

INVESTIGACION SOBRE LOS BIOCROMOS CAROTENOIDES DE LA PIEL Y ALETAS DEL DORADO (*Salminus maxillosus*, Val.)

Primera Comunicación

Q.F. NELSON H. BABUGLIA, PROF. VÍCTOR H. BERTULLO
y BACH. ALBERTO MORIS

EXTRACTO

Los extractos Acetona-Eter de los biocromos carotenoides de la piel y aletas del Dorado (*Salminus maxillosus*), muestran la presencia de Vitamina A, β -caroteno, Vitamina D₃ y de esteroides o grupos de esteroides que presentan un pico de absorción en las 244 μ m.

Se continúan los trabajos a los efectos de su identificación.

INTRODUCCION

El Dorado, (*Salminus maxillosus*, Val.) es un pez autóctono de la Cuenca del Plata, formada por los ríos Paraná, Paraguay y Uruguay y sus afluentes, conocido y apreciado como alimento desde la colonización española.

Bardin (1961) cita un informe de Alvar Núñez Cabeza de Vaca, sobre su viaje al Río de la Plata entre 1540 y 1542, que dice textualmente: "...Aquí mataron los españoles e indios en obra de una hora, muy gran cantidad de dorados, que hubo cristianos que mató el solo cuarenta dorados".

Feio (1953) comunica que el mismo Alvar Núñez, viniendo por tierra desde Asunción del Paraguay hacia San Vicente, Brasil, encontró en las regiones de los ríos Iguazú y Piquirí: "...un excelente pescado para alimentación, el dorado, cuyo mejor trozo es la cabeza, de la que se extrae un aceite que cura toda clase de lepra y sarna".

Toller, en su viaje al Río de la Plata en 1715, describe y dibuja en su libro, un pez que denomina "beny carp", que según los estudios de Vaz Ferreira (1955), corresponden a nuestro Dorado.

Cuvier y Valenciennes en 1840 lo clasifican y lo incluyen en el Género *Salminus*, creado por Agassiz en 1829 (Devicenzi, 1930).

Batista de Morais y Schubart (1955) lo describen como un pez de coloración muy típica. Amarillo plateado, con el dorso y el lado superior de la cabeza, verde ceniciento, que según los autores hizo decir a Fuster (1944) que poseía "...color limón sulfurado con algo de anaranjado, siendo la región dorsal de color verde limón con mezcla de carmín".

Ringuelet y Aramburu (1961) lo consideran un pez carnívoro, de tamaño grande, de singular importancia económica y deportiva, que recibe los siguientes nombres vernáculos: dorado; mona; pez amarillo; pirayú (que es una voz india, posiblemente guaraní, que significa **pez amarillo**).

Las aletas son de intenso color amarillo con bordes que van hasta el anaranjado fuerte y aun mismo el rojo, lo que nos sugirió la idea de que esta coloración podría deberse a la presencia de sustancias de origen carotenoide, eventuales fuentes de Vitamina A.

Baalsrund (1956), comunica que en cierta clase de Bacalao capturado en las costas de Noruega, pudo aislar la **Astraxantina**. Blig y Dyer (1959), comprueban que el pigmento del Salmón está constituido por **Astraxantina** y **Zeaxantina**. Fox y Hopkins (1966 a, 1966 b) y Crozier y Wilkie (1966) estudian los carotenoides del aceite de pescado.

Llamó nuestra atención la irregularidad de distribución de las reservas de vitaminas liposolubles especialmente las A y D en los distintos órganos de los peces, según que éstos fuesen magros o grasos, lo que aparentemente no tienen aún una clara explicación.

Precisamente sobre esta base de razonamiento, uno de nosotros (Bertullo) consideró de que otros elementos fuera de los comúnmente analizados, caso hígado, pudiesen actuar como depósito de esas vitaminas, lo que originó la presente Comunicación. sobre un tema no estudiado anteriormente en el país.

MATERIAL METODO

a) Las aletas y piel de dorado fueron de especímenes capturados en el río Uruguay y sus afluentes, durante los meses de diciembre-enero, colocándolas de inmediato en frascos color caramelo, herméticamente cerrados, llenos de Etanol a 95°.

b) En una segunda etapa, las muestras fueron puestas inmediatamente de extraídas, en frasco termo, en el cual se había colocado previamente Acetona con un 10% de Sulfato de Sodio anhidro y un 1% de Cloroformo, lo

que al reducir la hidratación, nos proporcionó un tejido que se prestó admirablemente para las posteriores operaciones de extracción.

e) Las manipulaciones del material se efectuaron adoptando las condiciones de trabajo usuales para los concentrados de vitaminas liposolubles, es decir material actínico, luz difusa, bajas temperaturas.

d) Cuando partimos de material conservado en alcohol, desechamos el extracto alcohólico y trabajamos únicamente con los obtenidos posteriormente con acetona, éter etílico libre de peróxidos o éter de petróleo de grado analítico. El método de desengrasado de Willstatler (1-2 tratamientos por acetona, seguido de 1-2 tratamientos por éter etílico) resultó el ideal para el trabajo.

e) El material extraído fue rápidamente filtrado por filtro Buchner por acción del vacío, obteniéndose un residuo blanco, mientras que el líquido de extracción aparecía incoloro. El extracto aceto-etérico, fue evaporado al vacío tomando las precauciones necesarias.

f) Se estudia la presencia de ácidos grasos en el insaponificable por intermedio de la reacción de Bayer-Hirsch. Los índices de Saponificación y de Yodo, fueron determinados de acuerdo a la USP XVI.

g) Se utiliza la reacción de Carr-Price, para la investigación preliminar de carotenoides y las de Liebermann, Liebermann-Burchard, Salkowski, Tortelli-Jaffe y Rosenheim, para las de esteroides.

h) La investigación de vitamina A fue llevada a cabo de acuerdo a la técnica de la USP XVI, utilizando el espectrofotómetro Beckman DU y la de esteroides con un registrador Beckman DK 2A.

i) Los carotenoides fueron también estudiados por cromatografía, siguiendo la técnica de la AOAC (1960), fijando el insaponificable sobre óxido de aluminio cromatográfico Breckman-Merck y eluyendo con éter-éter de petróleo, cromatografiándose luego en columna de óxido de magnesio-Celite, eluyendo con acetona-éter de petróleo y practicando luego las identificaciones correspondientes.

j) Se realizaron cromatogramas sobre papel Whatman N° 1, en la modalidad ascendente, empleando una mezcla de ciclo-hexano-cloroformo (6/4) y realizándose el revelado por pulverización con ácido fosfo-túngstico, con posterior secado en estufa a 70° C durante 20 minutos.

k) También se efectuaron ensayos de cromatografía en capa fina según la técnica de Mettier-Petterat, empleando como adsorbente una mezcla de 5 g. de gel de sílice G y 20 g. de hidróxido de calcio y como solvente una mezcla de éter de petróleo-benzeno (1-1). Se utilizó finalmente una lámpara analítica con filtro de Wood.

RESULTADOS

1) Llamó nuestra atención en el material listo para ser investigado, la sugestiva distribución de la materia colorante, particularmente en la cola del espécimen, en forma de anillos que insinuaría una separación selectiva o repartición proporcional, regida probablemente por algún factor vinculado con el proceso biológico de concentración.

2) El producto final obtenido tiene el aspecto de un aceite graso, con olor a pescado y típico color anaranjado intenso, similar al Bicromato de potasio.

3) Sus características fisicoquímicas son las siguientes: aceite semisólido a temperatura de laboratorio, con un Punto de Fusión aproximadamente de $27^{\circ}\text{C} = 1^{\circ}\text{C}$. Se saponifica con todas las características de una grasa, comprobándose la presencia del jabón formado por salificación y producción de espuma en medio acuoso.

4) La reacción de ácidos grasos en el insaponificable, previa acidificación, fue positiva, así como también la investigación de glicerina.

5) El Índice de Saponificación es de 98,50, valor bajo que corresponde a productos cereos, lo que indica una gran proporción de insaponificables. Su determinación cuantitativa dio un valor del 15,30 %.

6) El Índice de Yodo es de 91,60, bajo también por las mismas razones que en 5), correspondiendo a un aceite no secante.

7) Un par de gotas del producto disueltas en 0,5 mls. de Cloroformo y tres gotas del reactivo de Carr-Price, da de inmediato un intenso color azul que se mantiene estable durante bastante tiempo y que presenta a las 24 horas un tinte rosado, como si hubiese ocurrido una degradación.

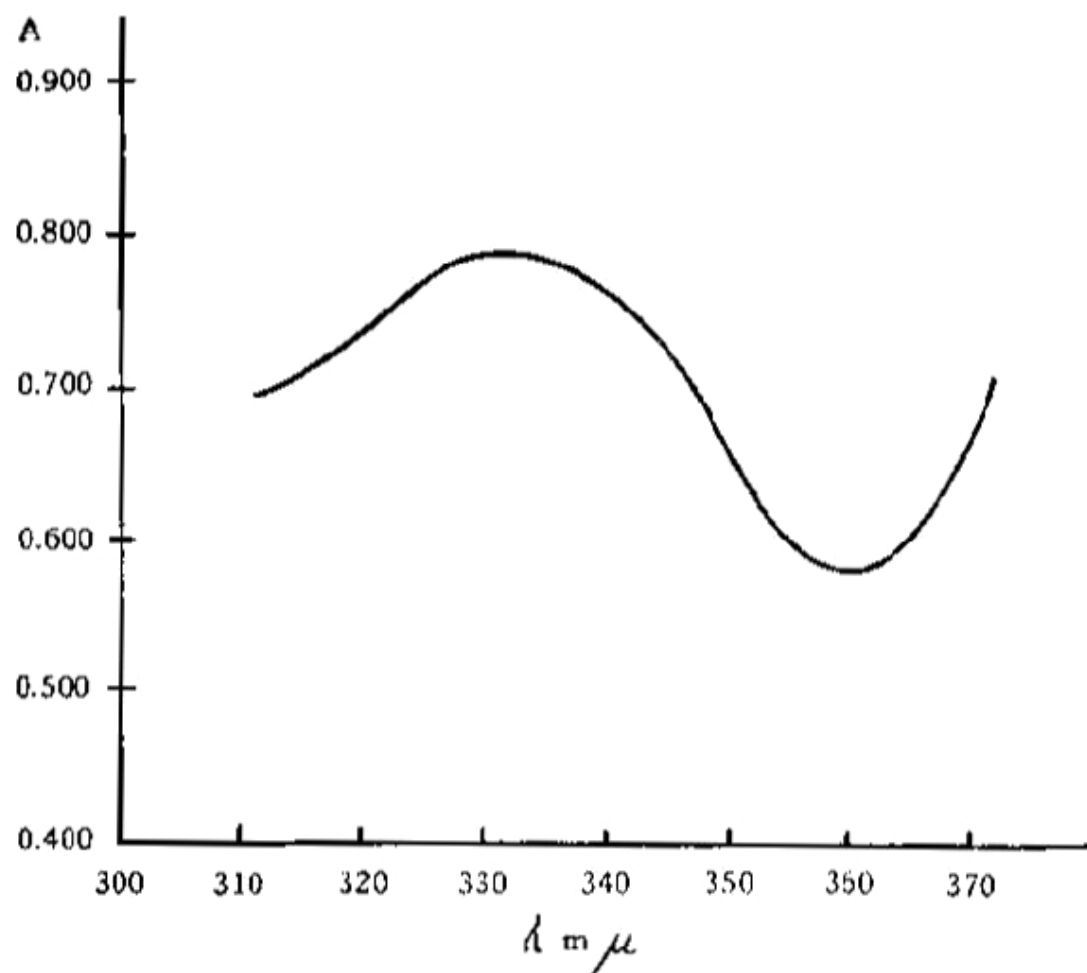
8) El color obtenido con la reacción de Carr-Price planteó la posibilidad de la presencia de esteroides, obteniéndose resultados positivos con las técnicas de Liebermann y de Liebermann-Buchard, que dio un hermoso color verde específico de los esteroides. También resultaron positivas las reacciones de Salkowski, algo enmascarada por los carotenos, la de Tortorelli-Jaffé y la de Rosenheim. Con la digitonina se obtiene un precipitado escaso.

9) La evaluación cuantitativa fotocolorimétrica de Colesterol-Vitamina D₃ con la reacción de Liebermann-Buchard indica que un 45 % del insaponificable, corresponde a **esteroides**.

10) Las vitaminas investigadas con el Beckmann DU, dieron la típica banda de absorción de la Vitamina A, con un pico característico entre 328-330 μm (Gráfica N^o 1).

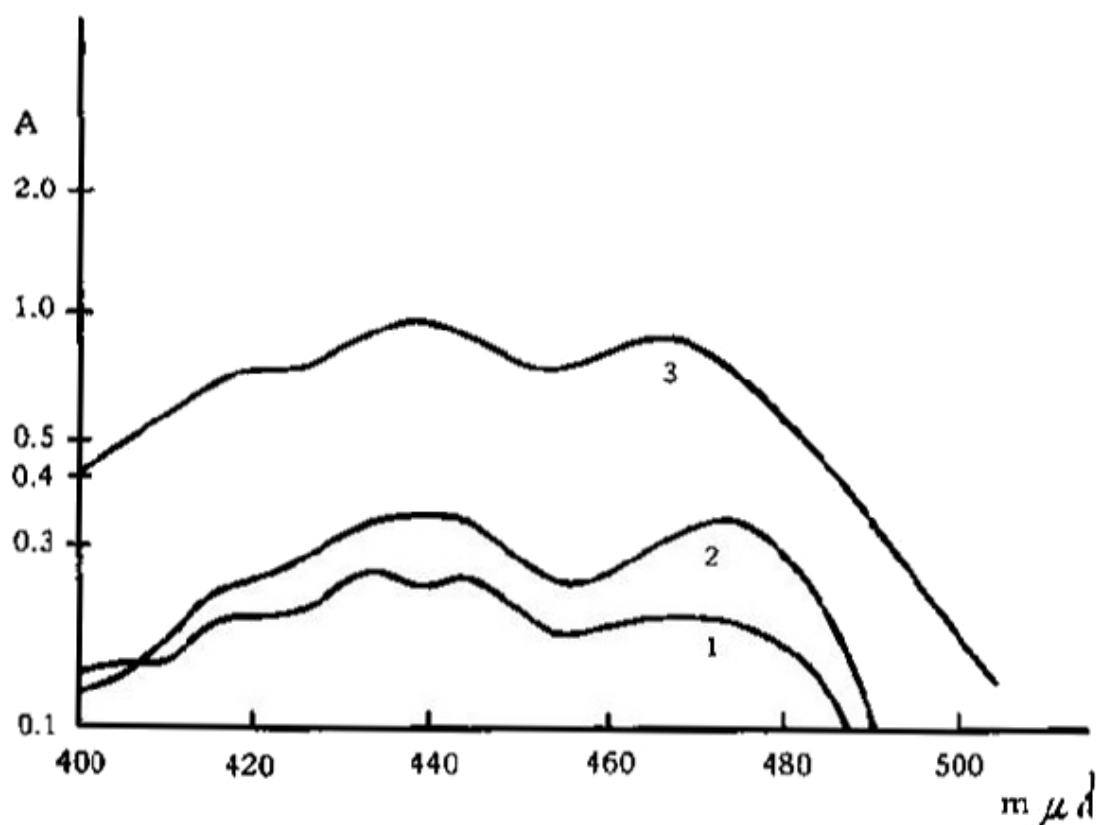
11) Los carotenoides, también identificados por espectrofotometría y utilizando como norma una solución de β -caroteno, de Roche Inc. USA, mues-

GRÁF. 1.— Identificación de Vitamina A, investigada con un equipo Beckman DU.



GRÁFICA 2.

Identificación de β caroteno. 1: Solución de β caroteno de Roche, Inc. 2: β caroteno en el insaponificable. 3: β caroteno en el extracto natural.



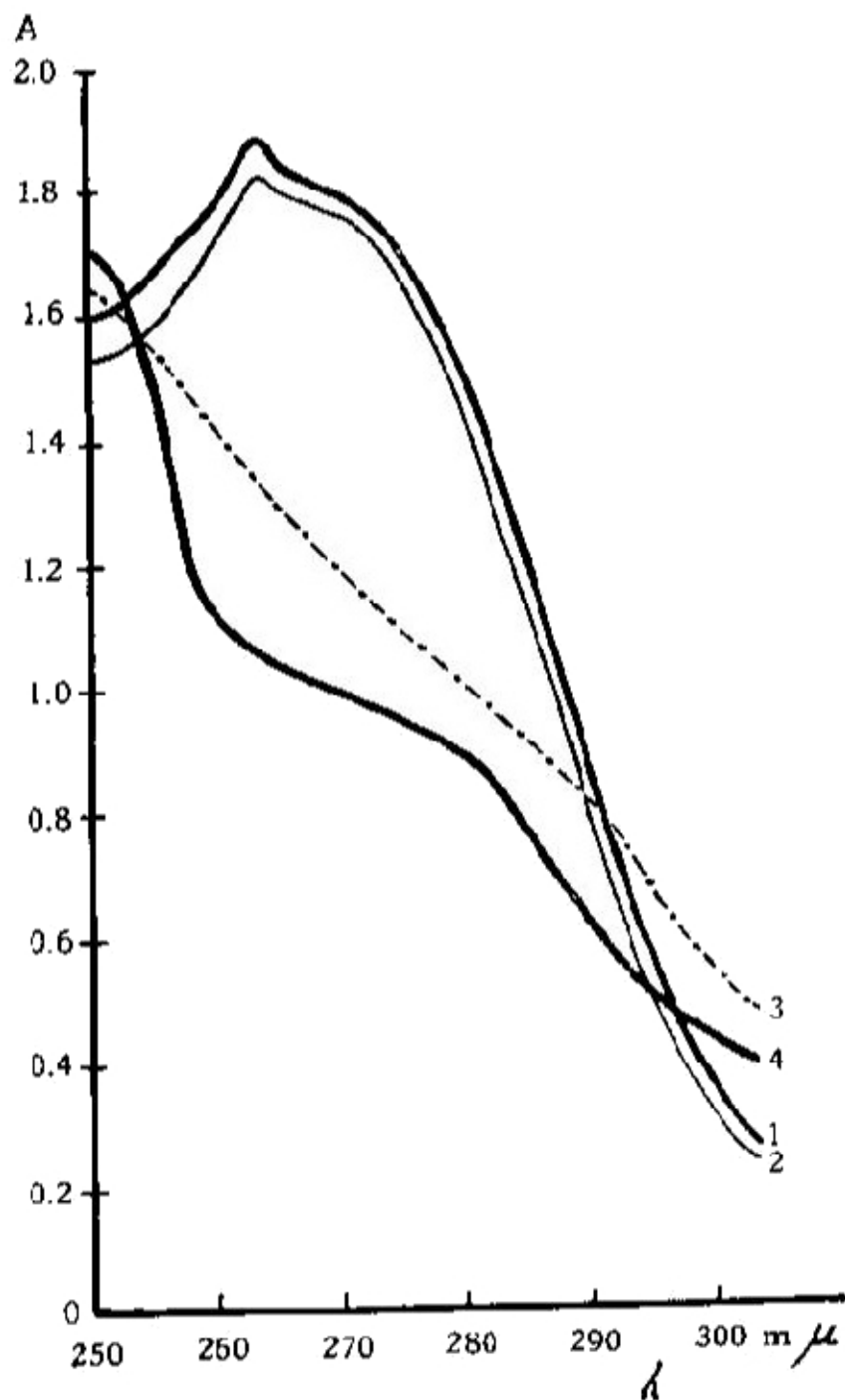
tran idénticas características en el extracto natural y en el insaponificable, lo cual prueba la presencia de aquél, y cuya dosificación será objeto de una Comunicación posterior (Gráfica N° 2).

12) Los esteroides que asimilábamos al grupo de la Vitamina D, nos sorprendieron en las pruebas iniciales al no dar los picos característicos que debía producir. Por lo tanto preparamos gráficas de Vitamina D₂ y D₃, destinadas a servir como normas, con picos típicos en las 265 μm (Gráfica N° 3).

GRÁFICA 3.

Investigación de Vitamina D₂ y D₃ en el extracto natural y en el insaponificable.

1: Vitamina D₂. 2: Vitamina D₃. 3: Extracto natural. 4: Insaponificable.



El resultado fue negativo tanto en el extracto natural como en el insaponificable, por lo cual practicamos nuevas identificaciones con el Beckman DK, comprobándose entonces la aparición de picos en 240-244 μm , mientras que el producido por el Colesterol aparecía a las 203 μm (Gráfica N° 4).

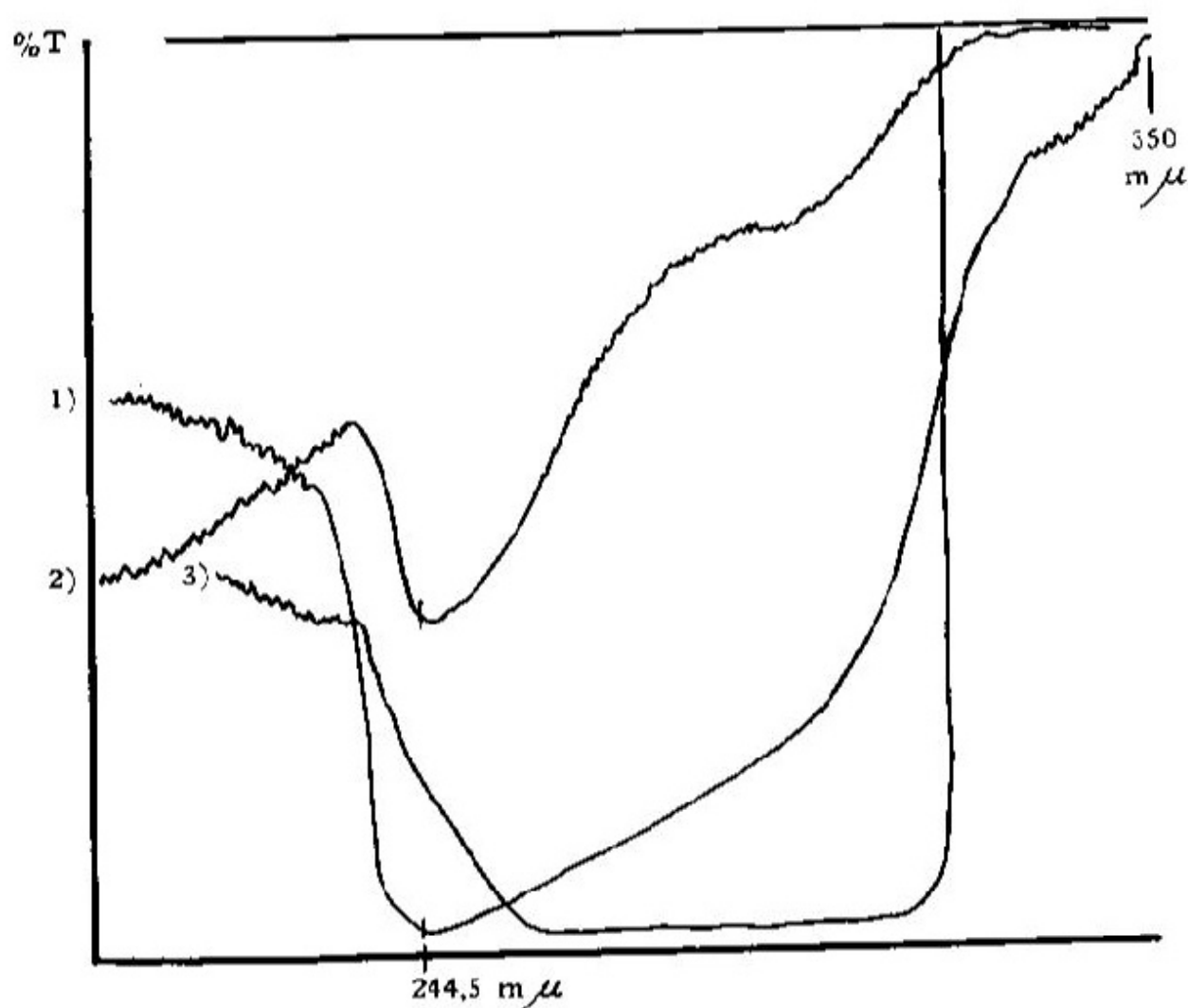
13) Los estudios cromatográficos en el insaponificable y su posterior identificación espectrofotométrica, mostraron claramente que el derivado pertenece al β -Caroteno (Gráfica N° 5).

14) La cromatografía de papel permitió identificar en la muestra una mancha de RF similar a la correspondiente a un patrón de Vitamina D₃, corrido en el mismo cromatograma. Pudimos observar en la muestra, una mancha inmediata, adyacente, de movilidad cromatográfica ligeramente superior.

15) La cromatografía en capa fina, permitió observar en la muestra una mancha fluorescente de RF, similar al patrón de Vitamina D₃.

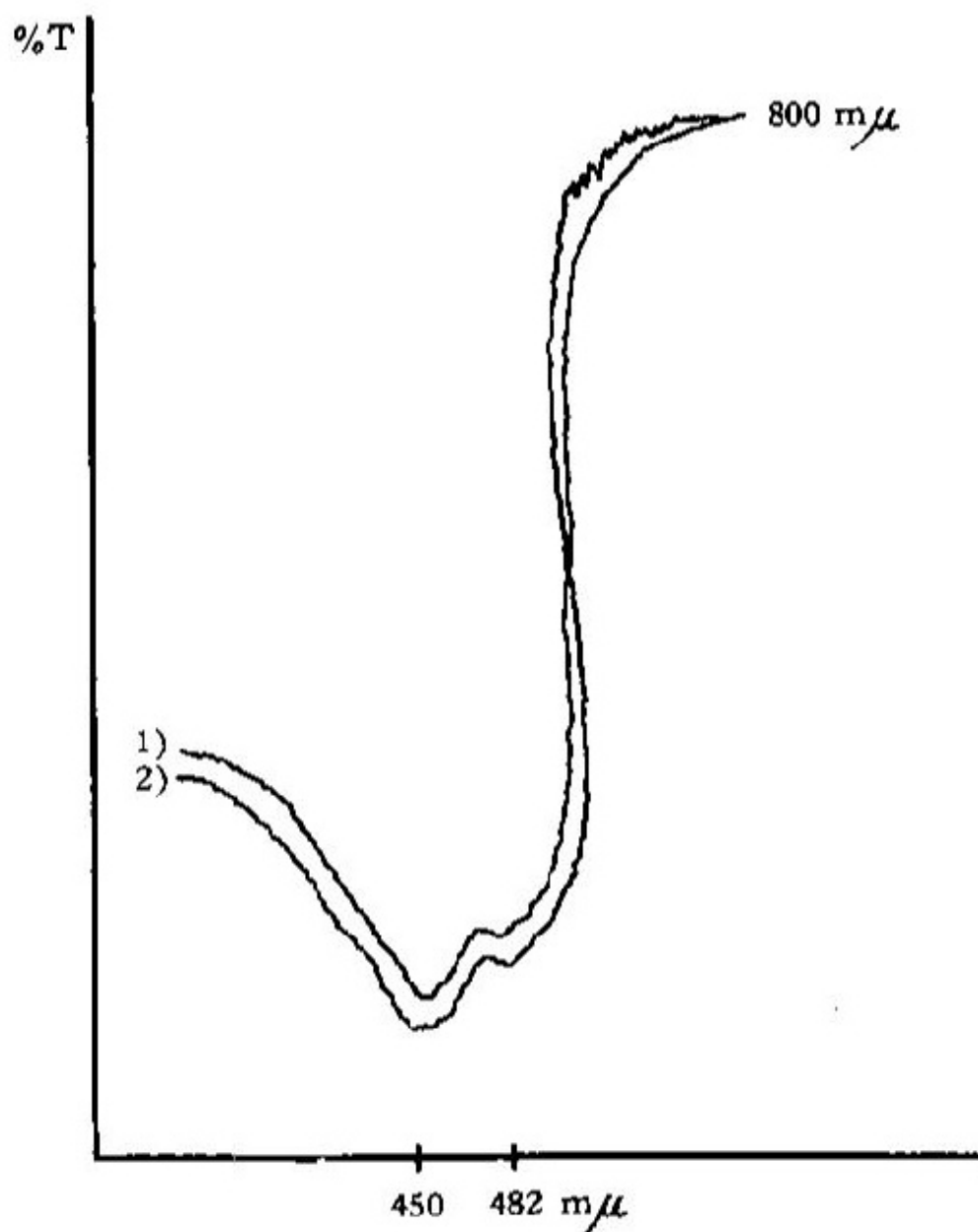
GRÁFICA 4

Gráfico del Recording DK. 1: Colesterol. 2: Extracto natural. 3: Insaponificable



GRÁFICA 5.

Investigación de caroteno con el Recording DK
1: Extracto natural. 2: Insaponificable.



DISCUSION

El color amarillo-anaranjado del producto, su insolubilidad en agua y solubilidad en aceite y solventes orgánicos y los caracteres cinéticos de la reacción de Carr-Price, además del resultado positivo de la reacción para carotenoides del ácido sulfúrico concentrado, ratificadas por espectrofotometría nos asegura la presencia de Vitamina A, así como también de β -Caroteno.

El problema surge en la investigación de los esteroides, en donde en vez de aparecer un pico característico en la banda de absorción de los 265 μm , comprobamos que los picos aparecían en las bandas de los 240 μm y 244 μm ,

situación no comunicada hasta el presente (de acuerdo a la bibliografía consultada) de absorción a 244 μm , presentada por los esteroides o grupos de esteroides.

Por cromatografía de papel se comprueba la presencia de Vitamina D₃, pero también aparece una mancha inmediatamente adyacente y de movilidad cromatográfica ligeramente superior.

La cromatografía de capa fina ratifica la presencia de Vitamina D₃.

La investigación genérica y específica de este nuevo cuerpo que hasta el presente no ha sido descrito, podría proporcionar tal vez, un nuevo conocimiento de la síntesis de las vitaminas liposolubles en ciertas formas de vida acuática.

BIBLIOGRAFIA

- A.O.A.C. (1960).—Official Methods of Analysis. 9th. Ed.
- BAALSRUND, G. (1956).—In "Nature" 178: 1182.
- BARDIN, P. (1961).—Pirayú. Ed. GKraft. Buenos Aires, Argentina.
- BATISTA DE MORAIS, M. y SCHUBERT, O. (1955).—Contribuição ao estudo do Dourado (*Salminus maxillosus*, Val.) do Rio Meggi Guassú. Ministerio da Agricultura. Divisão de Caça e Pesca. São Paulo, Brasil.
- BLIGH, E. G. y DYER, W. J. (1959).—Orange-red flesh in Cod and Haddock. *J. Fish. Res. Bd. Canadá*, 16(4): 449-452.
- CROZIER, A. y WILKIE, J. M. (1966).—Ocurrence of a dihidroxi-carotene in a fish. *Comparative Biochem. and Physiol.* 18: 801-804.
- DEVINCENZI, G. (1930).—Peces del Uruguay. II. Nuestra Fauna Ictiológica según nuestras colecciones. *An. Mus. Hist. Nat. de Montevideo*. Vol. II.
- FEIO, J. L. DE ARAUJO (1953).—Contribuição ao conhecimento da historia de zoografia do Brazil. Publ. Avulsas Mus. Nac. Rio de Janeiro. Nº 12.
- FOX, C. y HOPKINS, H. M. (1966 a).—Comparative metabolic fractionation of Carotenoids in three flamingo species. *Comparative Biochem. and Physiol.* 17: 841-843.
- FOX, C. y HOPKINS, H. M. (1966 b).—Carotenoid fractionation in the Scarlet Ibis. *Comparative Biochem. and Physiol.*, 19: 267-270.
- FUSTER DE PLAZA, M. L. (1944).—El Dorado. Bol. Nº 6. Dir. Piscult., Pesca y Caza. Min. Agricultura. Argentina. Mimeo. 7 pp.
- RINGUELET, R. y ARAMBURU, R. H. (1961).—Peces argentinos de agua dulce. *Agro*, Nº 7. B. Aires, Argentina.
- VAZ FERREIRA, R. (1955).—Documentos para la Historia de la República Oriental del Uruguay. Tomo II. "Relatos de Viajes, Memorias y Autobiografías". Viaje de William Toller a la Banda Oriental y Río de la Plata en 1715. Instituto de Investigaciones Históricas y Laboratorio de Zoología. Fac. de Humanidades y Ciencias. Montevideo.