

Estudos sobre óleos de fígado de peixes.

III — Peixes de água doce

por

Humberto T. Cardoso

(Com 6 gráficos no texto)

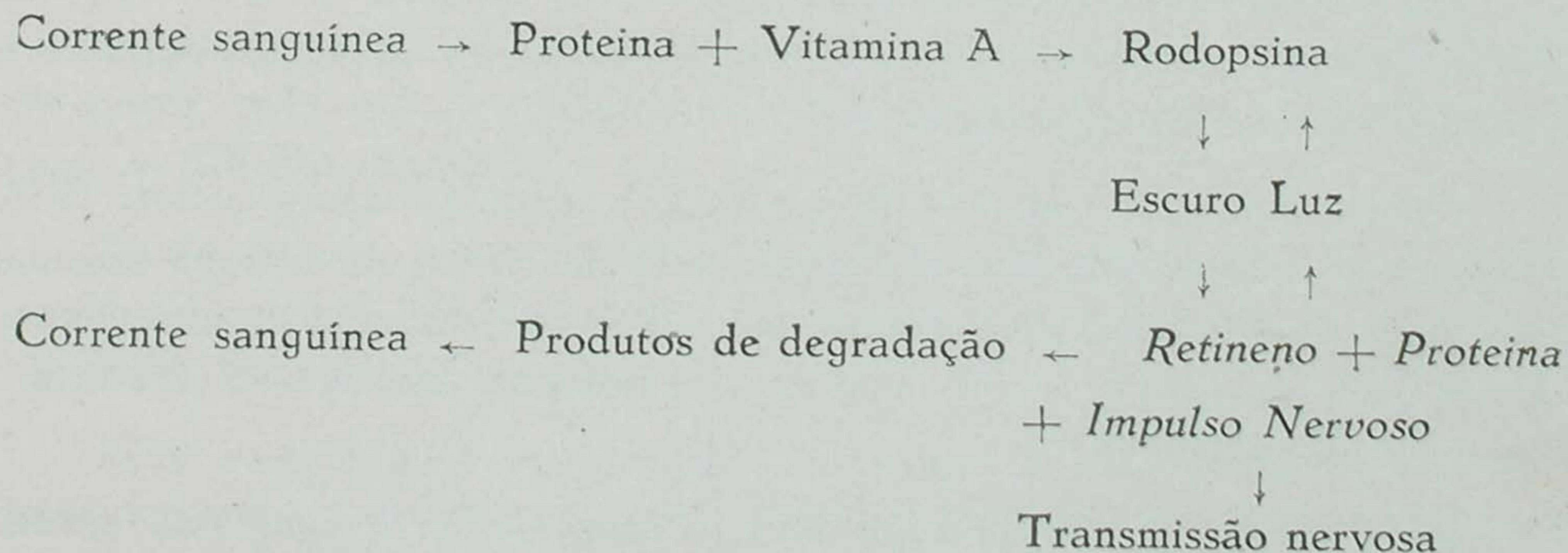
Este trabalho é uma continuação de dois artigos que publicamos anteriormente (1,2), sobre a presença da vitamina A em óleos de fígado de peixes.

Foram considerados, desta vês, os peixes de água doce, tendo sido preliminarmente estudados peixes encontrados no Distrito Federal e no Estado do Rio de Janeiro, nas proximidades desta Capital.

Êstes peixes, segundo o que se sabe até hoje, deveriam armazenar nos seus fígados a vitamina A₂ em vez da que é encontrada nos de água salgada.

Wald (13), estudando a composição da púrpura visual nos peixes, verificou que a substância corada da retina consistia num composto com natureza proteica e que se poderia decompôr, por ação da luz, fornecendo entre os produtos de degradação a vitamina A. Formulou então a hipótese da existência de um ciclo de reações, do qual participava essa substância, e que seria ligado ao mecanismo da visão.

Prosseguindo seus estudos, Wald (14) comprovou a existência do seguinte ciclo:



Isto foi demonstrado por Wald, trabalhando com olhos de peixes de água salgada e de sapos. Submetidas as retinas a uma iluminação intensa, o ma-

terial corado sofria uma degradação, chegando a uma cor amarelo-pálida: era a transformação da rodopsina numa mistura de substâncias, na qual se podia identificar a vitamina A.

Entretanto, se a iluminação não era muito prolongada, assim como a temperatura mantida dentro de certos limites, era encontrado, no produto degradado, um carotenoide, o retineno, em mistura com a proteína a que se achava ligado na forma de rodopsina. Esta reação poderia ser obtida em sentido oposto, observadas certas condições, ao colocar a material na obscuridade.

Os dados obtidos por Wald, no seu primeiro trabalho, em relação ao retineno, diferiam dos que haviam sido fornecidos muito antes, em 1896, por Köttgen e Abelsdorf (8) para material idêntico, porém obtido de peixes de água doce.

Em 1937, Wald (15) esclareceu essa divergência, apresentando os dados obtidos com púrpura visual de peixes de água salgada e de água doce, pelos quais se evidenciava que o λ_{\max} . do material retirado dos primeiros peixes era localizado a 500 milimicra, enquanto o dos outros aparecia a 522-525 milimicra. Por outro lado, na degradação da púrpura destes peixes de água doce, era encontrada a vitamina A₂ em vez da identificada no material proveniente dos peixes de água salgada como sendo A.

Ainda em 1937, Edisbury, Morton & Simpkins (4), confirmaram a presença da vitamina A na púrpura visual dos peixes de água doce, indicando o λ_{\max} . a 693 milimicra, quando faziam reagir o material corado com o tricloreto de antimônio.

Em consequência desses estudos, Wald (16) afirmou, de modo mais ou menos categórico, que a vitamina A existe nos peixes de água salgada e a vitamina A₂, nos de água doce.

Gillam, Heilbron, Lederer e Rosanova (6), ainda no mesmo ano de 1937, publicaram estudos realizados com óleos de fígado de peixes de água salgada, mostrando as diferenças encontradas, nos valores da absorção no ultravioleta, desses óleos em natureza, como também dos produtos das suas reações com o tricloreto de antimônio.

No caso dos peixes de água doce o λ_{\max} . (da vitamina A₂) encontrado foi de 340 — 345 milimicra (693 milimicra com o SbCl³) e nos de água salgada (vitamina A) a 328 milimicra (620 milimicra com SbCl³).

Êsses conhecimentos ficaram, assim, assentados até hoje, sendo de esperar que, no exame dos óleos de fígado dos nossos peixes de água doce, nas vitaminas encontradas estaria certamente a A₂.

Devemos lembrar por outro lado, o fato admitido geralmente de que a produção da vitamina A nos animais é feita à custa de precursores ingeridos na alimentação e que, no caso dos peixes, êste trabalho de síntese assume proporções excepcionais, dada a enorme reserva que contêm nas vísceras.

No caso, os peixes poderiam aproveitar na síntese não só as provitaminas ingeridas mas também outros carotenoides, como a astaxantina, pigmento principal dos crustáceos.

Isto poderia contribuir para a explicação dessas quantidades exageradas de vitamina, armazenadas no fígado.

Nós antes (1.2) mostramos as diferenças que se encontram entre espécies de cações de uma zona marítima limitada e entre exemplares de uma espécie mesma.

Os cações pertencentes à família *Sphyrnidae*, cuja alimentação parece ser principalmente constituída por crustáceos, mostraram, naquele inquérito, valores mais estáveis e mais altos que os demais examinados, que são mais ferozes e atacam qualquer presa. Nestes últimos, os valores excepcionalmente altos poderão ser talvez explicados como decorrentes da ingestão de grandes quantidades de outros peixes portadores de boas reservas da vitamina.

No caso dos peixes de água doce, o nosso inquérito tinha assim, perspectivas interessantes, principalmente quanto à qualidade e quantidade da vitamina presente.

Determinação da vitamina A:

A determinação da vitamina A natural vem sendo feita, quasi que exclusivamente, pela sua propriedade de absorver as radiações ultravioleta, na zona de 325-328 milimicra.

Outro método regularmente difundido é o de medir, no visível, a absorção do composto formado entre a vitamina A e o tricloreto de antimônio, altamente instável, de côr azul.

Mais recentemente, foi proposto um método de determinação desta vitamina, baseado na desidração da sua molécula, fechando um ciclo na mesma, e subsequente determinação da absorção no ultravioleta que é exibida pelo composto formado (7).

O primeiro método, acima mencionado, tem sido muito estudado e a dificuldade nêle encontrada, decorre apenas da presença dos glicerídeos e outras substâncias nos óleos. Esses produtos têm absorções que podem interferir com a absorção típica da vitamina A. Daí decorre a necessidade de se conhecer a curva de absorção típica de cada óleo comparando-a com a do tomado como referência, quando se deseja trabalhar diretamente, sem extrair o insaponificável.

Entre as substâncias conhecidas e que podem interferir podem ser citadas: o kitol, encontrado originariamente no óleo de fígado de baleia (5) e a sub-vitamina A, ambos com λ_{\max} . a 290 milimicra; a vitamina A anhidra, cíclica, com λ_{\max} . a 351, 371 e 392 milimicra; a vitamina A₂ e os compostos parentes respectivos. Isto mostra a importância de se conhecer a curva de absorção no ultravioleta dos diferentes óleos de fígado de peixes.

A determinação da potência em vitamina A dos óleos pela absorção no invisível está, portanto, condicionada a vários requisitos que resumiremos a seguir:

Conforme mostraram vários autores anteriormente e por último, Morgareidge (10), os solventes empregados para dissolver o óleo influenciam a posição do máximo de absorção em relação ao comprimento de onda. Assim, no trabalho acima citado, empregando o espectrofotômetro de quartzo de Beckman, o autor mostrou que as soluções em solventes polares forneciam valores mais altos, associados a um deslocamento do máximo de absorção para comprimentos de onda menores, comparados com os obtidos com soluções em solventes não polares. Ao mesmo tempo, foi evidenciada no mesmo trabalho a diferença de ação do ester da vitamina A e a desta na sua forma de álcool livre.

De acordo com os dados do trabalho de Morgareidge, o λ_{\max} . da vitamina A em solução em álcool isopropílico é a 325 milimicra, enquanto que com ciclohexana o λ_{\max} . está a 238 milimicra.

A determinação direta no óleo exige, como já vimos, que se conheça a absorção própria do óleo ou, pelo menos, que a faixa característica da vitamina A se apresente com persistência e nítida.

Usou-se como óleo de referência uma solução de acetato de vitamina A puro em óleo de algodão, padronizado biologicamente. Este padrão foi obtido do Comité da Farmacopéia dos Estados Unidos.

Utilizando o óleo padrão, os diferentes laboratórios estabelecem o fator de conversão da extinção determinada, em unidades de atividade biológica da vitamina A.

Nos Estados Unidos, em geral, os fatores que empregados eram muito variáveis e sempre superiores ao dos ingleses, cujos valores acompanham o estabelecido pelo Comité de Padronização da Liga das Nações (3). Mais recentemente, uma convenção comercial nos Estados Unidos, estabeleceu o fator de 2000 como base para os cálculos da atividade biológica dos óleos (12).

Todos os autores insistem em que, provisoriamente, seria melhor estabelecer uma técnica precisa e padronizada de determinação espectrofométrica do que discutir o fator de conversão.

Recentemente, Morton & Stubs (11) aconselharam a medida da absorção a 313, 328 e 338, 5 milimicra, no caso de se fazer a determinação direta com soluções de óleos, visando com isto corrigir o erro devido à presença da vitamina A anhidra e da oxidada.

Como elementos de comparação, fizemos, ainda, os traçados da absorção do óleo padrão da Farmacopéia dos Estados Unidos, acetato de vitamina A puro em óleo de algodão, e do acetato de vitamina A sintético Roche os quais aparecem no gráficos, estando os dados correspondentes contidos nas tabelas I e II.

Aparelho e técnica: Para a medida da absorção no ultravioleta foi empregado o aparelho de Beckman, espectrofotômetro de quartzo, modelo DU, fotoelétrico.

As determinações foram feitas com soluções dos óleos ou dos insaponificáveis em álcool isopropílico, dissolvendo-se quantidades variáveis daqueles, conforme a intensidade da absorção apresentada ou do material disponível.

Indicamos nas tabelas I e II as quantidades usadas. Estas amostras foram medidas da seguinte maneira: Em tubo capilar, tarado, munido de suporte adequado de arame inoxidável, de modo que as pontas não toquem o vidro de relógio que protege o prato da balança, toma-se um pouco de óleo (cêrca de 12 a 15 mm., conforme o diâmetro interno) aproveitando-se a capilaridade e, em seguida, verifica-se a diferença de massa.

O tubo capilar é colocado diretamente no frasco graduado, onde se coloca depois o álcool iso-propílico; com pequena movimentação no sentido longitudinal do tubo, consegue-se, ao fim de pouco tempo, a solução completa do óleo.

As soluções são, então, distribuídas em cubas de quartzo, de 10 milímetros de espessura, calibradas, e levadas ao espectrofotômetro, acompanhadas de uma cuba contendo o solvente puro.

Usando a lâmpada de hidrogênio, coloca-se inicialmente o tambor dos comprimentos de onda no ponto de partida, a 225 milimicra e, daí por diante, em valores superiores sucessivamente, com intervalos de 5 milimicra. As aberturas se modificaram de modo a fazer tôdas as leituras com o contrôlo de sensibilidade aproximadamente no mesmo ponto.

Material: — Os peixes foram capturados em cinco diferentes locais, variando assim as condições do meio de vida.

A 1ª experiência (17.11.48) foi feita com peixes recebidos de Friburgo, vivos. Tratava-se de um vermelho de 15 cms. e de uma carpa de 18 cm.

A 2ª experiência (13.12.48) foi realizada com peixes do rio Piabanha, pescados desde Itaipava até Areal.

Neste trecho as espécies conseguidas foram apenas duas: cascudo e acará. Peixes de tamanho médio de 15 cm.

Para um resultado preliminar os fígados de cada espécie foram misturados independentemente do sexo.

A 3ª experiência (17.12.48) contou com peixes apanhados no Tinguá e consistindo em cascudo, traíras e acarás de tamanhos médios, respectivamente, de 22 cm, 25 cm e 18 cm.

Na 4ª experiência empregamos carpas apanhadas na Av. Tijuca, em um lago artificial onde êsses peixes são criados.

Finalmente, a 5ª experiência fez-se com cascudos e traíras capturados nos terrenos do próprio Instituto, onde, surpreendentemente, êsses peixes aparecem e crescem nas valas de irrigação das capineiras. Os primeiros mediam uma média de cm, e os outros 18 cm. Acrescentamos nesta experiência o material obtido de tucunarés pescados nos lagos da Universidade Rural, no quilômetro 47, da Estrada Rio-São Paulo.

Os fígados dos peixes foram retirados imediatamente após a morte dos mesmos nunca havendo demora maior do que 2 horas até serem manipulados.

O primeiro tratamento, foi o de triturar êsse material seguindo-se após a pesagem, a sua mistura com sulfato de sódio anhidro em quantidade suficiente para obter um pó aparentemente sêco.

Êste pó foi então, extraído com éter etílico sêco, isento de peróxidos, em aparelho de Soxhlet até o esgotamento total.

Após evaporação do éter, o resíduo obtido em temperatura baixa, claro e sêco era acondicionado em tubos capilares bem cheios e fechados à lâmpada, até o exame espectrofotométrico.

Os rendimentos foram variáveis, obtendo-se em poucos casos quantidades de óleo em excesso sôbre o valor de 5% geralmente encontrado.

Como dissemos antes, foram feitos traçados com o óleo de referência da F. E. U. e acetado de vitamina A Sintético Roche além de um óleo de cação, padrão, da Escola Técnica Darcy Vargas, de Marambaia, E. do Rio.

Para excluir, em alguns casos, o efeito de absorção devido ao óleo propriamente dito, separou-se o insaponificável e fez-se o traçado das transmissões no ultra violeta.

A técnica para retirada do insaponificável foi a seguinte (A.O.A.C.) (9): —.

0,25 a 1g. do óleo é refluxado com 30 ml. de álcool a 95% e com 3 ml. de hidróxido de potássio em solução a 50%, durante vinte minutos.

Resfria-se, dilui-se com 30 ml. de água e extraí-se com 30 ml. éter etílico isento de peróxidos.

Lava-se o extrato etéreo com 100 ml. de água. Repete-se a operação até eliminação do álcali.

Evapora-se o éter e, antes de secar adiciona-se um pouco do solvente que será usado na determinação.

Continua-se a evaporação até eliminação completa do éter e retoma-se, então, com o solvente completando o volume em balão aferido.

CONCLUSÕES

O exame das curvas de absorção dos diferentes óleos de fígado de peixes de água doce não revela a presença de quantidade apreciável da Vitamina A..

Em muitos dêles há mesmo ausência, da curva típica da Vitamina A, tão abundante nos peixes de água salgada.

É interessante o fato de que na 5ª Experiência, o peixe tucunaré tenha dado um óleo que possivelmente contém as vitaminas A e A₂.

No mesmo ambiente, óleos de peixe como acará e cascudo, não apresentam vestígios de absorção típica dessas vitaminas.

Esse fato é ainda repetido na 3ª Experiência onde o material de trairas, que foram apanhadas no mesmo momento e local que os outros peixes que compõem a experiência, oferece uma curva que indica a existência da vitamina A.

Os insaponificáveis foram retirados para corrigir o efeito da absorção dos óleos e, ainda assim, os resultados não se modificaram.

Parece que deve haver um sistema ou cadeia de alimentação que está permitindo a uns o suprimento da vitamina enquanto outros não a recebem por serem pobres os intermediários.

O fenomeno se repete em locais e clima diferentes.

O prosseguimento natural deste trabalho seria verificar si a falta de reservas das vitaminas nesses peixes chega a trazer modificações de suas funções ou se haverá uma outra substância além das conhecidas que desempenha um papel semelhante ao daquelas no caso dos peixes de água salgada.

SUMÁRIO

São apresentadas curvas de absorção específica de soluções de óleos de fígado de peixes de água doce e óleos e referência com vitamina A.

Em alguns casos o insaponificável foi retirado afim de eliminar a interferência devida à absorção dos constituintes do óleo.

BIBLIOGRAFIA

1. CARDOSO, H. T.
1943. Estudos sobre óleos de fígado de cação; Mem Inst. Osw. Cruz., 39, 3, pg. 361.
2. CARDOSO, H. T.
1946. Estudos sobre óleos de fígado de cação II; Mem. Inst. Osw. Cruz. 44, 2, pág. 215.
3. COWARD, K. H.
1939. The Biological Standardization of the Vitamins, Baillière, Tindall and Cox, ed., London.
4. EDISBURY, J. R., MORTON, R. A.,
SIMPKINS, G. W.
1937. A possible vitamin A₂ Nature, 140, p. 234.
5. EMBREE, N. D. e SHANTZ, E. M.
1934. Kitol, a new provitamin A.
6. GILLAM, A. E., EEILBRON, I. M.,

- LEDERER, E., ROSANOVA, V.
1939. Differences in the chromogenic properties of marine fishes liver oils. *Nature*, 140, pg. 233.
7. HAWKINS, E. G. E. e HUNTER, R. F.
1944. The "cyclization" of vitamin A and allied compounds. *Biochem. J.*, 38, pg.34.
8. KÖTTGEN e ABELSDORF.
1896. In Wald, G. — ref. 3. *Z. Psych.*, 12, p. 161.
9. METHODS OF ANALYSIS, A. O. A. C.
1945. 6th. Ed. p. 599.
10. MORGAREIDGE, K.
1942. Influence of solvent on ultraviolet absorption maximum of vitamin A. *Ind. Eng. Chem., An. Ed.*, 14, n.º 9, p. 700.
11. MORTON, R. A. e STUBBS, A. L.
1946. Accurate determination of vitamin A. *Biochem. J.*, v. 40, n.º 5/6, Proc. LVIII.
12. OSER, B. L.
1941. In Morgareidge, K. — ref. 18. *Oil, Paint e Drug Reptr.*, 139, pg. 4.
13. WALD, G.
1935. The visual purple in marine fishes. *Nature*, 136, pg. 913.
14. WALD, G.
1935. Carotenoids and the visual cycle. *J. Gen. Physiol.*, 19. 351.
15. WALD, G.
1937. Bleaching of visual purple in solution. *Nature*, 139, pg. 587.
16. WALD, G.
1937. Visual purple system in fresh water fishes. *Nature*, 139, p. 1.017.

TABELA — I

QUANTIDADES EMPREGADAS NA DETERMINAÇÃO DE ABSORÇÃO

AMOSTRAS	MATERIAL	P E I X E S	EXPERIENCIAS (x)					
			1. ^a	2. ^a	3. ^a	4. ^a	5. ^a	6. ^a
1	Oleo	Vermelho ?	28	—	—	—	—	—
2	Oleo	Cação *566A REFERENCIA	—	135	—	—	—	—
3	Oleo	Carpa <i>Ciprinus carpa</i>	46	—	—	I) 119	—	—
4	Oleo	Tainhota <i>Gypsilurus heterurus, Raf.</i>	58	—	—	II) 135	—	—
5	Oleo	Traira <i>Hoplais malabaricus</i>	—	—	58	—	80	—
6	Oleo	Acará <i>Geophagus brasiliensis, G.</i>	—	I) 184	—	—	—	—
7	Oleo	Cascudo <i>Fam. Locarideos</i>	—	II) 37	66	—	—	—
8	Oleo	Tucunaré <i>Cichla ocellaris</i>	—	80	38	—	87	—
9	Insaponificável	Cação *562A REFERENCIA	—	—	—	—	88	—
10	Insaponificável	Acará <i>Geophagus brasiliensis, G.</i>	—	—	—	—	—	48 (xx)
11	Insaponificável	Carpa <i>Ciprinus carpa</i>	—	—	—	—	—	76 (xx)
12	Oleo	Farmacopéa Americana. REFERENCIA	—	—	—	—	—	II) 454 (xx)
13	—	Vitamina A sintética Roche. REFERENCIA	—	—	—	—	—	168
								10

(x) Os algarismos indicam número de miligramas dissolvidos em 100 cm³ do solvente.

(xx) Quantidade inicial de óleo saponificada e retomada sob forma de insaponificável no solvente.

TABELA —II

ABSORÇÕES DOS DIFERENTES OLEOS REFERENTES À CONCENTRAÇÃO DE G POR 100 cm³ DO SOLVENTE

CUMPRIMENTO DE ONDA (micra)	PEIXES DA 1. ^a EXPER.			PEIXES DA 2. ^a EXPER.				PEIXES DA 3. ^a EXPER.			PEIXES DA 4. ^a EXPER.		PEIXES DA 5. ^a EXPER.		
	1	3	4	7	6—I	6—II	2	7	5	6	3—I	3—II	5	7	8
225	52,85	31,07	24,99	187,50	5,47	11,88	14,07	10,65	10,86	8,78	16,72	12,22	20,68	31,25	27,26
230	49,45	29,00	24,13	181,25	5,25	11,48	12,59	9,99	10,77	8,63	15,79	12,59	19,53	26,68	26,12
235	44,99	27,05	22,58	162,50	5,79	10,40	11,11	8,81	10,68	8,18	14,20	12,22	17,46	26,43	23,29
240	37,85	24,22	19,39	131,25	3,74	8,24	—	7,10	10,17	7,27	11,55	9,62	14,01	21,25	19,79
245	32,85	22,81	15,86	103,75	2,64	5,94	—	5,91	9,65	6,51	9,45	6,66	11,49	17,75	16,47
250	31,06	20,64	12,93	83,75	1,54	3,78	—	5,13	9,30	6,06	7,56	3,40	9,42	15,31	14,31
255	29,28	19,55	11,37	72,50	0,93	2,78	3,55	4,73	8,96	5,83	6,63	1,85	8,50	13,75	12,78
260	26,78	19,12	10,86	66,25	0,77	2,43	2,22	4,52	8,62	5,52	6,38	1,77	7,81	12,37	11,92
265	23,56	19,12	10,68	56,25	0,69	2,16	1,92	4,20	8,10	5,04	6,13	1,85	7,23	10,75	11,13
270	21,06	19,99	9,91	49,37	0,65	2,08	1,92	3,99	7,84	4,59	6,05	2,22	6,66	9,25	10,67
275	19,81	22,16	9,56	44,37	0,57	1,94	2,14	3,99	7,75	4,24	5,88	2,29	6,03	8,50	10,67
280	18,92	22,81	8,96	41,25	0,54	1,89	2,33	3,81	7,75	4,01	5,67	2,48	5,51	7,75	10,45
285	17,85	24,98	8,44	37,50	0,50	1,67	—	3,68	7,75	3,71	5,50	2,48	5,05	7,37	10,67
290	16,78	25,64	7,67	34,37	0,43	1,54	2,77	3,42	7,84	3,48	5,29	2,62	4,59	7,00	10,65
295	15,53	25,64	6,89	30,62	0,37	1,43	3,02	3,02	7,93	3,18	4,70	2,29	4,10	6,68	9,99
300	14,64	26,51	6,37	28,75	0,35	1,35	—	3,02	8,10	2,95	4,78	2,48	3,73	6,50	9,76
305	13,39	28,68	5,94	25,62	9,32	1,26	3,48	3,02	8,18	2,65	4,74	3,33	3,38	6,25	9,76
310	12,31	30,42	5,51	21,87	0,29	1,16	—	3,02	8,27	2,39	3,86	2,51	3,04	6,12	9,88
315	11,60	33,68	5,17	20,00	0,28	1,16	4,22	3,15	8,26	2,19	4,15	2,51	2,81	6,06	10,22
320	11,42	35,85	4,94	18,12	0,27	1,13	4,44	3,34	8,44	2,09	4,03	3,25	2,58	5,87	10,67
325	11,07	38,46	4,65	16,87	0,27	0,94	4,59	3,55	8,44	1,96	3,06	2,18	2,37	5,68	10,90
330	10,71	38,46	4,31	15,00	0,25	0,94	4,60	3,60	8,27	1,89	2,56	1,44	2,18	5,43	11,18
335	9,82	37,15	3,91	13,75	0,22	0,89	4,51	3,42	7,75	1,74	2,31	1,24	2,01	4,93	11,18
340	8,57	34,98	3,44	11,87	0,20	0,81	4,14	3,42	7,24	1,51	2,10	1,11	1,83	4,37	10,73

