



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

CUANTIFICACION DEL ACIDO FOLICO POR
METODOS QUIMICO Y MICROBIOLOGICOS
EN PREPARADOS FARMACEUTICOS.

234

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO
BIOLOGO

p r e s e n t a :

NORMA GABRIELA HERROZ ZAMORANO



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.

Desii
1976
FECHA
PROC. M-L

235



QUÍMICA

A MIS PADRES :

Con todo cariño y agradecimiento por
toda su ayuda y apoyo para realizar-
esta tesis, que tanto significa para -
ellos.

A MIS HERMANOS :

Estela y Oscar

Joaquin y Rosa Elena

Juan y Tony

Patricia y

Azucena.

A mi mejor Amigo y Compañero

de mi vida :

M A N O L O

A mi Hijo con todo mi amor :

E M M A N U E L .

Agradesco Atentamente, al Profesor .

Alfredo Echegaray Alemán - las facilidades otorgadas para llevar a cabo la realización e impresión de mi tesis profesional.

Quiero hacer patente mi más sincero agradecimiento a la profesora Ethelvina Medrano y al Profesor Jorge Soto S. por la revisión y colaboración en este trabajo profesional.

Con viva Gratitud a mis queridos Amigos que con sus -
amistosas consejos y sus preciosas informaciones, han contribui
do a la redacción de este trabajo.

Cecy y Fernando

Elizabeth Díaz Durán

Conchita Cayón

Hector Garcidueñas

Lolita y Rodrigo

Y a todas las personas que de algún modo colaboraron -
para lograr esta Tesis.

HONORABLE JURADO

PRESIDENTE: ETHELVINA MEDRANO DE JAIMES
VOCAL: ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN
SECRETARIO : JORGE SOTO S.
SUPLENTE: MARIO MIRANDA CASTRO
SUPLENTE: ALFREDO GARZON SERRA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :

COMPAÑIA MEDICINAL LA CAMPANA
S.A. DE C.V.

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DI
LA FACULTAD DE QUIMICA.
U.N.A.M.

I N D I C E

	Págs:
INTRODUCCION	2
GENERALIDADES	5
MATERIAL Y METODOS	13
CALCULOS	24
RESULTADOS Y CONCLUSIONES	49
RESUMEN	51
BIBLIOGRAFIA	52

INTRODUCCION.

La utilización de las vitaminas en forma creciente en los preparados farmacéuticos, hace que su determinación sea de mucha importancia en la Industria Farmacéutica así mismo origina numerosos problemas al químico analista ya que durante su almacenaje pierden su potencia o interaccionan dando origen a muchos productos que interfieren en su cuantificación.

Algunos de los factores que generalmente son responsables de la inestabilidad de las vitaminas en las preparaciones multivitamínicas son los siguientes:

1) El pH del medio, 2) La presencia de ciertos metales como el hierro, cobre, calcio y estabilizadores como anti-oxidantes, proteínas, aminoácidos etc. 3) La cantidad de agua presente en la preparación, 4) Las condiciones de almacenaje como son recipientes, temperatura, luz etc. 5) Incompatibilidad de las vitaminas.- Algunas veces los aditivos y diluyentes pueden alterar su estabilidad debido a que introducen agua, contaminantes del tipo de metales menores o modifican el pH.

Para la determinación de las vitaminas se han utilizado los métodos biológicos, químicos, fisicoquímicos y microbiológicos.

Los métodos biológicos fueron los primeramente utilizados y posteriormente se desarrollan los químicos, fisicoquímicos y microbiológicos para reemplazar a los primeros.

Para la clasificación del ácido fólico por el método biológico se utilizan los pollos como animales mas recomendables, ya que en ausencia del ácido los pollos tiene un desarrollo muy precario en comparación con los animales que reciben la dieta, son anémicos y se mueren rápidamente.

Dell y Hogan valoraron el ácido fólico en pollos empleando una dieta purificada.- Campell utiliza un método profiláctico basa-

do en la determinación del crecimiento y en la prevención de la anemia en pollos de un día de nacidos sometidos a una dieta basal.

Después de una serie de investigaciones a nivel de laboratorio, se ha podido establecer el efecto biológico que tiene el ácido fólico sobre el crecimiento de los pollos, de su acción antianémica y actualmente se considera que el ácido fólico es idéntico a está muy relacionado con el factor de maduración de los glóbulos rojos.

También se ha empleado en la dosificación del ácido fólico - como animales de experimentación a la rata y al mono.

Los métodos biológicos son utilizados cada vez menos debido a que son muy caros, tardados y con un límite de error grande cuando son comparados con otros métodos.- Se emplean cuando no se dispone de otra metodología para la cuantificación de las vitaminas.

Actualmente los métodos que se utilizan para la valoración del ácido fólico en preparados farmacéuticos se clasifican en la categoría siguientes:

- a) Métodos químicos y fisicoquímicos.
- b) Método microbiológico.

En la primera categoría se incluyen la determinación espectrofométrica por absorción de luz ultravioleta, el método fluorométrico, el método fotométrico que es el oficial de la U.S.P., cromatografía de capa fina, determinación polarográfica en solución amortiguadora a pH de 9.0 y determinación polarográfica en solución de hidróxido de tetrametilamonio. (4)

El método microbiológico utiliza como microorganismo de prueba a *Streptococcus faecalis*.

La presente tesis tiene como objeto realizar un estudio técnico-práctico comparativo, entre dos metodologías de cuantificación del ácido fólico en productos farmacéuticos, empleando para ello el método fotométrico y el método microbiológico, para tratar de saber cuál de los dos es el más recomendable para nuestro propósito.

II.- GENERALIDADES.-

La historia del ácido fólico es de especial interés debido a la amplia diversidad de investigaciones en los campos de la deficiencia humana, enfermedades, nutrición animal y microbiología, que dieron como resultado la identificación de una vitamina que es de importancia fundamental en el metabolismo celular.- Cronológicamente la historia empieza en 1931 cuando Wills describió una anemia macrocítica, generalmente en asociación con el embarazo en una mujer hindú en Bombay, la que respondió a la terapia con levadura autolizada.- Wills y sus asociados (1932) intentaron demostrar que una anemia macrocítica similar podría ser producida en monos al ser alimentados con la misma clase de dieta ingerida por sus pacientes.

Además encontraron que la anemia macrocítica respondía al extracto crudo de hígado pero no a la fracción que es efectiva en el tratamiento de la anemia perniciosa. La sustancia efectiva para el tratamiento de la anemia macrocítica nutricional presente en levaduras e hígado vino a ser conocida como factor Wills.- (-6-).- Un poco después, en los Estados Unidos, Day y asociados (1935-1938) descubrieron un síndrome de deficiencia en monos caracterizado por anemia, leucopenia, gingivitis y diarrea que podía ser corregido con levaduras de cerveza seca pero no por alguno de los componentes del complejo de la vitamina B.

Ellos llamaron al factor desconocido Vitamina M.

Por ese tiempo, Stokstad y Manning (1938) y Hogan y Parrott (1940) describieron un síndrome de deficiencia en pollos caracterizados por anemia y fallas en el crecimiento.- La deficiencia podía ser corregida por la ingestión de muchas sustancias incluyéndose entre ellas las levaduras.- Este grupo de científicos llamó a la sustancia presente en la dieta esencial, vitamina Bc. (- 16 -).

A principios de 1940, los microbiólogos se avocaron a la identificación de nutrientes esenciales para los microorganismos.- Snell y Peterson (1940) descubrieron que los extractos de hígado y otras sustancias al ser adsorbidas con carbón "Norita" en el eluido se encontraba un factor que era esencial para el crecimiento de Lactobacillus-casei.- Esta sustancia fué luego purificada por Stokstad (1943) y llamada factor L. casei.- En 1941, Mitchell y sus colaboradores aislaron de la espinaca un ácido de composición química desconocida que era necesaria para el crecimiento de Streptococcus lactis R., Streptococcus Faecalis y L. casei.- Reconocieron que éste ácido era similar en propiedades químicas y fisiológicas a los extractos esenciales para el crecimiento de microorganismos previamente obtenidos de hígado y levaduras.- Debido a que obtuvieron este ácido de las hojas de la espinaca lo llamaron ácido fólico (- 6 -).

Las investigaciones de los nutricionistas y los microbiólogos se interfirieron cuando Hutchings y asociados (1941) observaron que la vitamina Bc y el factor L. casei.- eran intercambiables en soportar el crecimiento bacteriano y aviario.

En 1943, Pffifner y colaboradores lograron cristalizar la vitamina Bc del hígado y demostraron la gran actividad del compuesto para estimular el crecimiento de L. casei y Streptococcus faecalis y en la corrección de la anemia y deficiencias nutricionales asociadas en el pollo.- Posteriormente, Day y asociados en 1945 administraron la vitamina Bc cristalina a monos con deficiencia en vitaminas M y corrigieron el desorden nutricional.

Al darse cuenta de que el factor L. casei, la vitamina M y la vitamina Bc eran probablemente idénticas, se acrecentó el interés en la identificación química de ésta vitamina.- El progreso fué interferido por la pequeña cantidad de material que podía ser obtenido de fuentes naturales tales como levaduras y el hígado.- Además

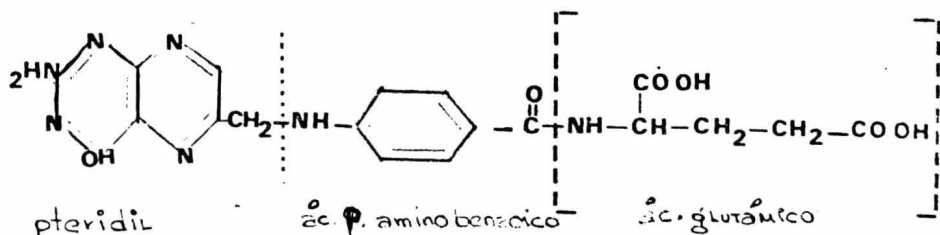
la investigación se complicó por inconsistencias en las reacciones metabólicas de microorganismos y pollos, un problema que finalmente fué resuelto al demostrarse la naturaleza múltiple de la vitamina.- - Afortunadamente los investigadores de los laboratorios Lederle descubrieron un microorganismo, perteneciente al género *Corynebacterium* - el cuál al crecer en medio de cultivo sintetizaba un factor necesario para el desarrollo de *Lactobacillus casei*.- Este factor fué llamado factor de fermentación para *L. casei*.- (Hutchings, 1944).- El factor fué identificado químicamente como un conjugado del ácido fólico (Angier, 1946).- (- 16 -).

Poco después, la vitamina Bc obtenida del hígado fué identificada como ácido fólico.- Posteriormente otro conjugado fué obtenido de la levadura.- La síntesis del ácido fólico fué llevada a cabo por (Angier, 1946) y la vitamina y sus conjugados estuvieron disponibles para someterse a estudios clínicos y biológicos.- De interés particular fué el hecho de que pudieron ser aliviados por tratamiento con la vitamina, las lesiones hematológicas aunque no las lesiones neurálgicas de la anemia perniciosa adisoniana.

Poco después del aislamiento y de la identificación química del ácido fólico, el factor de la anemia perniciosa del hígado fué también cristalizado.- Las variaciones de las funciones independientes e interdependientes de estas dos vitaminas en el metabolismo celular y la hematopoyésis ha probado ser una de las historias más fascinantes en la Biología.

El ácido fólico, N- ácido glutámico 4- (2 - a -
 mínimo 4- hidroxil -6- pteridil) -metil amino benzoil -
 -L (+), tiene la siguiente fórmula estructural :

NOTA : ver página siguiente.



Se encuentra en la naturaleza, solo y en forma de conjugados en la que más de una molécula de ácido glutámico está incorporada en la estructura.- El material obtenido de los cultivos de *Corynebacterium* sp. contiene tres variedades de ácido glutámico en la molécula y pueden ser designados químicamente como pteroil - γ - glutamil - γ - glutamil ácido glutámico.- El producto obtenido de la levadura contiene un total de siete moléculas de ácido glutámico y puede ser designado como: pteroil - hexa - γ - glutamil - ácido glutámico.- En las membranas de los mamíferos se encuentran presentes enzimas llamadas "conjugasas" que liberan ácido fólico de los conjugados.- Debido a que la mayoría del ácido fólico ingerido en la dieta es en forma conjugada, la importancia biológica de éstas enzimas es obvia.- Otra característica que es de interés biológico en la química del ácido fólico, es la presencia del ácido para-aminobenzóico y ácido glutámico en su molécula.- El ácido fólico es de gran importancia en el crecimiento y división de las células, incluyendo microorganismos.

La estructura compleja del ácido fólico ha dado a los químicos la oportunidad de sintetizar una gran variedad de análogos, varios de ellos actuando como antivitaminas.- La alta toxicidad de varios análogos atestiguan la importancia biológica de la vitamina.- Antagonistas del ácido fólico han encontrado una aplicación terapéutica limitada en el tratamiento de la anemia aguda.

A través de las numerosas investigaciones para llegar al conocimiento químico del ácido fólico últimamente convertido en un simple compuesto, se ha llegado a la conclusión de que no es necesario una terminología confusa. El término ácido fólico se introdujo por Mitchell (1941) para designar la sustancia aislada de la espinaca.

Cuando la relación entre el ácido fólico y la vitamina esencial en la nutrición animal fué establecida, el término ácido fólico fué retenido para designar a la vitamina y aún persiste a despecho de la identificación química de la vitamina como ácido pteroilglutámico.- Sin embargo, el ácido fólico es el nombre oficial para el ácido pteroilglutámico. (- 5 -).

El ácido fólico no presenta acciones farmacodinámicas, incluso en dosis muy por encima de la necesaria para prevenir la deficiencia nutricional.

Los síntomas de la deficiencia de ácido fólico son aparentemente el resultado de un defecto en el metabolismo celular relacionado muy estrechamente con la síntesis de los ácidos nucleicos.- Sin embargo, no es sorprendente encontrar que una deficiencia de ácido fólico se manifiesta primeramente por una falla en la maduración y división celular; la primera evidencia que es observada consiste en una hematopoyésis anormal.- En animales experimentales y en el hombre se observa leucopenia y anemia macrocítica con hiperplasia

megaloblástica de los ligamentos óseos.- Otros síntomas están relacionados al tracto gastrointestinal tales como diarrea y gingivitis.- En animales jóvenes la falta de crecimiento es un signo prominente de deficiencia de ácido fólico.

El requerimiento humano de ácido fólico para la dieta es desconocido; la síntesis de la vitamina por la microflora intestinal y el bajo nivel de excreción urinaria complican el problema.- En base a los requerimientos de otros animales se ha surgido ser de 0.1 a 0.2 mgm. diarios.

En la orina aparece muy poco ácido fólico en individuos con una dieta normal balanceada, siendo el total diarios menor a diez microgramos.- Se presume que el ácido fólico ingerido en la dieta es casi completamente utilizado o metabolizado.- El ácido fólico extradietario ingerido tal como es, ó en forma de algún derivado se absorbe rápidamente del tracto intestinal y de los sitios parentales de administración.- Después de la absorción, el ácido fólico es liberado de sus derivados por las enzimas presentes en los tejidos.- La cantidad del ácido que se excreta por la orina aumenta con la dosis, y solamente una pequeña fracción aparece en la orina después de la ingestión oral de 0.1 microgramos, pero puede excretarse un 90% por el riñón cuando se ingiere una dosis de quince microgramos La mayor parte del ácido fólico aparece en la orina después de seis horas y su excreción se completa hasta las veinticuatro horas.(-12-)

Una porción pequeña del ácido fólico ingerido aparece en la orina como ácido folínico.- La cantidad convertida a ácido folínico depende del contenido de ácido ascórbico en los tejidos y es muy reducida en individuos escorbúticos.-

El ácido fólico U.S.P. se presenta como polvo amarillo - naranja.- El ácido libre es ligeramente soluble en el agua, aunque forma sales con ácidos y bases lo que tienen una solubilidad en el agua limitada. la sal sódica es muy soluble en el agua.- Es insoluble en la mayoría de los solventes orgánicos como la acetona, éter, cloroformo y benceno, sin embargo es ligeramente soluble en etanol y butanol.-

Su fórmula empírica corresponde a $C_{19} H_{19} N_7 O_6$ con un peso molecular de 441.41

La Tiamina, Riboflavina, Acido Ascórbico, Colina Hipofosfito de calcio y el Sulfito de manganeso son responsables de su inestabilidad en preparaciones farmacéuticas. También es afectado considerablemente por el oxígeno atmosférico, la luz, el pH y la temperatura.

Las preparaciones oficiales son las cápsulas de ácido fólico U.S.P., ácido fólico U.S.P. inyectable y tabletas de ácido fólico U.S.P. Las cápsulas y las tabletas usualmente contienen cinco miligramos de la vitamina. (- 5 -)

Existen numerosas preparaciones en donde el ácido fólico se encuentra como un componente de mezclas multivitamínicas o está combinado con hierro y otras sustancias y es utilizado para estimular la hematopoyésis.

La aplicación terapéutica primaria del ácido fólico se enfoca al tratamiento de las anemias megaloblásticas que son el resultado de una deficiencia dietaria o por la absorción intestinal de ácido fólico.

Desafortunadamente, el ácido fólico se ha incorporado en las mezclas de drogas hematínicas.- Lo que se haya dicho acerca de las mezclas anti-anemia de acción rápida debe aplicarse particularmente al ácido fólico.- Si las preparaciones que contienen ácido fólico se usan indiscriminadamente para los tratamientos de anemias sin llevar diagnóstico diferenciales, los pacientes con anemias por deficiencia de hierro se tendrían que sujetar a inyecciones, en tanto que los pacientes con anemias perniciosas, que desprecien los exámenes hematológicos, pueden desarrollar lesiones neurológicas irreparables, antes de que la verdadera naturaleza de la enfermedad sea reconocida.

Es dudoso que el ácido fólico extradietario contribuya significativamente en el tratamiento de los estados nutricionales en la mayor parte de los individuos.- Si se sospecha deficiencia de ácido fólico, se podrá prescribir la vitamina como tal.- El uso generalizado de las mezclas multivitamínicas que contienen ácido fólico ha sido circunscrito a síndromes raros.- Los pacientes que desarrollaron una anemia perniciosa mientras toman esas preparaciones vitamínicas, pueden exhibir lesiones neurológicas sin la característica anemia macrocítica y así presentaran un problema de diagnóstico diferencial más difícil.

III.- MATERIAL Y METODOS.-

PARTE EXPERIMENTAL.-

En México desde hace tiempo se lleva a cabo la determinación de ácido fólico en productos farmacéuticos, siendo de especial interés para los laboratorios el método microbiológico en virtud de considerarse más preciso que el método químico, lo cual nos ha sugerido hacer una comparación real e imparcial entre los dos métodos para así poder demostrar la superioridad y eficacia de una técnica o de la otra.

Para poder llevar a cabo la comparación entre el método químico y microbiológico, fué necesario usar diferentes concentraciones de ácido fólico químicamente puro y cuantificarlo empleando el método químico y microbiológico, con el propósito de obtener una curva de referencia, curva que, nos permitirá observar las limitaciones de ambos métodos al mismo tiempo que sus ventajas y desventajas.

Las concentraciones de ácido fólico utilizadas variaron desde 0.0 mg/g, 0.25 mg/g, 0.50 mg/g, 0.75 mg/g, 1.0 mg/g, 1.5 mg/g, 2.0 mg/g, 2.5 mg/g, 3.0 mg/g, 3.5 mg/g, 4.0 mg/g, 4.5 mg/g, 5.0 mg/g, 5.5 mg/g, 6.0 mg/g, 6.5 mg/g y 7.0 mg/g.

Esta determinación se repitió tres veces con el fin de poder obtener una curva promedio que nos proporcionara datos confiables.

Después de obtenida dicha curva promedio, se procedió a la cuantificación del ácido fólico por el método químico y microbiológico.

gico en dos mezclas complejas de vitaminas preparadas en el laboratorio farmacéutico.- Estas mezclas contenían una cantidad conocida de ácido fólico a tres niveles de concentración que correspondían a el límite superior, el límite medio y el límite inferior de ácido fólico para cada una de las mezclas vitamínicas.

La mezcla número uno se preparó como sigue :

MATERIAS PRIMASCANTIDAD REQUERIDA :

	<u>UNIDAD</u>	<u>CANTIDAD</u>
Acido fólico U.S.P.....(**) g.		1.1873
Acido ascórbico U.S.P. (libre de- calcio)..... g.		37.5000
Fumarato ferroso U.S.P. granular.... g.		135.6000
Concentrado hepato gástrico..... g.		80.0000
Vitaminas B ₁₂ con concentrado de - factor intrínseco.....g.		4.0000
Lactos hidratada U.S.P.....(***) g.		49.1130
Triturado de vitamina B ₁₂(*) g.		4.6000

(*).....La cantidad deberá ajustarse para tener -
4.600 g. de 0.1 % de concentración

(**).....Ajustarse la cantidad para tener 1.100 -
g. de 100 % de concentración.

(***)..... Cantidad suficiente para 312.000 g.

Peso total de la mezcla 312.000 g.

La mezcla número dos se hizo de la siguiente manera :

MATERIAS PRIMAS :

CANTIDAD REQUERIDA :

	<u>UNIDAD</u>	<u>CANTIDAD</u>
Mononitrato de tiamina U.S.P	mg.	0.660
Riboflavina U.S.P.	mg.	0.440
Clorhidrato de pibidoxina (libre de calcio) U.S.P.	mg.	0.660
Acido fólico U.S.P.(*)	mg.	62.068
Carbonato de calcio U.S.P. denso	g.	120.000
Acido ascorbico U.S.P. (libre de calcio) . . .	g.	11.000
Niacinamida U.S.P. (libre de calcio)	g.	2.200
Acetato de vitamina "A" cristales. (**)	mg.	240.000
Sulfato ferroso U.S.P.	g.	21.000
Aceite mineral ligero N.F. viscosidad 70 cp. equivalente	mg.	0.400
Estearato de magnesio U.S.P.	g.	3.770
Vitamina A acetato + vitamina D ₂ 500,000 - A/ 50,000	g.	2.160
Triturado de vitamina B ₁₂(***)	g.	1.300
Azúcar en polvo con 3% de almidón(***)	g.	28.2657

- (*).....Ajustar la cantidad para tener 57,500 mg. de 100% de concentración.
- (**)...... Ajustar la cantidad para tener 240 mg. de 500.000 unidades de concentración.
- (***)...... La cantidad deberá ajustarse para tener 1.300 μ g. de 0.1 de concentración.
- (****)...... Poner la cantidad suficiente para 190.000 g.

Peso total de la mezcla 190 g.

Una vez preparadas las mezclas se procedió a efectuar las determinaciones siguientes :

- A) Determinación de ácido fólico en la mezclas vitamínicas por el método químico.
- B) Determinación de ácido fólico en la mezclas vitamínicas por el método microbiológico.
- A) Determinación de ácido fólico en las mezclas vitamínicas por el método químico :

El método siguiente (-20-) se emplea para la cuantificación de ácido fólico cuando es un ingrediente en preparaciones farmacéuticas conteniendo otros constituyentes activos.

Preparación del estandar :

Solución Stock :

Disolver lentamente alrededor de 50 mg. de ácido fólico U.S.P. del estandar de referencia pesado exactamente, con 50 mililitros de agua y 2 mililitros de amoníaco T.S. en una matríz volumétrico de 100 mililitros, cuando el ácido fólico está disuelto se afora al volúmen y se mezcla. Agregando previamente unas cuantas gotas de tolueno y colocando luego en un sitio frío y protegido de la luz.- El día del ensayo, diluir una cantidad medida de la solución Stock, con solución de fosfato de potasio dibásico (1:33) para obtener una concentración de 10 microgramos de ácido fólico por mililitro.- Calcular sobre base anhidra y obtener la preparación del estandar.

Preparación de la muestra problema:

Proceder de la misma manera, como en la preparación del estandar y obtener una solución de ácido fólico a una concentración de 10 microgramos por mililitro.

Procedimiento :

Prepara 4 recipientes adecuados, preferentemente vasos de 50 mililitros de capacidad con tapón esmerilado, o tubos de centrifuga y marcarlos respectivamente 1, 2, 3, y 4.

A cada uno de los tubos añadir 5 mililitros de la muestra problema.- A los tubos número 2 y 4, adicionar un mililitro de una solución de permanganato de potasio (1:250) y a los tubos número 3 y 4 agregar un mililitro de agua.- Dejar reposar de 2 a 3 minutos.

A partir de este punto tratar todos los tubos de manera semejante:

Añadir un mililitro de la solución de nitrito de sodio (1:50), más 1 mililitro de ácido clorhídrico 5 N y mezclar, dejar en reposo por 2 minutos; enseguida agregar 1 mililitro de la solución de sulfamato de amonio (1:20) y mezclar con movimiento giratorio hasta que todo el bióxido de nitrógeno este dispersado.

Añadir un mililitro de solución N- (1 naftil) etilendiamina - clorhídrica (1:1000) mezclar y dejar en reposo por 10 minutos.-
 Agregar 4 gramos de cloruro de sodio Q.P. y 10 mililitros de alcohol isobutílico.- Agitar vigorosamente por 2 minutos y centrifugar.-
 Decantar la capa clara sobrenadante y determinar la absorbancia en el espectrofotómetro (Beckman Modelo) a una longitud de 550 milimicras, usando como blanco una solución de alcohol isobutílico.

B) Determinación de ácido fólico en la mezcla vitamínica - por el método microbiológico.

El método microbiológico para el cuanteo de ácido fólico se basa en la inhibición o desarrollo de determinados microorganismos - en cuyo crecimiento es esencial el ácido fólico como son Lactobacillus casei y Streptococcus faecalis.

El microorganismo debe ser específico para la vitamina y sus propiedades bioquímicas deben permanecer constantes después de los subcultivos prolongados, además de poseer un crecimiento rápido. - El crecimiento de éstos microorganismos es proporcional a la concentración de ácido fólico en la muestra problema y se puede medir su crecimiento por turbidimetría o valorando la cantidad de ácido producido. (Acidimetría). (-1-) (-7-).

En todos los experimentos se preparó una curva estandar como señalan las técnicas de la AOAC, para ello se utilizaron dos microorganismos que se caracterizan por su especial desarrollo en presencia de ácido fólico, y éstos son :

- a) Streptococcus faecalis ATCC 8043
- b) Lactobacillus casei ATCC 7469

1.- Para el caso de Streptococcus faecalis se utilizó un medio de cultivo conocido como medio de ácido fólico AOAC Bacto, "Difco", que es un medio complementemente deshidratado para el ensayo microbiológico del ácido fólico, es preparado de acuerdo a las especificaciones de los métodos oficiales de análisis de la Asociación Oficial de Químicos Agrícolas (AOAC).- Está libre de ácido fólico pero contiene todos los otros factores necesarios para el crecimiento del Streptococcus faecalis ATCC 8043. La adición del ácido fólico en concentraciones específicas nos da un crecimiento de Streptococcus faecalis, que puede ser medido turbidimétricamente, o por acidimetría.

a) Preparación del inóculo.-

La cepa de Streptococcus faecalis se conserva por la inoculación en picadura en el medio de agar lactobacilo AOAC Bacto, "Difco", seguida de una incubación a 37° (+ 0.5 °C) durante diez y ocho a veinticuatro horas, posteriormente los tubos se almacenaron en el refrigerador.- Los cultivos frescos se prepararon cada semana y no son usados para la preparación del inóculo, si tienen más de una semana de antigüedad.- El inóculo para la prueba se preparó por subcultivos de la cepa de Streptococcus faecalis sembrada en un tubo contenido diez mililitros del medio de cultivo Caldo Lactobacilo

AOAC Bacto, "Difco".- Después de diez y ocho a veinticuatro horas de incubación a 37°C . se centrifugaron las células bajo condiciones asépticas y el líquido sobrenadante se decantó.- Las células se resuspendieron en diez mililitros de cloruro de sodio estéril al 0.85 %.

b) Preparación de la curva estandar.

Fué esencial que se hiciera una curva estandar para cada ensayo por separado, pues las condiciones de autoclave, temperatura de incubación, etc., pueden influenciar y alterar las lecturas de dicha curva.- La curva estandar se obtiene usando ácido fólico a concentraciones de : 0, 2, 3, 4, 6, 8, 10, milimicrogramos / mililitro.

Para esto se sigue la siguiente metodología :

Se disuelven cincuenta miligramos de ácido fólico de secado en treinta mililitros hidróxido de sodio 0.01N. y trescientos de agua destilada.- Se ajusta la reacción hasta un pH de 7.5 (+ 0.5) con ácido clorhídrico diluido y se agrega más agua destilada hasta dar un volumen final de quinientos mililitros, la solución resultante contendrá 100 microgramos de ácido fólico por mililitro.- Se coloca una alícuota de diez mililitros de la solución en un matríz aforado de 1000 mililitros y se agregan 500 mililitros de agua destilada ajustando la reacción hasta un pH de 7.5 (+0.5) con una solución de ácido clorhídrico y se afora a un litro.

La solución resultante contiene un microgramo de ácido fólico por mililitros.- Esta solución se diluye agregando 100 mililitros de la misma a 500 mililitros de agua destilada ajustando la reacción a un pH de 7.5 (+ 0.5) y diluyendo un litro con agua destilada para dar una solución base conteniendo 100 milimicrogramos / mililitro de ácido fólico.- La solución estandar para la prueba se hace diluyendo 10 mililitros de ésta solución base a 500 mililitros con agua -

destilada para dar una solución conteniendo 2 milimicrogramos / mililitro de ácido fólico.- Se colocan 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, mililitros por tubo de cultivo.

c) Cuantificación del ácido fólico.

Para rehidratar el medio de ácido fólico AOAC Bacto "Difco" se disuelven 11 gramos en 100 mililitros de agua destilada y se calienta hasta ebullición durante dos o tres minutos.- El ligero precipitado que se forma debe distribuirse perfectamente por agitación.- Se esteriliza en el autoclave por quince minutos a quince libras de presión (121°C.).

La inoculación del medio se realiza con la suspensión de Streptococcus faecalis en NaCl al 0.85 %, colocando 0.75 mililitros de la suspensión por cada 250 mililitros de medio.- A los tubos conteniendo cantidades de ácido fólico de la muestra estandar y problema, se les añade 5 mililitros del medio anteriormente inoculado y, se afora a diez mililitros con agua destilada.

Después, todos los tubos se someten a incubación a una temperatura de 37°C. durante diez y ocho horas al final de este tiempo se refrigeran los tubos por espacio de una hora con el objeto de detener el desarrollo microbiano y así proceder a las lecturas.

Las lecturas se hicieron en un fotocolbrimetro Spectronic 20, utilizando una longitud de onda de 620 milimicras.

Es muy importante correr una muestra en blanco, que se prepara colocando en un tubo cinco mililitros de agua destilada y cinco

mililitros de medio de ácido fólico AOAC Bacto "Difco" sin inocular, sometido a las mismas condiciones que los tubos con la muestra estandar y problema para con él, ajustar nuestro aparato a 100% de transmitancia al momento de efectuar nuestras lecturas.

2.- En el caso de Lactobacillus casei se utilizó la misma técnica que para Streptococcus faecalis a diferencia de los medios de cultivo empleados que fueron: el agar lactobacilo AOAC Bacto "Difco", para la conservación de la cepa, el caldo Lactobacilo AOAC Bacto "Difco" para preparar el inóculo veinticuatro horas antes de la prueba y el medio de Acido Fólico-Casei Bacto "Difco", como medio de cultivo para llevar a cabo la prueba.

C.- CALCULOS.-

a) En el método químico las operaciones que se llevan a cabo son las siguientes :

Se calcula la cantidad de ácido fólico en microgramos en cada mililitro de solución empleando la siguiente fórmula :

$$\frac{0.4 C(A_1 - A_3)}{(A_2 + A_3 - A_1 - A_4)}$$

en donde C es la concentración de ácido fólico en microgramos por mililitro de solución estandar y A₁, A₂, A₃, y A₄ designan la absorbancia de las soluciones en los respectivos tubos indicados.

a) Cálculos para el Método Químico.

1.- Partiendo de la base de que la mezcla vitamínica número uno contiene en cada gramo de problema 3,620 microgramos de ácido fólico, se llevan a cabo los siguientes cálculos :

3,620 mcg. de ácido fólico	_____	1000 mg. de Muestra
100 mcg.	_____	X

X = 27.62 mg. de mezcla con 100 mcg. de ácido fólico.

Si hacemos una dilución a 200 ml. con 55.2 mg. de mezcla, tendremos que en 55.2 mg. hay (200-mcg. de ácido fólico), por lo tanto :

$$\begin{array}{r} 55.2 \text{ mg. de muestra} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 200 \text{ ml.} \\ X \quad \quad \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1 \text{ ml.} \end{array}$$

SOLUCION A.

$X = 1$ mcg. de ácido fólico / mililitro.

Si de la solución A tomamos 5 mililitro y diluimos a 100, será:

$$\begin{array}{r} (5 \text{ mcg. de ácido fólico} \dots\dots\dots 5 \text{ ml.} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 100 \text{ ml.} \\ X \quad \quad \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1 \text{ ml.} \end{array}$$

SOLUCION B.

$X = 10$ mcg. de ácido fólico/mililitro de solución.

Esto es en cada mililitro de la solución B tendremos 10 microgramos de ácido fólico.

II.- La mezcla vitamínica número dos contiene en cada gramo de problema 0.30 mg. de ácido fólico, por lo tanto tendremos :

$$\begin{array}{ccc} 0.30 \text{ mg. de ácido fólico} & \underline{\hspace{2cm}} & 1000 \text{ mg. de mezcla.} \\ 100 \text{ mg.} & \underline{\hspace{2cm}} & X \end{array}$$

$X = 33.333 \text{ mg. de mezcla con } 100 \text{ mg. de ácido fólico.}$

Si hacemos una dilución a 1000 mililitros con 100 miligramos de muestra tendremos :

$$\begin{array}{ccc} 100 \text{ mg.} & \underline{\hspace{2cm}} & 1000 \text{ ml.} \\ X & \underline{\hspace{2cm}} & 1 \text{ ml.} \end{array}$$

SOLUCION A'

$X = 100 \text{ microgramos / mililitro de ácido fólico.}$

Si de la solución A' tomamos 10 mililitros (1000 mcg. de ácido fólico y lo llevo a 100 mililitros obtengo :

$$\begin{array}{ccc} 10 \text{ ml.} & \underline{\hspace{2cm}} & 100 \text{ ml.} \\ X & \underline{\hspace{2cm}} & 1 \text{ ml.} \end{array}$$

$X = 10 \text{ microgramos de ácido fólico / mililitro de solución.}$

III.- En lo que se refiere a la solución estandar se toman 50 miligramos de ácido fólico U.S. P. y se diluyen a 100 mililitros quedando de la siguiente forma:

$$\begin{array}{rcl} 50 \text{ mg.} & \underline{\hspace{2cm}} & 100 \text{ ml.} \\ X & \underline{\hspace{2cm}} & 1 \text{ ml.} \end{array}$$

SOLUCION "a".

$X = 500$ mcg. de ácido fólico / mililitro de solución.

Si de ésta solución tomamos 10 mililitros (5000 mcg. de ácido fólico) y aforamos a 100 mililitros, tendremos :

$$\begin{array}{rcl} 10 \text{ ml.} & \underline{\hspace{2cm}} & 100 \text{ ml.} \\ X & \underline{\hspace{2cm}} & 1 \text{ ml.} \end{array}$$

SOLUCION "b".

$X = 50$ mcg. de ácido fólico / mililitro de solución.

Si tomamos de ésta 2 mililitros y diluimos a 10 mililitros, - tendremos que en 2 mililitros hay (100 mcg. de ácido fólico), por lo tanto :

$$\begin{array}{rcl} 2 \text{ ml.} & \underline{\hspace{2cm}} & 100 \text{ ml.} \\ X & \underline{\hspace{2cm}} & 1 \text{ ml.} \end{array}$$

$X = 10$ mcg. de ácido fólico / mililitro de solución.

O sea en cada mililitro de la solución "c" tendremos 10 mcg. de ácido fólico.

b) Cálculos para el método Microbiológico :

En el método microbiológico los cálculos que se llevan a cabo son de la siguiente manera :

Lecturas de tubo en
el espectrofotómetro.

Lecturas de tubo en
el espectrofotómetro.

	<u>Concentración estandar estandar</u>		<u>Problemas</u>		<u>Problemas</u>	
	Nº 1	Nº 2	Nº 1	Nº 2		
	2 ng/ml.	2 ng / ml.	2 ng / ml.			
0	_____	A _____	A' _____	a _____	a' _____	
1	_____	B _____	B' _____	b _____	b' _____	
1.5	_____	C _____	C' _____	c _____	c' _____	
2	_____	D _____	D' _____	d _____	d' _____	
3	_____	E _____	E' _____	e _____	e' _____	
4	_____	F _____	F' _____	f _____	f' _____	
5	_____	G _____	G' _____	g _____	g' _____	

Estandar :

$$200 - (A + A') = Y_1$$

$$200 - (B + B') = Y_2$$

$$200 - (C + C') = Y_3$$

$$200 - (D + D') = Y_4$$

$$200 - (E + E') = Y_5$$

$$200 - (F + F') = Y_6$$

$$200 - (G + G') = Y_7$$

Problema :

$$200 - (c + c') = X_1$$

$$200 - (d + d') = X_2$$

$$200 - (e + e') = X_3$$

$$200 - (f + f') = X_4$$

Logaritmo natural :Mililitros estandar.

$$0 = K_1$$

$$1 = K_2$$

$$1.5 = K_3$$

$$2 = K_4$$

3	=	K ₅
4	=	K ₆
5	=	K ₇

A continuación se hace una curva estandar, como se muestra en la gráfica número uno, en la cuál se grafica el logaritmo natural contra el resultado obtenido del estandar, después se localizan los puntos problema para encontrar su logaritmo correspondiente.- - Ver la gráfica número dos.

Ahora se resta el logaritmo problema menos el logaritmo teórico :

$$K_3 - K_{3'} = X_{3'}$$

$$K_4 - K_{4'} = X_{4'}$$

$$K_5 - K_{5'} = X_{5'}$$

$$K_6 - K_{6'} = X_{6'}$$

$$X = \frac{X_3 + X_6}{4}$$

$$R = \text{antilogaritmo } (X = X_i) \text{ mg / g.}$$

Los resultados obtenidos tendrán que ser lo más parecidos a las cifras permitidas, que marcan las especificaciones, siendo en la

mezcla vitamínica número uno :

Límite inferior _____ 3.18 mg / g.

Límite medio _____ 3.62 mg / g.

Límite superior _____ 4.06 mg / g.

El límite teórico en gramos corresponde a 00362, siendo su logaritmo 3.5587.

Para la mezcla vitamínica número dos, los límites son :

Límite inferior _____ 0.27 mg / g.

Límite medio _____ 0.30 mg / g.

Límite superior _____ 0.33 mg / g.

El límite teórico en gramos corresponde a 0.00030 y su logaritmo es 4.4771.

Cálculos para el método Microbiológico.-

Mezcla vitamínica número uno.-

La mezcla vitamínica número uno, contiene en cada gramo de esta mezcla, 3.620 mcg. de ácido fólico, por lo tanto tendremos los siguientes cálculos :

$$\begin{array}{rcl} 3,620 \text{ mcg. de ácido fólico} & \underline{\hspace{2cm}} & 1000 \text{ mg. de -} \\ & & \text{Mezcla} \\ 200 \text{ mcg. de ácido fólico} & \underline{\hspace{2cm}} & X \text{ mg. de mezcla.} \end{array}$$

X = 55.24 mg. de mezcla (200 mcg. de ácido fólico), y si hacemos una dilución a 100 ml. nos dará el siguiente resultado :

$$\begin{array}{rcl} 55.24 & \underline{\hspace{2cm}} & 100 \text{ ml.} \\ X & \underline{\hspace{2cm}} & 1 \text{ ml.} \end{array}$$

SOLUCION "a"

X = 2 mcg. de ácido fólico / mililitro de solución.

Si de ésta solución tomamos 1 mililitro y lo aforamos a 100 mililitros, tendremos que en cada mililitro hay (2 mcg. de ácido fólico).

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ ml.} & \underline{\hspace{2cm}} & 100 \text{ ml.} \\ X & \underline{\hspace{2cm}} & 1 \text{ ml.} \end{array}$$

SOLUCION "b"

X = 0.02 mcg. de ácido fólico / mililitro de solución.

Si de la solución "b" tomamos 10 ml. y diluimos a 100 - mililitros, tendremos que en 10 mililitros (0.2 mcg / ml).

$$\begin{array}{rcl} 10 \text{ ml.} & \underline{\hspace{2cm}} & 100 \text{ ml.} \\ X & \underline{\hspace{2cm}} & 1 \text{ ml.} \end{array}$$

SOLUCION "c"

$X = 2 \text{ ng. de ácido fólico / mililitro de solución.}$

Por lo tanto en cada mililitro de la solución "c", tendremos : 2 ng. de ácido fólico.

Mezcla vitamínica número dos.-

La mezcla vitamínica número dos, contiene en cada gramo de problema 0.30 mg. de ácido fólico, por tanto se siguen los siguientes cálculos :

0.30 mg. de ácido fólico / 1 g. de mezcla.

300 mcg. de ácido fólico 1 g. de mezcla.

50 mcg. de ácido fólico X g. de mezcla.

$X = 0.16 \text{ g.}$ por lo tanto en 0.16 g. de mezcla tendremos -
50 mcg. de ácido fólico, esto es, si hacemos una dilución
tendremos :

0.16 g. de muestra 250 ml.

X 1 ml.

SOLUCION a'

$X = 0.200$ mcg. de ácido fólico / ml. de solución.

Si de aquí tomamos 5 ml. (1.0 mcg / ml) y los llevamos a 500 ml. tendremos :

$$\begin{array}{ccc} 5 \text{ ml.} & \underline{\hspace{2cm}} & 500 \text{ ml.} \\ X & \underline{\hspace{2cm}} & 1 \text{ ml.} \end{array}$$

SOLUCION b'

$X = 2$ mcg. de ácido fólico / mililitro de solución.

Haciendo una nueva dilución, tomando 10 ml. (20 mcg) y -
aforamos a 200 ml, tendremos :

$$\begin{array}{ccc} 10 \text{ ml.} & \underline{\hspace{2cm}} & 200 \text{ ml.} \\ X & \underline{\hspace{2cm}} & 1 \text{ ml.} \end{array}$$

SOLUCION c'

$X = 100$ ng. de ácido fólico / mililitro de solución.

Y por último si tomamos 10 ml. (1000ng) y los llevamos a -
500 ml. para tener :

$$\begin{array}{r} 10 \text{ ml.} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 500 \text{ ml.} \\ X \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1 \text{ ml.} \end{array}$$

SOLUCION d'

Por lo tanto en 1 ml. de la solución d' tendremos 2 ng. - de ácido fólico.

Solución estandar :

Si tomamos 50 mg. de ácido fólico USP y hacemos una dilución a 250 ml, tendremos :

$$\begin{array}{r} 50 \text{ mg.} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 250 \text{ ml.} \\ X \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1 \text{ ml.} \end{array}$$

SOLUCION A

$X = 200$ mcg. de ácido fólico / mililitro de solución.

Si de la solución A, tomamos 5 ml. y los diluimos a 500 - mililitros tendremos: Qué en cada 5 mililitros hay (10000 - mcg) entonces..

$$\begin{array}{r} 5 \text{ ml.} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 500 \text{ ml.} \\ X \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1 \text{ ml.} \end{array}$$

SOLUCION B

$X = 2$ mcg. de ácido fólico / mililitro de solución.

Si de la solución B tomamos 10 ml. (20 mcg.) y los diluimos a 200 ml, tendremos :

$$\begin{array}{ccc} 10 \text{ ml.} & \underline{\hspace{2cm}} & 200 \text{ ml.} \\ X & \underline{\hspace{2cm}} & 1 \text{ ml.} \end{array}$$

SOLUCION C

$X = 100$ ng. de ácido fólico / mililitro de solución.

Si de la solución C tomamos 10 ml, y aforamos a 500 ml, teniendo en cuenta que en 10 ml (1000 ng) tendremos :

$$\begin{array}{ccc} 10 \text{ ml} & \underline{\hspace{2cm}} & 500 \text{ ml.} \\ X & \underline{\hspace{2cm}} & 1 \text{ ml.} \end{array}$$

SOLUCION D

$X = 2$ ng. de ácido fólico / mililitro de solución.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto se trabajaron ambas técnicas simultáneamente durante 6 meses proporcionados los siguientes resultados :

CUADRO NUMERO UNO.
CUANTIFICACION DE ACIDO FOLICO QUIMICAMENTE PURO.
* POR LOS METODOS QUIMICO Y MICROBIOLOGICOS.

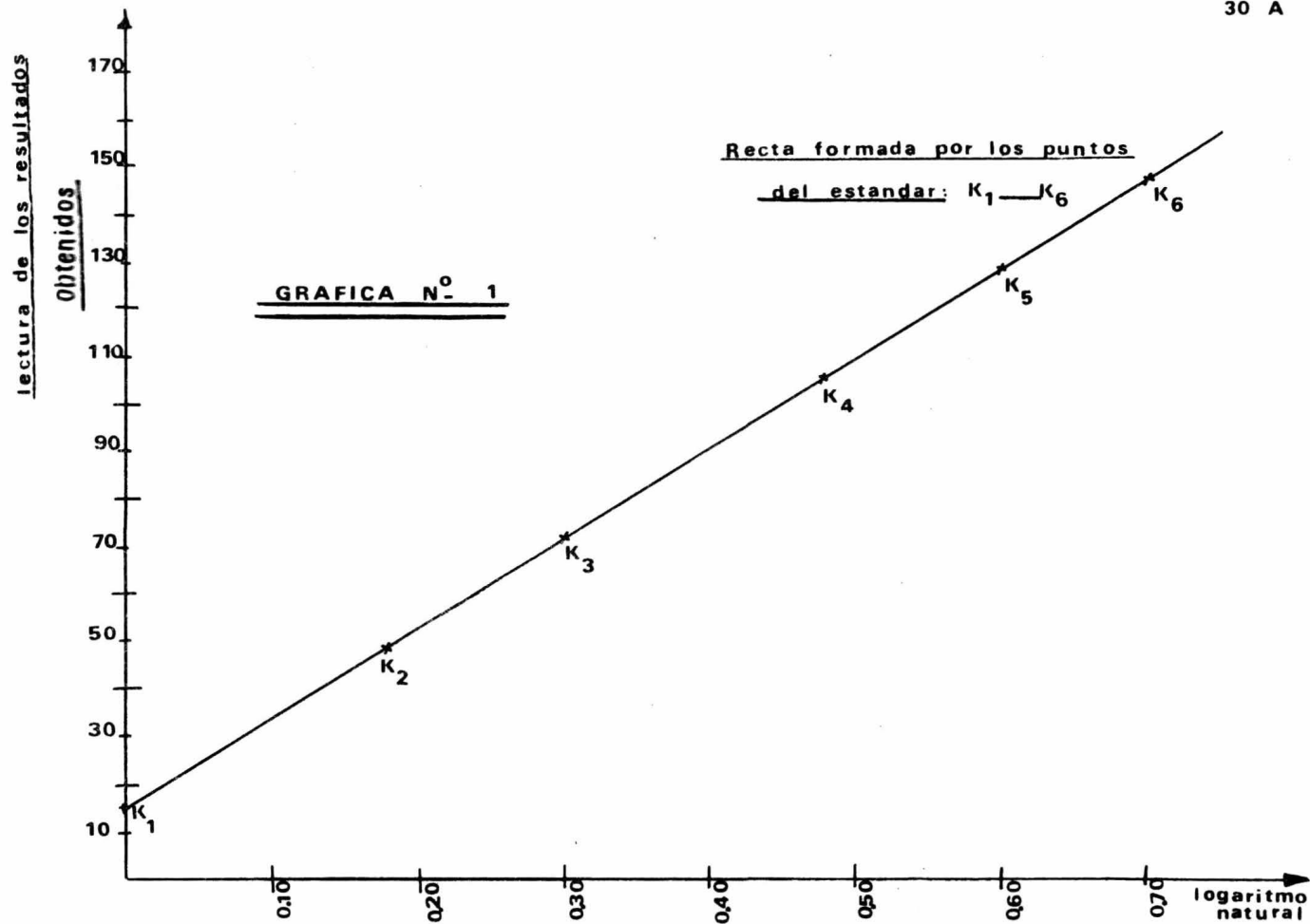
Acido fólico mg/g. de muestra Concentración Cono cida.	Acido Fólico mg/g. de muestra Utilizando: <u>Lactobacillus casei.</u>	Acido fólico mg/g de muestra Utilizando: <u>Streptococcus faecalis</u>	QUIMICO. Acido fólico mg/g de muestra
0.0	0.0	0.0	0.0
0.25	0.2503	0.2500	0.0
0.50	0.4997	0.5014	0.0
0.75	0.7560	0.7491	0.0
1.00	0.9994	1.0321	0.0
1.5	1.4980	1.5002	0.2010
2.0	2.0369	2.0034	0.8006
2.5	2.4900	2.5009	1.7968
3.0	2.9950	3.1250	2.5990
3.5	3.5412	3.5064	3.2103
4.0	4.0003	4.0558	3.9142
4.5	4.5792	4.5019	4.5019
5.0	5.0454	5.0129	5.1003
5.5	5.4910	5.5002	5.6008
6.0	6.0893	5.9758	6.1019
6.5	6.4879	6.4986	6.6032
7.0	6.9974	6.9896	7.2042

CUADRO NUMERO DOS.
CUANTIFICACION DE ACIDO FOLICO QUIMICAMENTE PURO.
POR LOS METODOS QUIMICO Y MICROBIOLOGICOS.

Acido fólico mg/g. de muestra Concentración Cono cida.	<u>MICROBIOLOGICOS.</u>		<u>QUIMICO</u>
	Acido fólico mg/g de muestra Utilizando: <u>Lactobacillus casei</u>	Acido fólico mg/g de muestra Utilizando: <u>Streptococcus faecalis.</u>	Acido fólico mg/g de muestra
0.0	0.0	0.0	0.0
0.25	0.2496	0.2501	0.0
0.50	0.5015	0.4997	0.0
0.75	0.7509	0.7497	0.0
1.0	1.0253	0.9970	0.0
1.5	1.5047	1.5028	0.2004
2.0	2.0018	1.9998	0.7994
2.5	2.5320	2.5160	1.8005
3.0	3.0172	2.9843	2.6066
3.5	3.4963	3.4995	3.2090
4.0	3.9816	4.0596	3.9019
4.5	4.5043	4.4891	4.4903
5.0	5.0293	4.9873	5.0998
5.5	5.4898	5.4827	5.6036
6.0	6.1235	6.2100	6.0987
6.5	6.4993	6.5100	6.5997
7.0	7.1032	7.0054	7.1935

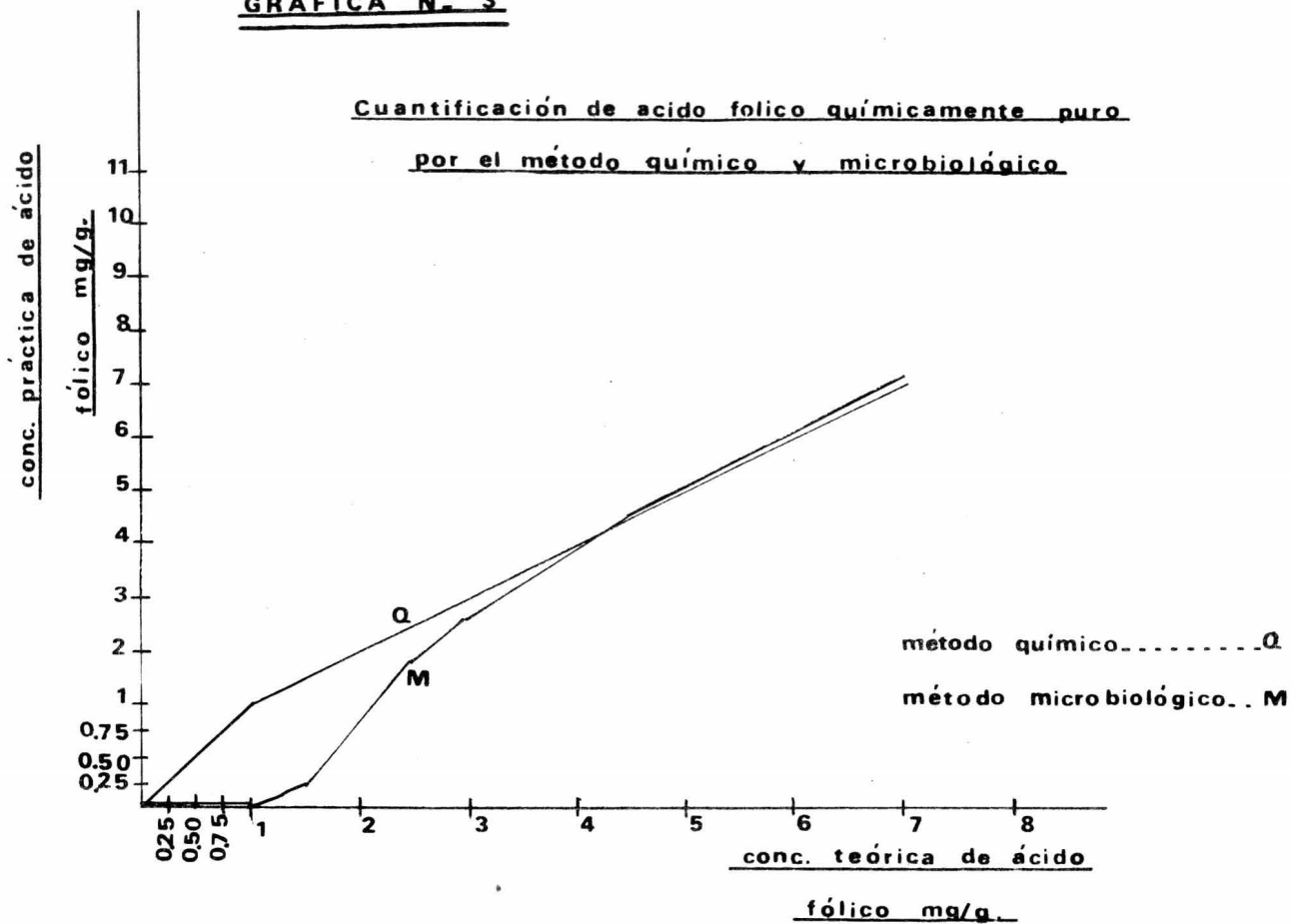
CUADRO NUMERO TRES.
 CUANTIFICACION DE ACIDO FOLICO QUIMICAMENTE PURO
 POR LOS METODOS QUIMICO MICROBIOLOGICOS.

Acido fólico mg/g de muestra Concentración Cono- cida.	MICROBIOLOGICOS.		QUIMICO..
	Acido fólico mg/g de muestra Utilizando: <u>Lactobacillus casei</u>	Acido fólico mg/g de muestra Utilizando: <u>Streptococcus Faecalis.</u>	Acido fólico mg/g de muestra
0.0	0.0	0.0	0.0
0.25	0.2501	0.2496	0.0
0.50	0.5002	0.5012	0.0
0.75	0.7485	0.7570	0.0
1.0	1.0056	1.0043	0.0
1.5	1.5032	1.5037	0.2103
2.0	2.1579	2.0564	0.8100
2.5	2.5180	2.4875	1.8143
3.0	3.1504	3.0025	2.6054
3.5	3.4895	3.5016	3.2042
4.0	4.0065	4.0537	3.8996
4.5	4.5490	4.5198	4.5008
5.0	5.0297	5.1832	5.1056
5.5	5.5212	5.4993	5.5992
6.0	5.9997	6.0109	6.1124
6.5	6.5001	6.5009	6.6008
7.0	7.0010	7.0132	7.2009



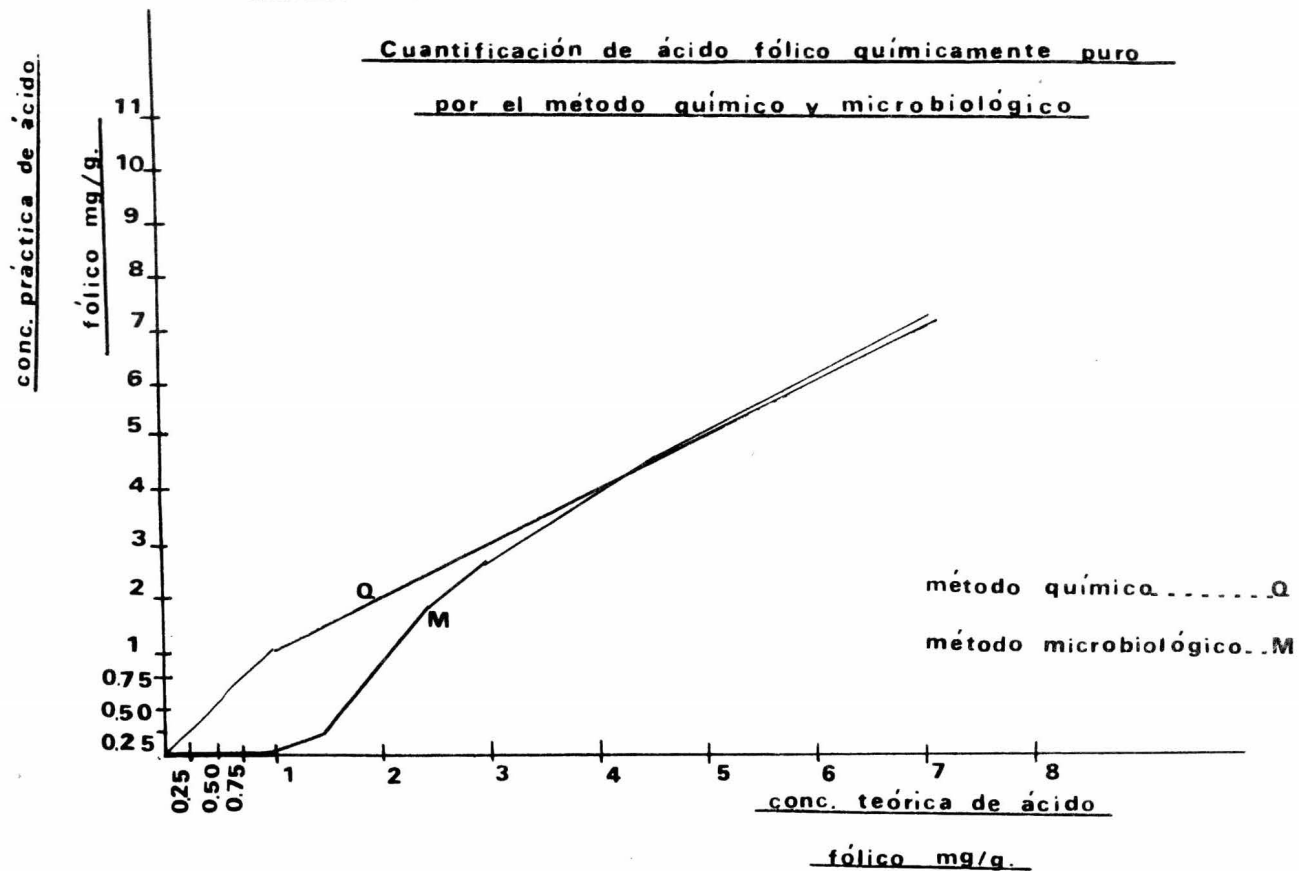
GRAFICA N.º 3

Cuantificación de ácido fólico químicamente puro
por el método químico y microbiológico.



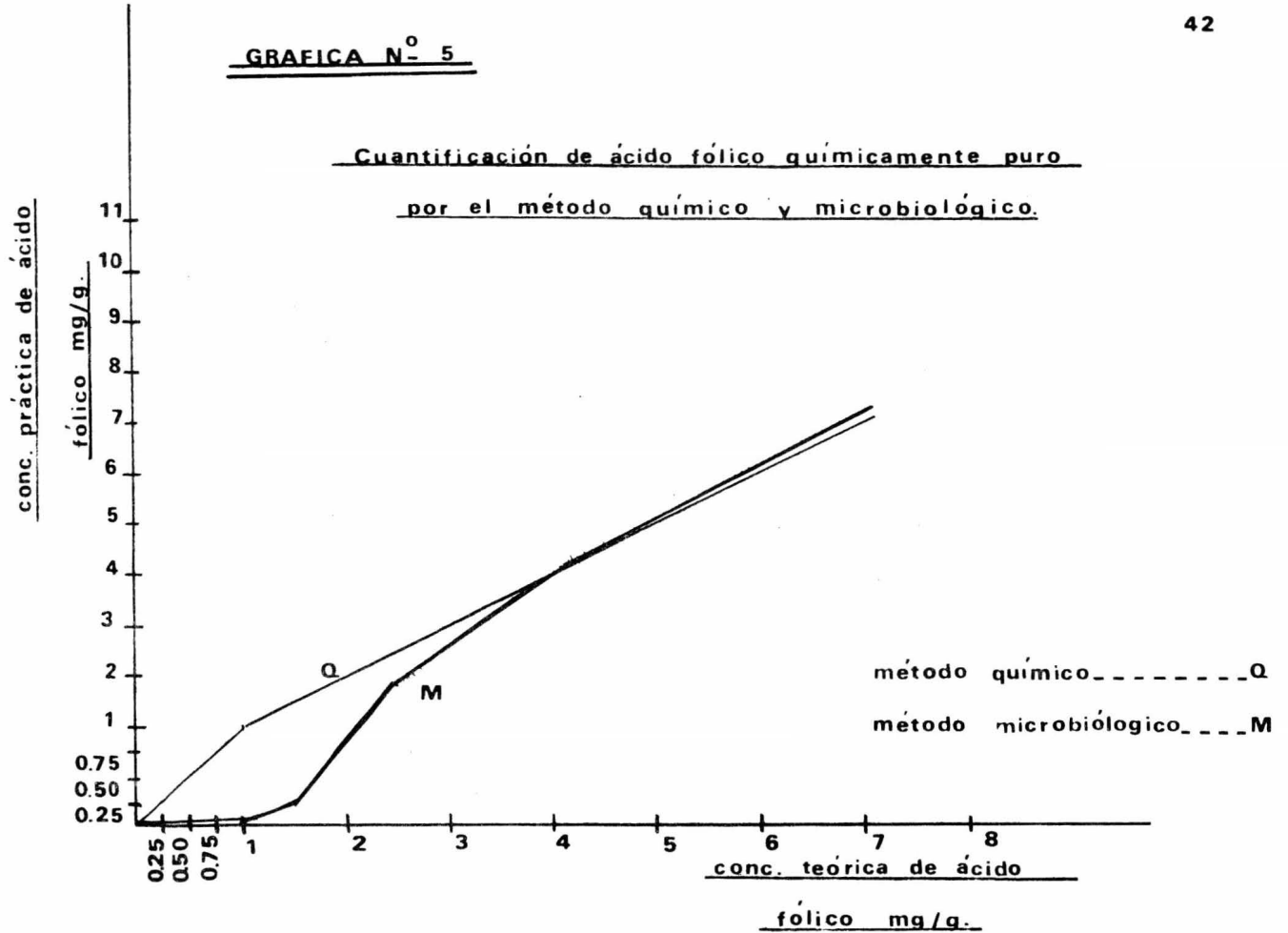
GRAFICA N° 4

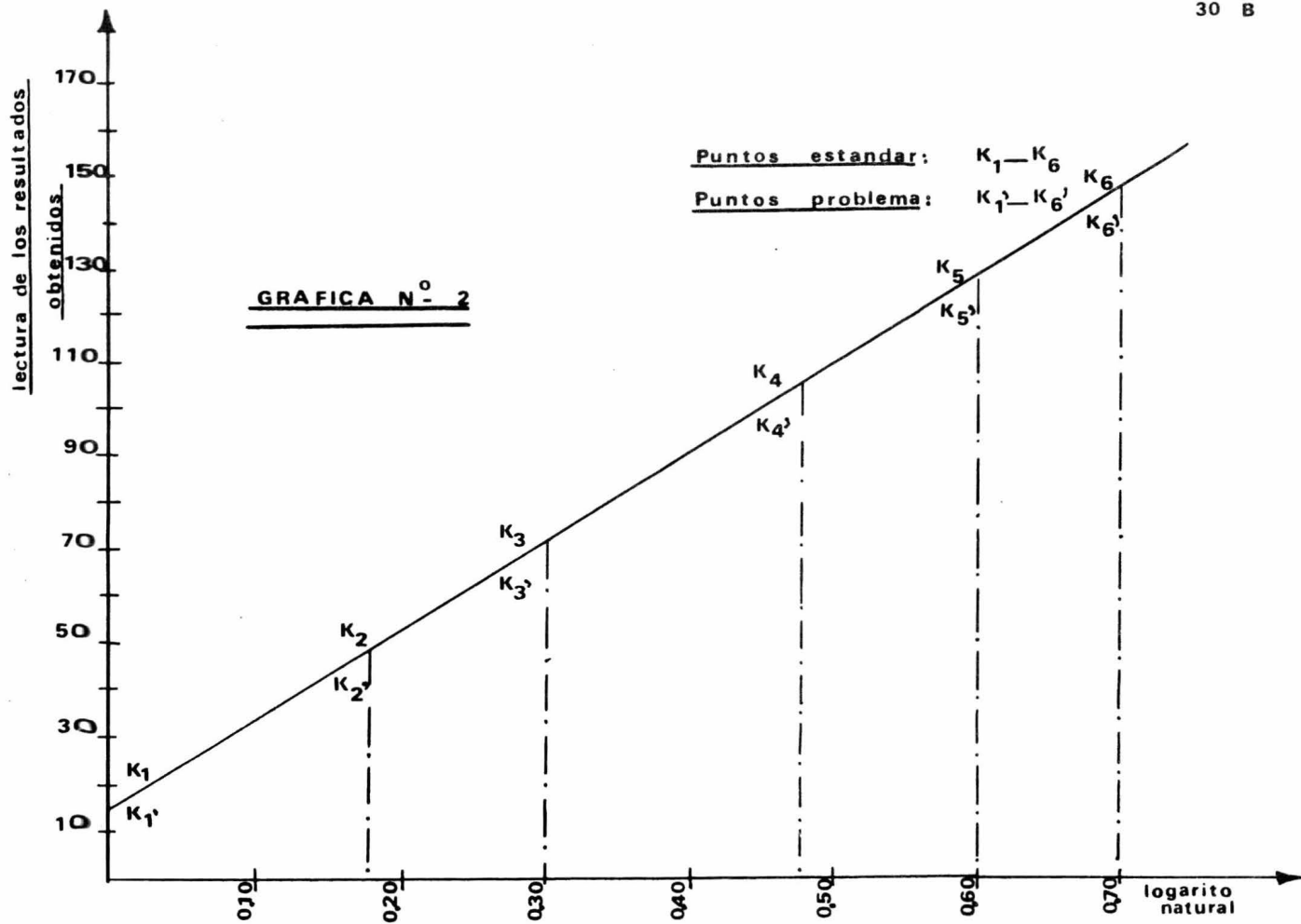
Cuantificación de ácido fólico químicamente puro
por el método químico y microbiológico



GRAFICA N^o 5

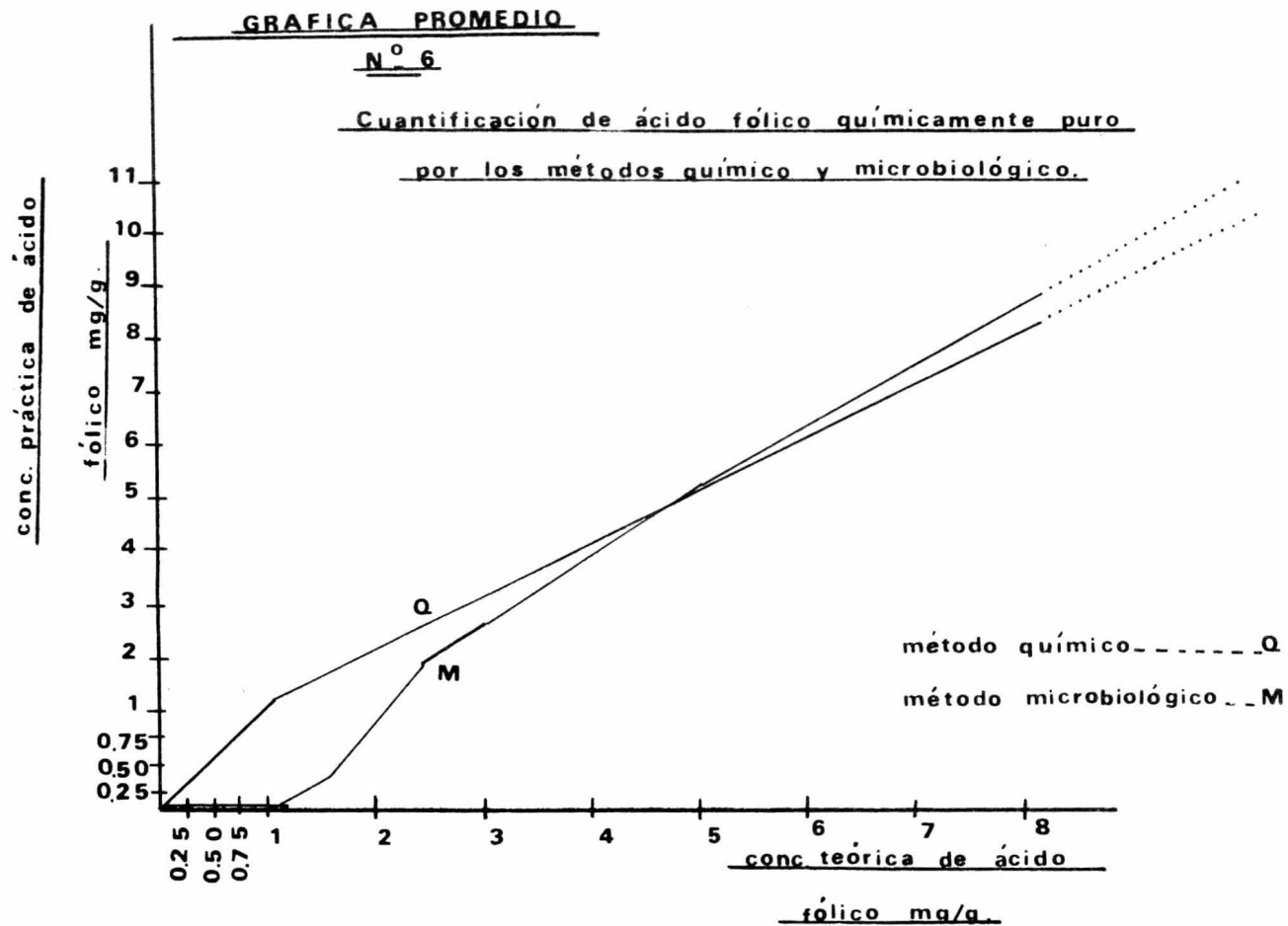
Cuantificación de ácido fólico químicamente puro
por el método químico y microbiológico.





CUADRO NUMERO CUATRO.
CUANTIFICACION DE ACIDO FOLICO QUIMICAMENTE PURO.
POR METODOS QUIMICO Y MICROBIOLÓGICOS.

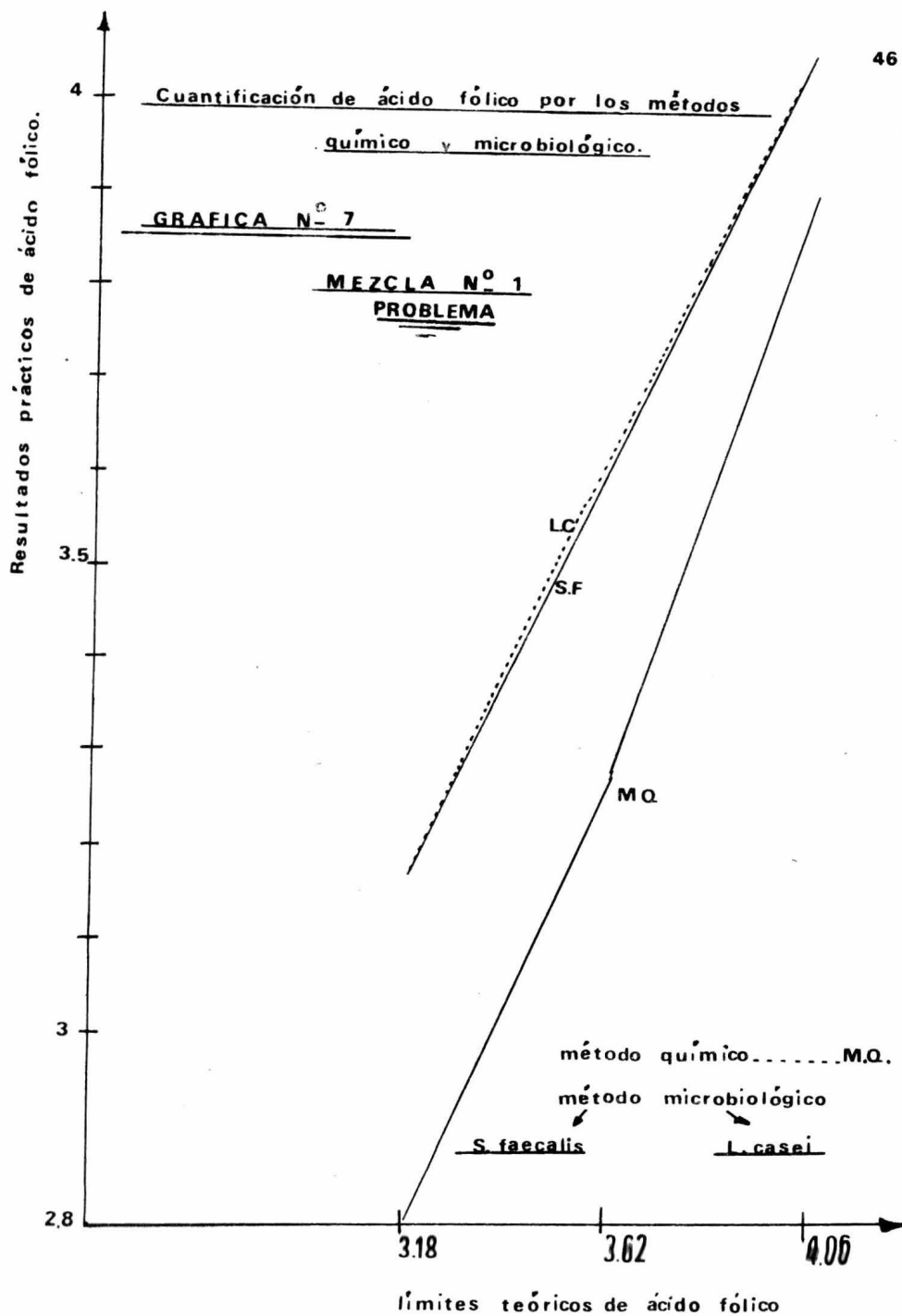
Acido fólico mg/g de muestra Concentración Cono cida.	<u>MICROBIOLÓGICOS.</u>		QUIMICO.
	Acido fólico mg/g de muestra Utilizando: <u>Lactobacillus casei</u>	Acido fólico mg/g de muestra Utilizando: <u>Streptococcus faecalis.</u>	Acido fólico mg/g de muestra
0.0	0.0	0.0	0.0
0.25	0.2500	0.2503	0.0
0.50	0.5004	0.5008	0.0
0.75	0.7518	0.7519	0.0
1.0	1.0101	1.0111	0.0
1.5	1.5019	1.5022	0.2038
2.0	2.0655	2.0198	0.8033
2.5	2.5133	2.5014	1.8038
3.0	3.0542	3.0370	2.6003
3.5	3.5090	3.5025	3.2078
4.0	3.9961	4.0563	3.9052
4.5	4.5441	4.5036	4.4975
5.0	5.0348	5.0611	5.1019
5.5	5.5000	5.4940	5.6012
6.0	6.0708	6.0655	6.1043
6.5	6.4957	6.5031	6.6009
7.0	7.0338	7.0027	7.1995



CUADRO NUMERO CINCO.
CUANTIFICACION DE ACIDO FOLICO EN LA MEZCLA VITAMINICA.
NUMERO UNO, POR EL METODO QUIMICO Y MICROBIOLOGICO.

MICROBIOLOGICO	QUIMICO	LIMITES.
Acido fólico mg/g de muestra Utilizando: <u>Lactobacillus casei</u>	Acido fólico mg/g de muestra Utilizando: <u>Streptococcus faecalis</u>	Acido fólico mg/g de muestra

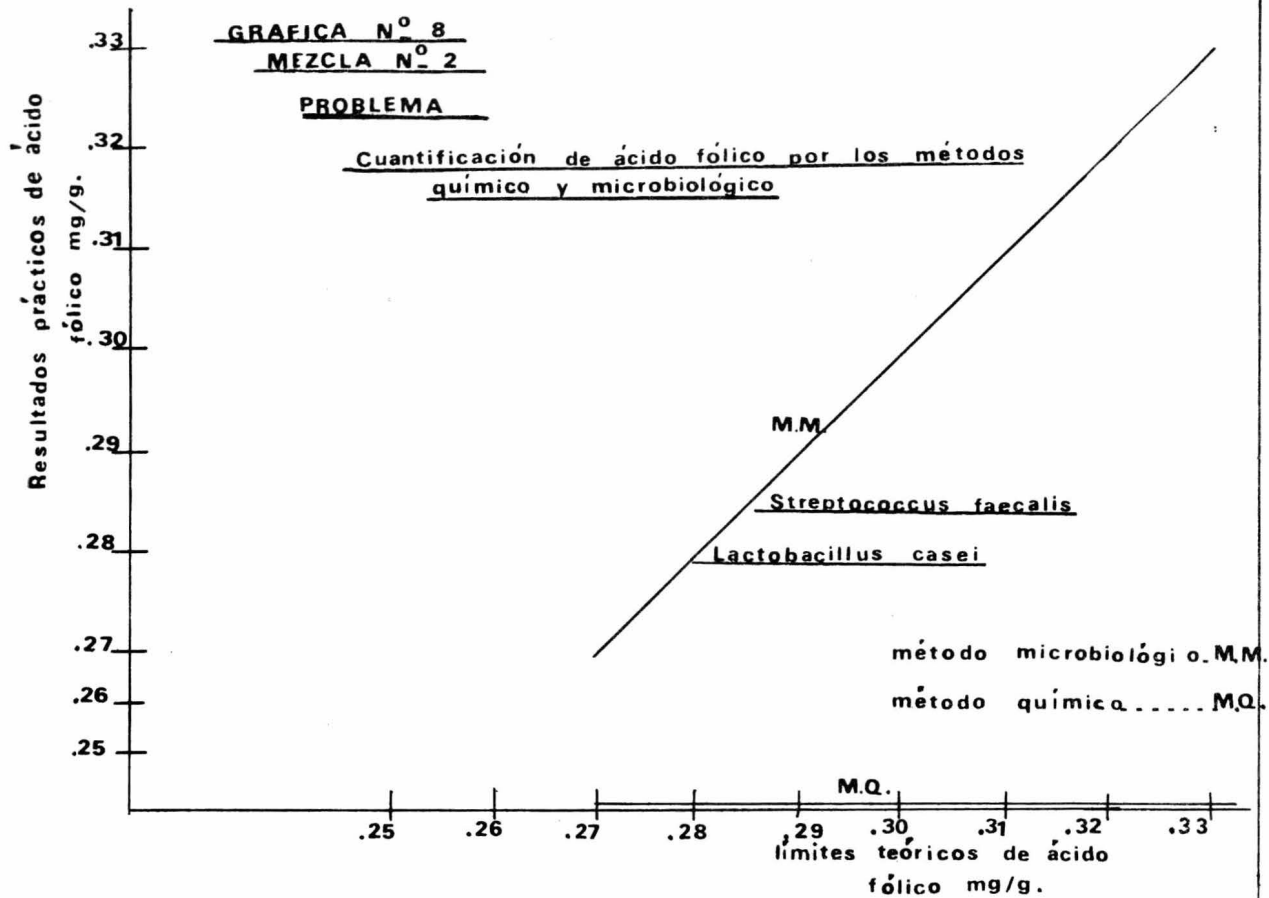
<u>Lactobacillus casei</u>	<u>Streptococcus faecalis</u>		
3.175	3.180	2.6964	
3.203	3.196	2.5510	
3.186	3.201	2.6599	3.18 Inferior
3.195	3.187	3.1110	
3.187	3.177	2.9999	
Promedio: 3.189	Promedio: 3.188	Promedio: 2.8036	
3.616	3.582	2.8000	
3.617	3.620	3.3768	
3.623	3.623	3.5700	3.62 Medio
3.639	3.632	3.3700	
3.644	3.647	3.2816	
Promedio: 3.627	Promedio: 3.620	Promedio: 3.2796	
4.052	4.058	3.9026	
4.058	4.058	3.9493	
4.061	4.058	3.8541	4.06 Superior
4.065	4.064	3.9576	
4.070	4.067	3.8541	
Promedio: 4.061	Promedio: 4.061	Promedio: 3.9035	



CUADRO NUMERO SEIS.
 CUANTIFICACION DE ACIDO FOLICO EN LA MEZCLA VITAMINICA.
 NUMERO DOS, POR EL METODO QUIMICO Y MICROBIOLOGICO.

MICROBIOLOGICOS	QUIMICOS		LIMITES.
Acido fólico mg/g de muestra Utilizando: <u>Lactobacillus casei</u>	Acido fólico mg/g de muestra Utilizando: <u>Streptococcus faecalis.</u>	Acido fólico mg/g de muestra	Acido fólico mg/g de muestra

0.2705	0.2714	X	
0.2699	0.2699	X	
0.2700	0.2703	X	0.27 Inferior
0.2699	0.2694	X	
0.2703	0.2712	X	
Promedio: 0.2701	Promedio 0.2704		
0.2994	0.3016	X	
0.3000	0.3018	X	
0.3002	0.3006	X	0.30 Medio
0.2996	0.3002	X	
0.3001	0.3001	X	
Promedio: 0.2998	Promedio: 0.3010		
0.3300	0.3311	X	
0.3300	0.3293	X	
0.3300	0.3286	X	0.33 Superior
0.3294	0.3308	X	
0.3306	0.3301	X	
Promedio: 0.3300	Promedio: 0.3299		



IV.- RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos por triplicado al cuantificar el ácido fólico químicamente puro, por los métodos químicos y microbiológicos, se pueden observar en los cuadros número uno, dos y tres, (gráficas tres, cuatro y cinco). En el cuadro número cuatro (gráfica seis), se reporta el valor promedio obtenido de éstas tres repeticiones, y puede observarse que el ácido fólico no puede determinarse por el método químico; a concentraciones de 0 a 1.0 miligramos / gramo, en concentraciones comprendidas entre 1.5 mg/g a 3.5 mg / g, los valores obtenidos son más bajos que los reales y en el rango de 4.5 a 7.0 mg / g. son ligeramente mayores que los valores reales.

En cuanto al método microbiológico es bastante exacto y funciona bien en el intervalo de concentración de ácido fólico de 0 a 7.0 mg / g. de muestra.

Respecto a la determinación del ácido fólico en la mezcla vitamínica número dos (cuadro número seis, gráfica número ocho), al emplear el método químico no se pudo cuantificar esta pequeña cantidad de ácido fólico por no ser sensible el método, en cambio cuando se utiliza el método microbiológico con los dos microorganismos, la prueba responde muy bien.

En la mezcla vitamínica número uno, en cuya composición existe una concentración mayor de ácido fólico, los resultados obtenidos de la cuantificación por el método químico, indican que son menores que los valores conocidos y de nuevo se demuestra que el método microbiológico funciona muy bien a estas concentraciones de ácido fólico. (Observar el cuadro número cinco y la gráfica número siete).

Al analizar los resultados obtenidos se observa que los dos métodos utilizados presentan ventajas y desventajas.

Entre las ventajas del método químico se encuentran: 1º su rapidez, ya que puede llevarse a cabo en un período de tiempo de 3 a 4 horas, 2º su utilización en el control analítico de materia prima en donde se emplean altas concentraciones de ácido; pero a cambio de esto tiene varias desventajas como son: 1º la falta de sensibilidad a pequeñas concentraciones de ácido fólico, 2º los errores en su determinación son más grandes que en los métodos microbiológicos, 3º no son específicos ya que las reacciones coloridas que son las bases de los métodos espectrofotométricos, fluorométricos y fotométricos cuantitativos únicamente indican ciertos grupos funcionales o parte relevante de la molécula del ácido fólico, 4º presentan problemas de interferencia con diversos componentes de la preparación multivitamínica.

Los métodos microbiológicos tienen como ventajas su gran sensibilidad, son altamente específicos y algunas veces no presentan problemas de interferencia con otras sustancias de la preparación vitamínica, su desventaja principal es el tiempo, ya que son más tardados que los métodos químicos.

En cuanto a nuestro trabajo encontramos que en la dosificación del ácido fólico en mezclas multivitamínicas, se puede utilizar indistintamente a Streptococcus faecalis o a Lactabacillus casei.

V.- R E S U M E N

En el presente trabajo, se comparan dos metodologías de cuantificación del ácido fólico en preparaciones multivitamínicas empleando para ello un método químico de tipo fotométrico (método del U.S.P.) y el método microbiológico.

Los resultados encontrados indican que en las preparaciones farmacéuticas utilizadas, el método químico no es sensible a bajas concentraciones de ácido fólico comprendidas entre 0.27 - 0.33 miligramos por gramo de muestra, en la concentración de 3.18 a 4.06 los valores obtenidos son más bajos que los valores reales, pudiendo deberse esto posiblemente a alguna interferencia de los componentes de la preparación.

El método microbiológico es muy exacto y trabaja perfectamente en el rango de concentración de las preparaciones farmacéuticas analizadas de 0.27 a 0.33 miligramos por gramo de muestra, además se puede utilizar indistintamente como microorganismo pruebe en la determinación a Streptococcus faecalis o a Lactobacillus casei.

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

- 1.- Association of vitamin chemists.
Methods of vitamin assay
2d. ed., rev. and supplemented.
Interscience Publishers, New York, U.S.A. (1951).
- 2.- Comprehensive Biochemistry.
Volume 11: water - soluble vitamins, hormones, antibiotics.
Edited By: Marcel Florkin and Elmer H. Stotz.
Elsevier Publishing Company
Amsterdam. London. New York. (1963).
- 3.- Conn Eric E.
Bioquímica Fundamental. Pags: 183 a la 187
Segunda edición.
Ed. Limusa.
México (1973)
- 4.- Conn, M.D. Howard F.
Terapeutica 1966
pags: de la 231 a la 305
Salvat Editores, S.A.
Barcelona, España, (1966)
- 5.- Cooper L.F., Barber, E. M., Mitchell, H.S.,
Rynbergen, H. J. and Greene, J.C.
Nutrición y dieta.

14a. ed. Ed. Interamericana, S.A. México (1966).
- 6.- Day, P.L. Langston, W. C. and C. F. Shukers.
Leukopenia and anemia in monkey resulting from
vitamin deficiency.
capitulo.9, Págs: 637 a la 644
Ed. Jour. of Nutrition. U.S.A. (1935).

- 7.- Difco- Supplementary Literature 1972- Difco laboratories
Media for the Microbiological Assay of vitamins and Amino-
acids.
Detroit Michigan U.S.A. (1972).
- 8.- Font Quer P.
Medicamenta.
Volumen 1, Pags: 91 a la 95, Séptima edición.
Ed. Labor, S. A.
México (1969).
- 9.- Goodman, Louis S. M. A., and Gilman Alfred
The Pharmacological basis of therapeutics.
Pags: 1706 a la 1710 y de la 1429 a la 1431, Second Edition.
Ed. The Macmillan Comapany.
New York, N.Y U.S.A. (1955).
- 10.- Guyton Arthur C.
Fisiología humana
Pags: 395 a la 402; tercera edición.
Ed. Interamericana, S. A. de C. V.
México (1969).
- 11.- Hogan, A. G. and E. M. Parrott.
Anemia in chicks caused by vitamin deficiency.
Pág Págs: 132, 507 a la 517.
Ed. Jour. of. Chem.
U.S.A. (1940).
- 12.- Hutchings, B. L. Bohonos, N., Hegsted, D. M. Elvehjem.
C. A. and W. H. Peterson.
Relation of a growth factor required by *Lactobacillus*
casei to the nutrition of the chick
Págs: 140 681 a la 682
Ed. Jour. of. Chem.
U.S.A. (1941).

- 13.- Knaysi, George.
A morfological study of *Streptococcus faecalis*
Volumen 42, capítulo V, Págs: 575 a la 586
Ed. Jour. of Bact.
U.S.A. (1941)
- 14.- Manzur U.L.H.
Assay of Vitamins in pharmaceutical preparations.
Ed. John Wiley and Sons. Inc.
New York. U.S.A. (1973).
- 15.- Mitchell, H.k., Snell, E. E. and R. J. Williams.
the concentration of "folic acid".
pags: 63, 2284.
Ed. Jour of. Am. Chem Soc.
U.S.A. (1941).
- 16.- Official Methods of analysis of the Association of official -
analytical chemists.
Vitamins other nutrients, chemical methods,
Alan Senzel and Helen Reynolds, Associate Editors.
Douglas L. Park, Assistant Editor.
Washington, D.C. U.S.A. (1975).
- 17.- Romine, Marjorie K.
The folic acid activity of human livers an measured with -
Lactocabillus casei.
Jour Vitaminol. 6, (3), Págs: 196 a la 201
Osaka, Japón (1960),
- 18.- Rosenberg, Hans Reinhard
Chemistry and physiology of the vitamins..
Págs: 525 a la 528.
Interscience - Publishers. Inc.
New York. N.Y. U.S.A. (1945).

- 19.- Schweigert. B.S.
Folic acid metabolism studies. 111. Intravenous
administration of pteroylglutamic acid and pteroyl-triglutamic
acid.
Vol. 33 Págs: 1271 a la 1275.
Jour of. Lab. & Clin. Med., (1948).
- 20.- The pharmacopeia of the United States of America
Págs: 906 a la 907.
Eighteenth Revisión.
Washington D. C. U.S.A.
- 21.- Vitaminas and hormones.
Advances in research and aplicaciones. U. I. 1943
V. ilus (pte-col).
Academic press Inc.
New York. U.S.A. (1943).
- 22.- Vitamin Methods
Vol 11 Págs: 232 a la 238
Edited by: Dr. Paul Gyorgy Academic Press Inc., Publishers
New York, N. Y. U.S.A. (1951),
- 23.- W.H. Sebrell. Jr. and Harris. S. Robert.
Chemistry, Physiology, Pathology
Vol. III
Academic Press, Inc Publishers.
New York. N.Y. U.S.A. (1954).
- 24.- Welch. A.D. and R.W. Heinle
Hematopoietic agents in macrocytic anemias
Vol 3, Pág. 345 a la 411
Pharmacol. Rev., 1951
U.S.A. (1951).