

DOSAGEM MICROBIOLÓGICA DE TIAMINA (VIT. B₁) EM CULTIVARES DE SOJA (*GLYCINE MAX*) L. MERRILL^c

SHIDUCA ITOW JANKEVICIUS^a
REGINA CELI SCORPIONE^b
DEISE TIHE TAKAOKA^b
JOSÉ VITOR JANKEVICIUS^a

RESUMO

Utilizando-se método microbiológico, foi quantificada a vitamina tiamina (vit. B₁) em cultivares de soja (*Glycine Max*) safras 1982(47) e 1984(96). Os valores encontrados demonstram que esta vitamina não apresenta variações quantitativas significativas entre as variedades genéticas analisadas, porém foi observada perda da atividade biológica desta vitamina durante a estocagem dos grãos.

PALAVRAS-CHAVE: Dosagem microbiológica; Vitaminas; Tiamina; Soja.

1 – INTRODUÇÃO

As vitaminas são constituintes alimentares importantes, já que são substâncias essenciais à vida e a sua quantificação é crucial, uma vez que a sua falta torna-se prejudicial à saúde do consumidor (FAO/WHO, 1967; HARRIS, 1938).

O Brasil, 2^o produtor mundial de soja, apresentou na safra 1979/80 uma produção de aproximadamente 15 milhões de toneladas (CABRAL & MODESTA, 1982) enquanto que o estado do Paraná constitui o 2^o produtor nacional tendo obtido uma elevação constante de sua produção passando de uma média de 104 mil toneladas (1961/70) para quase 5,5 milhões de toneladas em 1980 (BADEP, 1985).

Existem evidências que o teor vitamínico de vegetais consumidos na alimentação humana está mais intimamente relacionado à variedade genética do cultivar do que às condições exógenas de cultivo (OLIVEIRA et alii, 1981).

A literatura tem demonstrado esta preocupação (FRANCO, 1968) e importantes informações gerais foram obtidas sobre vitaminas em alimentos como a mandioca, almeirão (CAMPOS, 1944), castanha (CRAMER, 1960), várias vitaminas em peixes e crustáceos (RIBEIRO et alii, 1972) e este mesmo autor determinou o teor de colina em 9 variedades genéticas de soja (1981).

Existe ainda uma preocupação quanto à padronização de métodos utilizados para a detecção destas vitaminas, como os estudos de GROSSOWICZ et alii, (1981); YAMAHA et alii (1980); ANDERSON et alii (1986);

BOETTICHER et alii (1986); MOCHIDA et alii (1984) e SHANE et alii (1980).

Vários microrganismos apresentam como nutrientes essenciais as mesmas vitaminas indispensáveis ao homem e animais. Assim, devido à grande semelhança metabólica existente entre os microrganismos e seres superiores, o método microbiológico é o único que quantifica a atividade biológica das vitaminas, não importando a concentração total da forma inativa e nem dos demais nutrientes presentes no material a ser analisado.

Neste trabalho, o nosso objetivo foi a quantificação microbiológica da vitamina tiamina (B₁) nas diferentes variedades genéticas de *Glycine max* fornecidas pela EMBRAPA-CNPq.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

Extração da vitamina: foi realizada segundo KANASAWA et alii (1966) em que 2g de grão seco/10ml de água destilada estéril de cada cultivar foi amolecido e triturado após repouso de 10 a 12 horas a 45°C, completando-se o volume para 20ml. Cerca de 2g de cada amostra diluída foi submetida à hidrólise ácida com ácido sulfúrico 0,1N seguido de aquecimento até ebulição, esfriada, ajustado o pH 5,0, centrifugada e o sobrenadante utilizado como fonte de vitamina.

Dosagem microbiológica: o método utilizado foi o de BAKER et alii (1968).

Para a safra 1982 foi utilizado o protozoário *Ochromonas danica* e o meio de cultura utilizado na dosagem

a. Departamento de Patologia Geral – CCB/UUEL.

b. Bolsistas de Iniciação Científica – CNPq.

c. Financiado pela CPG/UUEL e CNPq.

consistia de (g%): ácido nitriloacético 0,04; KH_2PO_4 0,06; MgCO_3 0,04; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,08; 1-arginina HCl 0,08; glicose 2,0; biotina 0,000002; mistura de sais (mg%): Fe^{2+} 0,093; Zn^{2+} 0,047; 0,024; Cu^{2+} 0,0037; Co^{2+} 0,0047; B^{2+} 0,0047; Mo^{1+} 0,0024 e V^{2+} 0,0005.

Para a safra 1984 foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* JM-101, mutante auxotrófico para tiamina e o meio quimicamente definido de Davis (g%): KH_2PO_4 0,3; K_2HPO_4 0,7; $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 0,1; citrato de sódio 0,05; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01, glicose 1,0 e prolina 0,1.

A curva padrão para ambos os microrganismos utilizou as concentrações de tiamina de 0,0 a 25ng/ml dando perfis semelhantes e o inóculo foi padronizado na forma de 1 gota da fase log de crescimento do microrganismo, após estarvado no meio definido sem tiamina. O volume médio do sobrenadante da extração da vitamina foi estabelecido em 0,1ml de cada amostra, alterando-se esta alíquota nos casos extremos da fase linear da curva padrão. O crescimento foi avaliado através de leituras em espectrofotômetro Aus Jena, modelo Spekol no comprimento de onda de 450nm após incubação por 20 horas a 37°C, com agitação para a bactéria e o protozoário foi incubado durante 4 dias com temperatura entre 28°-32°C e as condições de luminosidade obtidas utilizando-se lâmpada fluorescente de 40 watts ou de 20 watts e lâmpada incandescente de 100 watts, a 80cm de distância.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 47 cultivares de *Glycine max* da safra 1982 e 96 variedades genéticas da safra 1984.

TABELA I

Concentração de tiamina em grãos de soja
Safra 1984: 14 a 20 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de grão
Safra 1982: 20 a 37 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de grão

CULTIVAR	1982 $\mu\text{g}\%$ de grão	1984 $\mu\text{g}\%$ de grão
Amarela comum		19,1
BR - 3	33,0	20,0
BR - 5	25,1	17,9
BR - 8		19,0
BR - 9		16,3
BR-12		20,0
Campos Gerais	31,5	18,5
CEP - 10		19,0
Cobb	30,0	19,0
Doko		19,2
Dourados		16,4
Engopa - 301		18,4
Flórida	29,6	16,0
FT - 3		20,0
FT - 6		19,8
FT - 9		14,5
FT - 10		19,0
Hood		20,0
IAC - 5	36,7	16,0

IAC - 9		18,2
IAC - 11		15,2
IAC - 12		19,4
IAS - 3 Delta		19,2
IVAI		16,0
Ivará	21,2	16,4
J - 200		17,9
LC - 72749		19,3
Majós		19,2
Missões	20,0	17,1
Ocepar - 5 Piquiri		18,7
Pelicano		17,5
Prata	25,7	16,7
Santa Rosa	36,7	16,0
Sertaneja		19,0
Sulina	31,3	16,7
Tiarajú		18,6
Tropical		19,2
UFV - 4		19,8
UFV - 6		18,5
UFV - 7		18,3

TABELA II

Concentração de tiamina em grãos de soja
Safra 1982: 23 a 45 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de grão
Safra 1984: 21 a 25 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de grão

CULTIVAR	1982 $\mu\text{g}\%$ de grão	1984 $\mu\text{g}\%$ de grão
Bienville	30,9	25,2
Bossier	33,7	20,1
Bragg	25,9	22,9
BR - 2	41,2	24,3
BR - 4	30,6	25,1
BR - 6	32,9	24,7
BR - 7		20,5
BR - 10		20,2
BR - 11		22,9
Cristalina		23,6
Coker - 136	31,2	24,0
Década		20,1
FT - 1	26,2	21,0
FT - 4		20,5
FT - 7		23,0
Hampton		24,4
Hardee	26,6	21,7
IAC - 2	32,2	22,8
IAC - 3	32,4	23,0
IAC - 8	31,1	21,0
IAC - 10		20,1
IAS - 3	29,6	22,8
IAS - 4		21,1
Ipagro - 20		22,9
Lancer	23,5	21,3
Mineira	42,3	23,0
Numbaira		21,0
Ocepar - 2		23,2
Ocepar - 3		22,0
Ocepar - 4		20,5
Paraná	27,1	22,4
Paranagoiana		24,0
Pérola	27,8	23,6
Sant'Ana	28,6	22,9
São Luiz	23,6	23,9
UFV - A	33,0	24,8
UFV - 1	39,8	25,0

UFV - 3	45,0	23,0
UFV - 8		20,5
UFV - 9		21,0
UFV - 10		22,5
União	27,5	21,0
Vila Rica	31,0	25,0

TABELA III

Concentração de tiamina em grãos de soja
 Safra 1982: 26 a 49 $\mu\text{g}/100$ de grão
 Safra 1984: 26 a 49 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de grão

CULTIVAR	1982 $\mu\text{g}\%$ de grão	1984 $\mu\text{g}\%$ de grão
Andrews	34,9	26,6
BR - 1	48,7	35,7
CEP - 12		26,7
Davis	32,0	27,6
FT - 2	26,2	25,8
IAC - 4	41,2	26,0
IAS - 2	33,7	27,3
Industrial	35,6	26,0
Pampeira	33,0	27,4
Planalto	27,2	27,7
Timbira	26,0	
UFV - 2	45,0	30,0
Viçosa	33,0	26,7

Um aspecto fundamental é a vantagem da utilização do método microbiológico para a quantificação de vitaminas, pois esta técnica baseia-se na avaliação fisiológica da vitamina diferindo do método químico ou imunológico que detecta a molécula, mesmo biologicamente inativa.

Os dois microrganismos auxotróficos foram testados e após a verificação da sobreposição das duas curvas padrões,

passamos a utilizar a bactéria *E. coli* para as demais quantificações devido à facilidade de sua manipulação.

Os nossos resultados demonstram que o teor da vitamina tiamina (B_1) não sofre variações quantitativas significativas entre os diversos cultivares de soja analisados e microrganismos utilizados em que houve sobreposição das curvas padrões.

Porém, um aspecto observado é o da perda de atividade biológica da vitamina durante a longa estocagem. Isto é facilmente observável (Tabela I, II e III), onde a tiamina da safra 1982 foi quantificada logo após a coleta de grãos de soja, enquanto o doseamento da safra 1984 foi realizado cerca de 12 meses após a colheita. Este fato foi observado também com a vitamina pura (mantida em geladeira) utilizada nas curvas padrões. No decorrer deste trabalho, foi verificado que a atividade biológica da mesma só é mantida quando armazenada a -15°C .

Isto constitui um fato importante na área da nutrição, onde a soja e derivados são consumidos, sob a forma de grãos, farinha, carne de soja, tofú, temperos, etc na alimentação humana, animal e de aves, pois o período de estocagem destes alimentos pode influir no teor da vitamina biologicamente ativa, dados estes já demonstrados por BOKORI & ANDRASOFSZKY ao investigar a estocagem de milho em 1985.

Levando-se em consideração a participação desta vitamina como cofator em diversas etapas metabólicas vitais em tecidos animais, principalmente na forma de tiamina-pirofosfato, coenzima essencial nas reações catalizadas por carboxilases específicas, participando em quase todas as descarboxilações oxidativas que conduzem à formação de CO_2 , a sua deficiência pode causar doenças como béri-béri, problema gastro intestinal, polineurite, etc (NISHINO, 1986), e o conhecimento da sua concentração em alimentos tem grande interesse na nutrição humana e animal.

ABSTRACT

The vitamin thiamine (B_1) was evaluated in soy-bean (*Glycine max*) cultivars, 1982/84 harvests, utilizing the microbiological method. The values found demonstrate that this vitamin did not present significant variations between genetic varieties but loss of biological activity of the vitamin was observed during grain storage.

KEY WORDS: Microbiological dosage; Vitamins; Thiamine; Soy-bean.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, S.H.; VICKERY, C.A.; NICOL, A.D. Adult thiamin requirements and the continuing need to fortify processed cereals. *LANCET*, 2(8498):85-89, 1986.
- ARAÚJO, A.R.P. & PORTELA, Z. Teor de piridoxina e ácido nicotínico em feijões do nordeste brasileiro. *Ann. Inst. Quim. Un., Recife*, 1:149-160, 1965.
- BADEP. *Paraná Informações*, 1985.
- BARKER, H. & FRANK, O. Clinical vitaminology. New York, Jo N. Willy & Sons, 1968. p.7-198.
- BOETTICHER, B. & BOETTICHER, D. Simple rapid determination of thiamin by high-performance liquid chromatography method in foods, body fluids urine and feces. *INT. J. VITAM. NUTR. RES.*, 56(2):155-160, 1986.

6. BOKORI, J. & ANDRASOFSZKY, T. Complex investigation of the storage and finding value of wet (by fermentation) preserved maize: 7 vitamin B content of maize preserved wet by different methods. *MAGY ALLATORY LAPJA*, 40(40):215-220, 1985.
7. CABRAL, L. & MODESTA, R.C.D. *Soja na alimentação humana*. EMBRAPA, CTAA/001/82.
8. CAMPOS, M.F.A. Algumas pesquisas sobre o almeirão. *BRASIL MÉDICO*, 45:3-16, 1944.
9. FAO/WHO. Requirements of vitamin A, thiamine, riboflavin and niacin. *41* (362), 1967.
10. FRANCO, G. *Teor vitamínico dos alimentos*. Rio de Janeiro, José Olympio, 1968. p.3-141.
11. GROSSOWICZ, N.; WACSMAR, S.; SCHREIDER, C. Crioprotected *Lactobacillus casei*: an approach to standardization of microbiological assay of folic acid in serum. *CLIN. CHEM.*, 27(5):745-747, 1981.
12. KANASAWA, A.; SAITO, A.; IDLER, D.R. Vitamins B in Dulce (*Rhodymenia palmata*). *J. FISH. RES. BD. CANADA*, 23:915-916, 1966.
13. MOCHIDA, K.; NAKAMURA, T.; FUJITA, K. Automatic determination of thiamin and its phosphates by the use of thiaminase I. *BULL. FAC. AGRIC. SHIMANE UNIV.* Japan, 0(18):193-196, 1984.
14. NISHINO, K. Study on the mechanism of disease caused by abnormal thiamin metabolism. *ASIAN MED. J.*, 29(3): 157-161, 1986.
15. OLIVEIRA, E.N.S.; KIZAWA, K.; CAMPOS, B. Análise microbiológica de ácido nicotínico e trigomelina em cafés brasileiros. *REV. MICROBIOL.*, 3(2):173-176, 1972.
16. RIBEIRO, S. & ROITMAN, I. Dosagens microbiológicas de vitaminas em peixes e crustáceos. II-Tiamina, biotina, ácido nicotínico, ácido pantotênico, riboflavina e piridoxina. *REV. MICROBIOL.*, 4(4):61-66, 1972.
17. RIBEIRO, S.; MAMFRIM, A.J.V.; MATTOS, I.G. Dosagem microbiológica de colina em feijão de soja (*Glycine hispida*). *AN. MICROBIOL.*, 26:103-108, 1981.
18. SHANE, B.; TAMURA, T.; STOKSTAD, E.L.R. Folate assay: a comparison of radioassay and microbiological methods. *CLIN. CHIM. ACTA.*, 100(1):1320, 1980.
19. YAMADA, M. A microbiological assay of folate by cup plate method using *Lactobacillus casei* as a test organism. *VITAMINS KYOTO*, 55(1):23-30, 1981.