

Riqueza vitamínica "A" en aceites de hígados de pescados

Por

OTTO GONZALEZ CORREA

Químico Farmacéutico

NOTA PRELIMINAR N.º 1

Durante estos últimos años ha sido motivo de múltiples experimentos la determinación vitamínica en aceites de pescados, algunos de los cuales son tan activos como el de bacalao, habiendo otros que presentan una actividad mucho mayor.

Con estos datos, y atendiendo a las dificultades de la época presente, nos fué planteado por el Dr. José J. Cerdeiras Alonso el estudio científico de este problema (1) como base previa imprescindible para que el Instituto de Química Industrial pudiese encarar su industrialización. Circunstancias felices pueden también facilitar el estudio de este problema por depender gran parte de la pesca en el Uruguay de un organismo oficial: el Servicio Oceanográfico y Pesca que concentra diariamente gran cantidad de pescado fresco, lo que permite su clasificación por especies, selección adecuada para la limpieza y extracción de las vísceras correspondientes. En este sentido los Sres. Com. Oscar Tagle y Teniente de Navío Hispano Pérez Fontana, Director del Servicio Oceanográfico y Pesca, nos han facilitado la tarea de seleccionar la materia prima de nuestros ensayos, cooperando eficazmente con nosotros.

ESTUDIO PREVIO DE LOS METODOS DE EXTRACCION

Comenzamos nuestro trabajo determinando el método de extracción de aceites de hígados de pescados que nos llevase a adoptar una técnica que sirviese de norma general. Ensayamos los siguientes disolventes: Cloroformo, Tetracloruro de carbono, Benceno y Tricloro-etileno.

Con todos los disolventes seguimos igual técnica de extracción, partiendo de hígados que presentaban un elevado grado de deshidratación y que estaban en perfecto estado de conservación con sal común y en cámaras frigoríficas. De estos hígados se tomó una cantidad aproximadamente de dos kilogramos y se pasó por una máquina de picar carne, para hacer una muestra media, de la cual

(1) Datos preliminares de Tesis.

se tomaron porciones sobre las que ensayamos los diversos disolventes en el Extractor Soxhlet.

CUADRO Nº 1

HIGADOS CONSERVADOS (1)

Ensayos	Disolventes	Color del Aceite	Tiempo Med.	Rend. Med.
A	Tricloro-etileno	Pardo	4 horas	33 %
B	Cloroformo	Am. oscuro	3 ½ horas	38,31 %
C	Benceno	Am. claro	5 horas	50,14 %
D	Tetracl. de carb.	Am. oscuro	4 horas	56,02 %

Encontramos rendimiento excesivamente altos en las extracciones debido, sin duda, al estado de desecación de los hígados empleados, lo que en este caso carece de importancia pues estos ensayos tenían por principal objetivo la elección del disolvente. Todos los aceites obtenidos poseían un olor "sui generis" a pescado y separaban una masa amarillenta de apariencia amorfa, a veces semi-crisalina.

De los disolventes empelados, elegimos el cloroformo, pues, aun cuando no era el que daba más alto rendimiento, en aceite, ni tampoco tenía éste el color más claro, la operación de extracción marchó regularmente y con más rapidez que con los otros, y, la menor temperatura de ebullición del cloroformo nos asegura además una menor alteración del poder vitamínico durante la manipulación.

DETERMINACION DE LA VITAMINA "A"

En estos ensayos hemos usado exclusivamente el procedimiento de dosaje seguido en el "Instituto Andrómaco" para sus preparados vitamínicos ideado por el Dr. Hans Eisner según sugestión de los trabajos de H. Brockmann, y M. Tecklemburg. (2).

Es un dosaje sumamente cómodo, sencillo y rápido, esperando, no obstante, confrontar los datos obtenidos por este método con los realizados por otros procedimientos.

Este procedimiento está basado en la reacción de Carr y Price (3) que da la vitamina "A" frente al tricloruro de antimonio en solución cloruro-fórmica, desarrollando un color azul-celeste con un máximo de intensidad a los 10 segundos. Es menester preparar primero el reactivo de Carr y Price y la escala colorimétrica.

(1) Nuestros datos se refieren a los hígados de merluza (*G. Merluccius*) y son un poco elevados con relación a los presentados por A. O. Castellanos: *Rev. Inst. Bac. (D. N. H.)* V-9 Dic. 1939, Nº 2, pág. 227.

(2) Brockmann y Tecklemburg. — *Zeitg. Phy. Chem.* 1933. 221. Pág. 117.

a) REACTIVO DE CARR Y PRICE

Es una solución a saturación de tricloruro de antimonio cristalizado en cloroformo seco, aproximadamente al 30 % (peso en volumen) (3).

b) PREPARACION DE LA ESCALA (4)

Se prepara la siguiente solución (2).

Sol. azul: sulfato de cobre cristalizado

$\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 5 gramos

Nitrato de Cobalto

$(\text{NO}_3)_2\text{Co}$ 0,125 gramos

Agua destilada c. s. p. 50 c. c.

Y se obtiene un color azul que es comparable al que desarrolla una solución 1/500 de aceite vitamínico que contenga 58.800 Unidades A frente al Reactivo de Carr y Price.

Se pueden preparar en una serie de tubos calibrados soluciones azules de distintas concentraciones cuyo valor en vitamina A se determina frente a aceites estandarizados usando igualmente el Reactivo de Carr y Price.

c) TECNICA DE LA REACCION

La escala de esas condiciones está hecha para operar con diluciones 1/500 del aceite a ensayar.

Se hace una dilución (I) de 0,1 c. c. del aceite en 0,9 c. c. de aceite de olivas neutralizado y esterilizado lo cual nos origina una dilución 1/10.

De esta dilución se hace otra (II) al 1/50 lo cual nos origina una dilución 1/500 del aceite primitivo; se toma 0,1 c. c. de la sol. I y se agrega 4,9 c. c. de cloroformo lavado y seco (sol. II dil. 1/500).

Se toma 0,15 c. c. de esta solución II y se le agrega 3 c. c. de reactivo Carr y Price. Si hay vitamina A se desarrolla un color azul más o menos pronunciado y se compara con los tubos de la escala. La intensidad del color azul alcanza su máximo a los 10 segundos para disminuir luego y desaparecer. Operando en estas condiciones (0,15 c. c. de dil. 1/500) da directamente el poder vitamínico "A" en unidades internacionales por gramo. El material a usarse debe ser rigurosamente seco.

TECNICA ADOPTADA

I

Trabajamos sobre corvinas (*Micropogon undulatus* L.) frescas, a lo sumo de 24 horas de pescadas, y conservadas en cámaras frigoríficas. Con el objeto de ilustrarnos sobre las condiciones en

(3) F. H. Carr y E. A. Price. — *Bioch. J.* 1926. 20. pág. 497.

(4) Este método lo debo a la deferencia del Dr. Hans Fisner

que se efectúa la pesca en el Río de la Plata, hemos realizado un viaje a bordo del "R. O. U. Antares", pesquero perteneciente al Servicio Oceanográfico y Pesca. Hemos recogido las mejores impresiones sobre la labor efectuada a bordo, ofreciéndonos, en ese sentido, las máximas garantías deseables en lo que se refiere a la conservación y acondicionamiento del pescado.

Hemos hecho nuestros ensayos sobre cinco tandas de corvinas con un total de 103 piezas que corresponden a 55.266 gramos, con un promedio general de 545.25 grs. por pieza. Hemos tomado siempre, para nuestro trabajo, el tipo medio corriente, de venta en el mercado de plaza.

En el cuadro N.º 2, compilamos los datos obtenidos.

CUADRO N.º 2

Ensayo N.º	1	2	3	4	5
Número de piezas	17	18	24	20	24
Peso total	9,885 g.	11,344 g.	11,760 g.	10,307 g.	11,970 g.
Promedio	518,4 g.	630,2 g.	490 g.	525,8 g.	498,7 g.
Peso de los hígados	107 g.	120 g.	116 g.	136 g.	143 g.
Peso medio "	6,29 g.	6,66 g.	4,82 g.	6,80 g.	5,95 g.
% del hígado s/total	1,08	1,05	0,98	1,31	1,19
Ensayos efectuados	5	2	2	2	3

a) **Extirpación de los hígados.** — Los pescados, lo más frescos posible, son traídos al laboratorio y pesados. Luego se les hace una incisión longitudinal a lo largo de la cara ventral de suerte que queden al descubierto las vísceras. Mediante pinza y bisturí se extirpan los órganos, teniendo cuidado de quitarles la vesícula biliar y que esta no derrame su contenido.

Se pasan a un cristallizador tarado y se pesan. Luego se someten a la extracción del aceite o se guardan a 0º C. en la heladera, para estudios comparativos.

b) **Deshidratación de los hígados.** — Por tratarse de hígados frescos, debemos considerar el agua propia de todo tejido animal, que en este caso molesta enormemente la extracción, haciéndola muy lenta y dando al final una mezcla de aceite y agua. La eliminación del agua del tejido hepático la hacemos mediante un deshidratante, pareciéndonos el más adecuado y corriente el sulfato de sodio anhidro, obtenido por desecación y calcinación en baño de arena, del sulfato de sodio cristalizado ($\text{SO}_4\text{Na}_2 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$). Agregado en forma de polvo fino y mezclado al hígado, le absorbe toda su agua, dando una masa pulverulenta muy fácil de tratar en el Extractor Soxhlet.

c) **Extracción del aceite.** — Una cantidad pesada de hígado se pasa a un mortero y se le incorpora dos veces su peso de sulfato

de sodio anhidro y calcinado con lo cual se logra la formación de un polvo pardo claro, bastante homogéneo que contiene al hígado muy dividido, lo cual facilita la extracción. Se pasa la mezcla a la vaina del Extractor Soxhlet y se agota por cloroformo.

Hemos empleado cada vez 45 gramos de hígados a los cuales se les quita el agua con 90 gramos de sulfato de sodio anhidro, y se extraen con 300 gramos de cloroformo rectificado (P. eb₍₇₆₀₎ = 61° C.)

La extracción es bien limpia y marcha muy bien, estando concluida entre 3-4 horas.

d) **Eliminación del disolvente.** — Terminada la extracción se procede a eliminar el disolvente por destilación.

Para asegurarnos la menor alteración posible del poder vitamínico (1) usamos la destilación a presión reducida y atmósfera de gas inerte (CO₂).

Empleamos la trompa eléctrica, que nos da un vacío de 320 m/m de mercurio, lo cual nos hace descender unos 20° C. el punto de ebullición del cloroformo. Facilitamos aun el arrastre del disolvente haciendo pasar una corriente de anhídrido carbónico seco.

El aceite obtenido se pesa y se calcula en rendimiento sobre el peso del hígado empleado.

Se guarda en tubo cerrado a la lámpara bajo anhídrido carbónico. Sobre ese aceite se hará el dosaje de Vitamina "A".

RENDIMIENTOS

Hemos obtenido rendimientos en aceites que son: sobre el peso del hígado: 6,25 % como mínimo y 16,11 % como máximo, con un promedio general sobre todos los ensayos de 10,28 %, y sobre el peso total del pescado, de 1,15 o/oo.

CUADRO N° 3	RENDIMIENTO SOBRE EL PESO DEL HIGADO				
Ensayo N°	1	2	3	4	5
Porcentaje medio	9,70	9,20	9,81	11,87	10,82

Los aceites obtenidos presentan un aspecto límpido, son transparente, poco fluidos, de color amarillo pardo y olor "sui generis" a pescado.

VALOR VITAMINICO

Los aceites obtenidos presentan marcada reacción de Vitamina "A" (Carr y Price). Los dosajes colorimétricos dieron valores

(1) Mac Collum, N. Simmonds, J. E. Becker, P. G. Shipley. — Jhon's Hopkins Hosp. Bull., 1922-23, pág. 229.
F. Wokes, S. G. Willimott. — Bioch. J., 1927, 21, pág. 414.

comprendidos entre 23,520 y 49,920 U. Internacionales por gramo, que consignamos en el cuadro N.º 4.

Asimismo hemos repetido en varias oportunidades los ensayos sobre los mismos hígados pero conservados en la heladera a cero grado centígrado, es decir, a varios días de extirpados del animal, datos que indicamos en el cuadro N.º 5.

CUADRO N.º 4		VALOR VITAMINICO				
Ensayo N.º ...	1	2	3	4	5	
U. I.	23,520	35,280	29,400	38,220	49,280	

CUADRO N.º 5		VALOR VITAMINICO				
Híg. conservado ...	6 días	1 día	4 días	1 día	—	
U. I.	neg.	35,280	17,640	38,220	—	

Los datos obtenidos nos indican una disminución del valor vitamínico "A" en hígados con cierto tiempo de extirpados. No obstante esperamos repetir los ensayos y comprobar todo lo observado en este sentido.

EXTRACCIONES POR TRICLORO-ETILENO

Paralelamente a estos ensayos hemos hecho algunas extracciones con tricloro-etileno, aplicando igual técnica, obteniendo rendimientos en aceites, aproximadamente un 4% menor con relación a los obtenidos por el cloroformo.

Los aceites obtenidos son entonces de color oscuro, negruzcos, de olor desagradable y que en ningún caso dan reacción de vitamina "A", a pesar de haber trabajado simultáneamente a los ensayos clorofórmicos y sobre los mismos hígados.

CONCLUSIONES

1º. — Proponemos como método de extracción para el aceite de hígados de pescados en el laboratorio el empleo de cloroformo en el extractor de Soxhlet, y y deshidratación del tejido hepático por medio del sulfato de sodio seco.

2º. — Observamos un rendimiento medio para el aceite de hígado de corvina de 10,28% sobre el peso del hígado, y 1,15% sobre el peso total del animal.

3º. — En los aceites obtenidos de hígados frescos de corvina existe vitamina "A" entre 20.000 y 49.000 U. I. por gramo.

4º. — Sobre hígados viejos, de más de 4 días de extirpados del animal, ese valor disminuye, en los aceites de ellos obtenidos.

5º. — Los aceites extraídos por medio del tricloro-etileno no denuncian vitamina "A" por medio del reactivo de Carr y Price.

Al terminar esta comunicación de carácter preliminar quisiéramos agradecer a los Dres. Hans Eisner y José J. Cerdeiras Alonso, así mismo como al Dr. del Instituto de Química Industrial, Sr. Alberto Ayala, por todas las indicaciones de ellos recibidas, sin las cuales no nos hubiéramos considerado capaces de emprender este estudio.

Julio de 1940.

Laboratorio del Instituto de Química Industrial
MONTEVIDEO