

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

BIOSSÍNTESE DA BIOTINA
A PARTIR DE
RESÍDUOS DA BATATA

EDUARDO ROMAN BALSECA
Engenheiro Químico

Orientadores:
Dr. Ricardo Sadir e
Dr. Waldemiro Sgarbieri
Professores da FTA da UNICAMP.

Dissertação apresentada à Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências em Tecnologia de Alimentos.

1972

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A :

MARIANITA

zoily, lily e margarita.

AGRADECIMENTOS

Aos professores, Dr. Ricardo Sadir e Dr. Waldemiro Sgarbieri, pelas suas orientações e dedicações na preparação d^oeste trabalho.

À Eng^o. Tecnóloga de Alimentos Maria Amélia Chaib, ao Farmacêutico Arlindo Moreira Sales e muito especialmente ao Diretor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos, Dr. André Tosello, por sua ajuda e facilidades proporcionadas ao autor.

Aos funcionários da Fundação Centro Tropical de Pesquisa de Tecnologia de Alimentos (F.C.T.P.T.A.), por sua colaboração.

À Organização dos Estados Americanos, pela oportunidade e ajuda econômica facultada, para que este trabalho fosse realizado.

À Universidade Luís Vargas Tôrres de Esmeralda, Equador por seu patrocínio no curso de Tecnologia de Alimentos.

À todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

INDICE

página

RESUMO

RESUMEN

SUMMARY

1. - INTRODUÇÃO	1
1.1. - Biotina	2
1.2. - Resíduos de batata	3
1.3. - Produção de biotina a partir de resíduos de batata	4
1.4. - Biossíntese da biotina	4
2. - DESENVOLVIMENTO	7
2.1. - Biotina	7
2.1.1. - Isolamento	8
2.1.2. - Estruturas	9
2.1.3. - Síntese química	9
2.1.4. - Síntese comercial	12
2.1.5. - Derivados com atividade biológica semelhante	12
2.1.6. - Utilização da biotina	14
2.1.7. - Valor comercial	17
2.2. - Resíduos de batata	18
2.2.1. - Aspectos gerais	18
2.2.2. - Condições dos Resíduos	19
2.3. - Produção de Biotina	26
2.3.1. - Presença de biotina em lagos e correntes	26
2.3.2. - Biossíntese da biotina	32
2.3.3. - Provas Microbiológicas da Bios- síntese	44
3. - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	55
4. - QUADROS	64
5. - FIGURAS	79
6. - BIBLIOGRAFIA	99

P E S U M O

A presença da biotina, vitamina do complexo B, em correntes aquáticas e a dificuldade de obter biotina com atividades biológicas pela síntese química, motivaram a busca de novos métodos.

Atualmente se obtém biotina por fermentação, aproveitando a faculdade de biossíntese do *Esporobolomyces*. Nesta investigação bibliográfica, se analisa a possibilidade de produzir biotina em lagoas facultativas que recebem os resíduos de indústrias de batatas que são estabilizados por oxidação biológica, e utilizados como meios nutrientes. O grupo *E. Coli*, e em especial *Aerobacter aerogenes*, tem a faculdade de sintetizar biotina. Nesse processo estão associadas às algas (*Chlorella vulgaris*) responsáveis pela fotossíntese e às bactérias (*Tiocapsa floridana*) que consomem e armazenam biotina e além disso permitem o desenvolvimento das algas.

O tratamento é feito principalmente em lagoas facultativas em que se desenvolvem organismos tanto aeróbios e anaeróbios.

As condições ótimas em lagoas facultativas para a biossíntese são: temperatura da água 10 a 30°C, temperatura ambiente 15 a 25°C, profundidade da lagoa 1,2 a 2,6m pH 7 a 7,5, carga residual tratada 17 a 250kg de BOD/ha/dia e ausência total de algas verdes azuladas, causadoras do odor desagradável da lagoa. Como precursores para a biossíntese se requerem aminoácidos livres e hidratos de carbono.

Nos resíduos de batata se encontram especialmente L-alanina, serina, ácido glutâmico, que respondem em forma excelente às exigências do *A. aerogenes*.

Outro precursor indispensável para a biossíntese é o ácido ni
mélico, obtido pela degradação dos carboidratos. A sequencia
mais aceitável da biossíntese é:

Ácido pimélico (AP) —————> 7-OxO-8-amino polargônico(7-KAP) —>
Ácido 7,8-diamino polargônico (DAP) —————> destiobiotina -(DTB)
—————> Biotina.

O produto final que é retirado das lagoas em forma de uma mas
sa micelial de algas, bactérias e biotina pode ser utilizado
diretamente como meio nutritivo para a síntese microbiológica,
ou para a alimentação de peixes, aves e outros animais.

Da massa micelial hidrolizada se pode separar a biotina e nu
rificá-la para uso medicinal.

Os rendimentos alcançados são de 55-10.000 ng/litro de água
residual tratada.

RESUMEN

La presencia de la biotina, vitamina del complejo B, en corrientes acuáticas y la dificultad de obtener biotina con actividad por la síntesis química, motivaron la búsqueda de nuevos métodos. Actualmente se obtiene biotina por fermentación, aprovechando la facultad de biosíntesis del *Esporobolomyces*. En esta investigación bibliográfica, se analiza la posibilidad de producir biotina en lagunas facultativas que reciben los residuos de industrias de patata que son estabilizados por oxidación biológica y utilizados como medios nutrientes. El grupo de *E. coli* y en especial el *Aerobacter aerogenes*, tiene la facultad de sintetizar biotina. En este proceso están asociadas las algas (*C. vulgaris*) responsables por la fotosíntesis y las bacterias (*T. floridana*) que consumen y almacenan biotina y además permiten el desenvolvimiento de las algas.

El tratamiento es realizado en lagunas facultativas en las que se desarrollan organismos tanto aerobios como anaerobios.

Las condiciones óptimas en las lagunas facultativas para la biosíntesis son: temperatura del agua 10 a 30°C, temperatura ambiente 15 a 25°C, profundidad de la laguna 1.2 a 2.5m, pH 7 a 7.5, carga residual tratada 17 a 250kg de BOD/ha/día y ausencia total de algas verde-azuladas, que causan el olor desagradable en la laguna. Como precursores para la biosíntesis se requieren aminoácidos libres o hidratos de carbono. En los residuos de patata se encuentran especialmente L-alanina, serina, ácido glutárico, que responden en forma excelente a las exigencias del *A. aerogenes*. Otro precursor indispensable para la biosíntesis es el ácido pimélico, obtenido por la degradación de los carbohidratos. La secuencia más aceptable

de la biosíntesis es:

Acido pimélico (AP) —————→ Acido 7-oxo-8-aminopelargónico
(7-KAP) —————→ Acido 7,8-diaminopelargónico (DAP) —————
————→ Desthiobiotina (DTB) —————→ Biotina.

El producto final que es retirado de las lagunas en forma de una masa miceliar de algas, bacterias y biotina, puede ser utilizada directamente como medio nutritivo para la síntesis microbiológica, o para la alimentación de peces, aves y otros animales.

De la masa miceliar, se puede separar la biotina y purificarla para uso medicinal. Los rendimientos alcanzados son de 55-10.000 ng/de biotina/litro de agua residual tratada.

S U M M A R Y

The presence of biotin in lakes, rivers and sea and the difficulty in obtaining biologically active biotin by chemical synthesis motivated the search for new methods of synthesis.

At present biotin can be obtained by fermentation with *Esperoboromyces*.

In this bibliographic investigation the possibility of production of biotin in facultative lagoons receiving potatoes industrial waste is considered. The wastes are first stabilized by oxidation and then fermented by various microorganisms with production of biotin and other vitamins of the B complex.

The *Escherichia Coli* group and specially *Aerobacter aerogenes* produce biotin and in this process they are in association with the alga *Chlorella vulgaris* and the purple sulfur bacterium *Tiocardia floridana* that stores most of the vitamin (biotin) produced in their cells.

The most common treatment is made in facultative lagoons under aerobic and anaerobic conditions requiring in addition the following: water temperature 10 to 30°C; ambient temperature 15 to 25°C; deepness of the lagoon 1.2 to 2.6m; pH 7-7,5; treated residual load 17-250kg of BOD/ha/day. It is also required absence of green-bluish algal responsible for unpleasant odor in the lagoon. The precursors of biotin are free amino acids and carbohydrates. In the wastes from potatoes are found mainly L-alanina, serine, glutaric acid, which satisfy the requirement of *A. aerogenes* for the biosynthesis of biotin.

The indispensable precursor of biotin is pimelic acid that can be formed through the degradation of carbohydrates.

The most acceptable sequence for the biosynthesis is:

Pimelic Acid (AP) \longrightarrow 7-oxo-8-aminopelargonic acid (7-KAP)
 \longrightarrow 7,8-diaminopelargonic acid (DAP) \longrightarrow desthiobiotin (DTB) \longrightarrow biotin.

The final product which is recovered from the lagoon as a micellar mass of algal and bacteria can be used as such in microbiologic media or as feed for fishes, poultry and other animals. The purified final product of the microbiological synthesis (biotin) can be used in medicine.

The yield in the process range from 55 a 10,000 ng/l of treated residual water (liquid waste).

INTRODUÇÃO

1. Generalidades

O progresso da tecnologia de alimentos implica enfrentar no vos problemas que se resolvem na maioria dos casos, a custos elevados.

No processamento de vegetais e frutas o problema da poluição causado pelos resíduos que em grande parte estão dissolvidos na água, agrava-se dia a dia.

Tal é o caso, no processamento de batatas cujos resíduos podem ser aproveitados como uma fonte de matéria orgânica para a ob tenção de proteínas ou vitaminas. Consideramos no presente trabalho, a possibilidade de se obter biotina, uma vitamina do complexo B, utilizando-se os resíduos de batatas e aplican do os princípios de um novo campo de extraordinárias perspec tivas para a Ciência e A Tecnologia de Alimentos que é a sín tese microbiológica.

Como os resíduos de batatas são ricos em carboidratos, proteí nas, aminoácidos livres e minerais, considerou-se sua utiliza ção em lagoas de oxidação ou estabilização onde se realiza a biossíntese de biotina, que se crê esta a cargo do *Aerobac* *ter aerogenes*.

Propõe-se além disso, a possibilidade de utilizar os resíduos da produção de amido e da indústria açucareira, especialmente beterraba.

O processo, do ponto de vista de equipamentos e técnicas é

por demais simples e de baixo custo, o qual está nestas condições, em amplo contraste com a possibilidade que se visa, da obtenção de produtos de alto valor nutricional e comercial.

1.1. Biotina

Corresponde ao ácido (+) - cis-hexahidro-2-ceto-1H-thieno (3,4)-imidazolidonico-4-valérico ($C_{10}H_{16}H_2O_3S$), opticamente ativo, comportando-se como ácido monocarboxílico.

Os primeiros trabalhos de síntese (1945-1947), foram puramente químicos, partindo do ácido cloroacético e derivados sódicos da cisteína. Em todo caso foi estabelecido que a forma dextro é biologicamente ativa e que existem derivados com atividade biológica semelhante, como a biocitina encontrada nos tecidos animais e a destiobiotina ativa, encontrada nos microorganismos.

A biotina participa durante o metabolismo numa série de reações de importância como desaminação, carboxilação e descarboxilação.

Sua deficiência pode ser causada pela avidina, uma proteína, que bloqueia a sua ação vitamínica. Comprovou-se em animais e aves que a deficiência de biotina facilita a infecção causada por *Plasmodium lophurae*. Comprovou-se em ratos que a deficiência de biotina diminuiu a produção de anticorpos permitindo a reprodução do *Trypanosoma lewigi*. Estima-se também que existe uma relação entre a deficiência de biotina e a de ácido pantotênico. Em ratos a deficiência de biotina causa anemia, tendo-se demonstrado que é possível evitá-la com 0.005 a 0.025 mg/100g de dieta.

Nakanara e Vignaud comprovaram que o câncer que é induzido em ratos pelo pigmento da manteiga (NN-dimetil-amino-azo-ben-zeno) era controlado pela administração de biotina. Efeitos cancerígenos também foram comprovados com avidina do ovo.

No homem comprovou-se a sua essencialidade pelos efeitos da deficiência induzida que se manifesta com dermatite, depressão e náuseas.

O valor comercial, tirado dos Anuários de Comércio Exterior, na seção importações e de catálogos de produtos químicos de Pierser Products, para biotina em cristais, é de Cr\$400,00 por grama.

1.2 Resíduos de batatas

Esses resíduos contêm água de lavagem, amido e restos de pele. A presença de hidratos de carbono, proteínas, aminoácidos livres (alanina, ácido glutâmico, tirosina, leucina, valina) e sais minerais, satisfazem os requerimentos para a síntese microbiológica.

Os resíduos que serão utilizados para a produção de biotina, são tratados previamente por peneiramento e sedimentação para reduzir o valor de BOD (demanda biológica de oxigênio) e em seguida são despejados em lagos facultativos de oxidação ou estabilização onde se processa uma série de reações aeróbicas, anaeróbicas e facultativas com a participação dos microrganismos presentes.

1.3 Produção de biotina, a partir de resíduos da batata.

Tomando como antecedente a presença de biotina no mar, lagos e rios, foram realizadas em Grafton-Forks, North Dakota, Estados Unidos durante 1968-1969, as primeiras experiências para se obter biotina a partir dos resíduos de batatas. Os microrganismos participantes foram *Aerobacter aerogenes*, produtor (excretor) da biotina, *Chlorella vulgaris* e *Thiocapsa floridana*, utilizadores da biotina. Obtiveram-se rendimentos (comprovados por ensaios microbiológicos) da ordem de 55-10.800 ug/l de carga residual tratada. Estudaram-se, além disso, as possibilidades de se obter biotina a partir dos resíduos de indústrias açucareiras de beterraba e resíduos domésticos.

Estudou-se cuidadosamente as relações ecológicas para a produção de biotina especialmente temperatura, pH, profundidade de lagoa, altitude, volume e condições da carga residual tratada.

A presença de biotina, foi constatada através de provas de laboratório realizadas com mutantes de *Serratia marinorubra* consumidores de biotina. Outra prova foi realizada com *Amphidinium carteri* mediando-se a absorção de ¹⁴C e determinando-se a biotina nos resíduos orgânicos com *Lactobacillus arabinosus* *Lactobacillus plantarum*.

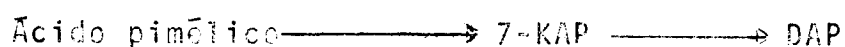
1.4 Biossíntese da biotina

A possibilidade de se obter biotina como produto excretado pelo *Aerobacter aerogenes* tinha sido delineada sem contudo ter-se estudado os mecanismos da biossíntese. No presente trabalho faz-se referência a várias experiências sobre a biossíntese de biotina, que têm sido devidamente comprovadas.

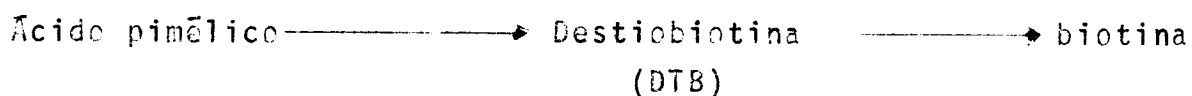
A - A partir de ácido pimélico - Este ácido é precursor na biossíntese (possivelmente se forma a partir de três moléculas de malonil coenzima A), combinando-se com a cisteína e com o carbamílo fosfato (produzido no ciclo da uréia em presença da carbamílo-fosfoquinase). O microrganismo responsável pertence ao gênero *Aeromobacter*.

B - Síntese enzimática do ácido 7-oxo-8-aminopelargônico (7-KAP). Neste caso parte-se da alanina e pimelil COA para obter um intermediário da biossíntese que é o 7-KAP. O microrganismo responsável é o mutante K-12 de *Escherichia coli* o qual excreta 7-KAP. Considera-se além disso, a possibilidade de início da síntese com serina ou ácido glutárico.

C - Síntese enzimática do ácido 7,8-diaminopelargônico (DAP). É outro intermediário na biossíntese, o qual foi obtido a partir de serina, bicarbonato de sódio e glicose como fontes de CO₂. Neste caso o ácido pimélico funciona como seu precursor. O enzima desta catálise foi purificado e caracterizado como sendo o responsável pela formação do anel uréido da biotina. Os microrganismos participantes correspondem ao grupo de mutantes K-12 do *Escherichia coli*. A sequência na síntese ficou bem estabelecida na seguinte ordem:



D - Biossíntese de biotina a partir de destiobiotina-A destiobiotina é o último intermediário na síntese da biotina. Tal aspecto pode ser observado no metabolismo da *Rhodotorula flava* cuja sequência estabelecida foi a seguinte:



Foram diferenciadas 60 tipos de auxótrofos de biotina, pertencentes à espécie *Escherichia coli* e classificados em quatro grupos, três dos quais excretam biotina. Com estas diferenças comprovou-se que na biossíntese da biotina, a destiobiotina é um intermediário.

A sequência da síntese é como segue:

Ác. Pimélico → 7-KAP → DAP → TDB → biotina

A cisteína não intervém como precursor.

Finalmente, a título de informação dá-se a conhecer alguns detalhes da síntese industrial (já patenteada) que se baseia no seguinte:

O género *Esporochoromices* forma biotina em meios que contêm ácido azelaico.

A Produção é por fermentação.

A biotina obtida e purificada, pode ser utilizada em medicina ou sem purificação, na alimentação de animais.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 - Biotina

A biotina é importante, especialmente no desenvolvimento de microrganismos. Pasteur e Liebig (1890), estabeleceram que o crescimento de leveduras era eficiente quando se partia de substratos formados por materiais albuminosos, considerados como "fatores essenciais". Em 1902, se estabeleceu que as linhagens de leveduras não alcançavam um desenvolvimento normal em soluções de sal e açúcar, e que os resultados eram bons adicionando peptona ou extrato de carne. O conjunto de fatores que aceleravam a atividade das linhagens foi denominado de "Bios". Em 1924, foi isolado e fracionado em três substâncias essenciais para o crescimento de microrganismos. (48,13,42).

"Bios" I, identificado como Meso-inositol.

"Bios" IIA, substituível por ácido pantotênico para algumas linhagens de microrganismos e por B-alanina suplementada com L-leucina para outros.

"Bios" IIB, identificado como Biotina.

Nos anos seguintes até 1930, se estabeleceu que o Bios IIB era um fator para respiração e crescimento de *Rhizobium trifolii*. Este Fator foi considerado como Fator B (coenzima) em nutrição, e denominado vitamina H. Posteriormente, o Fator B, coenzima B ou vitamina H, foi identificado como Biotina.

Os primeiros trabalhos de isolamento apresentaram sérias dificuldades, sendo necessários procurar substratos mais ricos. A gema de ovo deu os melhores resultados, servindo de base para

isolar a biotina na forma de seu éster metílico cristalino.

Na mesma época, foram isolados de organismos vivos um fator de proteção, fator X, a vitamina H e um outro fator protetor de lesões, causadas pelo uso excessivo de ovos na alimentação. Todos estes fatores demonstraram ter idêntica atividade em relação à biotina, diferenciando-se no ponto de ebulição e no poder rotatório.

Nos últimos anos, comprovou-se que a biotina extraída da gema de ovo (alfa-biotina) e a extraída de organismos vivos (beta-biotina), são praticamente iguais.

2.1.1. - Isolamento

É possível separar a biotina de extratos hidrolizados com papaína, pepsina, ou de leveduras. Um trabalho técnico constituiu em separar a biotina de 1000 ovos frescos, tratados com acetona, precipitando o filtrado com quatro volumes de álcool e eliminando as impurezas da solução aquosa com acetato de chumbo (49). O princípio ativo foi precipitado com ácido fosfo-tungstônico. Posteriormente, a amostra foi purificada com hidróxido de bário, utilizando-se depois carvão ativado para adsorção da biotina presente no filtrado. Finalmente, efetuou-se uma lavagem preliminar do adsorvente com etanol a 50%, e em seguida, separou-se a biotina com acetona a 60% contendo 2,5% de amônia. Para uma eliminação total das impurezas, utilizaram-se ácidos bromopictônico e rufínico. A biotina foi obtida em forma cristalina, com um rendimento de 1,1 mg. de biotina cristalizada por 250 kg de gema de ovo seca.

2.1.2 - Estrutura

Foi comprovado, que a biotina, citado em (49,13,42) corresponde ao ácido (+) - cis-hexaidro-2-ceto-1H-tieno-(3)-imidazol-4-valérico, que se comporta como ácido carboxílico. A figura 1 mostra a estrutura da biotina, demonstrada com as seguintes reações:

a. mediante provas com ninidrina e pelo método de Van Slyke, demonstrou-se a ausência de grupos amino e anéis nitrogenados básicos. Além disso, pelas reações com ácido iodídrico (HI), se comprovou a ausência de grupos OCH_3 , NCH_3 e SCH_3 .

b. por hidrólise com hidróxido de bário, se transformou a biotina (1') em ácido diaminocarboxílico (2'), e por oxidação se obteve ácido adípico (3'). Se o éster etílico de biotina (5') é submetido a degradação de Curtius, dá um derivado uretano (6'), que em presença de hidróxido de bário, se transforma em ácido adípico (3'), evidenciando assim, a presença de um ácido d-valérico como cadeia lateral da biotina.

2.1.3. Síntese Química

A biotina contém três centros de assimetria, e sua molécula pode ocorrer com orientação cis ou trans, em forma de quatro pares racêmicos. As duas formas cis estão representadas por (\pm)-biotina e (\pm)-epibiotina. As duas formas trans correspondem a (\pm)-allobiotina e (\pm)-epiallobiotina. De todos os isômeros somente a forma (+)-biotina apresenta atividade biológica (49,13,42).

A primeira síntese foi realizada em 1943/45, por Harris, e co lab. a partir de derivados do tiofeno.

A síntese inicia-se com a condensação do ácido cloracético (a) e o derivado sódico da cisteína (b) para obter-se um aminoácido intermediário (c). Este aminoácido por benzoilação e esterificação origina o éster benzoamida, que por ciclização alcali-induzida e descarboxilação ácido-catalítica, se transforma em 4-benzamida-3-ceto-tiofano (d). A 4-benzamida-3-ceto-tiofano, por condensação com gama-carbometil-butiraldeído em presença de ácido valérico, dá a alfa-gama-cetona insaturada (e), que em presença de hidroxilamina se transforma na oxima insaturada (f). Em seguida, esta oxima é reduzida com zinco e ácido acético a 3-aceto-amino-4-benzamida-2-(4-carbometoxibutil) 4,5-diidrotiofeno (g) que por hidrogenação em presença de paládio dá origem ao derivado tiofeno (h). Nesta etapa foram isolados do conjunto de reações dois racematos.

A síntese prossegue com a hidrólise do derivado de tiofeno (h) que em presença de hidróxido de bário dá um produto diamínico (i), que tratado com fosgênio em presença de carbonato de sódio produz a biotina (j). Figuras 2a e 2b.

A (+)-biotina se decompõe em presença do ácido mandélico em um isômero, o qual, é idêntico à biotina natural.

Em 1945 Grussner e colaboradores realizaram outra síntese, em que, partindo-se do tiofeno também se obteve a biotina. A importância deste trabalho está no cuidado que se tomou para estabelecer a configuração estérica das substituintes em posições 3 e 4.

A presença do anel imidazolidônico foi comprovada hidrolizando-se a biotina com hidróxido de bário para obter ácido diaminocarboxílico (2'). A presença de dois grupos aminos primários no produto hidrolizado foi confirmada mediante titulação

pelo método de Van Slyke; quando o ácido diaminocarboxílico foi tratado (2') com fosgênio, regenerou-se a biotina. Observou-se ainda, a existência de uma função cíclica da uréia, entretanto não se chegou a aclarar si se tratava de um anel com 5 ou 6 átomos. Foi necessário, então, tratar o ácido diaminocarboxílico (2') com fenantroquinona, obtendo-se a dibenzoquinoxalina (7), determinando-se sua estrutura por espectroscopia no ultra-violeta. Na etapa seguinte determinou-se a estrutura, que continha o átomo de enxôfre, admitindo-se que estava ligado a um ciclo de tioéster, comprovando-se a ausência do grupo SCH_3 com o teste de nitroprussiato, o qual foi negativo. Além disso, fixou-se posições aparentes relativas aos quatro átomos de carbono, considerando-se então a possibilidade de que um sexto membro do anel continha o enxôfre, por que a biotina podia ter uma cadeia lateral de 4 ou 5 átomos de carbono. Neste caso, havia a possibilidade de obter-se ácido adípico a partir de um derivado do ácido aminocarboxílico. Se a biotina contivesse um ácido como cadeia lateral, então o ácido intermediário, diaminocarboxílico, poderia ser um derivado tetraidro tiaporânico (8') que por oxidação se transformaria em ácido alfa-ceto-dicarboxílico (9') ou num ácido tricarboxílico (10) que se transforma em ácido adípico (3').

Continuando com os trabalhos (40,13), o quinto membro do anel que continha enxôfre foi determinado em presença de Níquel-Paney, obtendo-se destiobiotina (11') que por hidrólise se transformou em ácido destiodiamínico, o qual, em presença de periodato de potássio deu o ácido pimélico (13').

A presença do anel de tiofeno em posição alfa, com relação a cadeia lateral foi demonstrada pela conversão do ácido diaminocarboxílico (2') em ácido alfa-(2-tienil)-valérico (14') por metilação exaustiva. Figuras 1a a 1b.

2.1.4. - Síntese comercial

A síntese comercial desenvolvida nos laboratórios da Hoffmann-La Roche Inc. (U.S. patent 2.489.232 de nov./1949, por H. M. Goldberg e L.J. Sternback) consiste em formar, inicialmente, um anel imidazolidônico e em seguida o anel tiofênico, de tal forma que o grupo amino tenha orientação cis, evitando-se a formação de allobiotina e epiallobiotina.

Mecanismos: o ácido meso-dibromossuccínico é convertido a ácido bisbenzilaminossuccínico (1") que em presença de foscênio dá o ácido 1,3-dibenzil-2-imidazolidônico-cis-4,5-dicarboxílico (2") que se transforma no anidrido correspondente (3"). Este anidrido se reduz, com zinco em presença de anidrido e ácido acético a um aldeído cíclico (ácido derivado) (4") que se converte em tiolactona (5"), a qual por condensação com o composto de Grignard, brometo de 4-metoxibutil magnésio, dá o derivado carbinoí (6"), que por desidratação e redução da dupla ligação forma o 1-benzil-isômero (7"). Pela ação do ácido bromídrico, há o rompimento do grupo metoxilo e formação do derivado de metila. Este derivado por hidrólise produz monobenzil-biotina (8"), do qual se libera o grupo benzoil e produz (+)-biotina (9"), conforme mostram as figuras 3a e 3b.

2.1.5. - Derivados com atividade biológica semelhante

São substâncias capazes de substituir a biotina no crescimento de microrganismos e no controle de deficiência em animais, (13).

A Biocitina - Isolada em 1950 por Wright e colaboradores tem L-lisina na cadeia lateral e acredita-se que atue na

liberação de biotina dos extratos de leveduras ou, extratos que contêm biotina ligada às proteínas em forma covalente. Sua estrutura foi comprovada por degradação e síntese. A biocitina se encontra nos tecidos animais e em materiais naturais.

B. **Destiobiotina** - Foi preparada a partir da biotina e tem a mesma atividade nos microrganismos.

C. **Oxibiotina** - Existe somente na forma cis e tem uma atividade de apenas 25% em relação à (+) -biotina.

D. **Sulfóxido de biotina** - Sintetizada em 1954, por Melville e isolada do filtrado de *Aspergillus niger*, tem atividade metabólica quando combinada com *avidina*, que é a proteína causadora da inibição da biotina. Foi também isolada do leite concentrado, em duas formas opticamente ativas:

l-sulfoxido d-biotina p.f. 238-240 °C $(\alpha)_D^{20} = -99.50$

d-sulfoxido d-biotina p.f. 200-203 °C $(\alpha)_D^{20} = + 1309$

E. **Sulfonbiotina** - Considerado como um potente antagonista da biotina no crescimento de *Lactobacillus* e *Staphylococci*.

F. **Biotinol** - Alcool derivado da biotina (P.F. 174°C) $(\alpha)_D^{25} = + 84.7$

Foi preparada por Goldber e Sternback (pat.nº 2.499.237). Apresenta atividade somente após a sua oxidação enzimática nos animais, transformando-se em biotina. Nos microrganismos não apresenta nenhuma atividade.

2.1.6. - Utilização da Biotina

A. Metabolismo

A participação da biotina no metabolismo é direta e indireta dentro de uma série de reações que incluem :

- Desaminação do ácido aspártico, treonina e serina.
- Carboxilação do ácido pirúvico, adenina e guanina.
- Descarboxilação do oxalacetato e succinato
- Biossíntese de citrulina e ácido oléico.

A primeira associação da biotina com o metabolismo teve lugar na biossíntese de ácido aspártico por *Torula cremoris*. (49,13,51,42).

A utilização da biotina nas reações de carboxilação e descarboxilação tem sido largamente estudada e comprovada pelas seguintes observações.

a. Com *Lactobacillus arabinosus* em meios deficientes em ácido aspártico e bicarbonato, se demonstrou que a biotina atua como estimulante para seu desenvolvimento (49,13,24).

Quando o meio era deficiente em biotina não havia crescimento. Pode-se estabelecer que havia uma deficiência que não permitia a condensação do piruvato com dióxido de carbono para formar oxalacetato, do qual o ácido aspártico podia ser formado por transaminação.

b. Perda de habilidade da *Escherichia coli* para liberar dióxido de carbono do aspartato, a qual foi restaurada pela adição de biotina

c. a biotina participa da biossíntese dos ácidos oxalacético e alfa-cetoglutárico, de acordo com os trabalhos de Shieva, e Rogers.

d. Um enzima extraído de tecido de peru com deficiência de biotina demonstrou sua incapacidade para descarboxilação oxidativa do malato e oxalacetato, enquanto a atividade de outros enzimas presentes foi normal.

e. Estudos realizados (49,13,51,42), com carbono 14 , sobre a utilização de bicarbonato por *L.arabinosus*, estabeleceram que o seu crescimento em meios deficientes era limitado e que não ocorria com meios ricos em biotina. Não realizava-se a fixação de dióxido de carbono e a transformação do ^{14}C do bicarbonato em ácido aspártico.

f. Trabalhando com bicarbonato ^{13}C e avidina (inativador da biotina) (49), comprovaram que a avidina bloqueia a fixação de dióxido de carbono, de tal maneira que não se formava oxalacetato, porém a atividade era restaurada quando se adicionava biotina.

g. MacLeod e Landy estudaram a incorporação de óxido de carbono em vários tecidos, relacionada com as deficiências de biotina nos animais. Em ratos por exemplo, comprovou-se que a deficiência de biotina impedia a fixação de $^{14}\text{CO}_2$.

Como o dióxido de carbono é incorporado à arginina pela conversão da ornitina em citrulina no ciclo de Krebs-Henseleit (-Ureia), comprovou-se que, ao diminuir a biossíntese da arginina, diminuía também a biossíntese da citrulina. Os estudos demonstraram que os ratos com deficiência da biotina convertiam ornitina em citrulina porém em quantidades mínimas, e que a injeção de biotina restaurava a síntese depois de 24 horas, mostrou-se também que carbamyl-L-glutarato é um metabólito es

sencial para a conversão de ornitina em citrulina, além disso, a conversão de L-glutarato requer a presença de biotina.

h. A conversão de propionato em succinato pela fixação de dióxido de carbono foi demonstrado que se realiza em 4 etapas:

h₁-Conversão de propionato em propionil coenzimo A.

h₂-Conversão, com a utilização de um ATP, do propionil coenzimo A, por carboxilação em metilmalonil (isosuccinil) coenzimo A, com a participação de um enzimo que contém biotina.

h₃-isomerização quantitativa do metilmalonil coenzimo A, em succinil coenzimo A.

h₄-oxidação do succinil coenzimo A pelo ciclo dos ácidos tricarbôxílicos.

i. Estudos recentes com células extraídas de *Propionibacterium shermanii*, confirmaram a participação da biotina na descarboxilação do propionato a metilmalonato (49).

Os enzimos que contém biotina participam da síntese dos ácidos graxos, catalizando a carboxilação do acetil coenzimo A a malonil coenzimo A, em presença de ATP (1,2). Fica assim comprovada a importância metabólica da biotina.

B. Valor nutricional e terapêutico (13,4,42).

a. Em animais: Comprovou-se que ratos com deficiência de biotina, apresentam várias alterações, como dermatite, alopecia em torno dos olhos, paralisia. Deficiência de biotina pode ser induzida em cães, porcos, perus e peixes. Vários estudos tem sido realizados, especialmente com ratos alimentados com clara de ovo, em que está presente a avidina, que induz a deficiência de biotina.

b. Em microrganismos: A biotina funciona como fator de crescimento.

c. Em seres humanos: até o presente não se demonstrou a ocorrência de avitaminose natural. Deficiências induzidas têm causado depressão, náuseas, dores musculares, descamação da pele, etc. Em adultos, se estima que o requerimento é de 0,15 a 0,3 mg diários. As fontes de biotina de maior importância são: carne, cereais, extratos de leveduras. Acredita-se que sua deficiência, agrava a deficiência de ácido pantotênico (42).

2.1.7. Valor Comercial

No Anuário do Comércio Exterior do Brasil de 1970, seção importação, se encontram os seguintes dados:

Partida 54229: Outras vitaminas do complexo B

Total	Vários Países	Kg	Cr\$ (cruzeiros)	Valor em Dólar	
		314	69,150	CIF	F0B
				15.331	13.769

No catálogo de produtos químicos a Piense Products (7), a Piense Chemical Co., estabelece os seguintes valores para a biotina em cristais: 31132 D-biotina cristalina, US. \$ 4.00/100mg.

Valor médio: US. \$ 0,04/mg ou Cr\$ 400/g.

Apresentamos a seguir vários aspectos da produção de biotina a partir de resíduos de batata.

2.2. Resíduos de batata.

2.2.1. Aspectos gerais.

Considerando o volume de tratamento, 2550×10^3 tons, de material fresco durante 1967, nos Estados Unidos, a indústria de batatas ocupa o segundo lugar entre os principais vegetais processados. Quadro I

Os resíduos resultam da manufatura de amido, farinha, purê, batata frita (41). Isto requer uma demanda biológica de oxigênio (BOD) de 36 kg/ton. de resíduo para sua oxidação (estabilização).

Uma análise dos componentes da batata que devem ser estabilizados está expressa no Quadro 2, com as percentagens médias e variações.

Como na síntese da biotina tomam parte várias substâncias orgânicas que foram estabilizadas (42), resumimos no Quadro 3 os componentes mais comuns da batata

Existem determinados aminoácidos, tais como cisteína, alanina, ácido glutâmico, etc., que tomam parte na síntese da biotina, razão porque procura-se comprovar sua presença na batata e nos resíduos (46). Para estudos nutricionais e de armazenamento, realizaram-se análises dos principais aminoácidos da batata, Quadro 4. Como não foi encontrado cisteína na batata, presume-se que a síntese da biotina em resíduos desse material deve iniciar-se com alanina ou ácido glutâmico.

2.2.2 Condições dos resíduos

Para efeito de tratamento biológico, é necessário conhecer-se as condições dos resíduos, especialmente sólidos totais, demanda biológica de oxigênio (BOD), e a demanda química de Oxigênio (COD). Geralmente, os valores da descarga residual (44), são grandes sendo então submetida a um tratamento prévio, (quadro 5)

A carga residual está formada por restos de material lavado, pele (6-16%), tecidos moles, recortes, porções defeituosas, águas de lavagem do amido, restos do tratamento pelo calor, processamento final de conservação e embalagem.

Quando os resíduos provêm somente de fábricas de amido (30), não requerem tratamento primário porque a quantidade de sólidos totais é baixa.

Numa indústria onde se produzem todos os derivados da batata, os resíduos estão constituídos por águas de lavagem e restos de pele (30). Em indústrias onde as águas residuais ultrapassam de 2 milhões de litros por dia, as matérias orgânicas são aproveitadas para ração animal. Quadro 7.

A presença de proteínas, hidratos de carbono e minerais nos resíduos, assegura sua utilização como nutrientes para síntese microbiológica, embora nos últimos anos algumas dificuldades tenham surgido devido à presença de resíduos de pesticidas que atuam como inibidores dos processos biológicos. Quadro 8.

Os resíduos recebem diferentes tipos de tratamento para a sua utilização. Revisaremos em seguida o método de oxidação ou estabilização em lagoas facultativas.

2.2.3. Tratamento dos Resíduos.

A - Tratamento primário.

Corresponde à separação dos sólidos totais por peneiramento, clarificação e sedimentação, que se realiza para corrigir o valor de BOD (250-300 kg/ha./dia) e assegurar a presença de oxigênio que não deve ser inferior a 3mg./l. Figura 4.

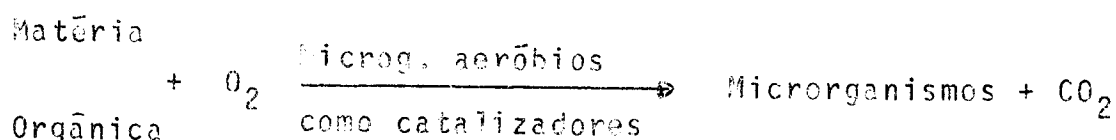
Imhoff (23), recomenda o valor de 9 a 18g. BOD/m³/por dia, para uma carga residual que chega a uma lagoa de 1,20m de profundidade, na qual se realiza o tratamento biológico.

Dados (41), de tratamento primário, provenientes de indústrias indicam que se consegue reduzir o valor de BOD em 60% e os sólidos em suspensão em 90%, quando se mantém uma carga residual de 20.000 a 25.000 l/m² por duas a tres horas num tanque de clarificação.

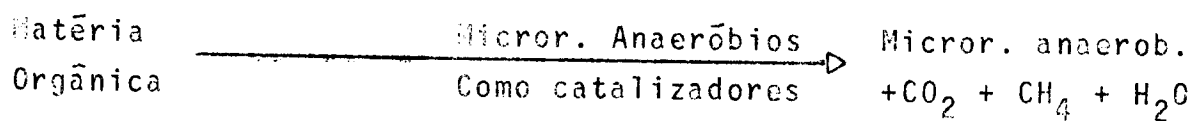
B - Tratamento secundário.

É feito para decompor as matérias orgânicas de carga residual em presença de microrganismos, por uma série de reações aeróbias, anaeróbias ou facultativas (41, 2), de acordo com o microrganismo envolvido. As reações de maior importância que ocorrem nas lagoas facultativas são:

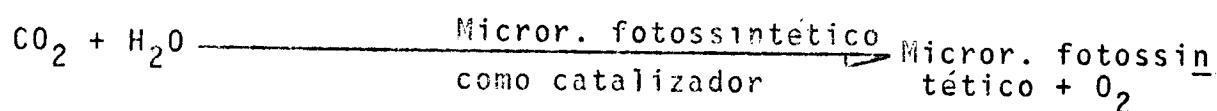
Aeróbias:



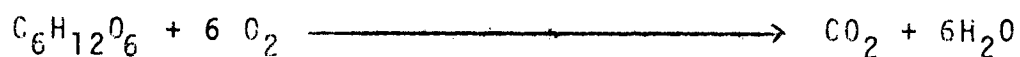
Anaeróbias:



Fotossíntese:



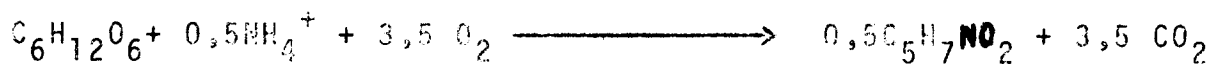
Respiração:



Síntese:



Admitindo-se um rendimento de 0,5 moles de $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$ /mol. de glicose, a relação líquida seria:



Autooxidação (autodestruição de microrganismos):

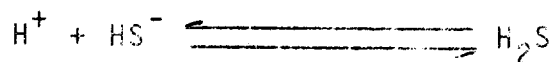


Presença de ácido sulfúrico:



Em determinadas concentrações o H_2S é tóxico para as metanobac_tterias.

Em fase anaeróbia, ocorre dissociação do H_2S :



A decomposição da glicose em presença de derivados de amônio (39), dá um composto que para fins de cálculo é considerado como $C_5H_7NO_2$.

Os tratamentos secundários propriamente ditos podem ser feitos por um dos seguintes processos:

b.1. Lodos ativados: procura-se em tanques (piscinas), um ambiente favorável para o desenvolvimento de bactérias em grandes massas que se denominam "lodos ativados" que podem ser retiradas ou recirculadas para o tratamento de novas cargas residuais (12).

b.2. Filtros biológicos: os resíduos são distribuídos sobre leito filtrante de rocha ou plástico (tipo rashing), no qual o oxigênio se move pelos espaços livres do meio filtrante, fazendo com que a massa de bactérias ligadas ao meio, aumente podendo finalmente ser recuperada por lavagem do meio filtrante (2,39).

b.3. Lagoas de estabilização ou oxidação (44,41,12,48): podem ser aeróbias, anaeróbias ou facultativas.

b.3.1. Lagoas facultativas - Ocorrem simultaneamente os processos aeróbios e anaeróbios. A maioria dos tratamentos pertencem a esta categoria. No caso da biotina, a produção é feita em lagoas facultativas. (41,19,36,11).

Mecanismo do processo:

Em relação à fase aeróbia, o mecanismo está representado simplificada^mente na figura 5. As bactérias oxidam a matéria orgânica, CO_2 , NH_3 e outras substâncias que são absorvidas pelas algas, que participam da fotossíntese. A massa de algas e bactérias produzidas podem ser retiradas periodicamente.

No tratamento biológico dos resíduos orgânicos das indústrias de alimentos (19,25), tanto algas como bactérias transformam a matéria orgânica. Ficou comprovado que 75% do processo se realiza em fase anaeróbia para alcançar a estabilização dos resíduos. A figura 6 corresponde a uma lagoa convencional em que a melhor distribuição de resíduos é conseguida quando a alimentação é feita pelo fundo.

O mecanismo de estabilização está resumido nas figuras 7 e 8 (31), representando o processo que se realiza em lagoas facultativas.

Eficiência:

Tem-se comprovado a eficiência das lagoas, cultivando peixes que requerem um teor de oxigênio superior a 3 mg./l (17). Além disso, deve-se assegurar a remoção de 90% de BOD, em 10 dias a 20°C, em uma área de 20m². A perda de nível de água em climas frios deve ser da ordem de 0,6-1m/ano e em climas quentes, não deve ser superior a 3m/ano. As perdas por evaporação são estimadas em 20% no inverno e 80% no verão.

Determinações:

Os parâmetros relacionados com o tratamento em lagoas facultativas são determinados pelas expressões seguintes: (37,36).

a. tempo de retenção, $t = \frac{V}{Q}$

onde t é o tempo em dias; V é a capacidade da lagoa em m^3 e Q é o volume da carga residual em m^3/dia .

b. oxigênio para BOD, $W = \frac{K \cdot d \cdot L}{t}$, W é a massa de oxigênio, em gramas, produzida por unidade de área em m^2 ; d é a profundidade média da lagoa; L é a percentagem de luz recebida (unidades de energia); t é o tempo de retenção e K é uma constante.

c. O método de Hiser ^{citado em (33)} para determinar BOD, consiste em relacionar o valor de demanda química de oxigênio (COD) com a oxidação biológica de acordo com a seguinte técnica:

c_1 - Desenvolver uma cultura adequada.

c_2 - Tomar uma amostra da carga residual e determinar o valor de COD (Standard methods for the Examination of Water and Waste Water).

c_3 - Tomar uma amostra da cultura e determinar o COD.

c_4 - A cultura e a carga residual são em seguida misturadas nas proporções adequadas.

c_5 - Determinar o COD da mistura:

$$\text{COD}_{\text{mist.}} = \frac{V_c \text{ COD}_c + V_w \text{ COD}_w}{V_c + V_w}, \text{ onde:}$$

V_c = Volume da cultura

V_w = Volume da água residual

c_6 - Manter a mistura aerada.

c_7 - Tomar amostras da mistura em intervalos convenientes, para medir a concentração de sólidos solúveis por

gravimetria e a variação de COD até a transformação total da carga residual.

Resultados:

O valor de BOD corresponde à diferença entre a medida inicial e final de COD. Ver figuras 9 e 10.

Conhecidas a natureza dos resíduos e as condições para o seu tratamento, examinaremos em seguida, os aspectos que se relacionam diretamente com a produção da biotina.

2.3. - PRODUÇÃO DE BIOTINA

Nos primeiros trabalhos sobre a obtenção de biotina em lagoas de estabilização, tipo facultativa (41,19,36,25,20), utilizaram resíduos de batata. Também Filipi e colab. realizaram em Grafton Forks, North Dakota experimentos de fermentação, utilizando o mesmo tipo de resíduo (11). O *Aerobacter aerogens*, participou como produto de biotina e a *Chlorella vulgaris* e *Thiocapsa floridana*, armazenam a biotina formada. Ficou com provado em escala de laboratório, que é possível utilizar os resíduos das usinas de açúcar, especialmente beterraba e os resíduos domésticos para a produção de biotina.

O trabalho é de alto interesse porque, além de alcançar o objetivo principal que é o tratamento da água residual, obtêm-se quantidades relativamente grandes de biotina, que é um produto de alto valor biológico e comercial.

Revisaremos os antecedentes que propiciaram as pesquisas sobre a produção de biotina em lagoas facultativas.

2.3.1. - Presença de biotina em lagos e correntes.

Investigando em 1942, a presença de tiamina nas algas removidas de lagos (22), Hutchinson encontrou quantidades consideráveis de biotina, embora a extração por centrifugação tenha sido incompleta, obtiveram-se valores de 3mg./l.

A presença de biotina foi comprovada mediante provas com *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando-se água concentrada de lagoa. Comprovou-se também a presença de biotina na água do mar (3). As concentrações variavam de 3-12 uug/ml e os microrganismos responsáveis pela sua produção foram identificados como bactérias marinhas e as provas em laboratório com água

do mar, sintética, foram concluídas através de testes turbidimétricos e espectrofotométricos.

Antia (3) cita que Burkholder comprovou a presença de biotina, biocitina destiobiotina na água do mar, não encontrando ácido pimélico ou oléido.

Em 1965, utilizando água proveniente do golfo do México (27), foram realizadas provas com mutantes auxotróficos de *Serratia marina rubra*, que demonstraram uma sensibilidade de 5 a 13 μg de biotina / l. Neste trabalho, ficou evidenciada a possibilidade de que a ocorrência de biotina no período primavera-verão podia ter uma significação ecológica e química (13, 4, 47, 21).

Posteriormente, encontrou-se um método (6) rápido e simples - para a determinação da biotina dissolvida na água do mar. A fixação de $^{14}\text{CO}_2$ por células de *Amphidinium carteri* foi proporcional à concentração de biotina na água.

Para a prova utilizaram-se algas fototróficas radioativas contendo ^{14}C e mediu-se posteriormente a quantidade de biotina - no meio, obtendo-se concentrações de 0,2 a 6 μg de biotina/l.

Após ter-se demonstrado a presença de biotina no mar e em lagos, iniciaram-se trabalhos para determinar a sua presença - também em resíduos domésticos (32). Tomando amostras de diferentes setores do tratamento biológico, se comprovou a intensa atividade microbiana capaz de utilizar os componentes residuais e sintetizar produtos de importância industrial como - biotina, outras vitaminas e proteínas.

Em trabalhos com *Propionibacterium shermanii*, determinou - se

também a presença de biotina em resíduos orgânicos industriais.

Como a biotina está presente nos tecidos animais e vegetais, se estabeleceu que sua separação somente era possível depois de uma hidrólise ácida vigorosa. Portanto todas as provas microbiológicas foram realizadas após a hidrólise das amostras.

Estudando os componentes do complexo B presentes na água (29), realizaram-se uma série de provas biológicas no Sudeste do Alasca para estabelecer-se que os mutantes da bactéria marinha, *Serratia marinorubra*, utilizavam para seu desenvolvimento, biotina e niacina. De 20 amostras tomadas em diferentes setores, 8 continham biotina perfazendo a percentagem de 35-40%, com uma concentração de 3,1 ug/l.

Destes trabalhos, um aspecto ficou bem definido: a biotina, cianocobalamina, tiamina e niacina, são determinantes da produtividade biológica nos oceanos.

No presente trabalho são analisados vários fatores que permitem obter-se em Grafton (11), rendimentos de biotina de 55-10.800 mg/l., a partir de resíduos de batata, que juntamente com os resíduos domésticos, foram descarregados na primeira lagoa na ordem de 250kg/ha./dia, durante os meses de setembro a maio (inverno) e 17kg./ha./dia., durante o verão. As condições no período de inverno - primavera foram anaeróbias, depois no período de verão, o processo esteve na dependência das bactérias sulfurosas púrpuras que são facultativas (11, 13).

Comprovou-se que a fase de bactérias sulfurosas púrpuras precedia a formação de algas nos últimos dias de verão. Ficou demonstrado também a estabilização dos resíduos descarregados e sua utilização por *Aerobacter aerogenes*, *Enterococcus* e *Salmo-*

nella para formar biotina. Para uma melhor compreensão da síntese da biotina seria interessante revisar os vários aspectos relacionados com os microrganismos participantes.

A. - *Aerobacter aerogenes*

Pertence ao gênero *Aerobacter*, (5, 14, 8) família *Enterobacteriaceae*. Apresenta-se com bastonetes de 0,2 a 2,9µ. Frequentemente esporulados, não apresentam mobilidade e são Gram negativos. As colônias em gelatinas apresentam-se espessas, opacas e brancas. Na prova de Litmus milk, forma-se ácido com coagulação, não peptoniza, não produz ácido sulfídrico. Em peptona agar, produz ácido acético, ácido succínico e gás, a partir de glicose, frutose, galactose, amido, dextrina, glicerol e manitol. Não fermenta a sacarose, inulina, dulcitol. A relação de produção de gás é de 2CO₂:1H. Utiliza ácido cítrico ou citratos como fontes de carbono, produz nitritos de nitratos e sintetiza a maioria das vitaminas que necessita. Podem ser aeróbios, anaeróbios ou facultativos. Para seu desenvolvimento normal, a temperatura ótima é 30°C, entretanto, nas águas residuais ele pode se desenvolver entre 10 e 40°C (5). Não produz gás pelo teste de Eijkman, 45-46°C. Foi isolado de fezes de crianças e se encontra em cereais, plantas, água, leite, resíduos alimentícios (8).

No estudo da ecologia considera-se todo o grupo *coli*forme (90% de coli fecal e 10% de coli não fecal ou *Aerobacter aerogenes*).

Em 1965, em Logan, Utah (15, 40) foi estudada a ecologia das bactérias presentes no lago "Great Salt", determinando-se os seguintes parâmetros que são essenciais para o desenvolvimento desses microrganismos:

- a. temperatura da água a 15cm de profundidade
entrada 9,5-22°C e saída 8,5-25°C
- b. temperatura do ar 23,5°C
- c. profundidade da lagoa 1,2-2,6m
- d. área 6 hectares
- e. altura do nível do mar 1372 metros
- f. volume tratado 4000 m³ / dia
- g. quantidade de bactérias: Coliformes foram determinados no caldo lactosado em três tubos pelo método MPN (fermentação de lactose) e confirmado em lactose verde brilhante, segundo Standard Methods, (APHA, 1945). A contagem foi feita - pelo método de membrana filtrante com meio MFE e pela técnica de Geldreich e colab.

Também mediante análise de regressão múltipla determinou-se o crescimento de *E. Coli* em função da temperatura, o que, permitiu traçar a curva da figura 11, mediante as seguintes equações:

$$T_1 = -6,0 + 0,95 T_2 + 0,04 \text{ langleys} + 0,14 T_3$$

onde: T_1 = temperatura de entrada de carga residual.

T_2 = temperatura de saída da água.

T_3 = temperatura máxima do ar.

Langleys = unidades de energia solar / m²

$$\lg_{10} N_0 \text{ células } E. \text{ Coli.} = 3,73 - 0,000126 T^3$$

B. Bactérias sulfurosas púrpuras: *Thiocapsa floridana*.

Determinam uma fase do tratamento dos resíduos porque permitem o desenvolvimento das algas durante o período final de verão - (11, 20) e paralelamente, a estabilização (oxidação) da carga residual para formar biotina (20).

A *Thiocapsa floridana*, pertence ao grupo das bactérias sulfuro

sas e utiliza a biotina sintetizada pelo *A. ceroyense* (11, 40, 20). Reduz sulfitos a sulfatos e alcança a maior reprodução - quando se elevam as concentrações de sulfitos e ácidos voláteis, enquanto os carboidratos e compostos alcalinos permanecem estáveis. Tem uma forma autotrófica de nutrição, quando utiliza sulfitos e outros substratos como fontes de elétrons no processo fotossintético. Apresentam-se como cocos (esféricas) em colônias de forma irregular ou isoladas em cápsulas - de limo são imóveis, e quando crescem as cápsulas se rebentam e as células se dispersam. A morfologia e o desenvolvimento - são semelhantes ao do gênero *Aphanocapsa* que se encontra entre as algas verdes azuladas. Contêm clorofila e pigmentos carotenóides e são capazes de fotossintetizar em presença do ácido sulfídrico para armazenar enxofre.

Para o desenvolvimento normal da *Thiocapsa floridana*, foram determinados os valores ótimos de pH, sulfitos e temperatura (20), depois de ter sido isolada do lago (11), onde se realizaram as primeiras provas para a obtenção de biotina. Foi utilizado o meio de Pfennig. Inocularam-se as colônias, incubando-se a 25°C com iluminação observando-se crescimento abundante. Em seguida foram adicionadas 5×10^7 células em tubos de 60ml. que continha o meio básico de Pfennig, a fim de analisar o potencial dos substratos utilizados como fonte de carbono e, o doador de elétrons para a *Thiocapsa floridana*. Os substratos orgânicos adicionados ao meio (0,1%) incluía succinato, piruvato, fumarato, malato, glicolato, lactato, etc. Além destes, ainda foram adicionados: formiato, valerato, butirato, isobutirato, propionato, em concentrações de 0,05%.

Ficou comprovado que a *Thiocapsa floridana* se desenvolvia normalmente em meios com concentrações de 20ug de sulfitos /ml. O pH ótimo foi de 7,5 temperatura da água residual durante o verão 16-30°C. Figuras 12, 13 e 14.

Comprovou-se que os compostos da carga residual, também podem ser utilizados como substratos orgânicos (quadro 9).

C. *Chlorella vulgaris*

É a alga relacionada com o armazenamento e a utilização da biotina e responsável pela maior parte da fotossíntese na lagoa (11,20,21).

Conhecem-se estudos de simbiose entre algas e bactérias (*Chlorella*-Sulfurbactérias) que participam na utilização das substâncias orgânicas em condições aeróbias (21), sendo o principal produto o CO₂ que é o nutriente essencial para as algas as quais pelo processo de fotossíntese produzem oxigênio. Tudo ocorre normalmente quando as condições de respiração, e a atividade metabólica e condições ecológicas estão sob controle.

Humenik em 1970 (21), realizaram trabalhos interessantes sobre as relações simbióticas algas-bactérias, utilizando resíduos industriais e domésticos e estabeleceram que a *Chlorella vulgaris* atuava como um inibidor do crescimento de bactérias quando os níveis de nitrogênio eram baixos.

Exames microscópicos revelaram que as algas envolviam completamente as bactérias, formando uma massa micelial que sobrenada da qual podia-se separar os produtos da síntese.

Com estes antecedentes, revisamos em seguida alguns aspectos da biossíntese da biotina.

2.3.2 Biossíntese da Biotina

A. A partir de resíduos da batata.

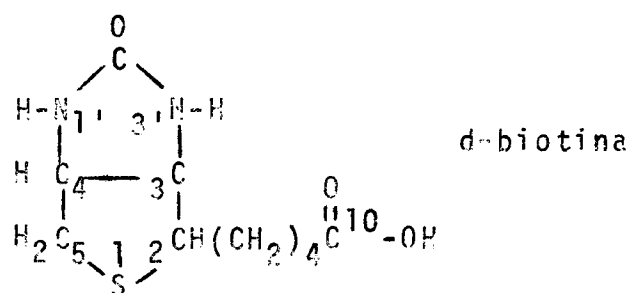
Fillipi e Vennes (1968) realizaram a primeira experiência na obtenção de biotina utilizando resíduos de batata (11).

As provas foram realizadas num sistema de lagoas facultativas (12,48,19,11) , com uma área de trinta hectares e 1-1,5 m de profundidade, que recebiam 250kg de BOD/ha/dia no inverno e 17-20kg de BOD/ha/dia no verão. A presença de biotina nos resíduos estabilizados foi comprovada tomando-se amostras e fazendo-se experiências microbiológicas. A produção de biotina foi feita com culturas puras de *Aerobacter aerogenes*, *Enterococcus* e *Salmonella*. A utilização e armazenamento da vitamina se dava pelos microrganismos *Lactobacillus arabinosus*, *Chlorella vulgaris* e *Thiocapsa floridana* (40,20). Os rendimentos foram significativos, alcançando valores de 10.000 ng/l (1,500 ug / mg de BOD) ver quadro 11 Nesta experiência somente foi estudada a possibilidade de utilização dos resíduos de batata para a obtenção de biotina sem dar a conhecer os mecanismos da síntese.

B. A partir do ácido pimélico

Vigneaud e colaboradores estabeleceram a estrutura da biotina e sugeriram que o possível precursor era o ácido pimélico.

Eakin 1961 demonstrou que a produção de biotina por *Aspergillus niger* era incrementada adicionando-se ácido pimélico e que quando a síntese partia de cisteína aumentava o efeito do ácido pimélico o qual podia contribuir com os carbonos 2 a 3 ou 6 a 10 da biotina.



Assim mesmo supôs-se que a molécula da cisteína poderia fornecer o átomo de enxofre, o átomo de nitrogênio e os átomos de carbono 4 e 5.

Considerou-se também a destiobiotina como um possível intermediário na síntese da biotina porque participa no desenvolvimento do *Saccharomyces cerevisiae*.

Winestock e Plaut (51) comprovaram que o *Aspergillus niger* convertia destiobiotina em biotina-1-sulfóxido que atua como uma verdadeira vitamina.

Eisenberg e Star, (10) demonstraram que a destiobiotina pode ser produzida por vários microrganismos, mas que, no caso do *Lactobacillus casei* atua como anti-metabólito.

Elfor e Wright citados em (10) estabeleceram que somente uma molécula de pimelato era incorporada a cada molécula da biotina e que no carbono 10 estava localizado o grupo carboxílico.

Lynen, também citado em (10) estudou a biogênese da biotina em rume de ovelha, isolando células de *Achromobacter* (IVS) que foram desenvolvidas em meio sintético com ácido isovalérico, como única fonte de carbono. A adição de cisteína-3-¹⁴C permitiu comprovar que o átomo marcado foi incorporado no carbono 5 do anel na biotina.

Quando o *Achromobacter* se desenvolveu em presença de ¹⁴CO₂, o carbono do ureído (C-2') e o carbono do carboxil (C-10) foram igualmente marcados e juntos mantinham 60% da radioatividade.

Lynen e colaboradores citados em (10) propuseram que o *Achromobacter* formava a biotina a partir de cisteína, pimetil CoA

e carbamyl fosfato, Figura 15. Manifestaram ainda que o ácido pimélico podia ser formado por três moléculas de malonil CoA, como acontece na biossíntese dos ácidos-graxos.

Da figura 15 pode-se concluir que a destiobiotina não é necessariamente um intermediário na formação da vitamina, porque a parece apenas como uma alternativa na via sintética de vários microrganismos (51) podendo ocasionalmente transformar em biotina.

Wright citado em (51) estabeleceu que a destiobiotina se transformava em biotina pela ação do *Aspergillus niger*, o qual demonstrava certa habilidade para transformar oxibiotina em biotina-1-sulfóxido.

Descobriu-se além disso, que a biotina formada atuava como grupo prostético dos enzimas por ligação covalente.

C. Síntese do ácido 7-oxo-8-amino pelargônico (7-KAP)

A partir de L-alanina e pimelil CoA, Eisenberg e Star (10) obtiveram o ácido-7-oxo-8-amino pelargônico (7-KAP).

As experiências foram realizadas com um mutante K-12 de *Escherichia coli* a qual excretava (7-KAP). A formação deste ácido foi comprovada por cromatografia. Observaram que somente três subgrupos dos mutantes excretavam o ácido e o quarto carecia de poder de síntese.

O ácido pimélico participou na síntese da biotina para formar um intermediário, a destiobiotina. Por condensação do ácido pimélico e L-alanina obteve-se 7-KAP. Foi estudada também a participação do ácido glutárico (35) como precursor da biotina nos processos de fermentação. Aliás, Ogata e colab. (35)

encontraram que o ácido 7,8-dioxopelargônico era o primeiro produto formado a partir do ácido pimélico e que o segundo composto na síntese de 7-KAP poderia se formar

Outro aspecto estudado foi a utilização de serina ou alanina como doadores de carbono. Pai e Lichstein citados em (10,9) com evidências bem fundamentadas mostraram que havia uma conversão direta de destiobiotina em biotina quando o 7-KAP estava presente como intermediário da síntese, demonstrando ainda que a síntese do 7-KAP por mutantes, não se realizava sem a presença de um ênzimo específico.

Foi comprovado que o ácido pimélico é um precursor na síntese da biotina (51,10,9), porém, no curso das investigações da síntese microbiana verificou-se que o gênero *Agrobacterium* sintetiza os intermediários da síntese, como desbiotina, partindo do ácido glutárico, o que não ocorre, quando este gênero está presente em meios contendo o ácido pimélico.

Para as provas foram usados *Agrobacterium tumefaciens* IAM 1525, *A. radiobacter* IAM 1256 e *A. radiobacter* IAM 157.

As bactérias foram cultivadas a 28°C durante 24 horas, com agitação, em meio contendo especialmente os ácidos glutárico e pimélico para sua comprovação. Depois deste período, as células foram recolhidas e os intermediários da biotina foram quantitativamente determinados mediante ensaios microbiológicos com *Saccharomyces cerevisiae* *Lactobacillus arabinosus* para determinar o rendimento a partir dos ácidos usados no meio. Quadro 13.

Comprovou-se também a efetividade dos aminoácidos que tomavam

parte como precursores na síntese, determinando-se que a L-alanina e o ácido glutâmico somente eram efetivos para o *Ara diobacter*, enquanto que a L-lisina era efetiva para as três bactérias. Quadro 14.

Para concluir a prova, foram determinadas também, as modificações na produção de intermediários, quando se modificava a concentração de ácido glutâmico e L-lisina. Figura 16. Os resultados foram ótimos para concentrações ao redor de 3-4mg/ml.

D. Síntese do ácido 7,8-diaminopelargônico (DAP)

É um intermediário na biossíntese da biotina. Eisenberg e Krell (9) encontraram que o mutante K-12 bioA de *Escherichia coli* era capaz de sintetizar destiobiotina, partindo em última instância do DAP, determinando além disso, as condições para a síntese. A destiobiotina formada foi identificada por cromatografia e eletroforese. Nas provas foram utilizadas serina, bicarbonato e glicose que atuaram aparentemente como fontes de CO₂. Verificou-se que os passos na síntese foram os seguintes:



A conversão da destiobiotina em biotina ficou por ser comprovada tomando-se por referência trabalhos de Eisenberg e Star (10) e Sekijc

A síntese do ácido 7,8-diaminopelargônico (DAP), foi revisada (9) e os detalhes do enzimo que cataliza a biossíntese do anel ureído, não foram, entretanto, estudados.

Yang, Han-Chul e colab.(54), purificaram o ênzimo que sintetiza o DAP através da incorporação do CO_2 no anel ureídico e determinaram o requerimento de cofatores para a síntese. Ficou comprovado que esse ênzimo era indispensável para a síntese do ácido diaminopelargônico (DAP).

A purificação enzimática foi conduzida com as condições fixadas no Quadro 15 (aquecendo a mistura a 90°C, durante dois minutos). Os produtos de síntese foram determinados quantitativamente com *Lactobacillus arabinosus*, *S. cerevisiae* e *B. subtilis*. Nas determinações ficou comprovado que no meio com ácido diaminocarboxílico somente se desenvolviam *S. cerevisiae* e *L. arabinosus* e que, com DAP, servia somente para o desenvolvivimento de *S. cerevisiae*, não servindo para *L. arabinosus* nem para *B. subtilis*.

A purificação do ênzimo foi conduzida a 50°C e deu um rendimento de 60%.

Foi necessário utilizar várias substâncias como cofatores e ficou comprovado que sua eficiência era igual tanto no caso da síntese com *Pseudomona graveolens*, como quando se usava extrato cru de *E. coli*. Os cofatores foram ATP, Mg e $NaHCO_3$, que foram considerados como essenciais. Quadro 16.

Os substratos específicos do ênzimo foram determinados, juntamente com biotina e destiobiotina que formavam somente quando eram usados, como substratos, o ácido biotindiaminocarboxílico e o DAP. A relação entre os ácidos formadores de biotina e de destiobiotina foi de 1:10, respectivamente. Quadro 17 Comprovou-se também, que o ácido 7-amino-2-cetopelargônico foi inativo como substrato. Até 1971, não foi possível conseguir dados sobre o mecanismo da reação enzimática.

Yang e colab. (53), baseados em trabalhos anteriores, determinaram a atividade do enzima isolado. A incubação foi de duas horas e a temperatura 37°C, usando-se como substratos DAP e o ácido biotindiaminocarboxílico (figuras 17,18).

E. Biossíntese de biotina a partir de destiobiotina.

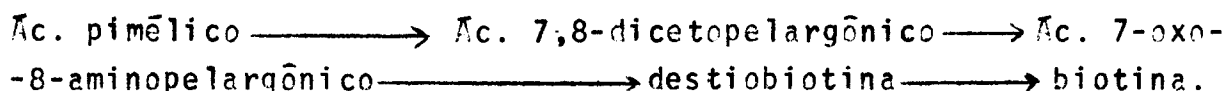
Sekijo e colab. (45), estudaram o metabolismo da destiobiotina por *Rhodotorula flava* e sua conversão em biotina realizada por *Bacillus* IFO 3013. Comprovaram além disso, que a destiobiotina foi degradada também por *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*, estabelecendo que a síntese obedece a seguinte sequência (51):



Rolfe e Eisenberg (43), realizaram um interessante trabalho, isolando mais de 60 auxótrofos de biotina, pertencente a *E. coli* K-12. Inicialmente foi feita uma classificação em quatro grupos, três dos quais deram resultados positivos em relação a síntese de biotina. Com a classificação dos mutantes foi possível observar os seguintes aspectos:

e.1. Na biossíntese da biotina, a destiobiotina é um intermediário.

e.2. É aceitável a suposição de Okumura citado em (43) de que a sequência das reações obedece a seguinte ordem:

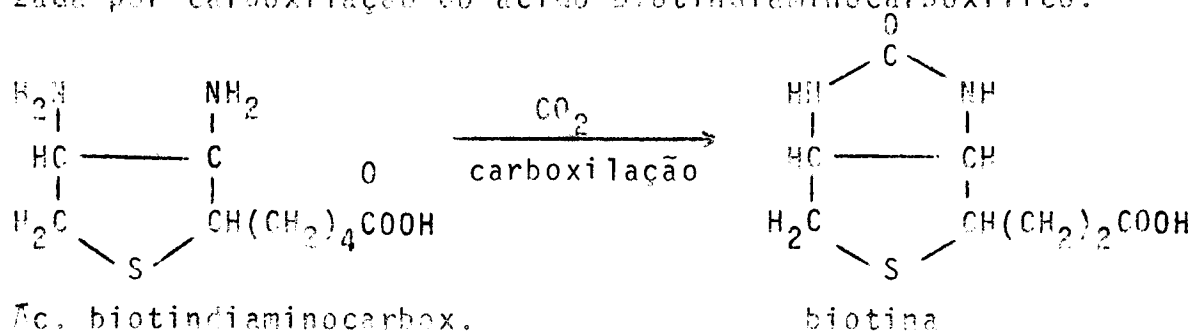


e.3. Esta sequência de reações está em desacordo com o que supõe Eisenberg e Star (10), que utilizaram ácido pimélico (como pimelilCoA) e cisteína.

4.4. A diferença entre as duas suposições já foi esclarecida sendo que, no caso de Eisenberg (10), o átomo de enxôfre se incorpora no início da síntese, enquanto que na síntese de Okumura o átomo de enxôfre se incorpora no final.

F. Síntese de biotina a partir do ácido biotindiaminocarboxílico.

Yang e colab. (54) observaram que a biotina pode ser sintetizada por carboxilação do ácido biotindiaminocarboxílico.



Utilizaram para esse fim *Bacillus sphaericus* e *Rhodotorula rubra* em meios específicos que continham diferentes aminoácidos, à temperatura de 28°C com agitação, durante 2 e 12 horas, como condições de cultivo (Quadro 18). A formação de biotina foi em seguida determinada mediante ensaios com *S. cerevisiae* e *B. subtilis*.

G. Biossíntese industrial

A seguir foram descritos os métodos industriais de produção de biotina por Shibata e colab. (pat. americana no 3.393129)

(28). Sabemos que diferentes microrganismos são capazes de sintetizar biotina em meios propícios, mas, na maioria dos casos, as substâncias acumuladas pelos respectivos microrganismos não podem ser identificadas como d-biotina, apesar de que em outros casos a quantidade sintetizada é tão pequena que não permite seu aproveitamento em escala comercial.

Tomando por base estes conhecimentos, Shibata e colab. inventaram novos métodos, considerando os seguintes aspectos:

- g.1. Existem microrganismos capazes de sintetizar biotina em quantidades apreciáveis.
- g.2. Estes microrganismos correspondem especialmente ao gênero *Sporobolomices* e são formadores de biotina em meios que contêm ácido azeláico.
- g.3. A produção neste caso realiza por fermentação e em escala industrial.

A biotina sintetizada por Shibata e colab. pode ser utilizada em medicina quando purificada para a alimentação de peixes, e neste caso não requer purificação.

Os melhores resultados na produção da biotina foram obtidos com os seguintes tipos de microrganismos: *Sporobolomices paranozeus*, *Sporobolomices salmonicolor*, *Sporobolomices carnicolor* e *Mutantes*.

O meio para incubação continha fontes de carbono assimilável, nitrogênio, enxofre e outros nutrientes necessários para o crescimento dos microrganismos. Como fonte de carbono foram empregados glicose, amido, lactose, maltose, galactose,

dextrina e glicerol. Como fontes de nitrogênio: peptona, pó de soja, licor de milho macerado, extrato de carne, sais de amônio, material orgânico e inorgânico que contêm nitrogênio. Como fontes de enxôfre: sulfato de sódio, sulfato de amônio, cistina, cisteína, metionina, ácido tiomálico, tiouréia, ácido lipônico, etc. Outras substâncias como sais de sódio, fosforo, cálcio, magnésio, zinco, etc., foram também adicionados óleos vegetais e animais como anti-espumantes.

A utilização do ácido azeláico, ou seus sais, deram resultados positivos como se pode ver em seguida:

Dias de incubação	Rendimento de biotina (mg/ml) +	
	5	7
adição de ác. azeláico (%)		
0	270	400
0,002	680	970
0,005	630	1300
0,01	680	1150
0,02	500	1450

+ miligrama por mililitro

As experiências para comprovar a eficiência do ácido azeláico foram realizadas com *Esporobromices carnicolor*.

Em escala industrial, os melhores resultados foram obtidos com culturas submersas, em experiências realizadas com agitação, temperaturas de 25-40°C e pH entre 5,0 e 7,0.

A d-biotina acumulada no meio de cultivo foi recolhida, purifi

cada e identificada através de espectroscopia de infra-vermelho.

Damos a seguir um dos métodos desenvolvidos por Shibata e colaboradores (28). Nos demais casos, apenas se muda o tipo de microrganismo utilizado e algumas características do meio, por exemplo, a adição de ácido azelaico.

Um meio de cultura aquoso contendo glicose, sacarose, extrato de levedura, asparaginato de sódio, fosfato de potássio e sulfato de magnésio (pH 7,0), é inoculado com *Esporobolomices parvoseus* ATCC 1645. Três litros deste meio é incubado a 28° C e mantido por 48 horas com agitação. Posteriormente, o inoculo é transferido para fermentador de aço com 600 litros do meio mantido a 28° C e pH 3,0 (ác. sulfúrico), durante 7 dias. A fermentação foi conduzida com agitação e aeracão. O produto de fermentação foi filtrado e no filtrado determinou-se a biotina, que acusou uma atividade de 450 mg/ml, comprovado mediante ensaio com *L. arabinosus*. Posteriormente, o filtrado foi tratado em uma coluna com carvão ativado, lavando-se em seguida com solução aquosa de amônio, obtendo-se um efluente que se concentrou a vácuo, até obter uma solução com concentração de 4600 mg/ml, comprovado com *L. arabinosus*. A cristalização da biotina pura com pureza de 103-105% foi comprovada por análise de espectro de infra-vermelho, em relação a d-biotina obtida por métodos químicos.

Em seguida daremos uma série de provas sobre a biossíntese de biotina pelas bactérias.

2.3.3. Provas Microbiológicas da biossíntese

A. Biossíntese da biotina a partir de resíduos de batata.

Fillipi e Vennes (11) são autores dos primeiros experimentos para obter biotina a nível de laboratório, a partir de resíduos de batata.

As experiências foram inicialmente feitas com *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (18). A habilidade dos heterótrofos de lagoa para sintetizar biotina foi determinada isolando-se culturas puras da lagoa em meios de MacConkey, eosina azul de metileno, nutrientes e extrato de triptona, glicose e agar (Difco). A incubação foi tanto aeróbia como anaeróbia.

Posteriormente, inoculou com heterótrofos isolados do meio modificado de Wright-Skeggs e incubado estaticamente com aproximadamente 10^5 células em tubos que continham 15 ml do meio. Regularmente foram retiradas amostras, num intervalo de 44-213 horas para a determinação da biotina.

Em 60 ml do filtrado de lagoa (usando filtro tipo HA Milli pore) a pH 7,0, determinou-se a habilidade dos microrganismos para utilizar e armazenar biotina do filtrado de lagoa. A amostra do filtrado foi incubada com 6 Erlenmeyers a 30°C nas seguintes condições:

a. em presença da luz

b. na obscuridade

Culturas de *T. floridana* (isoladas de lagoa) foram mantidas em meio de Pfenning's.

Em 124 ml. de filtrado foram adicionados 10^6 células de *Thiocapsa floridana*. Preparou-se também uma amostra para controle (sem filtrado de lagoa e incubada a 30°C nas condições a e b).

Algas e bactérias sulfúreas púrpuras.

A *Chlorella vulgaris* foi mantida em meio especial (Difco).

O BOD, n^o e Coliformes foram determinados pelos métodos padrões para análise de água e água residual (12,11,14,20).

O resultado da produção de biotina na lagoa primária que recebia resíduos de batata, foi incrementado 100 vezes durante a fase anaeróbia (ao passar de 100 a 10.000 ng/l.) e na fase das bactérias sulfúreas púrpuras. Figura 10.

Na segunda lagoa a formação de biotina diminuiu porque o conteúdo de matéria orgânica era inferior (a redução de BOD foi somente de 70%) no período de verão.

Na produção de biotina por heterótrofos da lagoa tomam parte duas espécies de *Aerobacter*, uma de *Enterococcus* e uma *Salmonella*. As espécies de *Aerobacter* e *Enterococcus* demonstraram sintetizar grandes quantidades de biotina depois de 44 horas de incubação. O principal produtor foi o de *A.aerogenes*.

Quanto a utilização de biotina, a amostra preparada sem filtrado da lagoa demonstrou ausência de biotina (incubada a 30°C na obscuridade). As amostras incubadas com iluminação demonstraram a utilização da biotina por parte das algas *Chlorella vulgaris*. As determinações foram realizadas nos intervalos de 26,168 e 264 horas Quadro 19. Ficou assim comprovado que as algas não utilizavam grandes quantidades de biotina nas

amostras incubadas na obscuridade Quadro 20.

A bactéria *Thiocapsa floridana* porém não demonstrou variações nas quantidades utilizadas tanto em presença como na ausência de luz. Quadro 21.

Os limites de produção de biotina foram de 10-4.400 ng/l para uma mistura de resíduos de batata e domésticos. Quadro 12.

B. - Biossíntese do 7-KAP - Comprovação com *Escherichia* (auxótrofo de biotina). O mutante de *E. coli* K-12-Y10 foi utilizado nesta prova (43).

Foi preparado um extrato de células livres proliferadas a 37°C com agitação, utilizando-se um meio mínimo com 10^{-4} ug . de biotina/ml. Paralelamente preparou-se uma amostra em branco para referência. As células incubadas foram centrifugadas, lavadas e mantidas em refrigeração.

A mistura de reação foi preparada com fosfato de piridoxal , aminoácidos (L-alanina, serina ou cistina) de acordo com o roteiro da síntese. Foi adicionado também o enzimo que se acredita seja o responsável pela síntese de 7-KAP. Como reativos utilizaram 7-KAP sintetizado pelo método de Suyama citado em (43) e os aminoácidos foram fornecidos por Eastman kodak Co.

Preparação do pimilil CoA - O ácido pimélico forma o anidrido monômero somente em condições especiais. O monotioéster do ácido pimélico necessário para as reações subseqüentes não pode ser preparado por nenhum dos métodos conhecidos sem a simultânea formação de tioéster. Nestas circunstâncias foi necessário procurar um método para preparar o tioéster.

A preparação do éster mono-O-tiocresol do ácido pimélico se efetuou pelo método de Hill e Crothers citados em (10) e foram obtidos simultaneamente mono e ditioéster que necessitaram ser purificados.

O pimelil CoA foi preparado a partir do mono-derivado e o CoA pelo método de Kloss e Dickinson.

O pimelil CoA pode ser usado sem purificação. Quando o pimelil CoA e alanina foram adicionados ao meio para o cultivo das células em presença de fosfato de piridoxal, obteve-se um composto intermediário da síntese, que substitui a biotina no desenvolvimento de leveduras.

Na omissão de pimelil CoA, não se formava o composto intermediário, da mesma forma, a ausência de alanina reduzia em 20% a quantidade de vitamina formada, e o fosfato de piridoxal atuava como um cofator na reação e sua ausência também, diminuía a quantidade do produto final.

Quando se substituiu a alanina por serina, o resultado foi o mesmo. Concluiu-se então que, a atividade das duas substâncias poderia estar relacionada com a presença da alanina endógena, no enzimo impuro. Quando este enzimo foi submetido à diálise, o rendimento em biotina diminuiu, não mais existindo a equivalência. Quadro 22.

Substituindo a alanina por cisteína, não houve produção de biotina a partir do enzimo natural.

O sobrenadante da reação entre a alanina ou serina e o extra-

to dialisado foi submetido a provas de cromatografia em papel com tres tipos de solventes. Os resultados permitiram afirmar que o intermediário formado enzimaticamente a partir da alanina tinha a mesma eficácia que o 7-KAP sintetizado. Respostas semelhantes foram obtidas por cromatografia e eletroforese combinadas.

A presença de 7-KAP nos microrganismos formadores de biotina foi uma confirmação de que este composto atuava como intermediário na síntese de biotina. Foi comprovado também que nem todos os mutantes tinham a capacidade de síntese; ou seja, não possuía o enzimo. O grupo de mutantes IV 310 deu o valor mais elevado de produção ou seja, 2.600 moles/ml. Quadro 23.

Estudos prévios com *P. chrysogenum* haviam indicado que a quantidade de 7-KAP e a destiobiotina excretada no meio de crescimento estavam sob controle da biotina. Fêz-se uma avaliação do papel da biotina na síntese do 7-KAP, utilizando-se o grupo de mutantes II 134. Verificou-se que, incrementando a quantidade de biotina, obtinha-se o valor ótimo de 0,20ng/ml, o qual correspondia a máxima atividade enzimática. Esta atividade decresceu quando a quantidade de biotina chegou a 0,5ng/ml. Ver Quadro 24.

C. - Biossíntese do ácido 7,8 - diaminopelargônico (DAP).

Foram utilizados os mutantes bio A105, bio A310 isolados das culturas de *E. Coli* K-12, tipo Y10-1 e HfH (10, 43).

Para o cultivo foram utilizados o meio Penassay Broth e agar nutriente de Difco para o preparado do meio básico, adicionando-se glicose (2g/l), L-leucina (0,1g/l) e tiamina. Em seguida o meio foi filtrado e esterilizado.

Tôdas as colônias foram cultivadas a 37°C com agitação. Para isso 2ml do meio foram inoculados e incubados durante 18 hs. As células em seguida foram recuperadas por centrifugação e a concentração determinada colorimetricamente com filtro 66. Aliquotas de 2ml do meio receberam 0,1mg de biotina, e após inoculação e incubação obteve-se uma concentração de $1,5 \times 10^6$ células/ml. Um segundo tubo foi inoculado e incubado somente com o meio básico para servir de controle. Ao fim de 18 horas de incubação, a cultura que continha biotina foi transferida para 100ml do meio mínimo; quando se alcançou a fase estacionária de crescimento, procedeu-se a recuperação das células por centrifugação a frio.

Para estudo da quantidade de biotina armazenada, as células foram desenvolvidas em meio mínimo, separadas por centrifugação e lavadas. As células assim obtidas foram distribuídas em porções iguais de 100ml do meio básico adicionando-se biotina até uma concentração de 5mg/ml. Os frascos foram incubados por duas horas e posteriormente as células foram separadas para submeterem-se às provas de atividade de síntese da destiobiotina. Para essas provas, tomou-se um ml da mistura de reação e adicionaram-se 2mg de células (base do peso seco), 150n moles de fosfato de potássio (pH 7,5), 2 moles de ácido dl-7, 8-diaminopelargônico, incubando-se a mistura a 37°C. Após a incubação o sobrenadante foi decantado e determinado o conteúdo de destiobiotina.

Os níveis de destiobiotina foram determinados usando-se mutantes do grupo III bio A302. A quantidade de células que depende da síntese de destiobiotina foi determinada paralelamente por um método turbidimétrico modificado por Snell citado em (9), usando-se meio básico e discos de Genghof, também foram preparados padrões de destiobiotina.

A presença de intermediários da síntese foi revelada por cromatografia com papel Whatman 3MM e eletroforese em uma célula Spinco-Durrum, usando um tampão 0,025 molar de citrato de sódio (pH 3,0).

As posições dos intermediários da síntese da biotina foram reveladas por bioautografia com bio A302 ou com leveduras.

Células do mutante bio A310 (grupo IV), incapazes de desenvolver-se em presença de destiobiotina, foram incubadas por três horas com DAP. Formou-se um intermediário, o qual suportou o desenvolvimento de um mutante bio A302. Este intermediário não foi encontrado posteriormente quando o DAP foi eliminado da mistura.

Provas cromatográficas com o sobrenadante revelaram três áreas de deslocamento, com Rfs 0,41, 0,63 e 0,83. Os valores de Rf para DAP, 7-KAP, biotina e destiobiotina puros correspondem a 0,38-0,40; 0,63-0,65; 0,75-0,77 e 0,83-0,85 respectivamente, concluindo-se que a destiobiotina possui o maior Rf.

D - Biossíntese da destiobiotina.. Para esta prova foi utilizada uma cultura de bio A105. Figura 20.

A Figura 20A corresponde ao tempo necessário para a síntese a partir de DAP; depois de 3 horas a síntese começa a decrescer. A Figura 20B, relaciona a concentração de DAP com a formação de destiobiotina. Quando a concentração de DAP atinge 250nmoles/ml, a concentração de destiobiotina permanece constante em seu valor máximo. A Figura 20C relaciona a concentração de células com a de destiobiotina.

A produção de destiobiotina é interrompida quando a concentração de células atinge a 8 a 10mg/ml (peso seco). A Figura 20D relaciona a formação de destiobiotina com o pH; o valor ótimo de pH esteve entre 7,0-7,5.

A síntese, no caso de *E. coli*, é inibida quando as células se encontram em meio com concentração elevada de biotina.

No caso de 7-KAP utilizou-se mutante bio A105 e inoculou-se em meio que continha biotina, a 37°C, com agitação por duas horas. Observou-se um decréscimo na síntese de destiobiotina, com uma quantidade de 3mg. de biotina/ml. Quando se adicionou cloranfenicol a mistura reagente inibiu a síntese. Estes resultados permitiram verificar que a biotina atuava como um repressor na síntese de destiobiotina. Figura 21.

Vários precursores têm possibilidade de formar o grupo ureído carbamil. O efeito da adição de várias fontes de carbono na mistura mostraram que a glicose apresentava os melhores resultados, com uma concentração de 28 umoles/ml; conseguiu-se 6,87 umoles de destiobiotina por hora.

A histidina, glicina e formiato apresentam possibilidades e podem ser considerados como doadores de C-1. A serina e o carbonato ácido de sódio não foram tão bons quanto a L-alanina como doadores de carbono em relação com a glicose.

A destiobiotina pode também ser convertida em biotina por *Rhodotorula flava*, cultivada em meio contendo 500ug/ml de dl-destiobiotina, em condições idênticas às das provas com o 7-KAP.

A formação de biotina, verificada mediante ensaio com *S. cerevisiae*, após um dia de incubação, deu um rendimento de 250 ug/ml, a produção de biotina foi máxima com 48 horas de incubação. Resultados idênticos foram observados com *B. arabinosus* apresentando desenvolvimento significativo entre o primeiro e o terceiro dia. Figura 22.

Verificou-se também que na síntese de biotina a partir da destiobiotina, existe a possibilidade de se obter dois derivados com características semelhantes às da biotina e que correspondem a bionordestiobiotina e destiobiotinamida.

Algumas considerações genéticas e bioquímicas sobre a biossíntese da biotina a partir da destiobiotina foram feitas utilizando-se mutantes de *E. Coli* K-12, colônia Y10-1 e HfrH. Para a detecção da biotina utilizaram-se mutantes K-12 (T5-2 e T50-1) e preparou-se um fago λ + irradiando com luz ultra-violeta o lisogenio Y 10-1. Além disso, foram preparados dois mutantes o Yd bio t 75 e Yd bio t103.

Utilizou-se como meio geral um caldo nutritivo em tampão de fosfato e como meio mínimo sais de amônio, potássio, magnésio, glicose, tiamina, L-leucina. Para as provas empregou-se também agar mínimo (Difco).

O isolamento de mutantes que requerem biotina, foi feito baseando-se na técnica do limite de enriquecimento e obtiveram-se misturas de bio⁻ e bio⁺ quando cultivadas em meio com 10^{-4} ug de biotina/ml.

Para ensaios de cruzamento foram aplicados dois métodos:

- a. fazendo-se picagem em placas com agar nutriente dos três tipos de bio⁻ mutantes.
- b. Tomou-se uma porção de agar, onde se inoculou colônias de um mutante individual, as quais receberam uma solução de biotina. O cruzamento neste caso resulta pela difusão dos intermediários da síntese.

A biotina total contida no filtrado de cada mutante foi determinada através de ensaios com *S.cerevisiae* (discos), utilizando-se os reativos d-biotina, dl-destiobiotina (DTR), DAP e 7-KAP

Para a determinação dos pontos de mutação, realizou-se uma análise genética dos mutantes que requerem biotina. A análise foi feita por transdução com λ^+ d bio (um tipo de fago), preparando-se também os lisantes dos fagos λ^+ d bio.

Resultados: - Foram isolados 6 grupos de *E.coli* K e um total de 52 tipos de mutantes que mostraram diferentes níveis de absorção dos nutrientes (o meio foi suplementado com 10^{-4} ug de biotina/ml).

Foi encontrado 10^{-4} ug de biotina exógena, que não causava repressão na biossíntese. Das provas com meio mínimo suplementado com 10^{-4} ug de biotina exógena, encontrou-se que os níveis da biotina total presente no filtrado, flutuavam entre 4.0×10^{-1} ug/ml a menos de 2×10^{-5} ug/ml; este último valor representa a menor concentração que pode detectar-se por esta prova.

A bioautografia demonstrou que os mutantes excretavam diferentes intermediários, então dividiu-se os mutantes em 4 grupos, que tinham o seguinte comportamento:

Grupos	I	II	III	IV
Rf		0,62-0,67	0,62-0,67	0,62-0,67
			0,36-0,45	0,36-0,45
				0,82-0,87

Os cromatogramas deram valores de Rf semelhantes aos da biossíntese do DAP. O grupo I não excretou nenhum intermediário -

com atividade vitamínica; o mutante II excretou somente o intermediário nº1, que tinha comportamento similar ao 7-KAP (Rf= 0,64); o grupo de mutantes III, excretou o 7-KAP e o intermediário nº2, ou seja, DAP (Rf = 0.38); o grupo IV excretou o 7-KAP, DAP e o intermediário nº3 ou destiobiotina (DTB) (Rf= 0.83). Quadro 25 e 26.

A presença de biotina no grupo IV permitiu delinear as seguintes etapas na biossíntese de biotina:

Ác. Pimélico ——— 7-KAP ——— KAP ——— DTB ——— Biotina

A completa coincidência deste delineamento foi substanciada mediante cruzamento entre os mutantes e utilizando o fago Y101. O grupo IV teve capacidade para manter aos outros três grupos; os mutantes do grupo II e III têm capacidade para manter somente o grupo I; este por sua vez foi incapaz de manter qualquer um dos outros grupos. Quadro 26.

Todas as provas realizadas serviram para confirmar que a destiobiotina, é o último intermediário na biossíntese. É possível que o processo se inicie com a condensação do ácido pimélico e L-alanina. Figura 23.

DISCUSSÃO e CONCLUSÕES

A importância da biotina está amplamente comprovada pela relação com todas as reações de carboxilação. Sua deficiência em animais de laboratório favorece o desenvolvimento de infecções, anemia e efeitos cancerígenos (relacionado com o pigmento amarelo NN-dimetil-amino-azo-benzeno, presente na manteiga e na avidina). Não se conhece casos de deficiência de biotina nos seres humanos, salvo quando esta é induzida. (13, 24, 49, 51, 4).

Portanto, do ponto de vista nutricional, sua utilização é notadamente para alimentação animal (rações) e como nutriente de microrganismos; foi comprovado por exemplo, que as leveduras necessitam de biotina para seu crescimento, sua deficiência provoca uma diminuição na produção de álcool, sendo necessário fornecer-lhe 0,23-0,76ug/g de nutriente para que seu desenvolvimento seja normal. Em fungos, a biotina estimula o crescimento (*Penicillium digitatum*) embora existam espécies como *Ficomyces brakesleanus* e *Esporoboromyces*, que em meios especiais sintetizam biotina. Está comprovado assim mesmo que as bactérias necessitam desta vitamina. Uma experiência muito interessante com biotina foi a criação de peixas, tipo "Cat - Fish" e Tilápia, obtendo-se rendimentos de 600 a 1600kg/ha. / ano. (45, 49, 17)

Comprovada sua importância e baseando-se na presença de biotina nas correntes aquáticas, foi estudada sua produção, seja por fermentação ou por processo de oxidação biológica, que é o método revisado neste trabalho. Na pesquisa de precursores, encontrou-se que a análise química da batata e de seus resíduos demonstraram ser possível a utilização como precursores da biotina. (9, 10, 11, 28, 1, 41, 43, 46, 47)

Os resíduos industriais de batata sofrem uma eliminação prévia dos sólidos em suspensão que podem ser utilizados para a alimentação de aves e animais. A fração residual de matéria orgânica dissolvida na água é conduzida a lagoas de estabilização, com um valor de BOD de 9-18g/m³/dia, ou 10-50g de BOD/ha/dia. A matéria orgânica é parcialmente oxidada pelas bactérias (*Thiocapsa floridana*) para produzir CO₂, NH₃ e outras substâncias que são metabolizadas pelas algas (*Chorella vulgaris*), que fornecem oxigênio por fotossíntese. (11, 2, 1, 15, 16, 20, 21). Outra fração desta matéria orgânica, representada por aminaçãocidos livres, carboidratos, etc., é utilizada pelas bactérias do grupo *E. coli*, caso do *Aerobacter aerogenes*, para seu metabolismo e síntese da biotina. Podemos dizer que os três microrganismos estão intimamente relacionados com a biosíntese e para seu desenvolvimento normal são necessárias determinadas condições ecológicas, tais como temperatura da água (3-25°C), temperatura ambiente (16-30°C), profundidade média da lagoa (1,5m) e pH (7,0-7,5). Determinou-se por exemplo, que a elevação da temperatura diminuía a contagem de bactérias, que nas lagoas muito profundas a produção de biotina era reduzida e que as correntes de vento favoreciam a aeração (40, 25, 26, 31, 32, 36, 39, 46, 45).

A presença de biotina pode ser comprovada mediante o emprêgo de ¹⁴C. Sua absorção relaciona-se com a biotina armazenada nas células. Assim por exemplo, células de *A. Carteri* que absorviam ¹⁴C em quantidades de 2500 c.p.i., demonstraram ter armazenada 0,2ug/l. Cumprindo-se todas as exigências e assim mesmo determinando-se a presença de biotina em resíduos de alimentos tratados pelo método de lodos ativados, encontrou-se valores de 50ug/l., que são superiores aos resultados encontrados ao analisar a presença de biotina em lagoas facultativas (27, 29, 18, 22, 11, 6).

Outro aspecto interessante relacionado com a presença de biotina nas lagoas é o fato de estarem sempre presentes outros integrantes do complexo B, como a tiamina, cianocobalamina, niacina, etc., e que nos leva a admitir a possibilidade de obter estas vitaminas no tratamento dos resíduos. (22, 29, 3, 42, 29).

Concretamente sôbre resíduos de batata, tem-se comprovado com culturas puras que é possível a obtenção de biotina porque está presente no tratamento por lagoas facultativas, em quantidades mais elevadas no período do verão; embora os resultados tenham sido aceitáveis, verificou-se que tratando resíduos de usina de açúcar a partir de beterraba e resíduos domésticos, os resultados foram melhores em relação àqueles obtidos com os resíduos de batatas. Admite-se portanto, que os resíduos de beterraba e os resíduos domésticos têm precursores mais efetivos, especialmente cisteína e glicose. (11).

O fato de se utilizarem resíduos de custos praticamente insignificantes justifica tôdas as experiências que se intentam levar avante, além de outros aspectos a considerar sôbre a síntese da biotina. Sabemos que é possível obtê-la por síntese química, mas o procedimento além de apresentar grandes dificuldades origina um produto de síntese, uma mistura, da qual é muito difícil se separar a biotina com atividade biolôgica semelhante à biotina natural. No processo de biossíntese obtêm-se diretamente a d-biotina. (13, 49, 42, 51).

Qualquer que seja o processo empregado, em lagoas de estabilização ou oxidação, utilizando bactérias (*E. coli*) é necessá-rio conhecer o mecanismo de síntese, estabelecido recentemente através dos seguintes trabalhos:

Partindo de materiais simples, aminoácidos, glicose, comprovou

se que o *Aerobacter* tem a faculdade de sintetizar biotina na ordem de 19,0ug/1000ml de cultura. Comprovou-se que o *Aspergillus niger* também tem a faculdade de sintetizar biotina e que a síntese dava maiores rendimentos quando se acrescentava ao meio ácido pimólico e cisteína; neste caso acreditava-se, também, que se formava um intermediário, o qual se denominou tiobiotina (2,9,10,26,28,36,43,51).

Continuando os ensaios encontrou-se que um tipo de *Achromobacter* IVS, tinha a faculdade de sintetizar biotina partindo do ácido isovalérico e cisteína.(13,26). De todos os ensaios anteriores pelo menos um aspecto estava ficando claro: o ácido pimólico era o precursor na síntese da biotina. A primeira experiência de síntese na que se considerou o aspecto enzimático foi realizada com *Achromobacter*, o qual tinha a faculdade de sintetizar biotina partindo de cisteína, carbamil fosfato e pimelil CoA; comprovou-se a presença da detiobiotina como intermediário. Embora a cisteína atuasse como um excelente precursor, outras possibilidades foram pesquisadas, em especial para aqueles materiais que não tinham cisteína em sua composição como é o caso dos resíduos de batata.(9,10,11). As primeiras experiências a respeito foram realizadas com mutantes K-12 de *E. coli*, os quais em presença do pimelil CoA e L-alanina, formavam um composto que era intermediário na síntese e correspondia ao ácido 7-oxo-8-aminopelargônico (7-KAP); acreditava-se que sua formação ocorria possivelmente por transaminação. Verificou-se também que serina, lisina e ácido glutâmico atuavam como precursores dando bons resultados quando a síntese era realizada por *Radiobacter* IAM 1256 e *Radiobacter* IAM 157. Foi demonstrada ainda nesta experiência a presença de um intermediário, a destiobiotina que se diferenciava da detiobiotina por carecer de um átomo de enxofre (34,35). Continuando, encontrou-se que depois do 7-KAP, existia na sequência da síntese outro composto que correspondia ao ácido

7,8-diamino-pe1argõnico, o qual era sintetizado por um tipo - de mutante K-12 de *E. Coli*, capaz de se desenvolver em meios que continham desbiotina. Estas afirmações foram plenamente - comprovadas quando se realizaram experiências cromatográficas, obtendo-se valores de Rf bem definidos, que são:

DAP	0,38-0,40	Destiobiotina	0,83-0,85
7-KAP	0,63-0,65	Biotina	0,75-0,77

Comprovou-se também que a serina, histidina e glicina (que não tem enxôfre em sua molécula), atuavam como bons precursores e que o ênzimo específico utilizava como cofatores ATP , magnésio e bicarbonato de sódio (43, 45). Até êste ponto sô faltava demonstrar concretamente a participação da destiobioti na na sîntese. Ensaando-se com *R. flava*, comprovou-se a transformação de destiobiotina em biotina; em todo caso, persistia a dũvida de que se tal caso aconteceria com bactérias, especial mente com o grupo *E. Coli*. Foi somente em 1968-1969, que se - comprovou mediante trabalhos de ordem genética e bioquímica , a possibilidade de sintetizar biotina quando atuava em ũltimo termo a destiobiotina. (52, 53, 54). A experiência consistiu em classificar cêrca de 60 auxotrofos da biotina, em particu lar mutantes K-12 de *E. Coli*,. Tal classificação resultou em quatro grandes grupos e mais a utilização de L-alanina e ácido pimêlico como precursores, permitiu através de ensaios cromatográficos definir a sequência da sîntese e a participação da destiobiotina. Foram obtidos os seguintes resultados de Rf:

7-KAP	0,62 - 0,67	DTB	0,83 - 0,87
DAP	0,38 - 0,45	Biotina	0,72 - 0,78

Estes valores comparados com os obtidos na sîntese de DAP,

praticamente são iguais e juntamente com as provas genéticas de diferenciação dos quatro grupos (I,II,III,IV), permitiram estabelecer a seguinte sequência nas sínteses:

AP → 7-KAP → DAP → DTB → Biotina

Resta apesar de tudo, comprovar a responsabilidade dos mutantes na formação do pimelil CoA (43, 9, 10).

O mecanismo anterior parece ser o mais apropriado para a síntese da biotina pelo *Aerobacter aerogenes*, a partir dos resíduos de batata (e de outros resíduos em geral), nos quais encontrem aminoácidos como precursores em cujas moléculas não esteja presente o enxôfre.

Crê-se por tudo o que foi exposto que o presente trabalho se justifica por se haver analisado as possibilidades de utilização dos resíduos das indústrias de alimentos que representam custos muito baixos. Além disso, foi possível estabelecer a sequência na síntese e os precursores necessários. Entretanto, embora o método de lagoas facultativas tenha sido mais usado, podemos dizer que esse método não é o mais aconselhável pois pode-se obter também a biotina em maiores concentrações por tratamento de lodos ativados e digestão, e por fermentação a nível industrial.

Em todo caso não cabe a menor dūvida sobre a possibilidade de utilização dos resīduos das indūstrias de alimentos para a obtenção de produtos de muito significado no campo nutricional. Deve-se contudo considerar que apesar da maioria dos trabalhos descritos terem sido feitos em carater experimental, existe a possibilidade de se utilizar grandes volumes de resīduos da indūstria alimentar para a produçāo dessa vitamina.

CONCLUSÕES

A maior utilidade da biotina foi comprovada nas sínteses microbiológicas, na alimentação de animais.

As análises químicas dos resíduos da batata demonstram o conteúdo de aminoácidos livres, carboidratos, etc., que se utilizam como precursores na síntese da biotina.

O tratamento em lagoas de estabilização não parece ser o método mais adequado para a obtenção da biotina, porquanto no tratamento de lodos ativados os rendimentos são mais altos.

A *E. Coli* tem a faculdade de síntese da biotina; supõe-se que no caso dos resíduos da batata, participe o *A. aerógenes* como formador. A *C. vulgaris* fornece maior quantidade de oxigênio e nas lagoas deve evitar-se a presença das algas verde-azuladas que alterem o processo da síntese e produzem odor desagradável; no caso de níveis baixos de nitrogênio, as algas *C. vulgaris* atuam como inibidoras do crescimento das bactérias e geralmente envolvem as bactérias e os produtos de síntese, tornando difícil sua separação.

A bactéria *T. floridana* é responsável pela oxidação de sulfitos a sulfatos; consome e armazena a biotina formada. A presença de concentrações elevadas de zinco, magnésio e pesticidas da batata, atuam como inibidores na biossíntese.

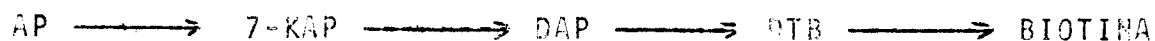
Os aminoácidos livres L-alanina, serina, cisteína, ácido glutâmico e ácido pimélico são os principais precursores na síntese.

No caso em que a síntese se inicia com ácido pimélico e cisteína, o átomo de enxôfre é ligado no início da síntese, formando o intermediário *detiobiotina*; no caso em que a síntese inicia-se com ácido pimélico e L-alanina, o átomo de enxôfre liga-se nos passos finais da síntese.

Na biossíntese com bactérias o precursor é um aminoácido livre que não tem o átomo de enxôfre em sua molécula, como L-alanina; no caso da biossíntese com leveduras o precursor é um aminoácido livre que contém enxôfre, caso da cisteína.

A síntese dos intermediários da biotina é enzimática.

A sequência da síntese quando se utiliza resíduos da batata e em geral para os meios com aminoácidos livres como L-alanina, e ácido pimélico (formado na degradação dos hidratos de carbono), é a seguinte:



A sequência é a mais indicada porque os resíduos de batata não possuem cisteína que é outro possível precursor..

Sugere-se estudar a utilização dos resíduos para a obtenção de outras vitaminas do complexo B, como tiamina, cianocobalamina, niacina, etc., que estão presentes quase sempre com a biotina.

QUADRO 1 - Resíduos das indústrias de vegetais^(a).

Mat. prima	Mat. fresco, ton.	Água res. 10 ³ lt./ton	BOD KG/ton.	Sols. em susp. Kg./ton	Sols. res. totais
Aspargos	120	40	5	4	325
Hervilha	750	30	15	2	190
Beterraba	270	16	70	20	400
Cenoura	280	16	25	17	450
Milho	2500	8	11	5	600
Tomate	5000	8	6	2	92
Batata	2550	16	36	23	345

(a) Valores para 1967. Census of Manufactures, U.S. Department of Commerce.

QUADRO 2 - Composição da Batata

Componentes	% médias	Limites
Água	77,5	63,2 - 86,9
Sólidos Totais	22,5	13,1 - 36,8
Proteínas	2,0	0,7 - 4,6
Gorduras	0,1	0,02 - 0,96
Carboidratos	19,4	13,3 - 30,53
Fibras cruas	0,6	0,7 - 3,90
Cinzas	1,0	0,44 - 1,90

QUADRO 3 - Análise qualitativa da batata fresca.

Aminoácidos livres:

Ácido aspártico
 Ácido glutâmico
 Serina, asparagina, treonina, glutamina
 Alanina, tirosina, valina e metionina

Ácidos orgânicos: Cítrico, isocítrico, ascórbico, láctico
 Málico, tartárico, succínico, oxálico
 Hidroxilamino, aconítico, alfa-ceto-glutarico, cafeínico, clorogênico.

Enzimas: Amilase, tirosinase, fosforibosase, catalase, aldeidase, polifenolase, oxidase, fosfatase, peroxidase, glioxalase, desidrogenase, sistoamilase, zimoxase, transaminase, descarboxilase.

Lipídeos: Linolêico, linolênico, palmítico, esteárico

Vitaminas, minerais, alcalóides.

Quadro 4 Aminoácidos livres, nitrogênio, gravidade específica e sólidos totais da batata pungo dos Estados Unidos (1966) (a).

Amino ácidos	batata fresca	2 Mês 10°C	5 meses 10°C	1 mês 20°C
Alanina	1.01	6.71	3.94	5.63
Arginina	5.00	8.29	5.89	7.99
Ac. aspártico	11.38	31.87	8.96	5.59
Cisteína (b)	-----	-----	-----	-----
Ác. glutâmico	14.71	9.80	4.33	6.29
Glicina	1.36	2.62	1.62	3.35
Histidina	2.96	4.80	3.08	4.57
Isoleucina	2.90	8.01	4.00	6.13
Leucina	0.82	2.57	2.68	2.20
Lisina	3.92	4.01	3.40	4.92
Metionina	2.10	3.54	2.96	2.42

continua

continuação.

Quadro 4 Aminoácidos, livres, nitrogênio, gravidade específica e sólidos totais da batata pungo dos Estados Unidos (1966) (a).

Amido	batata	2 Mês	5 meses	1 mes
ácidos	fresca	10°C	10°C	20°C.
Fenilalanina	2.11	2.54	3.59	3.12
Prolina	5.38	13.82	12.68	8.95
Serina y (c)				
Treonina	14.54	25.13	20.29	14.73
Triptofanio (d)	-----	-----	-----	-----
Tirosina	2.22	5.27	4.55	5.38
Valina	5.96	15.27	13.04	13.99
Nitrogênio	0.15	0.24	0.19	0.20
Grav.especif.	1.088	1.089	1.089	1.089
Sol.totais.	24.0	23.60	23.6	24.9

(a) Os aminoácidos foram expressos em micromoles/gr. de batata

(b) não se encontrou cistina

(c) a serina e treonina, foram calculadas como serina

(d) não se determinou o triptofano

(e) variedade de batata pungo

Quadro 5

Produção de resíduos por tonelada de batata fresca

Parâmetro	Valores
BOD ₅	KL. 40
COD ₅	90
Sólidos voláteis totais	70
Sólidos suspensos	45
Sólidos voláteis em suspensão	45
PO ₄ (fósforo total com P)	0.3
Nitrogênio total (N)	1.5
Água para o processo/ton	lt. 20,000

(a) BOD₅ é a demanda bioquímica de oxigênio depois de 5 dias de retenção a 20°C.

Quadro 6

Análise química na água de lavagem do amido

Componentes	porcentagens
Sólidos totais	10.85
Proteínas (Kjeldhal x 6.25)	28.50
Proteínas (reativo de Biuret)	4.60
Asparagina	20.40 (a)
Aminados compostos (análise automática)	18.80 (b)
Açúcares redutores totais	35.40
Potássio	17.70

(a) Da porcentagem de aminoácidos

(b) Da porcentagem de aminoácidos

Quadro 7

Análise dos resíduos da batata (casca e água de lavagem)

Parâmetro	kg./ton de material fresco
Água	110.0
BOD	6.0
COD	11.0
Sólidos totais	11.5
Sólidos voláteis totais	8.0
Sólidos em suspensão	8.5
Nitrogênio total (Kjeldhal)	0.12
Fósforo total (P)	0.05
Alcalinidade	1.5
pH	11.4

Quadro 8

Análise dos resíduos da batata
(Laboratório HIBBS dos Estados Unidos)

Parâmetros	percentagem
Umidade	94.5
Proteína	1.9
Gordura	0.02
Cinzas	0.16
Nitrogenio livre extraido	1.64
Nutrientes digeríveis totais	2.78
Cálcio	0.30
Fósforo	0.051
Hierro	0.0028
Sódio	0.099
pH	6.6
Pesticidas	ppm
Lindane	0.005
Aldrin	0.01
Heptacloroepoxi	0.01
Dieldrin	0.05
Endrin	0.05
DDE	0.5
DDD	0.1
DDT	0.1
Metoxicloro	0.2

Quadro 9

Utilização de substratos orgânicos por *Thiocapsa floridana*

Adições do substrato	Substrato só	Subst. mais HCO_3	Subst. mais S^{--}	Subst. mais $\text{HCO}_3 + \text{S}^{--}$
Nenhum	não (a)	não	não	sim (duplo)
Glucose	não	sim (duplo)	sim (duplo)	sim triplo
Frutose	não	sim (duplo)	sim (duplo)	sim triplo
Maltose	não	não	sim (b)	sim triplo
Lactose	não	sim (duplo)	sim	sim triplo
Sacarose	não	não	sim (duplo)	sim triplo
Glutamato	não	não	não	sim duplo
Histidina	sim (duplo)	sim (duplo)	sim (duplo)	sim triplo
Metionina	não	não	sim	sim duplo
Treonina	não	não	não	sim duplo
Aspartato	não	não	não	não
Valerato	não	sim	não	sim duplo
Butirato	não	não	não	sim duplo
Propionato	não	sim	não	sim duplo
Isobutirato	não	não	não	sim duplo
Hexanoato	não	sim	não	sim duplo
Isovalerato	não	não	não	sim duplo
Formiato	não	não	não	não
Acetato	não	sim	não	sim duplo
Succinato	não	sim	não	sim duplo
Piruvato	sim (duplo)	sim (duplo)	sim (duplo)	sim duplo
Fumarato	sim (duplo)	sim (duplo)	sim (duplo)	sim duplo
Malato	não	sim	não	sim duplo
Glicolato	não	sim	não	sim duplo

a - não, indica que a presença da substância adicionada ao substrato não aumenta o desenvolvimento das bactérias.

b - sim, indica que sua presença estimula o desenvolvimento das bactérias.

Quadro 10

Composição do meio completo para microrganismos
que requerem biotina para seu desenvolvimento.

Componentes	Quantidades
KNO_3	50 mg.
KH_2PO_4	7 mg.
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,004
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,004
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$	0,30
$\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$	0,60
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,15
EDTA	6,00
Vitaminas	0,20
Biotina	0,10
Acído nicotínico	0,10
Ac. pantoténico	0,10
Cianocobalamina	0,50
Inositol	3,0
Tiamina	5,0
Timina	0,01
Ac. p-amino benzoico (PAB)	0,02
Ac. fólico	0,002
Carvão ativado	1000,0 ml.

Quadro 11

Concentrações de Biotina em várias amostras tomadas nos tratamentos.

Origem da amostra	Conteúdo da biotina		
	Am. hidrolizada	não hidr.	cont. médio ug/gr. sólido
Res. fresco	21	5	1,0
Res. de digestão	50	100	0,5
Sobrenadante de estanques	30	3	10,0
Lodo ativado	10	15	0,7

Em termos gerais a presença de biotina nas águas residuais em tratamento foi de 10-50 ug/lt.

Quadro 12

Valores de Biotina e BOD₅ para resíduos industriais e domésticos

Origem e tratamento	Biotina (ng/l.)	BOD ₅ ug/ml.
Lagoas que recebem resíduos de batatas	1,226	12.700
Lagoas que recebem resíduos de usina de açúcar	3,660	542
Lagoas que recebem resíduos domésticos	77	50
Lagoas facultativas que recebem resíduos domésticos	122	25

Quadro 13

Efeito dos ácidos dicarboxílicos na biossíntese dos interme-
diários da biotina por *Agrobacterium sp.*

Adições	A. tumefaciens IAM 1525	A. radiobacter IAM 1226	A. radiobacter IAM 1527
Ácido oxálico	traços	traços	traços
Ácido malônico	"	"	"
Ácido glutárico	2,70	0,86	0,48
Ácido adípico	traços	traços	traços
Ácido pimélico	"	"	"
Ácido subérico	"	"	"
Ácido azelaico	"	"	"
Ácido sebáico	"	"	"

Quadro 14

Efeitos dos aminoácidos na biossíntese dos
Intermediários de biotina por *Agrobacterium sp.*

Adições	Intermediários sintetizados (ug/ml) por:		
	A. tumefaciens IAM 1525	A. radiobacter IAM 1226	A. radiobacter IAM 1527
L-alanina	traços	0.33	traços
L-leucina	"	traços	"
L-ácido glutâmico	"	0.34	"
L-ácido aspártico	"	traços	"
L-lisina	2.60	0.56	0.48
L-arginina	traços	traços	traços
L-ornitina	"	"	"
L-treonina	"	"	"
L-cisteína	"	"	"
DL-metionina	"	"	"

Quadro 15

Purificação do Enzimo

Elementos mg.	Proteínas	Ativid. especif. ^(a)		Ativ. total	
		BDC	DAPA	BDC	DAPA
Extrato crú	22,800.0	0.022	0.245	550	5,600
AmSO ₄ (20-50%)	13,440.0	0.032	0.333	442	4,480
DEAE-Celu losa	177.5	0.878	10.662	630	7,650
Hidroxila patita	66.5	5.697	76.944	380	5,130
Sephadex G-200	7.2	41.944	516.667	302	3,720

(a) milimicromoles de destiobiotina formada/mg.de proteína/2h
 Substrato:DAPA: 7,8-ácido diamino pelargólico
 EDC : ácido biotina diaminocarboxílico

Quadro 16

Necessidade de cofatores

Cofator omitido	Biotina formada	DTB formado(a)
Nenhum	0.491	4.293
ATP	0.061	0.419
NaHCO ₃	0.065	0.373
Mg ²⁺	0.049	0.181

Foi usado 12.5 ug de enzimo purificado

(a) milimicromoles de biotina ou destiobiotina formada/por 12.5 ug. de proteína/2hr.

Quadro 17

Substratos específicos do enzimo

Substratos	Biotina formada (a)	Destiobiotina formada(a)
Ác. 7-ceto-8-aminopelarg.	0	0
Ác. 7-amino-8-cetopelarg.	0	0
Ác. biotina diaminocarbox.	0.409	0
Ác. 7,8-diaminopelargon.	0	4.433

Foi usado 12.5 ug. de enzimo purificado
 (a) milicromoles de biotina ou destiobiotina formada/ por 12.5 ug proteina /2hr.

Quadro 18

Efeitos de diferentes aminoácidos na produção de biotina a partir do ácido biotindiaminocarboxílico

Aminoácido	<i>B. sphaericus</i> (A)	<i>R. rubra</i> (B)
	<i>L. arabinosus</i> (ug./ml)	<i>B. subtilis</i> (ug./ml.)
Nenhuma adição	1,8	1,0
Ác. L-aspartico	2,3	1,2
Ác. L-glutâmico	5,5	2,9
L-arginina	2,1	1,9
L-lisina	2,3	3,1
L-alanina	5,3	1,0
L-leucina	2,0	1,0
L-valina	3,1	

(A) - a mistura reagente continha 45,5 mg. de células, 10 ug. de ácido butindramino carboxílico (atividade comparada com d-biotina) e 2mg de aminoácido como indicado em 1 ml de Tris buffer 0,2 M (pH 7,2), e incubado por 12 horas.

(B) - A mistura reagente continha 45,5 mg. de células, 10 ug. de ácido biotindiaminocarboxílico (atividade comparada com d-biotina) e 2mg. de aminoácido como indicado em 1 ml. de tampão de fosfato, pH 7,2 e incubado por 12 horas.

Quadro 19

Produção de Biotina por culturas puras de lagoas

Microrganismos (n)	Tempo de incubação	
	44 horas	212 horas
	rendimento em mg/lt.	
4	21	19
16 (Salmonella sp.)	41	356
19	23	3213
20 (A. aerogenes)	734	663
21 (Aerobacter sp.)	434	44
22	32	191
24 (Enterococcus)	144	13
Controle (não inoculado)	14	

Quadro 20

Utilização de biotina

Tempo de in- cubação	Experimento		Controle *	
	biotina (ng/ml.)	alga por ml	biotina ng/ml	alga por ml.
0	283	$1,1 \cdot 10^5$	283	$1,1 \cdot 10^5$
25	150	$1,5 \cdot 10^5$	***	$1,4 \cdot 10^5$
48	190	$2,0 \cdot 10^5$	-	$1,4 \cdot 10^5$
67	170	$2,4 \cdot 10^5$	-	-
96	62	$2,6 \cdot 10^5$	270	$1,4 \cdot 10^5$
120	32	$2,3 \cdot 10^5$	-	-
138	26	$1,6 \cdot 10^5$	-	-
168	21	$1,6 \cdot 10^5$	280	$1,3 \cdot 10^5$
193	20	$1,3 \cdot 10^5$	-	-
216	19	$1,2 \cdot 10^5$	-	-
264	13	$1,2 \cdot 10^5$	280	$1,3 \cdot 10^5$

* Amostra incubada no escuro

** Amostra não analisada

Quadro 21

Utilização de Biotina por *Thiocapasa floridana*

Tempo de incubação	Biotina (ng/litro)			
	Experimental		Controle	
	Luz	Escuro	Luz	Escuro
0	8.500	8.500	8.500	8.500
53	4.600	3.600	8.500	8.500
192	-	2.800	8.500	8.500

Quadro 22

Biossíntese dos intermediários da biotina em
em extratos livres de células de *E. coli* (mutantes).

Mistura reagente	Equivalentes de biotina (ng/ml)(a)	
	Ênz. impuro	Ênz. dializada
Completa (b)	240	160
-L-alanina	50	5
-Pimelil CoA	0	0
-Fosfato de piridoxal	10	
L-serina	60	25
L-cisteína	0	

(a) ng/ml = 10^{-9} gr/ml.

(b) A mistura reagente completa continha 0,04 umol de fosfato de piridoxal, 0,15 a 0,45 umol de pimelil CoA, 50 umol de tampão (tris), 25 umol de L-alanina e 0,2 ml de énzimo em um volume final de 1 ml. Onde indicado, a alanina foi substituída por se rina ou cisteína.

Quadro 23

Distribuição do ênzimo de condensação do
7-KAP em vários grupos de mutantes produtores de biotina

Mutante bio _A	Equivalente de biotina (pmoles/ml)	at. específica (pmoles/mg. de proteína). (a)
Grupo Ia 110	<5	
Grupo I _b 124	300	20
Grupo I _c 123	1500	120
131	1300	120
Grupo II 134	1100	130
Grupo III 307	1900	190
308	2000	170
Grupo IV 310	2600	190
Y10-1	110	10
T50-1	<5	

Quadro 24

Efeito da concentração de biotina na formação do
ênzimo de condensação e na excreção do 7-KAP.

Meio c/biotina	Equivalentes de biotina	
	At. enzimática	Filtrado
mg/ml	mg/ml.	mg./ml.
0,05	180	80
0,10	230	90
0,20	590	170
0,50	280	90
1,00	170	40
5,00	<5	<5

Quadro 25

Identificação por cromatografia e electroforêsis intermediarios da biotina excretados pelos mutantes de *E. coli*.

Exemplos	nº de interme diário	valor R _F médio
Grupo II (colonia 34)	1	0.64
Grupo III Colonia 307	1	0.63
	2	0.37
Grupo IV	1	0.63
	2	0.39
	3	0.83
Linha extranha	1	0.64
	2	0.39
	3	0.83
7-KAP		0.62 - 0.67
DAP		0.38 - 0.45
DTE		0.83 - 0.87
Biotina		0.72 - 0.78

Quadro 26

Estudos de cruzamentos

Grupos de mutantes que intervêm no cruzamento	Possibilidades de cruzamento				
	Y10-1	Grupos de mutantes			
		I	II	III	IV
I	+	-	+	+	+
II	+	-	-	-	+
III	+	-	-	-	+
IV	+	-	-	-	-

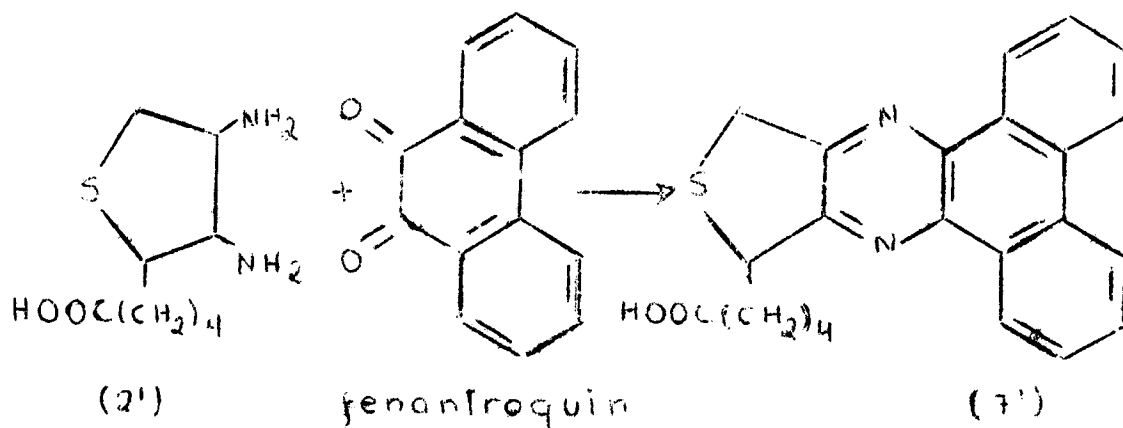
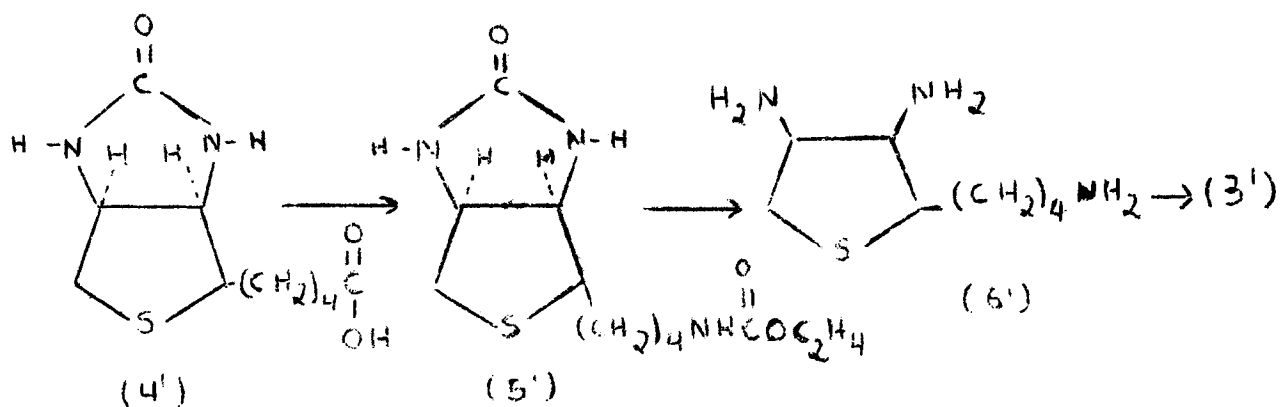
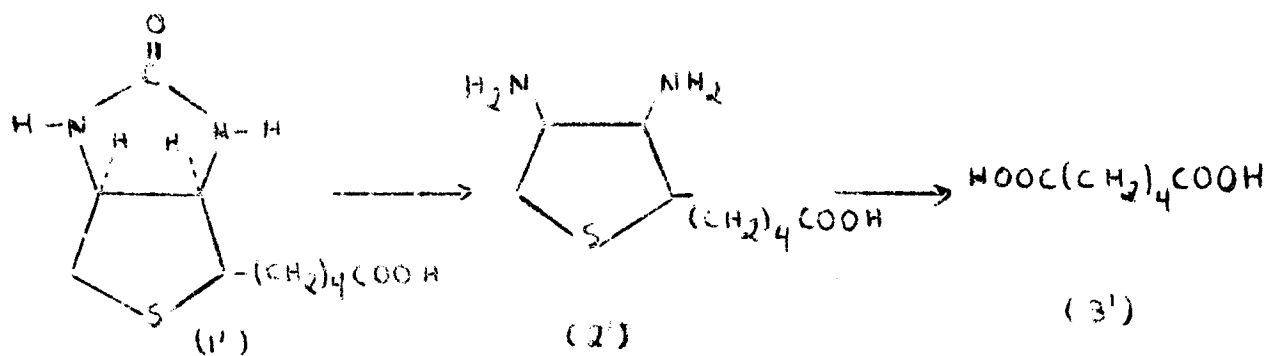


Figura 1a

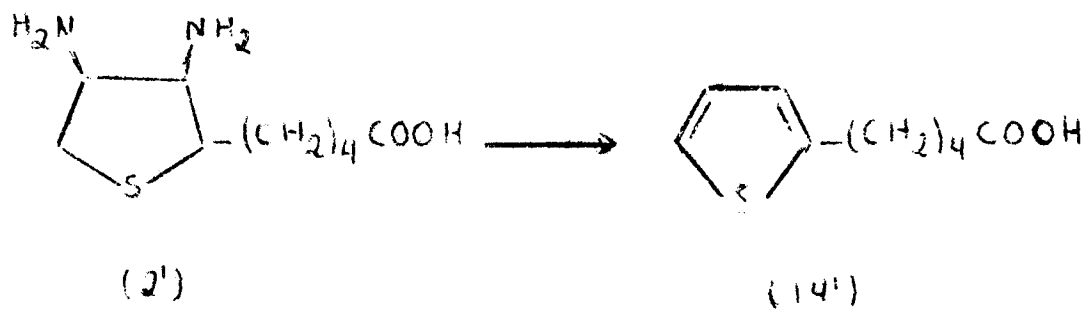
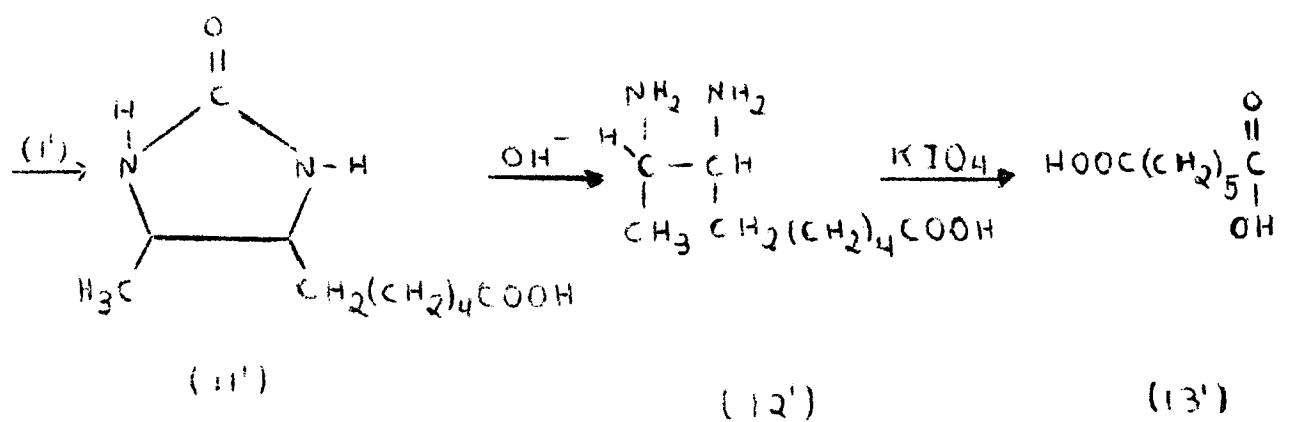
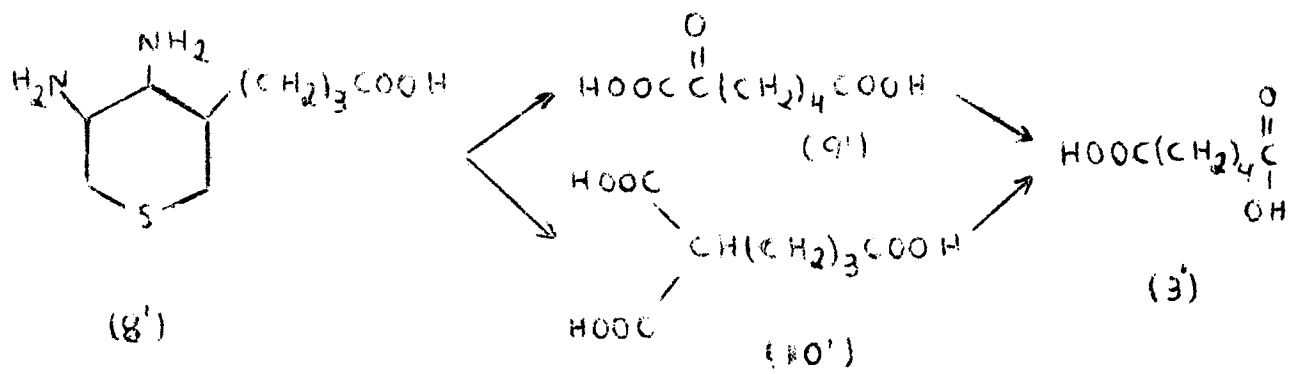


Figura 1b - Estrutura do Biotino

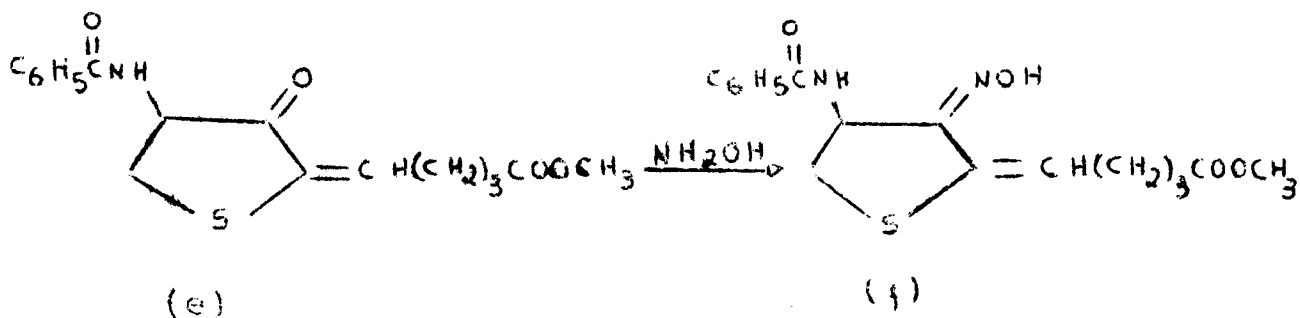
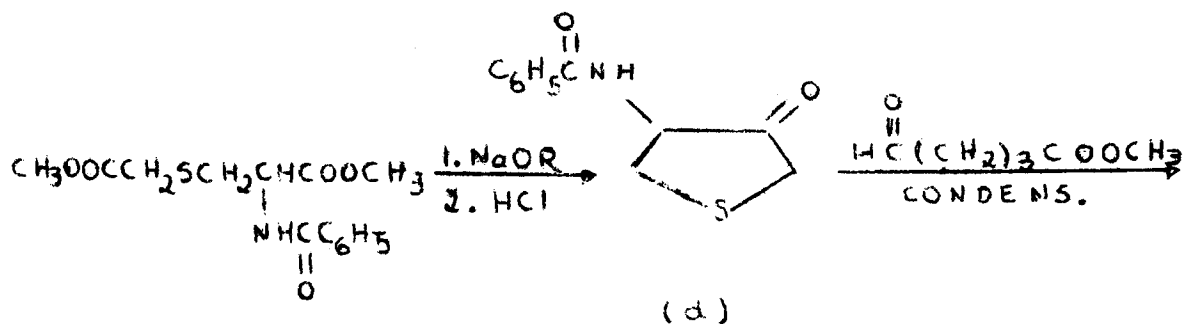
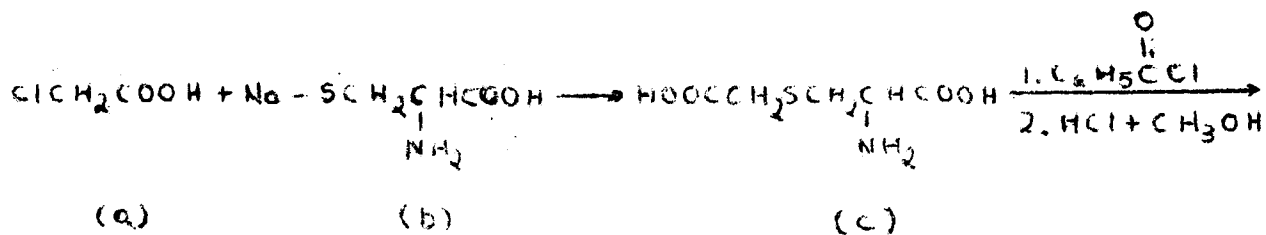


figura 2a

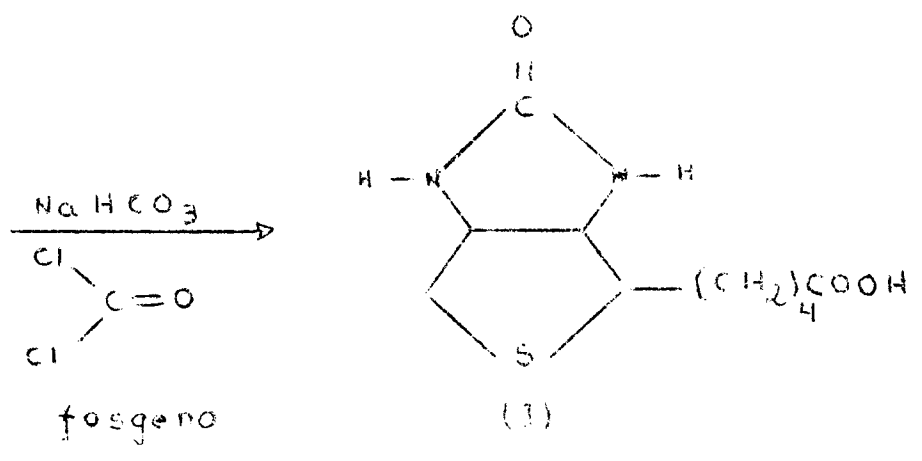
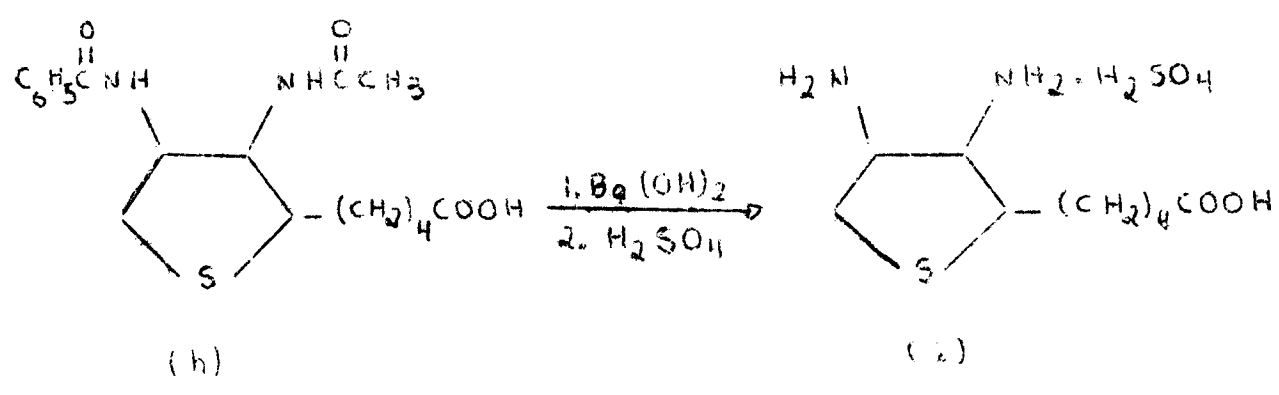
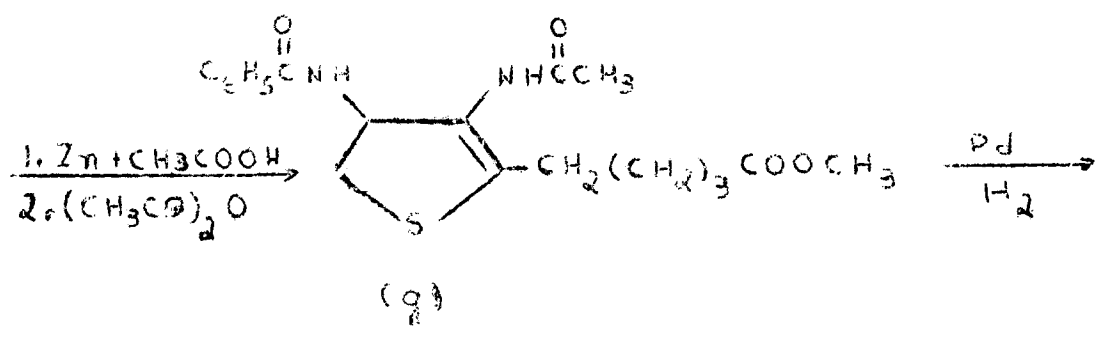


Figura 2 b Síntese da biotina

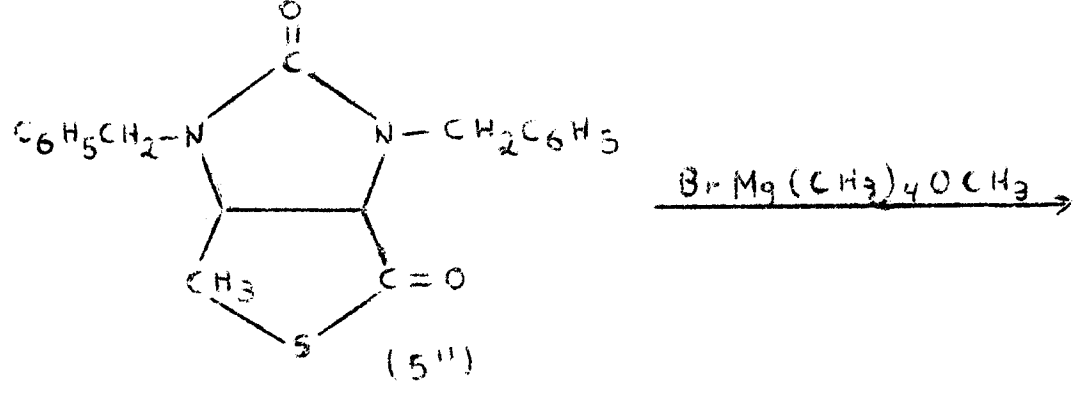
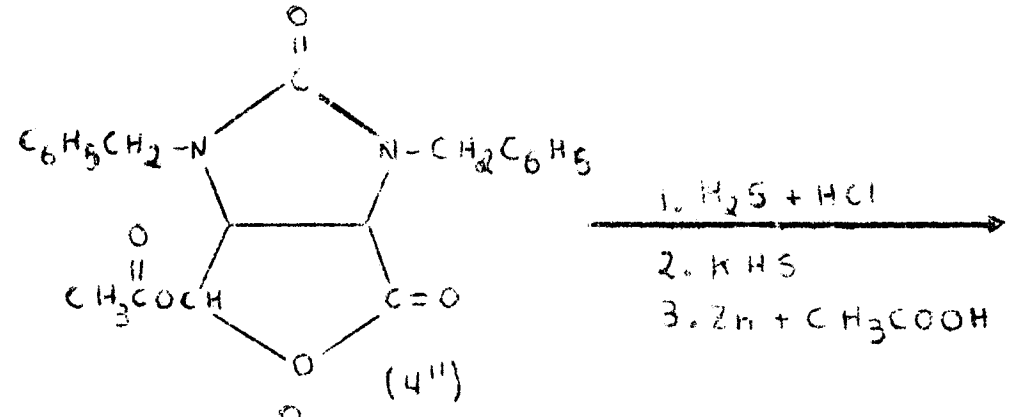
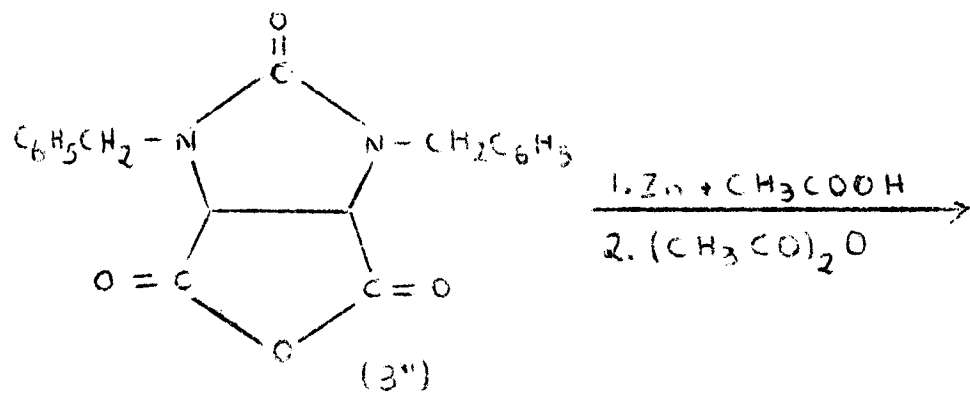
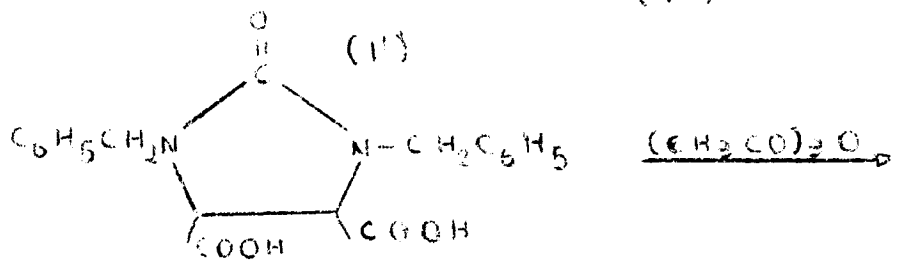
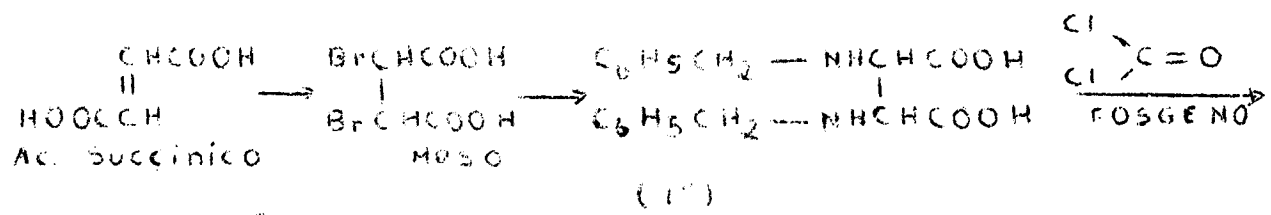


Figura 3a: Síntese comercial da Biotina.

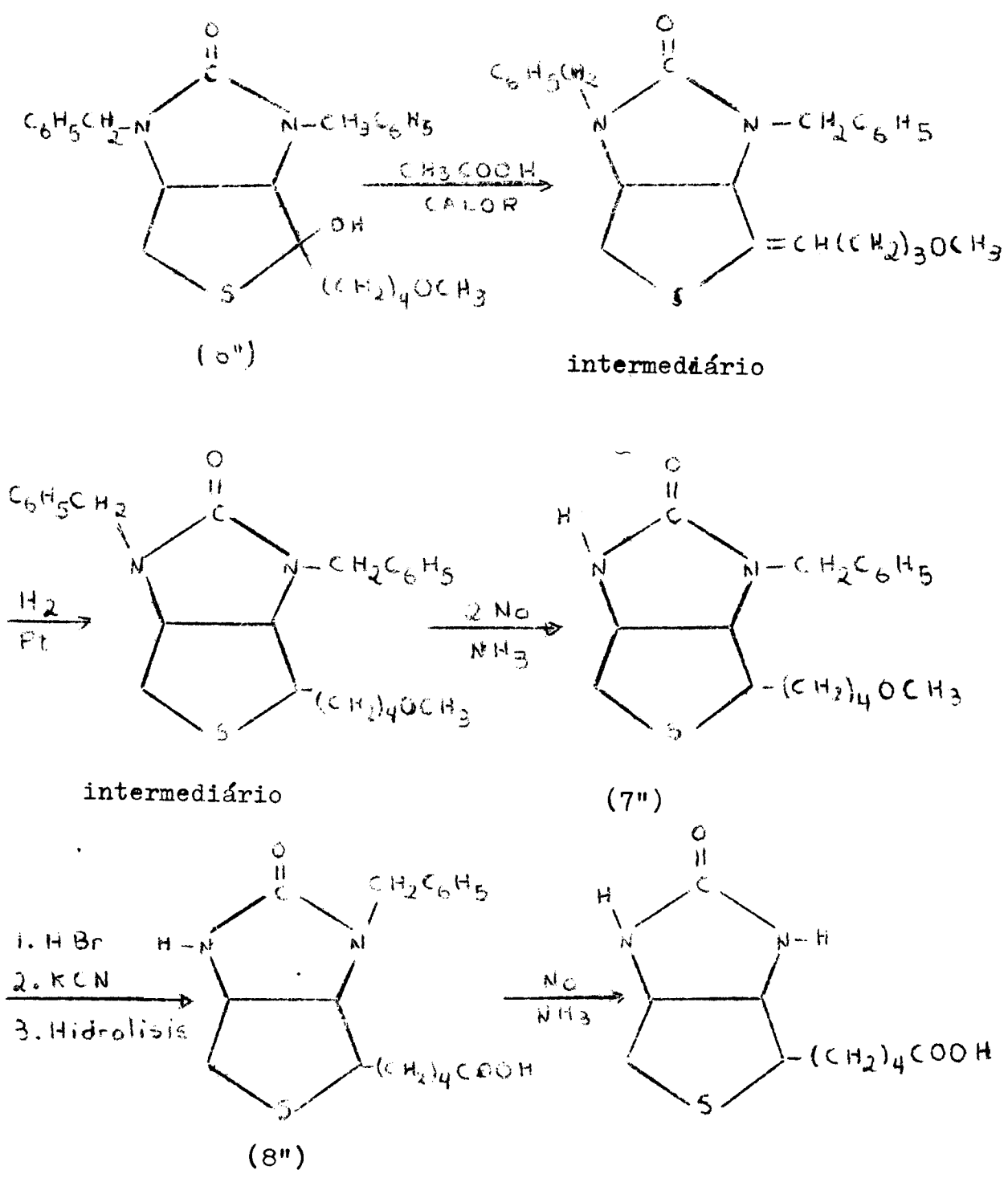


Figura 3 b : Síntese Comercial da Biotina

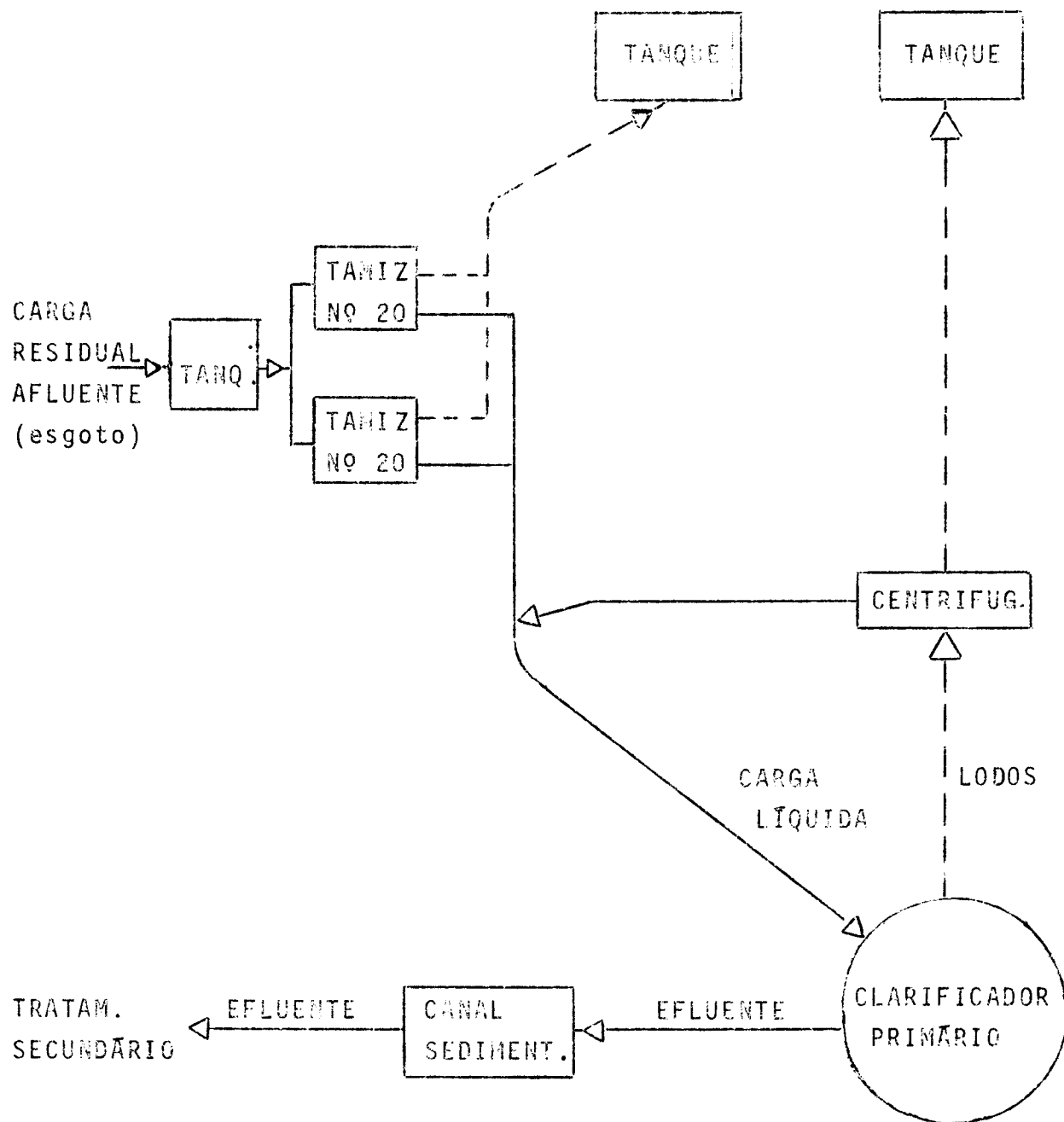


Figura 4: Tratamento Primário

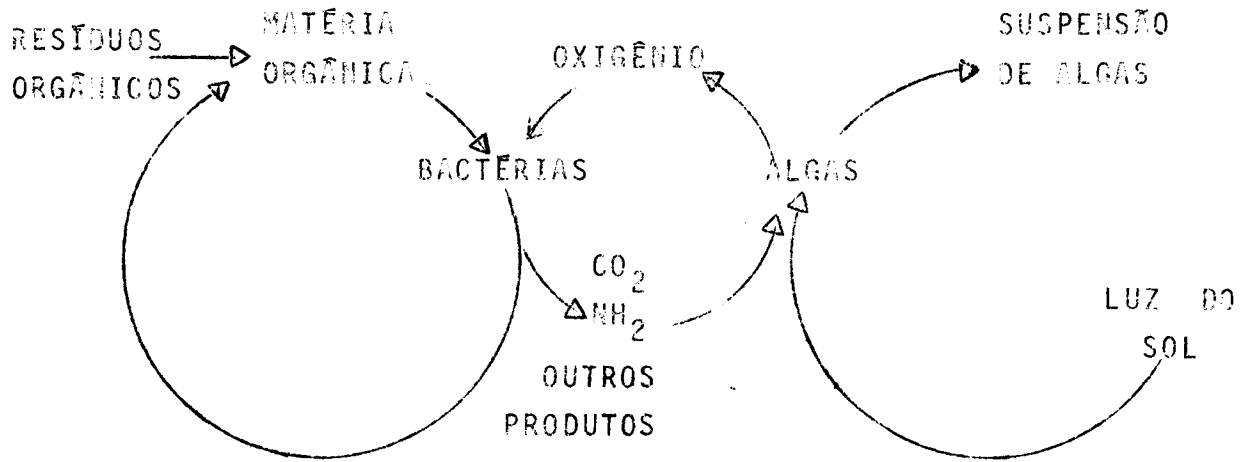


Figura 5: Ciclo de Fotossíntese e Oxigenação

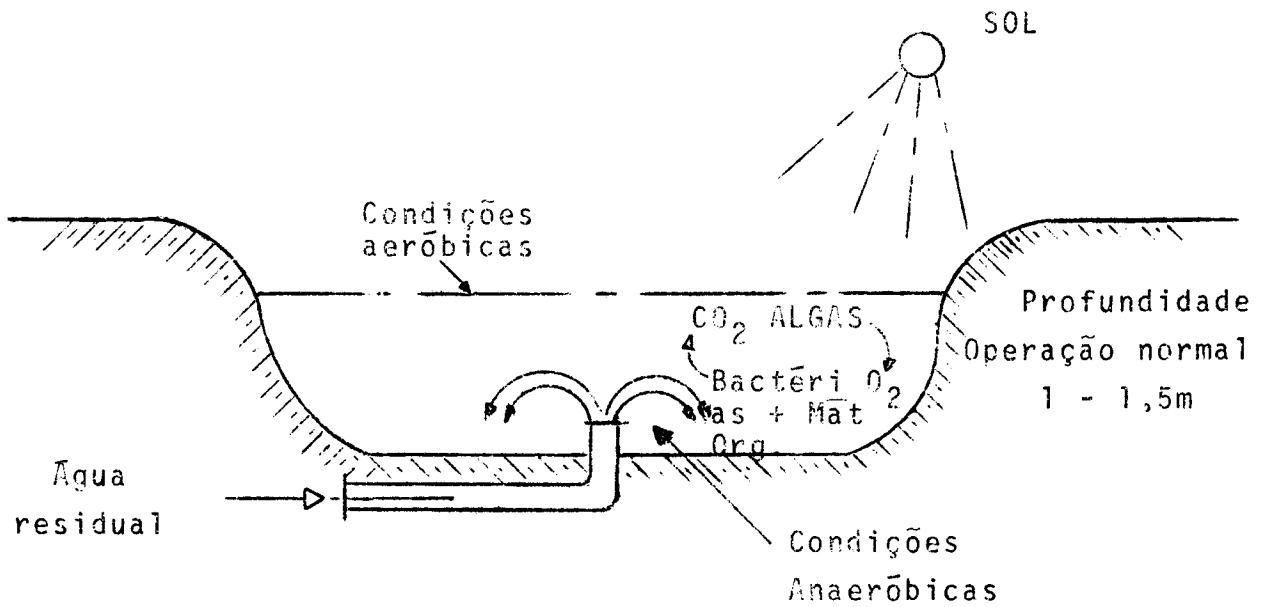


Figura 6: Lagoa Convencional

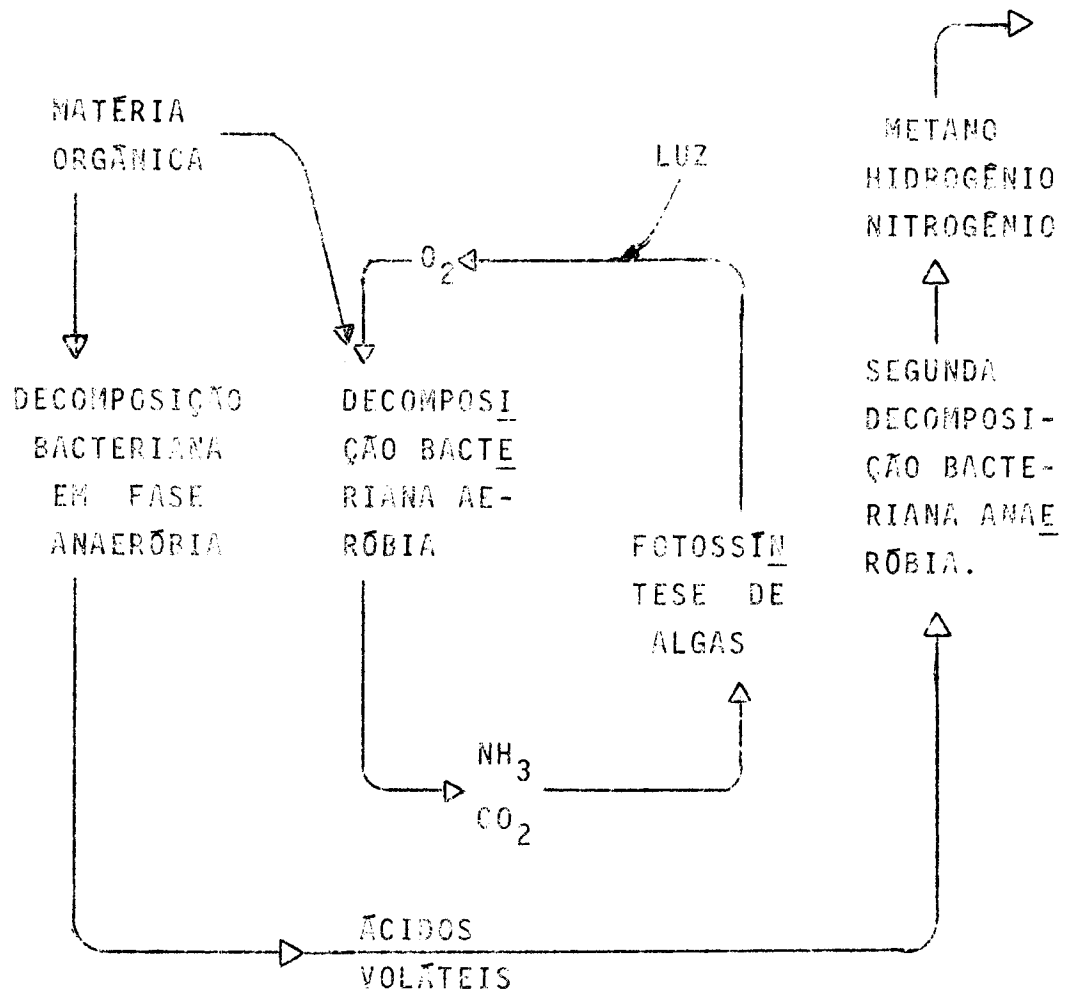


FIG. 7 - ATIVIDADE EM LAGOAS FACULTATIVAS

LAGOA FACULTATIVA

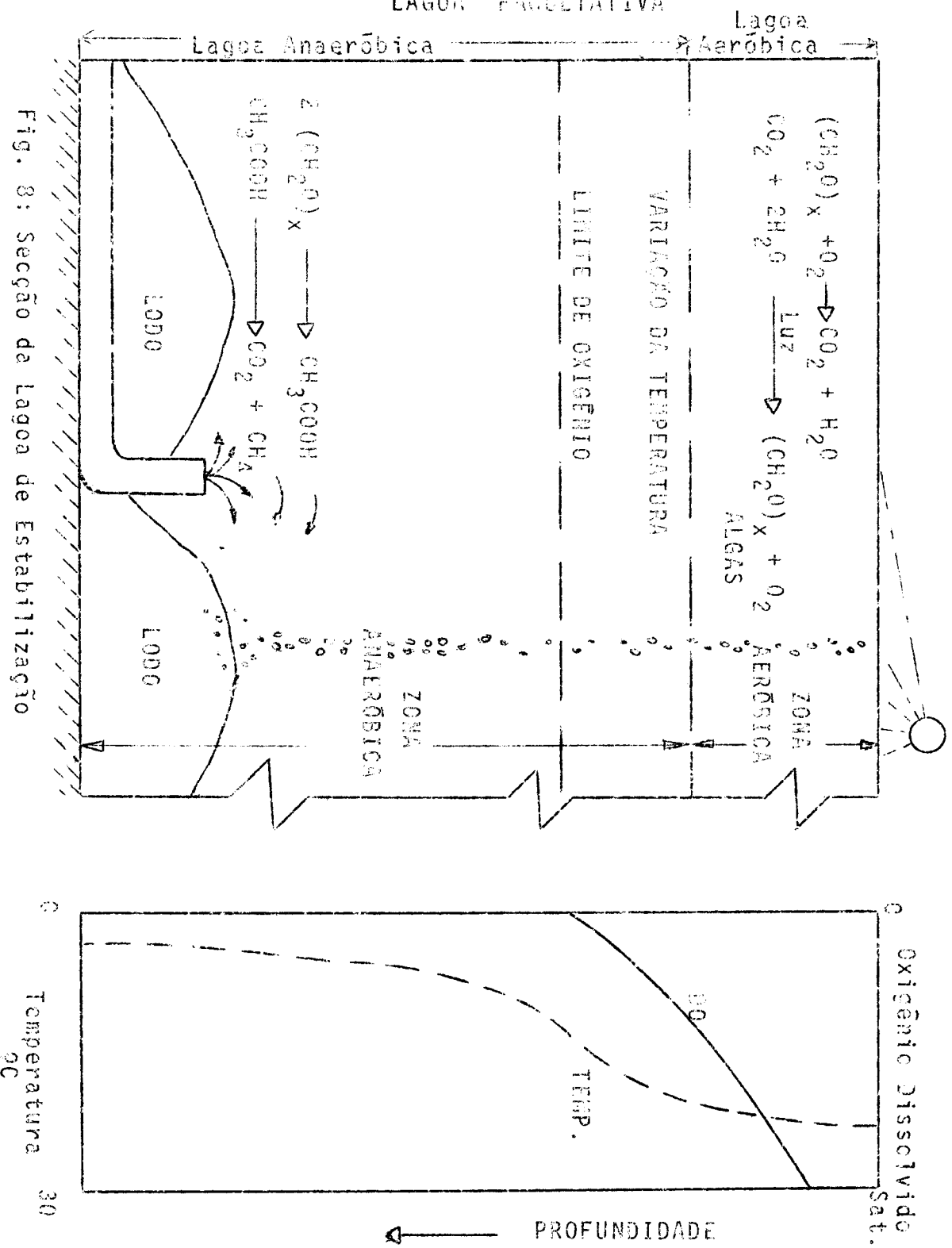


Fig. 8: Secção da Lagoa de Estabilização

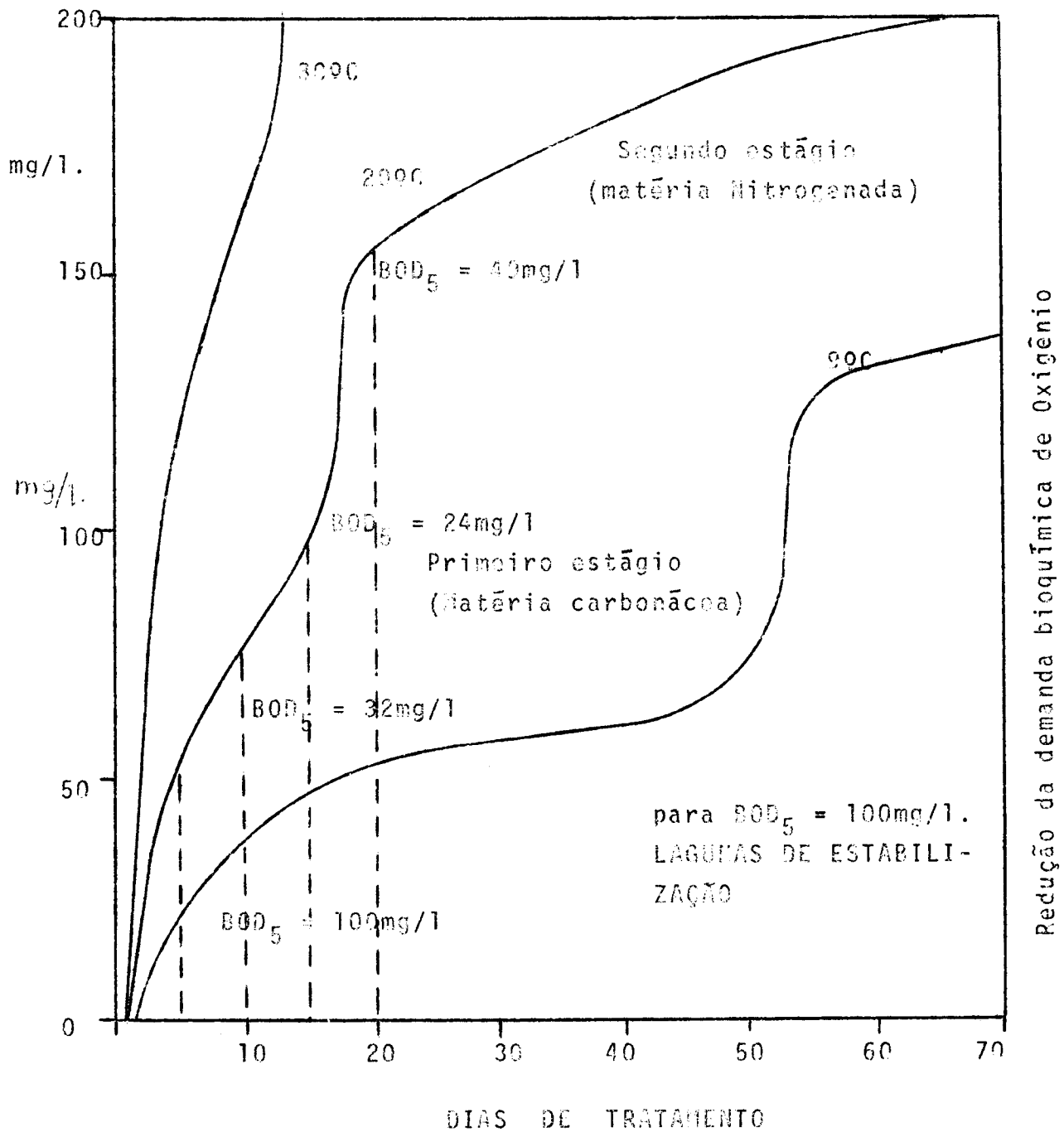


Figura 9: Redução da demanda de oxigênio de Esgôto fresco.

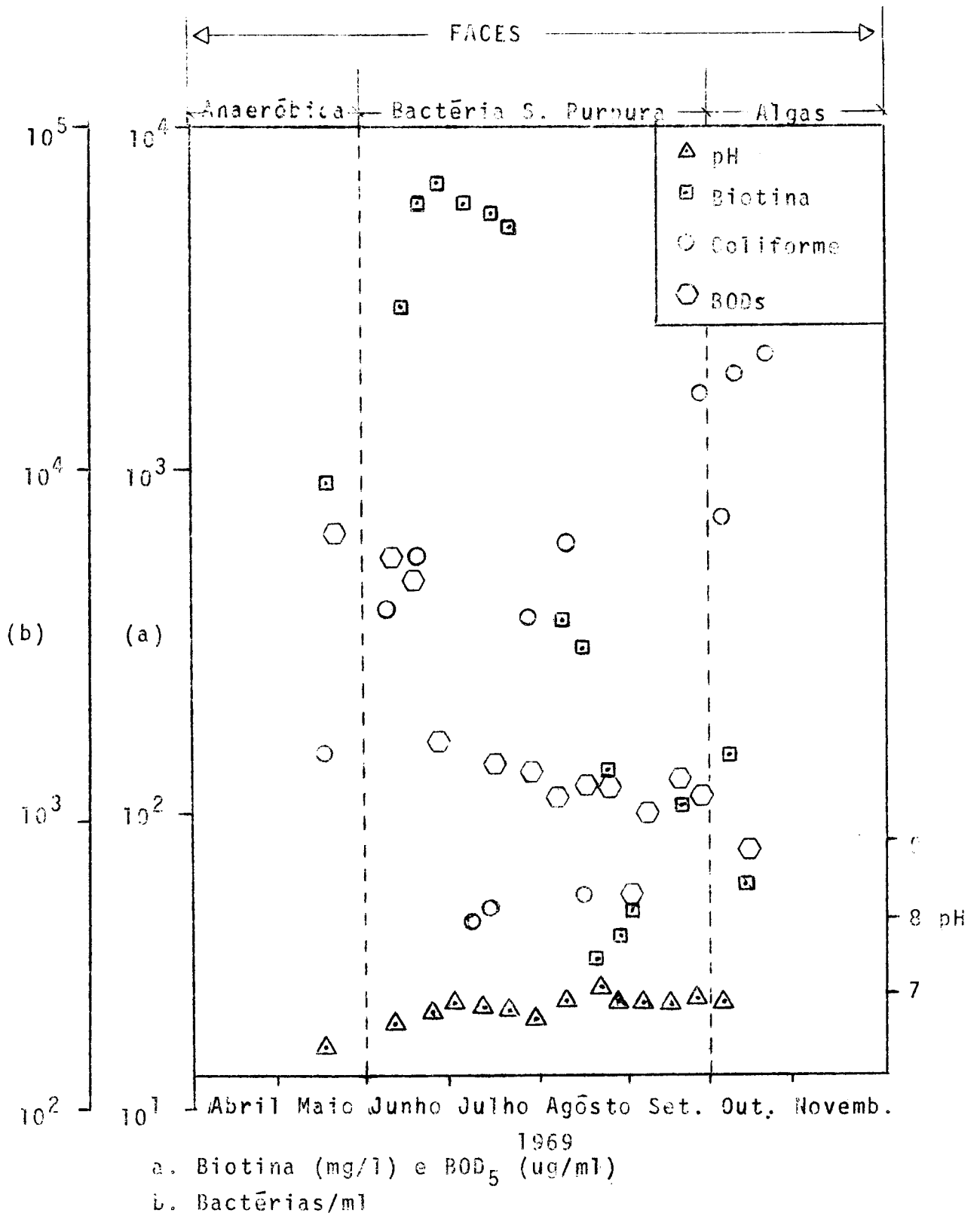
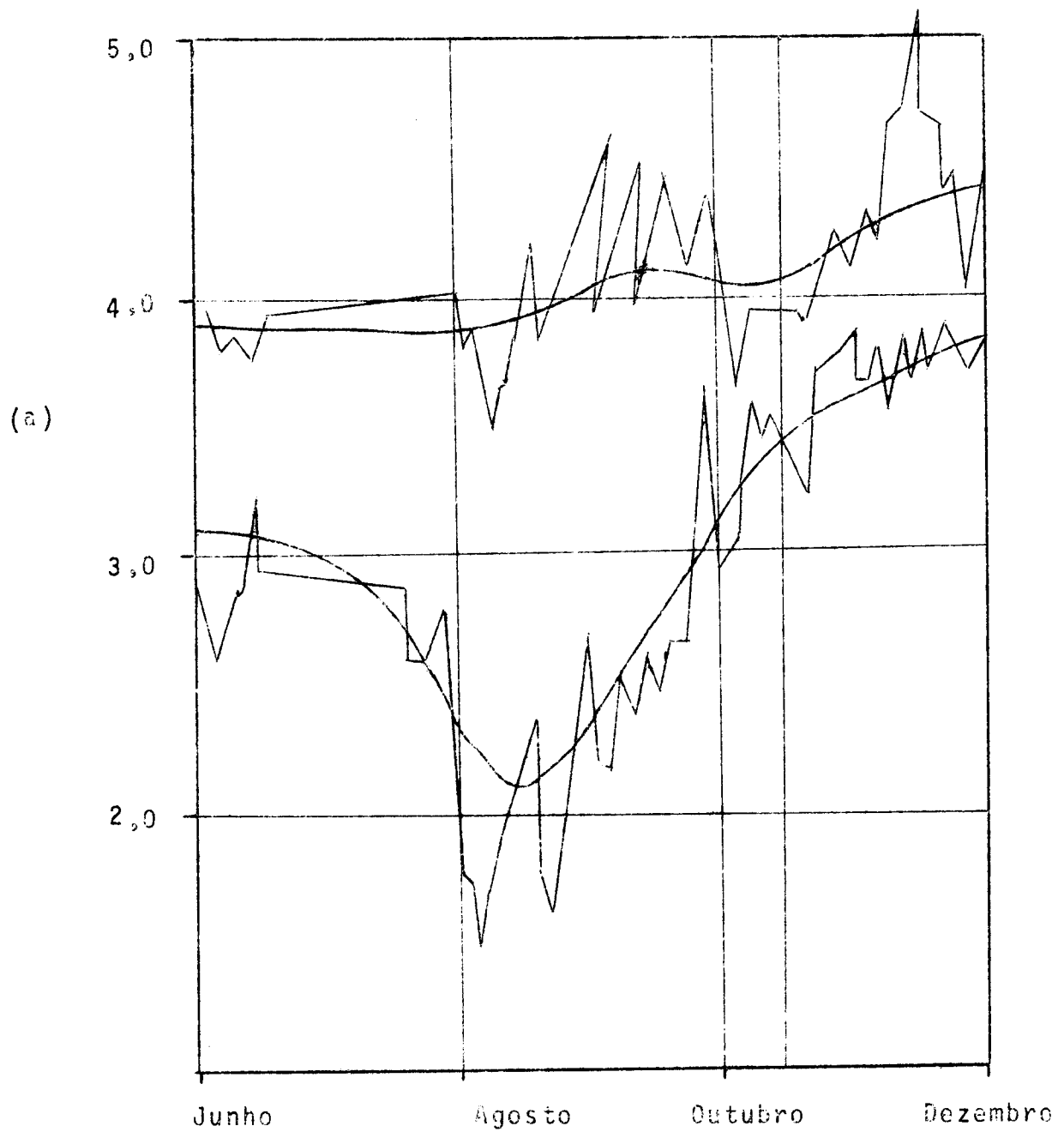


Figura 10: Mudanças ocorridas na lagoa facultativa na síntese da biotina



(a) Log_{10} Escherichia Coli-Coliforme Fecal/ml.

Figura 11: Coliforme em lagoa facultativa.

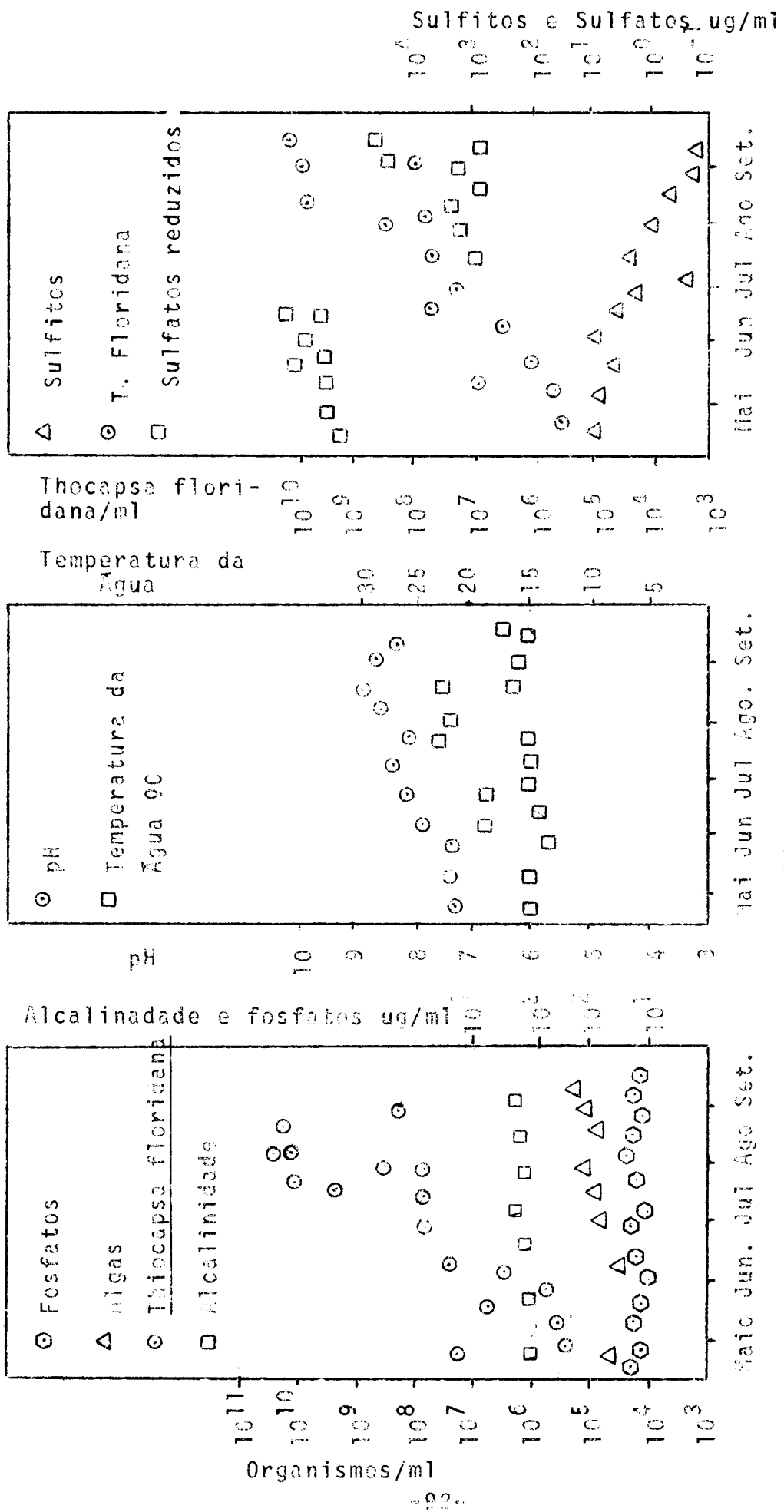


Figura 12

Figura 13

Figura 14

variações microbianas, físicas e químicas na lagoa que produz biotina durante o verão

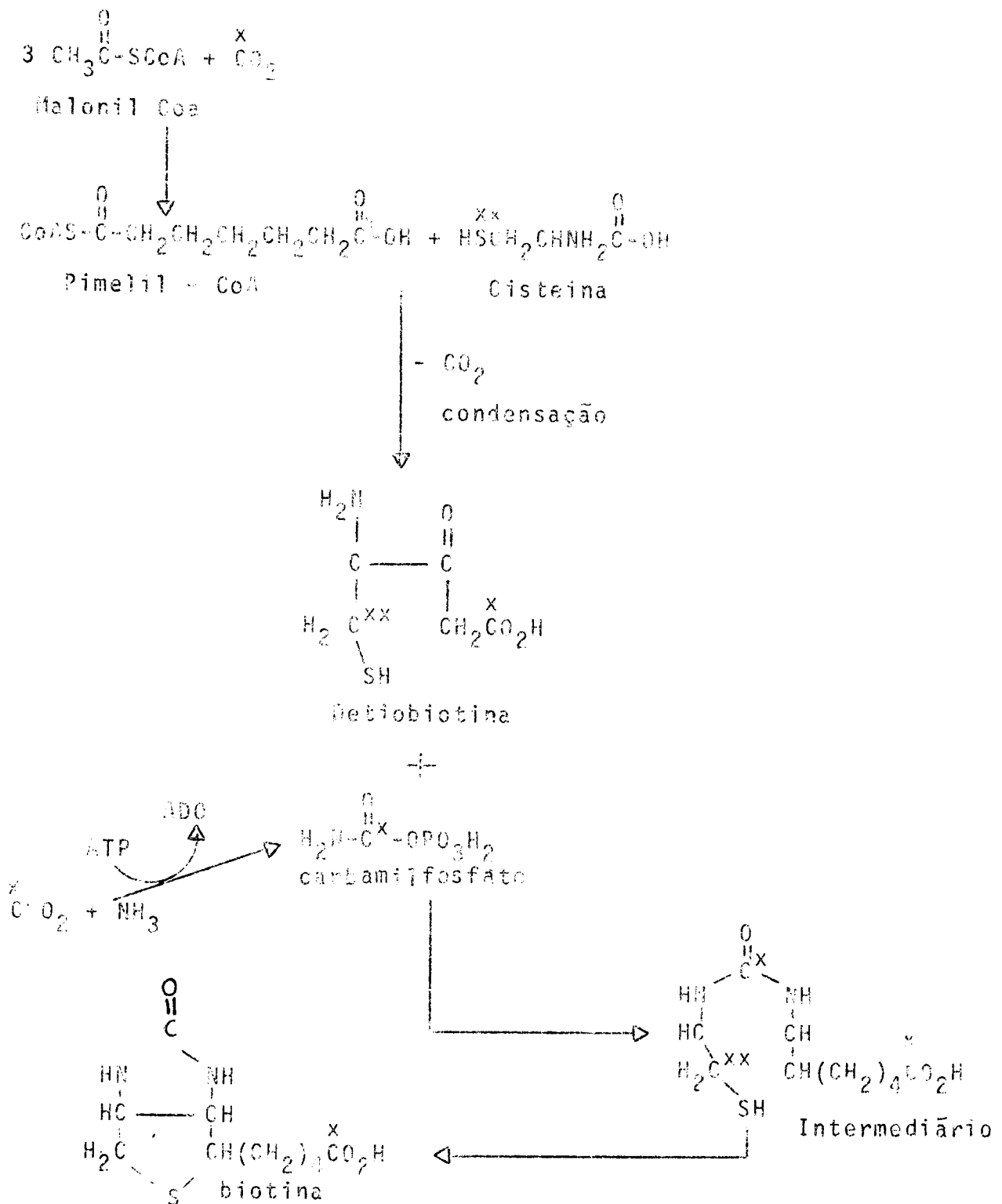
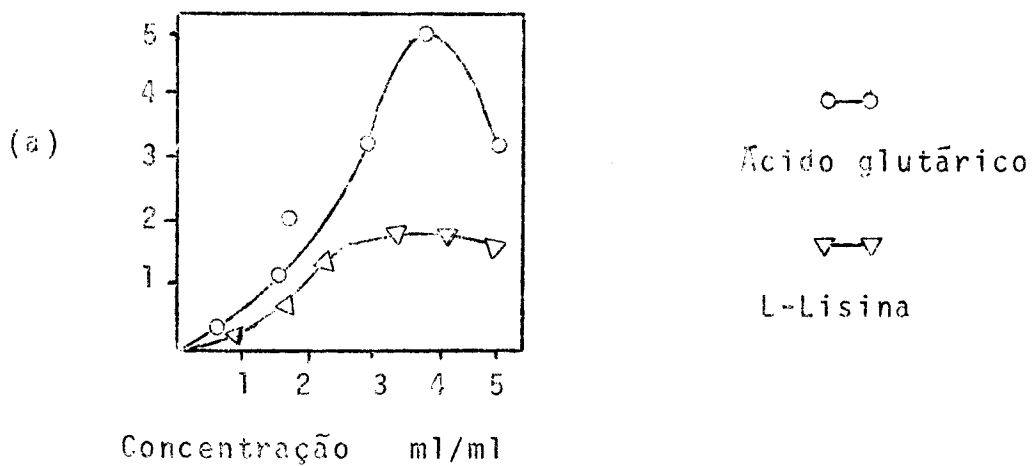
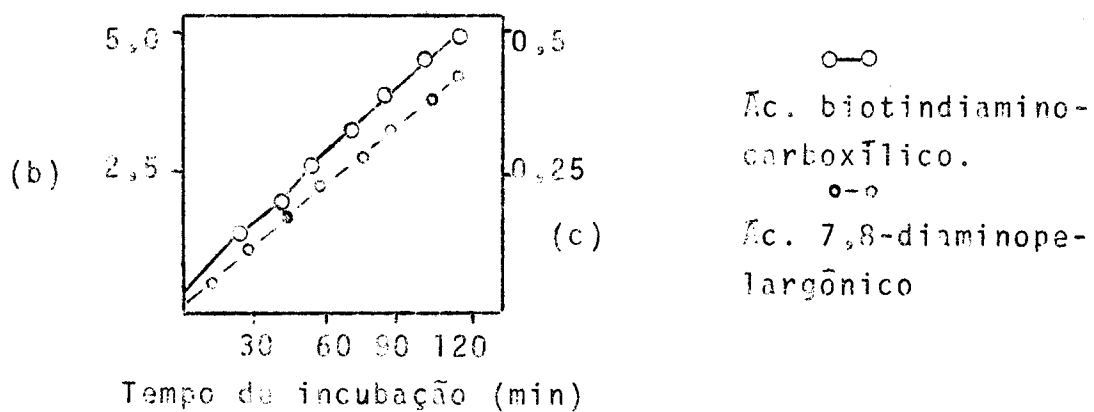


Figura 15: Biossíntese da biotina por Acromobacter.



a. Intermediários (ug/ml).

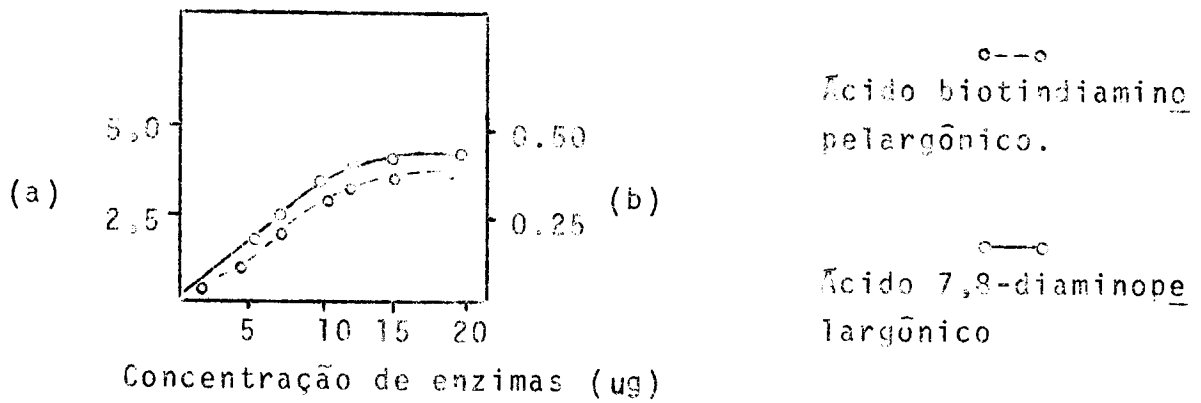
Figura 16: Efeito da concentração de Ácido Glutárico ou L - Lisina



b. Destiobiotina formada mu moles.

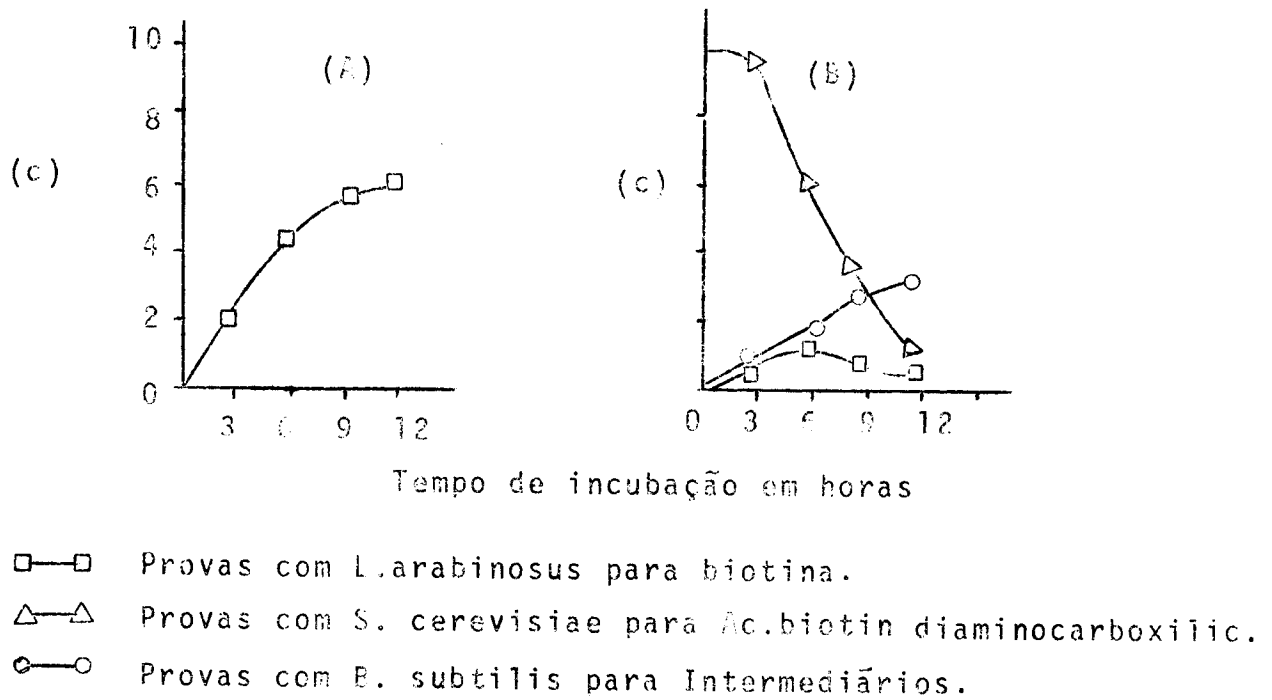
c. Biotina formada mu moles.

Figura 17: Formação de Biotina.



a. Destiobiotina formada em moles
 b. Biotina formada em μ moles.

Figura 18: Formação de Destiobiotina.



c. Intermediários μ g/ml.
 Figura 19: Produção de Intermediários.

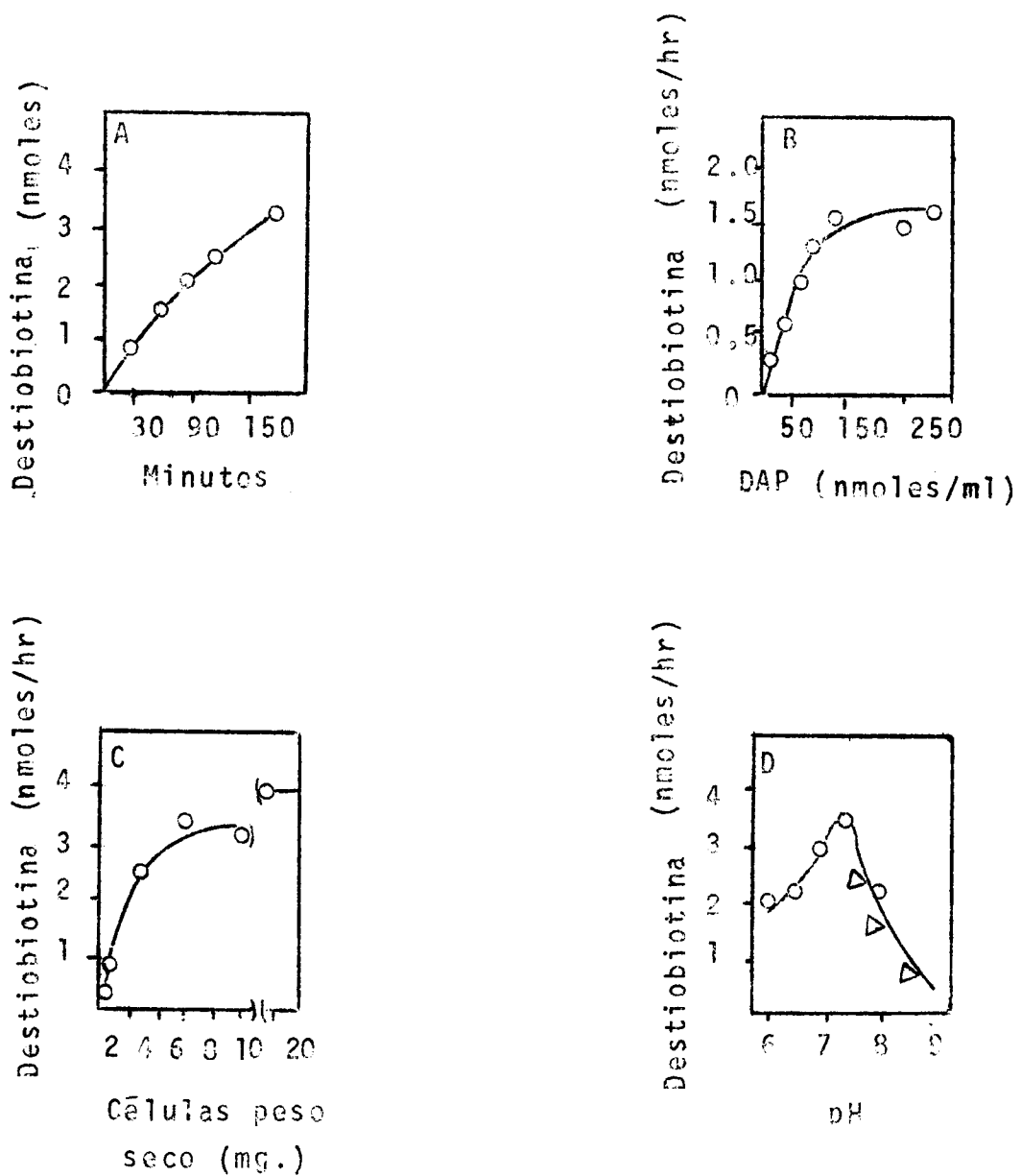


Figura 20 - Sínteses da Destiobiotina com bio A-105 em presença de 200 nmoles de DAP (ácido 7,8-diaminopelargônico/ml).

A em função do tempo

B conc. de DAP

C Como função da concentração de células

D Como função de pH

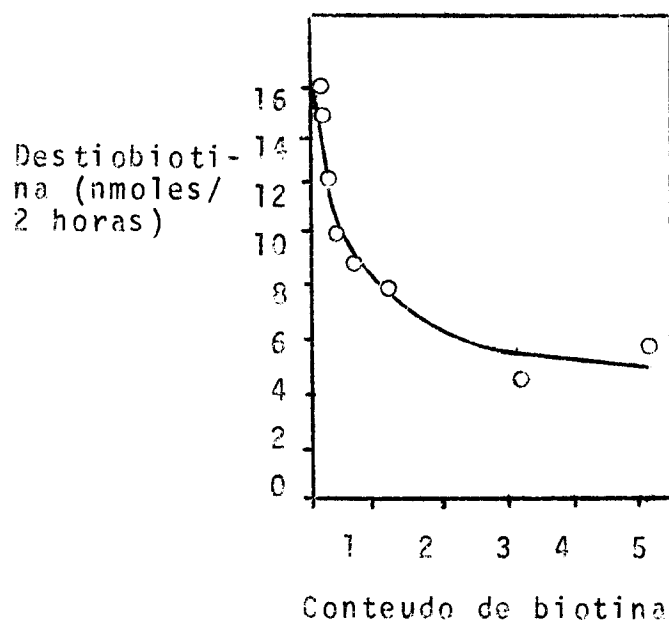


Figura 21 - Efeito da concentração de biotina sobre a atividade de síntese da destiobiotina.

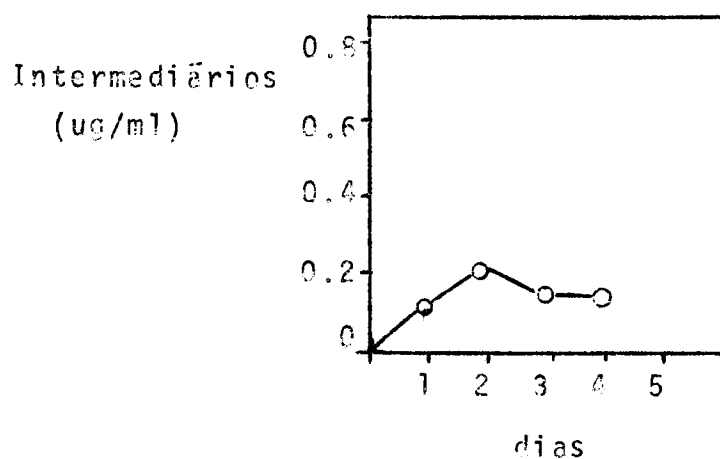


Figura 22: Formação de intermediários. Provas com *L. arabinosus* vs. tempo de cultivo.

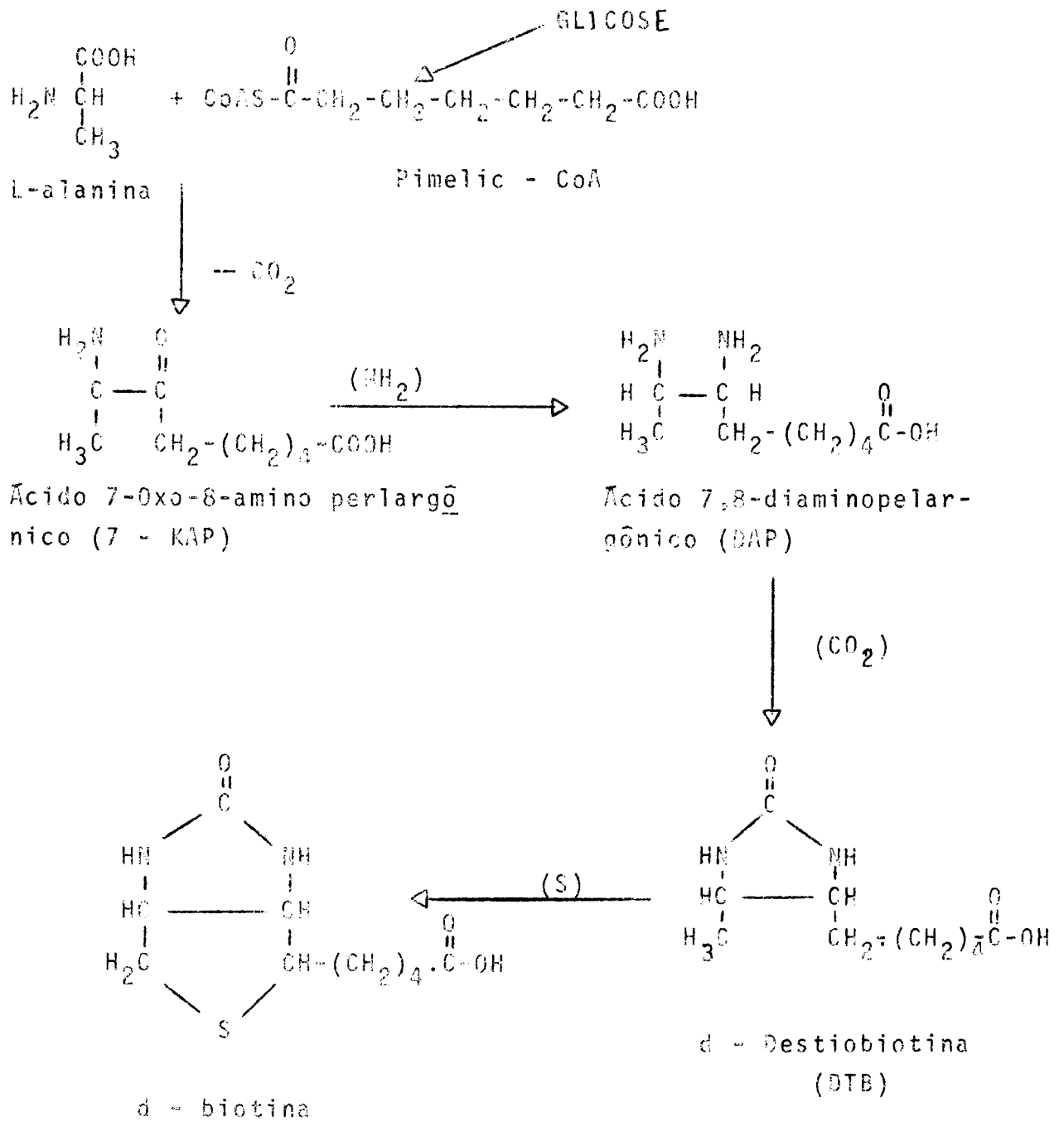


Figura 23 - Mecanismo de biossíntese da biotina.

B I B L I O G R A F I A

- 1 - AEROBIC SECONDARY TREATMENT OF POTATO PROCESSING WASTES - Washington, Water Quality Office, 1970. appendices: E-1 and E-2. Water Pollution Control Research Series. 12060.
- 2 - ANDREWS, J.F. - Biological Waste Treatment Processes. In Canale P. Raymond, Biological Waste Treatment. New York, Interscience Publisher, 1971. p. 5-10.
- 3 - ANTIA, N.J. - A microbiological assay for biotin in sea water. Canada British Columbia, Canadian Journal of Microbiology 9, 403-405, 1963.
- 4 - BENDER, A.E. - Biotin. In: Dietetic foods. New York, Chemical Publishing. Co., 1967. p.229-230.
- 5 - BREED, R.S. MURRAY, E.G.D., et al - Bergey's manual of determinative bacteriology, Baltimore. The Williams and Wilkins Company, 1957, p.342-343.
- 6 - CARLUCCI, A.F. and SILBERNAGEL, S.B. - The determination of dissolved biotin in sea water using ^{14}C uptake by cells of Amphidinium carteri. San Diego, California, Canadian - Journal of Microbiology 13 : 979-986, 1967.
- 7 - CATÁLOGO PRODUTOS QUÍMICOS. Chicago - Pierce Chemical Company, 1971.

- 8 - DIAS, F.F. - Isolation of pectinolytic strains of aerobacter aerogenes. New Brunswick, Appl. Microbiol. 15 (6) - 1512 - 1513, 1967.
- 9 - EISENBERG, M.A. and KRELL, KENNETH - Synthesis of Des-thiobiotin from 7,8 - Diaminopelargonic Acid in - Biotin Auxotrophs of Escherichia coli K-12. New York, Journal of Bacteriology, 98 (3): 1227-1231, 1969.
- 10 - EISENBERG, M.A. and STAR, C. - Synthesis of 7-oxo-8-Aminopelargonic Acid, A biotin Vitamer, in Cell-free Extracts of Escherichia coli Biotin Auxotrophs . New York, Journal of Bacteriology, 96 (4): 1291 - 1297, 1968.
- 11 - FILLIPI, G. M. and VENNES, J.W. - Biotin production and utilization in a sewage treatment lagoon, North Dakota, Applied Microbiology, 22, No1; 49 - 54, 1971.
- 12 - FIRST NATIONAL SYMPOSIUM ON FOOD PROCESSING WASTE, Portland, Oregon, 1970. Proceedings. pgs. 39-91. Water Pollution Control Research Series, 12060.
- 13 - FLORIN, Marcel - Comprehensive Biochemistry. New York , Interscience Publishers, 1963. p. 66 - 81.
- 14 - FRAZIER, C.W. - Food Microbiology, New York, Mc Graw - Hill Book Company, 1967. p. 36 - 63.

- 15 - GEYS and FAIR - Biology of water and waste water. In water Supply and waste-water disposal. New York , John Wiley and Sons, Inc. 1967. p. 510.
- 16 - GILD, E.L.C. - Pollution control in food industries. In: LUND, F. Herbert, Industrial Pollution Control - Handbook. New York, Mc Graw Hill Book Company, 1971, pp: 16-1; 16-46
- 17 - HALLOCK J. Robert, and ZIEBELL, D. Charles. - Feasibility of a sport fishery in tertiary treated waste wa-
ter Tucson, Arizona, Journal W.P.C.F. 42 (9):1956
1665, 1970.
- 18 - HENNING, M. HEINZ - D-biotina (vitamina H). In: Strehecker, Rolf, Analisis de Vitaminas: Madrid, Editorial Pal Montal VO. 1967 p. 212-218.
- 19 - HIGGINS, P.M. - Waste stabilization lagoons, their operation problems Okla. J. water an pollution Control 15: 155-159, 1966.
- 20 - HOLM, H.W., and VENNES J.M. - Occurrence of Purp Bacteria in a Sewage treatment Lagoon. Grand Forks, North Dakota, Appl. Microb. 19 (60): 988 - 996, 1970.
- 21 - HUMENIK, F.J. - Respiratory Relationships of a Symbiotic Algal - Bacterial Culture for Waste water Nutrient Removal. Columbus, Ohio, Biotechnology and Bioengineering 12: 541 - 560, 1970.
- 22 - HUTCHINSON, G.E. - Thiamin in lake waters and aquatic organisms. Yale, Arch. Biochem. 2: 143 - 150, 1943.
- 23 - INHOFF, KAR - Dimensionamento e Planejamento das estações de tratamentos de esgotos. Em Manual de Tratamento de Águas Residuarias. são Paulo, Editora Edgar Blucher Ltda. 1966. pgs. 32 - 35.

- 24 - CASE, KARLSON, P. - Nutricion y Vitaminas. En: Manual de Bioquímica. Barcelona. Editorial Marin, 1964. p. 345 - 351.
- 25 - KATO, M., ROCHA, A. - Lagoas de oxidação para tratamento de águas residuarias de colunas bacteriométricas. São Paulo, Revista D.A.E. p.138-147, Janeiro 1970.
- 26 - LANDY, Maurice and DICKEN, D.M. - Biotin synthesis by microorganisms. Ohio. Proc. Soc. Exp. Biol. - Med. 47: 449 - 452, 1941.
- 27 - LITCHFIELD, C. D. and HOOD, D. W. - Microbiology Assay for Organic Compounds in Sea water, Texas, Applied Microbiology 13 (N95): 886 - 894.
- 28 - METHODS FOR PRODUCING d - BIOTIN. SHIBATA, Motoo et al. U.S. Pat. n93, 393, 124, July 16, 1971.
- 29 - NATARAJAN, K.V. - Distribution of thiamine, Biotin, and niacin in the Sea, Alaska, Appl. Microbil. 16, 366 - 369, 1968.
- 30 - NATIONAL SYMPOSIUM ON FOOD PROCESSING WASTE, 2. Denver Colorado, 1971. Proceedings, p. 105 - 109. Water Pollution control research series, 12060.
- 31 - NETTO, AZEVEDO, de N. JOSE, HESS, L.M. - Tratamento de águas residuarias. São Paulo, Separata da Revista "D.A.E.", 1970, pg. 68 - 85.

32. - NEUTAHR , Y. et. al. - On the occurrence of biotin in different fractions of Municipal Sewage. Stockholm, Sweden, Acta Chem. Scand 15, n94:954-955,1961.
33. - MULLIS, M. K. , and SCHROEDER, E. D. - A rapid biochemical oxygen demand test suitable for operational control. California, Journal W.P.C.F., 43,n92. p. 209 - 215, 1971.
34. OGATA, IZUMI and TANI, - Control action of actitriazic Acid on the biosynthesis of biotin - vitamers by microorganisms, Kyoto. Agr. Biol. Chem. 34 (12), 1872 - 1874, 1970
35. - OGATA, IZUMI, and TANI - Glutaric acid, a new precursor of biotin biosynthesis. Kyoto, Agr. Biol. Chem., 34 (12): 1870-1871, 1970.
36. - OSWALD, J.W. - The High - Rate Pond in Waste Disposal . Berkeley Journal of Waste Treatment, 12: 112-119, 1968.
37. - OSWALDO, W.J. and GOTAAS, P. - Lagoas Design Ahmedabad, Journal W.P.C.F. 42 (9) - 1508 - 1510.
38. - OUTRAS VITAMINAS DO COMPLEXO B - Importação. Brasília , Comércio Exterior do Brasil, 1970.p.114,v.2.
39. - PORGES NANDOR, New aspects of waste treatment. Philadelphia, Journal of Sewage and Wastes, 24:1-29,1952.

- 40 - POST, F.J. - Ecology of selected bacteria in a small in termitent sewage pond. Logan; Utah, Pergamon Pres, 44 : 341 - 351, 1970.
- 41 - POTATO WASTE TREATMENT. - Washington, Proceeding of Symposium. Washington - Federal Water Pollution Con trol Administration. 1968. pg. 1970.
- 42 - ROBINSON, F.A. - Vitamin B Complex; New York, John Wiley and Sons Inc, 1951 p. 404 - 446.
- 43 - ROLFE, B. and EISENBERG, M. A. - Genetic and biochemical analysis of the biotin loci of Escherichia coli K-12. Toronto, Canada, Journal of Bacteriology, 96 (2): 515 - 524, 1968.
- 44 - SECONDARY TREATMENT OF POTATO PROCESSING WASTES - Washington, Water Quality Office, 1969. p. 11-37. Water Pollution Control Research Series, 12060.
- 45 - SEKIJO, C. TSUBOI, T., and YOSHIMURA, Y. Studies on production of biotin by microorganism, Fukushima - KU, Osaka, Agr. Biol. Chem., 33 (5): 683 - 688 , 1969.
- 46 - SWEENEY, P.J., HEPNER, A.P. and LIBECK, Y.S. - Organic acid, aminoacid, and ascorbic acid content of po tatoes as affected by storage conditions. New Brunswick, American Potato Journal, 46 : 263-269, 1969.
- 47 - TALLEY, E.A., FITZ PATRICK, J. and PORTER. M.L. - Chemical composition of potatoes. New Brunswick, Ameri can Potato Journal, 47: 231 - 244, 1970.

- 48 - TREATMENT OF CITRUS PROCESSING WASTES - Washington, Water Quality Office. 1970. p.29. Water Pollution Control Research Series, 12060.
- 49 - WARNER, F. Arthur - Vitamins and coenzymes. New York, Interscience Publishers, 1963. p. 138 - 157.
- 50 - WILLARD, Miles J., PAILTHORP, R.E. and SMITH, Ora - Waste disposable. In: Talbert William F. and Smith, Ora Potato Processing. Westport, AVI publishing, 1967.
- 51 - WINESTOCK, H.C. and PLAUT, E.W.G. - New York. The Biosynthesis of Coenzymes. New York, J. Biol. Chem. 238: 396 - 400, 1961.
- 52 - YANG, Han-Chul, OHSUGI, M. and OGATA, K. - Conversion of biotin diamino carboxyl acid into biotin and bisnorbiotin by cell system of microorganisms. Kyoto Japan, Agr. Biol. Chem. 33 (7):1104-1106, 1969.
- 53 - YANG, Han-Chul, TANI, YOSHIKI and OGATA, K. - Studies on the Metabolism of biotin vitamers by microorganisms. Kyoto, Japan, Agric. Biol. Chem., 35 (9) : 1346 - 1352. 1971.
- 54 - YANG, Han-Chul, TANI, K1. and OGATA, - Synthesis of biotin vitamers from biotin diaminocarboxylic acid or 7,8-diaminopelargonic acid by a purified enzyme of Pseudomonas graveolens. Kyoto, Japan, Agr. Biol. Chem. 34 (11) : 1748-1750, 1970.