

Aplicación del reactivo de Neesler en la cuantificación de amonio para las fermentaciones de productos biotecnológicos

Maelys Miyares-Estrada,* Dinorah Torres-Idavoy, Sheila Padrón-Morales, Jorge Valdés-Hernández, Michel Díaz-Martínez, Regla Mildrey Bonilla-Hernández

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave 31 entre 158 y 190, P.O Box 6162, 10600. La Habana, Cuba.

email: maelys.miyares@cigb.edu.cu

Las sales de amonio se utilizan en las fermentaciones para suplementar las cantidades deficitarias de nitrógeno y estabilizar el pH del medio de cultivo. El ion amonio en exceso, ejerce un efecto perjudicial en el proceso fermentativo ya que inhibe el crecimiento microbiano. Con el objetivo de monitorear y controlar la concentración de amonio durante el proceso de fermentación, se desarrolló un método con el reactivo de Neesler, para la cuantificación de dicho analito. El ensayo se estandarizó mediante: selección del equipo de medición; tiempo de reacción del ensayo y comparación de las sales estándares de amonio. El método se caracterizó con la evaluación de los parámetros: especificidad; linealidad y rango del sistema, límite de cuantificación, exactitud y precisión. El método demostró ser específico. Se establecieron dos sistemas con curvas que fueron lineales en los rangos de cloruro de amonio (2 a 20 $\mu\text{g/mL}$) y sulfato de amonio (5 a 30 $\mu\text{g/mL}$). Los límites de cuantificación fueron los puntos inferiores de cada rango de trabajo. El método resultó ser preciso y exacto. Este ensayo se aplicó a muestras de cultivos de levadura y bacterias del género *Saccharomyces* y *Escherichia. coli* respectivamente. Se desarrolló un método novedoso en microplaca para la cuantificación y control analítico del amonio. Mediante este método se controla este componente químico fundamental en las fermentaciones, para optimizar el medio de cultivo. Se logra una adecuada expresión de proteínas recombinantes y la obtención de candidatos vacunales para uso clínico.

Palabras clave: amonio, Neesler, control analítico, fermentación.

Introducción

Las sales de amonio se consideran la forma nitrogenada que mejor se asimila por las levaduras durante el proceso de fermentación. La solución de cloruro de amonio (NH_4Cl) como ácido débil reacciona con concentrados de ácidos para formar cloruro de hidrógeno y con bases fuertes para formar amoniaco.

El sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ está compuesto por el anión sulfato y el catión amonio; éste presenta buena estabilidad química. Estas sales se utilizan en las fermentaciones para suplementar las cantidades deficitarias de nitrógeno y estabilizar el pH del medio de cultivo.

El ion amonio es un compuesto químico que forma parte del ciclo del nitrógeno. Este componente en exceso, ejerce un efecto perjudicial en el proceso fermentativo, ya que inhibe el crecimiento microbiano. Con el objetivo de monitorear la concentración de dicho analito

durante las fermentaciones, en nuestro laboratorio se desarrolló un método analítico para la cuantificación de amonio con el reactivo de Neesler (1-8).

El reactivo de Neesler (4) es un reactivo químico que se utiliza para detectar pequeñas cantidades de amoniaco (azano, H_3N) o catión amonio (H_4N^+). Se utiliza para el análisis, la investigación y la química fina del nitrógeno. Debe su nombre a su descubridor, el químico alemán Julius Neesler. El método consiste en que la sal de NH_4^+ disuelta, reacciona con el reactivo de Neesler alcalino, elevándose el pH del medio, por el cual se obtiene amonio. Esta reacción produce una coloración gradual de amarillo a pardo, a medida que aumenta la concentración de amoniaco.

Este método solo está descrito en la literatura para la determinación de amonio en aguas residuales, por ello se hace necesario estandarizarlo para su aplicación en los procesos de fermentación de productos

* Licenciada en Tecnología de la Salud, Especialista en Control Analítico.

biotecnológicos. De esta forma, se controlaría este componente químico, además de permitir la optimización del medio de cultivo y lograr una mejor expresión de proteínas recombinantes, así como la obtención de candidatos vacunales para uso clínico.

Se evaluaron también muestras de cultivo de levadura y bacteria de género *Saccharomyces* y *Escherichia. coli* respectivamente, provenientes de estrategias de fermentación: cinética en zaranda, fermentación continua y discontinua de proteínas en la etapa de desarrollo.

Materiales y Métodos

Materiales y soluciones empleadas

- Reactivo de Neesler: NaI (BDH) 0,66g; HgI₂ (Merck) 1g y KCl (AppliChem) 0,42g csp 100 mL de NaOH (Merck) 3M.
- Soluciones: Cloruro de amonio NH₄Cl (Merck) y Sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄ (Merck) 1mg/mL.
- Placebo de las muestras de fermentación (medio de cultivo sin analito de interés): sacarosa, solución de aminoácidos, sales mayoritarias, vitaminas, ácido succínico, citrato y levadura.
- Muestra control: Medio de cultivo completo del lote F13778, suministrado por el departamento de desarrollo de fermentación del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba.
- Agua para inyección.

Estandarización del método

El ensayo se estandarizó en microplacas con dos sistemas, se utilizó como estándares las sales de cloruro y sulfato de amonio. Se establecieron las condiciones óptimas en el ensayo analítico para su uso como técnica de rutina en el laboratorio. Para la selección de la longitud de onda se compararon estadísticamente los valores de absorbancia obtenidos en los filtros 405 y 414 nm de espectrofotómetro (GENESYS) y Lector de Placa (MULTISKAN) mediante una prueba F y prueba *t de Student*. La comparación de las sales estándares cloruro y sulfato de amonio se analizó en tres días independientes; en el rango lineal de las curvas de calibración en el mismo ensayo. Se realizó el análisis estadístico de la prueba de *t de Student* para dos

muestras emparejadas para determinar si las curvas eran iguales. El tiempo de reacción del ensayo se evaluó con la reacción en 7, 15 y 30 min a temperatura ambiente (22-25 °C). Se compararon los valores de absorbancia en cada uno de los tiempos estudiados, mediante una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de Fisher con un procedimiento de comparación múltiple de medias, para determinar la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, para un nivel de confianza del 95% (7).

Procedimiento del ensayo

De forma general se realizaron los siguientes pasos, se adicionó en una placa 250 µL de cada punto de la curva de calibración, blanco del ensayo (agua para inyección AD.PU004) o muestras. Las muestras provenientes de cada una de las sales de amonio se cuantificaron con el estándar correspondiente. Luego se añadió 50 µL del reactivo de Neesler en los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la lectura de la reacción en el lector de placa (MULTISKAN).

Establecimiento y validación del método

La validación del método se estudió a partir del análisis de los parámetros establecidos: especificidad, linealidad, rango del sistema, límite de cuantificación, exactitud y precisión (9-14), ya que estos parámetros permiten demostrar que la técnica es adecuada en la cuantificación de amonio en las muestras de fermentaciones bajo las condiciones establecidas en este estudio.

Especificidad

Para evaluar la capacidad del método de detectar el analito sin interferencia de ningún otro compuesto, se realizó la prueba de evaluación de la interferencia del placebo (medio de cultivo sin analito de interés) de las muestras de fermentación.

Se aplicaron tres réplicas de diferentes diluciones del placebo (desde 1:20 hasta 1:1280) y tres réplicas del control negativo (agua) que se tomó como referencia. Se compararon los valores de absorbancia que se obtienen con la respuesta del blanco del ensayo, mediante una prueba F y una prueba de *t de Student*, para determinar si existían diferencias significativas entre ellos, con una probabilidad del 95 % (9-14).

Linealidad y rango del sistema

Se realizaron tres experimentos independientes y se determinaron los siguientes parámetros para evaluar la linealidad del sistema: coeficiente de determinación (R^2) ($\geq 0,98$) y el análisis de varianza (ANOVA) de significación de la pendiente ($p \leq 0,01$) (9-14).

Para establecer el rango de trabajo se analizó la precisión (repetibilidad y precisión intermedia) y la exactitud, de cada uno de los puntos del rango lineal de la curva de regresión. Se determinó la precisión mediante el cálculo del coeficiente de variación (CV) expresado en por cientos. Se consideró como criterio de aceptación para la repetibilidad (intraensayo) un $CV \leq 5\%$, calculado a partir de la concentración media de cada punto de la curva ensayada en el mismo día. Para la precisión intermedia (interensayo), se consideró como criterio de aceptación un $CV \leq 10\%$, calculado a partir de la concentración media global de cada punto de la curva de calibración entre días diferentes.

Para evaluar la exactitud se calculó la recuperación que se expresó en porcentajes (criterio de aceptación $100 \pm 10\%$) de los promedios de la concentración que se obtuvo para cada punto de la curva de calibración en el rango de trabajo seleccionado, con respecto al valor teórico. Se aplicó la prueba *t de Student*, para determinar si el valor medio obtenido y el valor teórico esperado de la concentración de los puntos de la curva, no difieren significativamente para un 95 % de confianza.

Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es la mínima cantidad del analito medible, se demostró la sensibilidad y la especificidad del mínimo punto en tres experimentos independientes durante tres días. Se consideró como criterio de aceptación un $CV \leq 10\%$ y la exactitud con el valor de recuperación entre $100 \pm 10\%$ (9-14).

Exactitud

Se realizó mediante la evaluación de la adición de las sales estándares a la muestra control teniendo en cuenta los resultados del estudio de especificidad (9-14).

Se prepararon muestras (Mm) de cantidades conocidas de NH_4Cl (2,8; 12,9 y 19,0 $\mu\text{g/mL}$) y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (7,4; 17,8 y 28,8 $\mu\text{g/mL}$) que corresponden a los rangos bajo, medio y alto de la curva de calibración. A los valores de absorbancia obtenidos se le restó el valor de la muestra

control. Se obtuvieron los valores de concentración (valores experimentales), los cuales se compararon con los valores esperados. Se analizaron los porcentajes de recuperación de cada preparación ($\% \text{Recup } 100 \pm 10$). Se realizó la prueba *t de Student* para determinar si existían diferencias significativas entre el valor medio obtenido y el valor teórico esperado, para un 95% de confianza. Se analizó el CV medio obtenido para cada caso ($CV \leq 5\%$) de todas las recuperaciones obtenidas.

Precisión

Se prepararon muestras que fueron mezclas (Mm) de cantidades conocidas de NH_4Cl (2,8; 12,9 y 19,0 $\mu\text{g/mL}$) y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (7,4; 17,8 y 28,8 $\mu\text{g/mL}$) correspondiendo a los rangos bajo, medio y alto de la curva de calibración.

La repetibilidad (precisión intraensayo) se estudió mediante el análisis de CV en las seis réplicas independientes en el mismo día. Se consideró como criterio de aceptación un ($CV \leq 5\%$).

Se analizó la variabilidad del valor de concentración al diluir las muestras en todos los rangos ($CV \text{ global } \leq 5\%$). La precisión intermedia (precisión interensayo) se evaluó realizando el ensayo bajo las mismas condiciones de operación en tres días distintos. Se consideró como criterio de aceptación un ($CV \leq 10\%$) (9-14).

Resultados y Discusión

Para poder contar con una buena herramienta de evaluación, lo cual es un requisito imprescindible para el análisis de un producto biotecnológico, es necesario la estandarización del sistema.

En este paso se precisa determinar condiciones como: tipo de ensayo, reactivos de detección, tampones, preparación del estándar y condiciones de reacción (7).

El presente trabajo comenzó con la estandarización del método de cuantificación con la sal cloruro de amonio. A partir de este resultado se varió el método con la sal sulfato de amonio ya que ésta se utiliza con más frecuencia en los procesos actuales de fermentación.

En la selección de la longitud de onda del ensayo se observó que el método fue más sensible en el lector de placa a 414 nm; ya que a una misma concentración de amonio se obtuvieron valores de absorbancia superiores (Fig. 1).

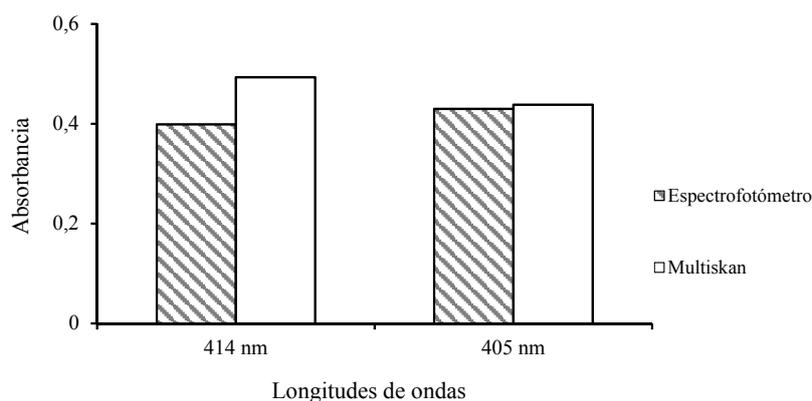


Fig. 1. Resultados de la comparación entre el espectrofotómetro y el lector de placa (Multiskan) en el método de cuantificación de amonio con el reactivo de Neesler.

Los resultados de las pruebas estadísticas indicaron que existen diferencias significativas entre las varianzas de las respuestas del ensayo a 414nm en ambos equipos ($F_{\text{experimental}}=0,33 > F_{\text{crítica}}=0,05$ y $t_{\text{experimental}}=26,50 > t_{\text{crítica}}=3,18$) (Tabla 1).

Sin embargo, en 405nm no difieren significativamente ($F_{\text{experimental}}=11 < F_{\text{crítica}}=19$ y $t_{\text{experimental}}=0,80 < t_{\text{crítica}}=4,30$) y ésta longitud de onda está próxima al pico de absorción 400 nm, que se originó por la coloración amarilla como indicador de bajas concentraciones de amonio (Tabla 2) (1, 2).

Se estableció el ensayo en microplacas con la lectura de la reacción a 405 nm, además se logró un ensayo económico, viable y capaz de cuantificar gran número de muestras.

Con la comparación de las sales estándares se observó que las curvas no son iguales ya que para una misma concentración de sal de amonio se obtuvieron diferentes valores de absorbancia. La curva con cloruro de amonio resultó ser más sensible. Los resultados estadísticos demostraron que existen diferencias significativas entre las sales, por la diversa respuesta en el método ($t_{\text{experimental}}=9,99$ y $5,21 > t_{\text{crítica}}=4,30$).

Se establecieron dos sistemas con curvas amonio, cada una presenta su rango lineal y se utiliza según la composición de la muestra a cuantificar (Fig. 2).

En el estudio del tiempo de reacción del ensayo se observó mayor señal a los 30 min (Fig. 3).

El análisis estadístico demostró que existen diferencias significativas entre los tiempos evaluados, ya que el valor P de la razón F fue menor que 0,05. Se estableció como tiempo de reacción 30 min para el ensayo.

Por tratarse de un método cuantitativo (11, 13) destinado a cuantificar el amonio (1-6, 8) en muestras de fermentaciones (15-16), se aseguró que los parámetros críticos cumplieran con los requerimientos establecidos y se mantuvieran dentro de los límites de las variaciones propias del ensayo. Se demostraron los criterios establecidos para los parámetros que se estudiaron (9-14).

Se estudió la especificidad del método mediante el análisis de la interferencia del placebo de las muestras de fermentaciones.

Se observó que el placebo presentó interferencia debido a la mezcla de aminoácidos; los cuales en su estructura presentan el grupo amino, que reaccionan con el reactivo. Se obtuvo valores de absorbancia superiores al valor de la referencia, pero estos disminuyeron al diluirlo en 1:320 (Fig. 4).

Los resultados estadísticos indicaron que no existen diferencias significativas entre las varianzas de las respuestas del placebo y la referencia con valores de ($F_{\text{experimental}}=9 \leq F_{\text{crítica}}=161$ y $t_{\text{experimental}}=0,63 \leq t_{\text{crítica}}=4,30$) para un $\alpha=0,05$, cumpliéndose el criterio de aceptación para esta prueba (Tabla 3).

Para determinar la linealidad y rango de los sistemas se realizó el ajuste de los puntos, estos relacionan la

Tabla 1. Resultados de las pruebas estadísticas realizadas a los datos experimentales de la lectura a 414 nm para la comparación entre los equipos Multiskan y espectrofotómetro.

(A)		
Filtro 414 nm	Multiskan	Espectrofotómetro
Media	0,416	0,398
Varianza	3,33333E-07	0,000001
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F	0,33	-
P(F<=f) una cola	0,25	-
Valor crítico para F (una cola)	0,05	-
(B)		
Filtro 405 nm	Multiskan	Espectrofotómetro
Media	0,416	0,398
Varianza	0,00000033	0,00000100
Observaciones	3	3
Diferencia hipotética de las medias	0	-
Grados de libertad	3	-
Estadístico t	26,50	-
P(T<=t) una cola	5,895E-05	-
Valor crítico de t (una cola)	2,353E+00	-
P(T<=t) dos colas	1,179E-04	-
Valor crítico de t (dos colas)	3,18	-

(A) Prueba F para varianzas de dos muestras y (B) Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales.

concentración ($\mu\text{g/mL}$) y la absorbancia mediante una regresión lineal por el método de los mínimos cuadrados, obteniéndose una línea recta.

En ambos casos se cumplió con el criterio de aceptación propuestos para cada prueba: $R^2 = 0,99$; probabilidad asociada al valor de F para la ANOVA de significación de la pendiente ($p \leq 0,01$) indicando que existe una relación estadísticamente significativa entre las dos variables (Tabla 4). La linealidad de los sistemas resultó satisfactoria. Se estableció el rango de trabajo que se evaluó para cada estándar. Todos los puntos de las curvas de calibración cumplieron con el criterio de aceptación. En la precisión intraensayo $CV \leq 5\%$ e interensayo, el mayor CV fue $9 < 10\%$ obtenido en la

curva de cloruro de amonio. Se observó para la exactitud un porcentaje de recuperación entre $100 \pm 10\%$ entre el valor calculado y el esperado. Todos los puntos tuvieron $t_{\text{calculada}} \leq t_{\text{teórica}}$ para un 95 % de confianza con una aceptada precisión y exactitud (Tablas 4 y 5). Se puede afirmar que el modelo lineal que se sugiere para describir los datos experimentales en ambas curvas estándares es el adecuado.

El análisis estadístico del límite de cuantificación se demostró con el parámetro rango de los sistemas, con el cual se analizaron los últimos puntos de los tres ensayos de las curvas de cada estándar. Se consideró el límite de cuantificación igual a $2 \mu\text{g/mL}$ para el cloruro de amonio y $5 \mu\text{g/mL}$ para el sulfato de amonio.

Tabla 2. Resultados de las pruebas estadísticas realizadas a los datos experimentales de la lectura a 405 nm para la comparación entre los equipos Multiskan y espectrofotómetro.

(A)		
Filtro 405 nm	Filtro 405 nm	Filtro 405 nm
Media	Media	Media
Varianza	Varianza	Varianza
Observaciones	Observaciones	Observaciones
Grados de libertad	Grados de libertad	Grados de libertad
F	F	F
P(F<=f) una cola	P(F<=f) una cola	P(F<=f) una cola
Valor crítico para F (una cola)	Valor crítico para F (una cola)	Valor crítico para F (una cola)
(B)		
Filtro 405 nm	Filtro 405 nm	Filtro 405 nm
Media	Media	Media
Varianza	Varianza	Varianza
Observaciones	Observaciones	Observaciones
Diferencia hipotética de las medias	Diferencia hipotética de las medias	Diferencia hipotética de las medias
Grados de libertad	Grados de libertad	Grados de libertad
Estadístico t	Estadístico t	Estadístico t
P(T<=t) una cola	P(T<=t) una cola	P(T<=t) una cola
Valor crítico de t (una cola)	Valor crítico de t (una cola)	Valor crítico de t (una cola)
P(T<=t) dos colas	P(T<=t) dos colas	P(T<=t) dos colas
Valor crítico de t (dos colas)	Valor crítico de t (dos colas)	Valor crítico de t (dos colas)

(A) Prueba F para varianzas de dos muestras y (B) Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales.

Estos puntos inferiores son los menores valores de las curvas de regresión con exactitud (Recup. 100 ± 10) y precisión ($CV \leq 10\%$). El estudio de exactitud del método se realizó a partir del análisis de los resultados de la adición del patrón a la muestra control teniendo en cuenta los resultados del estudio de especificidad. En la prueba G_{Corchran} se obtuvo valores de $G_{\text{experimental}} = 0,9 \leq G_{\text{tabulada}} = 0,9$ con la sal cloruro de amonio y $G_{\text{experimental}} = 0,6 \leq G_{\text{tabulada}} = 0,9$ con sulfato de amonio. Esto demuestra que el factor concentración no tiene influencia en la variabilidad de los resultados.

El porcentaje de recuperación medio fue de 104%, no hubo diferencias significativas entre este valor y el 100% ($t_{\text{experimental}} = 2,3 \leq t_{\text{tabulada}} = 2,3$).

El intervalo de confianza para el porcentaje de recuperación medio, se encontró entre 100 y 108% en ambos casos. Sin embargo, en el rango bajo de la curva de cloruro de amonio se observó en dos casos porcentajes de recuperación mayores de 110, este resultado se asocia a la variabilidad que existe en este rango.

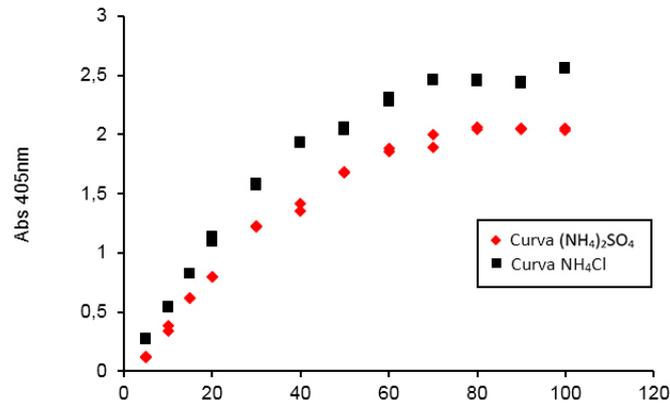


Fig. 2. Resultados obtenidos para la selección del rango en las curvas de las sales estándares de amonio. Abs: Absorbancia.

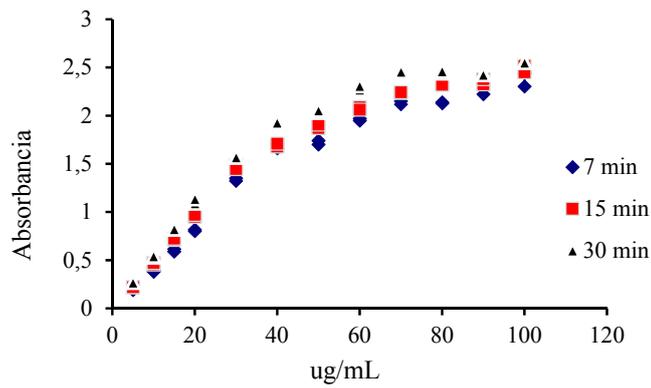


Fig. 3. Resultados del estudio del tiempo de reacción del ensayo.

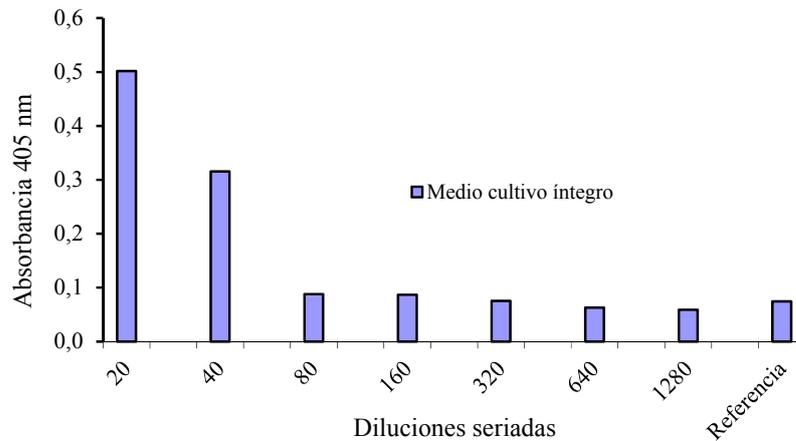


Fig. 4. Resultados de las repuestas en unidades de absorbancia obtenidas para el placebo de las muestras y los valores de la referencia (blanco del ensayo).

Tabla 3. Resultados del análisis estadístico realizado a los datos experimentales.

(A)		
Variables	Dilución 1/320	Referencia
Media	0,0755	0,0745
Varianza	4,5E-06	5E-07
Observaciones	2	2
Grados de libertad	1	1
F	9	-
P(F<=f) una cola	0,20483276	-
Valor crítico para F (una cola)	161	-
(B)		
Variables	Dilución 1/320	Referencia
	Dilución 1/320	Referencia
Media	0,0755	0,0745
Varianza	4,5E-06	5E-07
Observaciones	2	2
Varianza agrupada	0,0000025	-
Diferencia hipotética de las medias	0	-
Grados de libertad	2	-
Estadístico t	0,63	-
P(T<=t) una cola	0,29587585	-
Valor crítico de t (una cola)	2,91998558	-
P(T<=t) dos colas	0,59175171	-
Valor crítico de t (dos colas)	4,30	-

Solo se muestran los resultados de la comparación entre la dilución (1:320) a la cual fue posible eliminar las interferencias y la referencia (blanco del ensayo). (A) Prueba F para varianzas de dos muestras y (B) Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales.

Este resultado se tendrá en cuenta para cuantificar las muestras en los rangos altos y medios de la curva de calibración y así minimizar la variabilidad en el resultado final. El CV global obtenido fue de 5%, tanto para el cloruro de amonio como para el sulfato de amonio (Tabla 6). Estos resultados estadísticos demostraron que se cumplió con el criterio de aceptación para esta prueba.

El análisis de la precisión del método se demostró a partir de los resultados de las muestras preparadas a concentraciones conocidas del analito. El ensayo de repetibilidad obtuvo un CV global $\leq 5\%$, tanto para el análisis de concentración calculada como para la variabilidad del valor de concentración real al diluir las muestras.

Tabla 4. Resultados del análisis estadístico de los tres ensayos del estudio de linealidad de la curva de calibración de las sales de amonio.

Parámetros	Sal NH ₄ Cl			Sal (NH ₄) ₂ SO ₄		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 1	Curva 2	Curva 3
Pendiente de la Ec. Recta (m)	0,053	0,058	0,059	0,040	0,044	0,039
Intercepto de la Ec. Recta (b)	0,028	-0,001	0,001	0,029	0,096	0,058
Coefficiente de determinación (R ²)	0,995	0,998	0,997	0,998	0,996	0,993
Probabilidad asociada a F es menor que 0,01 (para la significación de la pendiente)	1,8E-10	7,7E-12	2,3E-11	5,6E-11	4,4E-12	2E-09

Tabla 5. Resultados experimentales de los tres ensayos independientes del análisis de linealidad de la curva de calibración. (A) Curva de cloruro de amonio y (B) Curva de sulfato de amonio.

Curvas cloruro de amonio									
(A)	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	C.M.Glob	DE (µg/mL)	CV	Rec (%)	T. teórica	T. calculada
						Glob (%)			
C.E	C.M	C.M	C.M						
20	19,6	20,0	20,1	19,9	0,3	1	99	4,30	0,78
15	15,4	14,8	14,7	14,9	0,4	2	100		0,26
10	10,5	10,3	10,1	10,3	0,2	2	103		3,21
5	4,9	5,2	5,5	5,2	0,3	5	104		1,13
2	1,7	1,7	2,0	1,8	0,2	9	90		1,99

Curvas sulfato de amonio									
(B)	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	C.M.Glob	DE (µg/mL)	CV	Rec (%)	T. teórica	T. calculada
						Glob (%)			
C.E	C.M	C.M	C.M						
30	29,6	29,7	29,1	29,5	0,4	1	98	4,30	2,62
20	20,6	19,9	21,2	20,6	0,6	3	103		1,65
15	15,0	15,9	15,6	15,5	0,4	3	103		2,01
10	9,8	9,9	9,8	9,8	0,1	1	98		2,86
5	4,9	4,5	4,3	4,6	0,3	7	92		2,36

C.E: Concentración estándar, C.M: Concentración de la muestra, C.M. Glob: Concentración media global, DE: Desviación estándar, CV Glob: Coeficiente de variación global, Rec: Recuperación.

Tabla 6. Resultados del análisis estadístico de exactitud por el método de adición de patrón al medio de cultivo.

Sales/rangos		Valor esperado ($\mu\text{g/mL}$)	Valor observado ($\mu\text{g/mL}$)	% de Recuperación
			28,2	98
	RA	28,8	28,8	100
			28,9	100
			19,5	110
Sulfato	RM	17,8	18,4	103
			18,8	106
			8,0	108
	RB	7,4	7,4	100
			7,6	102
			19,5	103
	RA	19,0	19,2	101
			19,0	100
			13,1	102
Cloruro	RM	12,9	13,0	101
			13,0	101
			3,1	111
	RB	2,8	3,0	110
			3,3	118

RA: Rango alto, RM: Rango medio, RB: Rango bajo.

Esto indica que los resultados se encuentran dentro de los límites establecidos, además que cumplen con el criterio de aceptación para esta prueba (Tabla 7).

En el ensayo de precisión intermedia el mayor coeficiente de variación fue 9% en el rango bajo de la curva de cloruro de amonio (Tabla 8).

Los resultados cumplieron con el criterio de aceptación para esta prueba en todos los rangos estudiados ($CV \leq 10\%$).

El método resultó ser preciso y se cumplió con el criterio de aceptación para el coeficiente de variación intraensayo e interensayo calculado para un mismo analista en 3 días diferentes.

Tabla 7. Resultados del análisis de repetibilidad en los diferentes rangos estudiados.

Sales Amonio	Rangos	Concentración calculada			Concentración real			
		Valores medios ($\mu\text{g/mL}$)	DE	CV (%)	Valores medios (mg/mL)	Media	DE (mg/mL)	CV (%)
Cloruro	RA	19,3	0,53	3	1,2	1,1	0,06	5
	RM	13,1	0,31	2	1,1			
	RB	3,5	0,09	3	1,1			
Sulfato	RA	24,5	0,25	1	1,0	1,0	0,02	2
	RM	18,2	0,35	2	1,0			
	RB	8,2	0,37	5	1,0			

RA: Rango alto, RM: Rango medio, RB: Rango bajo, DE: Desviación estándar, CV: Coeficiente de variación

Tabla 8. Resultados del análisis de precisión intermedia en los diferentes rangos estudiados.

Sales Amonio	Rangos	Valores medios ($\mu\text{g/mL}$)			Media Global ($\mu\text{g/mL}$)	DE Global ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)
		Día 1	Día 2	Día 3			
Cloruro	RA	19,4	19,0	17,4	18,6	1,05	7
	RM	13,1	12,8	12,2	12,7	0,46	4
	RB	3,5	2,9	3,1	3,1	0,28	9
Sulfato	RA	24,7	24,8	23,4	24,3	0,80	3
	RM	18,0	17,6	17,6	17,7	0,25	1
	RB	8,2	8,1	7,9	8,1	0,11	1

RA: Rango alto, RM: Rango medio, RB: Rango bajo, DE: Desviación estándar, CV: Coeficiente de variación.

Conclusiones

Se estandarizó el método al emplear dos sistemas con sales de amonio como curva patrón.

Los resultados de este trabajo demostraron que los parámetros críticos cumplieron con los criterios de aceptación establecidos y se mantuvieron dentro de los límites de las variaciones propias del ensayo, por lo que avalan el uso de este novedoso método cuantitativo en microplaca, para la cuantificación de amonio en muestras de fermentaciones.

Referencias

1. Vogel A. Química analítica cualitativa. Buenos Aires: Kapelusz; 1953.
2. Boltz DF, Howell JA. Colorimetric determination of nonmetals. 2nd ed. New York: John Wiley Edition; 1978.
3. Norma Mexicana. NMX-K 1968-231. México D.F: Secretaria de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI); 1968.
4. Cáceres J. Evaluación analítica y optimización de procesos de oxidación avanzada en planta piloto solar. [Tesis Doctoral]. Andalucía: Universidad de Almería; 2002.
5. Estrada-Fernández P, Riobos-Regadera MC, Gutiérrez Delgado JD. Manual de Control Analítico de la Potabilidad de las Aguas de Consumo Humano. 1a ed. Madrid: Díaz de Santos; 1983.

6. AWWA. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 16a edition. Washington: American Public Health Association-American Water Works Association-Water Environment Federation; 1985.
7. Sigarroa A. Biometría y Diseño experimental. La Habana: Edición Pueblo y Educación; 1985.
8. Romer J. "Análisis de agua". Barcelona: Eds. Omega S.A; 1989.
9. Chaloner-Larsson G, Anderson R, Egan A. WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. Validation of analytical assays. Geneva: WHO; 1997.
10. Serret A, Rosales I. Validación de métodos analíticos. Segundo Taller Nacional de Validación. La Habana: Grupo Nacional de Validación (GNV); 1997.
11. International Conference on Harmonisation. ICH validation of analytical procedures: Text and Methodology. London: ICH; 2005.
12. Walfish S. Analytical Methods: A Statistical Perspective on the ICH Q2A and Q2B Guidelines for Validation of Analytical Methods. *BioPharm International* 2006;19(12):28-37.
13. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Validación de Métodos Analíticos. Regulación No.41. La Habana: CECMED; 2007.
14. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Buenas Prácticas de Laboratorio para el Control de Medicamentos. Anexo 1 Regulación No.37. La Habana: CECMED; 2012.
15. García J. Aplicación del análisis de riesgo a la producción de proteínas recombinantes expresadas en *Escherichia coli*. *VacchiMonitor* 2012;21(2):35-42.
16. García J. Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *VacchiMonitor* 2013;22(2):30-9.

Application of Neesler reagent in the ammonium quantification used in the fermentations of biotechnology products

Abstract

The ammonium salts are used in fermentations to supplement the deficient amounts of nitrogen and stabilize the pH of the culture medium. The excess ammonium ion exerts a detrimental effect on the fermentation process inhibiting microbial growth. An analytical method based on Neesler reagent was developed for monitoring and controlling the concentration of ammonium during the fermentation process. The test was standardized, by means of the selection of measuring equipment, and the reaction time as well as comparing standards of ammonium salts. The method was characterized with the evaluation of the next parameters: Specificity, Linearity and Range, Quantification Limit, Accuracy and Precision. The method proved to be specific. Two linear curves were defined in the ranges of concentrations of ammonium chloride salt (2-20 µg/ml) and ammonium sulfate salt (5-30 µg/ml). The limits of quantification were the lowest points of each one. The method proved to be accurate and precise. This assay was applied to samples of the yeast culture and bacteria of the genus *Saccharomyces* and *E. coli* respectively. A novel method in micro plate for quantification and analytical control of ammonia was developed. This method is used to control this fundamental chemical component in the fermentations, to optimize the culture medium. Thus, an appropriate expression of recombinant proteins and proper vaccine candidates for clinical use are achieved.

Key words: Ammonium, Neesler, analytic control, fermentation.

Recibido: Agosto de 2014

Aceptado: Septiembre de 2014