

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DOIS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS PARA DOSAGEM DO ÁCIDO NICOTÍNICO *

COMPARATIVE STUDY BETWEEN TWO MICROBIOLOGICAL METHODS FOR DETERMINATION OF NICOTINIC ACID *

Kozué Kizawa **

e Elma N. Suassuna de Oliveira ***

Recebido em 14/9/73

Aprovado em 21/9/72

INTRODUÇÃO

A análise do ácido nicotínico em materiais os mais diversos vem sendo largamente explorada, considerando-se a importância metabólica da vitamina em relação às suas funções bioquímicas como constituinte de duas coenzimas vitais como são a Coenzima I (difosfopiridino nucleotídeo) e a Coenzima II (trifosfopiridinonucleotídeo).

A escolha de um método de análise para uma determinada vitamina, depende principalmente dos fins da análise, do grau de precisão requerido, do equipamento disponível e do tempo necessário para obtenção de resultados.

A pesquisa do ácido nicotínico foi inicialmente realizada empregando-se animais jovens com carência de vitamina provocada artificialmente. Como a maioria dos métodos biológicos empregados anteriormente, ofereceram poucas vantagens, exigindo um espaço de tempo muito longo para obtenção de resultados e, principalmente por-

* Extrato de tese de Mestrado, apresentado ao Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. Financiado pela CAPES/FORD.

** Auxiliar de Ensino do Departamento de Biofísica do Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

*** Professor Adjunto do Departamento de Microbiologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Paraná.

que estes resultados eram mais de natureza qualitativa do que quantitativa, logo caíram em desuso.

Comparando os métodos químicos e microbiológicos, os primeiros apresentam desvantagens, principalmente no que diz respeito às dificuldades surgidas durante os processos hidrolíticos, conforme revisão feita, discutida e analisada em detalhes por György & Rubin. (3)

A descoberta de que o ácido nicotínico poderia ser exigido por bactérias como fator de crescimento, data de 1937, quando Mueller (6) e Knight (7) trabalhando separadamente, concluíram quase que simultaneamente que o **Corynebacterium diphtheriae** e o **Staphylococcus aureus** requeriam ácido nicotínico para se desenvolver em meio de composição definida. Indiretamente esta foi uma importante descoberta no setor das dosagens microbiológicas, visto que, logo à seguir, começaram a surgir os primeiros métodos para a dosagem microbiológica do ácido nicotínico.

Empregando uma amostra de **Leuconostoc mesenteroides** que utiliza ácido nicotínico, mas não nicotinamida, Johnson (5) desenvolveu um método de dosagem para ácido nicotínico em presença de nicotinamida. Anteriormente, Berkman & Koser (2) já haviam introduzido o método para dosagem de nicotinamida em presença do ácido nicotínico, usando como organismo revelador uma amostra de **Pasteurella suiséptica**.

Entre 1938 e 1939, Snell et alii (13) e Snell & Strong (12) estudando as exigências nutritivas das bactérias do ácido láctico, deram os primeiros passos para a introdução do método de dosagem do ácido nicotínico mais largamente empregado atualmente. Este, preconiza o uso do **Lactobacillus plantarum** ATCC 8014 (**Lactobacillus arabinosus** 17/5) e tem como autores Snell & Wright. (14) Posteriormente o método foi revisado por Krell et alii (8) e modificado por Barton-Wright. (1)

Em 1946, surgiu mais um método microbiológico para dosagem do ácido nicotínico, o qual emprega como organismo revelador uma levedura **Torula cremoris** 2897 (**Candida pseudotropicalis**), sendo introduzido por Williams. (15) Por este método, pode-se determinar quantitativamente, não só o ácido nicotínico, mas também trigonelina e N-metil-nicotinamida, dependendo do tipo de hidrólise adotado na preparação dos extratos.

Trabalhos anteriormente realizados por Oliveira et alii (10) sobre a análise microbiológica do ácido nicotínico em variedades de cafés

brasileiros, despertaram nosso interesse para realização de um estudo comparativo entre os dois métodos: o de Barton-Wright (¹) e o de Williams (¹⁵) que recomendam o emprego do *Lactobacillus plantarum* e da *Torula cremoris*, respectivamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Material analisado: Como matéria prima para realização das dosagens foram usadas amostras de café, soja, lentilha, ervilha e trigo. Com exceção das amostras de café que foram fornecidas pelo Instituto Brasileiro do Café, as demais amostras foram obtidas em casas comerciais e usadas em seu estado natural sem serem submetidas a qualquer processo de torração ou cozimento.

Produtos químicos e reagentes: Os produtos químicos e reagentes utilizados foram da seguinte procedência: Difco Laboratories; Merck; Nutritional Biochemical Corporation Chemical Company; Mann Research Laboratories; Baker; Baltimore Biological Laboratories; Carlo Erba; Roche; Oxoid e Pfanstiehl Laboratories.

Aferição dos resultados: Tratando-se de dois métodos de leitura turbidimétrica, usou-se para aferição dos resultados o fotolorímetro Klett-Summerson com filtro verde (540 m μ), sendo os resultados referidos como Unidades Klett.

Solução padrão de ácido nicotínico: A solução padrão de ácido nicotínico foi preparada e guardada em refrigerador numa concentração de 1 miligrama por mililitro, sendo diluída nas concentrações exigidas para a curva padrão, no momento de usar, de modo que ficasse reduzida à concentração de 0,10 μ g de vitamina por mililitro. Na preparação das curvas padrão usaram-se quantidades conhecidas dessa solução adicionada em 5 ml do meio básico duas vezes concentrado, completando-se o volume final para 10 ml.

Meio básico: O meio básico correspondente a cada método de per si, foi previamente preparado em dupla concentração e conservada em refrigerador, adicionado de algumas gotas de tolueno e clorofórmio para evitar contaminação. A posterior autoclavação do meio a 121°C, durante 30 minutos, eliminava a interferência dos preservativos.

Salvo casos inerentes a cada método estudado, toda a tecnologia das dosagens, obedeceu à orientação dada por Hutner et alii, (⁴).

MÉTODO DE WILLIAMS (15)

Organismo revelador: *Torula cremoris* 2897 (*Candida pseudotropicalis*).

Meio de manutenção: Ágar Sabouraud inclinado.

Meio básico:

Glicose anidra (J. T. Baker)	5,0 g%
Peptona tratada por carvão * (Difco)	0,03 g%
KH ₂ PO ₄ (Merck)	1,0 g%
Tampão de citrato de potássio ** (J. T. Baker)	5ml/100 ml
Biotina (Nutritional Biochemical Corp Chem. Co.)	2,5 µg%
Cloreto de tiamina (Merck)	250 µg%
Cloreto de piridoxina (Merck)	250 µg%
Panóttenato de Cálcio (Merck)	250 µg%
Inositol (Pfanstiehl Laboratories)	2,5 mg%
MgSO ₄ .7H ₂ O (Merck)	0,01 g%

pH = 5,0

Esterilização: 121°C durante 30 minutos

Inóculo: Para inóculo foram usadas culturas com 24 horas de crescimento a 37°C no meio de manutenção. A suspensão foi preparada tocando-se de leve a cultura com agulha de platina, e transferindo-se pequena porção do crescimento ("a loopful") para um erlenmeyer de 50 ml, contendo 5 ml do meio básico e 5 ml de água bidestilada. Para inoculação da dosagem propriamente dita, foi usada uma gota dessa suspensão semeada com pipeta Pasteur.

Curva padrão — 0,0 — 0,05 — 0,10 — 0,15 — 0,20 — 0,30 µg de ácido nicotínico por 10 ml. Foram usados erlenmeyers de 50 ml.

Preparação das amostras: 0,5 a 1,0 g das amostras secas e finamente trituradas foram hidrolizadas com 50 ml de NaOH durante 60 minutos a 121°C. A seguir o pH foi ajustado em torno de 7,0 com H₂SO₄

* Peptona tratada por carvão — 100 gr. de Peptona em 800 ml de água bidestilada. Ajustar o pH a 3,0 com HCl N. Aparece uma ligeira turvação. Adicionar 25 g de carvão vegetal. Agitar durante uma hora. Filtrar a vácuo. Reajustar o pH a 3,0. Adicionar 10 g de carvão vegetal. Agitar mais uma hora. Filtrar a vácuo. O filtrado não deve ter mais do que uma fraca coloração. Ajustar o volume para 1.000 com água bidestilada. Tem-se uma solução a 10%. Preservar com tolueno.

** Tampão de citrato de potássio.

Citrato de potássio (Carlo Erba)	100 g
Ácido cítrico (Roche)	20 g
Água bidestilada até	1.000 ml

2 N e filtrado em papel de filtro (Whatman n.º 4). O filtrado foi diluído até dar uma concentração aproximada de 0,05 µg de ácido nicotínico por mililitro de extrato, conforme estabelecido em experiências prévias.

MÉTODO DE BARTON-WRIGHT (1)

Organismo revelador: *Lactobacillus plantarum* ATCC 9014 (*Lactobacillus arabinosus* 17/5).

Meio de manutenção: A cultura foi mantida em Tomato Juice ágar (Difco).

Meio líquido para preparação do inóculo: Meio L₅

Triptona (Difco)	1,0 g
Extrato de levedura (Oxoid)	1,0 g
K ₂ HPO ₄ (Merck)	0,5 g
Glicose anidra (J. T. Baker)	0,2 g
pH — 6,8 — 7,0	

Meio básico:

Glicose anidra (J. T. Baker)	40,0g
Hidrolizado de caseína (Nutr. Biochem. Corp. Chem. Co)	12,0g
Acetato de sódio (Carlo Erba)	20,0g
L-cistina (Baltimore Biological Laboratories)	0,4g
DL - triptofânio (Nutr. Biochem. Corp. Chem. Co) ..	0,2g
Adenina (Mann Research Laboratories)	0,02g
Uracil (Roche)	0,02g
Cloreto de tiamina (Merck)	0,2 mg
Cloreto de guanina (Merck)	20,0 mg
Cloreto de piridoxina (Merck)	0,4 mg
Pantotenato de cálcio (Merck)	0,2 mg
Riboflavina (Merck)	0,4 mg
Ácido p-aminobenzóico (Merck)	0,1 mg
Biotina (Nutr. Biochem. Corp. Chem. Co)	0,8 µg
K ₂ HPO ₄ (Merck)	1,0g

KH ₂ PO ₄ (Merck)	1,0g
Cloreto de sódio (Merck)	0,02g
Sulfato ferroso (Merck)	0,02g
Sulfato de manganês (Merck)	0,02g
Volume final de água bidistilada	1.000 ml
pH = 6,8 – 7,0	

Esterilização: 121° C durante 10 minutos

Inóculo: O inóculo foi preparado utilizando-se uma alçada ("a loopful") da cultura estoque de **Lactobacillus plantarum** crescida no meio de manutenção, e semeada em meio líquido L⁵, incubado a seguir por 24 horas a 37°C. Em seguida, a cultura foi centrifugada assépticamente e as células ressuspensas em 10 ml de soro fisiológico (NaCl a 0,85%) estéril. Esta operação foi repetida duas vezes após o que a suspensão foi diluída a 1/10 em soro fisiológico estéril. Uma gota dessa suspensão foi usada para inocular cada um dos tubos da dosagem.

Curva-padrão: 0,0 – 0,05 – 0,10 – 0,20 – 0,30 – 0,40 – 0,50 µg de ácido nicotínico por 10 ml. Foram usados tubos de 18/180 mm, fechados com tampas metálicas ("screw caps").

Preparação das amostras: 0,5 a 1,0 g das amostras secas e finamente trituradas foram colocadas em erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de HCl N e autoclavadas por 15 minutos a 121°C. O pH foi ajustado em torno de 7,0 com NaOH 30% e filtrado em papel de filtro comum. O filtrado foi diluído até fornecer uma concentração de cerca de 0,05 µg de ácido nicotínico por mililitro, conforme estabelecido em experiências prévias.

RESULTADOS

As curvas padrão obtidas pela resposta em crescimento proporcional às concentrações de ácido nicotínico, para a **Torula cremoris** e para o **Lactobacillus plantarum** são mostradas nas figuras 1 e 2.

Como pode ser observado pela figura 1, a **Torula cremoris** apresenta uma sensibilidade que varia de 0,2 a 3,0 µg de ácido nicotínico, enquanto que com o **Lactobacillus plantarum**, conforme se vê pela figura 2, essa sensibilidade varia de 0,5 a 5,0 µg de ácido nicotínico.

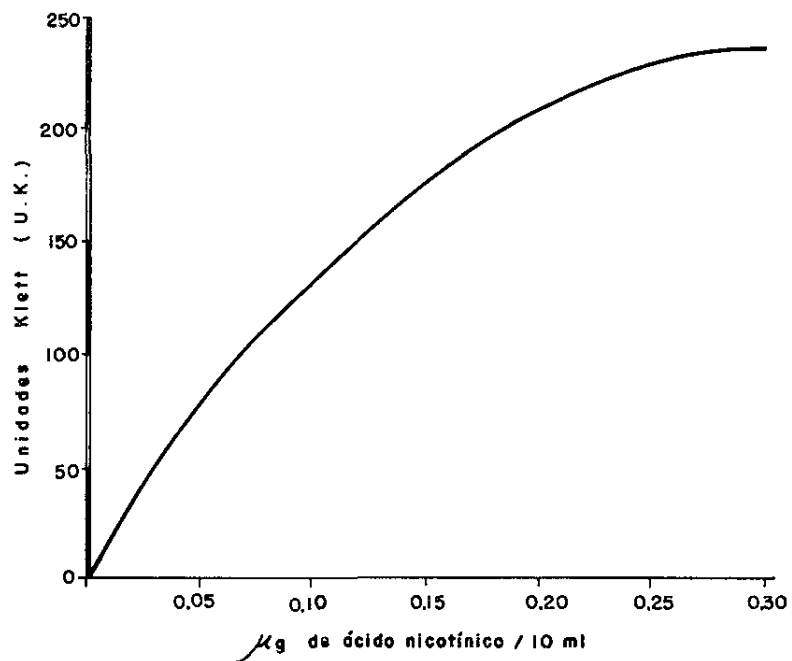


FIG. 1 — Curva padrão para a dosagem de ácido nicotínico, usando-se como organismo revelador a *Torula cremoris* 2897 (*Candida pseudotropicalis*) segundo indica o método de Williams.

Temperatura de incubação: 37° C

Período: 24 horas

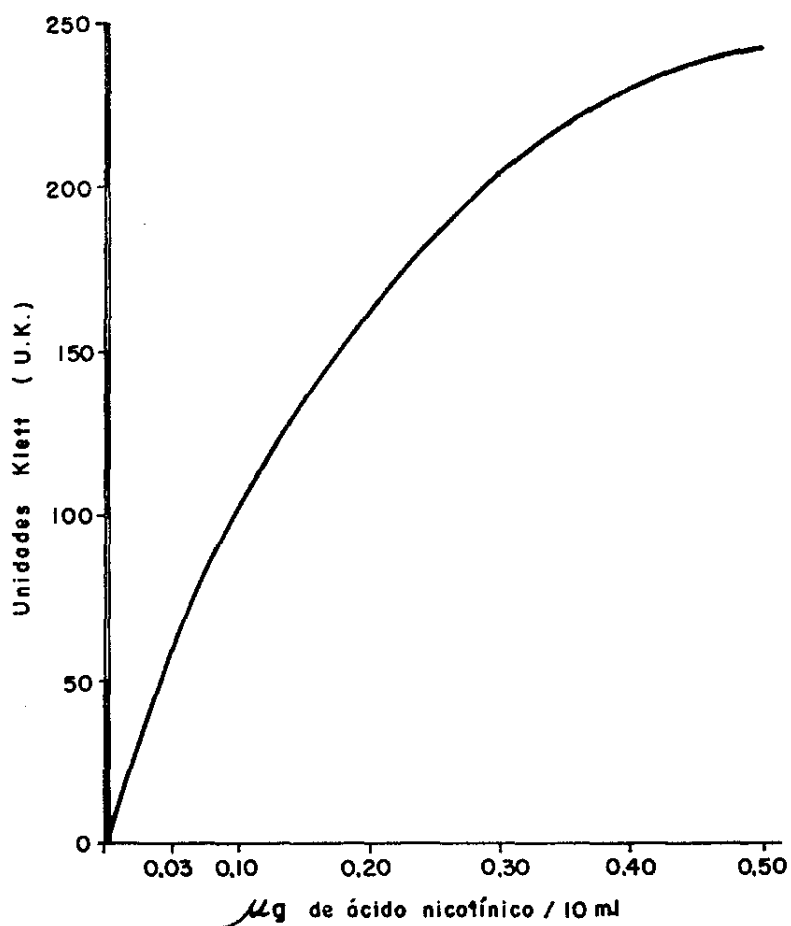


FIG. 2 — Curva padrão para a dosagem do ácido nicotínico, usando-se como organismo revelador o *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (*Lactobacillus arabinosus* 17/5), segundo indica o método de Barton-Wright.

Temperatura de incubação: 37°C

Período: 24 horas

A Tabela I indica que a reprodutibilidade em ambos os métodos é aceitável.

As médias dos tratamentos ensaiados foi aplicado o teste "t", com o seguinte resultado: $t = 0,60$, para um valor tabelado t (138) 1% 2,29. Verificou-se portanto que não há diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade entre as médias de reprodutibilidade dos métodos.

Teores de ácido nicotínico presentes em diferentes produtos naturais foram dosados pelos métodos de Williams (15) e de Barton-Wright (1), conforme se pode verificar pela Tabela II, com resultados satisfatórios.

Para melhor comprovar a precisão entre os dois métodos, foram feitas experiências de recuperação segundo está exposto na Tabela III. A média de ácido nicotínico recuperado foi aproximadamente a mesma para os dois organismos reveladores.

A Tabela III, registra também a exequibilidade dos métodos mediante determinações efetuadas sobre produtos naturais.

DISCUSSÃO

A observação da Tabela II revela que em especificidade e precisão os métodos são equivalentes, visto que os teores de ácido nicotínico obtidos sobre os produtos naturais examinados se correspondem em ambos os métodos. É mister que seja notada a diferença para mais no teor de ácido nicotínico encontrado no café com a **Torula cremoris**. Esta diferença corre por conta da sensibilidade do organismo revelador à trigonelina (16) e (9) existente em grande quantidade no café. (11)

Considerando-se o fator econômico, deve-se ressaltar que o método introduzido por Williams (15), que utiliza como organismo revelador a **Torula cremoris** é bem mais vantajoso, pois enquanto o método modificado por Barton-Wright (1) utiliza um meio básico que contém vitaminas, purinas, pirididinas e ácidos aminados livres, além do hidrolizado de caseína, que são elementos relativamente caros, perfazendo um total de vinte componentes, contando-se os sais minerais e a fonte de carbono, o método de Williams (15) reduz a sua composição a dez elementos, sendo as purinas, pirimidinas e os ácidos aminados livres substituídos por um único componente de baixo custo — a peptona tratada por carvão.

Reprodutibilidade dos métodos com quantidades conhecidas de Ácido Nicotínico

[illegible]

TABELA II

Teor de Ácido Nicotínico em várias amostras examinadas

Organismo revelador	Material analisado	Valores de ácido Nicotínico encontrados $\mu\text{g/gr}$					TOTAL	MÉDIA
Torula Cremoris	Lentilha	15,00	16,00	17,20	21,70	19,70	89,60	17,81
	Ervilha	23,60	24,60	26,20	24,50	24,50	123,40	24,60
	Trigo	42,00	41,40	40,00	41,00	39,10	203,50	40,70
	Café	66,60	70,00	73,75	67,77	66,00	344,12	68,82
	Soja	18,80	18,70	18,50	17,70	19,00	92,70	18,54
TOTAL							853,32	
Lactobacillus Plantarum	Lentilha	17,00	18,50	15,00	13,60	16,10	80,20	16,04
	Ervilha	17,33	16,26	17,40	20,00	19,71	90,70	18,14
	Trigo	50,00	39,20	40,00	41,40	37,40	208,00	41,60
	Café	32,00	25,00	28,57	26,89	25,00	137,46	27,48
	Soja	26,00	22,00	20,00	21,20	21,60	110,80	22,16
TOTAL							627,16	

TABELA III

Recuperação do ácido nicotínico e exequibilidade dos métodos

Organismo revelador	Material analisado	Ácido nicotínico adicionado μg	Ácido nicotínico encontrado μg	Recuperação μg
Torula cremoris	Lentilha	0	0,050	—
		0,050	0,111	111
	Ervilha	0	0,056	—
		0,050	0,115	108
	Trigo	0	0,126	—
		0,050	0,180	102
	Café	0	0,110	—
		0,050	0,190	118
	Soja	0	0,095	—
		0,050	0,135	91
Lactobacillus plantarum	Lentilha	0	0,060	—
		0,050	0,110	100
	Ervilha	0	0,056	—
		0,050	0,100	98
	Trigo	0	0,120	—
		0,050	0,159	92
	Café	0	0,200	—
		0,050	0,260	104
	Soja	0	0,205	—
		0,050	0,295	115

Por outro lado, a preparação do meio básico para dosagem do ácido nicotínico com a **Torula cremoris** é de mais fácil execução. Todas as soluções são aquosas e se conservam por longo tempo em refrigerador. Entretanto, tal não acontece com alguns componentes constituintes do meio básico utilizado para o crescimento do **Lactobacillus plantarum**, cujas soluções tem viabilidade limitada, mesmo quando conservadas em refrigerador, exigindo amiúde preparações.

No que diz respeito aos organismos reveladores em suas características biológicas e físicas para fins de preservação das amostras, é de se notar que o **Lactobacillus plantarum** é um germem altamente

exigente e sensível, necessitando para sua manutenção de um meio a base de triptona, sendo também extremamente suscetível a pequenas variações do potencial hidrogeniônico e temperatura. A **Torula cremoris** no entanto, é de fácil conservação, obtendo-se um crescimento luxuriante em meio de Sabouraud, cuja preparação é fácil e pouco dispendiosa, resistindo otimamente a variações de pH e temperatura.

CONCLUSÕES

Conclue-se portanto, que em sensibilidade, reprodutibilidade e recuperação, os métodos estudados são equivalentes, considerando-se, porém, a praticabilidade da tecnologia inerente a cada método de per si, o método de Williams ⁽¹⁵⁾ que preconiza o uso da **Torula cremoris**, apresenta vantagens sobre o método modificado de Barton-Wright ⁽¹⁾ que emprega o **Lactobacillus plantarum**, sendo consequentemente mais indicado para trabalhos de rotina em laboratório.

RESUMO

Foi realizado um estudo comparativo entre dois métodos microbiológicos para a dosagem do ácido nicotínico. Dos métodos analisados, o método de Snell e Wright ⁽¹⁴⁾, revisto por Krell et alii ⁽⁸⁾ e modificado por Barton-Wright ⁽¹⁾ é o de mais larga aplicação, enquanto que o método introduzido por Williams ⁽¹⁵⁾, embora de uso relativamente limitado, parece ser tão bom em sensibilidade, reprodutibilidade e recuperação quanto o primeiro.

Classificação: Dosagem microbiológica, — ácido nicotínico.

SUMMARY

Lactobacillus plantarum ATCC 8014, is currently used for the determination of nicotinic acid according to the method of Snell and Wright ⁽¹⁴⁾, revised by Krell et alii ⁽⁸⁾ and modified by Barton-Wright. ⁽¹⁾ The determination of nicotinic acid using **Torula cremoris** 2897 as a test organism, introduced by Williams ⁽¹⁵⁾ is also used. A comparative study between the two methods was carried out.

Key Words: Microbiological assay — nicotinic acid.

RESUMÉ

L'analyse comparative a été faite entre deux méthodes microbiologiques pour le dosage de l'acide nicotinique. Entre les deux méthodes, celle de Snell et Wright ⁽¹⁴⁾, révisée par Krell et alii ⁽⁸⁾

et modifiée par Barton-Wright (1) est la plus utilisée tandis que la méthode introduite par Williams (15), quoique moins employée, semble être aussi bonne, du point de vue de sensibilité et de reproductibilité, que la première.

Mots Clés: Dosage microbiologique, acide nicotinique.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao Dr. Luiz José Bove Kesikowski a análise estatística dos dados.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BARTON-WRIGHT, L. D. The microbiological assay of nicotinic acid in cereals and others products. *Biochem. J.*, London, **38**: 314-319, 1944.
- 2 — BERKMAN, S. & KOSER, S. A. Accessory-growth factor requirements of the genus *Pasteurella*, *J. Bacteriol.* Baltimore, Md., **41**: 36-39, 1941.
- 3 — GYORGY, P. & RUBIN, S. H. VI. Niacin and Niacinamide, in: *Vitamin Methods*. Vol. I, ed. György, P.; Academic Press, New York, 1950, pp 223-239.
- 4 — HUTNER, S. H.; CURY A. & BAKER, H. Microbiological Assays. *Anal. Chem.*, New York, **30**: 849-867, 1958.
- 5 — JONHSON, B. C. The microbiological determination of nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinuric acid. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, Md., **159**: 227-230, 1945.
- 6 — JOSHI, J. & HANDLER, P. V. Metabolism of trigonelline. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, Md., **235**: 2981-2983, 1962.
- 7 — KNIGHT B. C. J. G. The nutrition of *Staphylococcus aureus*; nicotinic acid and vitamin B₁, *Biochem. J.*, London, **31**: 731-737, 1937.
- 8 — KREHL, W. A., STRONG, F. M.; ELVEHJEM, C. A. Determination of nicotinic acid., *Ind. Chem. Amer. Ed.*, New York, **15**: 471-475, 1943.
- 9 — MUELLER, J. H. Nicotinic Acid, as a growth accessory for the diphtheria bacillus. *J. Biol. Chem.* Baltimore, Md., **120**: 219-224, 1937.
- 10 — OLIVEIRA, E. N. S.; CAMPOS B. & KIZAWA, K. Teor de ácido nicotínico no café brasileiro. *Rev. Inst. Biol. Pesq. Tecnol.*, Curitiba, Pr., **15**: 11-13, 1970.
- 11 — OLIVEIRA, E. N. S.; CAMPOS, B., & KIZAWA, K. Teor de trigonelina no café brasileiro. *Rev. Inst. Biol. Pesq. Tecnol.*, Curitiba, Pr., **15**: 14-15, 1970.
- 12 — SNELL, E. E. & STRONG, F. M. Growth factors for bacteria. *J. Bacteriol.*, Baltimore, Md., **38**: 293-308, 1939.
- 13 — SNELL, E. E.; STRONG, F. M. & PETERSON, W. H. Panthotenic and Nicotinic Acids as growth factors for lactic acid bacteria. *J. Amer. Soc.*, Easton, Pa., **60**: 2825, 1938.
- 14 — SNELL, E. E. & WRIGHT, L. D. A microbiological method for the determination of nicotinic acid. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, Md., **139**: 675-686, 1941.
- 15 — WILLIAMS, L. W. Yeast microbiological method for determination of nicotinic acid. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, Md., **166**: 397-406, 1946.