

Estudos sobre a dosagem microbiológica das vitaminas do complexo B — I. Riboflavina

por

Gilberto G. Villela e Alberto B. Hargreaves

(Com dois gráficos no texto)

A necessidade da aplicação dos métodos microbiológicos ao estudo das vitaminas do complexo B cada dia mais se faz sentir. Atualmente já são conhecidos numerosos microorganismos servindo de reativo sensível para os diversos fatores do complexo B, quando cultivados em meios de composição bem estabelecida. A rapidez dos ensaios microbiológicos em relação aos testes biológicos praticados em animais, bem como a enorme economia de material e espaço para sua execução, fizeram com que êles, rapidamente adquirissem uma posição de destaque na técnica vitaminológica.

Foi partindo do estudo do metabolismo dos fatores de crescimento do lêvedo e posteriormente de outros organismos, tais os cogumelos e as bactérias, que nasceram estes métodos de dosagem sensíveis e específicos. O estudo detalhado sobre a natureza complexa do "bios" e que culminou pelo isolamento da biotina, representa um atestado expressivo das aplicações praticas que se podem obter pelo emprego dos métodos microbiológicos. Os ensaios com lêvedos e outros cogumelos como o "*Phycomyces Blakesleeanus*" têm sido largamente empregados na determinação da tiamina (1) (2). WILLIAMS e seus colaboradores da Universidade de Texas criaram todo um sistema de dosagens microbiológicas que se tem mostrado de grande utilidade para o conhecimento da composição vitamínica dos tecidos animais e dos alimentos (3). SNELL e STRONG verificando que o "*Lactobacillus casei*" é um organismo que exige diversos fatores para o seu desenvolvimento, estudaram uma técnica de dosagem da riboflavina e depois do ácido pantotênico que se mostrou de grande valor para a determinação destas vitaminas nos meios biológicos (4).

LANDY e DICKEN fizeram estudos no sentido de simplificar as dosagens das vitaminas do complexo B empregando um mesmo meio de prova e um

* Recebido para publicação a 2 de janeiro de 1944 e dada à publicidade em fevereiro de 1945.

mesmo microorganismo para todos os testes (5). No que diz respeito à dosagem da piridoxina o método destes autores não tem dados resultados satisfatórios porquanto o *L. casei* utiliza principalmente a pseudopiridoxina que se forma pelo aquecimento entre a piridoxina e alguns amino-ácidos (6). O teste para esta vitamina não é como a princípio se supôs suficientemente específico.

O "*Lactobacillus casei*" só se desenvolve em meio sintético especial, contendo todos os fatores, quando a riboflavina fôr adicionada ao meio. O crescimento bacteriano e a produção de ácido é proporcional à quantidade de riboflavina presente no meio.

Foi nosso intuito estudar este método não só no que diz respeito à riboflavina como também a outras vitaminas do complexo B e aplicá-lo à dosagem no plasma, extratos de fígado e de lêvedo. Verificamos também a possibilidade de modificar o meio de prova pela substituição de alguns elementos por outros de mais fácil obtenção entre nós. No presente trabalho serão somente indicados os resultados obtidos na dosagem da riboflavina.

O método biológico da medida do crescimento do rato só permite a dosagem em material contendo quantidades apreciáveis de riboflavina. A determinação química nem sempre oferece resultados satisfatórios quando se acham presentes outros pigmentos fluorescentes dificilmente removíveis. O método de SNELL e STRONG além de ser muito sensível é bastante específico, pois o "*Lactobacillus casei*" não produz crescimento apreciável com os fotoderivados da riboflavina. Bem que o "*L. casei*" seja muito exigente em fatores de crescimento para que sejam satisfeitas as condições ótimas, foi possível conseguir um meio de prova de composição conhecida servindo para os ensaios das diversas vitaminas. Substituindo ao meio um dos elementos é possível obter respostas bastante significativas não só para a riboflavina como para os outros componentes ativos.

Parte experimental

A técnica por nós adotada foi a de SNELL e STRONG modificada em alguns pontos.

O "*Lactobacillus casei*" foi cultivado e mantido em meio de leite, sendo em alguns casos necessário adicionar a este 0,1 microg de riboflavina para 1 ml do meio para que o desenvolvimento fôsse abundante. Os tubos com o leite depois de 24 horas foram conservados na geladeira e repicados mensalmente em meio de conservação composto de extrato de cevada a 6%, glicose a 0,2% e água. Neste meio as culturas se mantêm com bom crescimento. No dia anterior ao ensaio semeiam-se os tubos com o meio de prova contendo 0,1 microg de riboflavina para 1 ml do meio.

Meio de prova

Peptona fotolizada	20 ml
Cistina.	20 ml
Extrato de lêvedo livre de riboflavina	2 ml
Glicose.	2 g
Solução salina A	1 ml
Solução salina B	1 ml
Água destilada até	100 ml

Misturam-se as soluções de peptona fotolizada, cistina, extrato de lêvedo e as soluções A e B. Adiciona-se a glicose aquecendo-se a solução. Após dissolução completa da glicose esfria-se a solução e ajusta-se o pH entre 6.6 e 6.8 com soda normal. Aquece-se em banho-maria a 70°C. O líquido de turvo passa a claro com pequenos flocos. Filtra-se e completa-se o volume para 100 ml com água destilada. O líquido filtrado fica perfeitamente límpido.

Peptona fotolizada

Pesam-se 40 g de peptona pura que se dissolvem em 250 ml de água destilada. Adicionam-se 250 ml de uma solução aquosa contendo 20 g de soda. Mistura-se bem e distribue-se o líquido em placas de Petri de 30 cm de diâmetro e 1 a 2 cm de altura. Iluminam-se as placas com uma lâmpada de 100 wts na distância de 30 cm durante 6 a 10 horas. Deixam-se ainda 18 a 14 horas (total de 24 horas) na temperatura ambiente. A solução é então neutralizada com ácido acético glacial (27,9 ml) e adicionada de 7 g de acetato de sódio anidro ou 9 g de acetato cristalizado. Dilui-se para 800 ml com água destilada. Usamos com bons resultados a peptona Geyer do Rio Grande do Sul. A solução de peptona é conservada na geladeira sob camada de tolueno.

Extrato de lêvedo livre de riboflavina

Pesam-se 500 g de lêvedo em pó que se suspendem em 5 litros de água destilada acidulada pelo ácido acético (pH 3.5 — 4.0). A suspensão fica em maceração durante 12 horas. Aquece-se a 100°C a fim de coagular as proteínas. Filtra-se e concentra-se o filtrado no vácuo até 250 ml. Este contém cerca de 50 g de matéria seca (75 g de substância pastosa) correspondendo ao extrato autolizado de lêvedo Difco empregado por SNELL e STRONG. Ao filtrado juntam-se 75 g de acetato básico de chumbo dissolvidos previamente em 250 ml de água. Filtra-se e alcaliniza-se pela amônia até o pH de 10, com o azul de timol como indicador externo. Filtra-se. Acidifica-se novamente com ácido acético. O excesso de acetato de chumbo é retirado por meio de uma corrente de gás sulfídrico e o líquido é novamente filtrado. Toda a riboflavina existente no lêvedo é, desse modo, absorvida pelo sulfu-

reto de chumbo. Completa-se o volume para 500 ml com água destilada. Conserva-se na geladeira sob camada de tolueno. Nestes ensaios usamos com bons resultados o lêvedo "Do L. C. S. A." do Rio de Janeiro.

Solução salina A

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

Solução salina B

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

Solução de cistina

A solução de cistina é preparada de modo a conter 1 mg de cistina para cada 1 ml de solução de HCl N/1. Conserva-se na geladeira sob tolueno. Empregamos a 1-cistina de Pfanstiehl.

Solução padrão de riboflavina

Faz-se uma solução contendo 10 mg de riboflavina em 100 ml de ácido acético a 0,02%. Conserva-se em frasco escuro, sob tolueno e na geladeira. Empregamos a riboflavina de Hoffman-La Roche.

Microorganismo

As amostras do "Lactobacillus casei" que serviram a êstes ensaios foram fornecidos por E. Snell, da Universidade de Texas, Estados Unidos, e classificadas com os números 393 e 7.469. Esta última foi a que nos forneceu melhores respostas, confirmando a observação recente de CAMPBELL e HUCKER (7).

Preparo dos tubos para o estabelecimento da curva padrão

Separa-se uma série de tubos de vidro Pyrex (15 cm x 1,8 cm ou 15 x 2 cm) onde se colocam 5 ml do meio de prova em cada tubo. Adicionam-se doses crescentes da solução de riboflavina diluída (1 ml para 9 ml de água, contendo 10 microgram. para 1 ml). Ao primeiro tubo deita-se 0,05 ml, ao segundo 0,1 ml e ao 3.º 0,15 ml até o 10.º tubo em que se coloca 0,5 ml. Têm-se quantidades que vão de 0,05 a 0,5 microg para 10 ml. da solução (ver

Quadro I). Adiciona-se água destilada a cada tubo para perfazer o volume de 10 ml. Os tubos são arrolhados e levados à autoclave a 110°C durante 10 minutos. Depois de frios são inoculados com a emulsão dos bacilos.

QUADRO I
DOSAGEM DA RIBOFLAVINA

DOSAGEM DA RIBOFLAVINA CURVA PADRÃO			EXTRATO DE LEVEDO		
ml por tubo	riboflavina em microg. por tubo	Volume gasto de NaOH 0.1N	ml por tubo	mg de levedo sêco	Volume de NaOH 0.1N em ml
0.05	0.05	2,1	0.4	4	2,6
0.10	0.10	3,5	0.6	6	3,8
0.15	0.15	5,3	0.8	8	5,1
0.20	0.20	6,1	1.0	10	6,1
0.25	0.25	6,5	EXTRATO DE FIGADO CONCENTRADO A 1:50		
0.30	0.30	7,0	mg de substancia sólida		Volume de NaOH 0.1N ml
0.35	0.35	7,4			
0.40	0.40	7,5			
0.45	0.45	7,6			
0.50	0.50	7,5			
			DOSAGEM FLUOROMETRICA		DOSAGEM MICROBIOLÓGICA
			em 1 ml		
Extrato de fígado.....			20 microg.		24 microg.
Extrato de levedo.....			2,25 mg.		2,50 mg.

Preparo dos tubos para a dosagem

Numa série de tubos Pyrex das mesmas dimensões dos empregados para a curva padrão, são adicionados 5 ml do meio de prova e mais doses crescentes do extrato a dosar em quantidades que fiquem dentro do ramo ascendente da curva padrão, isto é, entre 0,05 e 0,30 microg de riboflavina por tubo. Completa-se o volume para 10 ml com água e leva-se a autoclave a 110°C durante 10 minutos. Depois de frios os tubos são semeados com a mesma emulsão que serviu para os tubos padrões. Preparam-se também dois tubos sem riboflavina para servir de testemunhas.

Semeadura

A cultura em meio de leite é semeada para o tubo de cevada (contendo 1 microg de riboflavina). Deixa-se 24 horas na estufa a 37°C. Repica-se para o meio de prova adicionado também de 1 microg. de riboflavina. Deixa-se

na estufa a 37°C durante 24 horas. Centrifuga-se a suspensão assépticamente e lavam-se os bacilos 3 vezes por centrifugação com a solução salina de NaCl a 0,85% esterilizada. Após a última lavagem, adicionam-se ao centrifugado bacteriano 12 a 13 ml da solução salina esterilizada. Esta suspensão é que vai servir para a inoculação dos tubos.

A semeadura faz-se com 1 a 2 gotas da suspensão bacteriana por tubo. A emulsão não deve ser por demais densa para não produzir uma prova em branco muito elevada. Os tubos depois de inoculados são levados à estufa a 37°C, onde permanecem 72 horas.

Leitura dos resultados

O líquido de cada tubo é passado para um balão de Erlenmeyer de 50 ml e adicionado de 0,5 ml do indicador azul de bromotimol. Lava-se o tubo com água que também é passada para o balão. Titula-se com a solução de soda 0,1 N até a viragem para o azul nítido. Em alguns casos, foi também determinada a turvação de cada tubo no fotocolorímetro Lumetron com o filtro 530. Nestes casos os ensaios foram feitos com tubos de dimensões menores que se adaptam diretamente ao aparelho sem precisar traspassar o líquido para o tubo do colorímetro. As leituras foram feitas no dia anterior à dosagem da acidez. A curva se vê na Fig. 1.

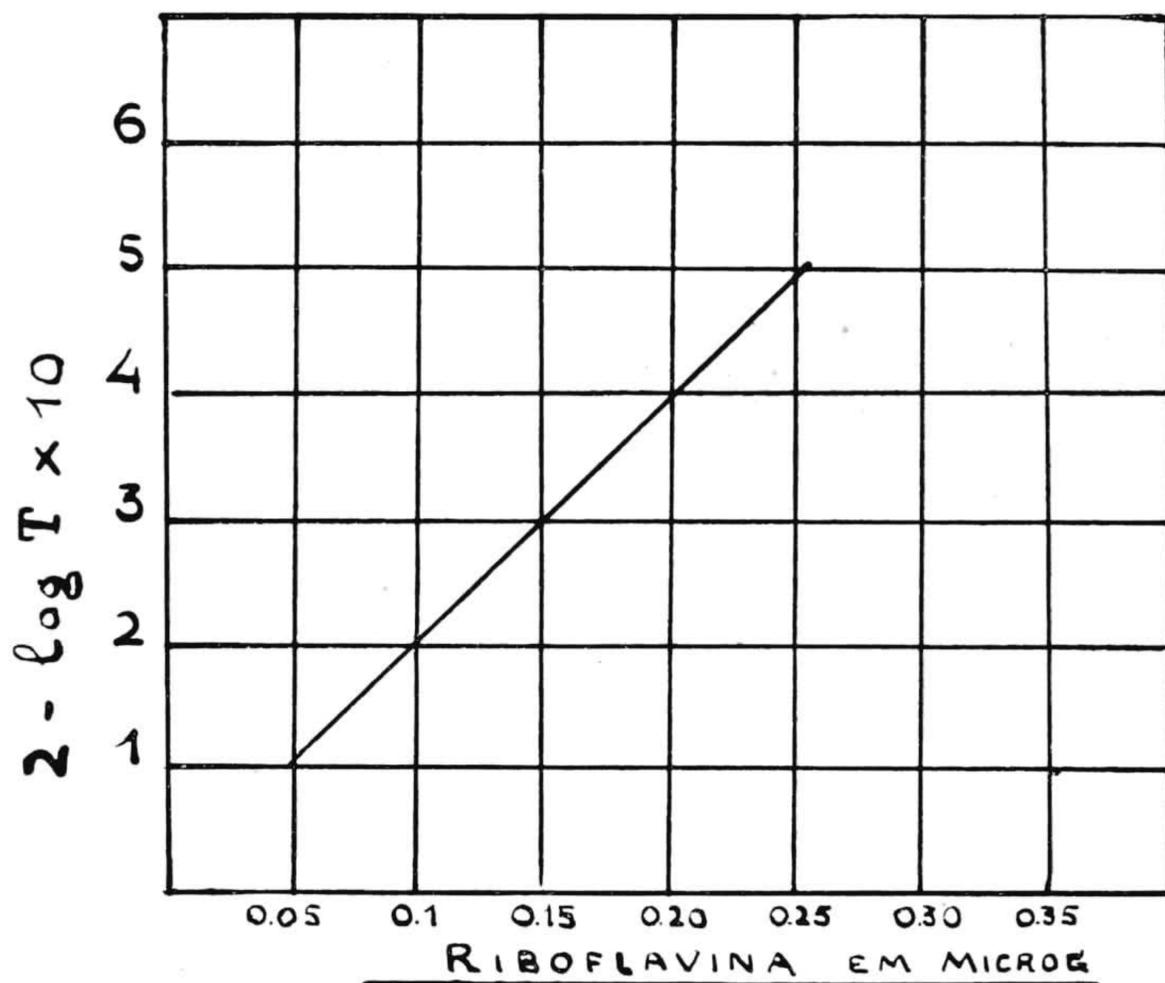


FIG. I

Relação entre a densidade ótica das culturas e a concentração em riboflavina

Dosagem nos extratos de fígado e de lêvedo

A dosagem da riboflavina foi por nós experimentada com a técnica acima para os extratos de fígado e de lêvedo, tendo-se obtido resultados bastante regulares que demonstram a perfeita aplicabilidade do método. Os resultados

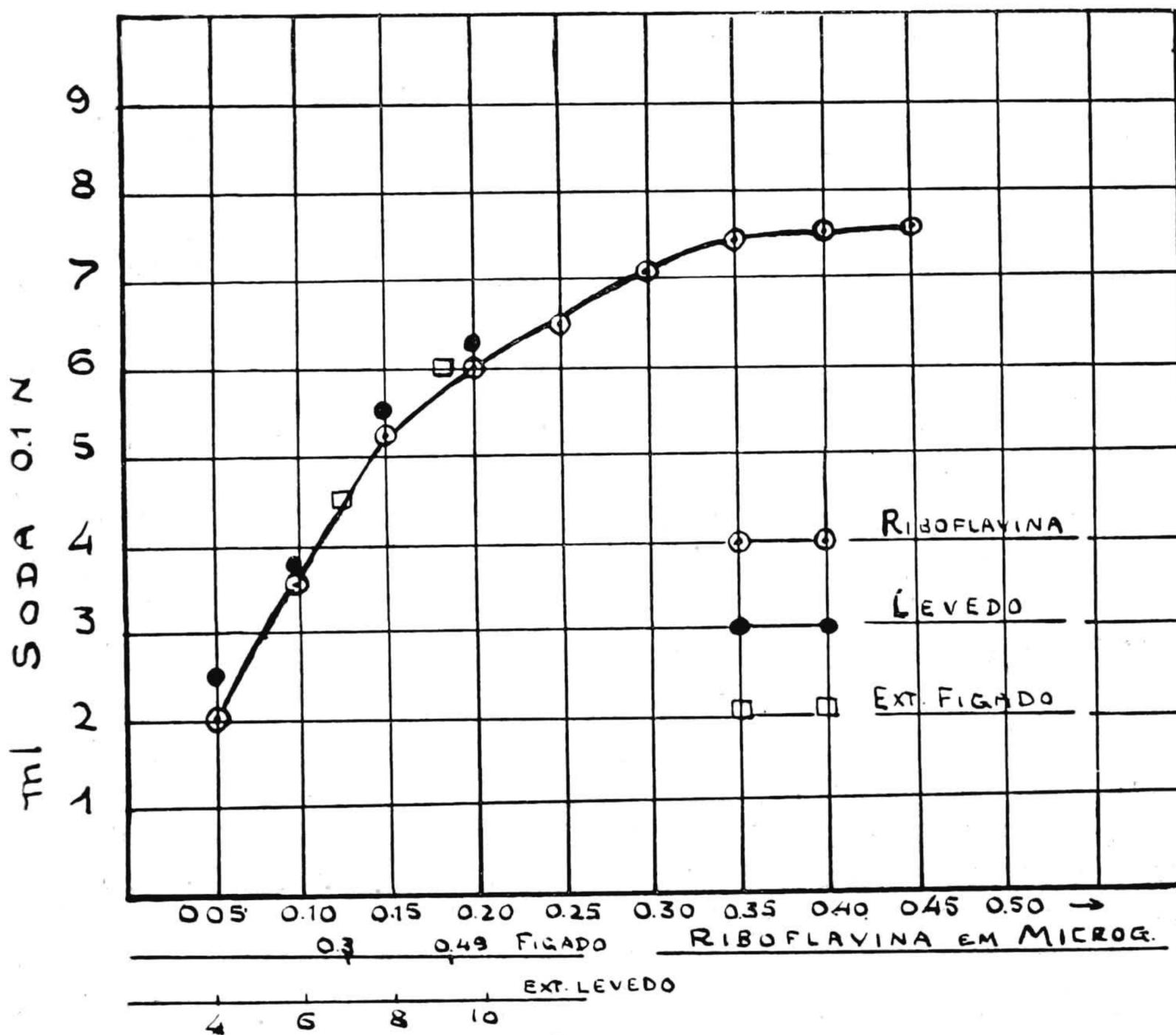


FIG. II

Resposta do "L. casei" às concentrações de riboflavina dos extratos de fígado e de lêvedo em comparação com a curva padrão de riboflavina

acham-se tabulados no Quadro I. Na fig. 2 reunimos as curvas obtidas com os extratos de fígado e de lêvedo em comparação com a curva padrão de riboflavina por nós estabelecida.

Os extratos são hidrolisados com HCl 0,1 N (5 a 10 vezes o volume) e aquecidos na autoclave a 110°C durante 15 minutos. Com êste tratamento a fração combinada da riboflavina é completamente libertada.

SNELL e STRONG, para a dosagem no soro de leite, precipitam as proteínas pela acidificação com ácido acético e aquecimento a 80-90°C. O filtrado serve para o ensaio. Como este pode conter substâncias estimuladoras do crescimento do *Lactobacilo* além da riboflavina, convém ensaiar adicionando à curva padrão o filtrado fotolizado em meio alcalino. Se a produção de ácido for superior à da curva padrão com o soro não fotolizado, é que existem substâncias estimulantes prejudiciais à dosagem. Para o fígado pode-se também fazer uma extração com 3 volumes de HCl 0,1N a quente durante 3 minutos. Filtra-se e neutraliza-se com soda e procede-se ao ensaio. O extrato fotolizado de fígado não estimula o crescimento do *Lactobacilo*.

CHAVES e RIBEIRO não obtiveram resultados satisfatórios pelo método de SNELL e STRONG aplicado à dosagem da riboflavina do extrato de leite (8). Entretanto, a curva por eles fornecida não é comparável à que se tem obtido com as mesmas quantidades de riboflavina; assim para 0,1 microg eles encontraram a produção de ácido titulável de 0,6 ml e para 0,3 microg a quantidade de 1 ml. Em nossos ensaios 0,05 microg já produz 2 ml e 0,3 microg cerca de 7 ml de soda 0,1 N. SNELL e STRONG, bem como LANDY e DICKEN, dão valores de 2 a 8 ml de soda 0,1 N para as quantidades de riboflavina de 0,05 a 0,3 microg. Os valores referidos por CHAVES e RIBEIRO são comparáveis aos que se obtêm com as provas em branco (em torno de 1 ml de soda 0,1N) e por isso acreditamos ter havido engano na construção do gráfico e da tabela.

No caso de se trabalhar com material rico em amido, os extratos fotolizados apresentam ação estimulante. SCOTT, RANDALL e HASSEL propuseram neste caso hidrolisar o amido pela takadiastase (9). O material diluído em HCl 0,1N (5 vezes o volume) é primeiramente autoclavado a 110°C, 15 minutos e depois da temperatura ficar em 50°C o pH é acertado para 4 e a takadiastase é adicionada. Deixam-se 12 horas a 50°C e depois inativa-se a enzima pela fervura, ajusta-se o pH para 6.6-6.8 e dilui-se o material com água. Usa-se uma parte alíquota para os ensaios.

Dosagem no sangue e na urina

STRONG, FEENEY, MOORE e PARSONS encontraram para o sangue total humano a média, pelo método microbiológico, de 0,49 microg/1 ml, para o de vitelo 0,44, de rato 0,45, de cão 0,97 e de porco 0,95 (10). Frazer e colaboradores referem para o sangue total de rato 0,22 a 0,63 microg para 1 ml. A verificação de Eckardt, Györgyi e Johnson de que o sangue total contém substâncias estimulantes para o crescimento do "*Lactobacillus casei*" veio mostrar que os dados até então referidos são mais elevados do que os reais (11).

Assim a adição de riboflavina ao sangue fotolizado determina maior crescimento do que a riboflavina pura. Mais recentemente, STRONG e colaboradores verificaram que as substâncias estimulantes do sangue podem ser extraídas pelo éter, álcool ou éter de petróleo nos pH de 1,5 a 10. Os filtrados alcoólicos de sangue contêm estas substâncias (9). O sangue depois de extraído pode ser usado nos ensaios microbiológicos.

Em trabalho recente, um de nós (12) encontrou no plasma de certas cobras brasileiras quantidades apreciáveis de riboflavina, identificada química e microbiologicamente. Foi obtida uma curva com as diluições do extrato desproteínizado do plasma que seguiu paralelamente à curva padrão. Os extratos foram preparados com o plasma livre de proteínas e tratados pelo éter de petróleo. Os valores obtidos variaram de 1,8 a 3,0 microg para 1 ml de plasma. Deve-se notar que os dados indicados pelos diversos autores para o sangue dos mamíferos referem-se ao sangue total e não ao plasma.

A urina também pode ser dosada pela técnica microbiológica. Os ensaios fazem-se com a urina ácida diluída com solução acética. Os valores para a urina oscilam de 500 a 800 microg por dia para o indivíduo em dieta normal. Pela dosagem fluorométrica obtêm-se em geral valores maiores, mas a precisão é menor.

ABSTRACT

*Studies on the microbiological assay of the vitamins of the
B. complex. I. Riboflavin*

The microbiological assay for riboflavin was employed for the determination in liver, yeast and plasma extracts. Snell and Strong's method was used and slight modifications were introduced for the preparation of the basal medium. Accurate results were obtained and the practical value of the method is discussed.

BIBLIOGRAFIA

1. — VILLELA (G. G.)
1938. Sobre a dosagem da vitamina B₁ (aneurina) pela técnica de Schopfer. O Hospital, 13, 43.
2. — VILLELA (G. G.)
1944. Dosagem microbiológica das vitaminas. O Hospital, 26, 187.
3. — WILLIAMS (R. J.) e colaboradores.
1941. Studies on the vitamin content of tissues. The University of Texas Publication N.º 4.137.

4. — SNELL (E. E.) e STRONG (F. M.)
1939. Microbiological assay for riboflavin. *Indust. Eng. Chem. (Anal. Ed.)* 11, 346.
 5. — 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.
 6. — CARPENTER (L. E.) e STRONG (F. M.)
1944. Determination of pyridoxin and pseudopyridoxin. *Arch. Bioch.* 3, 375.
 7. — CAMPBELL (T. E.) e HUCKER (G. J.)
1944. Riboflavin requirements of certain lactic acid bacteria. *Food Research*, 9, 197.
 8. — CHAVES (J. M.) e RIBEIRO (O.)
1943. Dosagem da riboflavina em alimentos. *An. Assoc. Quim. Brasil*, 2, 91.
 9. — SCOTT (M. L.) RANDALL (F. E.) e HESSEL (F. H.)
1941. A modification of the Snell and Strong microbiological method for determining riboflavin. *Jour. Biol. Chem.* 141, 325.
 10. — STRONG (E. M.) FEENEY (R. E.) MOORE (B.) e PARSONS (H. T.)
1941. The riboflavin content of blood and urine. *Jour. Biol. Chem.* 137, 363.
 11. — ECKARDT (R. E.) GYÖRGYI (P) e JOHNSON (L. V.)
1941. Presence of a factor in blood which enhances bacterial growth activity of riboflavin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 46, 405.
 12. — VILLELA (G. G.)
1945. Identificação microbiológica da flavina do plasma de algumas cobras. *Rev. Bras.*, 5, 113-115.
-