

Estudos sobre a dosagem microbiológica das vitaminas do complexo B — II. Niacina

por

Gilberto G. Villela e Alberto B. Hargreaves

(Com 2 figuras no texto)

A necessidade em ácido nicotínico (niacina) e em nicotinamida (niacínamida) para o crescimento dos diversos microorganismos fêz com que êstes fôssem utilizados para a dosagem destas vitaminas.

HUGHES, KNIGHT, LANDY e outros mostraram a necessidade da niacina para o desenvolvimento do "Staphylococcus aureus". FILDES verificou que o "Bacillus Proteus" só cresce em meio de cultura artificial se a êste fôr adicionada a niacina. LWOFF e QUERIDO aplicaram êste fato para estabelecer uma técnica de dosagem quantitativa da nicotinamida. Esta técnica já havia sido ensaiada por um de nós em trabalho anterior (1)

ISBELL e WOOLLEY, BULTER e SEBRELL verificaram que esta vitamina é indispensável para a "Shighella paradysenteriae".

SNELL e WRIGHT, em 1941, estudando o comportamento do "Lactobacillus arabinosus 17-5" verificaram que êste responde quantitativamente às doses de niacina presentes num meio de composição conhecida. Estabeleceram êstes autores um método bastante sensível e que tem sido largamente empregado para a dosagem da niacina nos meios biológicos e nos alimentos. (2)

Foi nosso intuito estudar o comportamento do L. arabinosus em diversos meios sintéticos. Procuramos assim obter um crescimento máximo que permitisse utilizar um meio de escolha para as dosagens nos meios biológicos diversos. KREHL, STRONG e ELVEHJEM recentemente também propuseram algumas modificações na composição do meio de prova, bem como no preparo do material a ensaiar (3).

PARTE EXPERIMENTAL

Microorganismo.

Foi usado o "Lactobacillus arabinosus" 17-5 proveniente da Universidade de Texas, Estados Unidos.

* Recebido para publicação a 9 de janeiro de 1944 e dada à publicidade em fevereiro de 1945.

Meio de prova.

Os ensaios comparativos feitos com o meio de prova de SNELL e WRIGHT e com o meio modificado por nós mostraram que as nossas curvas de crescimento atingiam uma elevação bem maior. Esse estímulo obtido com o nosso meio deve-se à adição de asparagina e ao aumento da concentração de glicose e de acetato de sódio. Bem que a riboflavina, piridoxina e tiamina não sejam indispensáveis, conforme referem BOHONOS e colaboradores e SNELL e STRONG, achamos melhor conservá-las no meio.

Composição do meio de prova:

Hidrolisado de caseína (em substância seca)	0,5 g
Acetato de sódio cristalizado	1,2 g
Glicose	2,0 g
Asparagina	25 mg
Triptofânio	10 mg
Cistina	10 mg
Cloridrato de guanina	0,5 mg
Sulfato de adenina	0,5 mg
Xantina	0,5 mg
Uracilo	0,5 mg
Solução salina A.	0,5 ml
Solução salina B.	0,5 ml
Solução de vitaminas	1,0 ml
Água destilada, até	100 ml

Solução salina A:

Fosfato monopotássico	5 g
Fosfato bipotássico	5 g
Água destilada	50 ml

Solução salina B:

Sulfato de magnésio (7 H ₂ O)	10,0 g
Cloreto de sódio	0,5 g
Sulfato de ferro (7 H ₂ O)	0,5 g
Sulfato de manganês (4 H ₂ O)	0,337 g
Água destilada	250 ml

Solução de vitaminas.

Cloridrato de tiamina	1,0 mg
Riboflavina	2,0 mg
Piridoxina.	4,0 mg
Pantotenato de cálcio	2,0 mg
Biotina	0,05 mg
Ácido clorídrico 0,01N	100 ml

Preparo do meio:

a) hidrolisado de caseína — Não se dispendo de caseína Labco livre de vitaminas, pode-se usar uma caseína bruta do comércio e purificá-la. Esta nos deu ótimos resultados e é muito mais econômica. Para isso, dissolvem-se 200g de caseína em 2 litros de água bicarbonatada a 0,03%, adicionam-se 2 ml de soda a 40% e leva-se à autoclave a 120° C durante 45 minutos para a completa dissolução da caseína e destruição das vitaminas. Filtra-se para separar as partículas não dissolvidas e as impurezas. Precipita-se o filtrado com o HCl até o pH 4.5. Redissolve-se novamente em meio alcalino. Repete-se a precipitação e a redissolução por mais 3 vezes. Precipita-se mais uma vez a caseína em meio ácido. Cobre-se o precipitado com acetona acidificada e leva-se ao banho maria, substitui-se a acetona, adicionando-se nova quantidade e deixa-se macerar durante 12 horas na temperatura ambiente. Seca-se e trata-se pelo éter para completo desengorduramento. Com este processo o rendimento é de cerca de 100g de caseína purificada livre de vitaminas.

Tomam-se 100g de caseína purificada e juntam-se 500 ml de ácido sulfúrico a 25%, deixa-se 10 horas na autoclave a 120°C. O ácido sulfúrico é precipitado pelo hidróxido de bário (218,75g) e o sulfato resultante é filtrado. Ajusta-se o pH do filtrado para 3 e adicionam-se 10g de carvão ativado. Agita-se 1 hora, filtra-se e toma-se uma porção para se determinar o teor em substância seca (secagem a 110°C durante 3 horas).

A este hidrolisado claro junta-se o acetato de sódio, a xantina, o uracilo, guanina e adenina de modo que a 0,5g de substâncias sólidas do hidrolisado num volume determinado se dissolva 1,2g do acetato e 0,5mg de cada uma das bases púricas.

b) Solução de asparagina, cistina e triptofânio.

Dissolve-se 0,25g de asparagina, 0,1g de cistina e 0,1g de triptofânio em 100 ml de HCl 0,1N. KLINE acha que a cistina em concentração dupla proporciona resultados melhores, mas na concentração de 0,1% obtivemos sempre curvas máximas.

c) Solução de niacina a 25mg em 100 ml.

O meio se prepara misturando o volume do hidrolisado (cerca de 12 ml) contendo 0,5g de substância seca às soluções abaixo.

Solução de asparagina-cistina, triptofânio	10 ml
Solução de vitaminas	1 ml
Solução salina A	0,5 ml
Solução salina B	0,5 ml

Dissolvem-se nesta mistura 2g de glicose pura. Acerta-se o pH para 6.6-6.8 com soda a 40% e aquece-se o líquido cuidadosamente em banho-maria fervente. Esfria-se e filtra-se. Completa-se o volume para 100 ml com água. Distribui-se em tubos de 20 x 160 mm, colocando-se 5 ml em cada. Para fazer a curva padrão, adicionam-se doses crescentes de niacina (de 0,01 microg a 0,6 microg por tubo) e completa-se o volume com água. Em outra série de tubos juntam-se doses crescentes do material a dcsar e completa-se o volume para 10 ml com água. Levam-se os tubos à autoclave a 110°C durante 15 minutos.

A cultura do "Lactobacillus arabinosus" é semeada em meio de leite (48 horas a 37° e 12-15 dias a 5° C) e conservada na geladeira. As passagens são feitas no meio de cevada a 6%, glicosado a 0,2% onde fica 24 horas. Após êsse prazo semea-se no meio de prova adicionado de 1 microg de niacina para 10 ml do meio. Deixa-se 24 horas na estufa a 37°C, centrifuga-se asséticamente e lava-se por centrifugação 2 vezes com solução salina a 0,85%. O centrifugado é suspenso em 10 ml da solução salina. Esta suspensão serve para o ensaio. Semea-se 1 gota para cada tubo e incuba-se a 37°C durante 3 dias.

Leitura

O conteúdo de cada tubo é passado para um balão de Erlenmeyer de 50ml. Lava-se o tubo com água que se passa para o balão. Titula-se pela solução de soda 0,1N, usando-se 0,5ml do indicador azul de bromotimol a 0,04%.

No Quadro I acham-se representados alguns resultados obtidos com extratos de lêvedo e de figado em comparação com a solução padrão de niacina.

QUADRO I

NIACINA		EXTRATO DE LEVEDO		EXTRATO DE FIGADO	
γ por tubo	ml de soda 0.1N gastos	ml por tubo	ml de soda 0.1N gastos	ml por tubo	ml de soda 0.1N
0.025	0.9	0.002	1.8	0.001	1.0
0.050	2.2	0.005	3.2	0.002	2.4
0.10	4.0	0.010	5.1	0.005	4.3
0.20	5.2	0.020	6.5	0.010	6.2
0.30	6.0			0.020	7.5
0.40	6.6				
0.50	7.4				

O extrato de lêvedo empregado continha em 10 ml a quantidade de 1 g de lêvedo sêco, e do extrato de fígado correspondiam 100 ml a 100 g de fígado fresco.

A comparação entre os valores obtidos para a parte ascendente da curva representada na Fig. 1, permite concluir que para o extrato de fígado:

0,001 ml do extrato contem 0,03 γ de niacina;
 0,002 ml do extrato contém 0,06 γ de niacina;
 0,005 ml do extrato contém 0,125 γ de niacina;

e para o extrato de lêvedo:

0,002 ml contém 0,04 γ de niacina;
 0,005 ml contém 0,08 γ de niacina;
 0,010 ml contém 0,17 γ de niacina;

Êstes valores dão para o fígado 3 mg de niacina para 100 g de órgão e para o lêvedo 17 mg de niacina para 100 g de lêvedo sêco.

As determinações fotométricas feitas pela reação de König com o bromociano e a anilina nas proporções usadas em (1) forneceram resultados muito aproximados como se pode ver no Quadro II.

QUADRO II

Comparação entre os métodos microbiológico e fotométrico

DILUIÇÃO	EXTRATO DE FIGADO		
	<i>g</i> PARA 5 ml	EXTINÇÃO (E) LIDA NO FOTOMETRO	NIACINA EM γ
1:10	0,5	0,19	15,5
2:10	1,0	0,36	31,0
	EXTRATO DE LEVEDO		
1:10	50 mg	0,10	12,5
2:10	100 mg	0,22	18,0
4:10	200 mg	0,42	41,0
METODO	EXTRATO DE FIGADO em mg para 100 g frescas	EXTRATO DE LEVEDO em mg para 100 g sêcas	
Microbiológico.....	3,0	17,0	
Fotométrico.....	3,1	18,0	

Foram feitos ensaios com cinco meios diferentes para estudar o comportamento do "L. arabinosus" e eleger o meio de escolha. Na fig. 2, para melhor compreensão, transcrevemos grãficamente êstes resultados e no quadro III se encontra a composição dos mesmos.

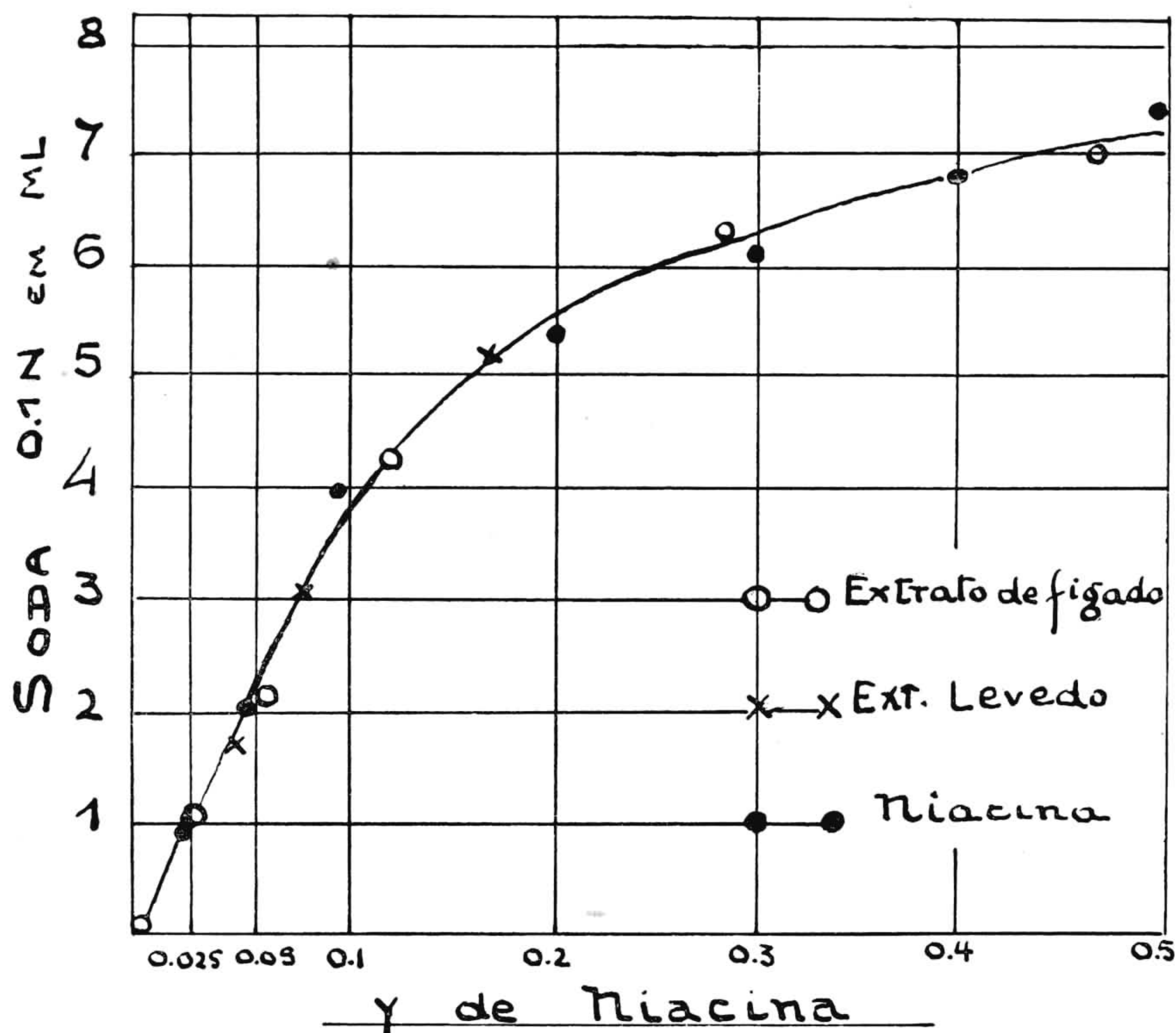


FIG. I

Resposta do "L. arabinosus" às concentrações crescentes de niacina

A dose de 1 g de glicose para 100 ml do meio (50 mg por tubo) como no meio A, não ocasiona o crescimento máximo como observaram LANDY e DICKEN para o "L. casei" (4). Aumentando-se a concentração da glicose para 2 g por cento, o crescimento torna-se máximo (meio B). No meio C experimentamos metade das doses de asparagina, cistina e triptofânio e o crescimento foi também sub-maximal. Esta deficiência pôde ser compensada pela adição do extrato hepático ou do lêvedo como foi feito no meio D. O extrato de fígado rico em amino ácidos compensa, portanto, a insuficiência do meio em triptofânio, cistina e asparagina. O extrato de fígado contém 0,62γ de niacina em 2 ml ou seja 0,03γ por tubo. O crescimento não ultrapassou, todavia, o obtido com a niacina pura, demonstrando que o extrato é isento de outras substâncias esti-

mulantes para o "L. arabinosus" além da niacina. O meio E que contém doses superiores dos amino acids e do hidrolisado de caseína permite o crescimento máximo e a curva de acidez produzida é proporcional à quantidade de niacina adicionada.

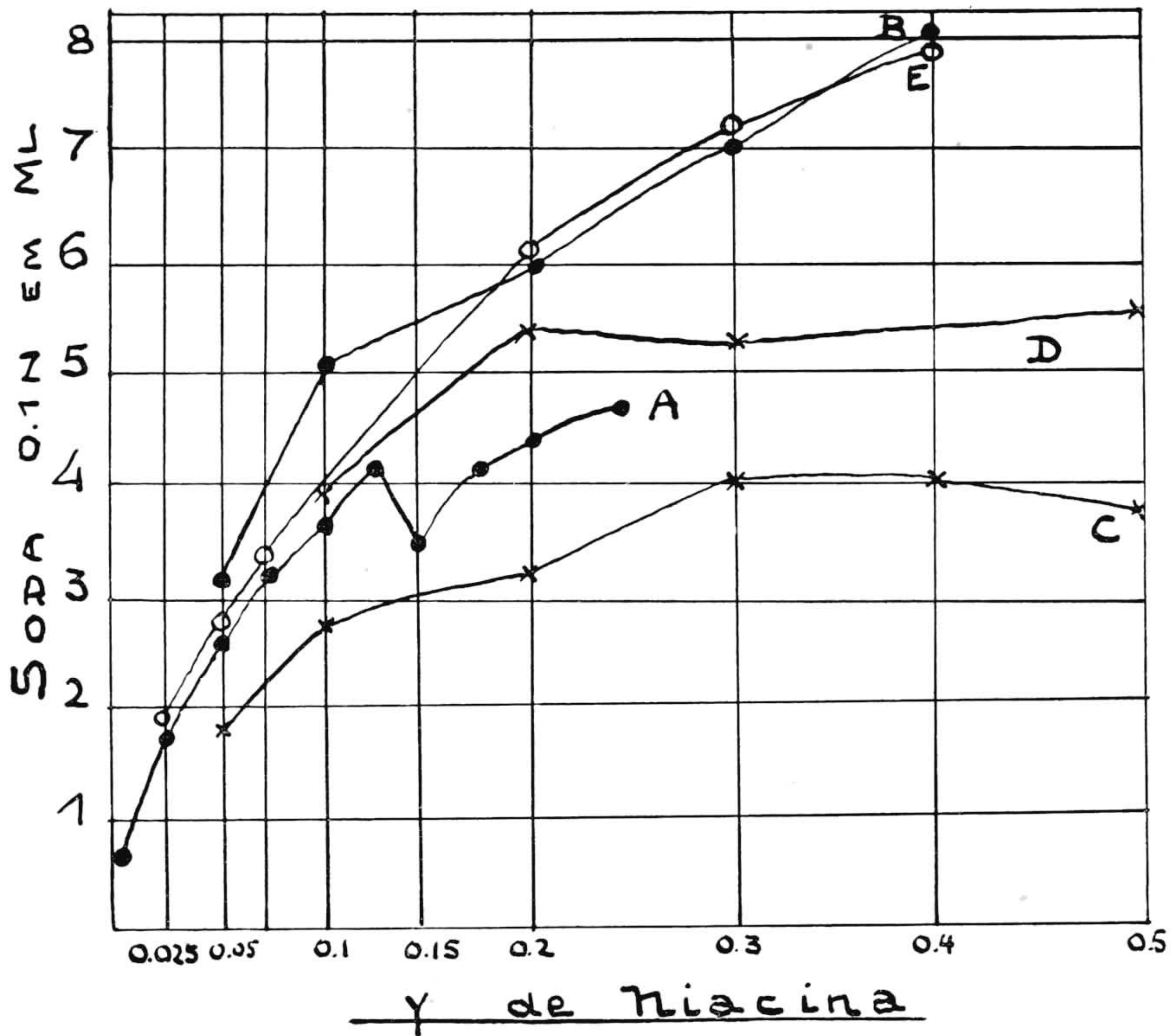


FIG. II

Resposta do "L. arabinosus" nos diversos meios ensaiados

QUADRO III

Composição dos meios estudados

CONSTITUINTES	A	B	C	D	E
Hidrolisado de caseína.....	12 ml	12 ml	12 ml	12 ml	20 ml
Glicose.....	1 g	2 g	2 g	2 g	2 g
Asparagina.....	25 mg	25 mg	12,5 mg	12,5 mg	25 mg
Cistina.....	10 mg	10 mg	5 mg	5 mg	10 mg
Triptofânio.....	10 mg	10 mg	5 mg	5 mg	10 mg
Sol.salina A.....	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	1 ml
Sol.salina B.....	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	1 ml
Mistura de vitaminas.....	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Extrato de fígado.....	—	—	—	2 ml	—
Água destilada.....	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

No caso de se empregarem amostras de órgãos ou alimentos deve-se homogenizar bem o material e tomar 1 g que se suspende em 50 ml de ácido clorídrico ou sulfúrico. Autoclava-se a 110° durante 20 minutos, esfria-se e ajusta-se o pH para 6.6-6.8 com soda normal. Dilue-se então para que 1 ml contenha 0,05 y de niacina aproximadamente.

ABSTRACT

Microbiological assay for niacine

The microbiological assay method of Snell and Wright for niacine was studied and some modifications of the basal medium were proposed. A maximal growth of the "Lactobacillus arabinosus" was obtained by the addition to the basal medium of 25 mg% asparagine and increasing the percentages of glucose and sodium acetate.

Liver and yeast extracts were assayed satisfactory and the niacine added was recovered quantitatively.

BIBLIOGRAFIA

1. — VILLELA (G. G.)
1940. Dosagem do ácido nicotínico (Vitamina P-P) no sangue. O Hospital, 17 : 431-442.
2. — SNELL (E. E.) e WRIGHT (L. D.),
1941. Assay method for nicotinic acid. University of Texas Public. N.º 4.137 : 22-23.
3. — KREHL (W. A.), STRONG (F. M.) e ELVEHJEM (C. A.).
1943. Determination of nicotinic acid. Modifications in the microbiological method. Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.) 15 : 471-475.
4. — LANDY (M.) e DICKEN (D. M.)
1942 — A microbiological assay method for six B vitamins using Lactobacillus casei and a medium of essentially known composition. Jour. Lab. Clin. Med.: 27, 1086-1092.