

PETRÔNIO AUGUSTO PINHEIRO

MODIFICAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE VITAMINA B₆ COM

Saccharomyces carlsbergensis ATCC 9080

Tese apresentada ao Ins_
tituto de Bioquĩmica da Uni_
versidade Federal do Paraná,
como parte dos requisitos ne_
cessários à obtenção do tĩtu_
lo de Mestre em Bioquĩmica
sob a orientação da Profa.
ELMA N. S. DE OLIVEIRA.

CURITIBA

1973

Tese defendida e

Orientadora: Dra. Elma Núbia Suassuna de Oliveira

Comissão Examinadora:

Trabalho realizado no Laboratório de
Fisiologia de Bactéria do Instituto
de Bioquímica da Universidade Fede
ral do Paraná.

A meus pais, o meu reconhecimento e a
minha eterna gratidão.

À minha esposa, minha incansável colaa
boradora, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece:

À Profa. ELMA NÚBIA SUASSUNA DE OLIVEIRA a sugestão, orientação e colaboração para a realização deste trabalho, o estímulo sempre presente, o exemplo honrado e humano e a oportunidade de conviver no ambiente de otimismo de seu laboratório.

Ao Prof. Sieg Odebrecht pela inestimável colaboração dispensada a ele e sua família.

Aos seus colegas e superiores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, especialmente à Profa. IRACEMA LIMA AINOZ, sempre dispostos a em prestar sua valiosa cooperação e incentivo.

Ao Serviço de Processamento de Dados da Universidade Federal do Ceará, na pessoa do Sr. Oscar F. Sousa, que não mediu esforços para resolver seus problemas de programação Fortran.

À todo pessoal do Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, e da Divisão de Bioquímica do Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Estado do Paraná, professores e funcionários, que lhe prestaram sua colaboração.

À todos aqueles que direta ou indiretamente lhe auxiliaram.

Às instituições que propiciaram suporte financeiro a ele e a execução deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

	PAG.
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	
MATERIAL	
Meio de Manutenção	5
Meio básico (2x)	5
Material analisado	8 e 9
MÉTODOS	
Manutenção do microrganismo	9
Preparação do material para análise	9
Solução de Peptona "tratada"	10
Preparação e composição do meio básico (2x)	10
Preparação do meio padrão	12
Preparação do meio contendo extrato do material a ser analisado	12
Preparação do inóculo e inoculação	13
Cultivo	13
Aferição do crescimento	13
RESULTADOS E DISCUSSÃO	
Condições de cultivo	14
Temperatura de incubação	14
Tempo de incubação	14
pH	21
Preparação do inóculo	21
Composição do meio	21
Efeito do cloreto férrico e ácido nicotínico	27
Efeito da tiamina	27
Respostas a formas de vitamina	31
Efeito da concentração do meio	31
Efeito da concentração de peptona "tratada"	31
Efeito da concentração de glicose	36
CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

ÍNDICE DE FIGURAS

PAG.

Fig. 1.	Crescimento da levedura em diferentes <u>tempe</u> <u>raturas</u>	19
Fig. 2.	Crescimento do organismo em diferentes <u>tem</u> <u>pos</u>	20
Fig. 3 e 4.	Variação do crescimento da levedura em <u>fun</u> <u>ção</u> do pH do meio	22 e 23
Fig. 5.	Curva de crescimento da levedura em <u>Sabou</u> <u>raud</u> líquido à 28°C	24
Fig. 6.	Variação do crescimento da levedura em <u>fun</u> <u>ção</u> da fonte de nitrogênio à temperatura de 28°C	25
Fig. 7.	Crescimento da levedura variando em <u>função</u> da fonte de nitrogênio à temperatura de 30°C	26
Fig. 8.	Crescimento da levedura em meio contendo ou não, cloreto férrico, ácido nicotínico ou ambos	28
Fig. 9.	Crescimento da levedura no meio padrão com ou sem cloreto férrico e ácido nicotínico	29
Fig. 10.	Crescimento da levedura no meio padrão. <u>Cur</u> <u>vas</u> traçadas por um computador IBM 1130	30
Fig. 11.	Crescimento da levedura relativo a <u>diferen</u> <u>tes</u> formas de vitamina B ₆	32
Fig. 12.	Crescimento da levedura em meios de <u>diferen</u> <u>tes</u> concentrações	34
Fig. 13.	Crescimento da levedura em meios com <u>dife</u> <u>rentes</u> concentrações de nutrientes	35
Fig. 14.	Crescimento da levedura em <u>função</u> da concen <u>tração</u> de peptona no meio	37
Fig. 15.	Variação do crescimento da levedura em <u>fun</u> <u>ção</u> da variação da concentração de glicose no meio	38

ÍNDICE DE TABELAS

	PAG.
Tabela I - Reprodutibilidade do presente método. Meio básico (2x) com cloreto férrico e ácido nícotínico	15
Tabela II - Reprodutibilidade do presente método. Meio básico (2x) sem cloreto férrico e ácido nícotínico	16
Tabela III- Determinação do conteúdo de vitamina B ₆ em semente de café "Laurina" efetuada por diferentes técnicos	17
Tabela IV - Estabilidade do meio básico (2x) padrão. Meios analisados em função de seu envelhecimento	18
Tabela V - Composição do meio básico (2x) do presente método e do método de Atkin et al.	33
Tabela VI - Determinação do conteúdo de vitamina B ₆ em diversos materiais, pelo presente método	39
Tabela VII- Recuperação de piridoxol-HCl adicionado a extratos de material analisado	41

O método de determinação de vitamina B₆ por Saccharomyces carlsbergensis ATCC 9080, desenvolvido por Atkin et al., foi modificado com relação ao cultivo do microrganismo, preparo do inóculo, inoculação e composição do meio básico.

O crescimento do microrganismo foi estudado em função da variação do tempo, da temperatura de incubação, do pH do meio, das fontes de nitrogênio e vitamina B₆, da ausência de cloreto férrico, ácido nicotínico e de ambos na composição do meio.

Observou-se ainda o efeito da ausência de tiamina, da concentração da fonte de nitrogênio e carbono e da concentração do meio.

A exequibilidade do método foi comprovada tendo em vista os resultados concordantes e reprodutíveis obtidos.

A existência da vitamina B₆ como um membro do complexo B foi determinada por GYORGY em 1934 (28) e por ser um derivado oxigenado da piridina foi denominada de piridoxina (29, 31 e 32).

O termo piridoxina se constituiu um sinônimo de vitamina B₆ até 1942 quando foram identificados o piridoxal e a piridoxamina como derivados da piridoxina (70). Em 1960, a Comissão de Nomenclatura de Química Biológica, da União Internacional da Química Pura e Aplicada, publicou normas para a nomenclatura da vitamina B₆ (38). Piridoxina passou a designar substâncias derivadas da piridina com atividade de vitamina B₆ compreendendo as três formas: piridoxol (3-hidroxi-4,5-dihidroximetil-2-metil piridina), piridoxal (3-hidroxi-4-formil-5-hidroximetil-2-metil piridina) e piridoxamina (3-hidroxi-4-aminometil-5-hidroximetil-2-metil piridina).

A vitamina B₆ como elemento integrante de numerosos sistemas enzimáticos participa, na forma de fosfato, direta ou indiretamente no metabolismo dos aminoácidos, lipídios, glicídios, hormônios e elementos minerais (5, 10, 14, 37, 40, 43, 48, 50, 59, 60, 71, 83, 86, 87, 89 e 92). Em consequência, a deficiência de vitamina B₆ em animais acarreta uma série de desordens metabólicas (5, 14, 26, 27, 37, 40, 43, 48, 59, 60, 67, 86, 87, 89, 91 e 92) e o conhecimento de sua ocorrência e distribuição quantitativa constituem um estímulo para o aperfeiçoamento dos métodos existentes.

Os métodos usados na determinação da vitamina B₆ podem ser classificados em: biológicos, químicos, físicos, físico-químicos, enzimáticos e microbiológicos.

Os métodos biológicos foram os primeiros a ser utilizados e se baseiam nos efeitos específicos causados em animais de laboratório, tais como, variação de crescimento ou de peso e alteração dermatológica no rato (acrodinia) (16, 33, 15, 18 e 7).

Apresentam as desvantagens de requerer muito tempo para execução, de ter grandes limites de erro e de ser normalmente onerosos. São empregados quando se deseja determinar a facilidade de absorção de vitamina pelo organismo e na impossibilidade de utilização de outros métodos. Entre os vários métodos biológicos utilizados, somente dois apresentam resultados concordantes e baseiam-se na variação do crescimento de frangos e ratos alimentados com rações carentes de vitamina B₆ (16 e 33).

Os métodos químicos, físicos e fisico-químicos substituíram gradativamente os métodos biológicos. São mais rápidos e econômicos que estes últimos e geralmente os limites de erros são muito menores. Devido a escassa especificidade são usados com certas reservas e sua aplicabilidade na determinação em compostos naturais é muito discutida. As dosagens por estes métodos são efetuadas preferencialmente nas determinações de preparações farmacêuticas. Os métodos químicos usados com maior frequência são os que se baseiam no teste do indofenol (74), na reação com a 2,6-dicloroquinona-cloroimida (8, 34, 49, 64, 65 e 66), na fluorescência da lactona do ácido 4-piridóxico (22, 23, 24, 25 e 36) e na reação da cianohidrina com o grupo 4-formil (9 e 81). Os métodos físicos baseiam-se na absorção seletiva na região do ultravioleta onde é característica e variável em função do pH (42, 49 e 74). Entre os métodos fisico-químicos podemos destacar os métodos polarográficos (46 e 47).

Alguns métodos baseados na atividade enzimática foram elaborados para determinar o conteúdo de piridoxal fosfato em materiais biológicos. Estes métodos apesar de terem boa sensibilidade apresentam sérios inconvenientes tais como a preparação das enzimas e a diminuição da atividade enzimática. Entre os métodos enzimáticos mais empregados estão os que usam a triptofanase (77, 88) e a tirosina descarboxilase. (11, 30 e 84).

A maioria dos métodos utilizados para determinar o conteúdo de vitamina B₆ é de natureza microbiológica. Embora sejam

mais demorados que os métodos químicos, são os mais usados, devido principalmente a sua grande sensibilidade e alta especificidade. São preferidos, em grande número de laboratórios e usados especialmente na determinação de vitamina B₆ em materiais de origem natural, após prévio tratamento hidrolítico.

Vários microrganismos têm sido usados para determinar o conteúdo total de vitamina B₆ através de inúmeros procedimentos. Estes microrganismos devem satisfazer as seguintes exigências (78) :

- 1 - não serem patogênicos;
- 2 - serem específicos para a vitamina a ser determinada;
- 3 - terem características absolutamente constantes após longos períodos de repicagens;
- 4 - apresentarem manifestações vitais que proporcionem efeitos graduais e facilmente detectáveis dentro de um intervalo ótimo para sua determinação quantitativa.

Métodos microbiológicos que usam bactérias do ácido láctico, cuja resposta é dada em termos de titulação do ácido produzido, foram desenvolvidos por vários pesquisadores e são mais adequados para a determinação do conteúdo de piridoxal ou piridoxamina (45, 55, 57, 58 e 73). Outros métodos bastante empregados usam a mutante Neurospora sitophila "piridoxinless" nº 299, cuja resposta é dada em termos de micélio seco. (6, 13, 75, 76 e 85). Existem ainda, os que empregam a Saccharomyces cerevisiae (68 e 93), e a Saccharomyces carlsbergensis ATCC 9080, cuja resposta é dada em termos de turbidez do meio (1, 2, 3, 52 e 56) ou diâmetro de zona de crescimento (41). As determinações fotométricas do crescimento, através da turbidez do meio onde cresceu o microrganismo, são as mais sensíveis e mais rápidas (4).

O método de ATKIN et al. (3) apesar de simples, preciso e de ser dos métodos microbiológicos o mais usado, apresenta inconvenientes quanto à preparação do inóculo, as condições

de cultivo e a composição do meio de crescimento. Por estas ra
zões foi modificado, afim de torná-lo ainda mais simples e mais
econômico, sem prejuízo de sua precisão e sensibilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

- 5 -

Material

MICROORGANISMO

Cepa de Saccharomyces carlsbergensis ATCC 9080 existente no Laboratório de Fisiologia de Bactéria do Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

MEIO DE MANUTENÇÃO

A cultura estoque foi mantida em agar-Sabouraud inclinado com a seguinte composição:

Peptona BBL (Gelysate)	1,00	g
Dextrose	2,00	g
Extrato de Levedura (Oxoid) batch nº 123	0,500	g
Após o pH ter sido ajustado para	6,0	
Agar-agar (Oxoid)	1,50	g
Água bi-destilada q.s.p.	100	ml

MEIO BÁSICO (2x)

Foram preparados meios básicos (2x) a partir das seguintes soluções:

1. Peptona: Solução a 10,0% "tratada" com Carvão Merck segundo Isbell (39). Foram usadas peptona BBL (Gelysate lot.803.624), Oxoid e Difco.
2. Caseína: Solução de hidrolisado ácido ou enzimático de caseína NBCo (livre de sal e de vitaminas) a 5%.
3. Triptona: Solução de Triptona Difco a 10,0% "tratada" se

gundo Isbell (39).

4. Açúcar e sais: Esta solução tinha a seguinte composição em 1.000 ml

Glucose anidra - $C_6H_{12}O_6$ - (Riedel De
Haen - Sulze Hannover) 200 g

Fosfato Mono-Potássico anidro - KH_2PO_4 -
(J. T. Baker) 2,2 g

Cloreto de Potássio anidro - KCl - (E. Merck AG) 1,7 g

Cloreto de Cálcio di-hidratado - $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ -
(E. Merck AG) 0,50 g

Sulfato de Magnésio hepta-hidratado -
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - (E. Merck AG) 1,0 g

Sulfato de Manganês mono-hidratado -
 $MnSO_4 \cdot H_2O$ - lot. 153.847
(Carlo Erba) 11,2 mg

OPCIONAL: Cloreto Férrico hexa-hidratado -
 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - lot. 540.614
(Carlo Erba) 16,6 mg

5. Tampão: Tinha em 1.000 ml:

20 g de Ácido Cítrico mono-hidratado
- $H_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$ - (J. T. Baker)

100 g de Citrado de Potássio mono-hidra
tado - $K_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$ - (J. T.
Baker)

6. Padrões de Vitaminas preparados a partir de soluções estoque:

Piridoxol. Continha 10 ng de piridoxol-HCl (E. Merck AG) por ml. Solução estoque: 1,0 mg/ml.

Tiamina. Continha 10 µg de tiamina. 2HCl (E. Merck AG) por ml. Solução estoque: 1,0 mg/ml.

Inositol. Continha 1,0 mg de i-inositol C.P. (hidrate) - (P. L.) por ml de solução. Solução estoque: 50 mg/ml.

Biotina. Tinha a concentração de 0,80 µg de biotina cristalina (NBCo) por ml. Solução estoque: 5,0 µg/ml.

Pantotenato de Cálcio. Sua concentração era igual a 0,2 mg de D(+) Pantotenato de Cálcio (E. Merck AG). Solução estoque : 1,0 mg/ml.

OPCIONAL - Ácido Nicotínico. Obtido pela dissolução de 100 mg de ácido nicotínico (E. Merck AG) em 100 ml de água bi-destilada.

Tanto o meio básico (2x) quanto as demais soluções após adição de preservativos (2 ou 3 gotas de clorofórmio e de tolueno) eram mantidas à 4°C, podendo ser usados até 4 meses após sua preparação.

SOLUÇÃO SALINA

Tinha concentração igual a 0,88 g de NaCl (E. Merck AG) por 100 ml de água bi-destilada sendo usada para preparar os inóculos.

VIDRARIA

. Erlenmeyers de 50 ml para cultivo do microrganismo;

Tubos de ensaio de 1,5 x 15 cm para manutenção do micr^oorganismo e para preparo do inóculo;

Pipeta Pasteur para inoculação do microrganismo nos meios;

Erlenmeyer de 2l para preparar soluções "tratadas" com carvão.

Pipetas de 0,50; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 ml.

EQUIPAMENTO

1. Aparelho para destilação de água modelo AG-10A de Corning Water Glass;
2. Potenciômetro Zeromatic da Beckman utilizada para determinações de pH;
3. Fotocolorímetro Klett-Summerson munido de filtro verde para aferição de crescimento pela variação da turbidez do meio;
4. Balança Mettler H-6 usada para determinações analíticas;
5. Autoclave "Fabbe" usado para esterilização com vapor fluente e hidrólise com vapor úmido a temperaturas superiores a 100°C.

MATERIAL DE ORIGEM VEGETAL EMPREGADO PARA TESTAR O MÉTODO

1. Semente de café Laurina (2 RP) proveniente da Estação Experimental de Ribeirão Preto (I. B. C.);
2. Feijão Macassar (Vigna sinensis cv. seridô) cultivado na Fazenda Experimental do Vale do Curu (UFCE);
3. Ervilha, lentilha, trigo, soja, milho, café solúvel (Nescafé) obtidos no comércio de Curitiba, Paraná;
4. Suco total de laranja e de limão preparados com frutos adquiridos no comércio de Curitiba, Paraná;
5. Levedura seca de cervejeiro e de padeiro adquiridas no comércio de Curitiba, Paraná;
6. Farinha e torta de soja de procedência desconhecida.

MATERIAL DE ORIGEM ANIMAL EMPREGADO PARA TESTAR O MÉTODO

1. Farinha de carne de Minas Gerais de procedência desconhecida;
2. Farinha de peixe nº 153 de procedência desconhecida.

Métodos

MANUTENÇÃO DO MICRORGANISMO

Para cada experiência dois tubos foram semeados a partir de uma cultura estoque de microrganismo. Após incubação à 28°C, por um período de 17 a 24 horas, um dos tubos, denominado "cultura estoque para guardar" era estocado à 4°C por 15 dias no máximo, e usado exclusivamente para manutenção da cultura estoque. O outro identificado como "cultura estoque para uso", era utilizado para preparação do inóculo.

Qualquer um destes tubos uma vez usado era desprezado para minimizar a possibilidade de contaminação.

PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA ANÁLISE

Uma quantidade de material encerrando vitamina B₆, a ser determinada após hidrólise, foi distribuída em triplicata em erlenmeyers de 250 ml, tamponados com buchas de algodão hidrófilo virgem.

A hidrólise foi feita com 18,0 ml de HCl 1 N durante 60min a 121°C. Após hidrólise o pH de cada extrato foi levado até 5,0 pela adição de NaOH 10%. Após filtração dos extratos, em papel de filtro "frama" o volume de cada filtrado foi levado a

100 ml lavando-se o respectivo residuo de filtração com água bi-destilada.

PREPARAÇÃO DO MEIO DE MANUTENÇÃO

Obtido o meio de manutenção, conforme descrito, foram distribuídos aproximadamente 5 ml por tubo de ensaio que, após tampados com buchas de algodão hidrófilo, foram submetidos à esterilização à 121°C durante 30min, em autoclave. Após esterilização os tubos foram submetidos a uma inclinação de cerca de 10° e deixados nesta posição até completa solidificação dos meios, quando então foram estocados na posição vertical, à temperatura de 4°C. Cerca de meia hora antes de serem usados foram retirados da estocagem e submetidos à temperatura de 28°C.

SOLUÇÃO DE PEPTONA A 10,0% "TRATADA"

As soluções de peptonas foram preparadas, como descrito abaixo, segundo a técnica desenvolvida por ISBELL (39).

Peptona (100,0g) foi pesada em balança analítica, dissolvida em água bi-destilada (800ml) e o pH da solução levado a 3,0 pela adição do HCl 1 N. A solução foi submetida à agitação contínua por 60min em presença de carvão Merck (25,0g).

Após agitação a solução foi filtrada a vácuo e o pH reajustado para 3,0. O filtrado foi submetido, mais uma vez, ao tratamento com carvão Merck (10,0g), agitação contínua por 60min e filtração. O novo filtrado obtido foi levado a 1.000 ml com água bi-destilada constituindo a solução de peptona a 10,0% "tratada".

PREPARAÇÃO E COMPOSIÇÃO DO MEIO BÁSICO (2x)

O meio básico, em dupla concentração, usado para as dosagens, foi preparado a partir de:

- | | |
|---|---------|
| 1. Solução de açúcar e sais (com ou sem FeCl_3) | 50,0 ml |
|---|---------|

2. Solução tampão		10,0 ml
3. Solução de peptona BBL (Gelysate) a 10,0%		
	"tratada"	20,0 ml
4. Solução de tiamina	(10 µg/ml)	5,0 ml
5. Solução de inositol	(1,0 mg/ml)	5,0 ml
6. Solução de biotina	(0,80µg/ml)	2,0 ml
7. Solução de pantotenato de cálcio	(0,2 mg/ml)	2,5 ml
8. OPCIONAL: Solução de <u>á</u> ci do nicotínico	(1,0 mg/ml)	5,0 ml

Após o pH ter sido ajustado para 5,0 com HCl ou NaOH o volume da solução foi completado com água bi-destilada para 1.000 ml.

O meio básico (2x) encerra por 100 ml, como fonte de:

<u>Nitrogênio:</u> peptona BB1 (Gelysate) "tratada"	0,20 g
<u>Carbono:</u> glicose	1,0 g
Sais inorgânicos: KH_2PO_4	11 mg
KCl	8,5 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,5 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,0 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	56 µg
OPCIONAL: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	83 µg
<u>Compostos Orgânicos:</u> Citrato de Potássio. H_2O	0,10 g
Ácido Cítrico. H_2O	20 mg
Vitaminas: Tiamina . 2HCl	5,0 µg

Inositol	0,50 mg
Biotina	0,16 µg
Pantotenato de cálcio	5×10^{-2} mg
OPCIONAL: Ácido Nicotínico	0,50 mg

PREPARAÇÃO DO MEIO PADRÃO

O meio padrão foi preparado tomando-se 5,0 ml do meio básico (2x), de zero a 5,0 ml de solução padrão de Piridoxol-HCl (10 ng/ml) e água bi-destilada para perfazer um volume final de 10,0 ml.

A representação gráfica da turbidez do meio em função da concentração de Piridoxol-HCl constitui-se a Curva Padrão.

PREPARAÇÃO DO MEIO CONTENDO EXTRATO DO MATERIAL A SER ANALISADO

De modo semelhante ao meio padrão, o meio contendo extrato do material a ser analisado, foi preparado a partir do meio básico (2x), tomando-se: 5,0 ml do meio básico (2x), um volume de extrato que não ultrapasse a 5,0 ml e de modo que a concentração de vitamina B₆ total esteja na faixa central da curva padrão e, água bi-destilada para perfazer um volume final de 10,0 ml.

O valor do conteúdo total de vitamina B₆, expresso como resultado, corresponde a uma média aritmética obtida do conteúdo total de vitamina B₆ de 3 extratos, sendo o valor do conteúdo de cada extrato aquele obtido, no mínimo, como média aritmética de 3 determinações em duplicata.

Para cada determinação do conteúdo de vitamina B₆ de qualquer material é necessária a obtenção de uma curva padrão correspondente.

ESTERILIZAÇÃO DOS MEIOS

Foi feita em vapor fluente durante 10min.

PREPARAÇÃO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO

Tanto a preparação do inóculo quanto a inoculação foram efetuadas segundo a técnica desenvolvida por CURY et al. (17) conforme descrito a seguir: A partir de uma "cultura estoque para uso" foi transferida uma pequena porção da cultura para um tubo contendo aproximadamente 5 ml de solução salina 0,88%, de modo a resultar uma turbidez em U.K.S. aproximadamente nula. A suspensão assim obtida foi denominada inóculo.

Com uma pipeta Pasteur, foi adicionada uma gota de inóculo, a cada erlenmeyer contendo meio. Essa inoculação foi efetuada à 28°C. Após a inoculação foi promovida uma agitação em todos os erlenmeyers para melhor uniformização do inóculo no meio.

CULTIVO

Após a inoculação seguida de agitação, os meios foram incubados à 28°C, em regime estacionário, por um período de aproximadamente 24 horas.

PARADA DO CRESCIMENTO

Foi efetuada por aquecimento durante 10min em vapor flutuante.

AFERIÇÃO DO CRESCIMENTO

O crescimento do microrganismo foi aferido pela turbidez do meio através de fotocolorímetro. O resultado foi sempre expresso em Unidades Klett-Summerson (U.K.S.) as quais podem ser convertidas em unidades de Densidade Ótica através da fórmula $U.K.S. = 500 \text{ u.D.O.}$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Condições de Cultivo

O cultivo da levedura em tubos de 18mm, sob agitação no aparelho de Fisher Khan, à temperatura de 30°C, foi substituído pelo cultivo em regime estacionário, à temperatura de 28°C, em erlenmeyers, de modo que a relação meio: volume foi de 1:5, tendo como fundamento os trabalhos desenvolvidos por MORRIS et al. (51), CADMUS et al. (12) e SINCLAIR & STOKES (69).

Nas condições especificadas e em pH 5,0, os resultados demonstram a exequibilidade do método pela excelente reprodutibilidade comprovada pelas tabelas I, II, III e IV. Essa reprodutibilidade não foi conseguida por ATKIN et al. (3), possivelmente porque o meio usado por estes autores era muito mais concentrado do que o empregado no presente trabalho.

Temperatura de Incubação

A temperatura de 28°C foi a escolhida como padrão por apresentar um bom crescimento da levedura, um menor crescimento endógeno e ser a mais usada para microrganismos mesófilos (fig.1). O crescimento da levedura à 37°C durante 24 h foi praticamente nulo, resultado este que diverge daquele obtido por MORRIS et al. (51).

Tempo de Incubação

A faixa de 22 a 26 h de crescimento à 28°C foi escolhida para a determinação turbidimétrica do crescimento, após parada do mesmo, tendo em vista os resultados apresentados na figura 2. Deste modo, a flexibilidade para determinação do crescimento da levedura foi consideravelmente aumentada, fornecendo uma maior faixa de segurança para o presente método.

Tabela I

Reprodutibilidade do presente método com quantidades conhecidas de Piridoxol-HCl. (meio básico (2x) com ácido nicotínico e cloreto fêrrico).

Pirid.-HCl ng/10,0 ml	Crescimento em unidades Klett											Total média	D. Padrão
0,0	39	36	38	37	38	36	37	38	39	37	375	37,5	1,1
5,0	70	66	69	65	67	64	66	66	69	68	670	67,0	1,9
10	89	85	88	84	87	83	86	87	90	86	865	86,5	2,0
20	116	111	115	110	113	110	112	114	116	113	1130	113,0	2,3
30	133	129	132	127	130	128	129	132	134	131	1305	130,5	2,1
40	146	141	143	140	139	143	142	144	145	142	1425	142,5	2,2
50	153	147	148	149	148	150	148	151	152	149	1495	149,5	2,0

Tabela II

Reprodutibilidade do presente método com quantidades conhecidas de Piridoxol-HCl. (meio básico (2x) sem ácido nicotínico e cloreto férrico).

Pirid.-HCl ng/10,0 ml	Crescimento em unidades Klett											Total Média	D. Padrão
0,0	34	39	37	38	39	37	35	34	38	39	370	37,0	2,0
5,0	61	65	63	64	67	65	62	61	65	67	640	64,0	2,2
10	74	79	76	78	79	76	75	74	80	79	770	77,0	2,3
20	97	103	99	102	105	101	98	96	104	105	1010	101,0	3,3
30	115	120	118	116	122	118	114	115	121	121	1180	118,0	2,9
40	124	128	126	126	129	127	125	123	129	128	1265	126,5	2,1
50	131	136	132	134	137	133	131	130	135	136	1335	133,5	2,5

Tabela III

Conteúdo de vitamina B₆ em semente de café "Laurina" determinado por diferentes técnicos. (resultados expressos em µg de vitamina B₆ por grama de semente de café).

Técnico designado como	Resultado obtido
A	2,5
	2,6
	2,6
	2,7
	2,7
	2,7
B	2,6
	2,7
	2,6
	2,6
	2,6
	2,7
C	2,5
	2,5
	2,4
	2,4
	2,5
	2,4
Média 2,6	
Desvio Padrão 0,11	

Tabela IV

Estabilidade do meio básico (2x) padrão comprovada por Ensaio efetuado após: 1, 43, 60 e 136 dias de preparado.

Piridoxol-HCl ng/10,0 ml	Crescimento em unidades Klett			
	1 dia	43 dias	60 dias	136 dias
0,0	38	37	38	37
5,0	67	70	71	72
10	83	87	87	89
20	110	113	114	116
30	130	132	134	131
40	143	144	142	142
50	149	150	149	148

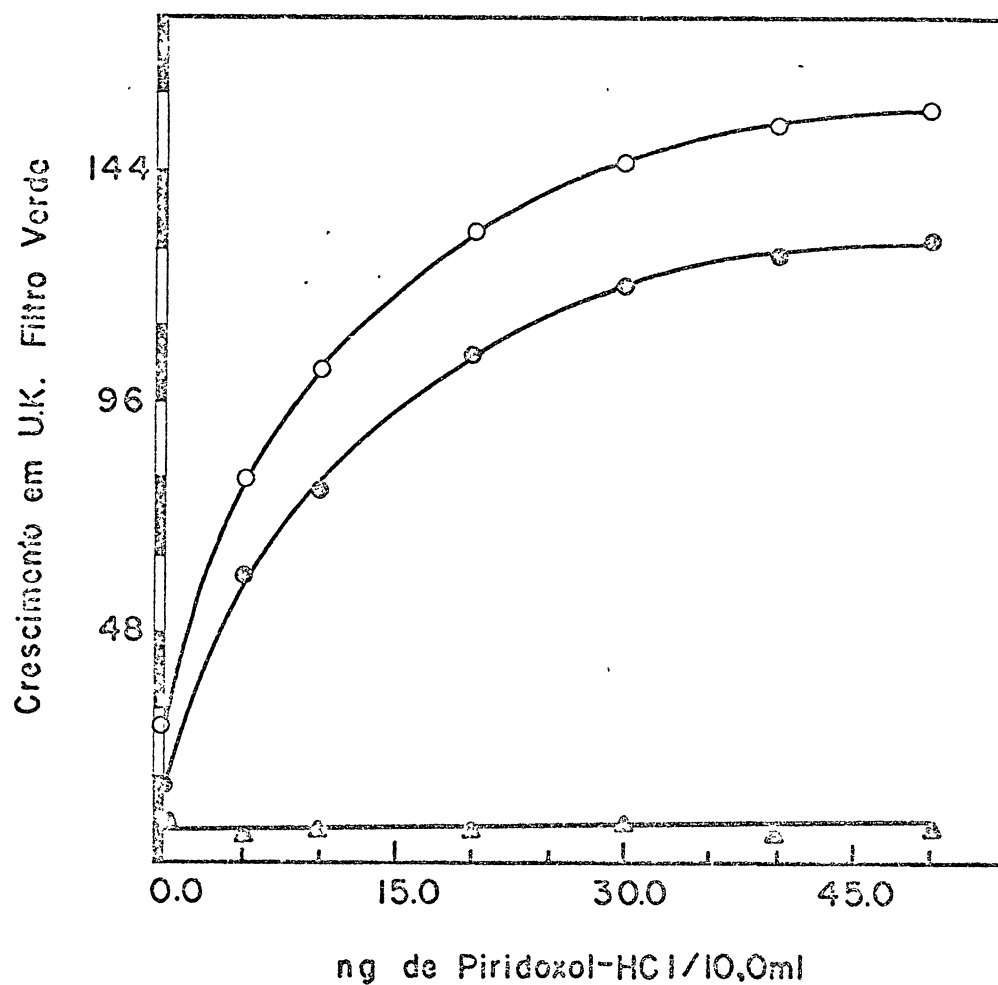


Fig. 1. Crescimento da *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080 em meio contendo peptona BBL(Gelysate)"tratada", em diferentes temperaturas: 28°C (●—●), 30°C (○—○) e 37°C (▲—▲). Tempo: 24 h. pH 5,0. Cultivo: sem agitação.

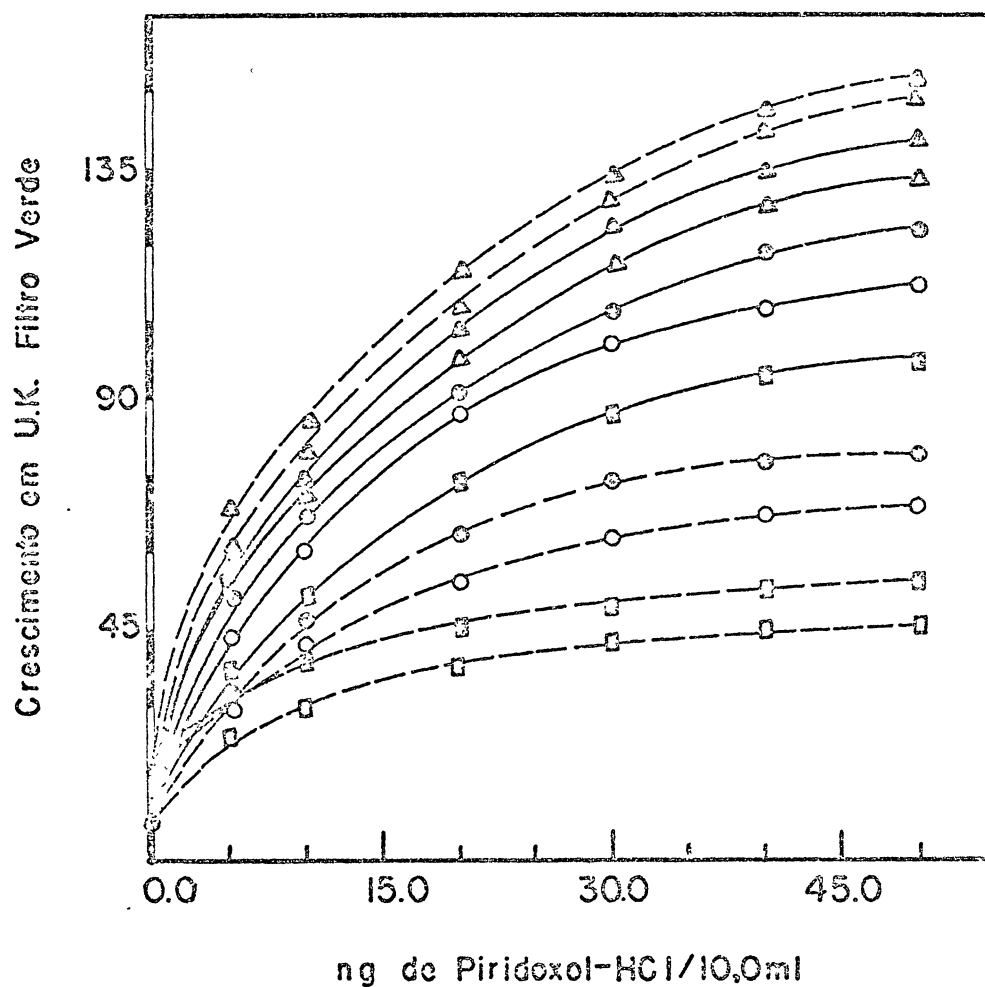


Fig. 2. Crescimento da *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080 em diferentes tempos: 13 h ($\square$ --- $\square$), 19 h ($\square$ --- $\square$), 20 h ($\circ$ --- $\circ$), 21 h ($\circ$ --- $\circ$), 22 h ($\square$ — $\square$), 23 h ($\circ$ — $\circ$), 24 h ($\circ$ — $\circ$), 25 h ($\triangle$ — $\triangle$), 26 h ($\triangle$ — $\triangle$), 27 h ($\triangle$ — $\triangle$) e 28 h ($\triangle$ --- $\triangle$). Temperatura: 28°C. pH 5,0. Cultivo: sem agitação.

A influência da variação do pH do meio (2x) sobre o crescimento da levedura está apresentada nas figuras 3 e 4. O decréscimo de pH de 7,0 a 3,5 causou um estímulo ao crescimento enquanto que o pH 3,0 promoveu inibição do crescimento. O pH 5,0 foi tomado como padrão por apresentar um crescimento mais proporcional e estar na faixa central da capacidade tamponante máxima do sistema ácido cítrico - citrato de potássio. Estes resultados foram ligeiramente diferentes dos obtidos por MORRIS et al. (51), provavelmente por terem sido obtidos a partir de linhagens diferentes.

Preparação do Inóculo

A preparação do inóculo conforme descrita, difere daquela usada por ATKIN et al. (3) por dispensar um ajustamento prévio da concentração de levedura. A transferência de vitamina B₆ do meio de manutenção é mínima, o volume do inóculo não é crítico e a reprodutibilidade não é influenciada. (tabelas I, II, III e IV).

Tomando-se como referência o crescimento da levedura em Sabouraud líquido, à temperatura de 28°C (figura 5) verificou-se que a preparação do inóculo pode ser efetuada a partir de 17 h de cultivo.

Composição do Meio

Menor crescimento endógeno e crescimento mais proporcional foi obtido quando o hidrolisado de Caseína, que constitui a fonte de nitrogênio para a levedura no meio básico (2x) desenvolvido por ATKIN et al. (3), foi substituído pela peptona BBL (Gelysate) "tratada". (figuras 6 e 7). Como fonte de nitrogênio foram testadas: hidrolisados ácido e enzimático de caseína NBCo, peptonas "tratadas" BBL (Gelysate) e Oxoid às temperaturas de 28 e 30°C (figuras 6 e 7) e ainda peptona e triptona "tratadas" Difco

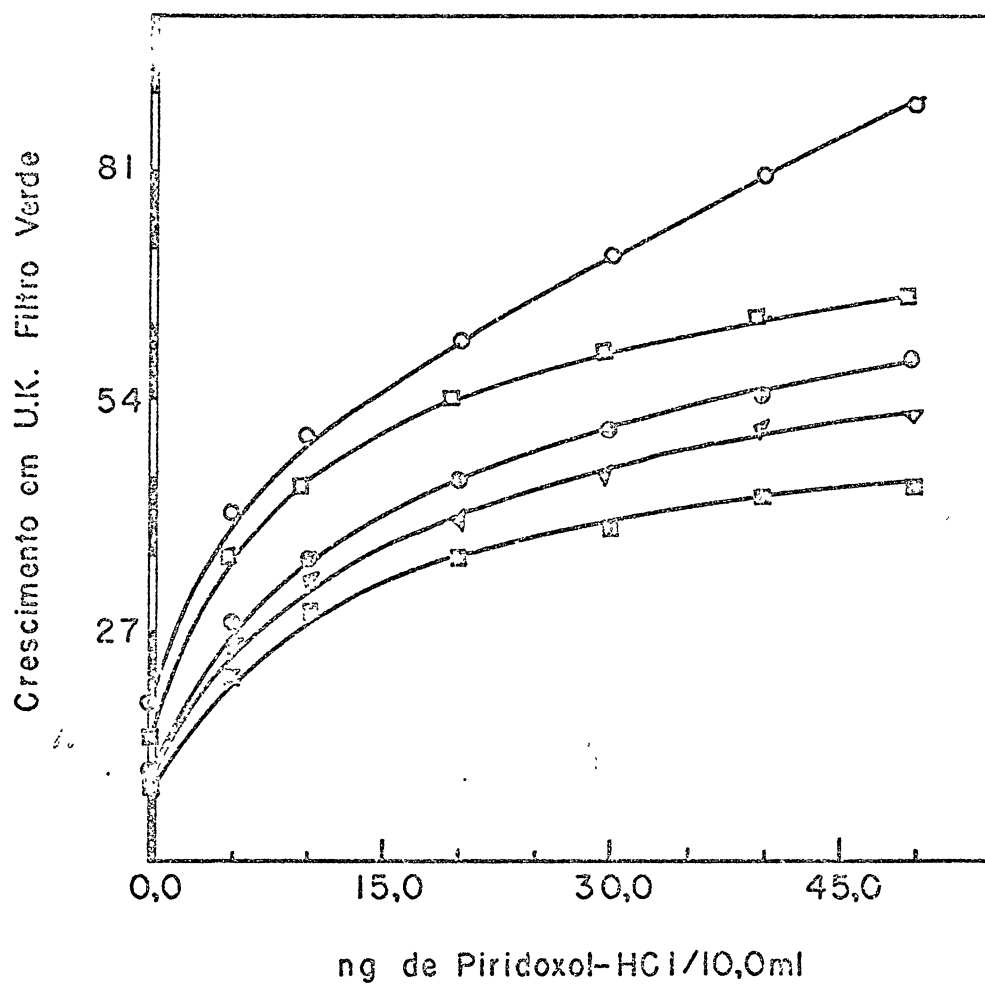


Fig. 3. Crescimento da *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080 em função da variação do pH: 5,0 (○—○), 5,5 (□—□), 6,0 (●—●), 6,5 (△—△), 7,0 (■—■). Temperatura: 28°C. Tempo: 24 h. Cultivo: sem agitação.

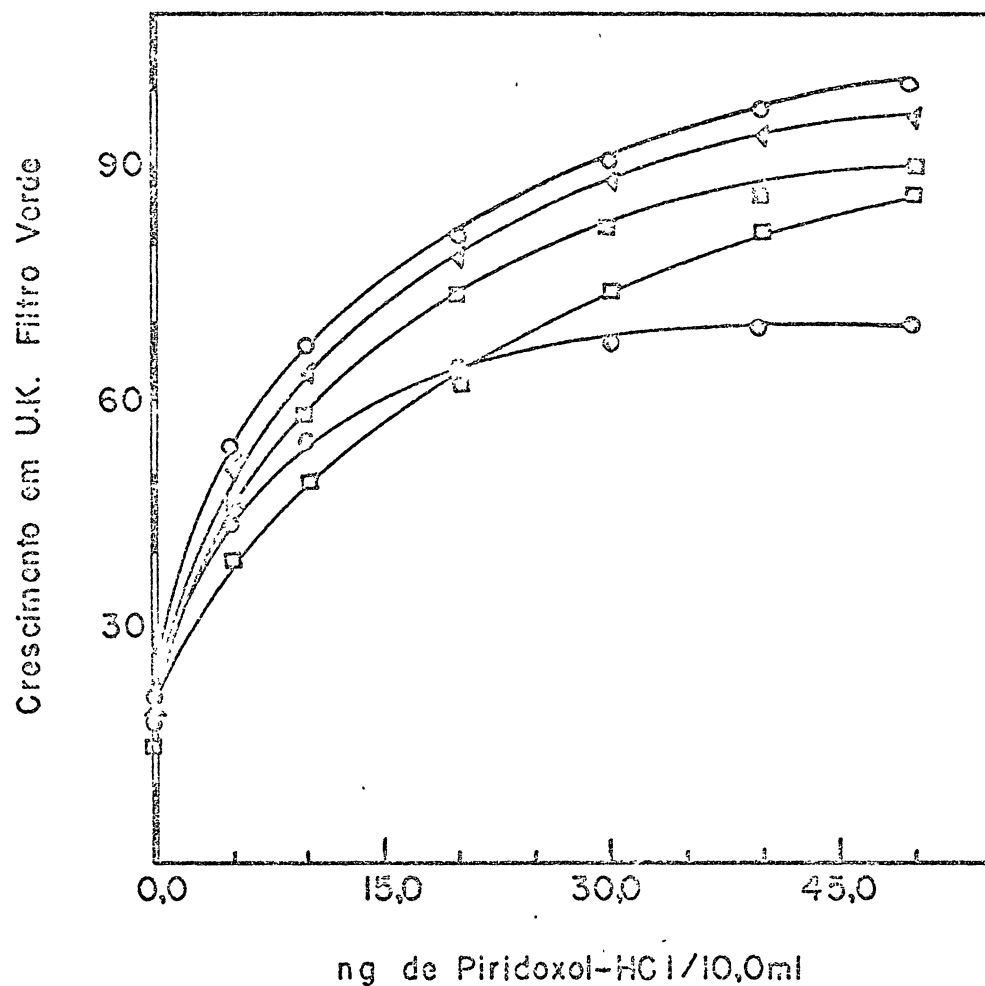


Fig. 4. Crescimento da *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080 em função da variação do pH: 3,0 (○—○), 3,5 (○—○), 4,0 (△—△), 4,5 (◻—◻) e 5,0 (◻—◻). Temperatura: 28°C. Tempo: 24 h. Cultivo: sem agitação.

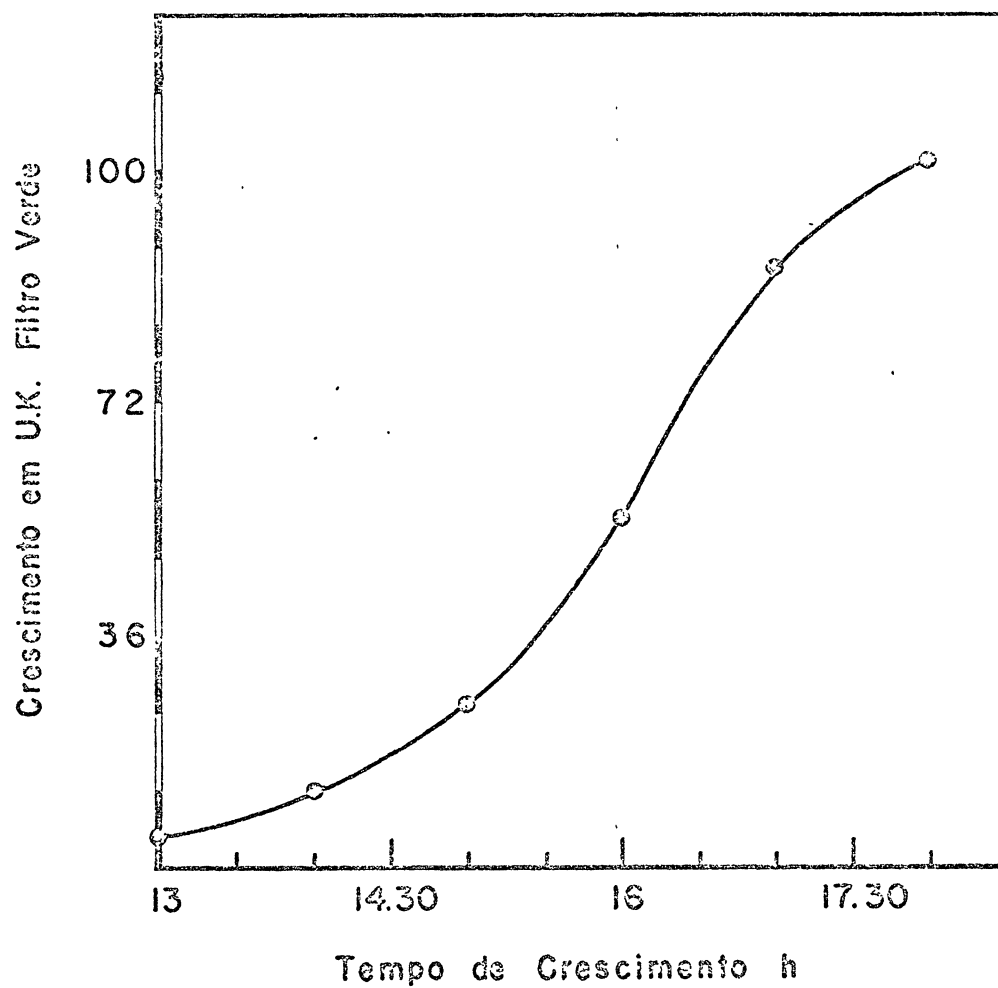


Fig. 5. Curva de crescimento da Saccharomyces carlsbergensis ATCC 9080 em Sabouraud líquido. Temperatura: 28°C. pH: 6,0. Cultivo: sem agitação em erlenmeyer de 50 ml com 10,0 ml de meio.

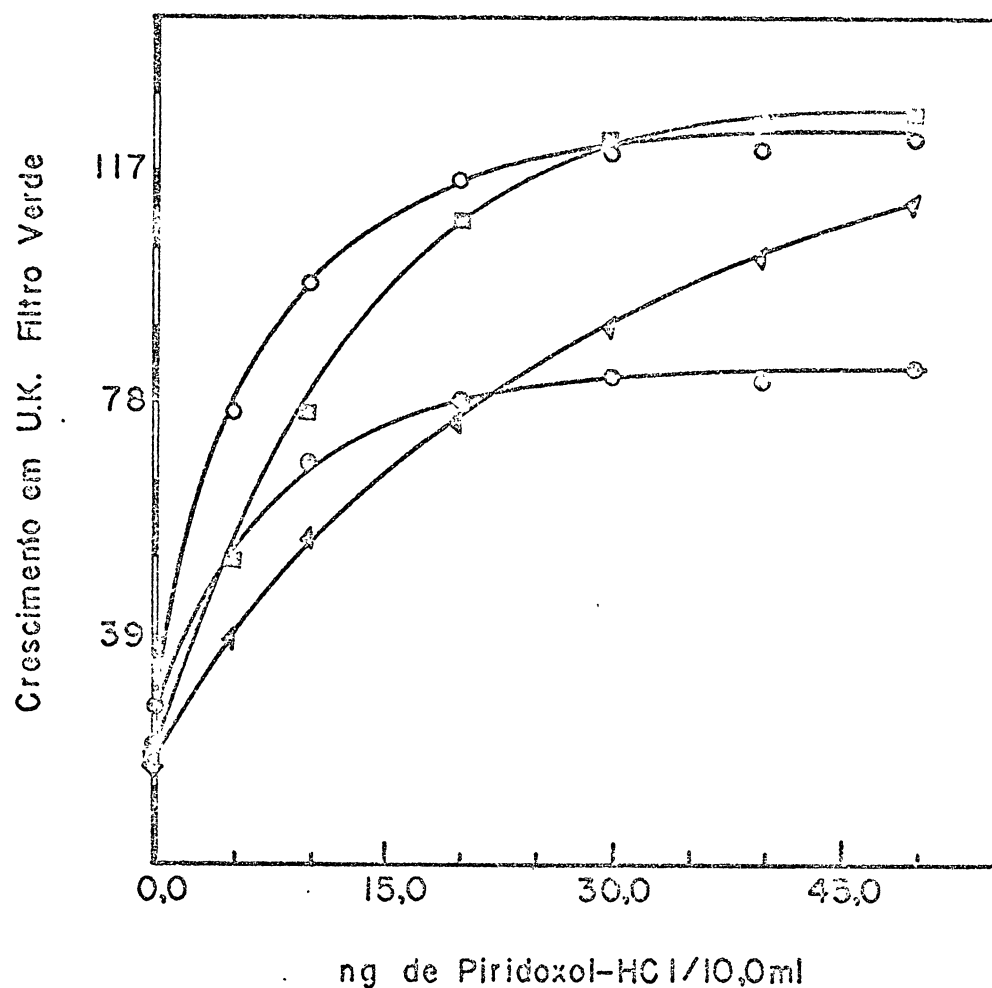


Fig. 6. Crescimento da *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080 em meios com diferentes fontes de nitrogênio: Peptona "tratada": Oxoid (○—○), BBL (Gelysate) (Δ—Δ). Hidrolisado ácido de caseína (□—□), hidrolisado enzimático de caseína (●—●). Temperatura: 28°C. Tempo: 24 h. pH 5,0. Cultivo: sem agitação.

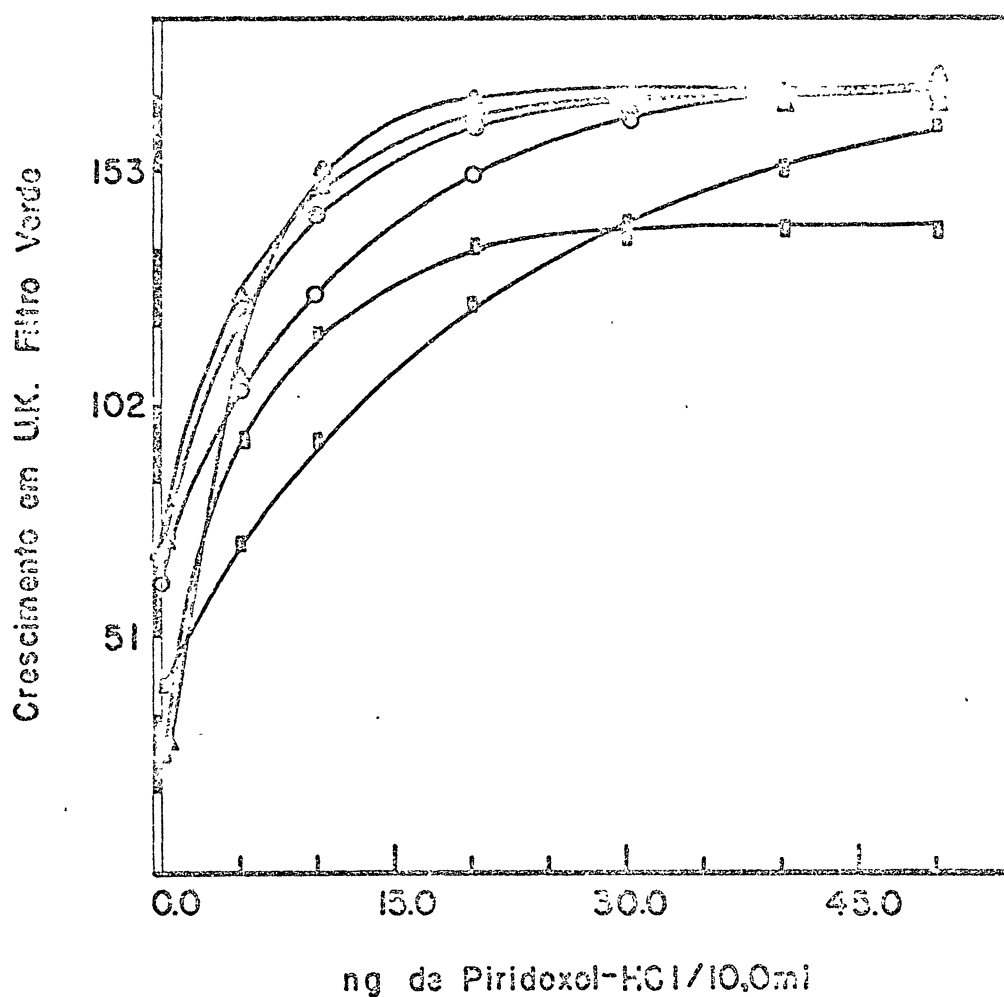


Fig. 7. Crescimento da *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080 em meios com diferentes fontes de nitrogênio: Peptona "tratada": Oxoid (○—○), Difco (○—○), BBL (Gelysate) (□—□). Triptona "tratada" Difco (△—△). Hidrolisado ácido de caseína (▲—▲) e hidrolisado enzimático de caseína (□—□). Temperatura: 30°C. Tempo: 24 h. pH 5,0. Cultivo: sem agitação.

às temperaturas de 30°C (figura 7) e 28°C. Por apresentarem elevado crescimento endógeno e baixa proporcionalidade de crescimento nesta última temperatura não tiveram seus resultados representados na figura 6.

Efeito do cloreto férrico e ácido nicotínico

A adição de cloreto férrico foi considerada opcional (figura 8) porque a sua ausência como componente do meio básico (2x) além de não afetar significativamente o comportamento do crescimento do organismo teste, eliminou o inconveniente da formação ocasional de um floculado possivelmente de fosfato férrico. Deste modo, a concentração de ferro no meio básico (2x) pode ser exclusivamente devida à sua presença como contaminante dos componentes do meio. A presença ou ausência do ácido nicotínico como constituinte do meio básico (2x) estabelecido para este método não interferiu de modo significativo no crescimento da levedura conforme mostra a figura 8. Este resultado diverge daquele obtido por HOPKINS & PENNINGTON (35) e MORRIS et al. (51) que mostraram um efeito estimulador do ácido nicotínico no crescimento da levedura. A eliminação simultânea do cloreto férrico e do ácido nicotínico como constituintes do meio básico (2x) do presente método, em alguns casos, não chegou a afetar significativamente o crescimento (fig. 8), embora, na maioria das vezes, houvesse uma diferença significativa no mesmo conforme mostram as figuras 9 e 10 e a comparação dos valores médios apresentados nas tabelas I e II. Apesar da diferença significativa de crescimento neste último caso não foi observado nenhum comprometimento da proporcionalidade de crescimento, do crescimento endógeno e utilização do meio básico (2x) usado para determinação do conteúdo de vitamina B₆ nos materiais analisados.

Efeito da tiamina

Os resultados obtidos não permitiram chegar a uma con

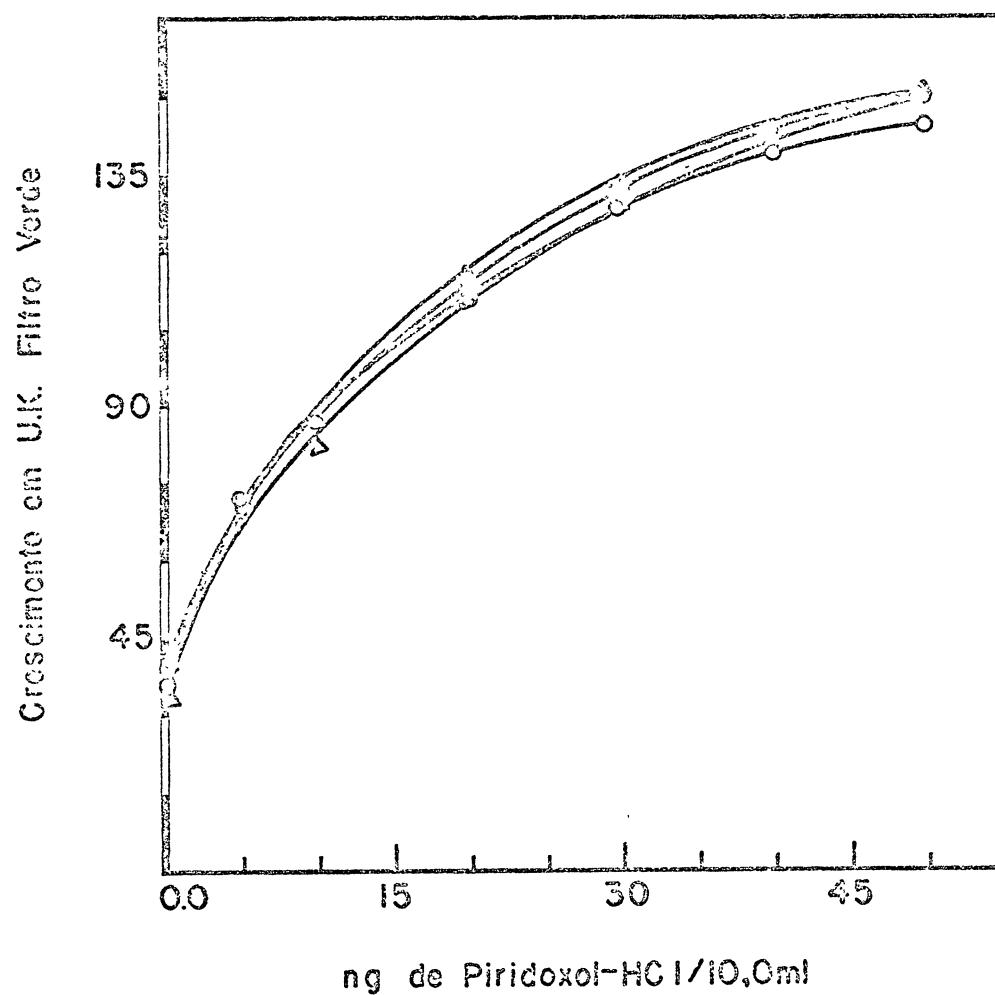


Fig. 8. Crescimento da *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080 em meio: com cloreto férrico e ácido nicotínico (●—●), sem cloreto férrico (Δ—Δ), sem ácido nicotínico (Δ—Δ) e, sem cloreto férrico e ácido nicotínico (○—○). Temperatura: 28°C. Tempo: 24 h. pH 5,0. Cultivo: sem agitação.

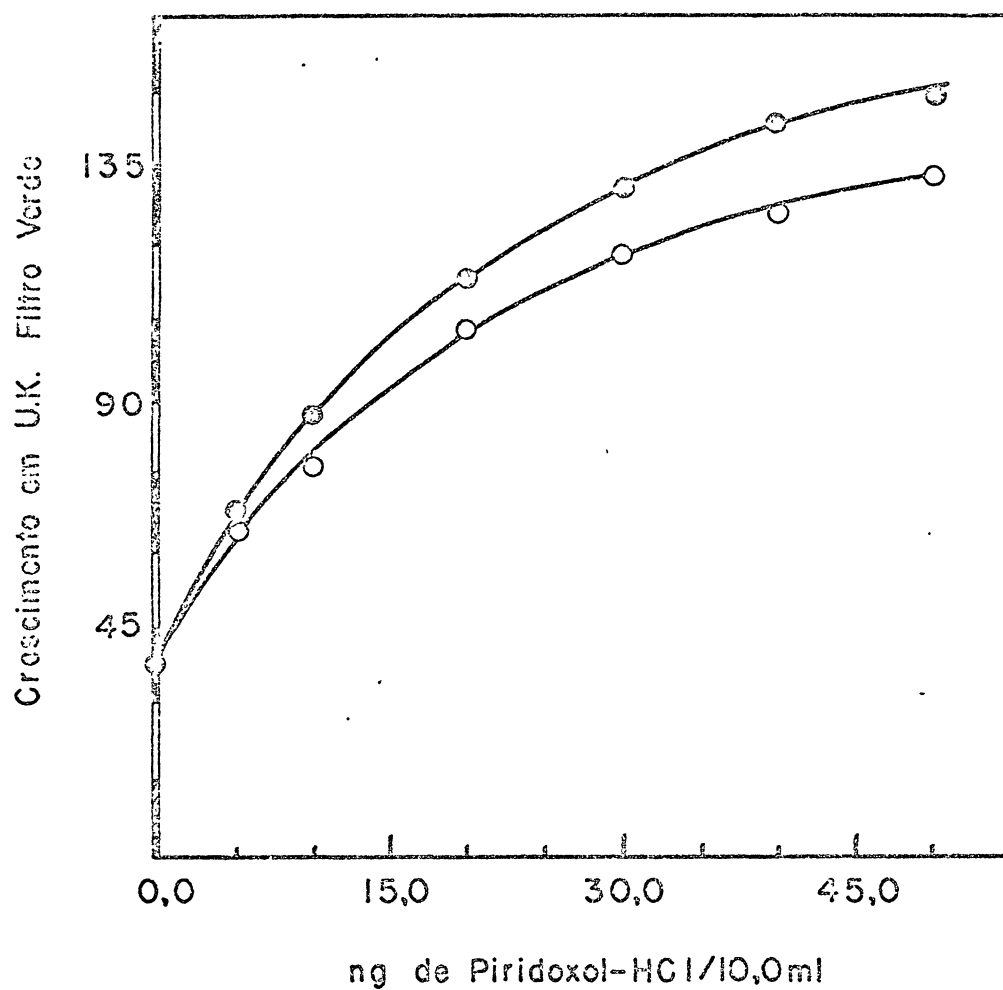


Fig. 9. Crescimento da *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080 em meio: com cloreto férrico e ácido nicotínico (●—●), sem cloreto férrico e ácido nicotínico (○—○). Temperatura: 28°C. Tempo: 24 h. pH 5,0. Cultivo: sem agitação.

CRESCIMENTO DA *SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS* ATCC 9080 - 30 -
 MEIO BASICO (2X) COM CLORETO FERRICO E ACIDO NICOTINICO 2
 MEIO BASICO (2X) SEM CLORETO FERRICO E ACIDO NICOTINICO 1

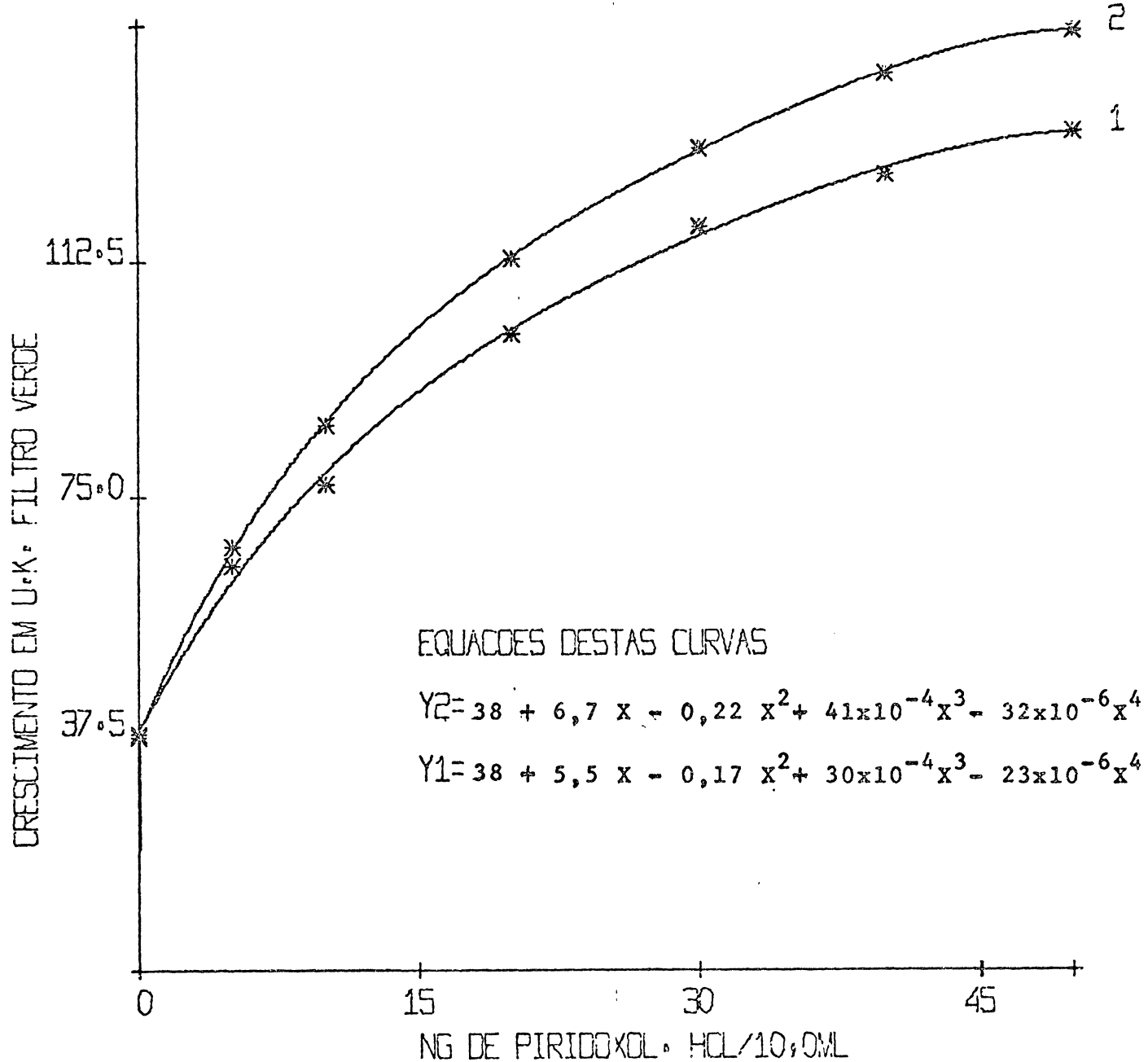


Fig. 10. Crescimento da *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080 em meio padrão contendo ou não cloreto férrico e ácido nicotínico. Curvas traçadas por um computador IBM 1130: Meio padrão com cloreto férrico e ácido nicotínico (2). Meio padrão sem cloreto férrico e ácido nicotínico (1). Temperatura: 28°C. Tempo: 24 h. pH 5,0. Cultivo: sem agitação.

clusão sobre a relação vitamina B₆ - vitamina B₁ para o microrganismo empregado neste método. Por esta razão os resultados deixam de ser apresentados.

Respostas a formas de Vitamina B₆

Em quantidades equi-moleculares a atividade da piridoxamina-2HCl em relação ao piridoxol-HCl variou de 96 a 102%. A figura 11 mostra um rendimento de 96%. Nenhum resultado foi determinado para o piridoxal uma vez que piridoxal e piridoxol têm uma mesma atividade B₆ (41, 51, 52 e 58).

Efeito da concentração do Meio

O crescimento da levedura foi verificado no meio básico (2x) desenvolvido por ATKIN et al. (3) (tabela V) tendo como fonte de nitrogênio peptona BBL (Gelysate) "tratada" na concentração de 2,0g/100ml de meio, em substituição ao hidrolisado de caseína, e em meios básicos (2x) preparados a partir deste, cujas concentrações eram: 70; 40; 20; 10% (figura 12), 8; 6 e 4% (figura 13). Pela análise da figura 12 observa-se que o meio básico (2x), que corresponde a 10% do meio básico (2x) desenvolvido por ATKIN et al. (3), com a modificação citada, foi aquele que apresentou menor crescimento endógeno a mesma proporcionalidade de crescimento que os meios 100% e 70%. Este meio básico (2x) que equivale em concentração dos constituintes a 10% do meio básico (2x) tomado como referência, é o meio padrão do presente método. Este meio não é crítico para o desenvolvimento da levedura pois o meio 8% (figura 13) apresenta tanto um crescimento endógeno como uma proporcionalidade de crescimento muito próximos daqueles apresentados pelo meio 10%.

Efeito da concentração de peptona "tratada"

A variação da concentração de peptona BBL (Gelysate) "tra

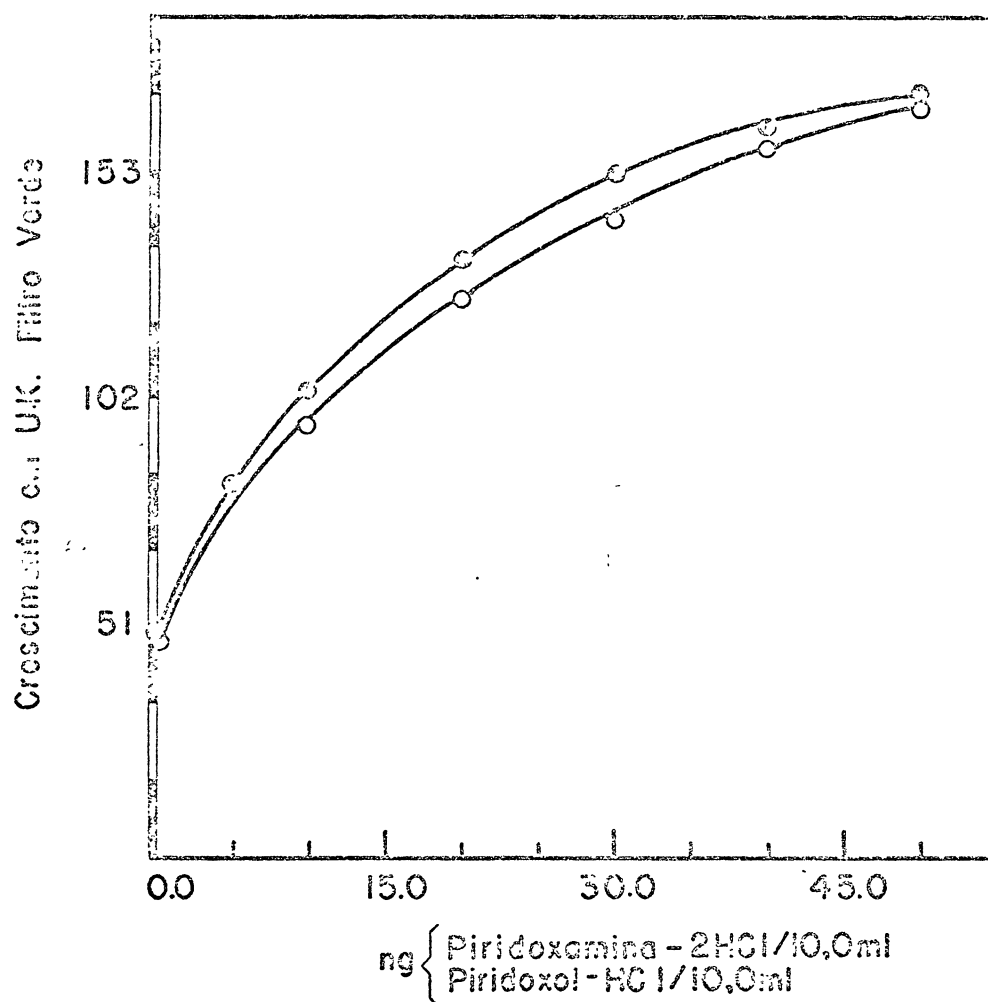


Fig. 11. Crescimento da Saccharomyces carlsbergensis ATCC 9080 em meio padrão: contendo piridoxol - HCl (○—○) e contendo piridoxamina - 2HCl (○—○). Temperatura: 28°C. Tempo: 24 h. pH 5,0. Cultivo: sem agitação.

Tabela V

Composição do meio básico (2x) do presente método e do método de ATKIN et al. (3).

	Presente método		Método de ATKIN et al.	
Glicose (anidra)	1,0	g	10	g
KH_2PO_4	11	mg	0,11	g
KCl	8,5	mg	85	mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,5	mg	25	mg
MgSO_4	2,5	mg	25	mg
FeCl_3	0,05	mg*	0,50	mg
MnSO_4	0,05	mg	0,50	mg
Peptona BBL (Gelysate) "tratada"	0,20	g	-----	
Hidrolisado de caseína	-----		0,80	g
Citrato de potássio mono hidratado	0,10	g	1,0	g
Ácido cítrico mono hidratado	0,02	g	0,20	g
Tiamina di clorohidrato	5,0	µg	0,05	mg
Inositol (hidrate)	0,50	mg	5,0	mg
Biotina	0,16	µg	1,6	µg
Pantotenato de cálcio	5×10^{-2}	mg	0,50	mg
Ácido nicotínico	0,50	mg*	-----	
Água bi-destilada q.s.p.	100	ml	100	ml

* OPCIONAL

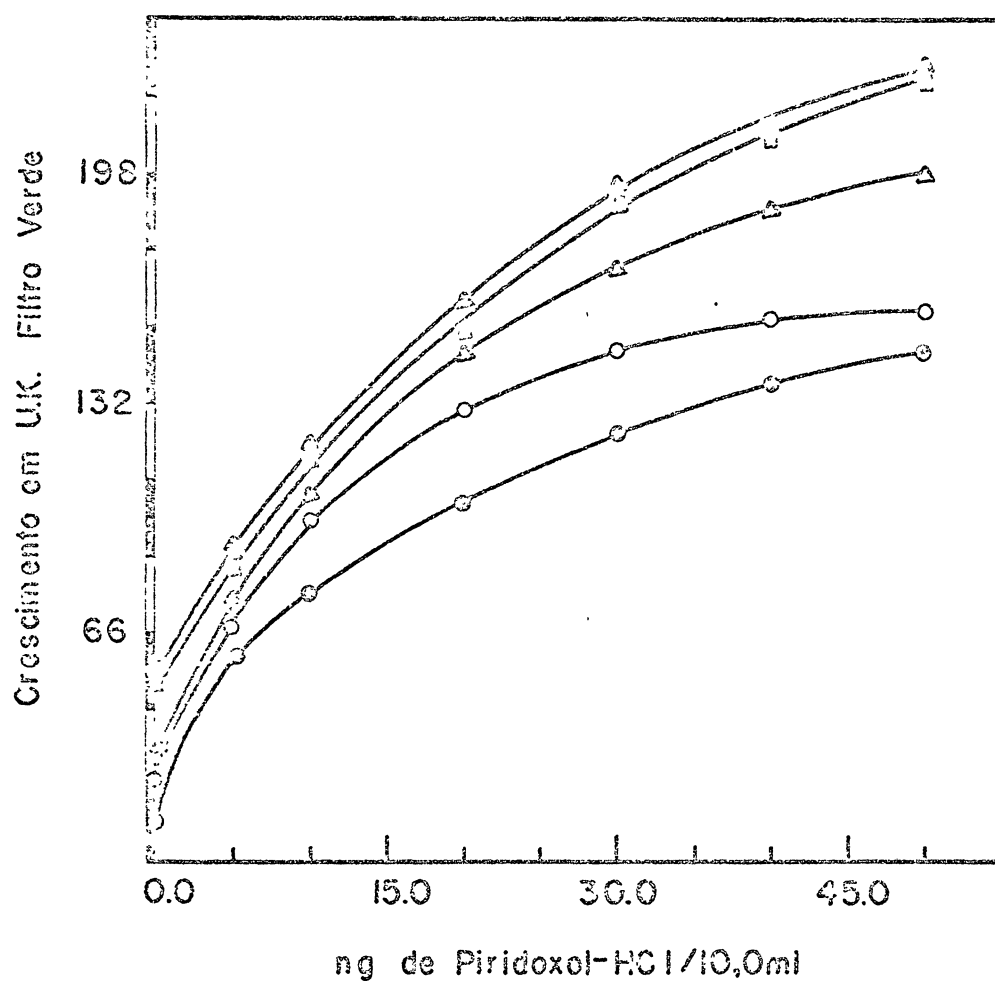


Fig. 12. Crescimento da *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080 em meios de diferentes concentrações: Meio de Atkin et al. com peptona BBL (Gelysate) "tratada" substituindo hidrolisado de caseína. (Meio 100%) (Δ—Δ), 70% (◻—◻), 40% (◊—◊), 20% (○—○) e 10% (○—○). Temperatura: 28°C. Tempo: 24 h. pH 5,0. Cultivo: sem agitação.

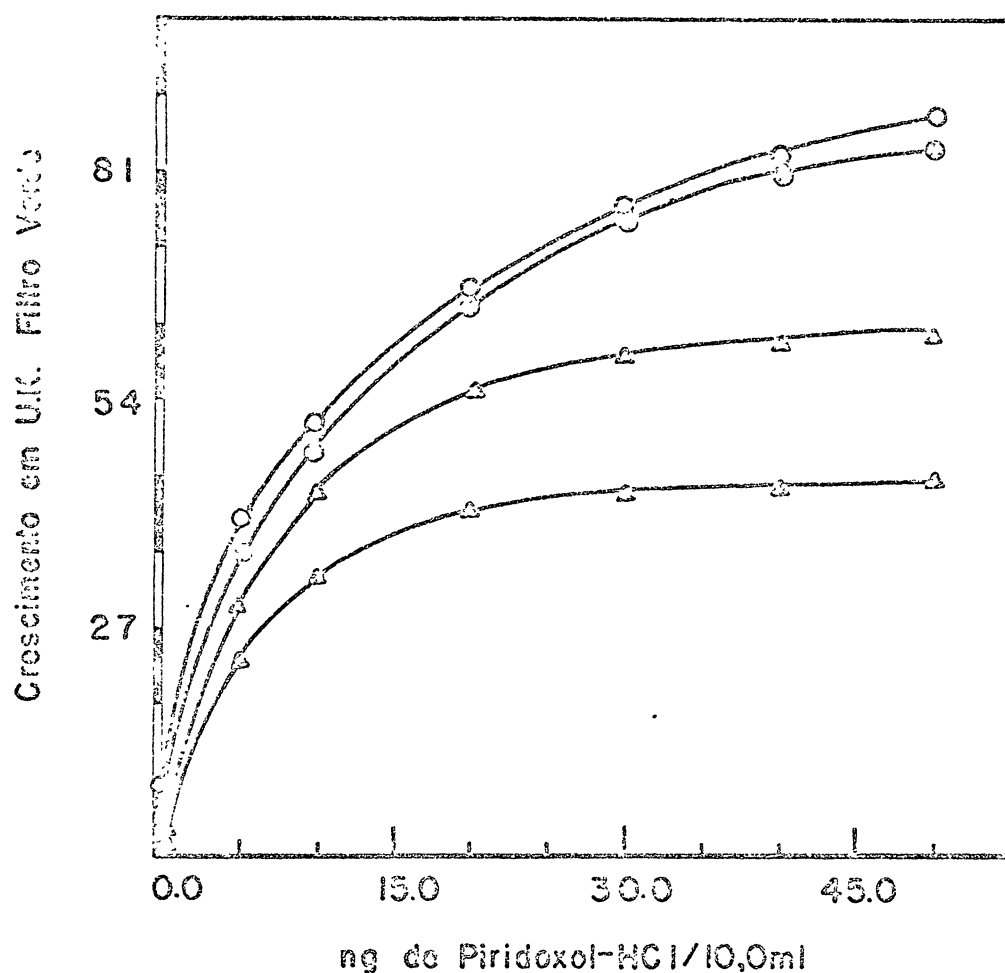


Fig. 13. Crescimento da *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080 em meios de diferentes concentrações em relação ao meio desenvolvido por Atkin et al., meio 100%, com peptona BBL (Gelysate) "tratada" substituindo hidrolisado de caseína. Meio: 10% (○—○), 8% (◐—◐), 6% (△—△) e 4% (◑—◑). Temperatura: 28°C. Tempo: 24 h. pH 5,0. Cultivo: sem agitação.

tada", no meio básico (2x) padrão foi aferida na faixa de 2,0 a 0,14g/100ml de meio (figura 14). Pelo traçado das curvas de crescimento do organismo tomou-se a concentração de peptona de 0,20g/100ml como a padrão para o método por apresentar um pequeno crescimento endógeno e sua concentração não ser crítica para o crescimento da levedura.

Efeito da concentração de Glicose

O comportamento do crescimento da levedura em função da variação da concentração da glicose foi verificada na faixa de concentração de 2,0 a 0,50g/100ml de meio básico (2x) padrão (figura 15). Por apresentar um comportamento similar na faixa de concentração compreendida entre 0,80 e 1,5g/100ml, tomou-se como sendo 1,0g/100ml de meio básico (2x), a concentração de glicose no meio padrão. Esta concentração não é crítica para a levedura e o crescimento endógeno é um dos menores.

A partir desses resultados foi determinado como meio básico (2x) padrão, contendo ou não cloreto férrico e ácido nicotínico, o indicado na tabela V. O comportamento do crescimento da Saccharomyces carlsbergensis ATCC 9080 neste meio é representado por curvas nas figuras 9 e 10.

As equações que representam as curvas da figura 10 são:
 $Y_2 = 38 + 6,7 X - 0,22 X^2 + 41 \times 10^{-4} X^3 - 32 \times 10^{-6} X^4$ para crescimento em meio contendo cloreto férrico e ácido nicotínico e
 $Y_1 = 38 + 5,5 X - 0,17 X^2 + 30 \times 10^{-4} X^3 - 23 \times 10^{-6} X^4$ para crescimento em meio sem cloreto férrico e ácido nicotínico.

Estabelecido o meio básico (2x) padrão, que mostrou uma boa estabilidade (tab. IV), foram efetuadas determinações do conteúdo total de vitamina B₆ em materiais cujo teor de vitamina B₆, na maioria era conhecido, com o propósito de testar o método (tabela VI). Os resultados obtidos são compatíveis com os valores citados na literatura.

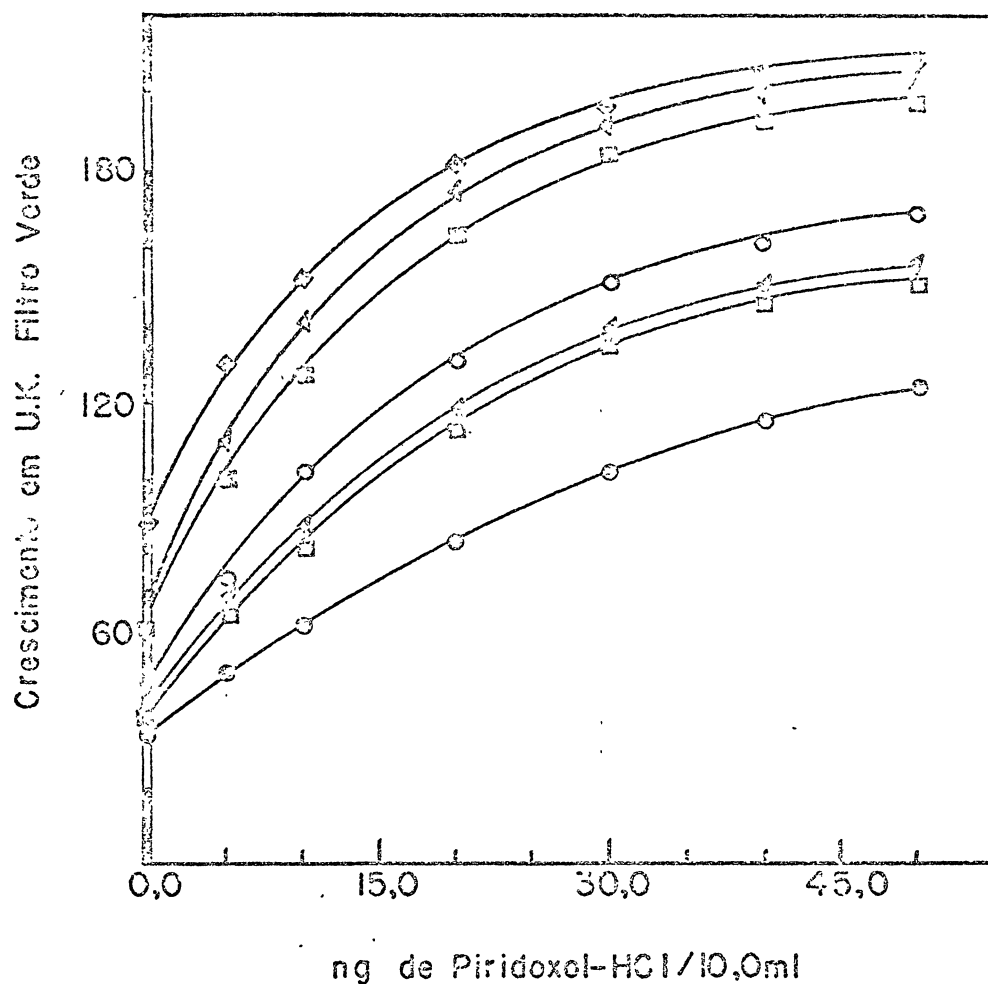


Fig. 14. Crescimento da *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080 em função da concentração de peptona BBL (Gelysate) "tratada" expressa em g/100ml de meio básico (2x). Peptona: 0,14 (○—○), 0,16 (□—□), 0,20 (△—△), 0,40 (○—○), 1,0 (■—■), 1,5 (▲—▲) e 2,0 (◆—◆). Temperatura: 28°C. Tempo: 24 h. pH 5,0. Cultivo: sem agitação.

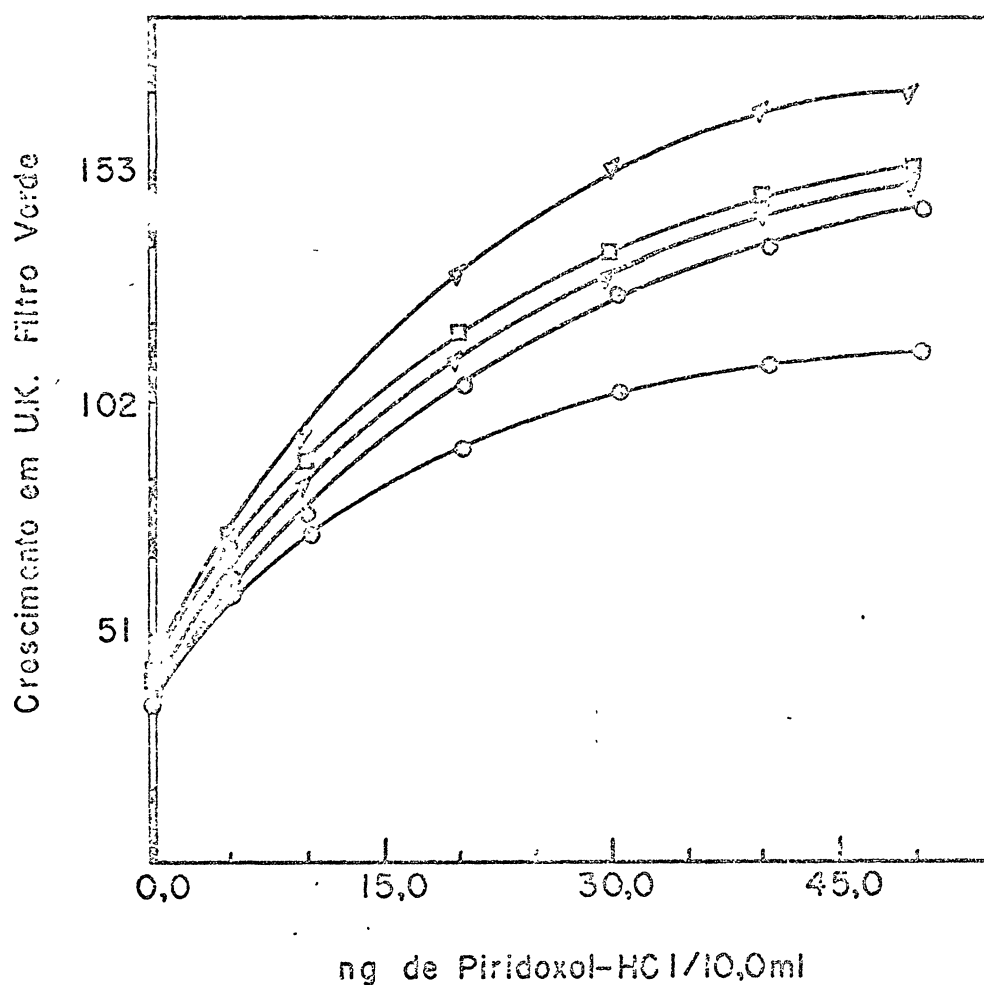


Fig. 15. Crescimento da *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080 em função da concentração de glicose expressa em g/100ml de meio básico (2x). Glicose: 0,50 (●—●), 0,80 (○—○), 1,0 (▲—▲), 1,5 (■—■) e 2,0 (△—△). Temperatura: 28°C. Tempo: 24 h. pH 5,0. Cultivo: sem agitação.

Tabela VI

Conteúdo médio de vitamina B₆ em diferentes materiais de terminado pelo presente método e citado na literatura.

Materiais analisados	Determi nado µg/g	Citado µg/g	Ref.Biblio gráficas.
Cafê solúvel "Nescafé"	0,29	0,32	(80)
Ervilha	4,9		
Farinha de carne de Minas Gerais	0,65		
Farinha de peixe nº 153	2,0	1,06 ± 0,21	(21)
		2,5 ± 1,6 -3,2	(63)
		3,3 ± 1,7 -6,5	(90)
Farinha de soja	6,0	5,75	(54)
		5,4 - 7,7	(63)
		7,6 ; 5,3 -10,6	(90)
Feijão macassar	5,8	5,55 ; 5,03- 6,00	(1)
Lentilha	12		
Levedura seca de cervejeiro	36	28,0	(57)
		29,9 ;15 -40	(63)
		39,3	(3)
		43,3	(20)
Levedura seca de padeiro	14		
Milho	2,7	1,9	(57)
		2,4	(54 e 82)
		3,6	(61)
		3,8	(68)
Semente de café "Laurina"	2,6		
Soja	7,6	7,1	(61)
		7,1 -12	(72)
		8,0	(53)
Suco total de laranja	0,39	0,52	(3)
		0,18 - 0,32	(44)
Suco total de limão	0,35	0,35	(3)
Torta de soja	7,1		
Trigo	6,9	4,8	(3)
		5,3	(19)
		6,0	(55)
		7,6	(79)

A exatidão do método é apresentada nas tabelas VII e III em função da recuperação de piridoxol-HCl adicionado a extratos de materiais analisados, e da condução de diferentes ensaios de um mesmo material por diferentes técnicos em diferentes condições.

Tabela VII

Recuperação de Vitamina B₆

Material analisado	Vit. B ₆ det. ng	Pir.-HCl ad. ng	Total de vit.B ₆ ng	Recup. %
Feijão macassar	15	10	25	100
Lentilha	23	20	45	105
Levedura sêca de cerve jeiro	14	10	26	108
Levedura sêca de pa deiro	5,5	10	16	103
Milho	6,8	10	17	101
Semente de café "Laurina"	13	10	23	100
Soja	11	10	21	100
Suco total de limão	14	20	37	109
Trigo	11	10	23	109

Média 104

CONCLUSÕES

O método de ATKIN et al. (3) foi modificado em relação ao cultivo, à preparação do inóculo e aos aspectos qualitativo e quantitativo da composição do meio básico (2x).

O cultivo em regime estacionário, nas condições em que foi efetuado, além de mostrar uma excelente reprodutibilidade, tornou o método mais prático e econômico pela eliminação do agitador de Fisher Khan e pela redução da temperatura de incubação sem alterar o comportamento do crescimento do microrganismo.

A preparação do inóculo como foi efetuada, além de não diminuir a sensibilidade nem a precisão do método, tornou-se mais simples e mais rápida por não necessitar de uma concentração de levedura pré-determinada no inóculo.

Na composição do meio básico (2x) o hidrolisado de caseína usado, por ATKIN et al. (3), foi substituído por peptona BBL (Gelysate) "tratada" um produto mais econômico e numa concentração 4 vezes menor, e os demais constituintes do meio tiveram suas concentrações diminuídas de 10 vezes. Nestas condições foi opcional a adição de cloreto férrico e ácido nicotínico.

O presente método mostrou-se exequível para determinação de vitamina B₆ em cereais, em rações animais e em outros produtos. A exequibilidade do presente método foi demonstrada em função da recuperação de piridoxol-HCl adicionado a extratos de materiais analisados e dos resultados obtidos na análise de um mesmo material por diferentes técnicos, portanto em diferentes condições.

A precisão e a sensibilidade do presente método são as mesmas do método original. Concentrações de vitamina B₆ da ordem de 0,30 a 4,5ng/ml podem ser determinadas por este método.

O tempo necessário para conclusão de um ensaio é praticamente o mesmo do método original, mas a faixa de segurança pa

ra a determinação do crescimento da levedura dá a este método uma maior flexibilidade.

Qualquer laboratório de microbiologia que disponha de um potenciômetro e um fotolorímetro tem condições de utilizar o presente método para dosagem de vitamina B₆.

A estabilidade do meio básico (2x) foi comprovada num período de até 136 dias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ARAUJO, A. N. P. de & PORTELA, Z. Teor de piridoxina e ácido nicotínico em feijões do nordeste brasileiro. An.Inst.Quím. Univ. Recife, 1 (2) : 149-60, 1965.
- 2 - ASSOCIATION OF VITAMIN CHEMISTS INC; Methods of vitamin assay. 2. ed. New York, Interscience, 1951. p. 220-29.
- 3 - ATKIN, L. et alii. Yeast microbiological methods for determination of vitamins. Pyridoxine. Ind. Eng. Chem. Anal.Ed., 15 (2) : 141-44, 1943.
- 4 - _____. A Method for measurement of yeast growth in bios and vitamin investigations. Arch. Biochem., 1 : 9-16, 1942.
- 5 - BAKER, H. & FRANK, O. Clinical vitaminology. New York, Interscience, 1968. p. 67-72.
- 6 - BARTON-WRIGHT, E. C. Biochem. J., 39 : X, 1945.
- 7 - BENDER, R. C. & SUPPLEE, G. C. Effect of complementing factors on the quantitative response and specificity of vitamin B₆. J. Nutr., 20 : 109-23, 1940.
- 8 - BIRD, O. D. et alii. Adaptation of the Scudi colorimetric method for pyridoxin. J.Biol.Chem., 142 : 317-22, 1942.
- 9 - BONAVIDA, V. The Reaction of pyridoxal 5-phosphate with cyanide and its analytical use. Arch. Biochem. Biophys., 88 : 366-72, 1960.
- 10 - BORGET, L. J. et alii. Nutrition and physical fitness. 8.ed. Philadelphia, W. B. Saunders, 1969. p. 260-64.
- 11 - BOXER, G. E. et alii. Pyridoxal 5-phosphoric acid in whole blood and isolated leucocytes of man and animals. J.Nutr., 63 : 623-36, 1957.
- 12 - CADMUS, M. C. et alii. Production of a new polysaccharide with Cryptococcus laurentii variety flavescens. Appl. Microbiol., 10 : 153-56, 1962.
- 13 - CARPENTER, L. E. & STRONG, F. M. Determination of pyridoxin and pseudopyridoxin. Arch.Biochem., 3 (3) : 375-88, 1944.
- 14 - CHOW, B. F. The B vitamins B₆, B₁₂. Folic acid, pantothenic acid and biotin. In: BEATON, G.H. & MCHENRY, E.W. Nutrition; a

- comprehensive treatise. New York, Academic Press, 1964. v.2, p.208-16.
- 15 - CLARKE, M. F. & LECHYCKA, M. The Biological assay of pyridoxine (vitamin B₆) J. Nutr., 25 : 571-84, 1943.
- 16 - CONGER, T. W. & ELVEHJEM, C. A. The Biological estimation of pyridoxin (vit. B₆) J.Biol.Chem., 138 : 555-61, 1941.
- 17 - CURY, A. et alii. A New microbiological method for choline assay. An. Microbiol., 12 : 11-24, 1965.
- 18 - EDGAR, C.E. et alii. Water-soluble B vitamins XI. The estimation of yeast eluate factor and yeast filtrate factor by rat growth methods. Biochem. J., 32 : 2200-06, 1938.
- 19 - ESTADOS UNIDOS. National Research Council. Joint US-Canadian tables of feed composition. Washington, 1959 (Publication, 659) apud VITAMIN B₆ in the nutrition of domestic animals. Basle, Suíça, F. Hoffmann-La Roche, 1965. p. 41, 55.
- 20 - _____. _____. Washington, 1964. (Publication, 1232) apud SCHEINER, J. M. & DE RITTER, E. J. Agr. Food Chem., 16 (5) : 746, 1968.
- 21 - FRIESECKE, H. & KIRCHGESSNER, M. Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk, 16 : 149, 1961. Apud VITAMIN B₆ in the nutrition of domestic animals. Basle, Suíça, F. Hoffmann-La Roche, 1965. p. 41, 53.
- 22 - FUJITA, A. & FUJINO, K. Fluorimetric determination of vitamina B₆. IV. Fractional determination of vitamin B₆ components and 4-pyridoxic acid in the urine J. Vitaminol., Osaka, 1 : 290-96, 1955.
- 23 - _____ et alii. Fluorimetric determination of vitamin B₆. I. Determination of pyridoxine. J. Vitaminol., Osaka, 1 : 267-74, 1955.
- 24 - _____. _____. II. Determination of pyridoxamine. J. Vitaminol., Osaka, 1 : 275-78, 1955.
- 25 - _____. _____. III. Fractional determination pyridoxal and 4-pyridoxic acid. J. Vitaminol., Osaka, 1 : 279-89, 1955.

- 26 - GYÖRGY, P. Effects of deficiency in man. In: SEBRELL JR., W. H. & HARRIS, R. S. ed. The Vitamins; chemistry, physiology, pathology. New York, Academic Press, 1954. v. 3, p. 280-90.
- 27 - _____. Vitamin B₆ deficiency effects in man. In: SEBRELL JR., W. H. & HARRIS, R. S. ed. The Vitamins; chemistry, physiology, pathology, methods. 2. ed. New York, Academic Press, 1968. v. 2, p. 90-104.
- 28 - _____. Vitamin B₂ and the pellagra like dermatitis in rats. Nature, 133 : 498-99, 1934.
- 29 - _____ & ECKHARDT, R. E. Vitamin B₆ and skin lesions in rats. Nature, 144 : 512, 1939.
- 30 - HAMFELT, A. A Method of determining pyridoxal phosphate in blood by decarboxylation of L-tyrosine-U-C¹⁴. Clin. Chem. Acta, 7 : 746-48, 1962.
- 31 - HARRIS, S. A. et alii. The Structure and synthesis of pyridoxamine and pyridoxal. J. Biol. Chem., 154 : 315-16, 1944.
- 32 - _____. The Vitamin B₆ group II. The Structure and synthesis of pyridoxamine and pyridoxal. J. Am. Chem. Soc., 66 : 2088-92, 1944.
- 33 - HEGSTED, D. M. et alii. The Vitamin B₆ requirement of the chick. Poultry Sci., 21 : 379-83, 1942.
- 34 - HOCHBERG, M. et alii. Chemical determination of pyridoxine; reactions in pure systems. J. Biol. Chem., 155:109-17, 1944.
- 35 - HOPKINS, R. H. & PENNINGTON, R. J. The Assay of the vitamin B₆ complex. Biochem. J., 41 : 110-14, 1947.
- 36 - HUFF, J. W. & PERLZWEIG, W. A. A Product of oxidative metabolism of pyridoxine 2-Methyl-3-Hydroxy-4-Carboxy-5-Hydroxy-Methylpyridine (4-Pyridoxic acid) J. Biol. Chem., 155 : 345-55, 1944.
- 37 - INTERNATIONAL Symposium on Vitamin B₆. Vitamins and Hormones; advances in research and applications, New York, 22 : 359, 1964.

- 38 - INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Commission of the Nomenclature of Biological Chemistry. Definitive rules for the nomenclature of amino acids, steroids, vitamins and carotenoids. J. Am. Chem. Soc., 82 : 5575-84, 1960.
- 39 - ISBELL, H. The Use of charcoal - treated peptone in micro biological assays. Science, 102 : 671-72, 1945.
- 40 - JACQUOT, R. et alii. Données générales sur la nutrition et l'alimentation. In: _____. Nutrition animale. Paris, J.-B. Baillière, 1958-1961. (Nouvelle encyclopédie agricole) v. 2, p. 1180-88.
- 41 - JONES, A. & MORRIS, S. A 24-hour plate assay technique for the vitamin B₆ complex of yeast. Analyst, 75 : 613-21, 1950.
- 42 - KERESZTESY, J. C. & STEVENS, J. C. Vitamin B₆. J. Am. Chem. Soc., 60 : 1267-68, 1938.
- 43 - KIZAWA, Kozuē. Dosagem microbiológica das vitaminas. Curitiba, 1971. p. 15-17. Trabalho para concurso de Professor assistente da cadeira de Química biológica da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Univ. Fed. Paraná.
- 44 - KREHL, W. A. & COWGIL, G. R. Vitamin content of citrus products. Food Research, 15 : 179-91, 1950.
- 45 - LANDY, M. & DICKEN, D. M. A Microbiological assay method for six B vitamins using Lactobacillus casei and a medium of essentially known composition. J. Lab. Clin. Med., 27 : 1086-92, 1942.
- 46 - LINGANE, J. J. & DAVIS, O. L. Polarographic determination of riboflavin (vitamin B₂) and other vitamin B factors. J. Biol. Chem., 137 : 567-74, 1941.
- 47 - MANOUŠEK, O. & ZUMAN, P. The Polarographic determination of pyridoxal and pyridoxal-5-phosphate. J. Eletroanal. Chem., 1 : 324-30, 1960.
- 48 - MARKS, J. The Vitamins in the health and disease; a modern

- reappraisal. London, J. & A. Churchill, 1968. p. 94-99.
- 49 - MELNICK, D. et alii. The Multiple nature of vitamin B₆. Critique of methods for the determination of the complex and its components. J. Biol. Chem., 160 : 1-14, 1945.
- 50 - MITCHELL, H. H. Comparative nutrition of the man and domestic animals. New York, Academic Press, 1964. v. 2, p. 120-25.
- 51 - MORRIS, J. G. et alii. Observations of the assay of vitamin B₆ with "Saccharomyces carlsbergensis" 4228. J. Gen. Microbiol., 20 : 566-75, 1959.
- 52 - PARRISH, W. P. et alii. A Study of the yeast method for vitamin B₆. J. Assoc. off. Agr. Chem., 38 : 506-13, 1955.
- 53 - PERUCHON DE BROCHARD, J. et alii. Table internationale de composition chimique des aliments. 6.ed. Marseille, 1957. Apud VITAMIN B₆ in the nutrition of domestic animals. Basle, Suïça, F. Hoffmann-La Roche, 1965. p. 41, 56.
- 54 - POLANSKY, M. M. et alii. Components of vitamin B₆ in grains and cereal products. J. Assoc. off. Agr. Chem., 47 : 750-53, 1964.
- 55 - RABINOWITZ, J. C. & SNELL, E. E. The Vitamin B₆ group XI. An improved method for assay of vit. B₆ with Streptococcus faecalis. J. Biol. Chem., 169 : 631-42, 1947.
- 56 - _____. Vitamin B₆ group. Extration procedures for the microbiological determination of vitamin B₆. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 19 : 277-80, 1947.
- 57 - _____. The Vitamin B₆ group. XIV. Distribution of pyridoxal, piridoxamine and pyridoxine in some natural products. J. Biol. Chem., 176 : 1157-67, 1948.
- 58 - _____ et alii. The Vitamin B₆ group. XIII. An improved procedure for determination for pyridoxal with Lactobacillus casei. J. Biol. Chem., 175 : 147, 1948.

- 59 - ROBINSON, F. A. The Vitamin B complex. London, Chapman & Hall, 1951. p. 317-38.
- 60 - _____. The Vitamin co-factors of enzyme systems. London, Pergamon, 1966. p. 352-86.
- 61 - SARMA, P. S. et alii. The bioassay of vitamin B₆ in natural materials. J. Nutr., 33 : 121-28, 1947.
- 62 - SAUBERLICH, H. E. Biochemical detection of deficiency. In: SEBRELL JR., W. H. & HARRIS, R. S. ed. The Vitamins; chemistry, physiology, pathology, methods. 2.ed. New York, Academic Press, 1968. v. 2, p. 44-74.
- 63 - SCHEINER, J. M. & DE RITTER, E. Vitamin B₆ content of feeds tuffs. J. Agr. Food Chem., 16 (5) : 746-51, 1968.
- 64 - SCUDI, J. V. The colorimetric determination of vitamin B₆. J. Biol. Chem., 139 : 707-20, 1941.
- 65 - _____ et alii. Urinary excretion of vitamin B₆ in the rat. Proc. Exptl. Biol. Med., 43 : 118-22, 1940.
- 66 - _____. A study of the urinary excretion of vitamin B₆ by a colorimetric method. J. Biol. Chem., 135 : 371-76, 1940.
- 67 - SHERMAN, H. Effects of deficiency in animals. In: SEBRELL JR., W. H. & HARRIS, R. S. ed. New York, Academic press, 1954. v. 3, p. 265-76.
- 68 - SIEGEL, L. et alii. Bound pyridoxine (vit. B₆) in biological materials. J. Biol. Chem., 149 : 361-67, 1943.
- 69 - SINCLAIR, N. A. & STOKES, J. L. Role of oxygen in the hight cells yields of psycrophiles and mesophiles at low temperatures. J. Bacteriol., 85 : 164-67, 1963.
- 70 - SNELL, E. E. Effect of heat sterilization on growth- promoting activity of pyridoxine for Streptococcus lactis R. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 51 : 356-58, 1942.
- 71 - _____ & HASKELL, B. E. Metabolism of vitamin B₆. In : STOTZ, E. H. ed. Comprehensive biochemistry. Amsterdam ,

Elsevier, 1971. v. 21, p. 47.

- 72 - _____ & KEEVIL JR., C. S. Occurrence in foods. In: SEBRELL JR., W. H. & HARRIS, R. S. éd. The Vitamins; chemistry, physiology, pathology. New York, Academic Press, 1954. v. 3, p. 255-63.
- 73 - _____ & RANNEFELD, A. N. The Vitamin B₆ group. III. The vitamin activity of pyridoxal and pyridoxamine for various organisms. J. Biol. Chem., 157 : 475-89, 1945.
- 74 - STILLER, E. T. et alii. The Structure of vitamin B₆ I. J. Am. Chem. Soc., 61 (5) : 1237-42, 1939.
- 75 - STOKES, J. L. et alii. A Neurospore assay for pyridoxine (*sitophila* 299) J. Biol. Chem., 150 (1) : 17-24, 1943.
- 76 - _____. Synthesis of pyridoxine by a "pyridoxinless" X-ray mutant of *Neurospora sitophila*. Arch. Biochem., 2 (2) : 235-45, 1943.
- 77 - STORVICK, C. A. et alii. Dados não publicados. Apud _____. Chemical and microbiological determination of vitamin B₆. Methods of biochemical analysis, 12 : 217, 272, 1964.
- 78 - STROHECKER, R. & HENNING, H. M. Analisis de vitaminas; metodos comprobados. Madrid, Paz Montalvo, 1967. p. 28.
- 79 - SWAMINATHAN, M. Chemical estimation of vitamin B₆ in foods by means of the diazo reaction and the phenol reagent. Nature, 145 : 780, 1940.
- 80 - TEPLY, L. J. Nutritional study of instant coffee powder. Food Technol., 12 (9) : 485-86, 1958.
- 81 - TOEPFER, E. W. et alii. Fluorimetric determination of pyridoxamine by conversion to pyridoxal cyanide compound. Anal. Biochem., 2 : 463-69, 1961.
- 82 - _____. Comparison of vitamin B₆ values of selected food samples by bioassay and microbiological assay. J. Agr. Food Chem., 11 (6) : 523-25, 1963.
- 83 - UMBREIT, W. W. Biochemical systems; specificity of action. In: SEBRELL JR., W. H. & HARRIS, R. S. éd. The Vitamins;

- chemistry, physiology, pathology. New York, Academic press, 1954. v. 3, p. 234-42.
- 84 - _____ et alii. The Function of pyridoxine derivates; a comparison of natural and synthetic codecarboxylase. Arch. Biochem., 7 : 185-99, 1945.
- 85 - VILLELA, G. G. Dosagem da piridoxina (vit. B₆) pelo teste da neurospora. O Hospital, 27 (5) : 735-46, 1945.
- 86 - _____. Vitaminas; métodos de dosificación. Buenos Aires, El Ateneo, 1948. p. 327-41.
- 87 - VITAMIN B₆ in the nutrition of domestic animals. Basle, Suíça, F. Hoffmann-La Roche, 1965. 57 p.
- 88 - WADA, H. et alii. J. Vitaminol., Kioto, 3 : 183-88, 1957.
- 89 - WAGNER, A. F. & FOLKERS, K. Vitamin and co-enzymes. New York, Interscience, 1964. p. 172-93.
- 90 - WALTER, M. Dados não publicados. Apud VITAMIN B₆ in the nutrition of domestic animals. Basle, Suíça, F. Hoffmann-La Roche, 1965. p. 40, 57.
- 91 - WEBER, F. et alii. Deficiency effects in animals. In: SEBRELL, JR., W. H. & HARRIS, R. S. ed. The Vitamins; chemistry, physiology, pathology. New York, Academic Press, 1968. v. 2, p. 80-90.
- 92 - WILLIAMS, M. A. Conocimientos actuales sobre la vitamina B₆ Traducido por el Instituto de nutrition del Centro Americano Panama. New York, The Nutrition Foundation, 1967. p. 76-83.
- 93 - WILLIAMS, R. J. et alii. Assay method for pyridoxin. Texas, Univ. Texas, 1941. (Publication, 4132) p. 24.