

# IMPLEMENTACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA MICROBIOLÓGICA PARA LA DETERMINACIÓN DE MIO-INOSITOL EN UN PRODUCTO MULTIVITAMÍNICO UTILIZANDO *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 16491

IMPLANTATION AND STANDARIZATION OF THE MICROBIOLOGICAL TECHNIQUE FOR THE DETERMINATION OF MIO-INOSITOL IN MULTIVITAMINIC PREPARATIONS USED *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 16491

Yenny C. Beltrán<sup>1</sup>, Liceth A. Cabrejo<sup>2</sup>, Juan Carlos Esparragoza<sup>3</sup>, Janeth Arias<sup>4</sup>

## Resumen

Se implementó un método microbiológico desarrollado en Merck Alemania (Rieth, 1999) para la determinación de mio-inositol en productos farmacéuticos. Basados en la utilización de un microorganismo auxotrófico para inositol, en este estudio se empleó *Schizosaccharomyces pombe* debido a que su crecimiento es directamente proporcional al logaritmo natural (ln) de las concentraciones de esta vitamina en el medio, lo que demuestra su idoneidad para determinar mio-inositol en productos farmacéuticos. Se probó la selectividad de la levadura exponiéndola a las demás vitaminas que hacen parte del producto y se obtuvieron resultados de interferencia menores al 5%. Se utilizó la prueba estadística t de student para determinar la linealidad de la curva patrón y se encontró que para un nivel de confianza del 95% no se cumple con el parámetro del intercepto, lo cual indica que cada ensayo con producto debe realizarse simultáneamente con la curva patrón. La técnica fue retada con tres lotes diferentes de producto, que mostraron un porcentaje de recuperación alto y un coeficiente de variación entre las medidas menores al 3%, lo que permite concluir que la técnica es apta para la determinación de mio-inositol.

*Palabras clave:* mio-inositol, técnica microbiológica, inositol, ciclitol, determinación de vitaminas, *Schizosaccharomyces pombe*.

## Abstract

Quality control in each one of the pharmaceutical industry's products is of vital importance. To reach this quality there are tools such as good manufacturing practices, which include a control in each of the production stages and the finished product itself. This control is based on analytical methods that value active principle quantity declared in the jars; therefore, an analytical technique was standardized and implemented for determining mio-inositol in multivitamins employing *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 16491. This microorganism was employed due to its auxotrophy for this vitamin, meaning its growth is directly proportional to the natural logarithm of the mio-inositol concentration. The statistic test was used to determine the linearity of the pattern curve, finding that for a level of confidence of 95% it doesn't perform with the parameter of the intercept, although it present variability in the point employed to adjust the base line of the spectrophotometer due to the microorganisms always grow different it sometimes presents a high growth, because it depends on environmental conditions. Consequently it can't get just a pattern curve so it's necessary that each essay makes his own pattern curve. It was determinate the selectivity of *S. pombe* expousing it to different components of the product (vitamins group B). Due to the vitamins are considered factor of growth for the microorganism in general. As a result it was obtained interference lower than 5%. It was concluded that *S. pombe* just will give answer due to the presence of mio-inositol and not for the presence of the other components of the product. The technique was

Recibido: septiembre de 2001; aprobado para publicación: noviembre de 2001.

<sup>1</sup> Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. E-mail: yennycbeltranm@hotmail.com.

<sup>2</sup> Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. E-mail: liz\_alejandra26@hotmail.com.

<sup>3</sup> Gerente de Aseguramiento de Calidad, Merck Colombia S.A.

<sup>4</sup> Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. E-mail: jdcarias@javeriana.edu.co.

tested with three different batch of the product which showed percentage of high recovery, presenting coefficient of variation lower than 3%, indicating that with this technic we can obtain reliable data to determine mio-inositol in product.

**Key words:** mio-inositol, microbiological technique, inositol, cyclitol, determination of vitamins, *Schizosaccharomyces pombe*.

## INTRODUCCIÓN

Existen sustancias que actúan en el organismo como vitaminas pero que no cumplen criterios estructurales para ser denominados como ellas. Una de estas sustancias es el mio-inositol, que es un azúcar de tipo ciclitol (Tolonen, 1990). Los ciclitoles son tres: mio-inositol, 1L-mio-inositol-1-fosfato (formado desde glucosa-6-fosfato en la biosíntesis de mio-inositol) y 1D-mio-inositol-1-fosfato (constituyente de fosfolípidos e inositol polifosfatos); de los ciclitoles, el mio-inositol es la forma biológicamente activa (figura 1), ya que se ha considerado como un factor nutricional para ciertos microorganismos, especialmente para *Schizosaccharomyces pombe*, por estimular su crecimiento (Yarborough y Clark, 1956).

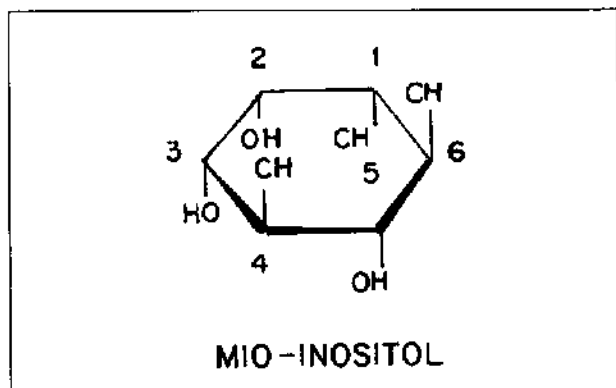


Figura 1. Fórmula estructural del mio-inositol

El mio-inositol se requiere a nivel metabólico para la biosíntesis de fosfolípidos de membrana (Niederberger *et al.*, 1998). Cantidades relativas de fosfatidilinositol (PI), principal fosfolípido aniónico, y fosfatidil serina (PS), varían en respuesta a la concentración exógena de mio-inositol. Así, cuando la concentración de este ciclitol es baja, el contenido de PI decrece mientras que el contenido de PS se incrementa. El precursor para la síntesis de PI y PS es CDP-diacilglicerol, que es un liponucleótido intermediario importante en la síntesis de fosfolípidos en levaduras (Gaynor y Greenberg, 1992).

Debido a la auxotrofia que presenta *S. pombe* frente al mio-inositol, este microorganismo ha sido utilizado en metodologías microbiológicas en las cuales se evalúa la respuesta en crecimiento de la levadura frente a las diferentes concentraciones de la vitamina a las que ha sido expuesta (Wright y Skeggs, 1944).

## MATERIALES Y MÉTODOS

El mio-inositol utilizado como estándar, así como los medios de conservación y de prueba, son de marca Merck. La cepa de *S. pombe* ATCC 16491 fue obtenida de Merck KGaA Darmstadt.

**Conservación del microorganismo.** Las células de *S. pombe* fueron mantenidas en un medio que contenía extracto de malta, extracto de levadura y agar agar. Se esterilizó durante quince minutos a 121 °C y se incubaron durante dieciséis horas a 32 °C. Se realizaron transferencias cada dos semanas y se conservaron en refrigeración a +4 °C.

**Preparación del inóculo.** A partir de uno de los tubos de conservación se tomó una asada y se realizó una resiembra en agar extracto de malta, el cual se esterilizó quince minutos a 121 °C, se solidificó en posición inclinada y se incubó dieciséis horas a 32 °C. Posteriormente, las células fueron lavadas con cloruro de sodio al 0.9% y centrifugadas a 3.000 rpm durante seis minutos tres veces. Las células fueron ajustadas al 10% de transmitancia medida a 660 nm de longitud de onda y mediante recuento en cámara de Neubauer se determinó la concentración en células/ml. La pureza del inóculo se determinó mediante observación microscópica y aislamientos en agar extracto de malta.

Células/ $\mu$ l = células contadas/superficie \* profundidad \* dilución

Superficie (5 cuadros) = 0.2 mm<sup>2</sup>

Profundidad = 0.1 mm

**Preparación de soluciones estándar de mio-inositol.** Se pesaron 25.25 mg de mio-inositol de pureza 99.0% y se llevaron a 100 ml de agua destilada estéril para obtener una solución de concentración 250 µg de mio-inositol/ml. Mediante diluciones se prepararon soluciones de concentraciones 4, 6, 8, 10 y 12 µg/ml de mio-inositol.

**Medio de prueba.** Se preparó según la técnica de Merck KGaA Darmstadt (Rieth, 1999) por mezcla de seis soluciones nutritivas que contienen sulfatos, fosfatos, vitaminas (piridoxina y tiamina), cofactores (nicotinamida y biotina), extracto de levadura como fuente de nitrógeno, elementos traza, cloruro de calcio y glucosa como fuente de carbono. Se dispensó en tubos tapa rosca, cada uno con 19 ml.

**Curva de crecimiento.** El microorganismo fue cultivado en el medio de prueba y expuesto a concentraciones de mio-inositol de 4, 6, 8, 10 y 12 µg/20 ml. Se mantuvo en incubación a 32 °C durante 96 horas y se determinó el crecimiento cada tres horas por medición espectrofotométrica de la absorbancia a 535 nm de longitud de onda. Se determinaron los parámetros cinéticos.

**Determinación del modelo de crecimiento.** Se realizaron siete réplicas para la estandarización de la curva patrón, siempre bajo las siguientes condiciones:

- Tiempo de incubación en agar extracto de malta: dieciséis horas
- Ajuste del inóculo a 10%T +/- 1%, que equivale a una absorbancia de 0.100
- Medio de prueba Merck KGaA Alemania
- Concentración de las soluciones de calibración de mio-inositol
- Tiempo de incubación del medio de prueba: 48 horas

• Blancos 1 y 2

• Adición de 3 ml de etanol al 95% hasta eliminación de CO<sub>2</sub>

• Lectura de absorbancia a  $\lambda_{535 \text{ nm}}$

Al medio de prueba se le adicionó 1 ml de las diferentes soluciones estándar de mio-inositol y se realizó por triplicado. A estos triplicados se les adicionó 0.1 ml del inóculo de *S. pombe* ajustado a 10%T. Se emplearon dos blancos:

*Blanco 1:* 19 ml de medio de prueba, 1 ml de agua estéril, más 0.1ml de inóculo.

*Blanco 2:* 19 ml de medio de prueba, 1 ml de agua estéril, sin inóculo. La incubación se llevó a cabo durante 48 horas a 32 °C.

Después de la incubación se adicionaron 3 ml de alcohol etílico al 95% y se dejó en reposo hasta que se eliminó el gas CO<sub>2</sub> producido. Después de la agitación se midió la absorbancia a  $\lambda_{535 \text{ nm}}$  a todos los tubos para cada una de las concentraciones de mio-inositol. Se ajustó la línea base del espectrofotómetro con el blanco 2, y el blanco 1 se utilizó como referencia para conocer el crecimiento del microorganismo sin mio-inositol.

La turbidez se obtuvo promediando los valores de absorbancia (turbidez) de cada una de las concentraciones y se elaboró una curva patrón a partir de la cual se realizó un análisis de regresión por el método de mínimos cuadrados utilizando los valores de turbidez en las ordenadas lineales y el ln de las concentraciones en abscisas lineales.

Se determinó el coeficiente de correlación, el valor de la pendiente y el valor del punto de intersección de la recta con el eje Y y se les realizó el test estadístico para comprobar la linealidad de la curva de acuerdo a las hipótesis planteadas bajo un nivel de confianza del 95%.

**Ensayos de selectividad.** Debido a que el microorganismo requiere para su crecimiento otros componentes del producto como riboflavina, piridoxina,

tiamina y nicotinamida, se enfrentó a éstos para determinar una posible interferencia en la evaluación del contenido de mio-inositol por el crecimiento de *S. pombe*. Cada compuesto fue extraído de la misma manera que se extrajo el mio-inositol del producto —como se describe más adelante— y se llevó a las concentraciones correspondientes a la dilución trabajada con producto para mio-inositol, que es de 8 µg/20 ml (punto central de la curva patrón).

% de interferencia = [(absorbancia de la muestra)/ (absorbancia del estándar de concentración 8 µg)] x 100

**Ensayos realizados con producto.** Se pesaron cinco grageas cuyo contenido de mio-inositol es de 20 mg/gragea y se disolvieron en 100 ml de agua desmineralizada estéril para obtener una solución de concentración 1 mg de mio-inositol/ml. Se llevó a calentamiento en baño maría a 50 °C durante treinta minutos y posteriormente se llevó a ultrasonido por dos minutos. A partir del sobrenadante de esta solución se realizaron diluciones en serie hasta obtener una solución de concentración supuesta de 8 µg de mio-inositol/ml. De esta solución se tomó 1 ml y se adicionó a 19 ml del medio de ensayo previamente esterilizado. Se inocularon con la suspensión microbiana ajustada y se llevaron a incubación por 48 horas a 32 °C. El ensayo se hizo por triplicado, se tomaron los valores de turbidez y se promediaron. Mediante la ecuación de la recta obtenida de la curva patrón se obtuvieron las concentraciones reales de mio-inositol en el producto, despejando X:

$$Y = bX + a$$

Donde Y = absorbancia, X = ln de la concentración de inositol, b es la pendiente de la recta y a el inter-

cepto con el eje Y. El valor hallado de X corresponde al ln de la concentración real de inositol en la dilución ensayada. Se efectúa la conversión al valor de concentración aplicando  $e^x$ .

Con el valor hallado de X se obtiene el contenido de mio-inositol por gragea. El valor obtenido es dividido por el valor del contenido supuesto de mio-inositol en el producto para obtener el porcentaje de recuperación.

% de recuperación = [(contenido de mio-inositol/gragea//contenido declarado/gragea)] x 100

## RESULTADOS

**El inóculo utilizado para todas las pruebas fue ajustado por medición de turbidez.** Sin embargo se comprobó, mediante recuento en cámara, que la suspensión ajustada al 10% de transmitancia contiene un número de células del orden de  $10^6$ , ya que las lecturas realizadas dieron 1.6, 1.4 y  $1.4 \times 10^6$  células por ml de suspensión.

**Curva de crecimiento.** Al comparar el comportamiento de *S. pombe* cuando crece a diferentes concentraciones de mio-inositol (tabla 1), se observa que en ausencia de esta vitamina no alcanza un desarrollo óptimo, pues a la hora 9 se detiene el crecimiento (figura 2), posiblemente debido a la falta de inositol, mientras que en las demás curvas la fase exponencial continúa hasta la hora 39, donde se estabiliza. El máximo crecimiento microbiano observado para cada curva demuestra que a medida que aumenta la concentración de inositol hay un aumento proporcional de la población microbiana. Esto se demuestra en el incremento de la velocidad de crecimiento y en la disminución del tiempo de duplicación.

**Tabla 1.** Parámetros de crecimiento de *S. pombe* a diferentes concentraciones de mio-inositol

|                                    | Concentración de mio-inositol (µg/20 ml) |        |        |        |        |        |
|------------------------------------|--|--------|--------|--------|--------|--------|
|                                    | Ausencia                                 | 4      | 6      | 8      | 10     | 12     |
| Velocidad de crecimiento (horas-1) | 0.0016                                   | 0.0167 | 0.0244 | 0.0302 | 0.0315 | 0.0343 |
| Intercepto                         | 0.059                                    | 0.034  | 0.105  | 0.085  | 0.010  | -0.005 |
| Coefficiente de correlación        | 0.683                                    | 0.971  | 0.941  | 0.958  | 0.967  | 0.965  |
| Tiempo de duplicación (minutos)    | 436.243                                  | 41.468 | 28.464 | 22.915 | 21.996 | 20.220 |

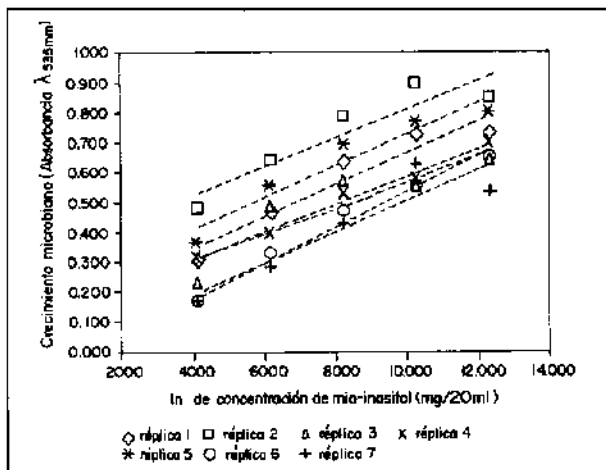


Figura 2. Curvas de crecimiento de *S. pombe* a diferentes concentraciones de mio-inositol

**Determinación del modelo de crecimiento.** Todas las réplicas mostraron una tendencia similar (figura 3). Se demostró que en el rango evaluado la metodología presenta un modelo exponencial. Por tanto, se buscó una transformación matemática de una de las variables (concentración) para obtener un modelo lineal, de la cual se obtuvieron los parámetros de la

recta tales como pendiente, intercepto y coeficiente de correlación, a los cuales se les realiza el test estadístico para confirmar su linealidad.

Los resultados obtenidos mediante el análisis estadístico de las réplicas realizadas para curva patrón son los siguientes (tabla 2):

**Pruebas de selectividad.** Los resultados obtenidos en las pruebas de selectividad se encuentran en la

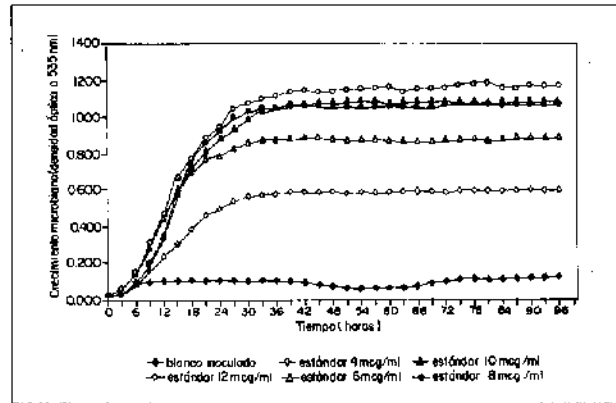


Figura 3. Gráfico comparativo de las réplicas de la curva patrón

Tabla 2. Prueba estadística de linealidad

| Parámetros evaluados       | t calculado | t tabulado | Ho     | Conclusión |  |
|----------------------------|-------------|------------|--------|------------|--|
| Intercepto                 | R 1         | -3.010     | 2,3534 | Aceptada   | Se concluye que el valor del intercepto es significativamente diferente de cero  |
|                            | R 2         | -0.713     |        | Rechazada  |  |
|                            | R 3         | -1.165     |        | Rechazada  |  |
|                            | R 4         | -4.872     |        | Aceptada   |  |
|                            | R 5         | -2.030     |        | Rechazada  |  |
|                            | R 6         | -18.688    |        | Aceptada   |  |
|                            | R 7         | -2.358     |        | Aceptada   |  |
| Pendiente                  | R 1         | 9.647      | 2,3534 | Aceptada   | Se concluye que el hecho de que la pendiente sea positiva, indica que la relación entre X y Y es una relación lineal directa |
|                            | R 2         | 10.418     |        | Aceptada   |  |
|                            | R 3         | 5.668      |        | Aceptada   |  |
|                            | R 4         | 20.199     |        | Aceptada   |  |
|                            | R 5         | 7.315      |        | Aceptada   |  |
|                            | R 6         | 37.460     |        | Aceptada   |  |
|                            | R 7         | 4.973      |        | Aceptada   |  |
| Coeficiente de correlación | R 1         | 9.680      | 2,3534 | Aceptada   | Se concluye que existe asociación entre las variables X y Y  |
|                            | R 2         | 10.393     |        | Aceptada   |  |
|                            | R 3         | 5.679      |        | Aceptada   |  |
|                            | R 4         | 20.619     |        | Aceptada   |  |
|                            | R 5         | 7.320      |        | Aceptada   |  |
|                            | R 6         | 38.691     |        | Aceptada   |  |
|                            | R 7         | 4.975      |        | Aceptada   |  |

tabla 3. Los principios activos no presentaron mayor interferencia excepto tiamina. Basados en el criterio de aceptación formulado en el protocolo de validación de técnicas analíticas de MCSA, para ensayos microbiológicos no se incluye como interferencia una respuesta menor al 5% de la respuesta obtenida del analito de interés. Se observa, además, que al realizar el ensayo con una mezcla de los exci-

pientes y principios activos del producto, la absorbancia no supera el 2.61% de la absorbancia del estándar, lo que indica que en presencia de los componentes del producto se disminuye la interferencia causada por tiamina y riboflavina. Por tanto, no se observa una verdadera interferencia por parte de los principios activos y excipientes.

**Tabla 3.** Datos de porcentaje de interferencia de excipiente y principios activos

| Componentes evaluados               | Promedio de crecimiento microbiano absorbancia $\lambda_{535\text{ nm}}$ | Coefficiente de variación | % de interferencia |
|-------------------------------------|--|---------------------------|--------------------|
| Std Inositol                        | 0.650  | 2.404                     | 100                |
| 2 Piridoxina                        | 0.017  | 8.813                     | 2.61               |
| 2. Tiamina                          | 0.039  | 2.936                     | 6.00               |
| 3. Rivo flavina                     | 0.033  | 6.061                     | 5.00               |
| 4. Biotina                          | 0.007  | 14.286                    | 1.07               |
| 5 Cianocobalamina                   | 0.017  | 8.813                     | 2.61               |
| 6 Nicotinamida                      | 0.032  | 4.824                     | 4.92               |
| 7 alfa-tocoferol                    | 0.008  | 18.330                    | 1.23               |
| 8 Placebo cubierta                  | 0.012  | 16.878                    | 2.46               |
| 9 Placebo núcleo                    | 0.017  | 11.765                    | 2.60               |
| 10 Excipientes + principios activos | 0.017  | 22.716                    | 2.61               |

Esto indica que las concentraciones de principios activos y excipientes presentes en la dilución del producto no influyen marcadamente en el crecimiento de *S. pombe*, aunque tiamina y piridoxina sean factores que estimulan el crecimiento de esta levadura (McVeigh y Bracken, 1944). *S. pombe* no depende de riboflavina; sin embargo, los resultados demuestran que la dilución utilizada no es suficien-

te para mantener una concentración que incremente su crecimiento.

**Determinación de mio-inositol en producto.** La técnica microbiológica fue retada enfrentándola a tres lotes diferentes de un producto multivitamínico que contiene, entre otras vitaminas, mio-inositol. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

#### Lote 1

|                                      | X calculado (ln de la concentración real) | e <sup>9</sup> mg/ml | % recuperado | Contenido de mio-inositol mg/gragea | Contenido de mio-inositol mg/5 grageas |
|--------------------------------------|---|----------------------|--------------|-------------------------------------|--|
| Muestra 1                            | 2.1809                                    | 8.8543               | 110.68       | 22.14                               | 110.70                                 |
| Muestra 2                            | 2.1956                                    | 8.9854               | 112.32       | 22.46                               | 112.30                                 |
| Promedio global                      |   | 8.9199               | 111.50       | 22.30                               | 111.50                                 |
| Coefficiente de variación global (%) |   | 1.039                | 1.040        | 1.015                               | 1.015                                  |

## Lote 2

|                                      | X calculado (ln de la concentración real) | e <sup>s</sup> mg/ml | % recuperado | Contenido de mio-inositol mg/gragea | Contenido de mio-inositol mg/5 grageas |
|--------------------------------------|---|----------------------|--------------|-------------------------------------|--|
| Muestra 1                            | 2.1238                                    | 8.3629               | 104.53       | 20.91                               | 104.55                                 |
| Muestra 2                            | 2.1028                                    | 8.1891               | 102.36       | 20.47                               | 102.35                                 |
| Promedio global                      |   | 8.2760               | 103.44       | 20.69                               | 103.45                                 |
| Coefficiente de variación global (%) |   | 1.485                | 1.483        | 1.504                               | 1.504                                  |

## Lote 3

|                                     | X calculado (ln de la concentración real) | e <sup>s</sup> mg/ml | % recuperado | Contenido de mio-inositol mg/gragea | Contenido de mio-inositol mg/5 grageas |
|-------------------------------------|---|----------------------|--------------|-------------------------------------|--|
| Muestra 1                           | 2.1654                                    | 8.7180               | 108.90       | 21.80                               | 109.00                                 |
| Muestra 2                           | 2.1154                                    | 8.2925               | 102.40       | 22.31                               | 111.55                                 |
| Muestra 3                           | 2.1425                                    | 8.5207               | 105.20       | 21.30                               | 106.50                                 |
| Promedio global                     |   | 8.5104               | 105.50       | 21.80                               | 109.02                                 |
| coeficiente de variación global (%) |   | 2.502                | 3.090        | 2.316                               | 2.316                                  |

Comparando los resultados obtenidos con las especificaciones (18.0-22.0 mg de mio-inositol/gragea) se observa que los resultados de dos de los lotes se encuentran dentro de especificaciones y que el coeficiente de variación entre las réplicas de cada lote no supera el 3%, lo cual indica que no existe variabilidad significativa para la determinación de mio-inositol en el producto (figura 4).

## DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El crecimiento de *S. pombe* confirmó que esta levadura es auxotrófica para mio-inositol según lo descrito por Niederberger *et al.* en 1998, cuando afirmó

que la cantidad exógena de esta sustancia estimula el apareamiento y la esporulación de *S. pombe*. McVeigh y Bracken (1944) afirma que el crecimiento óptimo de la levadura *S. pombe* se observa cuando ésta se encuentra en presencia de 8 µg de inositol. En este estudio se observó un crecimiento óptimo cuando la levadura se expone a 12 µg de mio-inositol (figura 2). También se encontró que la cinética de crecimiento de la levadura no presenta una fase de adaptación muy marcada y su crecimiento exponencial comienza aproximadamente a las tres horas de iniciarse la incubación y termina entre las 39 y las 42 horas.

Las condiciones de conservación de la levadura descritas en la metodología y establecidas en las técnicas alemanas, son óptimas tanto para su crecimiento como para su adaptación antes de la transferencia al medio de prueba. El tiempo empleado para obtener el inóculo del microorganismo fue dieciséis horas. De acuerdo con los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento, este tiempo es óptimo, pues a las quince horas se encuentra en plena fase exponencial (figura 2). Esto asegura que el 100% de las células resuspendidas para inocular el medio de prueba son viables. El comportamiento demostrado por *S. pombe* en las curvas de crecimiento permite acortar el tiempo de incubación de la prueba de 48 a 39 horas, ya que a las 48 horas (Rieth, 1999) se encuentra en fase estacionaria, lo que significa que las

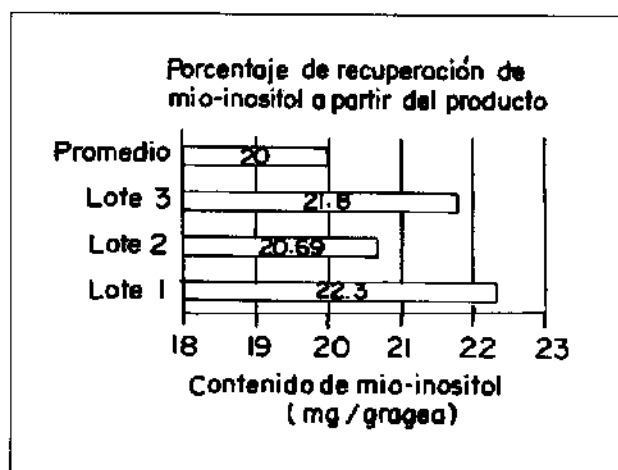


Figura 4. Resultados con producto

células no son 100% viables, causando un factor de error en la lectura; además, las mediciones de turbidez deben realizarse en la fase post-exponencial o pre-estacionaria (Freed, 1966), en donde se ha terminado el sustrato limitante del crecimiento y no cuando la precipitación de células muertas puede generar interferencia.

Debido a su metabolismo fermentativo, nuestra levadura produjo una gran cantidad de espuma como consecuencia de la formación de  $\text{CO}_2$ . Este factor interviene en la medición exacta de la turbidez. Para eliminar esta interferencia se adicionó etanol al 95% con base en lo reportado en McVeigh y Bracken (1944), en donde se emplea etanol como antiespumante y antifloculante. Este último fenómeno está asociado a propiedades electrocinéticas de la pared en presencia de iones bivalentes y polivalentes (McVeigh y Bracken, 1944); en nuestro caso,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  fueron adicionados en forma de sulfatos al medio de prueba incrementando la tendencia de la levadura a flocular. También se sugiere la existencia de una envoltura gelatinosa y mucoide que se adhiere fuertemente a las células de la levadura y que incrementa la aglutinación de éstas, dificultando una suspensión homogénea de células individuales. La adición de etanol concentrado tiende a disolver esta envoltura (McVeigh y Bracken, 1944). La tendencia a flocular disminuye notablemente cuando las células son lavadas y suspendidas en presencia de iones  $\text{Na}^+$  contenidos en la solución salina (McVeigh y Bracken, 1944); por esta razón, el inóculo es ajustado en esta solución. Empleando el etanol mejoraron los datos obtenidos, ya que los coeficientes de variación entre las tres lecturas de cada concentración disminuyeron de 56 a menos de 8%.

El producto en el cual se aplicó la prueba para determinación de contenido de mio-inositol contiene, además de éste, otras vitaminas del grupo B que según Waller y Lichstein (1965) son utilizadas como factores de crecimiento por una variedad de microorganismos, entre los cuales se incluyen *S. cerevisiae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* y la mayoría de especies del género *Lactobacillus*. Los resultados obtenidos demostraron que cuando este microorganismo se encuentra en presencia de

los diferentes principios activos del producto no muestra un crecimiento óptimo al ser comparado con el crecimiento frente al inositol (tabla 3), ya que el máximo obtenido fue del 6% frente al estándar. En el caso de tiamina, y para los demás principios activos, fue mucho menor de 5%. La suma de las pequeñas interferencias de cada componente del producto no representa el valor real de la interferencia encontrada cuando el microorganismo se enfrentó al placebo completo que contenía todos los principios activos excepto inositol, ya que sólo se obtuvo 2.6% del crecimiento obtenido frente al estándar.

De acuerdo con los resultados obtenidos al realizar la prueba estadística se demostró que la técnica es lineal. Sin embargo, debido a la susceptibilidad de la técnica a las variables del cultivo, a la pobre precisión y a la inhibición o estimulación de crecimiento por condiciones externas (Gregory, 1983), es necesario obtener una curva patrón cada vez que se realiza un ensayo manteniendo siempre las mismas condiciones.

Los ensayos realizados con producto demuestran que el modelo matemático empleado es el adecuado para determinar la ecuación que cuantifica el contenido real de mio-inositol presente en la muestra, tal como se observó en la tabla de resultados.

## CONCLUSIONES

*Schizosaccharomyces pombe* es el microorganismo idóneo para determinar mio-inositol en productos farmacéuticos, debido a su comprobada auxotrofia por esta vitamina y a la selectividad demostrada frente a otras vitaminas presentes en el producto, ya que esta levadura tiene la capacidad de discriminar el mio-inositol de otros compuestos.

Las condiciones de desarrollo de la técnica se mantuvieron en todos los ensayos de manera que se estandarizaron pH, temperatura y tiempos de incubación, concentración de células, longitud de onda para lecturas de turbidez, adición de alcohol antes de la lectura, preparación de medios de conservación, pre-inoculación y prueba; por tanto, puede iniciarse el proceso de validación.



Los ensayos realizados demostraron que en el rango de concentraciones de 4 a 12  $\mu\text{g}/20\text{ ml}$ , la curva patrón es lineal. Por consiguiente, la concentración de la dilución de producto se puede manejar en el punto medio que corresponde a 8  $\mu\text{g}/20\text{ ml}$ .

El método de extracción de mio-inositol es el óptimo, pues no se presenta interferencia por parte de los otros componentes que hacen parte del producto, aunque éstos son hidrosolubles.

## REFERENCIAS

- Freed M.** 1966. *Methods of vitamin assay*. 3ª ed. Interscience Publishers, John Wiley & Sons. pp. 21-27, 37-62, 245-255, 409-413.
- Gaynor P, Greenberg M.** 1992. Regulation of cdp-diacylglycerol synthesis and utilization by inositol and choline in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* 174(17):5.711-5.718.
- Gregory JF.** 1983. Methods of vitamin assay for nutritional evaluation of food processing. *Food Technol* 75-83.
- Hochstenbach F, Sciaky N.** 1997. The first international fission yeast meeting. En: [www.Ed.Ac.Uk/ebmv26/pombemeeting.html](http://www.Ed.Ac.Uk/ebmv26/pombemeeting.html). Edinburgh, Scotland.
- Hoffmann-La Roche.** 1972. *Compendio de vitaminas*. Ciba Pharmaceutical Corp., Basilea, Suiza. pp. 132-138.
- McVeigh I, Bracken E.** 1944. The nutrition of *Schizosaccharomyces pombe*. *Micology* 47:13-25.
- Niederberger C, Graub R, Schweingruber A, Poitelea M.** 1998. Exogenous inositol and genes responsible for inositol transport are required for mating and sporulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current Genetics* 33(4):255-261.
- Queen M, Westfield M.** 1999. Union international of biochemistry: numbering of atoms in myo-inositol, pp. 1-4. En: [www.Chem.amw.ac.uk/iupac/cyclitol/myo.html](http://www.Chem.amw.ac.uk/iupac/cyclitol/myo.html).
- Rieth M.** 1999. *Determination of inositol*. Merck KGaA Darmstadt.
- Tolonen M.** 1990. *Vitamins and minerals in health nutrition*. Ellis Horwood, Inglaterra. pp. 140-141.
- Waller J, Lichstein H.** 1965. Biotin transport and accumulation by cells of *Lactobacillus plantarum*. I General properties of the system. *J Bacteriol* 90(4):845-850.
- Wright L, Skeggs H.** 1944. Determination of biotin with *Lactobacillus arabinosus*. *Proc Soc Exp Biol Med* 56:95-98.
- Yarbrough HF, Clark FM.** 1956. Utilization of inositol, an essential metabolite for *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* 73:318-322.

La absorción del blanco utilizado para ajustar la curva genera un error porque el crecimiento del microorganismo siempre es diferente. Por esta razón se debe hacer la curva de calibración cada vez que se realice una determinación en producto graficando  $\ln$  de la concentración vs. absorbancia.