

I. INTRODUCCIÓN

La cianocobalamina y el ácido fólico son vitaminas indispensables para el correcto desarrollo del ser humano. La primera, actúa como coenzima en varias funciones metabólicas, incluido el metabolismo de grasas, carbohidratos y síntesis de proteínas. Es necesaria para el crecimiento y replicación celular, hematopoyesis y síntesis de nucleoproteínas y mielina, por su efecto sobre el metabolismo de la metionina, el ácido fólico y el ácido malónico. El ácido fólico es necesario para la eritropoyesis normal y para la síntesis de nucleoproteínas.

El ácido fólico y la vitamina B12 (cianocobalamina) tienen funciones cooperadas en la síntesis de nucleótidos purínicos y pirimidínicos, y en la obtención de metionina. El déficit de ácido fólico y B12 tiene su causa más común en una alimentación insuficiente, pudiendo aparecer desórdenes polineuropáticos y neuropsiquiátricos. Debido a lo anterior, muchas veces es necesario complementar la dieta con suplementos multivitamínicos que contengan ambas vitaminas.

En Guatemala, existen empresas farmacéuticas fabricantes de productos que contienen ácido fólico y cianocobalamina. Dicha elaboración, debe contar con sistemas de evaluación y alto control de calidad, por lo que surge la necesidad de implementar un método de análisis para la cuantificación de ambas vitaminas en dichos productos.

La cantidad de ácido fólico y cianocobalamina en las formulaciones farmacéuticas es baja y debido a esto, los ensayos inmunoenzimáticos e incluso la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), no devuelven resultados satisfactorios. Gracias a lo anterior, la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) ha reconocido que el análisis microbiológico es la metodología oficial y vigente para cuantificar las vitaminas antes mencionadas, ya que es la más sensible.

Este trabajo de investigación tiene como objetivo principal implementar y validar, en una industria farmacéutica líder, métodos de análisis microbiológico para la cuantificación de ácido fólico y cianocobalamina en cápsulas que contienen dichos micronutrientes.

Los parámetros fundamentales utilizados para la validación de los métodos de análisis (según la USP) fueron exactitud, precisión intermedia, repetibilidad, especificidad y linealidad. Así mismo, se determinó el porcentaje de recuperación de ambos métodos. Para que cada parámetro

fuera aceptado, se establecieron criterios de aceptación, los cuales se cumplieron y, por lo tanto, se logró la validación de las metodologías de análisis en estudio.

Para comprobar si el método de análisis microbiológico era el adecuado para la cuantificación de ácido fólico, éste se empleó para determinar la concentración de dicha vitamina en tabletas, concluyendo así que el método se puede implementar en distintas formas farmacéuticas.

En conclusión, se comprobó que los métodos de análisis microbiológico en estudio son adecuados para los requerimientos que se necesitan cumplir en la empresa farmacéutica donde se realizó el trabajo de investigación, respecto a cada micronutriente; es decir, se determinó que las metodologías empleadas son eficientes para cuantificar tanto ácido fólico como cianocobalamina en cápsulas.

II. ANTECEDENTES

Las cápsulas de vitaminas hidrosolubles con minerales contienen una o más de las siguientes vitaminas hidrosolubles: ácido ascórbico o su equivalente como ascorbato de calcio o ascorbato de sodio, biotina, cianocobalamina, ácido fólico, niacina o niacinamida, ácido pantoténico, clorhidrato de piridoxina, riboflavina y clorhidrato de tiamina o mononitrato de tiamina, además de uno o más minerales derivados de sustancias generalmente reconocidas como inocuas, que suministren uno o más de los siguientes elementos en forma ionizable: calcio, cromo, cobre, flúor, yodo, hierro, magnesio, manganeso, molibdeno, fósforo, potasio, selenio y zinc (Farmacopea de los Estados Unidos de América, 2007).

Las tabletas y cápsulas contiene no menos de 90.0% y no más de 150.0% de las cantidades declaradas de cianocobalamina y ácido fólico, entre otros; y no menos de 90.0% y no más de 125.0 % de las cantidades declaradas de hierro (entre otros minerales). Para corroborar el contenido de los anteriores en cápsulas es necesario el uso de métodos de valoración, los cuales, en este caso, se enfocarán principalmente en la valoración de ácido fólico y cianocobalamina (Farmacopea de los Estados Unidos de América, 2007).

A. Cianocobalamina.

La cianocobalamina o vitamina B₁₂ es la vitamina (junto con el ácido fólico) que previene la anemia. Pertenece al grupo de varios compuestos llamados “cobalamina”. Todos los compuestos pertenecientes a este grupo poseen un grupo prostético que contiene cobalto, que se caracteriza por enlaces de coordinación semejantes a los del hierro en la molécula de hemoglobina. Probablemente, el átomo de cobalto funcione de manera semejante al átomo de hierro para combinarse reversiblemente con otras sustancias (Guyton, 1992).

Es una molécula abundante en el hígado, pero también existe en la carne, huevos y animales marinos. Al igual que el grupo Hem y la clorofila, contiene también un núcleo de porfirina. Fue el primer compuesto orgánico que se descubrió (Linstromberg, 1977).

La cianocobalamina tiene varias funciones metabólicas además de actuar como coenzima aceptora de hidrógeno. Su función más importante es la de coenzima para reducir los ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos, etapa importante para la duplicación de los genes. En

resumen, se puede decir que las dos funciones principales de la vitamina B₁₂ son: 1) fomento del crecimiento y 2) fomento de la formación y maduración de eritrocitos (Guyton, 1992).

Actúa también como coenzima en la interconversión de algunos ácidos orgánicos como succinato y malonato de metilo (Villem, 1996).

Un efecto especial de la deficiencia de la vitamina B₁₂ es la desmielinización de las grandes fibras nerviosas de la médula espinal, en especial de las columnas posteriores y en ocasiones de las columnas laterales (Guyton, 1992).

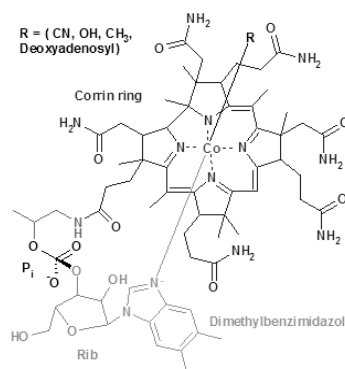
La cianocobalamina es sintetizada por las bacterias, pero no por las plantas y animales superiores. Así, es una “vitamina” para las plantas verdes y para los animales (Villem, 1996).

Microorganismos, principalmente bacterias, son los únicos organismos que tienen la capacidad de manufacturar vitamina B₁₂. Estas bacterias viven en el agua, suelo y en el tracto digestivo de animales (Norris, 2002).

La vitamina B₁₂ es producida por especies de *Pseudomonas*, *Propionibacterium* y *Streptomyces* cuando se les hace crecer en un medio de cultivo suplementado con cobalto. A partir de las anteriores se puede extraer dicha vitamina para luego integrarse en alimentos tales como pan, harina, cereales y comida para animales en general (Alcama, 2001).

1. Propiedades de la cianocobalamina

Fórmula: C₆₃H₈₈CoN₁₄O₁₄P



Estructura:

Es una molécula compleja, compuesta de un núcleo de corrina que contiene cobalto; además cuenta con grupos cianuro, azúcar, ribosa y otros constituyentes (Villem, 1996).

Se presenta en forma de cristales rojo oscuro o como polvo amorfo y cristalino de color rojo. Es inodora. Tiene una masa molecular de 1355.38 g/mol, con una solubilidad en agua de 12.5 g/L. Causa irritación en piel, ojos, mucosas, tracto respiratorio y gastrointestinal si es absorbido, inhalado o ingerido, respectivamente; es por ello que al manipularse, debe hacerse con lentes protectores, guantes y ropa adecuada (University of Akron Chemical Database, 2007).

Es estable a temperaturas y presión normales, es incompatible con oxidantes y ácidos fuertes. Se descompone al estar en contacto con monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno, óxidos de fósforo, dióxido de carbono y óxidos de cobalto. Es sensible a la luz, es por ello que debe guardarse en un lugar oscuro (University of Akron Chemical Database, 2007).

2. Métodos para la cuantificación de cianocobalamina en formas farmacéuticas sólidas

a. Radioensayo. La cuantificación de vitamina B₁₂ se ha hecho a través del método de radioensayo o ensayo de unión competitiva. Dicho método se basa en determinar si la cianocobalamina se une a una proteína R o a un factor intrínseco (FI). En la actualidad se sabe que ambas (proteína R y factor intrínseco) pueden unirse a análogos inactivos de la vitamina B₁₂ (Norris, 2002).

b. Ensayo con *Ochromonas malhamensis*. Es mejor que el ensayo del factor intrínseco, pues al comparar a ambos, se demostró que el último dio una lectura 44% mayor a la que dio el primero (Norris, 2002).

Varios autores sugieren que el análisis con *O. malhamensis* es el más efectivo de los varios ensayos que existen en cuanto a la medición de vitamina B₁₂ metabólica activa. Desafortunadamente, sólo un estudio se ha llevado a cabo para la cuantificación de cianocobalamina utilizando a *O. malhamensis* (Norris, 2002).

c. Cromatografía en papel. Por simplicidad, la cromatografía en papel es un arreglo de métodos que cuando son combinados pueden proveer una determinación mucho más precisa de la estructura exacta de una molécula. Estos métodos son más confiables que los anteriores, pero son difíciles de llevar a cabo. Por lo tanto, no puede decir la actividad actual de la vitamina B₁₂ como un todo (Norris, 2002).

d. Análisis de reducción de ácido metilmalónico. Debido a que los análogos inactivos de la vitamina B₁₂ pueden interferir con la función de la vitamina B₁₂ activa, una forma de determinar la actividad de ésta es dar a las personas suplementos que la contengan y luego se observa si sus niveles de ácido metilmalónico (AMM) suben o bajan. Si estos bajan, se considera que el producto es una fuente de cianocobalamina. Una alternativa es dar suplementos a personas con anemia macrocítica y ver si su padecimiento mejora. Desafortunadamente, esto puede confundirse con la presencia de folatos (Norris, 2002).

También es posible que algunos análogos de la cianocobalamina que están activos para los eritrocitos, estén inactivos para el tejido nervioso (Norris, 2002).

e. Análisis microbiológico. Tradicionalmente, la vitamina B₁₂ se cuantifica “alimentando” a ciertas bacterias con suplementos a los cuales se les quiere probar que contienen este micronutriente y observando qué tan bien crecen éstas en presencia de dicha vitamina (Norris, 2002).

La respuesta es el crecimiento y desarrollo del microorganismo que puede determinarse midiendo la turbidez, la cual se interpola en una curva de patrón de turbidez (expresada en transmitancia) versus la concentración del analito (Juárez, 2004).

Para la medición de cianocobalamina se han utilizado varios organismos control (cuadro 1, página 7).

Cuadro 1. Organismos control utilizados en ensayos microbiológicos para la cuantificación de vitamina B₁₂ (Norris, 2002)

Organism	Organism
<i>Escherichia coli</i> mutant 113-3	bacteria
<i>Lactobacillus leichmannii</i> 326	bacteria
<i>Euglena gracilis</i> Z-alga	protozoa
<i>Ochromonas malhamensis</i>	protozoa
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 7830	bacteria
<i>Anthrobacter</i> Lochhead 38	bacteria

Se ha encontrado que *Lactobacillus delbrueckii* (antes *Lactobacillus leichmannii*) (ATCC 7830) puede responder al factor cristalino contra la anemia perniciosa en un medio de cultivo químicamente definido, por lo que el uso de este organismo fue sugerido para propósitos del ensayo (Hoffman, *et.al.*, 1949).

Se ha demostrado que tanto la riboflavina como la cianocobalamina estimulan el crecimiento de bacterias del género *Lactobacillus* (Hébert, *et.al.*, 2004)

1) Características del género *Lactobacillus*. El género *Lactobacillus* pertenece al grupo de los bacilos gram positivo anaerobios no esporoforadores y pueden ser móviles o inmóviles, quimiorganotróficos y sacarolíticos o no sacarolíticos. La mayoría son anaerobios facultativos (Juárez, 2004).

Al sembrarse en medios sólidos pueden aparecer como cocobacilos gram-positivo de cadena corta y por su envejecimiento y en presencia de altas concentraciones de ácido pueden transformarse en gram-negativo (Juárez, 2004).

Este género es negativo para la prueba de catalasa, en cromatografía de gases muestra un pico característico del ácido láctico (producto metabólico de la glucosa). También se puede identificar usando sistemas comerciales como Vitek ANI y RapID ANA (Juárez, 2004).

Muchos laboratorios, especialmente aquellos de compañías privadas que quieren comercializar productos que dicen contener cianocobalamina utilizan este método para cuantificar el contenido de ésta en sus productos (Norris, 2002).

El procedimiento del ensayo para la determinación turbidimétrica de la vitamina B₁₂ consiste en los siguientes pasos: (1) preparación de soluciones concentradas de muestras y estándares, (2) preparación de cultivos control listos para incubación, (3) período de incubación, (4) lectura de la turbidez y (5) cálculo de los resultados del ensayo (Berg, *et.al.*, 1976).

B. Ácido fólico.

El ácido fólico, también conocido como ácido pteroilglutámico, forma parte de la familia de los folatos, los cuales son compuestos que tienen como base al anillo bicíclico de pteridina, el ácido p-aminobenzóico y uno o más residuos de glutamato (Juárez, 2004).

Funciona como portador de grupos hidroximetilo y formilo. Probablemente, su aplicación más importante sea para la síntesis de purinas y timina, las cuales son necesarias para la formación de ácido desoxirribonucleico (ADN). Es necesario para la reproducción de genes celulares, por lo que también es importante para la estimulación del crecimiento; es por ello que cuando falta, el ser humano crece muy poco (Guyton, 1992).

Es un estimulante del crecimiento más poderoso aún que la vitamina B₁₂ (cianocobalamina) y, como ésta, también tiene importancia en la maduración de los eritrocitos. Ambos tienen funciones específicas, pero diferentes, para estimular el crecimiento y maduración de los anteriores (Guyton, 1992).

El ácido fólico se puede obtener naturalmente de extractos de levaduras, residuos de azúcares de la leche y espinaca. Éste se puede concentrar para hacer concentrados para uso medicinal (Lange, 1967).

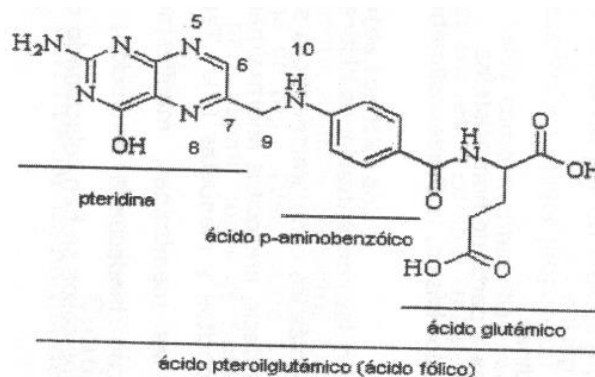
Las levaduras, hongos y hojas de muchas plantas también son fuentes de este micronutriente. En los animales, está presente en la leche y en todos los tejidos (Lange, 1967).

El ácido fólico también puede producirse sintéticamente o durante la fermentación aeróbica por algunos organismos o bacterias no patógenas, por ejemplo: *Corynebacterium pseudodiphtheriae* y *C. xerosis*, especies que están normalmente en las mucosas de la nariz, garganta, vagina y en la conjuntiva. En este caso, el ácido fólico producido se identifica como la forma monoglutámica y completamente oxidada de los folatos (Juárez, 2004).

Uno de los efectos más importantes de la deficiencia de ácido fólico es la anemia macrocítica, casi idéntica a la anemia perniciosa, la cual se trata eficazmente al suministrarse ácido fólico (Guyton, 1992).

1. Propiedades del ácido fólico

Fórmula: $C_{19}H_{19}N_7O_6$



Estructura:

Se presenta en forma de placas o agujas de color amarillo-anaranjado. Es inodoro y su masa molecular es de 441.40 g/mol. Su punto de fusión es 250°C su punto de descomposición es a 238°C. Es muy soluble en agua y poco soluble en metanol, etanol y butanol. Es insoluble en acetona y otros solventes apolares. Tiene solubilidad relativa en ácido acético, fenol, piridina y es soluble en hidróxidos, carbonatos, ácido clorhídrico y ácido sulfúrico diluido y concentrado. Puede causar irritación si es ingerido, inhalado o absorbido por la piel u ojos, por lo que si se está en contacto en él, debe utilizarse equipo adecuado para su manejo (lentes, guantes, bata) (University of Akron Chemical Database, 2007).

Presenta una absorbancia máxima de radiación ultravioleta (UV) a 256, 283 y 368 nm (Stokstand y Thenen, 1963).

La descomposición del ácido fólico se produce cuando se expone a la luz solar, debido a la unión del carbono 9 (C-9) y el nitrógeno 10 (N-10) con la formación del ácido *p*-aminobenzoilglutámico y una pteridina biológicamente activa. Su estabilidad a altas temperaturas es influenciada por el pH y por la presencia de oxígeno. Se destruye el 100% cuando se esteriliza en autoclave durante 30 minutos a pH 1, un 50% a pH 3 y permanece estable a pH 7 (Juárez, 2004).

2. Métodos para la cuantificación de ácido fólico en formas farmacéuticas sólidas. Los métodos de análisis de vitaminas se han utilizado desde tiempo atrás, pero eso no significa que sean obsoletos.

A pesar que procedimientos tan antiguos como los microbiológicos puedan no estar basados en tecnología e instrumentación química sofisticada, son todavía los mejores a utilizar en algunos casos. Todo depende de las vitaminas específicas que se quieran analizar y de la forma farmacéutica que las contiene (Marsili, 1996).

A pesar que las técnicas de conteo microbiológico de platos se usaban para medir el crecimiento microbiano en el pasado, en la actualidad los laboratorios usan métodos de turbidimetría para estimar la población bacteriana. Las técnicas turbidimétricas son mucho más fáciles, rápidas y, usualmente, más exactas (Marsili, 1996).

En la actualidad, existen técnicas que permiten la cuantificación de ácido fólico en preparaciones farmacéuticas sólidas; sin embargo, ninguna de ellas ha mostrado ser mejor que el método oficial, que es el microbiológico (Juárez, 2004).

a. Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). Los ELISA utilizados en este tipo de análisis son de tipo indirecto, en donde se añaden las soluciones de las muestras, patrones y el anticuerpo anti-ácido fólico a los pozos de una placa (kit comercial), la cual ya tiene fijado ácido fólico. Durante la incubación, el ácido fólico fijado a la placa compete con el adicionado en las soluciones que se desean analizar, se lava la placa para eliminar el ácido fólico que no se unió y luego se agrega un anticuerpo IgG unido a una enzima marcada, la cual se enlaza sólo al ácido fólico que ese unió a los pozos de la placa. Se vuelve a hacer un lavado y se agrega

un sustrato afín a la enzima marcada, la cual luego de un período de incubación produce un color que es indirectamente proporcional a la concentración de ácido fólico. Se determina la densidad óptica (OD) de cada pozo y ésta se usa para determinar la concentración de ácido fólico contra la curva patrón (Juárez, 2004).

Una de las limitantes del método es que las vitaminas no son inmunogénicas (no estimulan la producción de anticuerpos en animales), pero la mayor ventaja es que se emplean reactivos estables, además de que el proceso puede automatizarse (Juárez, 2004).

b. Ensayo enzimático unido a una proteína (EPBA). Se basa en la unión natural de la vitamina contenida en la cápsula y una proteína marcada directamente por unión química a una enzima como la peroxidasa. El procedimiento es similar al de un ELISA, pero se diferencia de éste en que existe un período menos de incubación y la función del anticuerpo es cumplida por una proteína-enzima. El EPBA es de fácil implementación, reproducibilidad, disminución de tiempo de trabajo e incremento de número de muestras por corrida; sin embargo, es necesario mejorar su sensibilidad eliminando interferentes (Juárez, 2004).

c. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se puede emplear para separar y cuantificar distintas formas de ácido fólico (folatos). Este método utiliza una fase estacionaria reversa, fase móvil isocrática, un detector fluorométrico muy sensible y específico y una columna de unión oxidativa para derivatización. Los estudios realizados hasta el momento han demostrado que se puede obtener una buena resolución de la mezcla de estándares, pero se han presentado problemas en la detección y cuantificación de ácido fólico en algunos vitámeros (Juárez, 2004).

d. Radioinmunoensayo (RIA). Requiere que la muestra sea adicionada a un tubo que contenga el ácido fólico marcado con un radioisótopo. Durante la incubación a temperatura ambiente, los folatos son reducidos y estabilizados para ser inmovilizados con una proteína de unión específica del folato. Posteriormente, existe una competencia por los sitios de unión, entre el folato marcado y adicionados en las soluciones a analizar. Luego se centrifuga, obteniéndose un sedimento y se descartan los folatos no unidos (suspendidos en el sobrenadante). Se cuantifica la radioactividad del sedimento obtenido y ésta se interpola en una curva patrón para determinar la concentración de ácido fólico en la muestra (Juárez, 2004).

La mayor desventaja del método es el uso de radioisótopos, lo cual implica contar con personal capacitado, procedimientos estandarizados y equipo costoso. Además, el patrón usado en el análisis debe ser estable, debe tener afinidad a la proteína de unión y ser el mismo tipo de folato que se va a analizar en el producto farmacéutico. Esta metodología es la que más se utiliza cuando se desea hacer cuantificación de ácido fólico en plasma, suero y/o eritrocitos; debe ser optimizada para poder emplearse en la industria farmacéutica (Juárez, 2004).

e. Análisis microbiológico. Bioensayo es el nombre que recibe un grupo de métodos donde la cantidad de un compuesto es medido por un sistema de evaluación biológica, por ejemplo: bacterias, levaduras o algas. Una precondition del ensayo es que el compuesto que va a ser medido sea conocido y éste a su vez debe de ser el factor limitante del crecimiento del microorganismo control (Labsystems Corp., 1990).

Cantidades de vitaminas (especialmente vitaminas del grupo B) y aminoácidos son generalmente medidos con técnicas de bioensayo. El material a analizar bien puede ser una solución pura o preparaciones mixtas. El método más comúnmente utilizado es el turbidimétrico, el cual está perfectamente descrito en las Farmacopeas (Labsystems Corp., 1990).

Los ensayos microbiológicos se basan entonces en los requerimientos de minerales, aminoácidos y vitaminas que un microorganismo específico necesita para su crecimiento y desarrollo (Juárez, 2004).

Principio del método: ciertas especies de bacterias pueden crecer sólo en presencia de ciertas vitaminas. Si estos organismos de prueba son transferidos a medios de cultivo definidos que contienen todos los componentes esenciales para su crecimiento menos la vitamina en cuestión, la proliferación de los organismos se ve totalmente inhibida o, por lo menos, drásticamente reducida. Luego de añadir la vitamina, el organismo puede crecer, siendo su crecimiento dependiente de la concentración de la vitamina. La cantidad de vitamina presente puede determinarse midiendo la turbidez producida como resultado del crecimiento microbiano o por la cuantificación de un metabolito (Juárez, 2004).

Se inicia haciendo una extracción y diluciones del analito a determinar en la muestra. Luego, se preparan diluciones del extracto en tubo equivalentes a las preparadas con la solución patrón, para luego ser inoculadas con un microorganismo cuya respuesta esté limitada únicamente por el

nutriente a determinar de una forma directamente proporcional. La respuesta es el crecimiento y desarrollo del microorganismo que puede determinarse midiendo la turbidez, la cual se interpola en una curva de patrón de turbidez (expresada en transmitancia) versus la concentración del analito (Juárez, 2004).

La ventaja del método microbiológico sobre los métodos químicos (por ejemplo, HPLC) es que el primero determina la cantidad de vitamina activa, mientras que el segundo proporciona la suma de vitamina activa e inactiva (Labsystems Corp, 1990).

Ciertas bacterias sintetizan ácido fólico para utilizarlo en la producción de sus ácidos nucleicos. A diferencia de los humanos, las bacterias poseen la enzima necesaria para manufacturar ácido fólico. Esto lo hacen a partir de tres componentes: la pteridina, ácido *p*-aminobenzoico (PABA) y ácido glutámico (Figura 1). En la síntesis normal de ácido fólico, la enzima bacteriana se une a los tres componentes, dando como resultado, la molécula del ácido fólico (Figura 2) (Alcama, 2001).

Figura 1. Componentes del ácido fólico (Alcama, 2001)

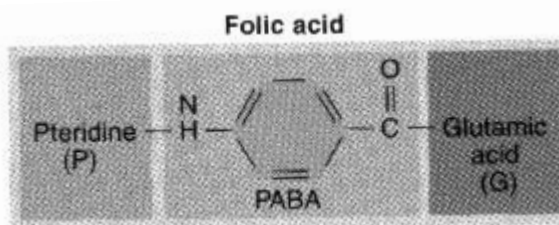
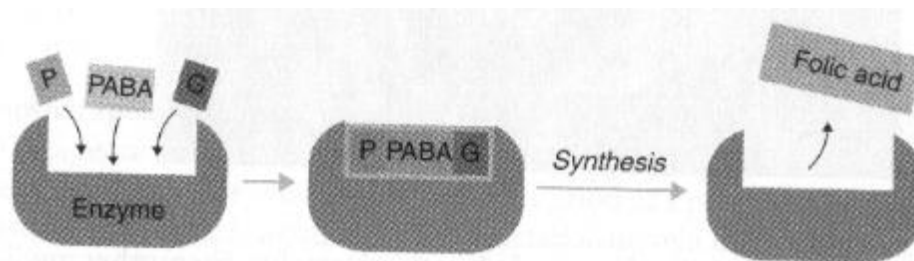


Figura 2. Síntesis normal del ácido fólico (Alcama, 2001)



Para el análisis microbiológico del ácido fólico adicionado o libre en productos farmacéuticos, puede emplearse como indicador a la bacteria *Enterococcus hirae* ATCC 8043. El anterior responde a la presencia de ácido fólico y al tetrahidrofolato (Juárez, 2004).

1) Características del género *Enterococcus* y la especie *Enterococcus hirae* ATCC 8043. *Enterococcus* es un género de bacterias cocos gram positivo, que pueden presentarse solos, en pares o en cadenas cortas. Pueden presentarse como cocobacilos cuando las tinciones de Gram son preparadas a partir de cultivos en medios sólidos, y más ovaladas cuando se hacen preparaciones a partir de cultivos en caldo de tioglicolato (Juárez, 2004).

Son anaerobios facultativos y su crecimiento se optimiza a 37°C. Todos los medios de cultivo para su crecimiento contienen 6.5% de cloruro de sodio y esculina hidrolizada en presencia de sales biliares (Juárez, 2004).

Son homofermentativos, no producen gas y producen ácido láctico como producto final de la fermentación de la glucosa. Crecen en agar tripticosa soya y sangre de carnero al 5%, agar BHI (infusión de corazón y cerebro) y sangre de carnero al 5%, o en agar base para sangre que contenga sangre de carnero al 5% (Juárez, 2004).

Enterococcus hirae forma parte del grupo III del género de *Enterococcus* y se diferencia de las demás especies porque no forma ácido en manitol, sorbitol o en caldos de sorbosa. Es positivo para una o ambas pruebas de rafinosa y sucrosa, pero es negativo para la prueba de piruvato y movilidad. No es considerado un agente patógeno (Juárez, 2004).

Otras especies de bacterias pueden ser utilizadas para este tipo de ensayo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Actividad de algunos organismos sobre el ácido fólico (Juárez, 2004)

Organismo	COMPUESTOS *					
	PGA	PTGA	PHGA	Acido 10-formil folato	Acido pterico	Acido 5-formiltebrahidro pterilglutámico
<i>Tetrahymena geleii</i> ^b	0.3 ng	Igual que PGA en una base molar	Igual que PGA en una base molar	-	Inactivo	-
<i>Lactobacillus casei</i>	0.09 ng	0.06 ng	0.01 µg	> 0.02 µg	c	0.17 ng ^d
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 8043	0.18 ng	4.2 ng	0.10 µg	0.035 ng	c	0.37 ng ^d
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30 mg	Inactivo	-	Inactivo	Inactivo	0.15 ng

^a PGA= ácido fólico, PTGA= ácido pteroiltriglutámico, PHGA= ácido pteroilheptaglutámico.
^b Los requerimientos son expresados como cantidades de factor por mililitro necesarios para producir la mitad del crecimiento máximo.
^c El ácido pterico es de 50-100% activo como ácido fólico para *E. hirae* (dependiendo del tiempo de incubación) y 0.01% activo para *L. casei*.
^d Naturalmente es activo.

C. Importancia de la combinación de ácido fólico y cianocobalamina en formas farmacéuticas sólidas.

El ácido fólico afecta los síntomas de anemia provocados por la deficiencia de cianocobalamina. El ácido fólico se necesita para convertir al uracilo en timidina, un bloque esencial para la construcción del ADN. Éste se necesita para la producción y división de nuevos eritrocitos (Norris, 2002).

La cianocobalamina está involucrada en el proceso anterior porque al crear metilcobalamina, la vitamina B₁₂ produce una forma de ácido fólico que se necesita para hacer ADN. Si no existe cianocobalamina disponible, este tipo de ácido fólico no se forma y la síntesis de ADN se vuelve lenta (Figura 6, pág 64).

D. Procedimientos para la implementación de la metodología de cuantificación de ácido fólico y cianocobalamina por medio de análisis microbiológico.

Para poder implementar la metodología de cuantificación tanto de ácido fólico como de cianocobalamina en cápsulas elaboradas en un laboratorio farmacéutico, es necesario tener en cuenta varias consideraciones y factores que pueden afectar el análisis. Por ejemplo, la cristalería utilizada deber ser lavada con detergentes no estimuladores del crecimiento de la bacteria, (ej.: laurilsulfato de sodio o cualquier detergente neutro y libre de fosfatos). Se deben eliminar residuos de detergente lavando la cristalería con agua de grifo y posteriormente con agua destilada; además, los tubos de cultivo pueden ser calentados a 250°C durante 1 ó 2 horas para quemar residuos orgánicos (Juárez, 2004).

Por otro lado, los medios de cultivo deben ser almacenados en lugares frescos o inclusive en refrigeración. Estos deben enfriarse inmediatamente luego de su disolución ya que esto evitará cambios de pH, precipitaciones no deseadas, consistencia inadecuada, pérdida de nutrientes y oscurecimiento del medio debido a la reacción entre aminoácidos y carbohidratos a temperatura alta (Juárez, 2004).

En cuanto a la preparación de soluciones, éstas deben utilizar agua destilada. La solución patrón madre de ácido fólico y la de cianocobalamina deben ser refrigeradas y debe adicionarse suficiente tolueno que permita formar una capa de 2-4 mm de este reactivo, para evitar que la solución tenga contacto con el oxígeno y se degrade. Esto también ayudará a inhibir el crecimiento de organismos aerobios que pudieran utilizar ácido fólico y cianocobalamina para su desarrollo. Debe evitarse el contacto de la solución con la luz solar, por lo que todos los recipientes deben ser color ámbar. Otro aspecto a tomar en consideración, es que las soluciones patrón deben de estar ajustadas a pH 7 (Juárez, 2004).

Los métodos microbiológicos miden respuestas que puedan ser convertidas a cantidades de una sustancia activa con la ayuda de una curva patrón. Ésta debe hacerse para cada corrida, por lo que puede haber diferencias entre corridas (Juárez, 2004).

Al reconstituir y mantener las cepas a utilizar, tanto para *Enterococcus hirae* ATCC 8043 como para *Lactobacillus delbrueckii* la forma óptica de propagación es suspenderlas en agar tripticasa soya y caldo de microinóculo, respectivamente, luego incubar 24 horas a 37°C. Luego, éstas son transferidas a un tubo con agar específico para su mantenimiento y se incuban durante 6-24 horas a 30-40°C. Antes de usar el nuevo cultivo, deben hacerse transferencias sucesivas en el mismo tipo de agar durante 1-2 semanas, hasta observar que luego de inocular la bacteria en un caldo específico para la producción de inóculos, se produce crecimiento a las 2-4 horas de incubación. Posteriormente las bacterias se transfieren de un tubo con agar para el mantenimiento de cepas a otro semanal o mensualmente. Este traspaso debe realizarse en medios de cultivo sólidos (Juárez, 2004).

Al preparar el inóculo, éste debe tener concentraciones de 100-1000 células/tubo cuando el tiempo de incubación del método es de 14-24 horas. Los inóculos utilizados deben estar en la fase

logarítmica de crecimiento de las bacterias. Una vez se ha establecido la concentración del inóculo, puede prepararse un lote de inóculo y congelarlo en alícuotas (Juárez, 2004).

También es necesario verificar la pureza de los cultivos de *Enterococcus hirae* ATCC 8043 y *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 7830. Esto se hace incubando cada cepa y debe observarse un solo tipo de colonias. A partir de éstas hacer una preparación y tinción de Gram (Juárez, 2004).

Previo a medir la turbidez de una suspensión bacteriana, se debe verificar el espectrofotómetro para establecer el grado de relación entre la respuesta del instrumento y la concentración de las células en suspensión. Se construye una curva patrón y se mide la respuesta del instrumento a diferentes concentraciones de las células suspendidas. Las curvas patrón deben hacerse para cada especie de bacterias en un espectrofotómetro específico (Juárez, 2004).

El tiempo de incubación debe determinarse experimentalmente, tomando en cuenta la concentración del inóculo. El tiempo de incubación depende de la composición y pH del medio, temperatura de incubación, concentración del inóculo, exposición del microorganismo al oxígeno y tipo de microorganismo. No se debe olvidar que también estará limitado por la sustancia a analizar, en este caso el ácido fólico y cianocobalamina (Juárez, 2004).

La cantidad de muestra a utilizar debe ser pequeña para que luego de hacer las diluciones requeridas, el extracto obtenido sea lo más claro posible y no interfiera en las lecturas obtenidas de densidad óptica o transmitancia de los diferentes tubos. El tamaño de muestra debe permitir hacer, por lo menos, dos diluciones para que cualquier interferente en la muestra esté ausente o en cantidades mínimas y que el extracto final tenga una concentración similar a la de la solución de trabajo, es decir, de 1ng/mL, ya que se obtienen mejores resultados cuando éstos son paralelos a los de la curva patrón (Juárez, 2004).

La muestra debe protegerse del contacto con la luz y el oxígeno para evitar la degradación del ácido fólico. El día de análisis, la muestra debe ser llevada, pulverizada y homogenizada a temperatura ambiente mediante agitación manual o mecánica antes de tomar la muestra (Juárez, 2004).

La relación entre las concentraciones ácido fólico/cianocobalamina y los porcentajes de transmitancia en una curva patrón para los análisis microbiológicos, está representada por una

curva típica y una ecuación de segundo grado. Esta curva pasa cerca del cero cuando el medio y el inóculo están libres de cualquier contaminante de origen bacteriano o químico que pudiera disminuir o aumentar la turbidez en el tubo. Se aceptan todas las concentraciones que estén incluidas en un rango de $\pm 10\%$ del promedio. Para que el ensayo sea válido deberán incluirse el número de tubos originales usados por muestra para calcular un nuevo promedio. Éste debe multiplicarse por los factores de dilución, la concentración del patrón y cualquier otro factor para obtener la concentración de ácido fólico en las dimensionales deseadas (Juárez, 2004).

Obtener la ecuación de segundo grados de la curva patrón de la corrida y sus coeficientes de determinación y correlación, a través de un análisis de regresión de segundo grado (Juárez, 2004).

En cada corrida debe analizarse una muestra control. Puede utilizarse una muestra certificada o preparada en el laboratorio y debe estar en una matriz similar a la de las muestras a analizar, estar disponible en suficiente cantidad, ser estable por un período largo de tiempo, con pocas variaciones en la concentración y debe conocerse el rango de concentración de ácido fólico y cianocobalamina respectivo.

Se debe utilizar una muestra de referencia para demostrar que el método microbiológico es válido para determinar ácido fólico y cianocobalamina en cápsulas. El porcentaje de recuperación de ácido fólico y cianocobalamina en la muestra de referencia se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{C_{\text{exp}}}{C_{\text{ref}}} \times 100 \text{ (ecuación 1)}$$

Donde,

C_{exp} = concentración de ácido fólico analizada en la muestra de referencia.

C_{ref} = concentración de ácido fólico reportada en el certificado de la muestra de referencia (Juárez, 2004).

E. Validación de los métodos de análisis microbiológico para cuantificar ácido fólico y cianocobalamina a implementar

1. Validación. Proceso establecido para la obtención de pruebas convenientemente documentadas y demostrativas de que un método de control es lo

suficientemente fiable para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos (Farmacopea de los Estados Unidos de América, 2007).

Validar es verificar documentalente que un método o proceso hace lo que tiene que hacer (Farmacopea de los Estados Unidos de América, 2007).

Figura 3. Diagrama de flujo que explica el proceso de validación



Los requisitos necesarios que debe cumplir un método analítico son los siguientes: Precisión, exactitud, linealidad, Rango (o Intervalo), Límite de detección, Límite de cuantificación, especificidad, tolerancia y robustez (Farmacopea de los Estados Unidos de América, 2007).

Considerando la variedad de ensayos analíticos existentes, se hace necesario establecer categorías que facilitan mejor el estudio y reconocer el tipo de información que se requiere para la validación de un método analítico (Farmacopea de los Estados Unidos de América, 2007).

CATEGORÍA I: Métodos analíticos para la cuantificación de los principales componentes del fármaco o de los principios activos (incluyendo los preservantes) en productos farmacéuticos terminados (Farmacopea de los Estados Unidos de América, 2007).

CATEGORÍA II: Métodos analíticos para la determinación de impurezas o productos de degradación en el producto farmacéutico terminado, incluyendo ensayos cuantitativos y pruebas de límites (Farmacopea de los Estados Unidos de América, 2007).

CATEGORÍA III: Métodos analíticos para evaluar las características de las formas farmacéuticas terminadas, tales como disolución o liberación de fármacos.

En el Cuadro 3 se presentan los requerimientos de validación necesarios para cada una de estas categorías (Farmacopea de los Estados Unidos de América, 2007).

Cuadro 3. Requerimientos necesarios de validación para cada categoría.

Parámetros analíticos	CATEGORÍAS			
	I	II		III
		Cuantitativo	E. Límite	
Precisión	x	x		x
Exactitud	x	x	+	+
Límite de detección			x	+
Límite de cuantificación		x		+
Especificidad	x	x	x	+
Rango o intervalo	x	x	+	+
Linealidad	x	x		+
Tolerancia o fortaleza		x	+	X

+ Puede o no requerirse, dependiendo de la naturaleza del análisis

En este caso, se trata de un método analítico de categoría I, por lo que se necesitan establecer los parámetros de precisión, exactitud, especificidad, rango, linealidad y tolerancia.

a. Precisión. Grado de correlación o cercanía entre los resultados analíticos individuales que se obtienen al aplicar repetidamente el método a varias muestras, de una homogeneidad común. Los valores a reportar son los siguientes: resultados individuales, rango, media, desviación estándar, coeficiente de variación. Existen diferentes diseños para llevar a cabo estos estudios, atendiendo a diversas tendencias (ISO, 1991).

b. Exactitud. Capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximo posible al verdadero valor. Si la diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena. Una diferencia grande significa que la exactitud es inadecuada y revela la existencia de errores determinados que deberían corregirse (ISO, 1991).

La exactitud se expresa matemáticamente en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra (Ecuación 1, pág. 18), o bien en forma de diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero (ISO, 1991).

Estadísticamente suele efectuarse un test de Student para determinar si el valor medio hallado y el valor considerado verdadero no difieren significativamente para un grado de probabilidad determinado (ISO, 1991).

c. Especificidad. Capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente el analito, sin interferencia, impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados o excipientes que puedan estar presentes en la matriz de la muestra (ISO, 1991).

Cuando se determina la pureza del contenido de principio activo u otro componente en un medicamento el estudio de selectividad debe asegurar que la señal medida con el método analítico procede únicamente de la sustancia a analizar sin interferencias de excipientes, productos de degradación y/o impurezas (ISO, 1991).

Para el caso de la forma terminada del medicamento, se debe demostrar que las impurezas y especialmente los productos de degradación no interfieren en los resultados. Además hay que comprobar que la presencia de excipientes y/u otros principios activos y las posibles interacciones medicamento-envase primario no tienen efectos relevantes sobre la determinación del principio activo (ISO, 1991).

d. Rango. Es el intervalo entre los niveles superior e inferior (incluyendo estos) de la sustancia, en que se cumplen los requisitos de precisión, exactitud y linealidad del método (ISO, 1991).

Para su determinación se preparan muestras adicionando la sustancia a placebos en los extremos superior e inferior del intervalo o rango que se desea establecer, así como dentro del mismo. Se analizan las muestras de manera repetida en cada uno de los niveles y se calcula la precisión, exactitud y linealidad a lo largo del intervalo. El mismo diseño establecido para el estudio de exactitud permite realizar el estudio del rango de forma simultánea (ISO, 1991).

e. Linealidad. Capacidad de un método analítico de obtener resultados proporcionales a la concentración de analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado (ISO, 1991).

Dentro de este término se incluye la proporcionalidad entre concentración de analito y respuesta, así como el intervalo de concentraciones de analito para los cuales el método es

satisfactorio. También se relaciona con la sensibilidad de calibrado entre la señal medida y la concentración de analito (ISO, 1991).

El ensayo de linealidad puede efectuarse tanto sobre soluciones patrón del analito, como sobre muestras problemas que contengan concentraciones crecientes de analito, efectuándose posteriormente el tratamiento matemático de los resultados analíticos. Es necesario preparar una serie de patrones de analito de concentraciones crecientes, cada análisis se efectuará como mínimo por duplicado y se determina la curva de calibración que relaciona respuesta (área, altura, absorbancia, etc.), con concentración de analito. Se calcula la recta de regresión por el método de ajuste de los mínimos cuadrados. Puede que en algunos casos se necesite alguna transformación previa (logaritmo, recíproco) para obtener funciones de calibrado lineales del tipo $y = bx + a$, donde x = concentración; b = pendiente; y = respuesta y a = intercepto. El tratamiento estadístico de los datos anteriores, puede hacerse con el programa de computadora Microsoft Excel (ISO, 1991).

F. Validación de equipo utilizado en análisis microbiológico para cuantificar ácido fólico y cianocobalamina.

Antes de utilizar un instrumento para validar un método, su funcionamiento y desempeño deben ser verificados usando estándares genéricos. Resultados satisfactorios para un método pueden ser obtenidos sólo con equipo que tenga buen desempeño. Se debe prestar especial atención a las características del equipo que son críticas para el método. El límite de detección, las especificaciones de la línea base de ruido del instrumento y la respuesta a compuestos específicos debe ser verificado. Cualquier material utilizado para determinar parámetros críticos de validación, tales como reactivos y estándares de referencia deben ser analizados para conocer su composición y pureza (Huber, 2001).

Si no hay o existe muy poca información sobre las características de desempeño de un método, es recomendado probar si éste es adecuado para lo que se necesita hacer mediante experimentos iniciales. Estos estudios deben incluir la precisión aproximada, rango de trabajo y límites de detección. Si los datos de la validación preliminar parecen ser inapropiados, se debe cambiar ya sea el método en sí, el equipo, la técnica de análisis o los límites de aceptación. En esta forma, el desarrollo del método y su validación son procesos interactivos (Huber, 2001).

1. Calificación de equipo. El objetivo principal de calificar equipo de laboratorio es para asegurar la validez de los datos que se obtengan de estos. Los programas y procedimientos que se utilizan actualmente en la industria farmacéutica para calificación de equipo están basados en requerimientos regulatorios, estándares voluntarios, prácticas de vendedores y prácticas industriales (Sigvardson, *et.al.*, 2001).

Las regulaciones de buenas prácticas de laboratorio establece que «el equipo utilizado para la generación, medición o estimación de datos debe ser puesto a prueba, calibrado y/o estandarizado adecuadamente» (Sigvardson, *et.al.*, 2001).

El programa de calificación del equipo debe ser definido y documentado. Debe contener provisiones para la calificación, mantenimiento y documentación de fallas de todo el equipo utilizado para coleccionar datos. Esto, usualmente se cumple usando un procedimiento de operación estándar (SOP) que describe todo el programa. Los procedimientos individuales, específicos para el equipo utilizado, también deben ser documentados (Sigvardson, *et.al.*, 2001).

Procedimientos específicos para calificación de equipo pueden documentarse haciendo un master de SOPs, en el cual se describen los requerimientos compilados para una variedad de equipo, por lo que se pueden crear procedimientos específicos para cada equipo como documentos separados (Sigvardson, *et.al.*, 2001).

Todo equipo utilizado para generar datos a reportar deben tener etiquetas que indiquen que se lleva un récord de mantenimiento (Sigvardson, *et.al.*, 2001).

En el caso de calificación de un espectrofotómetro UV-Visible es necesario evaluar las características ópticas tales como la absorción máxima, los límites de la Ley de Beer, absorptividad molar y la sensibilidad de Sandell. También es necesario evaluar la exactitud de la longitud de onda, la exactitud fotométrica y la resolución de la longitud de onda (Lakshminarayana, *et.al.*, 2007).

Se debe hacer un análisis de regresión de la pendiente, intercepto y coeficiente de correlación obtenidos a diferentes concentraciones utilizando el método de los mínimos cuadrados. Debe

calcularse la desviación estándar y el rango de porcentaje de error de las mediciones, lo cual proporcionará la precisión del método (Lakshminarayana, *et.al.*, 2007).

Para evaluar la validez y reproducibilidad del método espectrofotométrico, cantidades conocidas del material puro a estudiar se añade a las preparaciones farmacéuticas previamente analizadas y las mezclas se examinan con el método que se está empleando. Se calcula el porcentaje de recuperación. Se debe comprobar si los aditivos y otras formas activas interfieren con el análisis (Lakshminarayana, *et.al.*, 2007).

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a que en la actualidad el estado nutricional de muchas personas es deficiente, éstas recurren al consumo de multivitamínicos para suplir sus deficiencias de micronutrientes. Dentro de la industria farmacéutica existen cápsulas multivitamínicas, las cuales tienen por objetivo ayudar a suplir las necesidades de micronutrientes en la población consumidora.

La importancia de este trabajo radica en que dichas cápsulas, elaboradas por empresas farmacéuticas, generalmente incluyen dentro de su formulación ácido fólico y cianocobalamina (entre otros) y, al hacerlo, deben tener una concentración específica de las dos anteriores.

Mediante la cuantificación de ácido fólico y cianocobalamina, se garantiza que las concentraciones utilizadas en la formulación de cápsulas cumplen con los rangos de aceptación establecidos por la USP, para suplir las necesidades de estos micronutrientes en el ser humano.

Este estudio le proporciona beneficios a los laboratorios farmacéuticos, ya que por lo mencionado anteriormente, estos podrán determinar de manera eficiente la cantidad de ácido fólico y cianocobalamina que contienen las cápsulas que fabrican.

Debido a que la cuantificación de estas vitaminas es difícil por medio de métodos inmunológicos o cromatográficos a causa de la presencia de elementos interferentes (tal como el hierro aminoquelado también contenido en las muestras a analizar), el método microbiológico es el más adecuado para el análisis de ambos y, de hecho, es el recomendado por la AOAC pues determina solamente la cantidad de la sustancia deseada con base al consumo bacteriano de ésta. Por lo anterior, este estudio es exploratorio, pues se desea examinar un problema de investigación poco estudiado. Asimismo, el tema también es cuantitativo, ya que utiliza la recolección y análisis de datos para dar respuesta a la hipótesis establecida.

Es por todo lo anterior que se hace necesaria la implementación de métodos de análisis microbiológicos para la cuantificación de ácido fólico y cianocobalamina en cápsulas y, posiblemente, en otras formas farmacéuticas; así como también la realización de la validación de la metodología mediante la cual se determina si el método propuesto es simple, sensible, selectivo, exacto, preciso, reproducible y económico, por lo que se podrá utilizar en industrias farmacéuticas para la determinación cuantitativa de vitaminas en cápsulas, de forma rutinaria.

Con la implementación del método se desea entonces mantener la calidad de los productos analizados, asegurando así el posicionamiento de las empresas farmacéuticas en el mercado nacional e internacional.

IV. OBJETIVOS

A. General:

Implementar y validar, en una industria farmacéutica líder, un método de análisis microbiológico para la cuantificación de ácido fólico y cianocobalamina en cápsulas que contienen dichos micronutrientes.

B. Específicos:

1. Determinar si el método de análisis microbiológico en estudio para la cuantificación de ácido fólico y cianocobalamina es el adecuado, según los requerimientos de la empresa farmacéutica donde se ponga en práctica.
2. Asegurar que las concentraciones de ácido fólico y cianocobalamina en el producto a analizar cumplen con las especificaciones de calidad establecidas por la empresa farmacéutica donde se aplique el método de cuantificación, luego de que éste esté validado.
3. Garantizar la calidad y confiabilidad del medicamento mediante el empleo de metodologías de análisis microbiológico validadas.
4. Conocer la importancia que tienen las metodologías de análisis microbiológico validadas, como herramienta de análisis y cuantificación de micronutrientes específicos.

V. HIPÓTESIS

Ho: El método de análisis microbiológico en estudio es el adecuado para la cuantificación de ácido fólico y cianocobalamina en cápsulas luego de haberlo validado, por lo tanto, es posible su implementación en laboratorios farmacéuticos en general.

Ha: El método de análisis microbiológico en estudio NO es el adecuado para la cuantificación de ácido fólico y cianocobalamina en cápsulas luego de haberlo validado, por lo tanto, no es posible su implementación en laboratorios farmacéuticos en general.

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

A. Materiales y métodos

1. Método de análisis microbiológico para cuantificar ácido fólico en cápsulas

a. Materiales

1) **Estándar de Ácido fólico.** Se utilizó un estándar de ácido fólico certificado por la United States Pharmacopeia (grado USP, número de catálogo 1286005). El anterior se secó en un horno a 100-110°C durante 3 horas.

2) **Cepa de *Enterococcus hirae* ATCC 8043.** Se reconstituyó una cepa liofilizada de *Enterococcus hirae* ATCC 8043 (Micro-Biologics, lote 650294) pues ésta se encontraba inactiva. Se reconstituyó en un medio de cultivo adecuado (caldo tripticasa soya), en condiciones asépticas. Se incubó a 37°C durante 24 horas.

3) **Soluciones y medios de cultivo.** Se elaboraron soluciones de ácido clorhídrico 0.1 N, agua destilada tratada con carbón activado buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.0, solución salina isotónica estéril 0.85% p/v, hidróxido de amonio 40% v/v, hidróxido de amonio 0.1 M, hidróxido de sodio 0.1 N e hidróxido de sodio 0.01 N. Así mismo, se prepararon los siguientes medios de cultivo: caldo tripticasa soya, agar sangre de carnero al 5% v/v y caldo base para análisis de ácido fólico. Éste último se preparó según la cantidad de muestras y tubos a utilizar en el análisis.

4) **Muestras analizadas.** Se analizaron 6 muestras de cápsulas que contienen ácido fólico (cada una en triplicado). Cada muestra era de lote diferente y estaba conformada por el contenido de 20 cápsulas, tomadas aleatoriamente dentro del lote trabajado. Teóricamente, las cápsulas analizadas contienen 0.800 mg de ácido fólico.

b. Procedimiento

1) **Preparación del inóculo de trabajo.** Se tomaron 0.5 mL del cultivo de mantenimiento de *E. hirae* ATCC 8043 y se adicionaron a 10 mL de solución salina isotónica estéril 0.85% p/v. Se comprobó que esta dilución diera 70% de transmitancia a 550 nm. Se refrigeró a 4°C.

2) **Preparación de solución madre y diluciones para la curva estándar de calibración.** Se preparó una solución madre con el estándar USP de ácido fólico (100 µg/mL). Se leyó en espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 282 y 346 nm, en triplicado, usando buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.0 como blanco. Se calculó la concentración de la solución madre en µg de ácido fólico por mL obteniendo el promedio de las absorbancias de las tres lecturas y multiplicando el resultado por 160 para la absorbancia de 282 nm y por 613.33 para 346 nm. Las soluciones se guardaron en recipientes de color ámbar con una capa de tolueno de aproximadamente 2 mm en la refrigeradora.

Luego se preparó una solución intermedia 1 (1 µg/mL) a partir de la solución madre, se le ajustó el pH a 7-8 y se guardó en recipientes color ámbar en la refrigeradora.

Así mismo, se preparó una solución 2 (10 ng/mL) a partir de la solución intermedia 1. Esta solución se preparó cada vez que se iba a utilizar.

Por último, se preparó la solución de trabajo (1 ng/mL) a partir de la solución intermedia 2. Para aforar, se utilizó agua destilada tratada con carbón activado.

3) **Preparación de las soluciones de las muestras.** Se pulverizaron 20 cápsulas por muestra (6 muestras, cada una en triplicado). La cantidad de muestra se calculó tomando en cuenta la concentración aproximada de ácido fólico en cada cápsula (0.800 mg/cápsula), esto es, 20 mg del pulverizado de las cápsulas. Lo anterior se colocó en erlenmeyer de 250 mL.

La extracción de ácido fólico de la muestra se hizo disolviendo los 20 mg anteriores en 100 mL de agua destilada + 2 mL de hidróxido de amonio 40% (v/v). También contribuyen a la

extracción de ácido fólico el aumento de temperatura y presión que se llevan a cabo al autoclavar las muestras durante 15 minutos a 121°C.

Luego de la esterilización, las muestras se llevaron a temperatura ambiente sumergiendo los erlenmeyers en un baño de agua fría. Las soluciones de cada muestra se aforaron a un volumen de 200 mL, no fue necesario centrifugar.

Se procedió a transferir 1 mL de la solución anterior a un beaker de 50 mL, se le agregaron 20 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 6.8 con HCl 0.1 N. La solución anterior se aforó a un volumen de 100 mL tratada con carbón activado.

4) **Lectura del análisis microbiológico.** Se prepararon 3 tubos con tapadera de rosca para emplearlos como blanco sin inocular; 3 sin inocular; 3 tubos para emplearlos como blancos inoculados y 15 tubos con 2, 4, 6, 8 y 10 mL de la solución patrón de trabajo de 1 ng/mL, respectivamente. Cada volumen se trabajó en triplicado.

Por muestra se prepararon 12 tubos que contenían 2, 4, 6 y 8 mL del extracto final de la muestra obtenida. Cada volumen se trabajó en triplicado. Se adicionó agua destilada tratada con carbón activado a los tubos en donde era necesario para que el volumen final de todos los tubos fuera de 10 mL, tal como se indica en el cuadro 4:

Cuadro 4. Preparación de tubos para lectura de análisis microbiológico para cuantificar ácido fólico en cápsulas

mL de patrón o muestra/tubo	mL de agua destilada a agregar
0 (blanco)	10
2	8
4	6
6	4
8	2
10	0

Se agregó 10 mL del medio para análisis de ácido fólico a todos los tubos y se esterilizaron durante 5 minutos a 121°C. Los tubos se enfriaron en un baño de agua fría y se les agregó a cada uno 100 µL del inóculo, excepto a los que se emplearon como blanco sin inocular. Los tubos se

incubaron durante 16 horas a 37°C. Antes de leer cada tubo, estos se agitaron durante 15 segundos con la ayuda de un vórtex.

Se ajustó el 100 % de transmitancia (%T) del espectrofotómetro UV-Vis colocando en la celda de lectura el contenido de los tubos blancos sin inocular. Se leyó el % de transmitancia de los blancos inoculados y del resto de los tubos a 550 nm.

5) **Cálculos.** La concentración de ácido fólico que se encuentra en cada muestra se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{mg de ácido fólico}}{\text{cápsula}} = \frac{\bar{X}}{10,000} \times C_p \times \frac{V_1}{P_m} \times \frac{V_3}{V_2} \times \frac{R}{100} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde:

\bar{X} = Segundo promedio obtenido de concentración de ácido fólico en la muestra (ng/mL).

C_p = Concentración del patrón (en $\mu\text{g/mL}$)

V_1 = Volumen al cual se disuelve la muestra (200 mL)

P_m = Peso utilizado de la muestra para la cuantificación

V_2 = Volumen utilizado para la segunda dilución de muestra (1 mL)

V_3 = Volumen de dilución final de la muestra (100 mL)

R = Porcentaje de recuperación (ecuación 1, pág. 18)

2. Método de análisis microbiológico para cuantificar cianocobalamina en cápsulas

a. Materiales

1) **Estándar de Cianocobalamina.** Se utilizó un estándar de cianocobalamina certificado por la United Status Pharmacopeia (grado USP, número de catálogo 1152009). El anterior se secó en un horno a 100-110°C durante 3 horas.

2) Cepa de *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 7830. Se reconstituyó una cepa liofilizada de *L. delbrueckii* ATCC 7830 (MicroBiologics, lote 235105) pues ésta se encontraba inactiva. Se reconstituyó en un medio de cultivo adecuado (caldo de microinóculo), en condiciones asépticas. Se incubó a 37°C durante 24 horas.

3) Soluciones y medios de cultivo. Se elaboró una solución de etanol al 25% y solución salina isotónica estéril 0.85% p/v. Así mismo, se prepararon los siguientes medios de cultivo: caldo de microinóculo y caldo base para análisis de vitamina B12 (cianocobalamina). Este último se preparó en base a la cantidad de muestras y tubos a utilizar en el análisis.

4) Muestras analizadas. Se analizaron 6 muestras de cápsulas que contienen cianocobalamina (cada una en duplicado). Cada muestra era de lote diferente y estaba conformada por el contenido de 20 cápsulas, tomadas aleatoriamente dentro del lote trabajado. Teóricamente, las cápsulas analizadas contienen 8 µg de cianocobalamina.

b. Procedimiento

1) Preparación del inóculo de trabajo. Se tomaron 0.5 mL del cultivo de mantenimiento de *L. delbrueckii* ATCC 7830 y se colocaron en un tubo de ensayo con 10 mL de solución salina al 0.85% p/v. Se comprobó que esta solución diera como mínimo 70% de transmitancia a 530 nm (suspensión ajustada).

Luego se hizo una dilución 1:50 a partir de la suspensión ajustada y caldo base para el ensayo de vitamina B12 (dilución que se usó en la prueba).

2) Preparación de solución madre y diluciones para la curva estándar de calibración. Se preparó una solución patrón de 1

$\mu\text{g/mL}$ de cianocobalamina en etanol al 25% a partir de 10 mg de estándar USP de ésta. La curva patrón se hizo diluyendo la solución madre anterior en agua estéril, hasta que se alcanzaron las siguientes concentraciones (Cuadro 5):

Cuadro 5. Preparación de soluciones patrón

PUNTO DE LA CURVA	CONCENTRACIÓN ng/mL
1	0.01
2	0.04

3) Preparación de las soluciones de las muestras. Se prepararon soluciones de muestra y etanol al 25% con concentración final aprox. de $0.002 \mu\text{g/mL}$ de cianocobalamina. Las anteriores se diluyeron con agua estéril hasta llegar a las mismas concentraciones de la curva de la solución patrón (Cuadro 5).

4) Lectura del análisis microbiológico. Se prepararon 2 tubos con tapadera de rosca para emplearlos como blanco sin inocular; 2 tubos para emplearlos como blancos inoculados y las siguientes series de tubos por cada muestra a analizar (todas las muestras se trabajaron en duplicado, cada tubo tenía un volumen final de 10 mL) (Cuadro 6):

Cuadro 6. Preparación de soluciones patrón para cuantificación de cianocobalamina

Tubo No.	Solución patrón ng/mL	Volumen de solución patrón (mL)	Caldo base para el ensayo de Vitamina B12	Agua Purificada (mL)
1	0.01	1.0	5.0	4.0
2	0.01	1.5	5.0	3.5
3	0.01	2.0	5.0	3.0
4	0.01	3.0	5.0	2.0
5	0.01	4.0	5.0	1.0
6	0.01	5.0	5.0	---
7	0.04	1.0	5.0	4.0
8	0.04	1.5	5.0	3.5
9	0.04	2.0	5.0	3.0
10	0.04	3.0	5.0	2.0
11	0.04	4.0	5.0	1.0
12	0.04	5.0	5.0	---
13		---	5.0	5.0
14		---	5.0	5.0
15		---	5.0	5.0
16		---	5.0	5.0

Cuadro 7. Preparación de soluciones de muestra para cuantificación de cianocobalamina

Tubo No.	Solución muestra ng/mL	Muestra (mL)	Caldo base para el ensayo de Vitamina B12	Agua Purificada (mL)
17	0.01	1.0	5.0	4.0
18	0.01	1.5	5.0	3.5
19	0.01	2.0	5.0	3.0
20	0.01	3.0	5.0	2.0
21	0.01	4.0	5.0	1.0
22	0.01	5.0	5.0	---
23	0.02	1.0	5.0	4.0
24	0.02	1.5	5.0	3.5
25	0.02	2.0	5.0	3.0
26	0.02	3.0	5.0	2.0
27	0.02	4.0	5.0	1.0
28	0.02	5.0	5.0	---

Los tubos se esterizaron a 121° C durante 5 minutos. Se sacaron del autoclave y se enfriaron en un baño de agua fría.

Se adicionó 0.5 mL del inóculo preparado anteriormente a cada tubo, excepto a los dos que sirvieron como blancos no inoculados. Se incubó durante 17 horas a 37°C. El crecimiento de los microorganismos se detuvo al calentar los tubos en un horno a 90°C durante 5 minutos. Cada tubo se agitó y se leyó el %T a 530 nm, luego que las lecturas permanecían constantes, por lo menos 30 segundos.

Se ajustó la transmitancia a 100% con el blanco no inoculado, se leyó la transmitancia del blanco inoculado y la del resto de tubos.

5) **Cálculos.** La concentración de cianocobalamina que se encuentra en cada muestra analizada se calculó empleando la siguiente ecuación (Ecuación 4):

$$\text{anti log } M = \text{anti log } (M' + \log R) \text{ (Ecuación 4)}$$

Donde:

M = Cantidad experimental de cianocobalamina determinada en la muestra.

M' = Logaritmo de la potencia relativa de la muestra.

R = Es la cantidad de microgramos de cianocobalamina que teóricamente están presentes en cada cápsula tomada para prueba.

3. Validación de métodos de análisis microbiológico para cuantificar ácido fólico y cianocobalamina en cápsulas.

a. Precisión.

1) **Precisión intermedia.** Se analizaron 6 muestras de pulverizado de cápsulas (de lotes distintos) bajo las condiciones que se muestran en el cuadro 8 (2 distintos analistas, 1 misma área, 1 mismo equipo, 1 mismo día). El criterio de aceptación empleado fue que el coeficiente de variación fuera menor o igual a 5% (%CV ≤ 5%).

Lo anterior aplica tanto para la validación del método de análisis microbiológico para cuantificación de ácido fólico (muestras se hicieron en triplicado) como para la validación del método de análisis microbiológico para cuantificación de cianocobalamina (muestras se trabajaron en duplicado).

Cuadro 8. Ensayo para determinar la precisión intermedia del método de análisis microbiológico para cuantificación de ácido fólico y cianocobalamina con 6 muestras de pulverizado de cápsula, de lotes distintos.

Método de análisis de cuantificación	Analista	No. De muestra	Criterio de aceptación
Microbiológico (turbidimetría)	1	1	$\%CV \leq 5\%$
Microbiológico (turbidimetría)	1	2	$\%CV \leq 5\%$
Microbiológico (turbidimetría)	1	3	$\%CV \leq 5\%$
Microbiológico (turbidimetría)	1	4	$\%CV \leq 5\%$
Microbiológico (turbidimetría)	1	5	$\%CV \leq 5\%$
Microbiológico (turbidimetría)	1	6	$\%CV \leq 5\%$
Microbiológico (turbidimetría)	2	1	$\%CV \leq 5\%$
Microbiológico (turbidimetría)	2	2	$\%CV \leq 5\%$
Microbiológico (turbidimetría)	2	3	$\%CV \leq 5\%$
Microbiológico (turbidimetría)	2	4	$\%CV \leq 5\%$
Microbiológico (turbidimetría)	2	5	$\%CV \leq 5\%$
Microbiológico (turbidimetría)	2	6	$\%CV \leq 5\%$

Cálculos necesarios.

Media de los resultados. (\bar{X})
$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n} \text{ (Ecuación 5)}$$

Desviación estándar de los resultados (S)
$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \text{ (Ecuación 6)}$$

Coefficiente de variación.
$$C_v = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \text{ (Ecuación 7)}$$

Donde:

C_v = coeficiente de variación total
 S = Desviación estándar
 X = media

Cuadro 9. Requisitos con los que debe cumplir el coeficiente de variación total

MÉTODO	C_v
Cromatográficos	$\leq 2 \%$
Químicos y espectrofotométricos	$\leq 3 \%$
Microbiológicos	$\leq 5 \%$

(Comité de expertos de la OMS en especificaciones para las preparaciones farmacéuticas, 1992).

2) Precisión del sistema o repetibilidad. Se analizaron 6 muestras de pulverizado de cápsulas bajo las mismas condiciones de operación y por el mismo analista, para ambos métodos. Para la validación del método de cuantificación de ácido fólico las muestras se trabajaron en triplicado mientras que para la validación del método de cuantificación de cianocobalamina se trabajaron en duplicado. Los criterios de aceptación fueron:

- Porcentaje de recuperación: % R = 90-115 % (ácido fólico)
90-150 % (cianocobalamina)
- Coeficiente de variación: % CV $\leq 5 \%$ (ecuación 7, pág. 39)
- Límite de confianza: 95 %

b. **Exactitud.** Se hizo un análisis de 6 muestras de concentración única conocida para cada vitamina (0.800 mg/cápsula de ácido fólico y 8 μ g/cap-

sula de cianocobalamina), es decir, 6 muestras para validar metodología de cuantificación de ácido fólico y 6 muestras para validar metodología de cuantificación de cianocobalamina. Se hizo en triplicado para la validación de cuantificación de ácido fólico y en duplicado para la validación de cuantificación de cianocobalamina.

Se procedió a hacer la evaluación estadística, expresando los resultados en forma de porcentaje de recuperación respecto al teórico (Ecuación 1, pág. 18). Se calculó la media, desviación estándar, coeficiente de variación y Test t de student, utilizando el programa de análisis de datos “Analysis Toolpack” de la hoja electrónica de Microsoft Excel, 2003. Los criterios de aceptación utilizados fueron:

- Porcentaje de recuperación: 90-115 % (ácido fólico)
90-150 % (cianocobalamina)
- Coeficiente de variación: $\% CV \leq 5.0 \%$
- Test t de Student: $t_{\text{experimental}} < t_{\text{tabla}}, \alpha = 0.05$
- Límite de confianza: 95 %

c. **Especificidad y estabilidad.** En el caso del ácido fólico, se analizaron cápsulas que no contenían dicha vitamina. Los resultados obtenidos se se compararon con aquellos en donde el ácido fólico de las cápsulas sí estaba presente.

En el caso de la cianocobalamina, se analizaron tabletas que sólo contenían ácido fólico. Los resultados obtenidos se compararon con aquellos en donde la cianocobalamina de las cápsulas sí estaba presente.

Las muestras se prepararon y analizaron del mismo modo como indica el método de cuantificación para cada una de las vitaminas en estudio.

La estabilidad se evaluó en la solución madre de ácido fólico (100 $\mu\text{g/mL}$). Se tomaron 5 mL de la solución anterior y se midió su absorbancia a 282 y 346 nm (en triplicado) para cada longitud de onda, usando buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.0 como blanco. El promedio de cada absorbancia para cada longitud de onda se multiplicó por 160 (para 282 nm) y por 613.33 (para 346 nm). El promedio de las lecturas anteriores indica la concentración real de la solución.

Este procedimiento se realizó a las 2 y 4 semanas después de haber preparado la solución patrón.

Se determinó la estabilidad de las muestras tanto para cianocobalamina como para ácido fólico. Para ello, cuando se realizó la cuantificación de cada vitamina de forma independiente, las 6 muestras utilizadas en cada análisis se prepararon el mismo día¹. De las anteriores, se tomaron los volúmenes que se indican en cada metodología para llevar a cabo cada análisis en el transcurso del mismo día de preparación de cada muestra. El volumen que sobró de cada solución de muestra de cada vitamina se almacenó a 4°C y se analizó nuevamente al día siguiente.

d. **Rango y linealidad del sistema.** Se elaboró una curva de calibración a partir de una solución madre de donde se prepararon 10 y 9 diluciones hijas a diferentes concentraciones para ácido fólico y cianocobalamina, respectivamente; las cuales se analizaron con el método a validar.

Para el ácido fólico, se hizo una curva de calibración con soluciones que tenían las siguientes concentraciones: 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15, 20 y 25 ng/mL.

Para la cianocobalamina, también se preparó una curva de calibración con soluciones que tenían las siguientes concentraciones: 0.05, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12 y 0.14 ng/mL.

Con base a las anteriores, se construyó una gráfica de respuesta en función de la concentración de cada solución. Cada gráfica se evaluó para determinar el rango de trabajo que se adapta a la curva. Se obtuvo el coeficiente de correlación (R^2) para saber si las curvas obtenidas se adaptaban al análisis a validar, con lo cual también se pudo evaluar la linealidad del sistema.

¹ Las 6 muestras de ácido fólico se prepararon en un mismo día. Las 6 muestras de cianocobalamina también se prepararon en un mismo día, pero cabe destacar que no fue el mismo día que se prepararon las de ácido fólico.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cianocobalamina y el ácido fólico son vitaminas que permiten el correcto desarrollo del cuerpo humano, es por ello que muchas personas que padecen deficiencia de las anteriores recurren a ingerir multivitamínicos que les permiten cubrir las dosis diarias de cada una. Dichos multivitamínicos son elaborados por industrias farmacéuticas y pueden existir en distintas presentaciones, dentro de las que se encuentran las cápsulas.

El análisis de ambas vitaminas por métodos como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), radioinmunoensayo, ELISA o cromatografía en papel, es dificultoso debido a que algunos no son lo suficientemente sensibles y otros, porque no son lo suficientemente específicos ya que en las muestras analizadas pueden haber interferentes que compliquen la cuantificación de las vitaminas de interés.

Un claro ejemplo se observa cuando la muestra a analizar, además de vitaminas contiene minerales, en especial, hierro aminoquelado. Este mineral interfiere cuando se desea cuantificar tanto ácido fólico como cianocobalamina por el método de HPLC ya que la señal que emite es muy fuerte y se traslapa con las emitidas por las vitaminas.

La importancia de este trabajo radica en que se proponen métodos de análisis microbiológico para que la industria farmacéutica los implemente en su departamento de control de calidad y de esta manera, pueda realizar la cuantificación tanto de cianocobalamina como de ácido fólico en cápsulas que a su vez, contienen hierro aminoquelado dentro de su formulación farmacéutica. De esta manera, el laboratorio farmacéutico podrá brindar a sus clientes la garantía de que el producto que están consumiendo cumple con los más altos estándares de calidad, los cuales están siendo medidos por métodos de análisis validados. Cabe mencionar que en este estudio se analizó únicamente un tipo de cápsulas; sin embargo, los métodos de cuantificación utilizados pueden ser implementados en otras formas farmacéuticas que contengan tanto ácido fólico como cianocobalamina, por ejemplo: tabletas, suspensiones, gotas, entre otros.

Se ha reportado en varios estudios, que los métodos de análisis microbiológicos son los métodos de referencia para la estimación tanto de vitamina B12 (cianocobalamina) como de ácido fólico, por más de 30 años. Debido a lo anterior, el objetivo principal de este trabajo era el de implementar y validar estas metodologías en una empresa farmacéutica.

El fundamento de los métodos de análisis microbiológico es que los microorganismos utilizados en cada análisis necesitan nutrientes (minerales, aminoácidos y vitaminas) para su desarrollo. Para ello, se hace una extracción y diluciones del analito que se desea cuantificar en la muestra (solución patrón). Luego se procede a preparar un extracto y diluciones de la muestra a analizar (en este caso, cápsulas) en tubos, dichas diluciones deben ser equivalentes a las preparadas con la solución patrón. Posteriormente, las anteriores se inoculan con un microorganismo específico cuya respuesta esté limitada por el nutriente a determinar de una forma directamente proporcional. La respuesta es el crecimiento y desarrollo del microorganismo que puede determinarse midiendo la turbidez (expresada en porcentaje de transmitancia), la cual es interpolada en una curva estándar de calibración versus la concentración del analito.

La forma farmacéutica donde se implementaron ambos métodos de análisis microbiológico fue en cápsulas elaboradas en una industria farmacéutica. Dicha cápsula está compuesta, en teoría, por 8 µg/cápsula de cianocobalamina, 0.800 mg/cápsula de ácido fólico y 30 mg/cápsula de hierro aminoquelado.

En la implementación del método de análisis microbiológico para la cuantificación de cianocobalamina es necesario contar con suficiente cristalería, medios de cultivo específicos y con la cepa bacteriana *Lactobacillus delbrueckii* (antes conocida como *Lactobacillus leichmannii*) certificada por la American Type Culture Collection (ATCC 7830). Esta bacteria se utiliza ya que se ha evidenciado que la cianocobalamina estimula su crecimiento a una temperatura óptima de 37°C.

En el caso de la cuantificación de ácido fólico también es necesario contar con suficiente cristalería, la cual debe ser lavada con un detergente que no propicie el crecimiento de microorganismo. En este caso se utilizó una solución de Extrán al 5%. La bacteria que se utiliza es *Enterococcus hirae* ATCC 8043. Éste es un microorganismo indicador capaz de responder a la presencia de ácido fólico ya sea adicionado o libre y crece a una temperatura óptima de 37°C.

Para que la metodología a implementar para cuantificar ambas vitaminas sea adecuada, específica y sensible, es necesario realizar una extracción del analito a cuantificar. La extracción de la cianocobalamina contenida en la muestra se debe realizar con una mezcla compuesta de fosfato disódico, ácido cítrico anhidro y metabisulfito de sodio en combinación con un aumento de temperatura y presión (autoclave). Cabe mencionar que en este caso no se efectuó la extracción

de la cianocobalamina en la muestra; sin embargo, esto no representó problema alguno en el ejecución del análisis.

La extracción del ácido fólico contenido en la muestra se hizo con una solución básica (hidróxido de amonio al 40 % v/v) en combinación con aumento de temperatura y presión. Una ventaja de utilizar este tipo de extracción es que el reactivo es estable por tiempo indefinido a temperatura ambiente (Juárez, 2005).

Antes de iniciar con la validación de los métodos, se verificaron ciertos aspectos fundamentales en las metodologías microbiológicas a implementar, entre estos: la longitud de onda a la que se hacen las lecturas de porcentaje de transmitancia (%T), la pureza de la cepa bacteriana utilizada y la dilución del inóculo que proporciona la respuesta deseada.

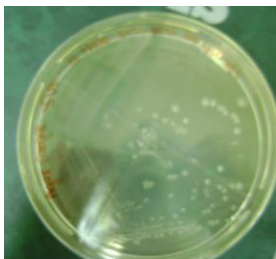
En el caso del ácido fólico, se reporta que la longitud de onda apropiada para utilizar en la lectura de %T es 550 nm. Lo anterior se pudo comprobar mediante la ejecución de un barrido de longitud de onda hecho con el espectrofotómetro utilizado, usando como blanco el caldo base para análisis de ácido fólico y como muestra, un estándar de ácido fólico de concentración 1 ng/mL. Se determinó que la longitud de onda que se puede usar para hacer las lecturas se encuentra en un rango de 530-560 nm, siendo 550nm la que más se ajusta a las necesidades del método.

El mismo procedimiento se siguió para la determinación de la mejor longitud de onda a utilizar para la lectura de %T de las muestras que contienen cianocobalamina. Se ha reportado que la mejor longitud de onda para hacer las lecturas es 530 nm. Para comprobarlo, se hizo un barrido utilizando como blanco el caldo base para análisis de vitamina B12 y como muestra, un estándar de cianocobalamina de 0.01 ng/mL. Se determinó absorción óptima entre 250-280 nm; sin embargo, a pesar de que 530 nm no es el pico máximo de absorción de la cianocobalamina, es la mejor longitud de onda a utilizar ya que el caldo utilizado para el análisis contiene muchos componentes (riboflavina, cromóforos, entre otros) que también absorben luz UV-Vis entre los 250-280 nm, por lo que las señales que emiten podrían interferir con el análisis de cuantificación.

Para verificar la pureza de las cepas bacterianas utilizadas en cada método de cuantificación, se sembró cada una de ellas en medios de cultivo apropiados para cada una. *Enterococcus hirae* se sembró en agar sangre de carnero al 5%, en donde crecieron colonias de tamaño mediano, bordes

redondos y regulares, poca elevación y de color blanco opalescente. Las características anteriores son las que se reportan en la literatura (Figura 4).

Figura 4. *Enterococcus hirae* ATCC 8043 sembrado en agar sangre de carnero al 5%. Vista macroscópica.

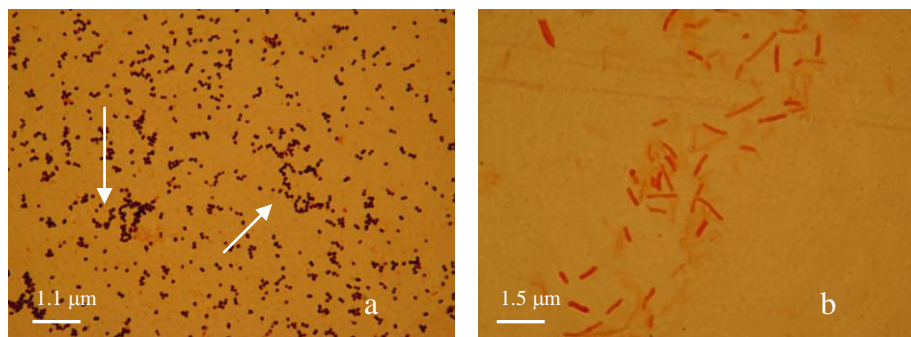


Lactobacillus delbrueckii se sembró en agar Man Rogosa Sharpe (MRS), el cual es exclusivo para el crecimiento de bacterias del género *Lactobacillus*. Se observó el crecimiento de colonias pequeñas, transparentes, de bordes redondos y regulares, con poca elevación.

Para confirmar la pureza de las cepas bacterianas utilizadas se hicieron tinciones Gram. *Enterococcus hirae* se observó como cocos Gram positivo que se presentan en cadenas cortas (Figura 5a), lo cual concuerda con lo reportado en otras investigaciones. *Lactobacillus delbrueckii* se presentó como bacilos largos; sin embargo, a pesar de que se reporta como Gram positivo, se notó una coloración parecida a la que se obtiene en las tinciones Gram negativo.

La causa de lo anterior pudo haber sido que la bacteria produjo mucho ácido láctico en el medio donde se estaba desarrollando, lo cual puede modificar las condiciones de ésta al hacerse la tinción de Gram (Figura 5b). Otra posible explicación para este fenómeno es que la cepa utilizada tenía fecha de caducidad 01-2007 (enero 2007), por lo que puede que ya no estuviera en las condiciones óptimas para su crecimiento y desarrollo normal. De hecho, se presentaron varias dificultades para que ésta se desarrollara incluso en el medio de cultivo selectivo y diferencial para lactobacilos.

Figura 5. (a) Tinción Gram de *Enterococcus hirae* (obsérvese las flechas); (b) tinción Gram de *Lactobacillus delbrueckii*.



En cuanto a las diluciones del inóculo con el que se trabaja en cada análisis, se determinó que el que se prepara para el método de cuantificación de ácido fólico es el apropiado para dicho fin ya que al medir su %T éste es cercana al 70%.

En cuanto a la dilución de inóculo empleado en la cuantificación de cianocobalamina, se recomienda hacer primero una suspensión ajustada 1:20 de microorganismo en solución salina al 0.85% p/v, ésta debe dar un %T igual 70%. A partir de la anterior se debe hacer una dilución apropiada que permita obtener la respuesta deseada. En este caso, se realizaron pruebas con diluciones 1:400, 1:200, 1:100 y 1:50 a partir de la suspensión ajustada, siendo ésta última la que dio los mejores resultados.

Antes de implementar los métodos microbiológicos para la cuantificación de cianocobalamina y ácido fólico en cápsulas, se efectuó la validación de estos. Para tal fin, se establecieron 5 parámetros analíticos basándose en lo indicado por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP). Ésta declara 3 categorías para la validación de métodos. Los métodos a implementar pertenecen a la categoría I, constituida por los “métodos analíticos para la cuantificación de los principales componentes del fármaco o de los principios activos (incluyendo los preservantes) en productos farmacéuticos terminados” (Farmacopea de los Estados Unidos de América, 2007). De acuerdo a lo anterior, los parámetros analíticos evaluados para la validación de los métodos fueron: Precisión (intermedia y del sistema), exactitud, especificidad/estabilidad, rango o intervalo y linealidad del sistema.

Cabe mencionar que para que ambos métodos a implementar sean completamente válidos, el equipo que se utiliza para las mediciones debe estar calificado. En este caso no se realizó este

procedimiento pues la empresa farmacéutica donde se realizó el estudio cuenta con un departamento de Validaciones y Calibraciones, el cual se ha encargado de validar y calificar todo el equipo que hay en funcionamiento dentro de la planta de producción, incluyendo el utilizado para hacer las lecturas de transmitancia necesarias para cuantificar cianocobalamina y ácido fólico.

La precisión intermedia es aquella que refleja las condiciones reales dentro de un laboratorio. Para su determinación, es necesario que las muestras que contienen el analito de interés (en este caso, vitaminas) sean analizadas por analistas diferentes, días diferentes y, si el laboratorio lo permite, equipos diferentes; utilizando el método a validar.

Las condiciones utilizadas en cada uno de los análisis de cuantificación a implementar fueron: dos analistas diferentes, mismo día, misma área, mismo equipo.

El criterio de aceptación utilizado en esta ocasión fue que el coeficiente de variación fuera menor o igual al 5% (Cuadro 9, pág. 39).

De las 6 muestras de cápsulas analizadas por dos analistas distintos, para la cianocobalamina se determinó una media de 7.8512 μg cianocobalamina/cápsula (98.140% de recuperación) con una desviación estándar de 0.326 y un coeficiente de variación de 4.152%, lo que indica que el método es preciso, incluso si es realizado por dos personas distintas. Se puede pensar que el coeficiente de variación que presentó el análisis es un poco alto, pero se debe recordar que el método es de tipo microbiológico, lo cual implica que las condiciones no sólo dependen del analista, sino de los microorganismos utilizados. La variación obtenida pudo deberse tanto al comportamiento de las bacterias que se inocularon al caldo base para análisis de vitamina B12 como a los mismos analistas.

En el Cuadro 10 se logra evidenciar la precisión intermedia del método de análisis microbiológico para cuantificación de cianocobalamina en cápsulas que se desea implementar, ya que los porcentajes de recuperación son buenos y el coeficiente de variación obtenido es menor al 5%.

Cuadro 10. Determinación de la precisión intermedia del método de análisis microbiológico para cuantificación de cianocobalamina en cápsulas

Método de análisis de cuantificación	Analista	No. De muestra	Concentración cianocobalamina ($\mu\text{g}/\text{cápsula}$)	Porcentaje de recuperación (%R)
Microbiológico	1	1	7.298	91.225
Microbiológico	1	2	7.510	93.880
Microbiológico	1	3	8.035	100.437
Microbiológico	1	4	8.000	100.006
Microbiológico	1	5	7.811	97.637
Microbiológico	1	6	8.099	101.243
Microbiológico	2	1	7.448	93.100
Microbiológico	2	2	8.299	103.737
Microbiológico	2	3	8.135	101.687
Microbiológico	2	4	7.721	96.512
Microbiológico	2	5	7.650	95.625
Microbiológico	2	6	8.207	102.587
Media			7.851	98.140
Desv. estándar			0.326	4.0751
Coef. variación			4.152%	4.152%

Para la determinación de la precisión intermedia del método de análisis microbiológico para cuantificar ácido fólico en cápsulas se utilizó el mismo diseño experimental empleado en la cianocobalamina. Con la anterior se logró calcular una media de 0.8017 mg ácido fólico/cápsula (100.224% de recuperación) con una desviación estándar de 0.024 y un coeficiente de variación de 3.047%. Esto quiere decir que el método para cuantificar ácido fólico es preciso, incluso cuando es ejecutado por dos analistas distintos.

Con base a los resultados obtenidos de los cálculos estadísticos correspondientes se comprobó que ambos métodos a implementar en el análisis de cápsulas son precisos, lo cual quedó evidenciado por los coeficientes de variación obtenidos.

En el Cuadro 11 se muestra la precisión intermedia del método de análisis microbiológico para cuantificar ácido fólico, ya que los porcentajes de recuperación son altos y el coeficiente de variación obtenido es menor al 5%.

Cuadro 11. Determinación de la precisión intermedia del método de análisis microbiológico para cuantificación de ácido fólico en cápsulas

Método de análisis de cuantificación	Analista	No. De muestra	Concentración ácido fólico (mg/cápsula)	Porcentaje de recuperación (%R)
Microbiológico	1	1	0.811	101.478
Microbiológico	1	2	0.818	102.296
Microbiológico	1	3	0.816	102.123
Microbiológico	1	4	0.817	102.136
Microbiológico	1	5	0.797	99.725
Microbiológico	1	6	0.805	100.737
Microbiológico	2	1	0.776	97.000
Microbiológico	2	2	0.791	98.900
Microbiológico	2	3	0.825	103.200
Microbiológico	2	4	0.775	96.925
Microbiológico	2	5	0.750	93.862
Microbiológico	2	6	0.834	104.312
		Media	0.801	100.224
		Desv. estándar	0.0244	3.055
		Coef. variación	3.047%	3.048%

La precisión que se espera obtener de cada método a implementar también está dada por la repetibilidad (o precisión del sistema) de cada uno. Para su determinación en el método de cuantificación de cianocobalamina en cápsulas, se calculó la concentración de ésta en 6 muestras distintas (cada muestra se analizó en triplicado). Todo fue realizado por el mismo analista y bajo las mismas condiciones de operación. Los criterios de aceptación establecidos para la evaluación de la repetibilidad fueron: % R = 90-115 % (ácido fólico) y 90-150 % (cianocobalamina) (Farmacopea de los Estados Unidos, 2007); % CV \leq 5 % y un límite de confianza de 95 %.

Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 12, en donde se puede observar que se obtuvo una media de 7.792 μ g cianocobalamina/cápsula (97.405% recuperación), con una desviación estándar de 0.322 y un coeficiente de variación de 4.141%, confirmándose así la repetibilidad del método de cuantificación de cianocobalamina, pues todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación establecidos.

Cuadro 12. Determinación de la repetibilidad del método de análisis microbiológico para cuantificación de cianocobalamina en cápsulas

Método de análisis de cuantificación	No. De muestra	Concentración cianocobalamina ($\mu\text{g}/\text{cápsula}$)	Porcentaje de recuperación (%R)
Microbiológico	1	7.298	91.225
Microbiológico	2	7.510	93.880
Microbiológico	3	8.035	100.437
Microbiológico	4	8.000	100.006
Microbiológico	5	7.811	97.637
Microbiológico	6	8.099	101.243
	Media	7.792	97.405
	Desv. estándar	0.322	4.033
	Coef. variación	4.141%	4.141%

En el Cuadro 13 se observan los resultados de la evaluación de repetibilidad del método de cuantificación del ácido fólico.

Luego de haberse obtenido una media de 0.811 mg ácido fólico/cápsula (101.415% recuperación), una desviación estándar de 0.008 y un coeficiente de variación de 0.993%, se confirma que el método de cuantificación de ácido fólico por medio de análisis microbiológico posee repetibilidad. Es posible afirmar lo anterior pues los resultados obtenidos cumplen con los criterios de aceptación establecidos.

Cuadro 13. Determinación de la repetibilidad del método de análisis microbiológico para cuantificación de ácido fólico en cápsulas

Método de análisis de cuantificación	No. De muestra	Concentración ácido fólico ($\text{mg}/\text{cápsula}$)	Porcentaje de recuperación (%R)
Microbiológico	1	0.811	101.478
Microbiológico	2	0.818	102.296
Microbiológico	3	0.816	102.123
Microbiológico	4	0.817	102.136
Microbiológico	5	0.797	99.725
Microbiológico	6	0.805	100.737
	Media	0.811	101.415
	Desv. estándar	0.008	1.011
	Coef. variación	0.993%	0.997%

Otro parámetro analítico que deben cumplir los métodos a validar es la exactitud. Para ello, se determinó la concentración de cada vitamina (independientemente) en 6 muestras de cápsulas de concentración única conocida (0.800 mg/cápsula de ácido fólico y 8 µg/cápsula de cianocobalamina), en dos días distintos. Los criterios de aceptación establecidos fueron: %R = 90-115 % (ácido fólico) y 90-150 % (cianocobalamina); % CV ≤ 5.0 %; Test t de Student: $t_{\text{experimental}} < t_{\text{tabla}}$, $\alpha = 0.05$ y límite de confianza: 95 %.

Los resultados para la evaluación de exactitud del método de cuantificación tanto de cianocobalamina como de ácido fólico se muestran en el Cuadro 14. La exactitud se evaluó simultáneamente con la precisión intermedia.

Cuadro 14. Determinación de la exactitud de los métodos de análisis microbiológico para cuantificación de cianocobalamina y ácido fólico en cápsulas

Método de análisis de cuantificación	No. De muestra	Concentración cianocobalamina (µg/cápsula)	Concentración ácido fólico (mg/cápsula)
Microbiológico	1	7.298	0.811
Microbiológico	2	7.510	0.818
Microbiológico	3	8.035	0.816
Microbiológico	4	8.000	0.817
Microbiológico	5	7.811	0.797
Microbiológico	6	8.099	0.805
Microbiológico	1	7.448	0.776
Microbiológico	2	8.299	0.791
Microbiológico	3	8.135	0.825
Microbiológico	4	7.721	0.775
Microbiológico	5	7.650	0.750
Microbiológico	6	8.207	0.834
	Media	7.851	0.801
	Desv. estándar	0.326	0.0244
	Coef. variación	4.152%	3.047%

Se aplicó la prueba t de Student, la cual permite conocer la diferencia que existe entre medias muestrales a unidades de error estándar de la diferencia. Para el análisis de ácido fólico, se obtuvo una $t_{\text{experimental}}$ menor a la t_{tabla} ($0.05 < 1.41$). Para la cianocobalamina también se estableció

una $t_{\text{experimental}}$ menor a la t_{tabla} ($0.05 < 0.606$). En base a los resultados anteriores, puede pensarse que el valor medio hallado para cada análisis y el valor considerado verdadero no difieren significativamente para un grado de probabilidad de 0.05.

Se puede notar que los resultados obtenidos para ambos métodos sí cumplen con los criterios de aceptación establecidos, por lo que se puede decir que los métodos de cuantificación además de precisos, también son exactos.

Cabe mencionar que la exactitud y precisión de cada procedimiento de medición se tuvo que haber evaluado sometiendo cada método a la determinación cuantitativa de ácido fólico y cianocobalamina con un material estándar de referencia del National Institute of Standards and Technology (NIST): tabletas NIST SRM 3280 multivitamin/multielement (Nelson, et.al., 2006). Sin embargo, no se contaba con dicho material de referencia, por lo que el análisis se hizo con las mismas muestras.

Para determinar la especificidad del método de cuantificación de cianocobalamina, se analizaron muestras de tabletas que no contenían dicha vitamina, pero sí contenían ácido fólico. En algunos de los tubos utilizados para el análisis se observó turbidez, lo cual implica que hubo crecimiento bacteriano. Esto posiblemente se debió a que tanto las tabletas como el caldo base para análisis de vitamina B12 contienen ácido fólico en su composición y se ha reportado que *Lactobacillus delbrueckii* requiere ácido fólico para crecer, entre otros nutrientes. Lo anterior no indica que el método no sea específico para cuantificar cianocobalamina, pues no hubo crecimiento en todos los tubos; sin embargo, es recomendable buscar algún otro caldo base para el análisis de la vitamina B12 o simplemente, utilizar otra muestra que no contenga ácido fólico ni cianocobalamina ya que se probó que el método no es 100% selectivo para ésta.

La especificidad del método de cuantificación de ácido fólico se hizo analizando cápsulas que no contenían dicha vitamina. No hubo crecimiento en ninguno de los tubos utilizados para el ensayo, lo cual evidencia la especificidad y selectividad del método a implementar.

Se evaluó la estabilidad de la solución madre de ácido fólico ($100.218 \mu\text{g/mL}$) a las 2 y 4 semanas luego de haber preparado la solución. El método oficial reporta que dicha solución es estable durante 2 meses en refrigeración al agregarle una capa de tolueno para que ésta no esté en

contacto con el oxígeno y se degrade con mayor rapidez. El Cuadro 15 muestra la variación de la concentración de la solución madre de ácido fólico.

Cuadro 15. Variación de la concentración de la solución patrón de ácido fólico al ser refrigerada

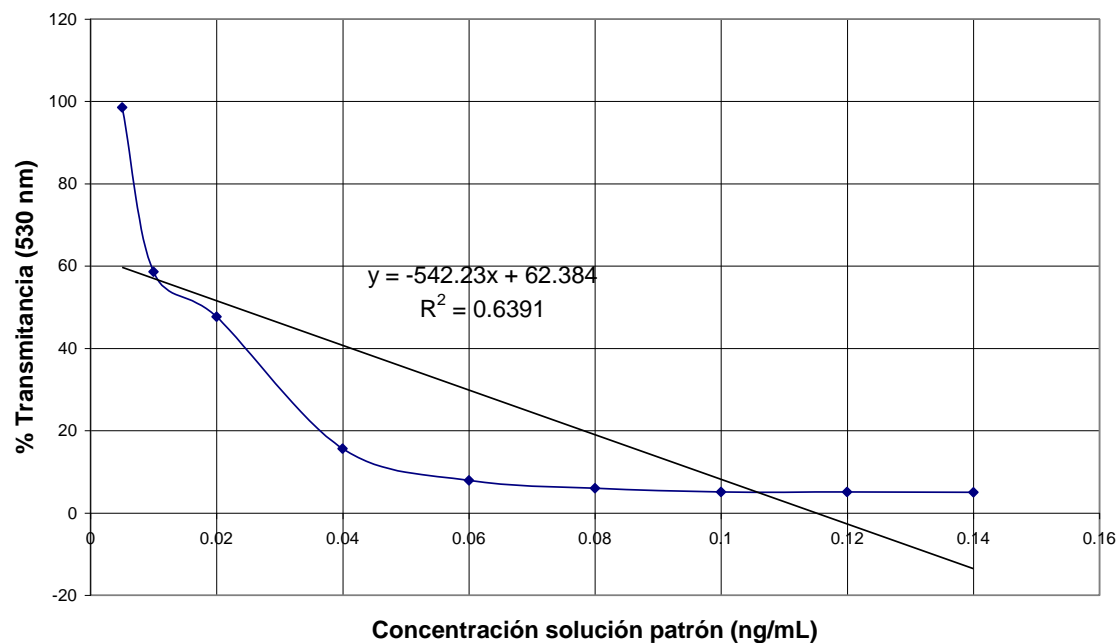
Evaluación solución patrón	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
Día de preparación	100.218
Segunda semana de preparación	96.421
Cuarta semana de preparación	91.574

Como se puede observar, las variaciones de la concentración de la solución patrón son notorias. Lo anterior se puede deber a que en este caso no se le agregó tolueno a ésta, lo cual pudo haber provocado la pronta degradación del ácido fólico. Por ello, se recomienda la utilización de tolueno como protector contra la oxidación y degradación del ácido fólico. Así mismo, se recomienda evaluar la concentración de la solución patrón más seguido (semanalmente) para evitar incurrir en errores al momento de cuantificar el ácido fólico en las muestras a analizar.

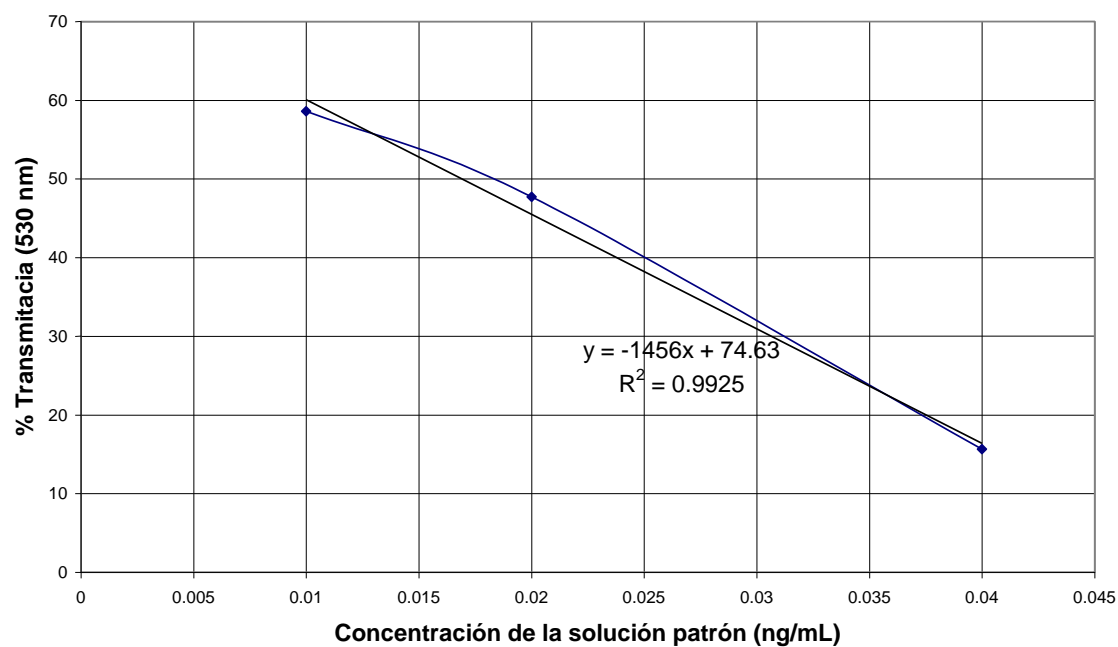
La estabilidad de las muestras preparadas tanto de ácido fólico como de cianocobalamina se evidenció luego de que éstas mostraron exactitud y precisión luego de que se analizaron en días distintos. Las muestras correspondientes a cada análisis se prepararon en un mismo día, se tomaron los volúmenes adecuados de cada una para realizar una corrida y luego de usarlas, éstas se almacenaron a 4°C para ser utilizadas al día siguiente. Se deduce entonces que las muestras son estables por lo menos por un día. Ya que en la industria farmacéutica los análisis de control de calidad de los productos deben realizarse en un tiempo corto, no es necesario determinar la estabilidad de las muestras preparadas luego de 2 ó más días.

Para la cuantificación de cianocobalamina en cápsulas, se logró establecer un rango de trabajo que va desde 0.0110 ng/mL hasta 0.04050 ng/mL . El anterior se pudo determinar gracias a la curva de calibración que se construyó en base a los distintos estándares (con concentración diferente) utilizados (diseño experimental, pág. 29). Al observar la curva que incluye a todos los estándares, se puede ver que la linealidad del sistema no es buena ($R^2 = 0.6391$) (Gráfica 1); sin embargo, al eliminar los estándares que ya no entran dentro del rango de trabajo y linealidad, se notó que ésta última mejoró considerablemente ($R^2 = 0.9925$) (Gráfica 2).

Gráfica 1. Linealidad y rango del sistema de cuantificación de cianocobalamina en cápsulas



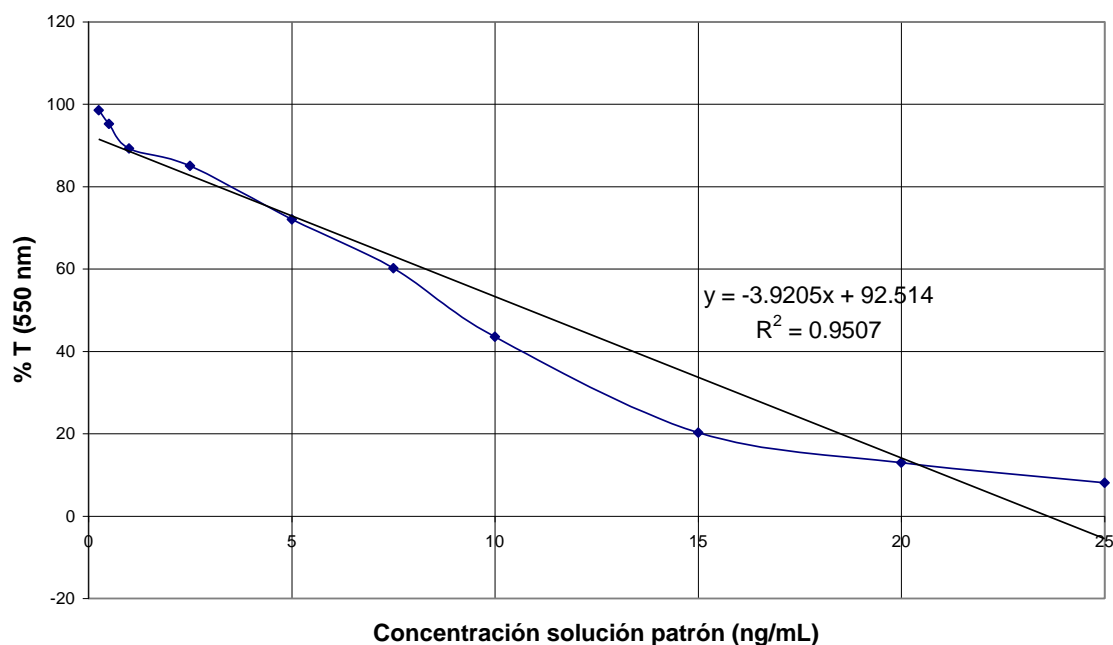
Gráfica 2. Linealidad del sistema de cuantificación de cianocobalamina en cápsulas



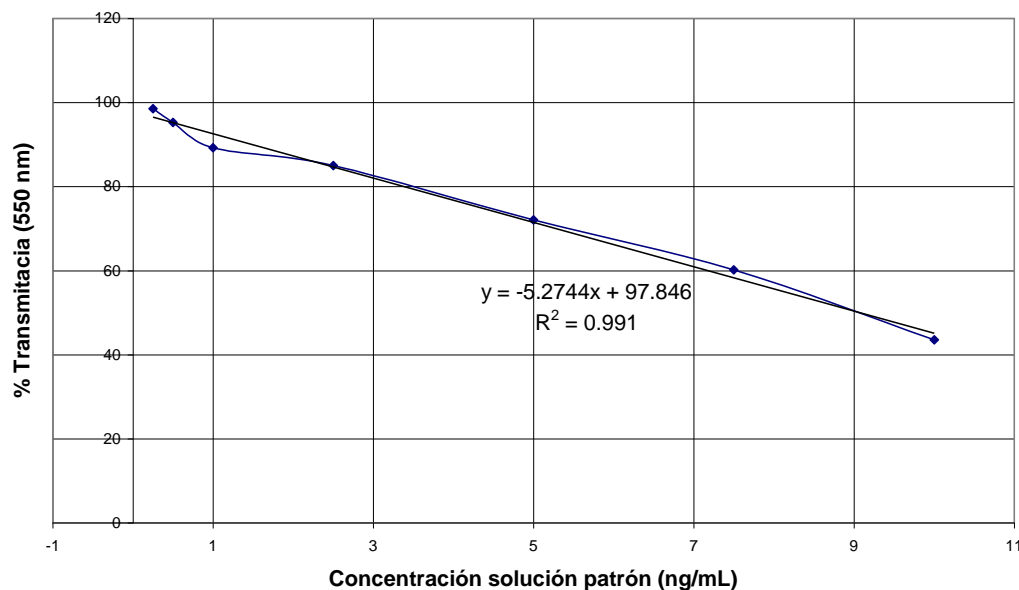
De igual manera, se determinó un rango de trabajo para el método de cuantificación de ácido fólico en cápsulas que va desde 0.1316 ng/mL hasta 10.2923 ng/mL. Dicho rango se halló mediante la elaboración de una curva de concentración del analito-respuesta (%T) utilizando soluciones estándares con distintas concentraciones de ácido fólico (diseño experimental, pág.29). Al observar la curva estándar de calibración que incluye todos los estándares, se nota que la linealidad del sistema es aceptable, aunque no es la mejor ($R^2 = 0.9507$) (Gráfica 3), es por ello que se eliminaron los estándares que no entraban dentro del rango de trabajo, con lo cual mejoró la linealidad del sistema ($R^2 = 0.991$) (Gráfica 4).

Con base a los rangos de trabajo establecidos y a las curvas estándar de calibración construidas para cada método de cuantificación se puede decir que ambos presentan linealidad y rangos de trabajo apropiados para la detección y cuantificación de ácido fólico y cianocobalamina, por lo que sí pueden ser implementados en la industria farmacéutica para la cuantificación de éstas en cápsulas.

Gráfica 3. Linealidad del sistema de cuantificación de ácido fólico en cápsulas



Gráfica 4. Linealidad del sistema para cuantificación de ácido fólico en cápsulas



Al analizar los resultados obtenidos de cada parámetro analítico establecido para la validación de las dos metodologías, se observa que cada uno de ellos cumple con sus respectivos criterios de aceptación. Con lo anterior ya evidenciado, se acepta la hipótesis propuesta al inicio del estudio: ambos métodos de cuantificación fueron validados bajo las condiciones en las que se ejecutó cada análisis, por lo tanto, éstos pueden ser implementados en la industria farmacéutica.

Respecto a la implementación de las metodologías de análisis para cada vitamina, se puede decir que éstas se fueron implementando mientras se validaba el método, lo cual queda evidenciado en los cuadros 12 y 13 (pág. 50 y 51, respectivamente), en donde se muestran los resultados obtenidos al emplear cada metodología para la cuantificación de ácido fólico y cianocobalamina en 6 muestras de cápsulas que contienen a las dos anteriores.

Es importante mencionar que los métodos en estudio consumen mucho tiempo, reactivos y se requiere de personal capacitado para su ejecución por lo que sería recomendable adaptar ambos métodos a microplaca, ya que es más rápido y económico.

Las cantidades de muestra utilizadas en cada análisis se calculan en base al contenido de vitamina que hay en cada cápsula, es por ello que se presume que estas metodologías también se pueden implementar y validar en otras presentaciones farmacéuticas, tales como suspensiones, tabletas, gotas, entre otros.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se comprobó que no es necesaria la extracción de la cianocobalamina contenida en las muestras a analizar, pues la cuantificación lograda con el método de análisis microbiológico fue certera, exacta y precisa.
2. Se determinó, mediante un barrido, que la mejor longitud de onda para las lecturas de %T que permiten la cuantificación de ácido fólico es de 550 nm, mientras que la que mejor se ajusta para la cuantificación de cianocobalamina es 530 nm.
3. La pureza de las cepas utilizadas en cada método se demuestra por medio de las características morfológicas de las colonias y por la tinción de Gram.
4. Se demostró que la bacteria *E. hirae* ATCC 8043 es Gram positivo, mientras que la bacteria *L. delbrueckii* ATCC 7830 en este caso es Gram positivo dudoso.
5. Se mostró que no es necesario hacer dilución del inóculo de bacteria con el que se trabaja en el método de cuantificación de ácido fólico en cápsulas.
6. En el método para cuantificar cianocobalamina en cápsulas, la dilución del inóculo de bacteria que mejor respuesta dio fue la de 1:50.
7. Debido a que las metodologías a implementar son de categoría I según la USP, se establecieron parámetros analíticos que permitieron la validación de ambos métodos: precisión (intermedia y repetibilidad), exactitud, especificidad/estabilidad, rango de trabajo y linealidad del sistema.
8. Al evaluar la precisión intermedia y repetibilidad de los métodos a implementar, se concluyó que los resultados obtenidos cumplen con los criterios de aceptación establecidos, por lo tanto, los métodos son precisos.
9. La prueba t de Student evidenció que el valor medio hallado para cada análisis y el valor verdadero (8 µg cianocobalamina/cápsula y 0.800 mg ácido fólico/cápsula) no difieren

significativamente para un grado de probabilidad de 0.05, por lo que se considera que ambos métodos son exactos.

10. Se probó que ambos métodos son específicos para cada vitamina analizada; sin embargo, el método de la cianocobalamina no es 100% selectivo para dicha vitamina.
11. Al evaluar la variación en la concentración de la solución madre de ácido fólico se encontró que ésta se degrada fácil y rápidamente (en un mes aproximadamente) si no se le agrega una capa de tolueno.
12. Las muestras que se prepararon para la cuantificación de cada vitamina fueron estables después de un día de elaboración. Esto quedó comprobado con los resultados obtenidos, los cuales fueron exactos y precisos.
13. Para la cuantificación de cianocobalamina en cápsulas multivitamínicas se determinó un rango de trabajo que va desde 0.1316 hasta 10.2923 ng/mL, mientras que el rango de trabajo calculado para el análisis de ácido fólico fue de 0.0110 a 0.04050 ng/mL.
14. Ambos métodos de cuantificación poseen buena linealidad, lo cual se fundamenta en los valores obtenidos de R^2 para cada curva estándar de calibración: 0.9910 para ácido fólico y 0.9925 para cianocobalamina.
15. De las 6 muestras analizadas por cada método de cuantificación se determinó que la muestra 1 fue la que presentó menor concentración de cianocobalamina (7.298 μ g/cápsula; 91.225% recuperación), mientras que la muestra 5 fue la que tuvo menor concentración de ácido fólico (0.797 mg/cápsula; 99.625% recuperación).
16. Se logró implementar y validar ambos métodos de análisis microbiológico en la industria farmacéutica donde se realizó el estudio.

IX. RECOMENDACIONES

1. Considerar la implementación y validación de ambos métodos de cuantificación de vitaminas en cápsulas, pero tomando en cuenta la variante de microplaca, ya que puede representar mayor productividad y menos costos para el laboratorio de control de calidad.
2. Verificar la fecha de caducidad de todos los materiales y reactivos que se utilizan, incluyendo las cepas bacterianas con las que se trabajarán.
3. Para lograr que el método de análisis de cuantificación de cianocobalamina sea más selectivo, buscar otro caldo base para el análisis de vitamina B12 o utilizar otra muestra que no contenga compuestos que puedan ayudar al desarrollo de la bacteria.
4. Evaluar con mayor periodicidad la solución patrón de ácido fólico. Así mismo, adicionarle una capa de tolueno para que el ácido fólico no se degrade con facilidad.
5. Utilizar materiales de referencia para la evaluación de la precisión (intermedia y repetibilidad) y exactitud que necesita tener cada método para ser validado.
6. Implementar las metodologías de cuantificación de vitaminas (ácido fólico y cianocobalamina) en otras presentaciones farmacéuticas.

X. LITERATURA CITADA

1. Alcamo, E. 2001. *Fundamentals of Microbiology*. 6ª edición. Editorial Jones and Bartlett Publishers. Estados Unidos. Págs. 725-726, 815.
2. Berg, T., J. De Vries, C. van Gastaren, H. Meeuwissen, G. Stevens y F. Verbon. 1976. *Comparative studies on the Microbiological Vitamin B₁₂ Assay at two Laboratories. Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 31, (4):459-464. Estados Unidos. Abstract en: <http://aem.asm.org/cgi/reprint/31/4/459>
3. Comité de expertos de la OMS en especificaciones para las preparaciones farmacéuticas. 1992. *Informe OMS, Serie de Informes Técnicos*. 32. (823):121-125.
4. Guyton, A. 1992. *Tratado de Fisiología Médica*. 2a edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México, D. F. Págs. 820-821.
5. Hébert, E., R. Raya y G. Savoy. 2004. *Nutritional Requirements of Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis in a Chemically Defined Medium. Journal of Current Microbiology*. 49. (5): 341-345.
6. Hoffman, C., E. Stokstad, B. Hutchings, A. Dornbush y T. Jukes. 1949. *The Microbiological Assay of vitamin B₁₂ with Lactobacillus leichmannii. The Journal of Biological Chemistry*. 181. (2): 635-644. Abstract en: <http://www.jbc.org/cgi/reprint/181/2/635>
7. Huber, L. 2001. *Validation of Analytical Methods: Review and Strategy*. Revisión 2.01, Agilent Technologies. LabCompliance. Abstract en: <http://www.daqbi.cefetpr.br/professores/claudia/validation%20exemplo%201%20.pdf>

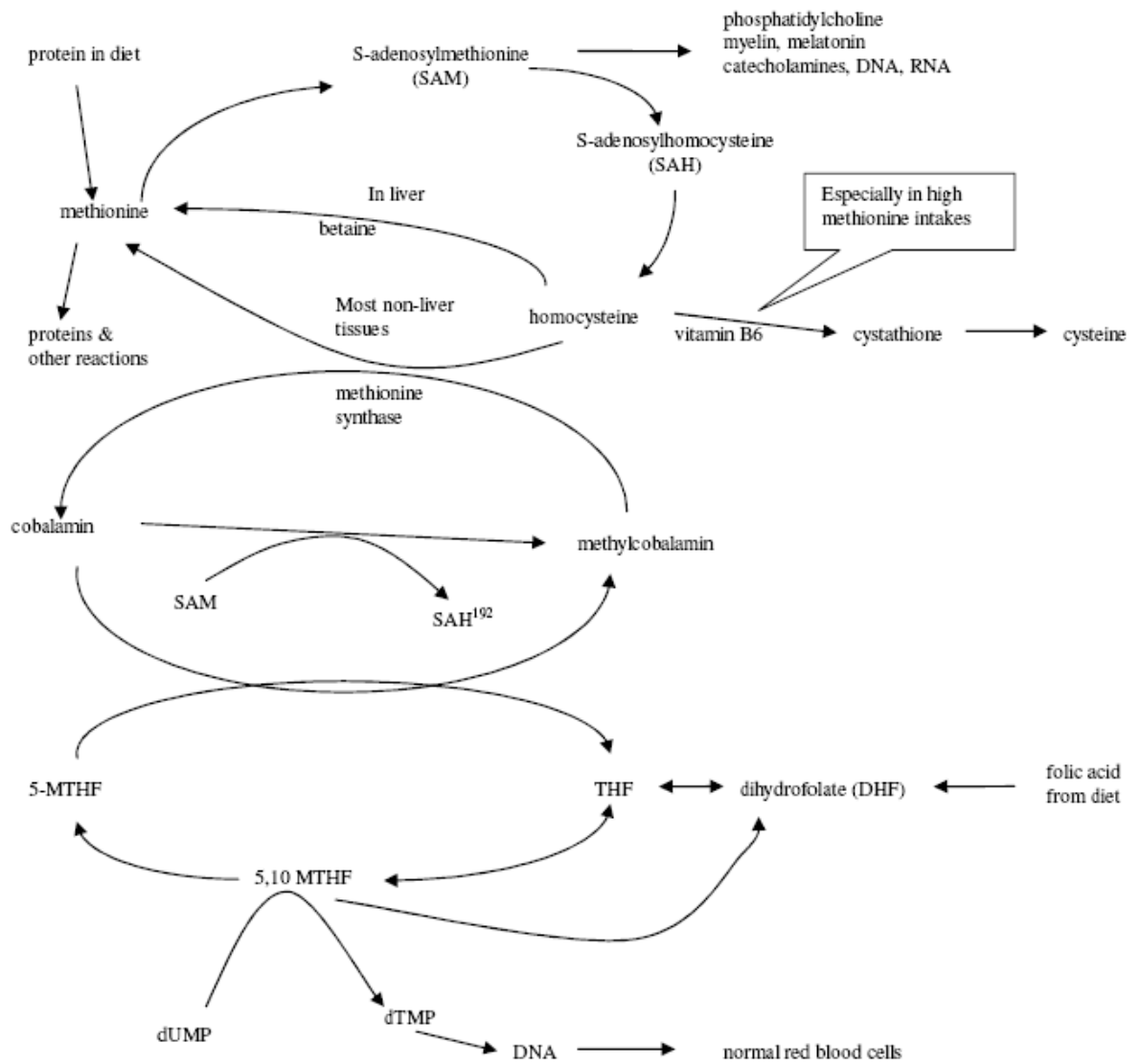
8. ISO/DI 5725-1. 1991. *Accuracy: Trueness and precisión of measurement method and results*. A basic method for determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.
9. ISO/DI 5725-2. 1991. *Accuracy: Trueness and precisión of measurement method and results*. General principles and definitions.
10. Juárez, B. 2005. *Validación del método microbiológico en microplaca para la determinación de ácido fólico en alimentos fortificados*. Facultad de Ciencias y Humanidades, Universidad del Valle de Guatemala. Págs. 33-58.
11. Juárez, P. 2004. *Manual del método microbiológico para la determinación de ácido fólico en alimentos fortificados*. Laboratorio de composición de alimentos. Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP) y Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2a edición. Guatemala.
12. Labsystems Corp., Research Laboratorios. 1990. *Bioscreen Assay of Vitamins and Amino Acids: folic acid (B-group vitamin), calcium pantothenate (vitamin B3), biotin (B-group vitamin), cyanocobalamin (vitamin B12), niacin (vitamin B5) and tylosine (antimicrobial)*. Helsinki, Finlandia. Abstract en: http://www.bionewsonline.com/b/2/labsystems_2.htm
13. Lakshminarayana, K., Y. Manohara, B. Gurupadayya. 2007. *Development and validation of spectrophotometric methods for the estimation of nitazoxanide in tablet dosage forms*. *Indian J Pharm Sci.* 69:147-149.
14. Lange, N. 1967. *Handbook of Chemistry*. 10ma edición. Editorial McGraw-Hill Book Company. Estados Unidos. Pág. 816.
15. Linstromberg, W. 1977. *Curso breve de Química orgánica*. Universidad de Nebraska. Versión en español. Editorial Reverté, S.A. España. Pág. 460-461.

16. Marsili, R. 1996. *Are new methods better? Best vitamin testing methods*. QA/QC, Food Product Design. Virgo Publishing. Abstract en: <http://www.foodproductdesign.com/archive/1996/0296QA.html>
17. Nelson, B., K. Sharpless, L. Sander. 2006. *Quantitative determination of folic acid in multivitamin/multielement tablets using liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. *Journal Chromatogr A*. 1135(2):203-11.
18. Norris, J. 2002. *Vitamin B₁₂: Are you getting it?*. Vegan Outreach. Rev 05/02. Abstract en: <http://www.veganoutreach.org/health/B122002.pdf>
19. Sigvardson, K., J. Manalo, R. Roller, F. Saless y D. Wasserman. 2001. *Laboratory Equipment Qualification*. *Pharmaceutical Technology*. 72: 102-108.
20. Stokstand, E. y S. Thenen. 1963. *Chemical and Biochemical reactions of folic acid*. Academic Press. Estados Unidos. Pág. 387-405.
21. The United States Pharmacopeial Convention. 2007. *Farmacopea de los Estados Unidos de América 30 (USP 30)*. Edición Anual en Español. Vol. 1. Port City Press, Baltimore, USA. Pág. 149-150, 176, 1087-1088, 1092-1093.
22. University of Akron Chemical Database. 2007. *Folic acid*. Departamento de Química, Universidad de Akron, Estados Unidos. Abstract en: <http://ull.chemistry.uakron.edu/erd/chemicals/9001/9771.html>
23. Villee, C. 1996. *Biología*. 8va edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México, D. F. Pág. 430.

XI. APÉNDICE

Anexo A. Ciclo de la metionina-homocisteína-ácido fólico-vitamina B₁₂

Figura 6. Diagrama de flujo que muestra el Ciclo de la metionina-homocisteína-ácido fólico-vitamina B₁₂ (Norris, 2002)



Anexo B. Preparación de soluciones de trabajo para la cuantificación de ácido fólico usando método turbidimétrico

- **Ácido clorhídrico 0.1N:** Transferir 8.3 mL de ácido clorhídrico concentrado a un balón volumétrico de 1,000 mL, que contenga previamente 500 mL de agua destilada. Disolver y llevar a volumen, mezclar.

- **Agua destilada tratada con carbón activado:** Agregar 10 mg de carbón activado a un litro de agua destilada. Filtrar la solución a través de papel filtro Whatman No. 1. Esta solución debe prepararse el mismo día a utilizarse.

- **Buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.0:** Pesar 13.61 g de fosfato de potasio monobásico y transferir a un balón volumétrico de 1,000 mL, disolver con 500 mL de agua y ajustar a pH 7.0 con hidróxido de potasio 4 N. Llevar a volumen con agua y mezclar. Esta solución debe prepararse el mismo día a utilizarse.

- **Solución salina isotónica estéril 0.85% p/v:** Pesar 8.5 g de cloruro de sodio y transferir a un balón volumétrico de 1,000 mL, disolver con 500 mL de agua destilada y llevar a volumen, mezclar. Colocar la solución en una botella y esterilizar en autoclave a 121 – 124 °C durante 30 minutos. Esta solución debe prepararse el mismo día a utilizarse.

- **Hidróxido de amonio 40% v/v:** Transferir 40 mL de amoníaco concentrado a un balón volumétrico de 100 mL que contenga 30 mL de agua destilada. Disolver y llevar a volumen y mezclar.

- **Hidróxido de amonio 0.1 M:** Transferir 1.4 mL de amoníaco concentrado a un balón volumétrico de 100 mL, que contenga previamente 50 mL de agua destilada, disolver, llevar a volumen y mezclar.

- **Hidróxido de sodio 0.1 N:** Pesar 4 g de hidróxido de sodio y transferir a un balón volumétrico 1,000 mL. Disolver con 50 mL de agua destilada, permitir que enfríe, llevar a volumen con agua destilada y mezclar.

- **Hidróxido de sodio 0.01 N:** Transferir 100 mL de la solución de hidróxido de sodio 0.1 N a un balón volumétrico de 1,000 mL, llevar a volumen con agua y mezclar.

- **Solución madre:** Pesar 50 mg del estándar de ácido fólico y transferir a un balón volumétrico de 500 mL y disolver y llevar a volumen con buffer fosfato 0.1 M pH 7.0.

- **Solución intermedia 1 (1 µg/mL):** Transferir 1 mL de la solución madre a un balón volumétrico de 100 mL, que contenga 50 mL de agua destilada y ajustar a pH 7 – 8 con HCl o NaOH 0.1 N gota a gota. Llevar a volumen con agua y mezclar.

- **Solución intermedia 2 (10 ng/mL):** Transferir 1 mL de la solución intermedia 1, a un balón volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con agua destilada y mezclar. Esta solución se debe preparar cada vez que se va a utilizar.

- **Solución de trabajo (1 ng/mL):** Transferir 5 mL de la solución intermedia 2, a un balón volumétrico de 50 mL, llevar a volumen con agua destilada tratada con carbón activado y mezclar. Esta solución se debe preparar cada vez que se va a utilizar.

Anexo C. Composición y preparación de medios de cultivo utilizados para la cuantificación de ácido fólico usando método turbidimétrico

- Fórmula caldo tripticas soya (según Merck):

Ingredientes:	g/L
Digerido pancreático de soja	3.0 g
Digerido pancreático de caseína	17 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato de potasio	2.5 g
Dextrosa	1.0 g

Pesar 30.0 g del caldo a un beacker de 1,000 mL. Agregar 1,000 mL agua destilada y mezclar. Calentar hasta que todo el polvo se haya disuelto. Ajustar el pH a 7.3 ± 0.2 (25°C) con HCl 0.1 o NaOH 0.1 N. Esterilizar en autoclave a 121 – 124 °C durante 15 minutos. Dispensar en viales de 2.5 mL e incubar por 24 horas a 35 - 37°C. Este medio se puede guardar por dos meses a una temperatura de 2 – 8 °C.

- Fórmula agar sangre de carnero al 5% (v/v) (según Merck):

Ingredientes:	g/L
Digerido pancreático de caseína	10
Peptona proteasa N. 3	5.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Digerido de corazón de res	3.0 g
almidón	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	15.0 g
Sangre de carnero desfibrinada estéril	52.6 mL / L de agar base

Pesar 44.0 g del agar, suspender en un litro de agua destilada calentar y dejar hervir 1 minuto. Ajustar a pH 7.3 ± 0.2 (25°C) con HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N. Esterilizar en autoclave a 121 – 124 °C durante 15 minutos. Enfriar a 45 – 50°C y agregar asépticamente 52.6 mL de sangre de carnero desfibrinada estéril y mezclar. Dispensar el medio en cajas de Petri y dejar enfriar. Incubar por 24 horas a 35-37°C. Este medio se puede guardar por dos meses a una temperatura de 2 – 8 °C.

- Fórmula para el medio de análisis de ácido fólico (según Merck):

Caseína ácido hidrolizada, libre de vitaminas	10 g
L-asparagina	0.6 g
L-triptófano	0.2 g
Hidrocloreuro de L-cisteína	0.76 g
Dextrosa	40 g
Adeninsulfato	0.01 g
Hidrocloreuro de Guanina	0.01 g
Uracilo	0.01 g
Xantina	0.02 g
Acido p-aminobenzóico	0.001 g
Hidroxicloruro de piridoxina	0.004 g
Hidrocloreuro de tiamina	0.0004 g
Pantotenato de calcio	0.0008 g
Acido nicotínico	0.0008 g
Biotina	0.00002 g
Riboflavina	0.001 g
Glucagón	0.0052 g
Polisorbato 80	0.1 g
Citrato de sodio	52 g
Fosfato de dipotasio	6.4 g
Sulfato de magnesio	0.4 g
Sulfato de manganeso	0.02 g
Cloruro de sodio	0.02 g
Sulfato ferroso	0.02 g

Pesar 11.1 g del medio, suspender en 100 mL de agua destilada calentar y dejar hervir de 2 – 3 minutos. Rápidamente, enfríe en baño de agua fría. Cuando el medio esté a temperatura ambiente, ajustar a pH 6.8 ± 0.2 (25°C) con HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N. Preparar solamente la cantidad necesaria para cada corrida.

Anexo D. Composición y preparación de medios de cultivo utilizados para la cuantificación de cianocobalamina usando método turbidimétrico

- Caldo base para el ensayo de Vitamina B12 (Vitamin B12 Assay Broth, Base. Según Merck)

D(+) Glucosa, anhidra	40 g
Caseína hidrolizada “libre vitamina”	15 g
L-asparagina	200 mg
L cisteína clorhidrato	200 mg
L-cistina	400 mg
L-triptófano	200 mg
Adenina	20 mg
Guanina	40 mg
Uracilo	20 mg
Xantina	20 mg
Acido 4-aminobenzoico	2 mg
L(+) ácido ascórbico	4 g
D(+) Biotina (Vitamina H)	10 mcg
Pantotenato de calcio D(+)	1 mg
Acido fólico	200 mcg
Acido nicotínico	2 mg
Piridoxal clorhidrato	4 mg
Piridoxina clorhidrato	800 mcg
Riboflavina	1 mg
Clorhidrato de tiamina	1 mg
Hidrogenofosfato di-potasico	1 g
Sulfato ferroso	20 mg
Dihidrogenofosfato de potasio	1 g
Sulfato de magnesio	400 mg
Sulfato de manganeso	20 mg
Acetato de sodio anhidro	20 g
Cloruro de sodio	20 mg
Tween 80*	2 mL
Agua	1000 mL

pH después de esterilización: 6.0 ± 0.2 a 25°C

*Tween 80 debe agregarse al preparar el medio.

Disolver los ingredientes en agua, ajustar el pH después de esterilización y esterilizar por calor en autoclave a 121°C por 15 minutos.

- Caldo para microinoculación (Micro-Inoculum Broth) (Merck)

Peptona proteasa	5.0 g
Extracto de levadura	20.0 g
D(+) glucosa	10.0 g
Dihidrogenofosfato de potasio	2.0 g
Tween 80	0.1 g
Agua destilada	1000 mL

pH después de esterilización: 6.7 ± 0.1 a 25°C

Disolver los ingredientes en agua, filtrar y ajustar el pH después de esterilización, esterilizar por calor en autoclave a 121°C por 15 minutos.

- Medio para suspensión del inóculo

Diluir un volumen conocido del caldo base para el ensayo de vitamina B12 con igual volumen de agua destilada. Agregar en tubo de pyrex 10 mL y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar tan rápido como sea posible para evitar formación de color debido al sobrecalentamiento del medio.

- Medio de cultivo para mantenimiento de *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830:

A 100 mL del caldo para microinoculación agregar de 1.0 a 1.5 g de agar, calentar en baño de vapor con agitación hasta que se disuelva el agar. Colocar 10 mL de la solución caliente en tubos pyrex, esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos, inclinar los tubos y dejar que el medio se solidifique en un cuarto a temperatura.

Anexo E. Reactivos químicos, materiales y equipo utilizados para la cuantificación de ácido fólico en cápsulas.

Cuadro 16. Materiales y reactivos necesarios para la cuantificación de ácido fólico

Reactivos/Soluciones	Cepa bacteriana /Medios de cultivo	Cristalería	Equipo
Acido clorhídrico 0.1N (Merck)	Cepa liofilizada de <i>Enterococcus hirae</i> ATCC 8043 (MicroBiologics)	5 Balón volumétrico de 1,000 mL (Blau Brand)	Papel filtro Whatman No. 1, 110 mm (Schleicher & Schuell)
Agua destilada		1 Balón volumétrico de 200 mL (Blau Brand)	Incubadora (Precision)
Carbón activado (Merck)	Caldo Trypticasa soya (Merck)	5 Balón volumétrico de 100 mL (Kimax)	Autoclave (Varioklav)
Buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.0 (Merck)	Caldo para la preparación de inóculos para ensayos microbiológicos de vitaminas (Merck)	1 Balón volumétrico de 50 mL (Kimax)	Potenciómetro (Mettler-Toledo, modelo Seven-Go)
Hidróxido de potasio 4N (Merck)	Agar Sangre de carnero al 5% v/v (Merck)	Botella de vidrio con tapón de rosca	Pipeta automática 10, 200 y 1000 µL (Transferpipette)
Solución salina isotónica estéril 0.85% p/v	Medio de análisis de ácido fólico (Merck)	1 Beacker de 1,000 mL	Tips estériles 50 µL (Eppendorf)
Cloruro de sodio (Merck)	Estándar de referencia de ácido fólico con certificado USP (No. Catálogo 28600, lote P)	2 Beacker de 50mL (VWR)	Baño maría (VWR Scientist Inc.)
Hidróxido de amonio 40% v/v (Merck)		3 juegos de Tubos de 16-20 mm de diámetro (Pyrex)	Vórtex (MG, modelo VM-300)
Hidróxido de amonio 0.1 M (Merck)		Balón volumétrico de 500 mL	Espectrofotómetro UV-VIS (Beckman, modelo DV series 600) y celdas
Hidróxido de sodio 0.01 N y 0.1 N (Merck)		Recipientes color ámbar	Centrífuga
Cápsulas compuestas por hierro aminoquelado, ácido fólico y cianocobalamina		Erlenmeyer de 250 mL	Gradillas

Anexo F. Reactivos químicos, materiales y equipo utilizados para la cuantificación de cianocobalamina en cápsulas

Cuadro 17. Materiales y reactivos necesarios para la cuantificación de cianocobalamina

Reactivos/Soluciones	Cepa bacteriana /Medios de cultivo	Cristalería	Equipo
Estándar de referencia de cianocobalamina certificado por la USP	Pellet de Liofilizado de <i>Lactobacillus leichmannii</i> ATCC 7830 (MicroBiologics)	56 Tubos Pyrex	Autoclave (Varioklav)
Solución Salina		5 Tubos de rosca (Pyrex)	Filtros Whatman No. 1(filtrar)
Etanol al 25% (Merck)	Caldo base para el ensayo de vitamina B ₁₂ (Merck)	2 Pipetas de 1, 5 y 10 mL (Pyrex)	Gradillas
Tween 80	Caldo para microinoculación (Microinoculum Broth) (Difco)	5 Beakers de 10, 50 y 100 mL (Kimax)	Baño de María (VWR Scientist Inc)
Cápsulas compuestas de hierro aminoquelado, ácido fólico y cianocobalamina		3 Balón volumétrico de 100 mL (Kimax)	2 Asas de nicromo
		Mortero y pistilo (Coors)	Espectrofotómetro UV-VIS (Beckman)
		Balones volumétricos de distintos volúmenes	Refrigeradora
			Incubadora (Precision)
			Balanza (Mettler-Toledo, modelo PB303-5)
			Calculadora (Casio)
			Computadora (Dell)