

# Estudos sobre a determinação da vitamina B<sub>1</sub> (aneurina, tiamina) na herba mate \*

por

Gilberto G. Villela

(Com 6 graficos no texto e 3 estampas)

A infusão de mate (chá do Paraguay, herba mate, yerba mate) obtém-se pela extração aquosa a quente das folhas da planta « *Ilex paraguayensis* » St. Hil. As propriedades fisiológicas desta bebida têm sido pouco investigadas. Os estudos iniciais se fizeram de modo bastante empírico, tendo-se atribuído ao mate efeitos vagos e indeterminados sobre o metabolismo e a digestão gástrica. Lesage verificou que a infusão de mate atua sobre a atividade muscular e modifica a acidez gástrica. Esses resultados devem ser atribuídos em parte à presença de cafeína na infusão do mate.

O estudo das enzimas oxidantes e a ação sobre o metabolismo glicídico do extrato de mate, foi feito por Otero (23) (24) (25). A questão da presença de vitamina C na herba mate ainda é discutida. Escudero e colaboradores (5) encontraram, pela titulação com o corante di-clorofenol indofenol, quantidades apreciáveis de ácido ascórbico nas folhas e na infusão do mate, ao passo que Mendive não conseguiu sequer isolar a vitamina sob a forma de vitamosazona, acreditando que se esta vitamina existe deve ser em quantidade muito pequena (20). Em experiências a serem publicadas proximamente, não nos foi possível obter respostas positivas em cobaios tornados escorbúticos, nem tampouco impedir o aparecimento da avitaminose nesses animais, quer com o extrato quer com a própria folha. Gatti Menéndez e Knallinsky (20) também não conseguiram modificar a evolução do escorbuto humano, que grassou no exército paraguaio, com a ingestão de doses elevadas da infusão do mate. No cobaio também não obtiveram qualquer ação protetora contra a avitaminose C. Deulofeu, do Instituto Bacteriológico de Buenos Aires, nos comunicou recentemente, que também não conseguira resultados positivos com a herba mate no que respeita o teor em ácido ascórbico.

---

\* Recebido para publicação a 14 de Novembro de 1938 e dado á publicidade em Julho de 1939.

O valor alimentar da herva mate suscitou até agora numero pequeno de trabalhos. Otero, na Argentina, procurou verificar se o infuso de mate continha vitaminas. Para a vitamina A empregou a tecnica do crescimento do rato e para as vitaminas do grupo B, instituiu pesquisas em ratos e pombos como tambem ensaiou a tecnica do desenvolvimento do levedo de Williams e do consumo de glicose de Damianovich e Catan (22). Concluiu Otero que o mate contém vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e A, entretanto não foi feita nenhuma determinação quantitativa. Os tests feitos com o pombo forneceram resultados pouco demonstrativos; nem a dieta nem a sintomatologia foram tampouco referidas. O criterio citado da hiperglicemia tambem não serve como indice da avitaminose. A ação sobre o crescimento do levedo é igualmente destituída de valor porquanto é inespecifica. Todavia, os resultados obtidos nos animais fazem entrever a presença de vitamina B na herva mate.

Em 1934, M. Saraiva (30) publicou uma pequena nota sobre o mate, em revista não tecnica, em que incidentemente cita algumas experiencias por ele executadas no Instituto de Quimica sobre a presença de vitamina B<sub>1</sub> na infusão do mate. Refere este autor que 40 cc. da infusão a 12,5 grs. %, em substituição á agua potavel, por dia, evita a avitaminose dos pombos alimentados exclusivamente com arroz descorticado. Concluiu que a herva mate contém vitamina antineuritica suficiente para prevenir a polinevrite quando ministrada liberalmente. Devemos lembrar que não foi feita nenhuma dosagem quantitativa.

Dado o numero pequeno de observações e a falta de determinações quantitativas nos propuzemos a verificar se de fato a herva mate encerra vitamina B<sub>1</sub> e em que quantidade. Os trabalhos anteriores não esclarecem se a vitamina encontrada é realmente a antineuritica ou o conjunto dos fatores do grupo B.

#### TÉCNICAS EMPREGADAS

Os ensaios em animais sendo sujeitos a varias causas de erro quando a percentagem de vitamina é muito pequena, procuramos comprova-los por meio de outros processos hoje bastante empregados e que permitem dosar a vitamina com material menos abundante e com maior rapidez. O presente trabalho só se refere á vitamina B<sub>1</sub> que recebeu as denominações de aneurina por Jansen e de tiamina por Williams.

Os tests empregados foram os seguintes:

- a) tests do pombo e do camondongo (Peters, Cowgill);
- b) test vegetal (Schopfer e Jung);
- c) test da fluorescencia do tiocromo (Jansen).

Os tests animais no pombo e no camundongo forneceram resultados pouco satisfatórios, mas permitiram evidenciar a presença qualitativa da aneurina.

#### ENSAIO COM O POMBO.

Adotou-se primeiro o criterio curativo (Peters), depois o preventivo e por fim o da manutenção do peso (Carter (2), Cowgill (4)). Os animais para as primeiras experiencias foram pesados e mantidos inicialmente com a alimentação de arroz descorticado, polido e lavado. A lavagem e secagem são indispensaveis para retirar qualquer quantidade de aneurina presente no pó que fica aderente ao grão (Spruyt) (40). A alimentação com arroz deve ser durante 8 a 10 dias sómente, porque o arroz descorticado não é um alimento satisfatório para o equilibrio alimentar do pombo, não só no que diz respeito ás vitaminas A e D como também ás proteínas e sais minerais. Por esse motivo adotamos uma dieta mixta composta de arroz descorticado e lavado, caseina purificada, gordura de manteiga, mistura salina (Mc Collum 185). O todo é adicionado de agua, sêco na estufa e cortado em pequenos pedaços. O óleo de fígado de bacalhão foi ministrado por via oral em gotas emulsionadas com agua e introduzido com sonda. A vitamina C não foi adicionada porque o pombo é capaz de sintetiza-la (Simmonet, Sugiura e Benedict) (39). Em alguns casos empregamos o hidrolizado alcalino de carne (tendões, aponevroses). Este era misturado com maizena, sêco a 120° e triturado. Os animais se adaptam facilmente a essa dieta.

Cowgill (4) empregou, com bons resultados, os residuos da carne de vaca como fonte suplementar de proteínas.

O peso inicial dos pombos variou de 320 a 400 grs., os quais ficavam de 8 a 10 dias com a alimentação exclusiva de arroz descorticado passando em seguida á dieta com caseina acima descrita. Ao cabo de 12 a 15 dias apareciam os primeiros sintomas. Os fenomenos nervosos eram mais tardios, sobretudo quando a alimentação é forçada. O opistotono nem sempre aparece. Alguns morrem sem que se verifiquem sintomas agudos. A questão do aparecimento do opistotono parece depender da localização da lesão quimica do sistema nervoso, como muito bem fizeram vêr recentemente Galvão e Pereira (7).

A prova da cura foi instituida em 4 pombos que apresentaram sintomas tipicos. A injeção de 20 cc. do extrato aquoso a 10% não alterou a atitude nem o opistotono, mesmo a introdução por meio de sonda (40 cc. do infuso a 5 e 10%) não determinou nenhuma cura. Em um caso foi possível pela ministração de 10 grs. do adsorbato total correspondente a 20 grs. da herba mate obter melhora sensível com volta do apetite e desaparecimento do opistotono.

O desaparecimento do opistotono não indica a rigor que a substancia contém vitamina B<sub>1</sub>, desde que outras substancias podem igualmente gozar desta propriedade, assim a histamina (Peters). A cura espontanea também pode ser observada (Kon e Drummond) (14). Em boas condições experimentais o test curativo pode ser util (Kinnorsley, Peters e Reader) (2).

Fizeram-se outras experiencias com o fim de verificar o impedimento dos fenomenos polinevriticos (test preventivo) tanto com o emprego da infusão como do adsorbato. Sómente o adsorbato foi capaz de evitar o aparecimento

da avitaminose, com relativa manutenção do peso, em 3 pombos dos 6 estudados.

A manutenção do peso foi possível quando pela adição da herba pura á maizena sêca na estufa e triturada em seguida. A quantidade diaria de herba foi de 30 grs. O peso se manteve durante 6 a 7 dias. Houve depois quêda de peso.

Os pombos mais pesados são os que se prestaram mais ao ensaio.

A terra de infusorio conhecida como reagente de Lloyd tem grande poder de adsorção pela aneurina, como já foi demonstrado varias vezes (Salmon, Guerrant e Hay, Levene e van der Hoeven) (28) (29) (16). Utilizamos tambem com bons resultados o kaolim lavado e sêco.

A ministração da infusão do mate só pode ser feita por meio de sonda fina introduzida no papo. O volume de liquido não deve ultrapassar 15 cc., senão o animal regorgita todo o conteúdo estomacal. A substituição da agua potavel pela infusão não é recomendavel, porque o animal utiliza muito pouco liquido e cada vez menos.

As respostas pelo peso não foram muito satisfatorias. O grafico 1 (p. 241) apresenta os ensaios com a infusão aquosa a 5 e 10% e com o adsorbato total equivalente a 25 grs. da folha original.

O ensaio com o camondongo tambem não foi muito demonstrativo, excepto quando se utilizou o adsorbato. Foram escolhidos camondongos machos de 28 a 30 dias de idade e pesando 7 a 9 grs. Os animais em numero de 16 foram separados por grupos de 2 em gaiolas metalicas com fundo gradeado para evitar o acumulo de fezes e a coprofagia.

A dieta empregada foi a de Evans e Lepkovsky:

Caseina	20 partes
Sacarose	70 »
Mistura salina	4 »
Levedo autoclavado	10 »

A caseina usada foi a de Schuchardt (Görlitz) purificada 3 vezes. A caseina é primeiro agitada com solução acetica a 0,1% durante 2 dias e depois extraída com alcool. Adicionam-se 2 litros de alcool para 400 grs. Decanta-se, adiciona-se alcool absoluto, filtra-se no buchner e seca-se na estufa a 60°. A sacarose deve ser pura. A mistura salina é de Mc Collum-Davis N.º 185 e tem a seguinte composição.

Lactato de calcio	35,15 grs
Fosfato de calcio	14,60 »
Fosfato acido de potassio	25,78 »
Fosfato de sodio	9,38 »
Clorêto de sodio	4,67 »
Sulfato de magnesio	7,19 »
Citrato de ferro	3,19 »

O levedo é preparado como segue:

Seca-se 1 kilo a 60° que fornece perto de 360 grs. Usamos o fermento Fleishmann fresco em tijolos. Para cada 100 grs. do levedo seco, adicionam-se

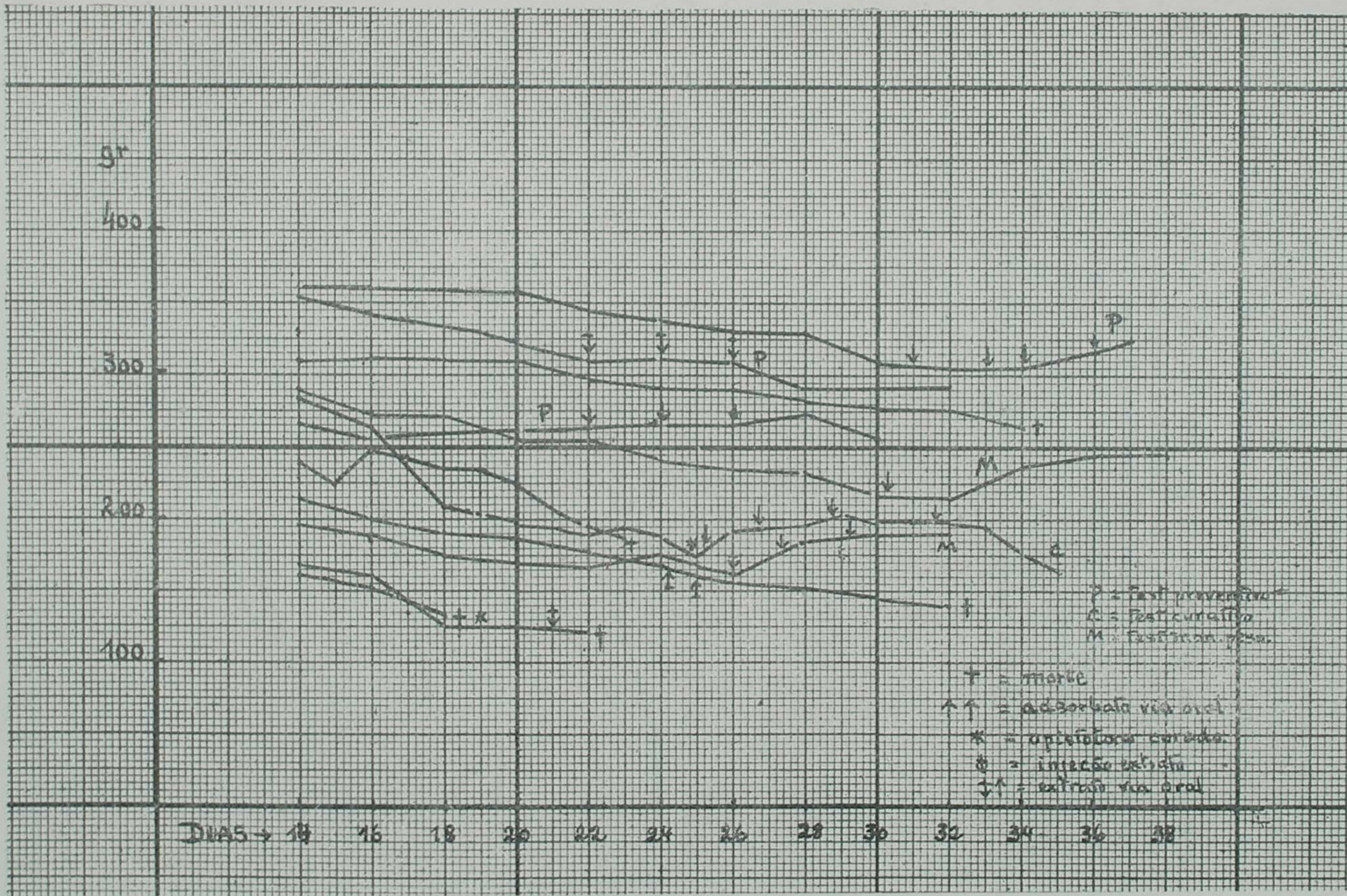


Grafico 1 — Test do pombo.

125 cc. de soda N/10 formando então uma pasta leitosa. Leva-se á autoclave durante 6 horas a 120°. Neutraliza-se com acido cloridrico 0,1 N. Seca-se na estufa e tritura-se. O pó é adicionado á dieta. Com esta dieta praticamente isenta de vitamina B<sub>1</sub> e contendo vitamina B<sub>2</sub> e os demais fatores, os animais crescem durante 1 semana até haver parada do peso. Principia-se então a dar a substancia a ensaiar. As testemunhas morreram 20 a 22 dias depois.

A ministração do adsorbato (1 gr. por dia) foi capaz de manter o peso durante 8 dias. A injeção de 1 cc. do liquido concentrado (eluição de 3 grs. de adsorbato) repartido em 3 porções determinou ligeiro aumento do peso. Perturbações da marcha e a polinevrite só foram obtidas em 4 animais. Para esses sintomas serem mais constantes é necessario que a dieta contenha aneurina em pequena quantidade ou que se injetem pequenas doses (0,5 unidade de dois em dois dias). O grafico abaixo mostra a resposta ao adsorbato.

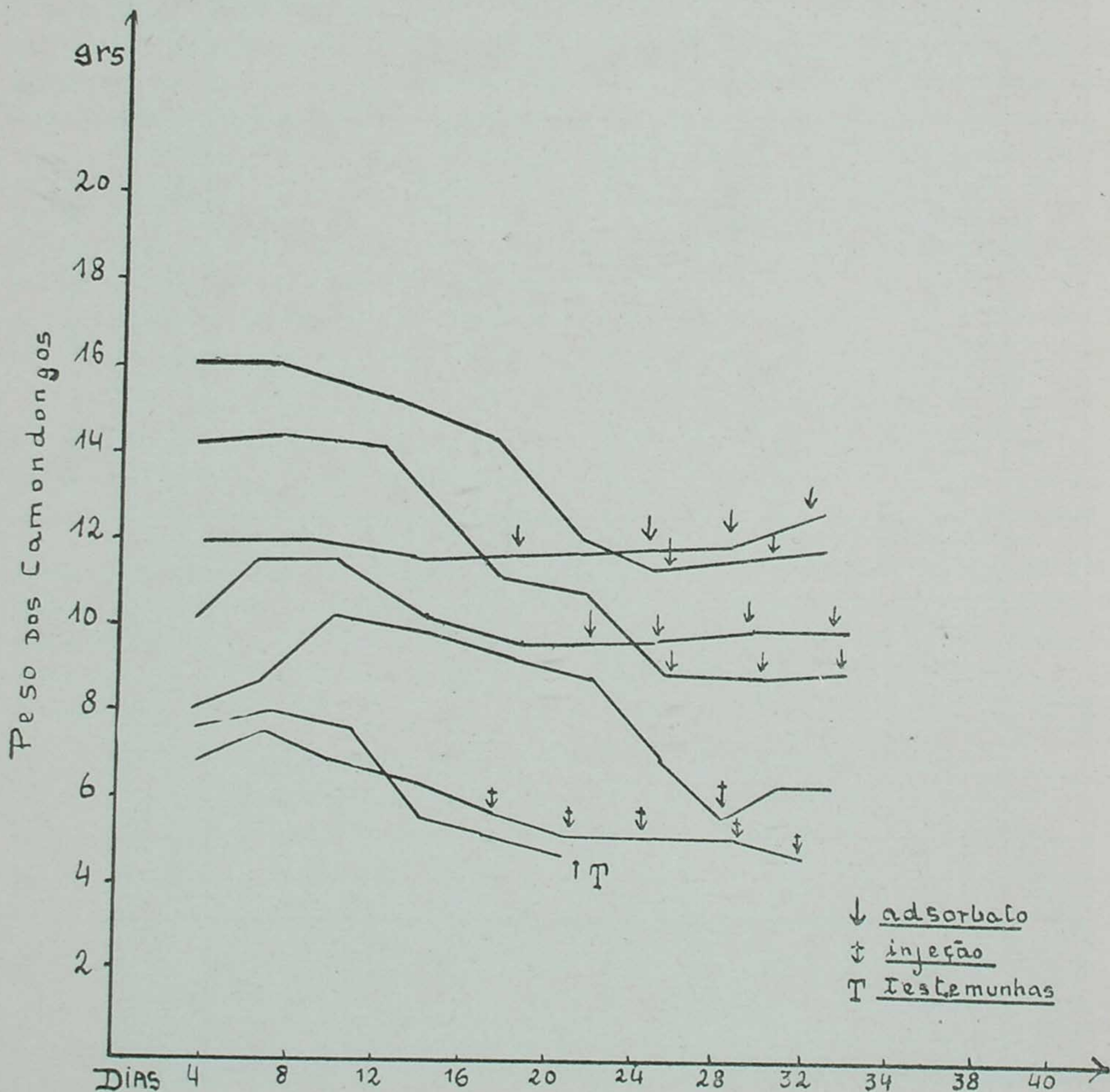


Gráfico 2 — Resposta á ingestão do adsorbato e á injeção do liquido de eluição em camundongos carenciados (avitaminose B).

Os ensaios feitos com os demais tests (Schopfer-Jung, Jansen) permitiram verificar que o adsorbato, correspondendo a 1 e 2 unidades internacionais de aneurina, fornece pelos tests do pombo e do camundongo respostas pouco uniformes e incertas. Os animais nem sempre reagem bem quando a quantidade de vitamina é muito pequena.

#### TEST VEGETAL DE SCHOPFER E JUNG.

Desde os trabalhos iniciais de R. J. Williams, de Funk e Dubin, de Eddy, de Bachman e de tantos outros, se procurou mostrar que os levedos necessitam de vitamina B para o seu desenvolvimento. Esse fato mereceu a atenção especial de Williams que propoz um test para a dosagem da vitamina B<sub>1</sub> baseado no crescimento do levedo. Funk e Dubin, Eddy e Stevenson, Fraenkel e Schwartz também indicaram várias técnicas fundamentadas na proliferação das células do levedo, avaliadas por gravimetria, por contagem de células ou pela produção de CO<sub>2</sub>. As inúmeras pesquisas sobre a natureza dos fatores de crescimento dos microorganismos vieram mostrar que o « bios » que atua com enorme intensidade no desenvolvimento do levedo não deve ser confundido com a vitamina B<sub>1</sub>. O « bios » é por si constituído de 2 ou mais fatores. A aneurina é um fator importante para o levedo, mas que pode em muitos casos ser sintetizada por ele. Portanto, os tests baseados no crescimento do levedo para a dosagem da aneurina deixam de ter valor dada a sua inconstância e inespecificidade (41).

Em 1930, Schopfer verificou que um cogumelo da família das Mucorineas, o « *Phycomyces blakesleeanus*, Bgf » tem a faculdade de só se desenvolver quando o meio encerra a aneurina. Quando este cogumelo é semeado em meio sintético não se dá nenhum ou quasi nenhum desenvolvimento. A adição de quantidades diminutas de aneurina (0,0005 y por 1 cc. do meio) já permitem o seu crescimento. A ação da vitamina é proporcional á quantidade adicionada. Quando é atingido um certo limite, uma nova adição é sem efeito e mesmo nociva (Schopfer). De 1931 a 1935, Schopfer e Jung, propuzeram um test para a dosagem da aneurina baseado na sensibilidade do « *Phycomyces* » ás pequenas doses dessa vitamina (31) (34).

As soluções puras contendo vitamina B fornecem curvas facilmente interpretaveis (33). Quando se tem que experimentar substancias complexas torna-se indispensavel fazer um tratamento prévio para isolar a vitamina. O ensaio com as soluções purificadas dá valores bastante constantes para que sejam utilizados com proveito nas dosagens quantitativas.

## PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS DO MATE.

Os extratos aquosos simples do mate foram por nós primeiramente ensaiados e se mostraram ativos sobre o desenvolvimento do « *Phycomyces* » em doses bastante pequenas (0,05 cc. para 20 cc. do meio. 0,0025 cc. para 1 cc. do extrato a 5%). O grafico abaixo mostra bem a proporcionalidade da sua ação.

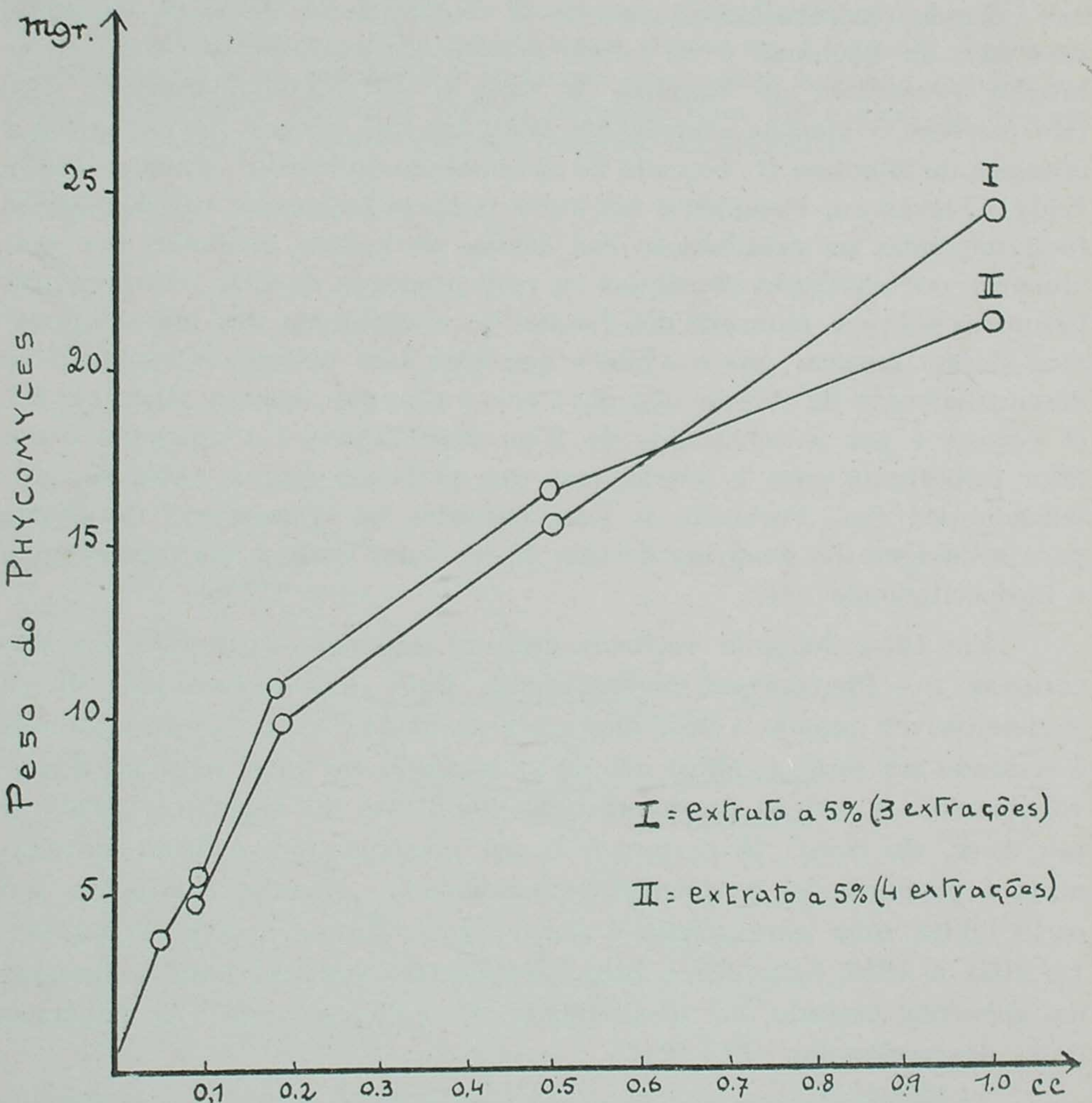


Gráfico 3 — Ação do extrato aquoso a 5 o/o sobre o desenvolvimento do «*Phycomyces*».

Entretanto, para uma determinação mais exata torna-se necessario purificar o extrato, eliminando as substancias que possam ter influencia sobre o crescimento do cogumelo.



A regularidade da curva acima (grafico III) mostra que a substancia ativadora existente no extrato não purificado age tal como a aneurina. A presença de azoto no extrato podia ser um fator perturbador desde que se sabe que a curva varia com a concentração do azoto do meio. Para verificar esse ponto, dosamos pelo Kjeldahl a quantidade existente de azoto para 1 cc. do extrato. A quantidade achada foi de 0,056 mg., que diluida em 20 cc. do meio fica na concentração de 0,00028 mg. para 0,1 cc. do extrato e 0,0028 mg. se fôr adicionado 1 cc., portanto não influe sobre a concentração total em azoto do meio.

A existencia de cafeina no mate nos sugeriu que esta substancia poderia atuar sobre o desenvolvimento do cogumelo. Os resultados obtidos foram os seguintes:

Quadro 1

Cafeina [solução 0,2 o/o]		Quantidade adicionada	Peso do "Phycomyces"
1 cc.	equivalente a	2 mg. cafeina	23,3 mg.
0,5 cc.	« a	1 mg.	26,4 mg.
0,1 cc.	« a	0,1 mg.	30,8 mg.
0,05 cc.	« a	0,05 mg.	25,3 mg.
Sem adição de cafeina		----	24,6 mg.

Balões de 150 cc. com 25 cc. do meio.

Todos os balões foram adicionados de 0,2  $\gamma$  de aneurina.

As pequenas diferenças, pouco significativas, devem-se provavelmente ao teor em azoto da cafeina. A cafeina contida em 100 cc. do extrato é de 2,5 mg., sendo que 1 cc. conterá sómente 0,5 mg. e 0,1 cc. 0,05 mg. que para o volume de 25 cc. do meio ficaria de 0,02 mg. para 1 cc. do meio. Nessa concentração como se vê no quadro acima a ação da cafeina do extrato é praticamente nula. Os valores referidos na literatura para o teor em cafeina das folhas variam de 0,52% (Stengel) até 0,89% (König) e 1,85% (Stenhouse e Stahl) (15) (48). Experimentamos também a influencia da acetilcolina e da adenina, que já têm sido encontradas no mate, sem que observassemos qualquer ação estimulante sobre o desenvolvimento do « Phycomyces ».

Quadro 2

Aneurina	Acetilcolina	Peso do cogumelo
0,2 $\gamma$	10 mg.	23,1 mg.
0,2 $\gamma$	5 mg.	26,0 mg.
Aneurina	Adenina	
0,2 $\gamma$	10 mg.	25,9 mg.
0,2 $\gamma$	5 mg.	21,8 mg.
Testemunhas (0,2 $\gamma$ de aneurina)		25,4 mg.
Sem aneurina e com adenina e acetilcolina		Ausencia de desenvolvimento

O extrato simples foi obtido da seguinte forma:

5 grs. de folhas são extraídas com 100 cc. de agua em ebulição contendo 1% de acido acetico (pH 3.8-4.0). A agua é adicionada por 3 porções de modo a extrair maior quantidade de material. Filtra-se e o filtrado é utilizado para os ensaios. A purificação foi feita pela adsorção da aneurina com terra de infusorio, kaolim e carvão (norita). Todos os tres adsorventes se mostraram ativos, bem que o kaolim e a terra de infusorio (Merck) tenham dado melhores resultados, com o pH de 4.0. Levene e van der Hoeven (1924) já haviam verificado que o reativo de Lloyd (terra de infusorio) adsorve seletivamente a vitamina B<sub>1</sub>. A vitamina B<sub>2</sub> só é adsorvida quando o pH é muito baixo (0,05 a 0,1) e a eluição muito mais difícil (Narayanan e Drummond) (16) (21).

O preparo do adsorbato foi feito da seguinte maneira. Pesaram-se 50 grs. das folhas e adicionaram-se 500 cc. de agua contendo 1% de acido acetico glacial. Deixou-se na geladeira durante 12 horas, agitando-se frequentemente. O liquido foi filtrado e adicionado de alcool a 95° acidulado com 0,5 cc. de acido sulfurico M/1. Adicionou-se em seguida 20 grs. de kaolim ou de terra de infusorio e deixou-se na geladeira durante 3 horas. Filtrou-se no Buchner e lavou-se o adsorbato com a solução acetica a 1% e alcool a 95°. O adsorbato depois de sêco na estufa a 100° foi então empregado nas experiencias em animais.

Para os ensaios com a tecnica de Schopfer preparamos preferentemente o adsorbato da seguinte fórmula: o extrato a 5% em solução aquosa contendo 1% de acido acetico é adicionado do adsorvente. Para cada 10 cc. de extrato empregamos 0,2 g. de kaolim puro lavado ou de frankonite ou terra de infusorio Merck. O maximo de adsorção é obtido quando o adsorvente fica 12 horas em contato com o extrato, na gela-

deira. Após esse tempo centrifuga-se e o adsorbato é lavado com solução acética a 1% e álcool a 95° e sêco na estufa a 100°.

A quantidade de 0,2 grs. é suficiente para a terra de infusorio como para o kaolim, bem que este seja mais ativo. O carvão (norite) não é aconselhavel para este test porque dificulta a separação do cogumelo.

Quadro 3

Quantidade do adsorvente em mgs.	Peso do "Phycomyces" em mgrs.		
	Carvão	Terra de infusorio	Kaolim
100	15	26	40
200	22	25	39
500	---	25	---

#### TECNICA DE DOSAGEM.

A tecnica de Schopfer-Jung consiste na semeadura do cogumelo em meio sintetico adicionado da substancia contendo a aneurina e a pesagem da cultura depois do desenvolvimento completo no 10.º dia.

#### MEIO DE CULTURA SINTETICO.

O meio sintetico usado foi o de Schopfer cuja composição é a seguinte:

Glicose	50 grs.
Asparagina	1 gr.
Fosfato acido de potassio	1,5 gr.
Sulfato de magnesio	0,5 gr.
Agua	1000 cc.

Foram usados balões de vidro neutro de 150 cc. e de 20 cc. arrolhados com algodão hidrófilo. O algodão bruto deve ser evitado porque contém um fator de crescimento (pirimidina) (Schopfer) (35). Em alguns casos tambem empregamos tubos de ensaio.

A substancia a ensaiar (extrato ou adsorbato) é adicionada ao meio sintetico. Os balões são levados ao autoclave onde permanecem a 110° durante 10 minutos exatos. Depois de frios são adicionados de 2 gotas da suspensão recente de esporos do « Phycomyces ». A cultura do « Phycomyces blakesleanus, Bgf, amostra sexuada, deve ser feita em meio sólido (agar e malt a 2%). Nós empregamos amostras que nos foram gentilmente enviadas pelo Prof. W. H. Schopfer do Instituto Botanico da Universidade de Bern.

## VOLUME DO MEIO.

O volume do meio empregado inicialmente por Schopfer e Jung foi de 25 cc. em balões de Erlenmeyer de 150 cc. de capacidade. A cultura também se desenvolve bem em tubos de ensaio, sendo neste caso o volume de liquido de 1 cc. ou 2 cc. e a concentração de asparagina de 2,5 gr. por litro. A tecnica da cultura em tubos foi por nós anteriormente utilizada (42) e recentemente proposta por Schopfer e Jung para a dosagem de pequenas quantidades de aneurina (33).

## COMPOSIÇÃO EM ASPARAGINA.

A concentração em asparagina é muito importante para a obtenção

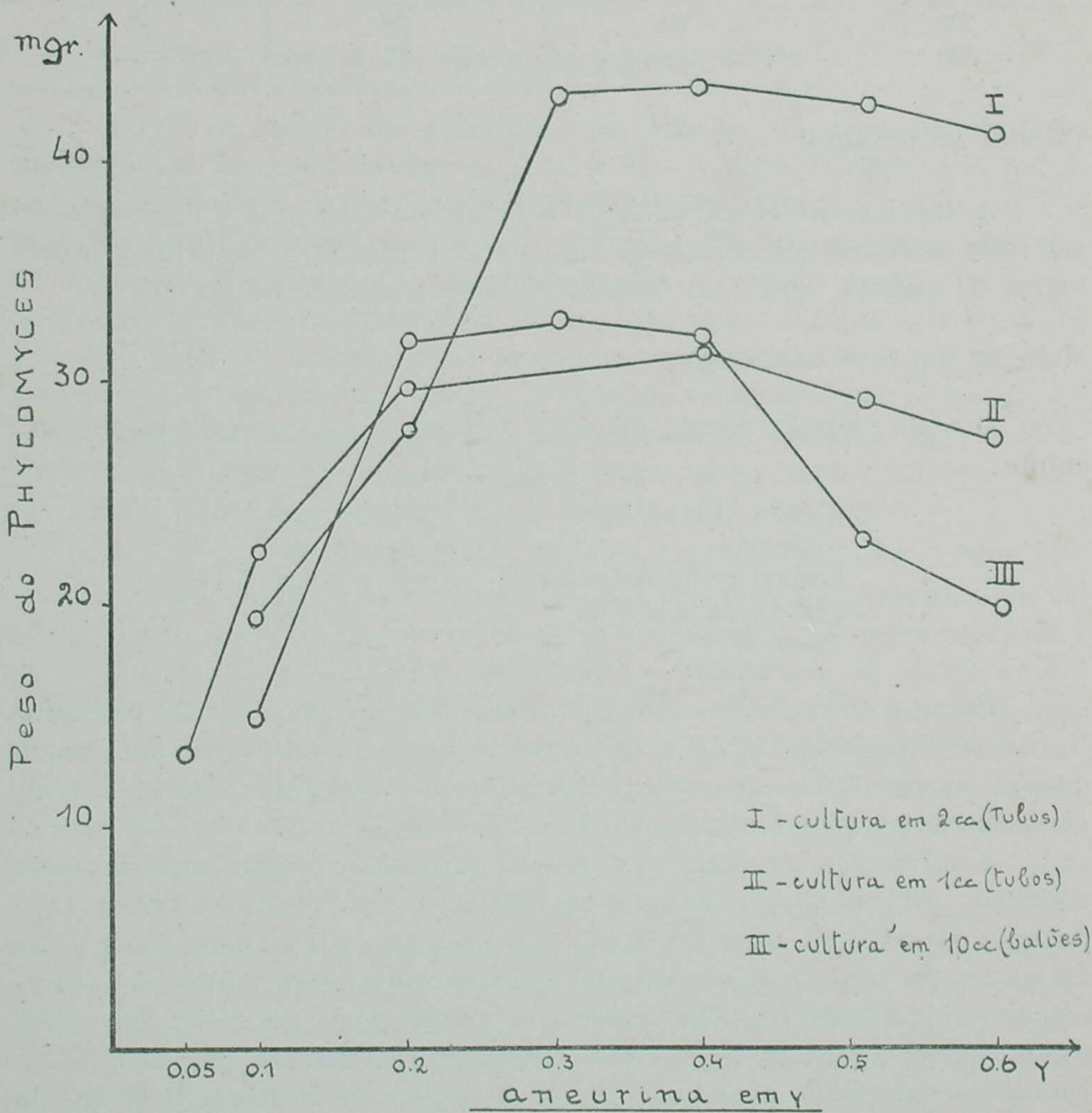


Gráfico 4 — Curvas de peso do "Phycomyces" em tubos e balões contendo volumes variáveis (1, 2 e 10 cc.) do meio sintético.

de curvas de peso homogêneas. Na fórmula de Schopfer a concentração é de 1 g. por litro e o volume do meio de 25 cc. Meiklejohn obteve resultados muito constantes com a asparagina a 2 g. por 1000, usando volumes pequenos do meio nutritivo (3 cc.). Sendo o peso da colheita proporcional ao teor em asparagina, é portanto indispensável que se façam dosagens sempre com o meio de composição e volume idênticos. O gráfico acima mostra diferentes curvas de peso por nós obtidas com volumes diversos do meio.

#### INOCULAÇÃO DO COGUMELO.

A emulsão de esporos é preparada no mesmo dia da sementeira, partindo de uma cultura em meio sólido bem desenvolvida (7 a 8 dias). Costumamos adicionar 10 a 15 cc. do meio nutritivo ao tubo contendo a cultura e agitar bem até que a emulsão fique turva. Aspira-se com pipeta Pasteur e deixa-se cair 2 gotas em cada balão. Agita-se no mesmo dia e nos 2 dias seguintes para que a emulsão se distribua bem nos balões. A quantidade de esporos inoculados não tem grande importância; as culturas fornecem finalmente o mesmo peso tanto com emulsões de 300.000 como de 1 milhão de esporos por mm<sup>3</sup> (Schopfer). A quantidade de aneurina que a emulsão pode acarretar por si só é insuficiente para influir no desenvolvimento do cogumelo no meio sintético. Às vezes aparece uma pequena turvação devido a esse fato mas cuja cultura final não fornece um peso superior a 10 mg.

#### SEPARAÇÃO DOS MICÉLIOS.

Ao cabo de 10 dias a cultura atingiu o crescimento máximo, sendo então retirados os micélios facilmente para a secagem e pesagem. Introduce-se um bastão, desprega-se a massa micelar compacta que logo lhe fica aderente. Lava-se a cultura em água destilada e seca-se na estufa a 100° durante 1 hora. Pesa-se com balança analítica. Quando o desenvolvimento é mínimo, como no caso da presença de traços de aneurina, a cultura fica submersa, sem formação de hifas aéreas e esporângios.

#### PREPARO DO PADRÃO.

Ao mesmo tempo que se preparam os balões com o material a analisar, prepara-se também uma série de balões de igual capacidade e com o mesmo volume do meio, e adiciona-se a vitamina padrão de kaolim ou de terra de infusório, em que 10 mg. representam uma unidade

internacional. O adsorbato padrão é fornecido pelo National Institute for Medical Research de Hampstead, Inglaterra, oficialmente adotado pela Liga das Nações (3).

Uma unidade internacional equivale aproximadamente a 2 gamas de aneurina pura cristalizada. O peso de aneurina para produzir, nas condições experimentais acima, 1 mg. sêco de cogumelo, representa o que Schopfer denominou de unidade-Phycomyces ou seja de 0,005  $\gamma$ <sup>1</sup> (33).

O « Phycomyces » se desenvolve produzindo o mesmo peso da cultura com qualquer das preparações puras de aneurina em doses equivalentes (31). A aneurina cristalizada ou melhor os preparados comerciais contendo doses conhecidas dessa vitamina, podem também ser empregados dando resultados perfeitamente comparáveis entre si (Villela) (42).

A comparação entre a curva de peso fornecida pelo padrão internacional ou pela aneurina cristalizada e a curva de peso produzida pela substância a ensaiar, permite estabelecer uma dosagem bastante precisa, desde que se tenha verificado, por ensaio prévio, qual a diluição conveniente. Se a quantidade de vitamina é excessiva, o resultado é falseado e os valores obtidos não mais exprimem a quantidade existente. O papel da aneurina sendo a de um catalizador na utilização do nitrogenio do meio (asparagina) é claro que existe uma dose maxima além da qual a adição suplementar de vitamina não pode mais alterar o desenvolvimento do cogumelo.

Para a dosagem em peso, fazem-se diluições crescentes de modo a obter uma curva em que se tomam os seus valores maximos. Além desse ponto ha ligeira quéda que se deve ao excesso de vitamina.

#### ESPECIFICIDADE.

Os primeiros trabalhos de Schopfer faziam crêr que o « Phycomyces » não se desenvolvia senão quando a aneurina era adicionada ao meio de cultura sintético. Mais tarde, porém, este autor observou que a destruição da aneurina pelo superaquecimento em meio alcalino não fazia perder a sua atividade sobre o cogumelo. Este fato foi posteriormente esclarecido quando foram empregados os produtos de desintegração da aneurina (tiazol e pirimidina). Nem a pirimidina (4-metil-4-amino-5-amino-metil-pirimidina) nem o tiazol (4-metil-5-(beta-oxietil)-tiazol) isolados são capazes de atuar como fatores de crescimento, mas quando adicionados conjuntamente eles se tornam ativos para o « Phycomyces ». Isso significa que o cogumelo é capaz de sintetizar a aneurina quando os

<sup>1</sup>  $1 \gamma = 1 \text{ gama} = 1 \text{ micrograma} = 0,001 \text{ mgr.}$

componentes da aneurina se acham presentes. Á primeira vista, parece que o test perde a especificidade; de fato, deixa de existir completa especificidade, mas a adsorção com o kaolim ou a terra de infusorio no pH de 4,0 só se dá para a aneurina, nem o tiazol nem a pirimidina são adsorvidas, logo o valor do test persiste. Para a dosagem de produtos vitaminicos tem-se verificado perfeita concordancia entre este test vegetal e o test do pombo (Faguet) (6).

Outros microorganismos têm sido propostos como test para a evidenciação e dosagem da aneurina. O tripanosomideo « *Strigomonas oncopelti* » só se desenvolve quando a aneurina está presente (M. Lwoff) (17). Com as diluições da aneurina de  $1 \times 10^{-8}$  a  $1 \times 10^{-9}$  já aparecem culturas (18). A pirimidina e o tiazol não substituem a aneurina, nem isolados nem adicionados conjuntamente. A ação da aneurina é para esse protozoario muito mais especifica do que para o « *Phycomyces* ».

Desde que a vitamina é um fator indispensavel para muitos microorganismos (bacterias) (Knight) (11, 12, 13), (protozoarios) (Lwoff) (17, 18) e que as substancias pirimidinicas e tiazolicas não têm influencia, parece á primeira vista que estes microorganismos devam ser preferidos ao test de Schopfer-Jung como indicadores da presença de aneurina. Entretanto, a dificuldade em se obter uma cultura uniforme, além da impossibilidade de avaliar as variações quantitativas, tornam esses microorganismos improprios para um test de dosagem. A inoculação do meio com bacterias ou flagelados tem muita importancia, assim pequenas variações no numero de celulas inoculadas já fornece resultados discordantes, ao passo que o « *Phycomyces* » pode ser semeado por meio de emulsões de densidade diferente sem que o peso da colheita ofereça variações apreciaveis. Outra vantagem reside na medida do desenvolvimento da cultura que se torna muito dificil com os protozoarios e facil com um cogumelo de micelios aereos como é o « *Phycomyces* ». Nem o bios (inositol) nem o acido pantotenico de Williams têm ação sobre o « *Phycomyces* » (Schopfer, Meiklejohn) (32) (19).

## RESULTADOS.

A adsorção da aneurina existente no extrato aquoso do mate em pH 4.0, pela terra de infusorio ou pelo kaolim (pH 3.0), nos forneceu os resultados que passamos a relatar. As curvas de peso estabelecidas indicaram que 100 grs. de folhas contêm 60 a 280 y de aneurina. O test da fluorescencia tambem mostrou valores proximos a esses. Tanto o mate verde como o mate chamado « queimado » contêm aneurina em concen-

tração proxima. Com o emprego do adsorbato de kaolim em doses crescentes obtivemos curvas tipicas como exprime o grafico abaixo.

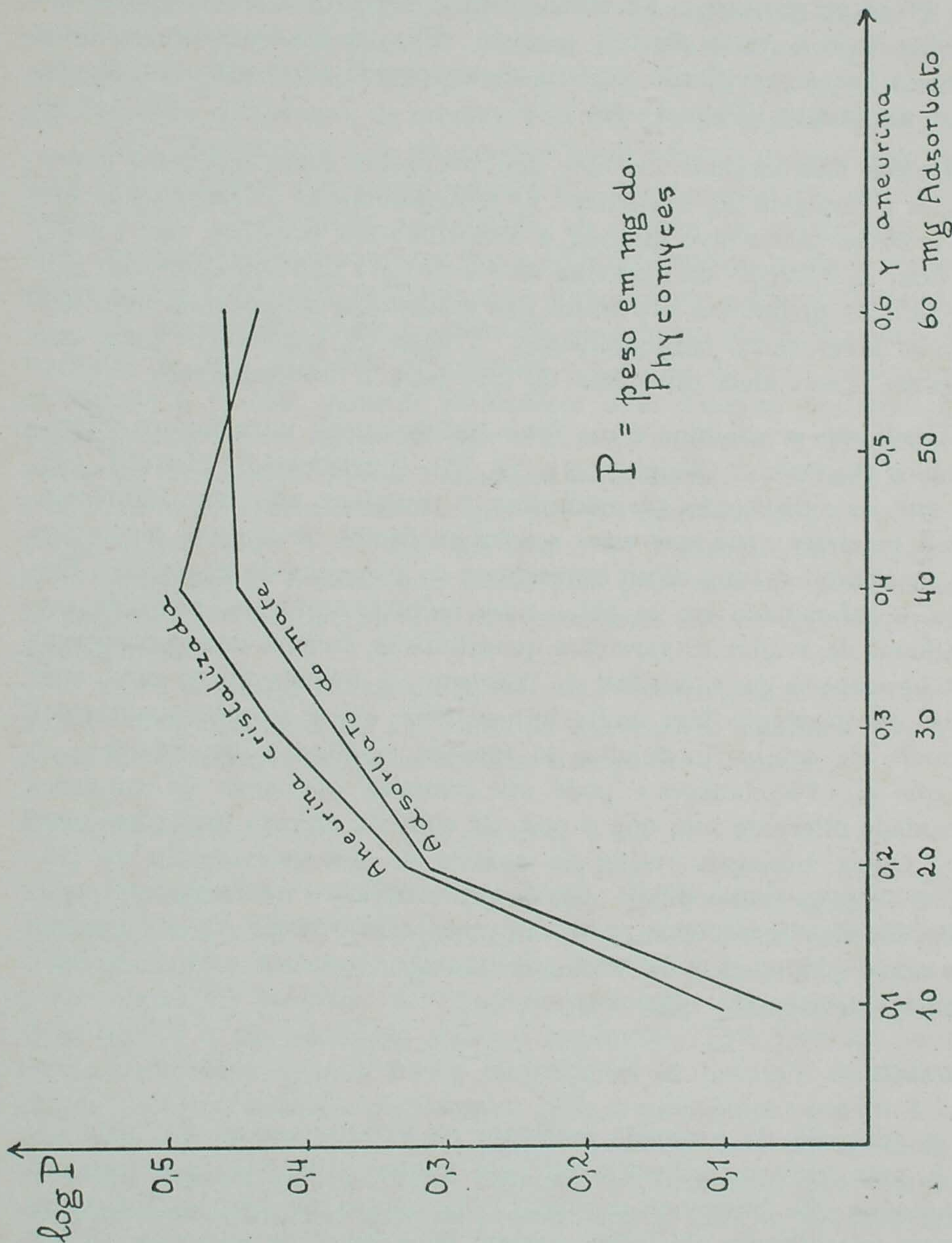


Gráfico 5 — Curva de peso do "Phycomyces" com quantidades crescentes do adsorbato de kaolim, em comparação com a curva de peso obtida com a aneurina cristalizada. Na linha das ordenadas figuram os log. de P (peso do cogumelo em mgrs).

A tecnica mais favoravel foi a do emprego de doses crescentes do adsorbato.



## ANALISE CROMATOGRÁFICA.

Usamos o dispositivo de Mohler e Hämmerle (51) que nos forneceu uma coluna com tres zonas distintas. A primeira zona de cima de 4 cm., a segunda do meio e a terceira de baixo com 8 cm. cada uma. A primeira zona é incolor, a segunda verde e castanho-esverdeado, e a terceira incolor. A aneurina acompanha o pigmento na zona média, sendo também encontrada na camada inferior. O volume de liquido foi de 10 cc. e o tubo de 24 cm. de comprimento e 0,7 cm. de diametro. O adsorvente empregado foi a terra de infusorio.

## DOSAGEM DA ANEURINA PELA REAÇÃO DO TIOCROMO (JANSEN).

Diversas reações coradas têm sido propostas para a identificação da vitamina B<sub>1</sub>. Umas se baseiam na diazo-reação e suas modificações (Kinnersley e Peters, Prebluda e McCollum, Willstaedt), outra na reação com o iodeto de bismuto e potassio (Naiman), outras nas reações com o 2-6-dibromoquinona-cloro-imida (Raybin) e com o p-dimetil-amino-benzaldehido (Tauber) e por fim na fluorescencia do tiocromo (Jansen) (1) (8) (9) (27).

Quasi todas essas reações só dão resultados satisfatorios com soluções puras de aneurina. A unica que tem provado bons resultados nas determinações da aneurina em produtos biologicos é a do tiocromo de Jansen.

Em 1936, B. C. P. Jansen (8) (9) publicou um método para a dosagem da aneurina tendo por base a fluorescencia produzida pelo tiocromo que se obtem depois de oxidar a vitamina. Esta tecnica foi em seguida aplicada á dosagem da aneurina nos liquidos biologicos (urina, sangue, liquor) (9) (45) (46) (49). Nós tivemos ensejo de aplicar esta tecnica á dosagem da aneurina do mate, obtendo valores concordantes com os encontrados para a tecnica de Schopfer (43) (47).

A tecnica por nós adotada foi a seguinte:

5 grs. de folhas de mate são extraidas a quente com 3 porções de agua destilada em ebulição num total de 100 cc., acidulada com acido acetico até o pH de 4.0. Filtra-se e tomam-se 10 cc. que se adicionam de 100 mg. de terra de infusorio (frankonite) ou melhor de kaolim puro lavado. Deixa-se na geladeira durante 1 hora, agitando-se frequentemente. Centrifuga-se e lava-se com uma solução de acido acetico a 1% e depois com etanol a 96°. O adsorbato é sêco na estufa a 100° e adicionado de 2 cc. de metanol e 1 cc. de soda a 30%. Agita-se e junta-se 0,8 cc. de ferricianeto de potassio a 1% e 12 cc. de isobutanol. Deixa-se em repouso

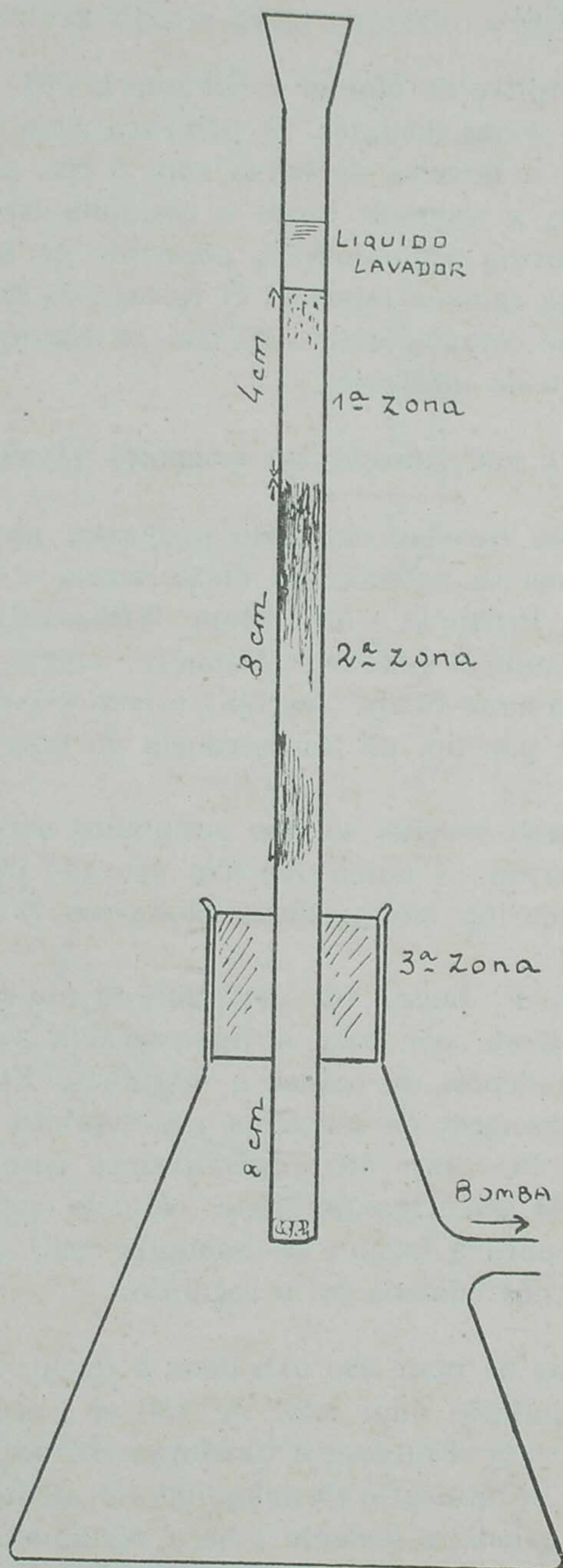


Fig. 1 — Coluna do adsorvente [terra de infusorio] com as diferentes camadas de cromatograma.

durante 1 hora ou centrifuga-se e retira-se a camada de isobutanol que acarreta o tiocromo, e submete-se á luz ultra-violeta em comparação com um padrão de aneurina tratado da mesma maneira. Usamos varios padrões contendo de 1 y a 5 y de aneurina sintetica (Benerva Roche). A intensidade da fluorescencia é medida tambem com mais precisão pelo fotometro Pulfrich de Zeiss adaptado a uma lampada de vapor de mercurio de Hanau. Neste caso mede-se a percentagem de luz transmitida ou absorvida e um unico padrão inicial é suficiente. As dosagens feitas com varias amostras de mate nos forneceram valores variaveis de 80 a 250 y para 100 grs. de folhas de mate sêcas. O mate verde contém em média quantidades superiores ás do mate sêco. Das amostras estudadas por nós, provenientes de varias fontes, sempre encontramos valores médios em torno de 100 y. O mate chamado queimado tambem contém aneurina em concentração próxima a esse valor.

#### ABSTRACT.

*Studies on the determination of vitamin B (aneurin, thiamin) in the « tea » of Paraguay (yerba mate).*

- 1) The infusion used as a beverage and known as tea of Paraguay or mate (*Ilex paraguarensis*, St. Hil.) contains vitamin B (aneurin).
- 2) Aneurin determinations were made on the infusion commonly used (water extract) and on the complete water and alcohol extracts. The presence of aneurin was detected in both extracts. For quantitative study aneurin was adsorbed from the extracts (pH 3.8-4.0) by means of fuller's earth and kaolin.
- 3) Animal tests with pigeons and mice (curative, preventive and maintenance of body weight) give positive but inconstant results. No exact quantitative values could be obtained with the animal test.
- 4) Schopfer-Jung test based on the development of the mould « *Phycomyces blakesleeanus*, Bgf » showed constant results. Regular growth curves were obtained with the adsorbate of kaolin and fuller's earth.
- 5) The thiochrome fluorescence test introduced by Jansen was applied to the detection of aneurin in the adsorbate and good

results were found which check closely with those encountered by the Schopfer-Jung test.

- 6) The determinations of aneurin by means of the *Phycomyces* and thiochrome tests gave values varying from 60 to 280  $\mu$ g per 100 gr.
- 7) Green leaves are more rich in aneurin than dry ones.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) BOMSKOV, CH.  
1935. *Methodik der Vitaminforschung* — Georg Thieme — Leipzig.
- 2) CARTER, C. W., KINNERSLEY, H. W. & PETERS, R. A.  
1930. Maintenance of nutrition in adult pigeon and its relation to torulin (vitamin B<sub>1</sub>). *Bioch. J.*, **24** : 1832.
- 3) COWARD, K. H.  
1938. *Biological Standardization of Vitamins*, W. Wood, Baltimore.
- 4) COWGILL, G. R.  
1935. *The vitamin B requirement of man*, Yale Univ. Press — New Haven: 22-39.
- 5) ESCUDERO, A., SAGASTUME, M., SENRA, R. & SANTORNO, J.  
1936. Sobre la presencia de ácido ascórbico (vitamina C) en la yerba mate (*Ilex paraguayensis*). *Semana Med.*, **43** : 1868.
- 6) FAGUET, M.  
1937. Titration de la vitamine B<sub>1</sub> par le test végétal. Étude comparative avec le test animal. *Compt. R. Soc. Biol.*, **126** : 856.
- 7) GALVÃO, P. E. & PEREIRA, J.  
1938. Sobre a oxidação do ácido láctico no encefalo de animais normais e em avitaminose B<sub>1</sub>. Localização da lesão química nos mamíferos e nas aves. *Arch. Inst. Biol.*, **9** : 25.
- 8) JANSEN, B. C. P.  
1938. Chemische methoden zur Bestimmung der Vitamine und ihre praktische Bedeutung — *Zeit. f. Vitaminforsch.*, **7** : 226.
- 9) JANSEN, B. C. P.  
1938. Quantitative Bestimmung von Aneurin (= Vitamin B<sub>1</sub>) *Zeit. f. Vitaminforsch.*, **7** : 239.
- 10) KARRER, W.  
1937. Zur Bestimmung von Vitamin B<sub>1</sub> im menschlichem Harn. *Helv. Chim. Acta*, **20** : 1147.
- 11) KNIGHT, B. C. V. G.  
1937. The nutrition of «*Staphylococcus Aureus*». The activities of nicotinamide, aneurin (vitamin B<sub>1</sub>) and related compounds. *Bioch. Jour.*, **31** : 731.

- 12) KNIGHT, B. C. V. G.  
1937. The nutrition of «Staphylococcus Aureus»; nicotinic acid and vitamin B<sub>1</sub>. Bioch. Jour., **31** : 731.
- 13) KNIGHT, B. C. V. G.  
1938. The specificity of aneurin and nicotinamide in the growth of «Staph. Aureus». Bioch. Jour., **32** : 1241.
- 14) KON, S. K. & DRUMMOND, V. C.  
1927. The physiological rôle of vitamin B. Bioch. J., **21** : 632.
- 15) KÖNIG, J.  
1920. Chemie der Nahrungs-und Genussmittel sowie der Gebrauchsgegenstände. Julius Springer, **2** : 560 e 851, **5** : 1920.
- 16) LEVENE, P. A. & VAN HOEVEN, B. J.  
1924. The concentration of vitamin B<sub>1</sub>. Jour. Biol. Chem., **61** : 429.
- 17) LWOFF, M.  
1938. L'aneurine facteur de croissance pour les «Strigomonas». C. R. Soc. Biol., **128** : 241.
- 18) LWOFF, A. & DUSI, H.  
1938. Culture de divers flagellés leucophytes en milieu synthétique. Compt. Rend. Soc. Biol., **127** : 53.
- 19) MEIKLEJOHN, A. P.  
1937. The estimation of vitamin B<sub>1</sub> in blood by a modification of Schopfer's test. Bioch. J., **31** : 1441.
- 20) MENDIVE, J. R.  
1938. Sobre la presencia de ácido ascórbico en la yerba mate del Comercio. Rev. Inst. Bact., **8** : 400.
- 21) NARAYANAN, B. T. & DRUMMOND, J. C.  
1930. The concentration of vitamin B<sub>2</sub>. Bioch. Jour., **24** : 19.
- 22) OTERO, M. J.  
1930. Las vitaminas en la «yerba mate». Arch. Soc. Biol., Montevideo. Suppl. Congr. Internac. Biol., **4** : 1026.
- 23) OTERO, M. J.  
1938. Contribución al estudio de la acción de infusiones de yerba mate (*Ilex paraguayensis*) sobre enzimas que actúan en los procesos de oxidación en el organismo animal. An. Inst. Mod. Clin. Med.
- 24) OTERO, M. J.  
1938. Contribución al estudio de la acción de infusiones de yerba mate en el metabolismo de los hidratos de carbono. An. Inst. Mod. Clin. Med.
- 25) OTERO, M. J.  
1938. Contribución al estudio de los fermentos oxidantes de las hojas del *Ilex paraguayensis* (Yerba mate) — Idem. Idem.

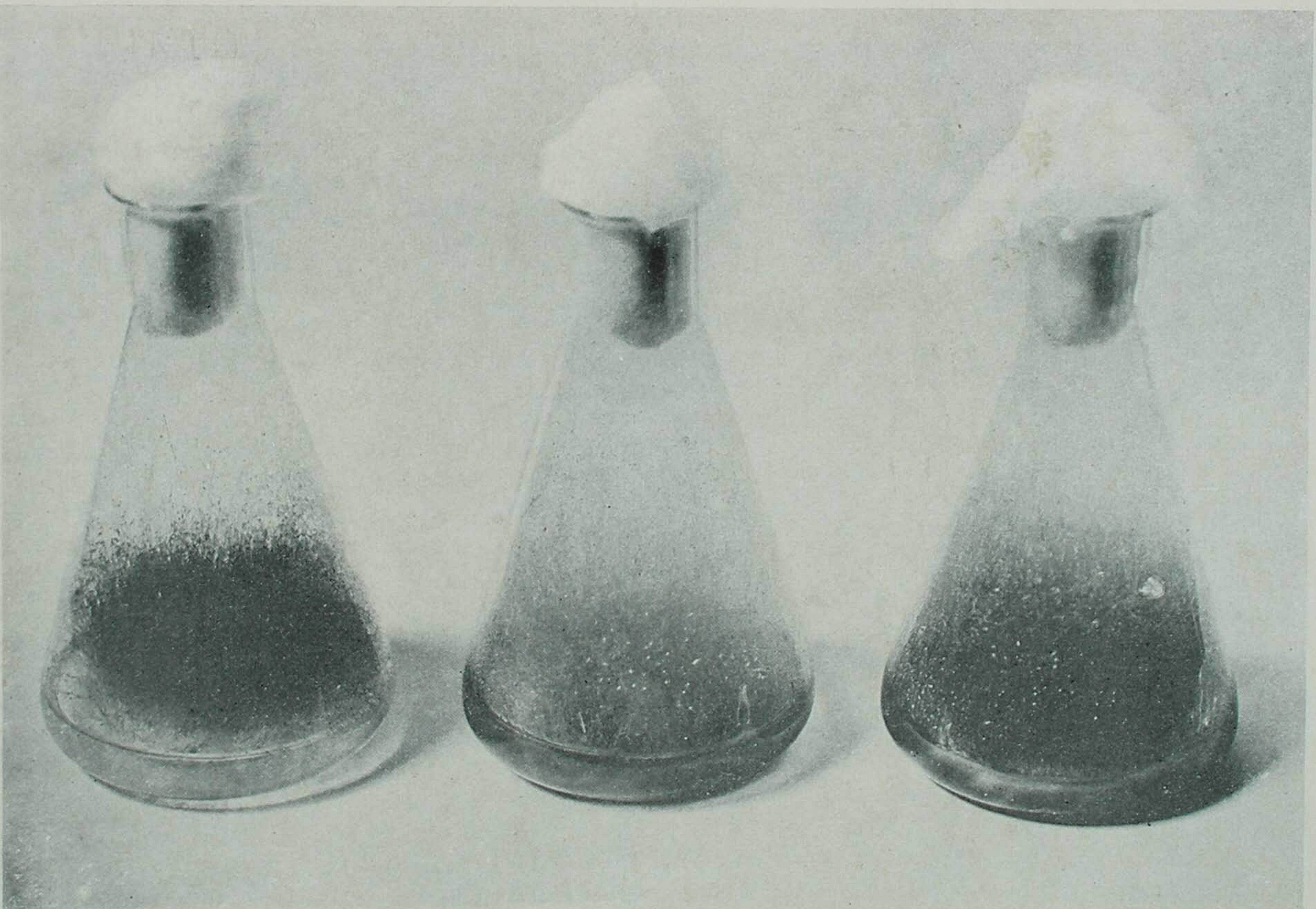
- 26) RANDOIN, L. & SIMMONET, H.  
1927. La question des vitamines. Presse Univ. de France.
- 27) RAYBIN, H. W.  
1938. A new color reaction of vitamin B<sub>1</sub> (Thiamin). Science, **88** : 35.
- 28) SALMON, W. D. & GUERRANT, N. B.  
1928. On the existence of two active factors in the vitamin B complex. J. B. Chem., **76** : 487.
- 29) SALMON, W. D., GUERRANT, N. B. & HAY, T.  
1928. The effect of Hydrogen ion concentration upon adsorption of the active factors of vitamin B complex by fuller's earth. J. B. Chem., **80** : 91.
- 30) SARAIVA, M.  
1934. Algumas considerações sobre o Mate. Bol. Mes. Camara Com. Arg. del Brasil, **1** : 5.
- 31) SCHOPFER, W. H.  
1936. Étude de l'action auxogène des extraits de tissus animaux normaux et pathologiques sur le développement de Phycomyces. C. R. Acad. Sc. Paris, **202** : 236.
- 32) SCHOPFER, W. H. & MOSES, W.  
1936. Recherches sur la concentration et la séparation des facteurs de croissance de microorganisme contenus dans le germe de blé. Protoplasma, **26** : 538.
- 33) SCHOPFER, W. H. & JUNG, A.  
1938. Étude des organes d'animaux et en avitaminose B<sub>1</sub> au moyen du test Phycomyces. Établissement d'une microméthode. Zeit. f. Vitaminforsch., **7** : 143.
- 34) SCHOPFER, W. H. & JUNG, A.  
1936. Recherches sur la mesure de l'activité vitaminique B<sub>1</sub> à l'aide d'un microorganisme (Phycomyces). Compt. Rend. Soc. Phys. Hist. Nat. Genève, **53** : 22.
- 35) SCHOPFER, W. H. & RYTZ JOR., W.  
1937. La ouate comme source de facteur de croissance de microorganisme. Arch. f. Microf., **8** : 244.
- 36) SEIDELL, A.  
1922. Improved method for the preparation of vitamin-activated fuller's earth. U. S. Pub. Health Repts., **37** : 801.
- 37) SHERMAN, H. C. & SMITH, S. L.  
1931. The Vitamins. Chem. Catalog Co. N. Y. : 24-110.
- 38) SHERMAN, H. C. & MC ARTHUR, E. H.  
1927. A quantitative study of the determination of vitamin B. Jour. Biol. Chem., **74** : 107.

- 39) SIMMONET, H.  
1933. Les vitamines B. Zeit. f. Vitaminforsch., **2** : 28.
- 40) SPRUYT, J. P.  
1934. Comparative determinations of the antineuritic vitamin content of rice, made by experiments on the rice bird and by the rat tests. Arch. Néerl. Physiol., **19** : 295.
- 41) TANNER, F. W.  
1924. The « Bios » Question. Chem. Rev., **1** : 397.
- 42) VILLELA, G. G.  
1938. Sobre a dosagem da vitamina B<sub>1</sub> (aneurina) pela technica de Schopfer. O Hospital, **13** : 43.
- 43) VILLELA, G. G.  
1938. Sur le dosage de l'aneurine (vitamin B<sub>1</sub>) du maté par la technique Schopfer-Jung. Compt. Rend. Soc. Biol., **129** : 987.
- 44) VILLELA, G. G.  
1938. Sur la présence d'un facteur de croissance (aneurine) dans l'infusion de thé constaté par le test de Schopfer-Jung. Compt. Rend. Soc. Biol., **129** : 997.
- 45) VILLELA, G. G.  
1938. Vitamin B<sub>1</sub> in cerebrospinal fluid. Science, **89** : 251.
- 46) VILLELA, G. G.  
1938. Sur l'emploi du test du Phycomyces pour le dosage de l'aneurine dans l'urine. Compt. Rend. Soc. Biol., **129** : 989.
- 47) VILLELA, G. G.  
1939. Dosagem de vitamina B<sub>1</sub> na herua mate. Acta Med., **3** : 75.
- 48) WEHMER, C.  
1931. Die Pflanzenstoffe. Fischer : 718.
- 49) WESTENBRINK, H. G. K. & GOUDSMIT, J.  
1937. En chemische methode voor de bepaling van het aneurine (= vitamine B<sub>1</sub>) in urine. Nederl Tijdsch. Geneesk., **81** : 2632.
- 50) WILLIAMS, R. J. & ROEHM, R. R.  
1930. The effect of antineuritic vitamin preparations on the growth of yeasts. Jour. Biol. Chem., **87** : 581.
- 51) ZECHMEISTER, L. & CHOLNOKY, L.  
1937. Die chromatographische Adsorptionsmethode. Julius Springer — Vienna.
-

### Estampa 1

Fig. 2 — Desenvolvimento do «Phycómyces» pela adição ao meio sintético de 200 mgr. do adsorbato de kaolim e 100 e 200 mgrs. do adsorbato de terra de infusorio.

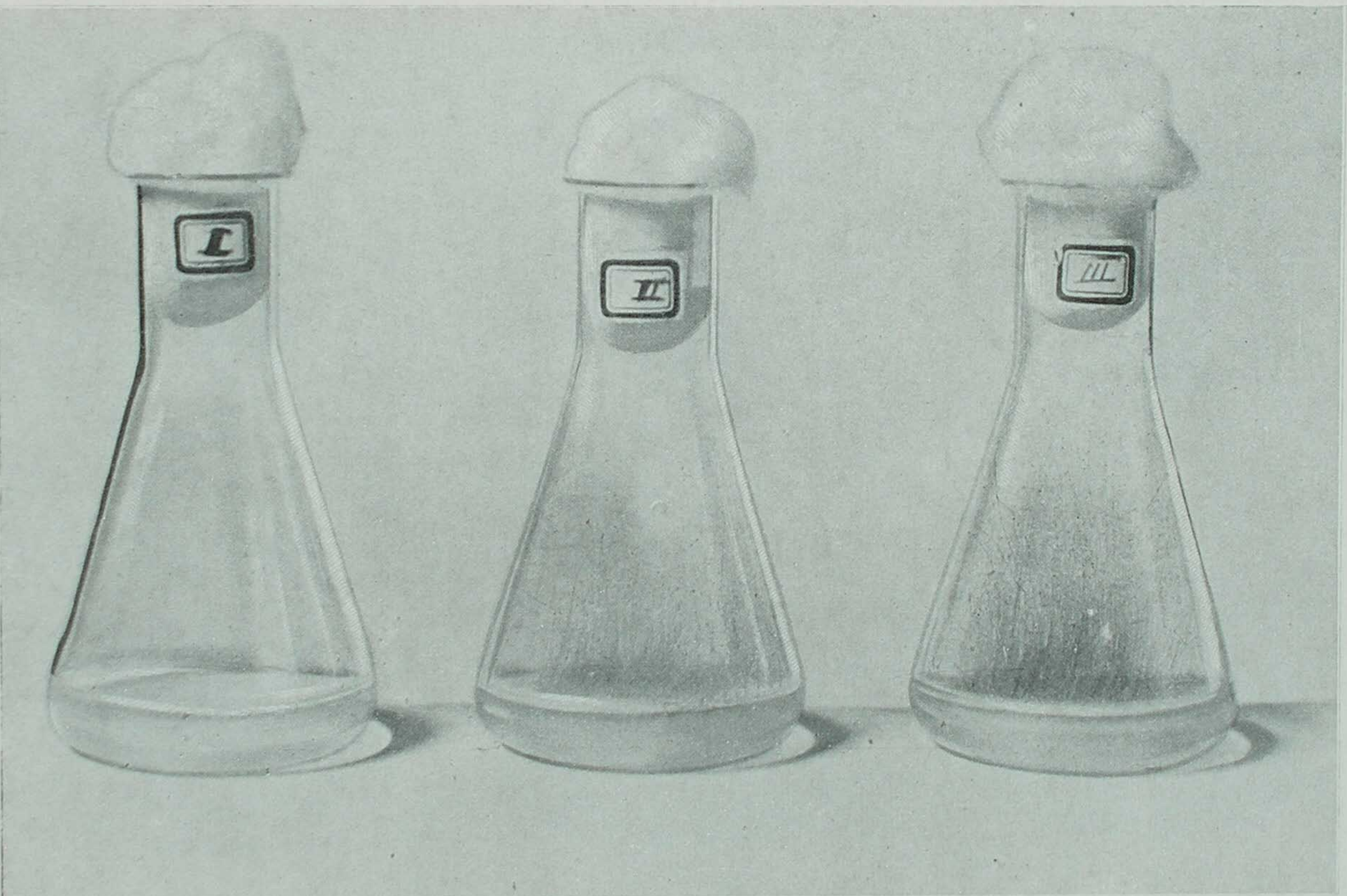




Villela : Vitamina B<sub>1</sub> na herva mate.

**Estampa 2**

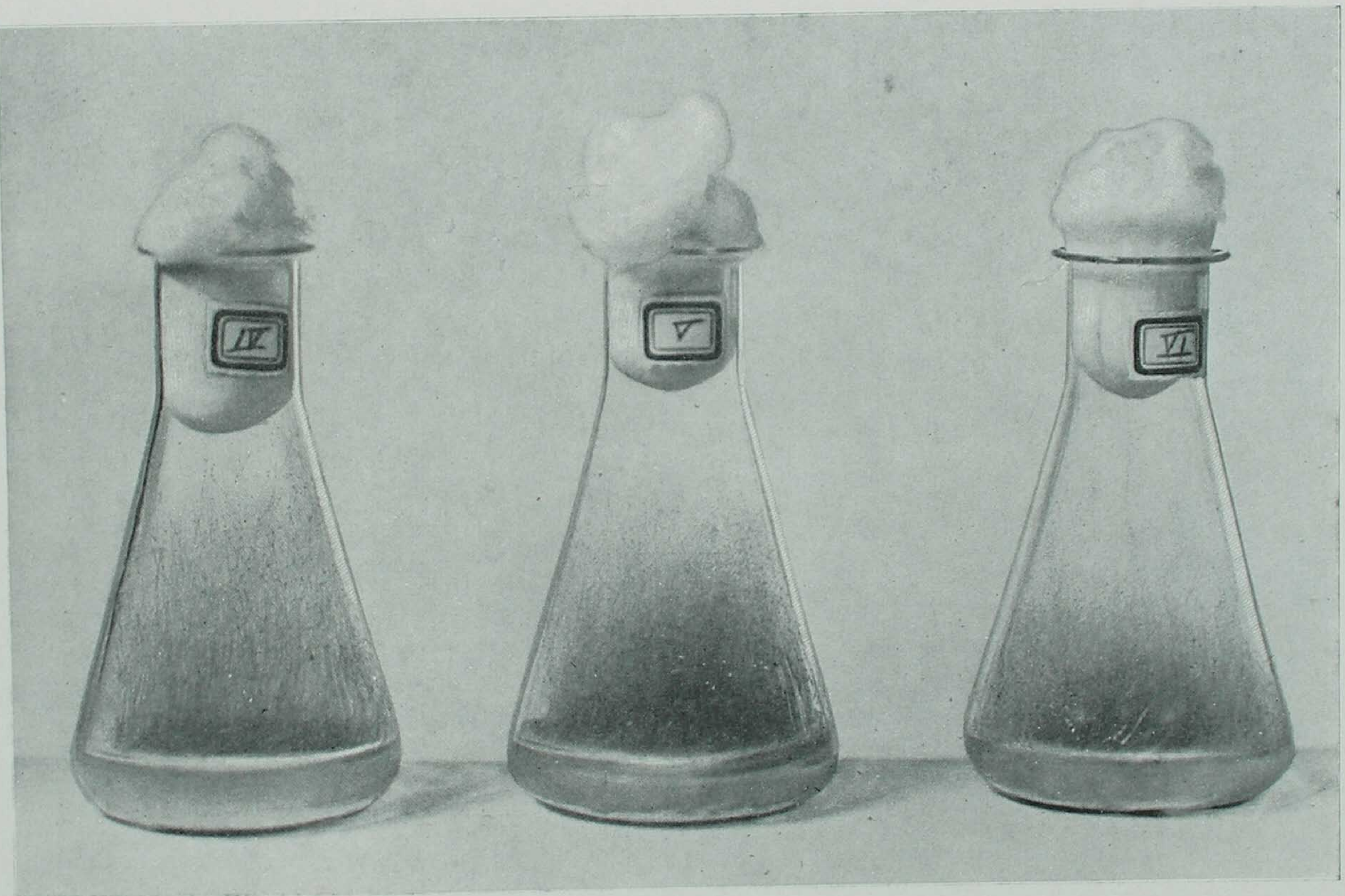
Fig. 3 — Balões com doses crescentes do adsorbato de kaolim.



Villela: Vitamina B<sub>1</sub> na herva mate.

**Estampa 3**

Fig. 3 — Balões com doses crescentes do adsorbato de kaolim.



Villela : Vitamina B<sub>1</sub> na herva mate.