

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Nutrição

SANTOS

O DESENVOLVIMENTO HISTÓRICO DA CIÊNCIA DA NUTRIÇÃO EM RELAÇÃO AO DE OUTRAS CIÊNCIAS

Karina Maria Olbrich dos Santos
Engenheira de Alimentos

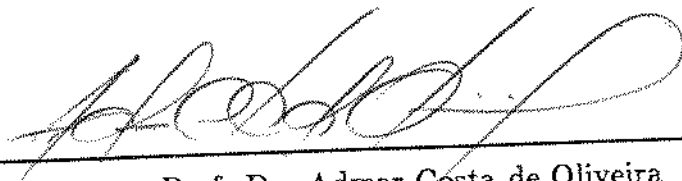
Passador

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Karina Maria Olbrich dos Santos e aprovada pela Comissão Julgadora em 21.06.90. Campinas, 21 de junho de 1990.

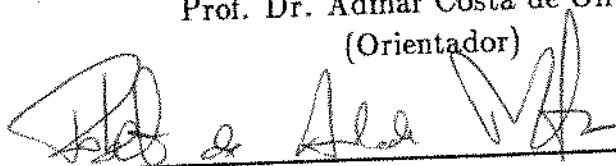
12/90
Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira
Orientador

Prof. Dr. Roberto de Andrade Martins
Co-Orientador

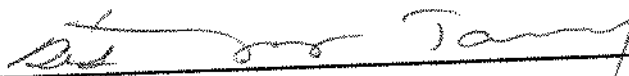
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira
(Orientador)



Prof. Dr. Roberto de Andrade Martins
(Membro)



Profa. Dra. Débora de Queiroz Tavares
(Membro)



Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
(Membro)

Campinas, 21 de junho de 1990.

Ao Ricardo

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Admar e ao Prof. Roberto, pela orientação recebida para a realização do presente estudo. Ao Prof. Roberto, em particular, pela constante atenção, empenho e estímulo e pelas inúmeras sugestões.

À Profa. Débora, pelo incentivo inicial e pelas sugestões para a redação final desta dissertação.

À minha família, pelo apoio irrestrito.

Aos amigos – em especial Ana Bô, Magali, Domingos, Justino, Mônica e Nelson – pela participação direta ou indireta nas diversas fases (altos e baixos) do Mestrado.

À Cristina, Eliane, Fátima, Lilian e Lilhane – “habitantes da casa” do Centro de Lógica – pela amizade e pelas conversas animadas na hora do cafezinho.

Ao Centro de Lógica, Epistemologia e História da Ciência da UNICAMP, pela aquisição de obras históricas fundamentais para a realização desta dissertação e pela digitação e impressão da mesma. Em particular, à Nilza e à Bel, pelo empenho no trabalho de digitação.

À CAPES, ao CNPq e à UNICAMP, pelas bolsas de estudos concedidas.

À ABIA, pela colaboração na reprodução xerográfica desta dissertação.

SUMÁRIO

Resumo	iv
Abstract	vi
Introdução	viii
1 Final do século XVIII: estado da fisiologia e da química com relação ao conhecimento sobre nutrição	01
1.1 Fisiologia e nutrição	01
1.2 Contribuições de Lavoisier	05
1.3 O conhecimento químico sobre as substâncias orgânicas	08
2 Avanços no conhecimento químico sobre as substâncias orgânicas na primeira metade do século XIX	15
2.1 Desenvolvimento de métodos analíticos	15
2.2 A classificação das “substâncias alimentares” de Prout	19
2.3 Experimentos com o amido: a descoberta da diástase e o conceito de catálise	21
2.4 A “teoria das proteínas” de Mulder	22
3 A abordagem fisiológica dos processos relacionados à nutrição na primeira metade do século XIX	27
3.1 A fisiologia no início do século XIX	27
3.2 Novos estudos sobre digestão	28
4 A abordagem química e as teorias sobre o processo nutricional na primeira metade do século XIX	45
4.1 As teorias de Gmelin e Prout.....	45
4.2 As pesquisas de Boussingault e o desenvolvimento do método “input-output”	48
4.3 A teoria dualista de Dumas	50
4.4 As teorias metabólicas de Liebig	53
5 Origens da avaliação biológica do valor nutricional dos alimentos	64

5.1 Experimentos de Magendie sobre a origem do nitrogênio animal	64
5.2 Estudos nutricionais sobre a gelatina	64
6 A descoberta da capacidade biossintética do organismo animal	70
6.1 A controvérsia sobre a origem da gordura animal	70
6.2 A descoberta da função glicogênica do fígado	76
7 Estudos quantitativos sobre o metabolismo: origens da calorimetria moderna	82
7.1 Uréia como medida do metabolismo de compostos nitrogenados e a questão da fonte do trabalho muscular	82
7.2 Termoquímica, calorimetria e o conhecimento sobre o metabolismo energético	93
8 O conhecimento sobre a necessidade nutricional de minerais	108
9 O conhecimento químico, fisiológico e nutricional sobre as proteínas na segunda metade do século XIX e início do século XX	117
9.1 Idéias sobre a digestão, absorção e assimilação de proteínas ..	117
9.2 A química de proteínas e as idéias sobre sua estrutura	128
9.3 Novas idéias sobre o metabolismo e o valor nutricional das proteínas	136
10 O desenvolvimento do conceito de vitaminas	145
10.1 Estudos sobre necessidades nutricionais	145
10.2 Estudos sobre doenças de deficiência nutricional	151
10.3 O conceito de vitaminas	158
Discussão e Conclusões	164
Lista Bibliográfica	179

RESUMO

O presente trabalho consiste em um estudo histórico do desenvolvimento do conhecimento científico sobre nutrição em relação ao desenvolvimento de outras ciências, particularmente da química e da fisiologia. O período abordado estende-se desde o final do século XVIII, que marca o início da química moderna e o surgimento da fisiologia enquanto ciência independente, até princípios do século XX, quando é estabelecido o conceito de vitaminas.

O estudo teve como base a bibliografia histórica disponível a respeito do desenvolvimento da ciência da nutrição, da fisiologia, da química e da bioquímica. Foram obtidas informações históricas relativas às pesquisas experimentais e às concepções teóricas sobre o processo e as necessidades nutricionais. Essas informações foram organizadas de forma a compor a história dos principais conceitos e métodos de experimentação que definiam a ciência da nutrição no início do século XX, evidenciando o caminho percorrido pelos pesquisadores ao longo do período considerado e procurando estabelecer relações com o conhecimento científico disponível na época. Dentro dos limites definidos no tempo, este trabalho acompanha desde o surgimento das primeiras concepções químicas (no sentido moderno) sobre o processo de nutrição animal até o estabelecimento das leis que determinam os requerimentos energéticos humanos e o reconhecimento da essencialidade nutricional de minerais, aminoácidos e vitaminas.

Verificou-se que o desenvolvimento da ciência da nutrição esteve historicamente condicionado pelo conhecimento químico sobre as substâncias orgânicas e pelo conhecimento químico e fisiológico sobre os processos metabólicos; e que esteve sujeito a controvérsias, disputas, tentativas e erros e numerosas dificuldades, ao longo do período estudado. As concepções e os métodos experimentais recém desenvolvidos em química e fisiologia eram logo incorporados às pesquisas em nutrição. Entretanto, constatou-se que nem sempre o conhecimento científico disponível contribuiu para o avanço da nutrição. Algumas vezes, as concepções predominantes até dificultaram o esclarecimento de determinadas questões. Isso ficou particularmente claro com relação ao estabelecimento do conceito de vitaminas, dificultado pelo sucesso da teoria dos germes causadores de doenças e pela confiança irrestrita nos métodos de análise química disponíveis e no conhecimento então

aceito sobre as necessidades nutricionais.

Verificou-se também que no início do século XX a ciência da nutrição já contava com base teórica e experimental assim como com métodos próprios de experimentação. Esses métodos – experimentos de dieta e experimentos de balanço – já se encontravam esboçados no início do século XIX, mas ao longo desse século foram incorporando a evolução do conhecimento químico, fisiológico e nutricional.

ABSTRACT

This work is a historical study about the development of scientific knowledge on nutrition, and its relation to the development of others sciences, specially chemistry and physiology. It studies the period from the end of the XVIIIth century – marked by the begining of modern chemistry and the rise of physiology as an independent science – to the early XXth century, when the concept of vitamin was formulated.

This study was grounded on historical works concerning the development of the sciences of nutrition, physiology, chemistry and biochemistry. The study of those sources brought a wealth of historical informations about the experimental researches and the theoretical conceptions about the nutritional process and requirements. These informations were organized in order to compose the history of the main concepts and experimental methods that defined the science of nutrition in the early XXth century. This history exhibits the way trailed by the researchers in this period and discusses their use of the scientific knowledge then available. In the limits of the above defined time period, this work provides a view from the rise of the early chemical conceptions (in a modern sense) about the animal nutritional processes to the determination of the laws that define the human energetic requirements and the acknowledgement that certain minerals, aminoacids and vitamins are nutricionally essencial.

The work ascertains that the development of nutrition science was historically conditioned by the chemical knowledge about the organic substances and by the chemical and biological knowledge about the metabolic processes. It also shows that the evolution of this science was liable to controversies, quarrels, attempts and errors, and many others difficulties during the aforesaid period. The conceptions and experimental methods just developed in chemistry and physiology were soon incorporated to nutritional researches. Sometimes, the prevailing conceptions provided an obstruction to the understanding of certain questions. This was particularly clear in the discovery of the vitamins, which was made more difficult by the success of the germ theory of diseases, by the absolute faith in the available methods of chemical analysis and by the knowledge then accepted about nutritional requirements.

The work also shows that in the early XXth century the science of nu-

trition was already endowed with its theoretical and experimental basis, and with its own experimental methods. These methods – feeding experiments and balance experiments – were already outlined in the early XIXth century, but during that century they incorporated the growing knowledge about chemistry, physiology and nutrition, acquiring their final form after an evolution that lasted for a whole century.

INTRODUÇÃO

O estudo do conhecimento científico atual sobre o processo e as necessidades nutricionais humanas certamente não dá idéia do longo e tortuoso caminho percorrido pelos pesquisadores envolvidos com o fenômeno nutricional, até que se chegasse aos métodos e conceitos hoje amplamente aceitos. Muitas vezes, num certo sentido, fica difícil imaginar como se chegou a determinadas conclusões que constituem a base atual da ciência da nutrição. De modo geral, o conhecimento do pesquisador em nutrição – assim como em outras ciências – sobre o desenvolvimento histórico de sua disciplina limita-se a alguns nomes de cientistas que realizaram descobertas importantes em sua área e às datas dessas descobertas. Assim, é comum a visão de que o desenvolvimento científico se dá numa sequência linear de aperfeiçoamentos e aprofundamentos, na qual os grandes passos são dados por “gênios”. São esquecidas as inúmeras dificuldades enfrentadas, as controvérsias, as tentativas que não deram certo, os erros que não foram percebidos durante anos. Esquece-se também que houve teorias amplamente aceitas – algumas das quais, inclusive, contribuíram para o avanço da ciência em sua época – e que depois foram derrubadas. Da mesma forma, fica diluída a genialidade de outras descobertas, que ficaria evidente se fossem contrapostas ao conhecimento científico de sua época. A importância do estudo da história de uma disciplina científica – no caso, a ciência da nutrição – está, justamente, em possibilitar ao pesquisador conhecer as origens dos métodos que utiliza e dos conceitos que considera válidos. Pois as hipóteses, os argumentos, as discussões, os resultados experimentais, etc, que definem suas origens, tornam mais clara a compreensão de seus fundamentos. Além disso, o conhecimento histórico contribui para que o pesquisador atual desenvolva uma visão crítica com relação às pesquisas em sua área, à medida que o torna consciente dos erros e acertos cometidos no passado. No mesmo sentido, evidencia-se a importância desse conhecimento para o ensino da ciência da nutrição: através da evolução histórica dos métodos e conceitos fundamentais dessa ciência fica mais fácil compreender e assimilar o conhecimento atual.

Através de um levantamento bibliográfico preliminar – cujo objetivo era obter informações para desenvolver o projeto de pesquisa desta dissertação – com base em obras descritivas sobre a história das ciências em geral, foi

possível perceber que a história da nutrição é, ainda, um campo bastante inexplorado da história da ciência. Essas obras traziam pouquíssimas informações sobre o conhecimento em nutrição. Alguns artigos e livros mais específicos localizados sobre o assunto também evidenciaram a escassez de estudos históricos a esse respeito, o que reforçou a idéia de se realizar uma pesquisa abrangente sobre a história da nutrição. Levando-se em conta o fato de que o conhecimento nutricional esteve associado historicamente ao desenvolvimento de outras ciências, foi definido como objetivo deste trabalho o estudo do desenvolvimento histórico do conhecimento científico sobre a nutrição em suas relações com o de outras ciências, particularmente da química e da fisiologia. O período a ser estudado foi estabelecido com base nesse objetivo: como ponto inicial, o final do século XVIII, que marca o início da química moderna e, num certo sentido, o surgimento da fisiologia enquanto ciência independente; como limite final no tempo, o início do século XX, quando se dá o estabelecimento do conceito de vitaminas, que marca a última grande reviravolta nos conceitos sobre a nutrição. Ficou, assim, definido o que o estudo iria focalizar, principalmente: as relações entre o surgimento da ciência da nutrição e o desenvolvimento da química e da fisiologia, ao longo do período considerado. Isso guiou a seleção de obras a serem estudadas, assim como a análise dessas obras. Por outro lado, ficou também definido o que o estudo *não* iria abordar. Foi deixado de lado o período anterior ao século XVIII, assim como a própria experiência humana acumulada anteriormente – e as crenças – com relação à nutrição. É possível que concepções antigas ou desenvolvidas fora dos laboratórios de pesquisa tenham contribuído para o desenvolvimento do conhecimento científico sobre nutrição. Entretanto, pode-se dizer que sua influência não foi decisiva nesse sentido, já que o caminho percorrido pelos pesquisadores pode ser acompanhado de forma compreensível¹. O problema da institucionalização da nutrição enquanto disciplina também não foi estudado, justamente porque implica em focalizar os aspectos sociológicos da estruturação da comunidade de pesquisadores em nutrição – o que requeria outro tipo de bibliografia e fugia ao objetivo do presente estudo². Pelo mesmo

¹O capítulo 13 do livro de McCollum (1957) sobre história da nutrição, por exemplo, traz informações sobre a história das dietas e crenças não científicas sobre nutrição.

²O livro "From Medical Chemistry to Biochemistry – the making of a biomedical discipline", de Robert E. Kohler, exemplifica esse tipo de estudo: discute o surgimento

motivo, os aspectos sociais, políticos e econômicos que possam ter influído no desenvolvimento da ciência da nutrição não foram pesquisados. Cabe notar que cada uma destas questões poderia dar origem a outras pesquisas históricas sobre essa ciência, certamente interessantes.

Definidos o objetivo e o período a ser estudado, o primeiro passo foi, então, consultar os periódicos de referência bibliográfica relevantes em história da ciência: a "Critical bibliography" da ISIS e o "Bulletin Signalétique". Localizados os primeiros artigos e livros que abordavam aspectos da história da nutrição, as referências neles contidas foram também procuradas. E assim, sucessivamente, procurou-se garantir que todo o material disponível sobre o assunto fosse levantado. Cabe notar que vários dos artigos e livros não foram localizados nas bibliotecas nacionais e destes, alguns puderam ser adquiridos do exterior através do COMUT e da Biblioteca e Arquivo de Documentação em História da Ciência da UNICAMP. Do material localizado, apenas um livro, "A History of Nutrition", de E.V. McCollum, procurava fornecer uma visão geral sobre a história da nutrição – bastante abrangente mas, na maioria das vezes, superficial. Alguns livros e artigos sobre a história da bioquímica e da fisiologia continham informações importantes para este trabalho, em geral relativas à evolução do conhecimento sobre os processos metabólicos. Livros e artigos sobre a história da química também foram utilizados, pois em muitos pontos foi preciso obter detalhes sobre o conhecimento químico disponível na época. Cabe ressaltar aqui a importância do livro "Claude Bernard and Animal Chemistry", de F.L.Holmes, para a realização deste trabalho, por apresentar descrições e análises históricas profundas sobre diversos aspectos relativos à nutrição.

Assim, o presente estudo foi realizado com base na bibliografia histórica (fontes secundárias) disponível sobre o assunto, devido à amplitude do tema e à extensão do período considerado. A consulta aos próprios trabalhos científicos (fontes primárias) ficou restrita a poucos casos pois, dada a imensa quantidade destes, produzidos no período em questão, seria inviável recorrer sistematicamente a essas fontes. Além disso, é importante notar que a disponibilidade de trabalhos científicos anteriores ao século XX no Brasil é, ainda, bastante restrita. Desse modo, o estudo ficou sujeito às limitações

da bioquímica como disciplina institucionalizada e aborda os aspectos sociais da interação entre química e fisiologia no século XIX.

associadas ao uso quase exclusivo de fontes secundárias: as informações obtidas ficaram restritas ao que já foi levantado e relatado através de pesquisas históricas sobre a ciência da nutrição. Isso implicou, muitas vezes, na falta de determinadas informações específicas importantes – por exemplo, detalhes da metodologia empregada em certas pesquisas em nutrição. Outras vezes, as informações obtidas derivavam de um único historiador, estando sujeitas, portanto, à sua seleção e compreensão dos fatos. Além disso, a extensão e a profundidade das informações disponíveis variou muito: em alguns casos foi possível acompanhar a sequência de raciocínio e experimentos de um cientista, em outros só foi possível obter informações superficiais (quase nada além de nomes e datas). Em compensação, a utilização de fontes secundárias tornou possível trabalhar com a ciência da nutrição como um todo e com um período bastante extenso, e estabelecer uma visão geral sobre o desenvolvimento dessa ciência.

Desse modo, o trabalho como um todo refere-se à evolução das idéias sobre o processo e as necessidades nutricionais do organismo animal, sempre relacionando-as ao conhecimento disponível sobre a constituição química desse organismo e de seus alimentos e sobre a fisiologia animal. A primeira parte (capítulo 1), define o estado do conhecimento fisiológico sobre os processos relativos à nutrição a partir de meados do século XVIII, evidenciando-se como a visão química sobre as substâncias orgânicas (introduzidas principalmente por Lavoisier) se refletiu nas concepções sobre o fenômeno nutricional datadas do final desse século. Os capítulos 2 e 3 descrevem respectivamente a evolução do conhecimento químico sobre os constituintes dos tecidos e fluidos animais e do conhecimento fisiológico sobre a digestão durante a primeira metade do século XIX, com ênfase na crescente interação entre fisiologia e química. Com base no que foi apresentado nesses capítulos, são relatadas as concepções e as formas químicas de abordagem do processo nutricional desenvolvidas ao longo da primeira metade do século XIX (capítulo 4). No mesmo sentido, o capítulo 5 procura estabelecer a origem da avaliação biológica dos alimentos, associando-a às tentativas de determinar o valor nutricional da gelatina, condicionadas pelo conhecimento químico, fisiológico e nutricional disponível. São descritos, então, o debate, as controvérsias e as pesquisas que acabaram evidenciando e demonstrando a capacidade biossintética do organismo animal, cujo re-

conhecimento alterou sensivelmente a visão predominante sobre o processo de nutrição (capítulo 6). Já o capítulo 7 procura descrever a evolução do conhecimento sobre o metabolismo energético – no que se refere ao conhecimento sobre o processo e as necessidades nutricionais – e o estabelecimento dos princípios da calorimetria moderna, ao longo da segunda metade do século XIX e no início do século XX.

Os capítulos 8, 9 e 10 tratam basicamente do reconhecimento da essencialidade de determinados nutrientes. O capítulo 8 relata as pesquisas que levaram ao estabelecimento da necessidade nutricional de elementos minerais – no caso, dos macroelementos. O capítulo 9 descreve os diversos estudos sobre a digestão, a constituição química e o valor nutricional das proteínas, realizados na segunda metade do século XIX e em princípios do XX, que culminaram na constatação de que esses nutrientes forneciam ao organismo animal aminoácidos nutricionalmente essenciais. Por fim, o capítulo 10 acompanha a história do desenvolvimento do conceito de vitaminas, que derivou de pesquisas sobre as necessidades nutricionais e sobre doenças como o beribéri e o escorbuto (depois reconhecidas como doenças de deficiência nutricional) e que significou uma reviravolta no conhecimento científico sobre nutrição.

Assim, dentro dos limites cronológicos definidos para o presente trabalho, foi acompanhado o desenvolvimento das pesquisas nutricionais até o estabelecimento das leis que determinam os requerimentos energéticos do organismo animal e o reconhecimento da essencialidade nutricional de minerais, aminoácidos e vitaminas. Nesse sentido, cabe ressaltar que no início do século XX, paralelamente ao que será relatado, os aspectos bioquímicos dos processos nutricionais já estavam sendo investigados a nível celular e com base em teorias enzimáticas sobre o metabolismo. Entretanto, por se situarem além dos limites definidos anteriormente, essas pesquisas não foram incluídas neste trabalho.

CAPÍTULO 1

FINAL DO SÉCULO XVIII: ESTADO DA FISIOLOGIA E DA QUÍMICA COM RELAÇÃO AO CONHECIMENTO SOBRE NUTRIÇÃO

1.1 FISIOLOGIA E NUTRIÇÃO

Em meados do século XVIII o fenômeno da nutrição animal era definido como um conjunto de processos responsável pela reposição dos materiais corpóreos gastos continuamente na realização das ações vitais, assim como pelo acréscimo de matéria característico do crescimento (DIDEROT e D'ALEMBERT 1757). Segundo Holmes (1975, p. 136) o termo “nutrição” freqüentemente incluía os processos considerados preparatórios, como mastigação, digestão, quilificação¹, absorção e formação de sangue (sanguificação), e os processos de decomposição e eliminação dos materiais gastos.

Até o final do século XVIII, o fenômeno nutricional era, de modo geral, objeto de estudo da fisiologia e, portanto, dos fisiologistas. A fisiologia, por sua vez, encontrava-se ligada e subordinada à anatomia – que na época já era bastante desenvolvida – e ambas eram consideradas “unidade inseparável”, com base na associação entre estrutura e função (SCHILLER 1968, p. 64). Essa ligação definia, inclusive, a forma de abordagem dos fenômenos fisiológicos: a função de um órgão era deduzida a partir da observação anatômica de sua estrutura e localização no organismo. Inversamente, a constatação de um processo fisiológico era seguida da procura da estrutura anatômica que o tinha como função (SCHILLER 1968). Assim, em geral, o conhecimento fisiológico se restringia à descrição da “rede anatômica” que comportava os processos.

Mas os processos metabólicos, em particular, não eram acessíveis à abordagem anatômica e várias explicações diferentes sobre o fenômeno nutricional

¹Segundo as definições da “Enciclopédia” de Diderot e D'Alembert, o produto da digestão que saía do estômago já era denominado “quilo”, mas ainda sofreria modificações no intestino ao se misturar com a bile e com o suco pancreático (quilificação propriamente dita) antes de ser absorvido. Depois de entrar na corrente sanguínea, ele se transformaria em sangue.

onal coexistiam (HOLMES 1975) baseadas em hipóteses ou analogias que não podiam ser testadas experimentalmente e, portanto, não podiam ser confirmadas ou refutadas. Assim, por exemplo, Xavier Bichat (1771-1802), considerado um dos principais fisiologistas da época, procurava explicar processos como absorção e assimilação de nutrientes com base no conceito de "sensibilidade orgânica", bastante difundido na época. Devido a essa propriedade, cada "fibra" do organismo animal selecionava as substâncias que estivessem ao seu redor e "sugava" as que lhe fossem adequadas através de mudanças no seu estado de "contratibilidade orgânica sensível" (GROSS 1979, p.236). Outro fisiologista importante, Albrecht von Haller (1708-1777), considerava que o processo de nutrição era um fenômeno físico governado por leis mecânicas (GUGGENHEIM 1986). Segundo von Haller, as partes sólidas do organismo animal eram desgastadas mecanicamente e de forma contínua devido à expansão dos músculos uns contra os outros, originando espaços vazios na estrutura corpórea. Através do processo nutricional esses espaços seriam preenchidos, pela deposição de partículas "gelatinosas" ou "terrosas" trazidas pelos fluidos nutritivos que percorriam o organismo (HOLMES 1975, p. 137).

Por outro lado, o processo de digestão dos alimentos, enquanto função do estômago, chegou a ser estudado de forma mais direta, experimentalmente, durante a segunda metade do século XVIII, principalmente através das pesquisas pioneiras do francês René Antoine Ferchault de Réaumur (1683-1757), depois estendidas pelo naturalista italiano Lazzaro Spallanzani (1729-1799). Em meados do século, hipóteses diversas disputavam a explicação do processo digestivo: uma delas supunha que a digestão consistia numa ação mecânica de trituração dos alimentos, originando partículas cada vez menores; outras consideravam que na digestão os alimentos eram dissolvidos quimicamente. Mas havia também divergência sobre se o agente responsável pela dissolução era um fermento, um solvente específico ou, ainda, se o processo era putrefativo. Com o objetivo de obter informações que definissem qual explicação era correta, Réaumur realizou uma série de experimentos importantes com búbios, pássaros que regurgitam as partes indigeríveis de seus alimentos.

Assim, para observar o que acontecia com os alimentos no interior do estômago, Réaumur forçou um búbio a engolir um pequeno tubo de metal que continha um pedaço de carne e cujas extremidades eram fechadas com

rede de arame fino. Quando o pássaro regurgitou o tubo, verificou que só restava uma parte do pedaço de carne original, a qual estava mole e cinzenta. Repetiu o experimento com pedaços de osso dentro do tubo e observou que estes também eram reduzidos e amaciados. Além disso, notou que os tubos regurgitados continham um pouco de um líquido amarelado e amargo². Procurou, então, obter uma quantidade maior desse líquido, para estudá-lo melhor e para isso repetiu o experimento com um pedaço de esponja dentro do tubo. A partir do líquido coletado constatou, através de papel de tornassol, que o fluido era ácido. Em seguida, para verificar se o poder de dissolver carne se mantinha fora do estômago, Réaumur colocou num recipiente o fluido e um pedaço de carne; para comparação, preparou outro recipiente com carne e água. Procurou manter os recipientes em temperatura próxima à do organismo e após 24 horas verificou que apenas uma pequena parte da carne tinha sido dissolvida pelo fluido, o que atribuiu à pequena quantidade de fluido. Por outro lado, observou que a carne imersa em água estava em processo de putrefação, ao contrário da carne submetida à ação do fluido, descartando a visão de que o processo digestivo era um tipo de putrefação (McCOLLUM 1957, p. 64; HOLMES 1974, p. 142). Mais tarde, Réaumur procurou estender suas pesquisas, usando cães nos experimentos. Nesse caso, para obter amostras dos alimentos já digeridos e poder verificar o que havia acontecido, sacrificava os animais logo após o período de digestão.

Antes de Réaumur ninguém havia abordado um processo metabólico de forma tão direta e engenhosa. Nesse sentido, segundo Holmes (1974, p.142), mais importante que os resultados dos experimentos de Réaumur foram suas contribuições com relação à metodologia de abordagem do processo digestivo de introduzir procedimentos para obtenção de alimentos já submetidos à digestão e para obtenção do próprio suco gástrico. E foi o primeiro a procurar realizar o processo digestivo fora do corpo animal, como forma de torná-lo mais acessível. Além disso, realizou as primeiras análises – da forma que era possível – do suco gástrico.

Vários anos mais tarde, Spallanzani seguiu os procedimentos metodológicos de Réaumur, aperfeiçoando-os; e estendeu seus experimentos

²Holmes (1974, p. 142) observa que a classificação do sabor era parte importante da análise química da época.

a vários tipos de animais e inclusive a si mesmo, sempre demonstrando a ação dissolvedora do suco gástrico (HOLMES 1974). Spallanzani usou tubos perfurados, que permitiam um contato maior entre o alimento e o suco digestivo. E repetiu a tentativa de Réaumur de realizar a digestão fora do organismo animal, dessa vez usando maior quantidade de suco gástrico e testando várias condições de temperatura. Obteve resultados positivos, que confirmavam a visão de que a digestão envolvia a dissolução química dos alimentos, e que não era um tipo de putrefação nem de fermentação (McCOLLUM 1957, p. 65; HOLMES 1974, p.143). Spallanzani também realizou análises químicas do suco gástrico, reagindo amostras desse suco com uma base forte e com ácidos minerais e ainda colocando-o em contato com coral (pois se sabia que ácidos tinham capacidade de dissolver esse material). Seus resultados o levaram a concluir que o suco gástrico era neutro, pois não se comportara nem como ácido nem como base. Isso não estava de acordo com análises anteriores, inclusive as de Réaumur, nas quais os resultados indicavam que esse suco era ácido. O próprio Spallanzani havia observado que o suco gástrico coalhava o leite da mesma forma que ácidos. Além disso, a quantidade e as propriedades do suco gástrico variavam conforme as condições através das quais era coletado, pois o suco obtido de animais em jejum era menos viscoso e mais transparente do que o obtido de estômago contendo alimento. Concluiu, então, que havia um princípio ácido no suco gástrico cuja presença dependia da qualidade do alimento no estômago (HOLMES 1974, p. 144).

As demonstrações de Spallanzani da ação dissolvedora que o suco gástrico exerce sobre os alimentos pareciam deixar claro que essa ação ocorre. Mas muitos fisiologistas continuaram a duvidar, ainda defendendo a teoria de que a digestão é um tipo de fermentação, ou acreditando que não envolve ação química, ou simplesmente duvidando que o suco gástrico fosse o agente da digestão. Essas dúvidas se mantiveram nos cinquenta anos seguintes (HOLMES 1974) e a abordagem de Réaumur e Spallanzani só seria retomada na segunda década do século XIX.

Havia ainda muita resistência, por parte dos fisiologistas, com relação à idéias a respeito da natureza química dos processos fisiológicos. A maioria dos que estudavam esses processos defendia explicações que remetiam à existência de uma força vital como causa dos fenômenos que ocorriam nos organismos vivos, ou a propriedades hipotéticas como as de "sensibilidade"

e “contratibilidade” orgânicas, ou se limitavam, como já foi dito, à descrição anatômica das estruturas onde esses processos ocorriam. Os que estudavam o fenômeno nutricional procuravam explicá-lo, em geral, sem recorrer a idéias sobre transformações químicas e mesmo os que consideravam a nutrição como um processo químico se limitavam a descrevê-los vagamente, de forma especulativa (HOLMES 1963, p. 54-5). Ainda no final do século XVIII, algumas descobertas e contribuições importantes levariam gradualmente à mudança desse quadro, abrindo caminho para a aproximação da fisiologia e da química.

1.2 CONTRIBUIÇÕES DE LAVOISIER

Em seus estudos e pesquisas sobre combustão, respiração e calor animal, Antoine-Laurent de Lavoisier (1743-1794) introduziu procedimentos, apresentou resultados e chegou a conclusões que deram impulso decisivo à concepção de que os processos relacionados à nutrição eram químicos.

No final da década de 1770, a partir de resultados experimentais, Lavoisier concluiu que a respiração era uma forma lenta de combustão, na qual o “ar vital” (oxigênio) inspirado era convertido em “ar fixo” (dióxido de carbono) com liberação de calor. Partindo dessa constatação, Lavoisier supôs que esse processo químico era a fonte de todo ou, pelo menos, da maior parte do calor animal³. Junto com Pierre-Simon de Laplace (1749-1827), procurou verificar experimentalmente se o calor produzido na combustão respiratória (calculado a partir do calor de combustão de carvão e da quantidade de gás carbônico expirado) equivalia ao calor liberado pelo organismo animal, medido num calorímetro a gelo por eles desenvolvido (LAVOISIER & LAPLACE, 1780). Os experimentos foram realizados com porquinhos da Índia. Os resultados indicaram que o calor determinado no calorímetro era um pouco maior (cerca de 20%) que o liberado na respiração, mas a diferença podia ser atribuída a imprecisões e erros experimentais. Por exemplo, ao fato de que a temperatura das extremidades do animal havia abaixado durante o experimento e de que as determinações do calor e dos gases respirados não haviam sido feitas simultaneamente, nem com o mesmo

³Cabe notar que durante o século XVIII havia predominado a concepção de que o atrito do sangue nas artérias ou nos capilares durante a circulação dava origem ao calor animal (MENDELSON 1964, p. 75).

animal. De qualquer forma, os resultados obtidos permitiam concluir que a respiração era, de longe, a principal fonte do calor animal.

Mais tarde, em 1785, Lavoisier reconsiderou essa conclusão. Através de novos experimentos verificou que a quantidade de oxigênio consumida na respiração era maior que a quantidade equivalente ao dióxido de carbono formado. Com base nesse resultado, considerou que o excedente de calor observado nos experimentos de 1780 não devia ser totalmente atribuído a erros experimentais, mas à combinação de oxigênio e hidrogênio, que resultava na formação de água. Assim, concluiu que na respiração ocorria a combustão de carbono e de hidrogênio, com liberação de gás carbônico e vapor d'água (HOLMES 1963; HOLMES 1964).

Os experimentos de Lavoisier e Laplace baseavam-se numa suposição que, muitos anos depois, seria derrubada. Eles consideravam que o calor de combustão do carbono e hidrogênio separados (o que eles determinavam) era igual ao calor de combustão de um composto que os contivesse proporcionalmente. Por outro lado, sua conclusão era coerente e embasada pelos dados experimentais apresentados. Nesse sentido, ao mostrar, com base experimental, que uma combinação química entre elementos era a base de um processo fisiológico, Lavoisier abriu caminho para idéias sobre os aspectos químicos de todos os fenômenos fisiológicos.

Paralelamente, Lavoisier estendeu o método de análise elementar de substâncias inorgânicas – que consistia na combustão da amostra em oxigênio, seguida da captura e determinação dos compostos gasosos de oxigênio que eram liberados – à análise de substâncias orgânicas. Ao verificar que na combustão de óleos, álcool e outros materiais vegetais sempre ocorria a formação de gás carbônico e de vapor d'água e considerando que estes eram óxidos, respectivamente, de carbono e hidrogênio, concluiu que esses elementos estavam presentes nas substâncias orgânicas analisadas e que, durante a combustão, se combinavam com o oxigênio. Depois, concluiu que o oxigênio também era um elemento constituinte da matéria orgânica e que sua composição incluía, invariavelmente, esses três elementos (HOLMES 1963; HOLMES 1987; FLORKIN 1974). Desse modo, Lavoisier mostrou, em 1784, que a matéria animal e vegetal era composta principalmente por carbono, hidrogênio e oxigênio, elementos também pre-

sentes na matéria inorgânica⁴. Os procedimentos para a análise elementar de substâncias orgânicas introduzidos por Lavoisier foram depois utilizados amplamente e muitos químicos se dedicaram a aperfeiçoá-los nas primeiras décadas do século XIX. Por outro lado, sua concepção sobre a composição elementar dessas substâncias foram fundamentais para o desenvolvimento de concepções químicas sobre os processos metabólicos do organismo animal, particularmente sobre o processo de nutrição, como será visto na próxima seção.

No final da década de 1780, Lavoisier realizou novos experimentos sobre a respiração animal, junto com Armand Seguin (1767-1835), que também se submeteu às determinações experimentais. Procuraram verificar o efeito sobre a respiração humana de uma redução na temperatura ambiente, do processo de digestão e da realização de trabalho muscular, comparando o consumo de oxigênio nessas situações com o consumo determinado em condições de jejum, repouso e sob temperatura de 26°C. Desse modo constataram que uma menor temperatura ambiente (12°C), a digestão e a realização de trabalho determinavam um aumento no número de inspirações e no consumo de oxigênio. A combinação desses fatores – por exemplo, digestão mais trabalho muscular – resultava num consumo de oxigênio ainda maior. Com base nesses resultados e considerando que o oxigênio e o carbono a serem oxidados na respiração viriam do sangue e deveriam ser repostos pelos alimentos para que a composição do sangue se mantivesse constante, concluíram que o organismo animal contava com um sistema de regulação fisiológica que determinava uma proporcionalidade entre processos fisiológicos. Assim, a partir de uma visão química da fisiologia animal, processos antes considerados distintos e independentes foram interrelacionados por Lavoisier e Seguin: respiração, transpiração, nutrição e produção de calor e trabalho muscular. O processo nutricional, responsável pela reposição dos elementos utilizados na respiração deveria, portanto, ser proporcional à respiração. Esta, por sua vez, deveria acompanhar a necessidade de produção de calor para manutenção da temperatura corpórea. A realização de trabalho muscular, de acordo com os resultados experimentais, também determinava um aumento na taxa respiratória, com um

⁴Em meados do século XVIII havia pesquisadores importantes – por exemplo G. Buffon – que consideravam que a matéria orgânica era totalmente distinta da inorgânica. Através de suas análises, Lavoisier mostrou que isso não era verdade.

aumento proporcional na produção de calor. Nesse caso, a transpiração aumentaria, para manter constante a temperatura do organismo. Esses resultados e conclusões foram apresentados à Academia Francesa de Ciências em 1789, sob o título: "Premier Mémoire sur la respiration des animaux" (LAVOISIER & SEGUIN 1789; HOLMES 1963, p. 60-1; HOLMES 1964, p. 45).

Através da associação das trocas gasosas respiratórias à produção de calor animal, ao trabalho muscular e à ingestão de alimentos, Lavoisier forneceu a base para as pesquisas em calorimetria realizadas no decorrer do século XIX. Nesse sentido, os experimentos realizados com Laplace e com Seguin foram modelo, em seus princípios, para essas pesquisas.

Por outro lado, a idéia de determinar qualitativa e quantitativamente as substâncias que entravam e saíam do organismo animal através da respiração, associada ao conhecimento sobre a composição elementar de substâncias orgânicas, foi base para o desenvolvimento de métodos de "input-output" no século seguinte, que incluíam também a entrada de elementos através da alimentação e a saída através de secreções e excreções. Segundo Holmes (1987), Lavoisier e Seguin chegaram a planejar, em 1790, a realização de experimentos para estabelecer o balanço global de elementos do organismo animal, considerando a entrada dos gases inspirados e de alimentos e bebidas e as perdas através da expiração, transpiração e excreção. Mas, devido aos acontecimentos ligados à Revolução Francesa, nenhum progresso nesse sentido foi conseguido por eles.

1.3 O CONHECIMENTO QUÍMICO SOBRE AS SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS

No final do século XVIII o conhecimento químico sobre os materiais que constituíam os organismos vivos era ainda bastante vago. Durante o século XVII e na maior parte do século XVIII o principal procedimento para a análise química da matéria orgânica era a destilação. Através desse procedimento os químicos procuravam separar os constituintes da matéria animal e vegetal e "em geral obtinham uma sucessão de líquidos que caracterizavam como volátil, mucoso, salgado, ácido, alcalino ou oleoso e um resíduo sólido" (HOLMES 1963, p. 52). Mas, dependendo das condições de destilação, os produtos de decomposição a partir de um mesmo mate-

rial eram diversos em suas propriedades características. Ao mesmo tempo, os produtos obtidos a partir de materiais bastante diversos muitas vezes eram bastante similares. Assim, ficava difícil distinguir quimicamente os diferentes materiais orgânicos e seus constituintes, e as limitações desses procedimentos de análise tornavam-se mais e mais evidentes. Nesse sentido, diversos químicos dedicaram-se ao desenvolvimento de métodos de análise mais brandos, que possibilitassem a separação dos constituintes da matéria orgânica e, ao mesmo tempo, evitassem a destruição desses constituintes e a alteração de suas propriedades, que atribuíam à ação do fogo.

No início do século XVIII, Guillaume-François Rouelle (1703-1770) introduziu a extração por solventes (a princípio água e álcool) como procedimento para separação dos constituintes da matéria vegetal e passou a classificá-los com base em suas características de solubilidade (HOLMES 1974, p. 145). Ao longo do século XVIII o método de extração por solvente foi adquirindo importância na análise química da matéria orgânica e sua utilização possibilitou o isolamento e a caracterização de diversas substâncias orgânicas antes desconhecidas (HOLMES 1963, p. 53). Enquanto isso, a destilação seca continuou a ser utilizada na caracterização dos constituintes isolados. Iacopo Bartolomeo Beccari (1682-1766), por exemplo, em 1728, separou dois constituintes da farinha de trigo, um solúvel em água e outro insolúvel. O constituinte hidrossolúvel foi identificado como sendo amido, já considerado uma substância típica de vegetais. Beccari verificou que o constituinte insolúvel, que denominou "glúten", putrefazia ao invés de fermentar – ao contrário da matéria vegetal em geral – e que, quando submetido à destilação, produzia "álcali volátil" (amônia). Considerou, então, que o glúten era similar às substâncias gelatinosas derivadas de tecidos e fluidos de origem animal, conhecidas como "substâncias animais" (HOLMES 1974, p. 146; GLAS 1979, p. 18). No decorrer do século, outras "substâncias animais" foram isoladas a partir de vegetais através da extração por solvente, mas até o final do século ainda não havia critérios químicos que possibilitassem uma distinção clara entre essas substâncias.

O fato dos tecidos e fluidos animais darem origem a substâncias gelatinosas foi considerado evidência de que o valor nutricional de um alimento estava associado ao seu conteúdo de substâncias dessa natureza. Nesse sentido, a gelatina extraída através da cocção das partes sólidas de um animal chegou a ser considerada como "a substância nutriente básica a partir da

qual os tecidos corpóreos são formados" (HOLMES 1974, p. 6).

Já na década de 1780, Carl Wilhelm Scheele (1742-1786) e Claude Louis Berthollet (1748-1822) introduziram na análise de substâncias orgânicas testes antes utilizados para identificação de ácidos, bases e sais: reação com ácidos, bases e metais conhecidos. Submetendo glúten e substâncias derivadas da matéria animal a esses testes identificaram, independentemente, outras características comum a essas substâncias. Em 1785, Antoine F. de Fourcroy (1755-1809) reuniu todos esses procedimentos para comparação de diversas substâncias animais: fibra muscular, gelatina, albumina do sangue e de ovo e fibrina de sangue (que na época ele chamava de "glúten"). Desse modo, distinguiu-as com base em seus produtos de destilação, características de solubilidade e reações com ácidos e álcalis. Por exemplo, verificou que a albumina era solúvel em água e álcali, coagulava quando aquecida e quando em álcool ou solução ácida resultava em relativamente pouco álcali volátil. Já a fibrina era insolúvel em água, álcool e álcali, solúvel em ácido e liberava bastante álcali volátil quando submetida à destilação (HOLMES 1974, p. 146-7).

Por outro lado, a composição química das substâncias orgânicas continuava desconhecida e a caracterização baseada nos produtos de destilação e propriedades de solubilidade não possibilitava a identificação precisa das diversas substâncias conhecidas e dava margem a classificações contraditórias. Assim, sem conseguir relacionar de forma consistente a composição dessas substâncias, ficava também difícil para os químicos explicar a transformação de uma substância em outra (HOLMES 1963, p. 54). Para o avanço desse conhecimento, foram importantes as descobertas sobre a composição elementar das substâncias orgânicas, por Lavoisier e Berthollet, também na década de 1780.

À descoberta, por Lavoisier, de que a matéria orgânica era composta basicamente por carbono, hidrogênio e oxigênio, somou-se a determinação da presença regular de um quarto elemento, o nitrogênio, na matéria animal. Entre 1780 e 1786, Berthollet analisou diversas "substâncias animais" com o objetivo de identificar constituintes que as diferenciasses de substâncias vegetais. Tratando-as com ácido nítrico e coletando e identificando os produtos gasosos resultantes dessa reação, constatou que o nitrogênio sempre estava presente entre esses produtos. Sabia que na destilação dessas substâncias ocorria liberação de álcali volátil (amônia), que era composto,

segundo seus próprios resultados, por nitrogênio e hidrogênio. Desse modo, concluiu que o nitrogênio era um elemento constituinte da matéria animal e, durante a destilação, se combinava com o hidrogênio também presente, formando amônia (HOLMES 1963, p. 55-6; GLAS 1979, p. 18; GLAS 1975, p. 290). Pouco depois, em 1789, Fourcroy aplicou o método de Berthollet às substâncias animais que havia isolado e caracterizado e chegou a distingui-las com base na proporção de nitrogênio que cada uma continha. No mesmo ano, Lavoisier também identificou o nitrogênio como constituinte da matéria animal e verificou que enxofre e fósforo também podiam estar presentes (LAVOISIER 1789). A partir dos resultados de Berthollet, Fourcroy e Lavoisier o nitrogênio passou a ser considerado como elemento característico de substâncias animais.

O método de análise elementar introduzido por Lavoisier e o procedimento de Berthollet para determinação de nitrogênio foram aplicadas pelos químicos à análise da matéria orgânica. Embora já fosse possível separar alguns constituintes da matéria orgânica através de extração por solvente, de modo geral as análises eram realizadas com os materiais brutos: submetia-se sangue, tecido muscular, cera, leite, etc., aos procedimentos de análise. Procurou-se distinguir e caracterizar os diferentes materiais pelas proporções de seus elementos constituintes. Os resultados não eram quantitativamente precisos e se referiam à composição dos materiais como um todo, mas tornaram possível verificar que os alimentos, os tecidos e fluidos vegetais e animais, os gases envolvidos na respiração e a própria matéria inanimada eram constituídos pelos mesmos elementos químicos. A análise elementar mostrou também que a proporção dos elementos numa substância estava relacionada às suas propriedades físicas e químicas. Com base nisso, Lavoisier propôs uma classificação das substâncias orgânicas de acordo com sua composição elementar. Gorduras e óleos, por exemplo, eram compostos basicamente por carbono e hidrogênio; gomas, açúcares e amido continham também certa quantidade de oxigênio, etc. Berthollet também chegou a propor uma classificação, relacionando composição elementar e propriedades químicas (HOLMES 1963, p. 58).

Segundo Holmes (1963), a idéia de se caracterizar as diferentes substâncias orgânicas com base em sua composição elementar gerou idéias igualmente simples sobre as transformações químicas dessas substâncias. A alteração nas proporções dos elementos constituintes de uma substância, através da

adição, subtração ou recombinação desses elementos dava origem a outra substância. Na época ainda não havia a idéia de moléculas com estrutura definida e, assim, parecia não haver barreiras para a alteração dessas proporções. A interpretação dada por Lavoisier e Berthollet aos resultados de suas análises, considerando que durante os procedimentos experimentais ocorria uma recombinação dos elementos presentes nos materiais analisados, resultando nos produtos gasosos coletados, deu base para esse tipo de explicação. Nos anos seguintes, a concepção de reação química como adição, remoção e/ou recombinação de elementos ganhou espaço e importância entre os químicos (HOLMES 1963, p. 58).

Essa explicação logo foi estendida às transformações químicas que ocorriam nos organismos vivos. Lavoisier foi um dos primeiros a fazer isso. Em 1786, propôs que a formação dos tecidos vegetais era um processo químico inverso ao que ocorria na decomposição desses tecidos através da combustão: o carbono do gás carbônico se combinava com o hidrogênio da água e formava os óleos e as resinas características desses tecidos, enquanto o oxigênio era liberado para a atmosfera (HOLMES 1963, p. 59-60). A idéia de que a alimentação reporia ao sangue o carbono e hidrogênio perdidos através da respiração após se combinarem com o oxigênio inspirado, apresentada por Lavoisier e Seguin alguns anos depois, também partiu dessa concepção de reação química.

Assim, os resultados da análise elementar de substâncias orgânicas e as explicações para as transformações químicas dessas substâncias derivadas desse conhecimento deram base para o início das discussões sobre os aspectos químicos dos fenômenos fisiológicos, que se difundiram a partir do final do século XVIII. Em particular, impulsionaram o reconhecimento de que os processos relacionados à nutrição eram químicos⁵. Nesse sentido, na última década desse século, surgiram diversas propostas de explicação química para os processos nutricionais, baseadas no conhecimento disponível sobre a composição elementar das substâncias envolvidas nesses processos (HOLMES 1963; HOLMES 1964; FLORKIN 1974). Em geral, procurava-se explicar como os quatro principais elementos da matéria orgânica, carbono,

⁵Holmes (1975) ressalta que isso não foi suficiente para que o fenômeno nutricional passasse a ser abordado através de métodos químicos. Como exemplo, cita Cuvier, importante zoólogo francês, que apesar de reconhecer esse fenômeno como químico continuou a estudá-lo com base em anatomia comparada.

oxigênio, hidrogênio e nitrogênio eram fornecidos ao organismo animal e como eram retidos ou eliminados. Em outras palavras, procurava-se explicar “como a composição das substâncias dos tecidos corpóreos é mantida, através da adição e remoção de seus elementos constituintes, via alimentos, gases inspirados e expirados e excrementos” (HOLMES 1963, p. 76). Supunha-se portanto, de acordo com Lavoisier, que o objetivo dos processos nutricionais era o de manter balanceada a composição elementar do organismo animal.

Uma questão que intrigava os pesquisadores envolvidos com o fenômeno nutricional no final do século XVIII era a de como os alimentos vegetais, que continham menor proporção de nitrogênio, eram transformados em tecidos e fluidos animais, caracterizados por uma proporção muito maior desse elemento. Partindo dessa questão e dos resultados recentes da análise elementar, Fourcroy concluiu em 1789 que essa transformação consistia simplesmente na adição de nitrogênio à substância vegetal ingerida, nitrogênio esse que podia ser absorvido através da respiração (HOLMES 1963, p. 61; FLORKIN 1972, p. 119).

Jean Noel Hallé (1754-1822), médico parisiense, também procurou explicar quimicamente como os nutrientes vegetais eram “animalizados”, ou seja, convertidos em matéria animal, partindo dos resultados recentes da análise elementar. Hallé considerou que a proporção de nitrogênio dos alimentos vegetais seria aumentada gradualmente, através de três etapas sucessivas de adição desse elemento e remoção de carbono. A primeira etapa ocorreria nos intestinos, onde as secreções digestivas, que continham alta proporção de nitrogênio, forneceriam esse elemento aos nutrientes, enquanto parte de seu carbono se combinaria com o oxigênio, que viria de ar engolido ou da decomposição de água, sendo removido na forma de gás carbônico. Em seguida, já na forma de quilo – na época considerado como um estágio intermediário da transformação dos alimentos em sangue – os nutrientes seriam absorvidos, entrando na circulação. Ao passar pelos pulmões, a remoção de carbono do sangue resultaria num aumento da proporção de nitrogênio, que seria adicionado ao quilo. Algumas alterações ocorreriam também nos vasos linfáticos da pele (HOLMES 1963, p. 61; HOLMES 1964, p. 51-2; LEICESTER 1974, p. 142-3).

Hallé não procurou testar experimentalmente sua teoria da “animalização”, como ficou conhecida. Por outro lado, sua teoria era a primeira

que procurava descrever com detalhes os processos químicos da nutrição. Ela incorporava os resultados recentes da análise elementar e relacionava nutrição à respiração, como Lavoisier havia sugerido, de forma coerente com o conhecimento disponível na época. Provavelmente por isso, segundo Holmes (1963, 1964), suas idéias foram bastante influentes nos 20 anos seguintes à sua publicação, mesmo sem evidências diretas que as confirmassem. Depois foram perdendo a importância, pela própria falta de suporte experimental.

Até o final do século, outros pesquisadores também apresentaram suas idéias sobre as transformações das substâncias orgânicas do organismo animal, baseadas na composição elementar. Todas essas idéias, derivadas direta ou indiretamente dos trabalhos de Lavoisier, eram ainda bastante especulativas, como fica evidente pelo conteúdo da teoria da animalização, mesmo porque refletiam a limitação do conhecimento químico sobre essas substâncias. Refletiam também o estado do conhecimento fisiológico sobre nutrição, limitado, como foi dito, pela própria metodologia da época, que a mantinha restrita aos aspectos anatômicos. Por outro lado, representaram o início das interpretações químicas sobre os processos metabólicos e concretizaram a aproximação entre química e fisiologia, que seria crescente no século seguinte.

CAPÍTULO 2

AVANÇOS DO CONHECIMENTO QUÍMICO SOBRE AS SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS NA PRIMEIRA METADE DO SÉCULO XIX

2.1 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

No final do século XVIII e início do XIX, os químicos que se dedicavam ao estudo da matéria orgânica trabalharam no desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos para o isolamento e caracterização das substâncias presentes nos fluidos e tecidos animais e vegetais. Nesse sentido, os procedimentos de extração por solvente tiveram seu uso difundido entre os químicos e foram sendo aperfeiçoados sucessivamente. Da mesma forma, difundiu-se a idéia de se caracterizar e identificar as substâncias orgânicas isoladas através de suas propriedades físicas e químicas. Gradualmente, através do trabalho de diversos pesquisadores, foram sendo estabelecidos seqüências complexas e sistemáticas de procedimentos para a separação das substâncias de materiais orgânicos, seguida de identificação com base em características de solubilidade e seu comportamento químico frente a diversos reagentes. Esse tipo de análise possibilitou a descoberta de diversos compostos orgânicos antes desconhecidos e forneceu informações fundamentais para o conhecimento químico sobre os organismos vivos.

Os diversos testes aplicados às substâncias isoladas revelaram fatos químicos importantes. Em 1812, por exemplo, Gottlieb S. Kirchhoff (1764-1833), um químico russo, verificou que o amido era transformado em açúcar ao ser aquecido em solução de ácido sulfúrico. Pouco depois, em 1814, relatou outra forma de realizar essa conversão: adicionando glúten a uma solução aquosa de amido e mantendo essa mistura aquecida por algumas horas¹ (McCOLLUM 1957, p.11-2; HOLMES 1974, p. 153-4). Kirchhoff observou também que a solução de açúcar resultante podia fermentar, produzindo álcool. Desse modo, mostrou que na fermentação de soluções de amido (fato já conhecido há muito) não era este que fermentava,

¹ McCollum (1957, p. 11-2) observa que, provavelmente, o glúten preparado por Kirchhof e usado em seus experimentos devia conter diástase adsorvida.

mas o açúcar no qual havia se transformado. Depois disso a fermentação alcoólica passou a ser utilizada como teste para determinação da presença de açúcar (HOLMES 1974, p. 153-4).

A investigação das “substâncias animais” foi particularmente enfatizada no início do século XIX. Os critérios estabelecidos por Fourcroy no final do século anterior para a identificação de fibrina muscular, gelatina, albumina de ovo e do sangue, não se mostravam adequados para distinguir outras substâncias desse tipo. Surgiram dificuldades e dúvidas sobre como identificar claramente cada tipo de substância animal. Diversos químicos se dedicaram a resolver essa questão, partindo dos resultados anteriores de Fourcroy: Louis Nicolas Vauquelin, Louis Jacques Thenard, Alexander Marcet, John Bostock e, principalmente, Jöns Jacob Berzelius (1779-1848), além do próprio Fourcroy.

Em uma pesquisa sobre as substâncias constituintes de diversos fluidos e tecidos animais, publicada em 1813, Berzelius examinou de forma mais completa suas propriedades químicas e definiu novos critérios para sua diferenciação. Assim, por exemplo, verificou que a fibrina de sangue era insolúvel em água e que sofria alguma decomposição por ação do álcool e éter. Reagindo-a com ácido acético, muriático (clorídrico), sulfúrico e nítrico, concentrado e diluído, constatou que era insolúvel em todos quando concentrados e solúvel quando diluídos. Notou que o ácido nítrico provocava decomposição originando ácido málico e uma substância amarela. Verificou também que álcali cáustico dissolvia a fibrina e que a adição de ácido a precipitava novamente, com alguma modificação (HOLMES 1974, p. 148). Segundo Holmes (1974), a identificação de substâncias animais continuou sendo um problema pois o conjunto de propriedades que definia uma substância derivada de determinado material raramente se repetia para alguma substância de outra fonte. Restavam dúvidas sobre “se as diferenças observadas significavam que eram distintas, modificações de uma única substância ou substâncias impuras” (HOLMES 1974, p. 149). Nesse sentido, ao verificar as semelhanças entre fibrina, albumina e a “matéria corante” do sangue, Berzelius concluiu que podiam ser consideradas modificações de uma mesma substância e as denominou conjuntamente de “substâncias albuminosas”. Nas décadas seguintes, gradualmente, foram-se ampliando os procedimentos analíticos para a separação dessas substâncias e estabeleceu-se uma seqüência padrão de operações com essa finalidade.

Por outro lado, o conhecimento da constituição química das substâncias que estavam sendo isoladas dependia da determinação de sua composição elementar. Assim, paralelamente, diversos químicos se dedicavam a resolver problemas técnicos do método de análise elementar introduzido por Lavoisier (cuja base era a combustão das amostras em oxigênio) de forma a possibilitar determinações quantitativamente precisas. Os primeiros a ter sucesso nesse sentido foram Joseph Gay-Lussac (1778-1850) e Louis Jacques Thenard (1777-1857), que introduziram o uso de clorato de potássio, possibilitando a oxidação completa das amostras. Chegaram, assim, a um método que fornecia resultados quantitativos razoavelmente precisos (GLAS 1975, p. 290-1). Por outro lado, seu método, publicado em 1810, ainda era pouco prático e sua aplicação requeria muita habilidade e cuidado. Nos anos seguintes Berzelius conseguiu aperfeiçoar e simplificar bastante o método de Gay-Lussac e Thenard, possibilitando a determinação da composição elementar percentual de substâncias orgânicas com considerável precisão e a distinção entre essas substâncias a partir desses resultados (HOLMES 1963, p. 66). O método apresentado por Berzelius em 1812 ainda requeria grande habilidade, o que restringia sua aplicação, mas difundiu-se entre os químicos nos anos seguintes e foi muito utilizado. Através desse método, foram estabelecidas as composições elementares de diversos açúcares, ácidos graxos, albuminóides, entre outros.

Os resultados dessas análises possibilitaram o surgimento de classificações mais definidas e precisas das substâncias orgânicas com base na composição elementar. Assim, Gay-Lussac e Thenard estabeleceram que açúcares e substâncias relacionadas, como amido e gomas, continham hidrogênio e oxigênio nas mesmas proporções que a água. Definiram óleos e resinas como substâncias que continham hidrogênio em excesso em relação à proporção da água, enquanto que os ácidos vegetais continham oxigênio em excesso. Entre as "substâncias animais" conhecidas, fibrina, albumina, gelatina e caseína foram definidas como substâncias que liberavam hidrogênio, oxigênio e nitrogênio nas proporções necessárias para formar água e amônia (HOLMES 1963, p. 67). Havia exceções, mas essas classes permaneceram como uma forma útil de agrupar as substâncias orgânicas. À medida que foram surgindo novos resultados sobre composição elementar, essa classificação foi sendo modificada.

Enquanto isso, a teoria atômica de John Dalton (1766-1844), publicada

em 1808 e que introduziu à noção de átomo químico com peso fixo e característico (PARTINGTON 1951) foi se tornando amplamente aceita. A partir dessa teoria e do reconhecimento de que as substâncias orgânicas apresentavam uma estrutura molecular composta de átomos da mesma forma que as inorgânicas (embora mais complexa), já por volta de 1815, os químicos passaram a converter a composição percentual na análise elementar em fórmulas que indicavam o número relativo de átomos de cada elemento numa determinada substância (HOLMES 1963, p. 67-8). Essas idéias, associadas aos resultados mais precisos da análise elementar, reforçaram e tornaram mais claras as explicações químicas sobre a conversão de um composto orgânico em outro.

Mais tarde, já na década de 1820, Justus von Liebig (1803-1873), químico alemão que estava no início de sua carreira, dedicou-se a aperfeiçoar e simplificar o método de análise elementar que aprendera com Gay-Lussac. Em 1831, depois de seis anos de trabalho, chegou a um procedimento mais simples, rápido e preciso (FRUTON 1972, p. 93). Segundo Holmes (1963, p. 73) sua principal inovação foi uma armadilha ("trap") para capturar o gás carbônico da combustão, que possibilitava absorvê-lo diretamente numa solução de potassa cáustica, sem precisar coletá-lo como gás.

Também na década de 1820, Michel Eugène Chevreul (1786-1889) relatou os resultados de sua pesquisa sobre a constituição química das gorduras, que havia se estendido por mais de dez anos. Nessa pesquisa, publicada em 1824, procurou isolar as gorduras dos materiais biológicos onde estavam presentes (sem alterar sua composição), purificá-las, separar seus constituintes químicos e caracterizá-los a partir de suas propriedades químicas e físicas e de sua composição elementar (FLORKIN 1972, p. 114-5). Combinou diversos procedimentos analíticos, estabelecendo uma seqüência completa de análise química. Através de seus resultados, Chevreul mostrou que as gorduras – classe que incluía enorme variedade de substâncias – eram compostas invariavelmente por glicerol ligado a um ou mais ácidos graxos, cuja composição elementar determinou com precisão. Segundo Holmes (1964, p. 13; 1974, p. 51), os critérios para a identificação e a purificação de substâncias orgânicas que Chevreul estabeleceu nessa pesquisa foram modelo para todas as análises químicas realizadas nas décadas seguintes.

Por outro lado, Glas (1979, p. 18) afirma que foi principalmente devido às pesquisas de Chevreul que a idéia de que "espécies químicas de-

finidas” estavam presentes nos organismos tornou-se estabelecida. Essas “espécies químicas” seriam os constituintes moleculares dos organismos e seriam reveladas através dos procedimentos de análise centesimal (“analyse immédiate”). Estes, por sua vez, seriam compostos por elementos químicos, determinados através da análise elementar. Também segundo Glas (1979, p. 19) a noção de constituintes moleculares se tornaria central para a química orgânica nas décadas seguintes e a combinação da “analyse immédiate” e da análise elementar forneceria a base para o desenvolvimento teórico da química orgânica.

A simplificação, o aperfeiçoamento e a sistematização dos métodos de análise química resultaram na difusão dos estudos sobre a composição dos alimentos e dos organismos animais, que por sua vez resultaram na ampliação do conhecimento químico sobre a matéria orgânica. Desse modo foi possível constatar que os mesmos tipos de componentes moleculares constituíam os animais e seus alimentos: não só os mesmos elementos estavam presentes, mas também os mesmos arranjos moleculares desses elementos. Os fisiologistas logo incorporaram em suas pesquisas a noção dos constituintes moleculares (“proximate principles”) e a classificação das substâncias orgânicas propostas pelos químicos. Enfatizaram a utilização de métodos qualitativos de análise química para identificar as substâncias presentes nos tecidos e fluidos corpóreos, base material dos processos que investigavam. Tudo isso deu impulso a novas concepções e formas de abordagem do fenômeno nutricional, a partir da década de 1820.

2.2 A CLASSIFICAÇÃO DAS “SUBSTÂNCIAS ALIMENTARES” DE PROUT.

No final da década de 1820, William Prout (1785-1850), médico e químico inglês, apresentou à “Royal Society” de Londres sua conclusão de que “as principais substâncias alimentares empregadas pelo homem e pelos animais mais perfeitos podem ser reduzidas a três grandes classes: “saccharine”, “oily” e “albuminous” ” (PROUT 1828, p. 33)². Partindo dessa conclusão – à qual afirmou ter chegado “gradualmente” – Prout estabeleceu como

²Os nomes dados por Prout às três classes de substâncias poderiam ser traduzidas, aproximadamente, por “sacáricos”, “oleosos” e “albuminosos”, equivalendo, atualmente, a “carboidratos”, “óleos e gorduras” e “proteínas”.

seu objetivo de pesquisa determinar a composição elementar "exata" dessas substâncias e depois investigar as mudanças nelas produzidas durante os processos de digestão e assimilação.

Em seu livro "Chemistry, Metereology and the Function of Digestion, Considered with Reference to Natural Theology", publicado em 1834, Prout apresentou mais detalhes sobre sua proposta de classificação dos nutrientes e os resultados da continuação de sua pesquisa³. Havia determinado a composição elementar de diversas substâncias isoladas de alimentos e fluidos e tecidos animais. Com base nesses resultados, definiu cada uma das três classes: as "saccharine" continham hidrogênio e oxigênio na mesma proporção que a da água; as "oily" eram constituídas por etileno ("olefiant gas", que em francês significa justamente "gás formador de óleos") mais água em diferentes quantidades (portanto, continham alta proporção de hidrogênio). Entre as substâncias nitrogenadas da classe "albuminous", Prout fez distinção entre a gelatina, que continha menor porcentagem de carbono e as relacionadas à albumina, que podiam ser diferenciadas com base nas diferentes temperaturas de coagulação (FÄRBER 1938; HOLMES 1963).

Através dos resultados de suas análises Prout constatou que os componentes dos tecidos e fluidos animais e vegetais sempre se encaixavam nas três classes. Com base nessa constatação e observando que o leite, "única substância produzida na natureza especificamente como um nutriente", continha representantes dessas três classes, reforçou sua conclusão de que as substâncias dessas três classes constituíam os requerimentos nutricionais básicos dos animais (HOLMES 1964, p. 54-5). Holmes (1963) afirma que a classificação dos nutrientes introduzida por Prout foi amplamente aceita por seus contemporâneos e passou a ser fundamental para estudos sobre nutrição. Segundo McCollum (1957, p. 88), a relação por ele estabelecida entre essa classificação e os requerimentos nutricionais dos animais tem sido considerada como a "primeira tentativa de definir uma dieta adequada em termos de substâncias químicas".

³ As idéias de Prout sobre a digestão e assimilação dos nutrientes apresentadas nesse livro estão descritas na seção 4.1.

2.3 EXPERIMENTOS COM O AMIDO: A DESCOBERTA DA DIÁSTASE E O CONCEITO DE CATÁLISE

Em 1833, ao investigar a conversão do amido em açúcar, Anselme Payen (1795-1871) e Jean François Persoz (1805-1868) conseguiram isolar e purificar, através de extração por solvente, uma substância presente em grãos germinados a qual em temperatura moderada agia sobre o amido, liquefazendo-o. A solução resultante foi separada em três componentes distintos: um que era solúvel em água quente, insolúvel em água fria e reagia com iodo dando cor azul (portanto, o próprio amido)⁴; outro que era solúvel em água fria e não originava cor azul pela adição de iodo, que consideraram ser um tipo de goma; e um terceiro que era um açúcar fermentável. Observaram também que através de um contacto prolongado entre a substância isolada e a solução de amido ocorria a transformação completa em açúcar. Denominaram a substância descoberta de “diástase”, devido à sua capacidade de quebrar o amido (McCOLLUM 1957, p. 13; FLORKIN 1972, p. 267; HOLMES 1974, p. 164)⁵.

Payen e Persoz notaram que a quantidade de diástase necessária a essa reação era incrivelmente pequena: uma parte de diástase convertia em açúcar duas mil partes de amido solúvel seco, dissolvido em água morna. Verificaram, ainda, que a capacidade da diástase de agir sobre o amido era destruída pelo aquecimento (McCOLLUM 1957, p. 13; HOLMES 1974, p. 164).

Enquanto isso, Eilhard Mitscherlich (1794-1863) investigava a reação de formação de éter a partir do álcool e ácido sulfúrico e observou que a quantidade de ácido necessária à reação era muito pequena. Esse fato não podia ser explicado pelas concepções de reação química predominantes na época, baseadas na idéia de afinidade química⁶. Mitscherlich introduziu, então, a idéia de “combinação e decomposição através de contato” para

⁴A reação do amido com o iodo resultando em cor azul havia sido relatada em 1815 por J.J. Colin e H.F. Gaultier de Claubry, ambos químicos franceses (McCOLLUM 1957, p. 11).

⁵A diástase foi a primeira *enzima* a ser descoberta, embora na época não fosse assim designada (DIXON 1971, p. 17).

⁶Segundo Holmes (1974, p. 165), de acordo com essa idéia de afinidade química, “uma substância só poderia causar a decomposição de outra quando seus próprios constituintes tinham uma afinidade maior por um constituinte da segunda substância do que os próprios constituintes dessa substância”.

explicar reações desse tipo (outras já haviam sido descritas em química inorgânica). Segundo ele, o contato entre o reagente (ou reagentes) e a substância presente em quantidades mínimas, sob determinadas condições, produzia a reação. Mitscherlich considerou que a fermentação alcoólica e acética, que ocorriam na presença de uma quantidade muito pequena de fermento, também eram exemplos de reação por contacto (IHDE 1964, p. 435; HOLMES 1974, p. 165; GLAS 1979, p. 43)⁷.

Partindo dessa idéia de Mitscherlich publicada em 1833, Berzelius elaborou em 1837 sua noção de "catálise", fenômeno determinado pelo que ele chamou de "força catalítica", no qual uma substância "despertava afinidades" em outras substâncias, "por sua simples presença" (HOLMES 1974, p. 165). Concluiu que a diástase era um agente catalítico, assim como o fermento que provocava a transformação do açúcar em álcool⁸. Berzelius estendeu sua noção de catálise a fenômenos vitais, considerando que a ação catalítica devia ser fundamental nas complexas transformações fisiológicas dos organismos vivos (GLAS 1979, p. 43).

2.4 A "TEORIA DAS PROTEÍNAS" DE MULDER

Até meados da década de 1830, o conhecimento químico sobre os albuminóides estava restrito ao conhecimento de algumas de suas propriedades físicas características – base dos métodos qualitativos de isolamento e identificação – e aos resultados da análise elementar de substâncias dessa classe. Por outro lado, já se reconhecia a importância dos albuminóides como constituintes de fluidos e tecidos animais e vegetais e como nutrientes, o que os mantinha como foco da atenção de diversos pesquisadores.

O desenvolvimento de concepções teóricas sobre a estrutura química das substâncias orgânicas foi decisivo para o avanço no conhecimento sobre

⁷Na época a fermentação era considerada um processo químico que ocorria com a participação de um "fermento", caracterizado como uma "substância animal". Sabia-se que a presença de um "fermento" era imprescindível em processos fermentativos, mas não se sabia explicar seu papel nesses processos. Em 1825, J. J. Colin havia proposto que a fermentação era provocada por um distúrbio no equilíbrio eletroquímico do fermento, que era transferido ao açúcar (GLAS 1979, p. 42; IHDE 1964, p. 433).

⁸Nessa época e até meados do século XIX, não se fazia distinção entre "fermento", enquanto entidade microbiológica, e uma substância química – como a diástase – que apresentava ação catalítica.

os albuminóides. Em particular, foi importante o surgimento da noção de radicais orgânicos, resultante da conjunção de pesquisas de vários químicos: Gay-Lussac, Dumas, Berzelius, Wöhler e Liebig (GLAS 1976). Essa noção foi a base da hipótese sobre a estrutura dos albuminóides, de Gerardus Johannis Mulder (1802-1880), um químico holandês que já havia trabalhado em medicina. Sua hipótese procurava explicar a relação estreita entre as diversas substâncias dessa classe e levava em conta seu papel fisiológico (GLAS 1979, p. 37-40). Desse modo, Mulder evidenciou a importância e a utilidade do conhecimento químico sobre as substâncias orgânicas para a compreensão dos processos fisiológicos.

Lavoisier já havia suposto a existência de radicais orgânicos, estendendo às substâncias orgânicas suas idéias sobre a constituição das inorgânicas. A ligação de diferentes proporções a um radical composto de carbono e hidrogênio (“radical hidrocarbono”), por exemplo, definiria a substância: açúcar continha a menor proporção de oxigênio e ácido oxálico a maior proporção (PARTINGTON 1951, p. 218-9). Mas o conceito de radicais orgânicos só seria definido muitos anos depois. Em 1815, Gay-Lussac isolou o “cianogênio”, um composto que se mantinha constante durante reações químicas, comportando-se como se fosse um elemento. Isso evidenciava a existência de radicais orgânicos.

No mesmo ano, ao determinar a densidade do vapor de álcool e de éter, Gay-Lussac notou que ambas podiam ser expressas em termos de uma combinação simples das densidades do “olefiant gas” (etileno) e do vapor d’água. A densidade do vapor de álcool era igual à soma da densidade de etileno e vapor d’água, e a do vapor de éter equivalia a duas vezes a do etileno mais a da água. No ano seguinte, Pierre Jean Robiquet (1780-1840) e Jean Jaques Colin (1784-1865) fizeram observações, notando que a densidade do cloreto de etila era equivalente à soma da densidade do éter e do ácido hidrolórico. Já em 1828, Jean-Baptiste André Dumas (1800-1884) e P. F. G. Boullay partiram dessas observações e dos resultados de seus próprios experimentos e elaboraram a “teoria do etileno”. Concluíram que substâncias como éter, álcool e cloreto de etila eram compostas a partir de um mesmo radical comum, o “etileno” (IHDE 1964, p. 184; GLAS 1979, p. 20-1).

Em 1832, Liebig e Friedrich Wöhler (1800-1882) forneceram mais evidências experimentais para essa teoria. Obtiveram uma série de derivados do “óleo

de amêndoas amargas" (benzaldeído), através de oxidação, cloração, decomposição, etc., e verificaram que todos esses derivados continham um radical comum, que denominaram "radical benzoíla". Berzelius, na época uma das principais autoridades em química orgânica, logo reconheceu a importância da noção de radicais. Houve discordâncias com relação à fórmula correta dos diversos radicais, mas a teoria como um todo foi reforçada nos anos seguintes com novas evidências experimentais. Tornou-se, então, estabelecida na química orgânica e se mostrou bastante útil para a classificação de substâncias orgânicas e para a compreensão do comportamento químico das mesmas (PARTINGTON 1951, p. 228-34; IHDE 1964, p. 186-9; GLAS 1979, p. 21-2).

Alguns anos depois, Mulder começou a investigar as substâncias albuminóides. Sob a orientação (através de cartas) de Berzelius e partindo dos trabalhos de Fourcroy sobre essas substâncias, Mulder dedicou-se a isolar e purificar diversos albuminóides e analisá-los quanto à composição. Utilizava técnicas de fracionamento baseadas na precipitação por ácidos, bases, sais neutros, sais de metais pesados, álcool ou ácido tânico e na coagulação por calor (GLAS 1975, p. 292; GLAS 1979, p. 27). Glas (1975) ressalta que, certamente, Mulder não chegou a obter proteínas na forma purificada, devido à limitação dos métodos disponíveis. Assim, muitas vezes, analisava misturas complexas dessas substâncias. O único critério de pureza que ele considerava era a constância das propriedades físicas e químicas.

O objetivo de Mulder era determinar as fórmulas moleculares dos albuminóides isolados. Portanto, precisava chegar ao número absoluto de átomos na molécula, partindo das proporções desses átomos, obtidas através da análise elementar. Para isso, baseou-se na teoria Eletrodualística de Berzelius, segundo a qual as moléculas orgânicas, assim como as inorgânicas, eram compostas por duas partes (simples ou compostas) de cargas elétricas opostas, que podiam ser separadas (PARTINGTON 1951). Assumindo essa suposição, era possível estabelecer o número absoluto de átomos de uma molécula orgânica a partir de sua combinação com ácidos e bases inorgânicas. Assim, Mulder submeteu os albuminóides isolados a uma série de reações com reagentes inorgânicos. Depois de enfrentar diversas dificuldades, sempre auxiliado por Berzelius, Mulder obteve resultados analíticos que indicavam que todos os albuminóides – no caso, albumina de ovo e de soro, fibrina e caseína – apresentavam praticamente a mesma composição

elementar. Continham a mesma proporção de carbono, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio e fósforo, e diferiram apenas no conteúdo de enxofre. Através de dissolução em álcali diluído, seguida de precipitação com ácido acético, conseguiu remover o fósforo e enxofre dos albuminóides. Chegou a uma substância que considerou ser o radical comum a todos os albuminóides, cuja fórmula era $C_{40}H_{62}N_{10}O_{12}$ (VICKERY e OSBORNE 1928, p. 394; GLAS 1975, p. 293-7; GLAS 1979, p. 27-31). Por sugestão de Berzelius, Mulder denominou esse radical de "proteína", palavra derivada do grego "proteios" e que significa "princípio". Segundo seus resultados, a fórmula da albumina de ovo e da fibrina podiam ser representadas como $Pr_{10}P$ (Pr indicando o radical "Proteína") e a da albumina do soro de sangue $Pr_{10}S_2P$ (GLAS 1979, p. 31). Mulder estendeu suas análises a albuminóides vegetais e confirmou sua conclusão de que esse radical era comum a todos os albuminóides, animais ou vegetais. Concluiu também que esses resultados mostravam que os albuminóides animais originavam-se dos vegetais. Estes seriam assimilados diretamente no sangue após terem sido reduzidos à "proteína" (GLAS 1976; HOLMES 1963).

As pesquisas de Mulder e sua teoria das proteínas representaram não só um avanço no conhecimento químico sobre essas substâncias, mas também mostraram como esse tipo de conhecimento era importante para a compreensão de questões fisiológicas (GLAS 1976; HOLMES 1963). Publicadas em 1838, tiveram ótima recepção entre químicos e fisiologistas, pois explicavam a relação entre os diversos albuminóides e a conversão de albuminóides vegetais em animais. Seus resultados e conclusões deram base para pesquisas posteriores sobre essas substâncias e às teorias importantes sobre o metabolismo animal, como a de Liebig. Entretanto, sua influência foi limitada a um curto período. Poucos anos depois surgiram resultados analíticos diversos dos de Mulder e que colocaram em dúvida sua teoria das proteínas.

Em 1842, Dumas e seus assistentes determinaram a composição elementar de diversos albuminóides, introduzindo cuidados que aumentavam a precisão dos resultados. Desse modo verificaram que a fibrina apresentava uma proporção de nitrogênio maior que as da albumina e da caseína (as quais considerou idêntica). Constatou também diferenças na composição elementar de outros albuminóides e passou a questionar a idéia de identidade dessas substâncias com relação à composição elementar (HOLMES

1974, p. 54-5). Mais tarde, uma série de experimentos realizados por colaboradores de Liebig produziram resultados que também divergiam dos de Mulder. Em 1845, Nicholas Laskowski (1816-1871) concluiu que as fórmulas empíricas propostas por Mulder eram “inaceitáveis” e que sua “proteína” não podia ser isolada, já que o material resultante dos procedimentos descritos por Mulder ainda continha enxofre (FRUTON 1972, p. 98). Laskowski não havia usado a temperatura recomendada por Mulder e foi por ele criticado. Mas em 1847 Fleitmann, que também trabalhava no laboratório de Liebig mostrou que, realmente, o produto que Mulder definiu como sendo o radical proteína continha enxofre (GLAS 1979, p. 37).

Mulder aceitou esses resultados e procurou modificar sua teoria de forma que os explicasse, mas não obteve aceitação. Paralelamente, a visão dualística dos compostos orgânicos – na qual os métodos e as interpretações de Mulder se fundamentavam – estava perdendo a importância na química orgânica. Isso enfraqueceu ainda mais a teoria das proteínas. Em meados dos anos 1850 essa teoria estava praticamente descartada (FRUTON 1972, p. 99; GLAS 1979, p. 37-40), sem que outra hipótese sobre a estrutura dos albuminóides a tivesse substituído⁹.

⁹Cabe notar que esse fato contraria a visão de Thomas Kuhn sobre a ciência, apresentada em seu livro “A estrutura das revoluções científicas” (KUHN 1975). Segundo ele, uma teoria só é abandonada quando surge outra que a substitua.

CAPÍTULO 3

A ABORDAGEM FISIOLÓGICA DOS PROCESSOS RELACIONADOS À NUTRIÇÃO NA PRIMEIRA METADE DO SÉCULO XIX

3.1 A FISIOLOGIA NO INÍCIO DO SÉCULO XIX

Até o final do século XVIII eram poucas as pesquisas fisiológicas que abordavam as transformações dos alimentos no interior do organismo animal (HOLMES 1963) e, desse modo, os fisiologistas não dispunham de informações que pudessem confirmar ou refutar as especulações incluídas nas teorias químicas emergentes. Para a alteração desse estado de coisas, foram fundamentais as mudanças metodológicas e teóricas que a fisiologia sofreu logo no início do século XIX, introduzidas principalmente por François Magendie (1783-1855), considerado o principal fisiologista francês da primeira metade do século XIX. Essas mudanças tiveram consequências diretas para o desenvolvimento dos estudos sobre nutrição.

Magendie mostrou que, do ponto de vista fisiológico, uma função era o resultado da ação conjunta de vários órgãos, rompendo a associação órgão-função que predominava em fisiologia como consequência de sua vinculação com a anatomia (GROSS 1979). Desse modo, estabeleceu o conceito fisiológico de função, que passou a ser o ponto de partida das pesquisas em fisiologia, ao invés da estrutura anatômica (SCHILLER 1968). Isso foi especialmente importante para o estudo do processo nutricional, já que este não pode ser relacionado a um único órgão, nem pode ser observado ou descrito anatomicamente. Além disso, Magendie colocou os processos metabólicos como problema central da fisiologia¹ (GROSS, 1979) e os atribuiu a agentes físico-químicos desconhecidos, abandonando a idéia de sensibilidade e contratibilidade como causa direta desses processos. Empenhou-se em estabelecer a fisiologia como ciência experimental, para que viesse a ter a

¹Segundo Gross, a ênfase de Magendie nos processos metabólicos aparece logo após a difusão da análise elementar de substâncias orgânicas e do surgimento de teorias químicas sobre esses processos. Ainda segundo Gross, Magendie teve como ponto de partida a visão dos zoologistas da época, em especial G. Cuvier (1769-1832), para a idéia de que a nutrição era a principal função vital.

mesma objetividade das ciências físicas. Para isso, enfatizou a importância da vivissecção – por permitir a observação do organismo vivo – e da análise das condições físico-químicas dos processos vitais. Paralelamente na Alemanha, Johannes Müller (1801-1858), um dos principais fisiologistas alemães da época, defendia basicamente os mesmos princípios metodológicos defendidos por Magendie na França, empenhando-se também em difundir a experimentação em fisiologia.

Assim, a fisiologia foi se abrindo gradualmente para as concepções químicas dos processos fisiológicos e foi reconhecendo os aspectos químicos desses processos. Nesse sentido, os fisiologistas foram percebendo a importância do conhecimento químico sobre as substâncias que participavam desses processos para a ampliação do conhecimento fisiológico. Tudo isso resultou na incorporação de conceitos, instrumentos e métodos da química nas pesquisas em fisiologia, a partir do início do século XIX.

3.2 NOVOS ESTUDOS SOBRE DIGESTÃO²

A partir dos experimentos de Réaumur e Spallanzani e através da incorporação de métodos de análise química recentemente desenvolvidos às pesquisas em fisiologia, tornaram-se acessíveis à pesquisa as transformações que os alimentos sofriam durante os processos digestivos. Reconhecendo essa possibilidade e a relevância da interação da química e da fisiologia, a Academia Francesa de Ciências ofereceu um prêmio, em 1823, para quem determinasse “através de séries de experimentos químicos e fisiológicos, quais são os fenômenos que se sucedem um ao outro nos órgãos digestivos” (HOLMES 1974, p. 149). A Academia definiu também que deveriam ser examinadas tanto as transformações digestivas dos alimentos como um todo, como dos “constituintes moleculares” simples, já que os avanços recentes da química tinham “tornado possível considerar individualmente alguns dos constituintes moleculares que compunham os alimentos” (HOLMES 1974, p. 149).

Para concorrer ao prêmio, Frederick Tiedemann (1781-1861), um ana-

²Esta seção se baseia, quase exclusivamente – com exceção de algumas poucas informações, devidamente remetidas aos autores que as relataram – nas descrições e análises detalhadas de Holmes contidas nos capítulos de VII a XIV de seu livro “Claude Bernard and Animal Chemistry”, 1974, p. 141-320.

tomista e fisiologista alemão, e Leopold Gmelin (1788-1853), um químico também alemão, apresentaram um trabalho sobre digestão³, que se tornou modelo, estímulo e fonte de informação para as pesquisas sobre o assunto nos trinta anos seguintes (HOLMES 1964). Em sua pesquisa, realizada entre 1820 e 1825, Tiedemann e Gmelin procuraram determinar meticulosamente as mudanças químicas que os nutrientes sofrem ao longo do trato digestivo, desde sua passagem pelo estômago até serem absorvidos no intestino. Eles se basearam, inicialmente, nos procedimentos e resultados de Réaumur e Spallanzani, partindo da conclusão de que a digestão no estômago era resultado da ação do suco gástrico e supondo que essa conclusão podia ser estendida aos outros sucos digestivos. Realizaram, então, análises químicas qualitativas desses sucos puros⁴ e dos conteúdos do trato gastro-intestinal, após intervalos diversos da digestão de vários nutrientes simples e alimentos. Para isso, usaram os métodos mais recentes disponíveis: primeiro, separaram os componentes através de extração por solvente (no caso, usaram água, álcool, ácido acético e éter). Depois, procuraram identificar esses componentes através de testes com uma sequência padrão de reagentes – por exemplo, ácido clorídrico, acetato de chumbo, nitrato de mercúrio, tintura de bugalho, entre outros (HOLMES 1974, p. 151-2).

Em suas análises do suco gástrico, Tiedemann e Gmelin encontraram *osmazome* (uma substância solúvel em álcool) e “matéria salivar”; e notaram a ausência de albumina. Também constataram a presença de um ácido, que identificaram como sendo o ácido clorídrico⁵. Confirmaram isso alimentando cães com pedras calcáreas e observando que se formava grande

³Outro trabalho também foi submetido à Academia nessa ocasião, pelos franceses François Lemet e Louis Lassaigne, mas não será descrito aqui, pois não representou nenhum avanço significativo com relação ao conhecimento anterior, apesar de ter dividido o prêmio com o de Tiedemann e Gmelin.

⁴Na tentativa de obter os sucos digestivos puros, Tiedemann e Gmelin verificaram que a produção desses sucos respondia a estímulos mecânicos ou químicos. Para obter o suco gástrico eles obrigaram animais em jejum a engolir pedras de quartzo, o que resultava na secreção desse suco em grande quantidade.

⁵Um pouco antes, em 1824, William Prout havia identificado esse ácido no suco gástrico (HOLMES 1974; McCOLLUM 1957). Mas a questão de qual era o ácido presente nesse fluido permaneceu ainda controversa por vários anos, pois diversos pesquisadores chegaram a resultados diferentes em suas análises.

quantidade de cloreto de cálcio, o que, segundo eles, era devido à reação de neutralização entre o carbonato de cálcio e o ácido clorídrico (HOLMES 1974).

Numa segunda etapa, Tiedemann e Gmelin procuraram seguir os alimentos através do trato digestivo: alimentavam cães com um só tipo de alimento, ou um nutriente "simples", durante alguns dias e os sacrificavam determinado tempo após uma última refeição. Em seguida, analisavam quimicamente o conteúdo do estômago, de diversas porções do intestino, dos vasos quilíferos e, em alguns casos, também o sangue e a urina. Entre os nutrientes "simples" que investigaram estavam: albumina líquida e coagulada, fibrina, gelatina, manteiga, caseína, amido e glúten; e, entre os alimentos "complexos": leite, carne crua e cozida, carne mais pão, ossos, além de outras combinações. Os experimentos foram repetidos com diversos animais: gatos, cavalos, vacas, pássaros, répteis e peixes. Os resultados, muitas vezes, não possibilitaram nenhuma conclusão, principalmente no caso de alimentos "complexos", pois a diversidade de substâncias presentes tornava impossível determinar, através dos métodos disponíveis, quais alterações químicas haviam ocorrido. Nesse caso, limitaram-se a descrever as mudanças que podiam observar visualmente. Nos experimentos com nutrientes "simples", procuravam detectar a presença do nutriente ingerido no conteúdo de cada porção do trato digestivo, para verificar onde o nutriente "desaparecia", ou seja, sofria alguma alteração química. Em seguida, procuraram identificar alguma substância na qual o nutriente em questão pudesse ter se transformado ou que fosse produto de sua composição. Assim, no caso de algumas "substâncias animais", os resultados indicavam que tinham se transformado em outras da mesma classe. Por exemplo, constataram que a fibrina desaparecia no estômago, pois os testes com o conteúdo desse órgão já não indicavam suas propriedades características, mas sim as da albumina. Como a albumina não havia sido identificada no suco gástrico puro, concluíram que parte da fibrina tinha se transformado em albumina. Em geral, só podiam verificar se o nutriente ingerido havia, ou não, sofrido alteração (em caso positivo, já não constatavam suas propriedades características), pois os testes disponíveis para identificação de "substâncias animais", baseados nas características de solubilidade e reação com determinadas substâncias, muitas vezes forneciam resultados confusos.

Os resultados dos experimentos com amido foram os mais significati-

vos. Nesse caso, já havia um teste específico e inconfundível para detectar a presença dessa substância, baseado em sua propriedade de reagir com iodo resultando uma cor azul característica. Também já era conhecida a conversão de amido em açúcar e a fermentação alcoólica era utilizada como teste para detectar a presença de açúcar, desde os relatos de Kirchhoff, entre 1812 e 1816 (ver seção 2.1). Desse modo, Tiedemann e Gmelin observaram que o amido desaparecia no estômago e procuraram verificar se havia se transformado em açúcar. Para isso, examinaram os conteúdos do estômago, dos intestinos, o quilo, o sangue da veia porta e da veia cava, primeiro separando os constituintes através de solventes e depois submetendo à fermentação (através da adição de fermento) as frações onde o açúcar poderia estar presente. Os resultados indicaram a presença de açúcar em todos os fluidos e eles concluíram que “assim que o amido era dissolvido nos sucos digestivos ele perdia sua propriedade de tornar o iodo azul e era transformado, ao menos em parte, em açúcar” (HOLMES 1974, p. 154). Holmes (1974) afirma que essa descoberta foi marcante, por ser uma das primeiras evidências diretas da transformação química de uma substância no interior de um organismo animal, de uma forma idêntica à transformação observada em laboratório.

Com base nesses resultados experimentais, Tiedemann e Gmelin propuseram uma teoria sobre o processo de digestão. Consideraram que os resultados não deixavam dúvidas de que o suco gástrico agia quimicamente sobre os alimentos “simples” ou “compostos” dissolvendo-os e transformando-os em quimo. Cada constituinte desse suco era responsável pela dissolução de determinados nutrientes: a água presente, por exemplo, dissolvia as substâncias hidrossolúveis e o ácido presente dissolvia as que eram insolúveis em água mas solúveis em ácido. Concluíram também que algum tipo especial de decomposição podia ocorrer durante a digestão gástrica, como no caso do amido, para a qual os constituintes orgânicos do suco gástrico, a “matéria salivar” ou o “osmazome”, poderiam contribuir, da mesma forma que o glúten participava da transformação do amido (HOLMES 1974, p. 154-6).

Assim, através dos inúmeros experimentos que realizaram, Tiedemann e Gmelin fizeram observações meticolosas, levantaram questões específicas a serem exploradas e chegaram a alguns resultados importantes, como os sobre a digestão do amido. Não chegaram a desvendar “os fenômenos que

se sucedem um ao outro nos órgãos digestivos”, como propunha a Academia de Ciências, mesmo porque essa proposta era demasiado abrangente e as informações disponíveis anteriormente eram muito escassas. Havia também a limitação imposta pelos métodos de análise química disponíveis. Por outro lado, desenvolveram uma forma de abordagem que incorporava os métodos recentes de análise química e que levava em conta as condições fisiológicas. Nesse sentido, Holmes 1974, p. 157) ressalta que Tiedemann e Gmelin “ajudaram a abrir uma era de investigação extensiva da natureza química da digestão... usando a química como instrumento, em vez de fonte de explicações teóricas”. Nesse sentido, o trabalho que apresentaram à Academia foi modelo para novas pesquisas sobre digestão realizadas nos anos seguintes.

Alguns anos depois, nos Estados Unidos, William Beaumont (1785-1853) fez observações detalhadas sobre a digestão humana. Beaumont era cirurgião militar e ao tratar de um soldado canadense que tinha uma fístula permanente em seu estômago, aberta por um tiro, realizou uma série de observações, durante vários anos (McCOLLUM 1957). Seu método consistia em alimentar o paciente com um tipo de alimento e recolher amostras através da fistula após diversos intervalos de tempo, verificando o que havia acontecido. Através desses experimentos constatou, por exemplo, que a digestão era facilitada pela quebra do alimento em partículas finas, que o tempo de digestão depende da qualidade e do tipo de alimento e que a ação do estômago era a mesma sobre todos os tipos de alimentos (McCAY 1973). Suas principais observações foram confirmações dos resultados de Réaumur e Spallanzani (ver seção 1.1).

Beaumont recolheu amostras de suco gástrico através da fistula e as enviou a químicos para análise, mas não chegou a nenhum resultado significativo, além da confirmação da presença do ácido hidroclórico. Realizou também experimentos de digestão artificial com suco gástrico e obteve praticamente os mesmos resultados verificados na digestão gástrica mostrando definitivamente que esse fluido era o responsável pela digestão dos alimentos (HOLMES 1974, p. 157).

Em seu trabalho, publicado em 1833, Beaumont se preocupou em descrever meticulosamente o que observava através de seus experimentos. Por outro lado, restringiu-se a isso, numa época em que já havia métodos químicos que poderiam tornar suas verificações mais precisas. Uma con-

seqüência direta e importante de seu trabalho foi o desenvolvimento, alguns anos depois, por Nicholas Blondot (1810-1877), de uma técnica cirúrgica para produção de fístula artificial permanente no estômago de animais (McCOLLUM 1957; HOLMES 1974). Isso facilitou muito as pesquisas sobre digestão, por possibilitar um acesso mais fácil ao conteúdo desse órgão e sob condições melhor controladas.

Paralelamente às pesquisas de Beaumont, Johan N. Eberle realizou estudos sobre o processo digestivo, partindo dos resultados e procedimentos introduzidos por Tiedemann e Gmelin. Eberle se interessou em investigar qual componente do suco gástrico era responsável pela quimificação dos alimentos. Primeiro, examinou a ação dos ácidos presentes – ele havia detectado a presença do ácido clorídrico, acético e algumas vezes, do ácido butírico – e verificou que eram capazes de dissolver alguns alimentos, mas que os produtos resultantes diferiam dos produtos da ação do suco gástrico. Passou então a investigar o muco que envolvia os alimentos sólidos e que recobria a membrana mucosa do estômago durante o processo digestivo.

Verificou que esse muco era ácido e apresentava ação digestiva sobre “substâncias animais”, ao contrário do muco presente no estômago de animais em jejum. Eberle observou, então, que ao adicionar algumas gotas de ácido clorídrico ou acético ao muco de animais em jejum, este passava a ter propriedades digestivas. Em seguida, descobriu que era possível produzir um suco gástrico “artificial” a partir da própria membrana mucosa do estômago (no caso, usou mucosa do estômago de bezerro seca) mergulhando-a em solução de ácido clorídrico ou acético bastante diluído em água. Através de análise química verificou que a solução resultante continha as mesmas substâncias que o suco gástrico “natural” além da mesma cor e sabor. Procurou também testar a ação desse suco artificial sobre diversos nutrientes, a maioria “substâncias animais”, comparando o produto resultante com o produto da digestão natural dos mesmos nutrientes, seguindo os procedimentos e os métodos químicos utilizados por Tiedemann e Gmelin. Seus resultados indicaram que, em geral, a ação do suco gástrico artificial tinha sido similar à digestão no estômago.

Embora tivesse verificado, através de seus resultados experimentais, que determinados nutrientes – como o amido e a albumina coagulada – sofriam alterações químicas sob ação do muco presente no suco gástrico, Eberle apresentou conclusões contraditórias. No livro em que relatou essa pes-

quiza, publicado em 1834, afirmou que, em geral, os nutrientes “simples” eram apenas dissolvidos no estômago e que os alimentos “complexos” eram modificados quimicamente devido à interação de seus diversos constituintes após a dissolução. Procurando explicar as conclusões confusas de Eberle, Holmes concluiu que ele, aparentemente, não estava consciente das implicações de seus resultados (HOLMES 1974, p. 163). Sua descoberta de que o agente químico da digestão era inerente ao muco e a demonstração da ação digestiva de um suco gástrico “artificial”, da mucosa gástrica acidificada, deram base para novas pesquisas sobre o processo digestivo, notadamente as de Müller e Schwann.

A partir dos trabalhos de Eberle e de Beaumont sobre digestão, da descoberta da diástase por Payen e Persoz e das idéias de Mitscherlich sobre “reação através de contato”⁶, Johannes Müller e Theodor Schwann (1810-1882, na época, seu assistente) associaram a ação do suco gástrico sobre alimentos à ação da diástase sobre o amido.

Müller e Schwann confirmaram os resultados experimentais de Eberle sobre a digestão de albumina coagulada, que evidenciaram sua modificação química. Também reconheceram a importância da descoberta de Eberle sobre o agente químico da digestão, considerando-a “uma descoberta brilhante, uma das mais importantes em química animal” (MÜLLER & SCHWANN 1836, citado em HOLMES 1974, p. 164). Pois era a primeira vez que se verificava a ação de uma “substância animal” sobre outra e que se observava em animais uma “ação química por contato”. Müller também supôs que outros processos no organismo poderiam ocorrer dessa forma, similarmente à ação da diástase e do agente digestivo.

Em seguida, Schwann continuou sozinho as pesquisas sobre digestão que tinha iniciado com Müller, dedicando-se especificamente a desvendar a natureza do agente digestivo e seu modo de ação sobre os alimentos. Schwann abordou o problema de forma sistemática, dividindo a questão que queria responder nas questões específicas que a compunham, listando as possibilidades de resposta e realizando experimentos que testassem cada alternativa. A partir dos resultados, eliminava, confirmava ou mantinha as alternativas para investigação posterior. Holmes qualifica essa pesquisa

⁶ A descoberta da diástase e a idéia de “reação através de contato” são descritas na seção 2.3. Segundo Holmes (1974) não se sabe se Müller tinha conhecimento da noção da catálise, elaborada por Berzelius e já publicada na época.

de Schwann como “o mais sofisticado tratamento do assunto na época” (HOLMES 1974, p. 167).

Assim, para estudar o agente da digestão gástrica, Schwann partiu da questão sobre seu modo de ação. Esta poderia se dar, segundo ele, por combinação química ordinária – baseada na afinidade química – ou por contato. Se a ação fosse de contato, a quantidade do agente necessária devia ser muito pequena, não proporcional à do substrato, e o agente não devia se combinar com o produto. Schwann procurou testar essa alternativa através de experimentos de digestão artificial: observou a ação de suco gástrico artificial (preparado segundo o procedimento de Eberle) em diversas diluições sobre albumina coagulada. Os resultados mostraram que a atividade digestiva não era proporcional à concentração e que a quantidade do “agente” necessária era realmente muito pequena. Isso descartava a hipótese de combinação química ordinária e indicava que a ação ocorria por contato.

Por outro lado, ao “reutilizar” as preparações de suco gástrico, constatou que haviam perdido parte da atividade digestiva, o que podia indicar que o “agente” tinha se combinado com o produto. Mas notou que processos como fermentação acética e alcoólica também se adequavam ao primeiro critério e deixavam dúvida sobre o segundo. Realizou, então uma série de experimentos, visando comparar digestão e fermentação. Havia diferenças importantes, como o fato de a fermentação só ocorrer com açúcares e a digestão incluir as substâncias animais. Por outro lado, constatou diversas semelhanças: ambas só ocorriam em meio aquoso e em temperatura morna; o agente digestivo e o fermento alcoólico eram destruídos por fervura e, principalmente, ambas caracterizavam-se como “uma decomposição espontânea de materiais orgânicos, causada por uma substância agindo (por contato?) em quantidade muito pequena” (SCHWANN 1836, citado em HOLMES 1974, p. 169). Assim, concluiu que fermentação e digestão podiam ser consideradas como um mesmo tipo de processo.

Em seguida, Schwann abordou a questão da natureza do princípio digestivo. Como não era possível isolá-lo através dos métodos disponíveis de extração por solvente (pois o álcool destruía a atividade digestiva), procurou conhecer as propriedades químicas desse “agente” no próprio suco gástrico, através de reações de precipitação (observando se a atividade digestiva acompanhava o precipitado ou permanecia no filtrado) e da série

de testes com reagentes usada para identificar “substâncias animais”. Verificou, a partir dos resultados experimentais, que o princípio digestivo era diferente de todas as “substâncias animais” conhecidas. Procurou isolá-lo através de uma sequência de reações de precipitação e obteve um fluido com ação digestiva que considerou conter o agente digestivo e osmazome, os quais não conseguia separar.

Schwann estendeu sua pesquisa a outros nutrientes – até então só havia utilizado albumina coagulada – para verificar se suas conclusões continuavam válidas. Procurou comparar os efeitos da digestão com suco gástrico artificial e da dissolução em ácidos fluidos, sobre diversos nutrientes, para saber se os resultados vinham da ação do princípio digestivo ou da acidez do suco gástrico. Desse modo confirmou que esse princípio era o responsável pela digestão de outras “substâncias animais”, como a fibrina e a fibra muscular. Por outro lado, constatou que a gelatina e o glúten pareciam ser igualmente dissolvidos no suco gástrico artificial e em soluções, o que sugeria que sua digestão não prescindia do princípio digestivo. Observou também que o amido não era dissolvido em nenhuma das preparações. Schwann conhecia o trabalho de Erhard F. Leuchs (1800-1837), publicado em 1831. Ao investigar qual substância do suco gástrico era responsável pela conversão do amido em açúcar, Leuchs havia constatado que era a saliva que agia sobre esse nutriente e não o suco gástrico. Schwann repetiu os experimentos de Leuchs e confirmou seus resultados, concluindo que a digestão do amido no estômago devia-se à deglutição de saliva.

Com base nesses resultados, Schwann concluiu que o agente digestivo – que, então, denominou “pepsina” – era o responsável pela digestão das principais substâncias animais. Assim, através de uma pesquisa experimental sistemática e metódica, Schwann contribuiu decisivamente para o esclarecimento de diversas questões que envolviam o processo de digestão gástrica. A descoberta da pepsina, as conclusões sobre o modo de ação desse “agente” e a própria metodologia utilizada por Schwann representaram um avanço significativo no conhecimento sobre a digestão.

As pesquisas, os resultados e as conclusões de Eberle, Müller e Schwann deram início na Alemanha, a uma nova fase de pesquisas sobre a digestão, baseadas nos novos procedimentos de digestão artificial e nas idéias sobre o princípio digestivo. Assim, por exemplo, cabe citar as análises da pepsina por Gabriel G. Valentin (1810-1883), fisiologista alemão, cujos resultados

indicaram que era quimicamente semelhante à albumina líquida. As observações microscópicas da mucosa gástrica de Adolph Wasmann também levaram a resultados interessantes. Wasmann notou a presença de células glandulares especiais em certas áreas dessa mucosa e verificou que era possível produzir uma solução de alto poder digestivo a partir de pequenos pedaços da mucosa mergulhados em solução diluída. Como conclusão, atribuiu a origem da pepsina às células glandulares que havia observado (HOLMES 1974, p. 172-3).

Entretanto, diversos pesquisadores não concordaram com a teoria de Schwann sobre a pepsina. O próprio Wasmann, por exemplo, ao verificar que alguns nutrientes eram dissolvidos em solução ácida diluída, sugeriu que a ação dissolvedora do suco gástrico estava associada ao ácido presente e que a pepsina limitava-se a apressar o processo.

Essas pesquisas e teorias sobre digestão dos alemães foram praticamente ignoradas na França por um período significativo⁷. Mesmo depois de 1840, pesquisadores franceses importantes ainda tomavam o trabalho de Tiedemann e Gmelin como único ponto de partida para suas pesquisas em digestão. Isso resultou, diversas vezes, na repetição – como se fossem novidades – de observações já descritas na Alemanha e mesmo de suposições que já haviam sido refutadas ou que já estavam mais elaboradas.

Por outro lado, algumas das pesquisas realizadas na França na década de 1840 revelaram mais detalhes e novos aspectos do processo de digestão dos alimentos. Em 1845, Apollinaire Bouchardat (1806-1886), conhecido farmacêutico francês, e Claude Marie Sandras (1802-1856), seu colaborador, relataram os resultados de seus estudos sobre a digestão de amido e açúcares. Seguindo a abordagem de Tiedemann e Gmelin, acompanharam a digestão da sacarose e concluíram que era transformada em açúcar invertido e ácido láctico, ambos detectados também no sangue, onde, segundo Bouchardat e Sandras, deviam ser oxidados. Para confirmar isso, utilizaram um método desenvolvido por Claude Bernard (1813-1878), que consistia em injetar a substância a ser testada na veia de um animal e verificar se desaparecia no sangue (o que indicava que era assimilável) ou se era excretada através da urina. Assim, verificaram que a sacarose injetada aparecia na urina, ao contrário da glucose e do açúcar invertido. A sacarose

⁷Holmes (1974, p. 179-85) procura analisar e explicar porque isso aconteceu.

digerida (injetada no estômago de cão através de fístula e recolhida após determinado tempo) também desaparecia, confirmando, segundo eles, sua suposição.

Ignorando o trabalho de Schwann, em 1845, Louis Miahle (1807-1886), químico francês, isolou da saliva um "fermento"⁸ capaz de transformar amido em açúcar numa proporção de uma parte por duas mil partes de amido. Através de análise química e das condições características da ação desse "fermento", concluiu que era quimicamente idêntico à diástase isolada de vegetais e que, portanto, a saliva era o agente da digestão do amido em animais, e não o suco gástrico. Bouchardat e Sandras não concordaram, pois tinham observado em suas pesquisas que o amido era digerido principalmente no intestino delgado. Realizaram, então, experimentos procurando detectar o agente da digestão do amido no suco gástrico, na bile e em diversas membranas do trato digestivo, sem encontrá-lo. Em seguida testaram o suco pancreático de galinha e de ganso e verificaram que esse suco convertia rapidamente o amido em dextrina e glucose, concluindo que o pâncreas era o responsável pela secreção do "fermento" que digeriria amido. Essa descoberta, considerada a principal contribuição de Bouchardat e Sandras (HOLMES 1974, p. 235) estabeleceu a participação do pâncreas no processo digestivo, que até então não havia sido enfatizada nas pesquisas sobre digestão.

Essas conclusões controversas sobre o papel da saliva e do suco pancreático na digestão do amido motivaram novas pesquisas e debates sobre o assunto. Entre outras, destacaram-se as de Claude Bernard e Charles Barreswil (1817-1870), que há algum tempo de dedicavam a estudar as-

⁸ Até meados do século XIX não se fazia distinção entre enzimas e microorganismos. Assim, o nome "fermento" era utilizado para designar tanto os agentes de fermentação como os princípios ativos presentes nos sucos digestivos. Depois que L. Pasteur mostrou, no final de 1858, que microorganismos vivos estavam envolvidos nos processos fermentativos, esses agentes passaram a ser designados de "fermentos organizados", para diferenciá-los dos "fermentos não-organizados", estes isolados de fluidos e tecidos vegetais e animais (diástase, pepsina, tripsina, entre outros). Na verdade, a partir da década de 1860, estabeleceu-se uma grande controvérsia a respeito da natureza desses agentes e desses processos, que se estendeu até o final do século, envolvendo pesquisadores importantes como Liebig, M. Berthelot e Pasteur, entre muitos outros. Nesse contexto, em 1878, Wikühne propôs o nome de "enzimas" - derivado do grego "dentro do levedo" - para designar conjuntamente os "fermentos não organizados". Gradualmente o novo termo foi sendo adotado (DIXON 1971, p. 19-21; FRUTON 1972, p. 71-4; LEICESTER 1972, p. 176-83).

pectos do fenômeno nutricional. Bernard e Barreswil realizaram alguns experimentos com o suco pancreático e observaram que, quando adicionavam gotas de ácido láctico, esse suco perdia sua propriedade de digerir o amido e se tornava capaz de dissolver “substâncias animais”, como carne e glúten. Por outro lado, quando o neutralizavam, voltava a agir sobre o amido. Com base nesses resultados, concluíram que a condição de acidez ou alcalinidade determinava a ação do suco pancreático. Repetiram os testes com o suco gástrico e verificaram que quando neutralizado deixava de agir sobre “substâncias animais” e passava a digerir amido. Repetiram com saliva e, apesar dos resultados não terem sido muito claros, generalizaram sua conclusão, sugerindo que o agente digestivo era um só, comum a esses três fluidos. Sua ação sobre um ou outro tipo de nutriente seria determinada pela condição de acidez ou alcalinidade. Essa generalização não se sustentou por muito tempo, pois os resultados sobre a saliva não foram confirmados por outros pesquisadores, nem mesmo por Bernard e Barreswil.

Miahle confirmou os resultados de Bernard e Barreswil de que o suco gástrico alcalinizado passava a digerir o amido. Concluiu que esse procedimento devia permitir a manifestação da diástase presente na saliva que deglutida, misturava-se com o suco gástrico. Confirmou essa interpretação experimentalmente, mostrando que uma solução levemente acidificada de pepsina e diástase, que agia sobre “substâncias animais”, depois de neutralizada passava a agir sobre amido. Ao contrário de Bernard e Barreswil, Miahle supunha que a digestão de cada classe de nutrientes estava associada a um “fermento específico” (FRUTON 1972, p. 68; HOLMES 1974, p. 300).

Miahle procurou investigar especificamente a digestão das “substâncias animais”, na época também denominadas “albuminóides”. Como ponto de partida, fez uma revisão cuidadosa dos estudos anteriores sobre o assunto, partindo dos experimentos de Spallanzani e incluindo as pesquisas realizadas na Alemanha. Desse modo, segundo Holmes (1974, p. 303), pode perceber a direção em que o problema estava sendo trabalhado e chegar ao centro das questões a serem resolvidas. Concordou com as conclusões de Schwann, considerando que a pepsina devia ser o princípio ativo da digestão

gástrica⁹. Procuraram, então, demonstrar de forma decisiva que a ação do suco gástrico sobre os alimentos não estava associada ao ácido presente, mas à pepsina. Para isso, analisou e comparou os produtos da dissolução da fibrina em ácido hidrolórico diluído e em solução de pepsina¹⁰ acidificada com o mesmo ácido. Seus resultados mostraram diferenças claras: a fibrina dissolvida na solução ácida apresentava características similares às da caseína, pois se tornava turva pela ação do calor e precipitava pela edição de ácido, de álcali e de pepsina. Por sua vez, a fibrina dissolvida em solução ácida de pepsina não coagulava pelo calor, não precipitava com a adição de ácido ou álcali por nova adição de pepsina. Segundo Miahle, isso provava que a pepsina causava uma “completa metamorfose constitutiva” da fibrina, e não só sua dissolução (HOLMES 1974, p. 300). Concluiu também que o ácido presente tinha a função de dividir e hidratar o alimento, facilitando e tornando mais rápido o processo.

Miahle repetiu os experimentos com outros albuminóides (glúten, albumina e caseína) e confirmou sua conclusão. Os resultados que obteve indicaram que os produtos da digestão dos albuminóides apresentavam as mesmas propriedades químicas, independentemente da substância digerida. Assim, supôs que a ação da pepsina sobre os diversos albuminóides resultava num só produto, que denominou “albuminose” (HOLMES 1974; McCOLLUM 1957). Segundo Miahle, a albuminose era para os nutrientes nitrogenados o que a glucose era para os carboidratos, ou seja, seria a única substância nitrogenada passível de ser assimilada (HOLMES 1974, p. 301). Procurando demonstrar essa afirmação, Miahle citou um experimento realizado por Bernard, que havia observado que albumina dissolvida em água injetada na veia de cão aparecia na urina, ao contrário de albumina digerida em suco gástrico, que era assimilado. Miahle repetiu esse experimento, confirmando os resultados; depois, estendeu-o à caseína e à fibrina e obteve resultados similares. Nesse último caso, constatou que a fibrina não

⁹ Chegou a isso depois de analisar os resultados, inclusive repetindo experimentos, de Schwann e de outros pesquisadores que afirmavam ter isolado o princípio digestivo. No caso, a “chymosine” de Michel Deschamps, que Miahle verificou ser a pepsina combinada com outras substâncias, e a “gasterase” de Payen, que segundo Miahle era a própria pepsina num estado mais purificado (HOLMES 1974).

¹⁰ Para isolar a pepsina, adotou o método de August Vogel, baseado na precipitação com acetato de chumbo, desenvolvido a partir dos procedimentos do próprio Schwann (HOLMES 1974, p. 299).

digerida provocava a morte do animal.

Através de seus experimentos, publicados em 1846 e 1847, Miahle conseguiu mostrar mais claramente que a ação digestiva no estômago estava associada à pepsina. Além disso, sua idéia sobre a “metamorfose constitutiva” que os nutrientes nitrogenados sofreriam no estômago (que ele comparava à conversão do amido em glucose), dando origem à “albuminose”, deu impulso à uma nova visão sobre a digestão desses nutrientes (McCOLLUM 1957; HOLMES 1974).

Alguns anos depois, Carl G. Lehmann (1812-1863), químico-fisiólogo alemão, estudou a digestão de albuminóides e verificou que essas substâncias perdiam gradualmente suas propriedades características, embora sua composição elementar fosse mantida. Confirmou os resultados de Miahle, notando que os produtos da digestão de albuminóides diversos apresentavam várias propriedades químicas em comum. Por outro lado, verificou algumas diferenças quanto a essas propriedades, discordando da conclusão de Miahle de que eram uma única substância. Com base em seus resultados, Lehmann concluiu que havia produtos distintos resultantes da transformação digestiva dos albuminóides e os denominou conjuntamente de “peptonas” (HOLMES 1974, p. 303; HOLMES 1979). Essas conclusões de Lehmann foram publicadas em 1853, em seu tratado sobre química fisiológica.

Enquanto isso, Claude Bernard continuou suas investigações sobre o processo digestivo. No início de 1848, conseguiu chegar a um procedimento para produzir fistula pancreática em animais, o que possibilitava a obtenção de suco pancreático fresco em quantidade e reduzia a um mínimo os distúrbios causados ao animal. Iniciou, então, uma série de experimentos sobre a ação digestiva desse suco. Partindo de sua idéia de que todos os sucos digestivos continham um mesmo princípio ativo, cuja ação era determinada pelas condições do meio, realizou diversos experimentos de digestão “in vitro”. Mas seus resultados não confirmaram essa idéia: o suco gástrico agia sobre a carne e o suco pancreático não, sob as mesmas condições, e só o suco pancreático agia sobre o amido. Por outro lado, ao testar a ação desse suco sobre sebo, observou a formação de uma emulsão branca e homogênea, que indicava ter havido “uma ação peculiar do suco pancreático sobre a gordura” (BERNARD 1848, citado em HOLMES 1974, p. 379).

Bernard procurou, então, examinar comparativamente essa ação com a da bile e de álcali sobre gordura, através de experimentos “in vitro”.

Constatou que, embora a bile e a solução de bicarbonato de sódio também provocassem emulsificação, só a emulsão produzida com a presença de suco pancreático era perfeitamente homogênea e apresentava-se ácida. Testou também a ação de diversos outros fluidos corpóreos e combinações desses fluidos, para comparação, mas acabou concluindo que o suco pancreático agia sobre gordura de forma singular (HOLMES 1974, p. 380-2).

Antes de continuar os experimentos sobre a digestão das gorduras, Bernard procurou examinar as propriedades químicas do suco pancreático – o que, talvez, pudesse esclarecer seu modo de ação. Verificou que coagulava como albumina quando submetido à fervura ou através da adição de ácido acético ou clorídrico concentrados. Apesar dessa similaridade, considerou que deviam haver diferenças químicas entre a albumina e a substância constituinte desse suco – já que apresentavam propriedades fisiológicas diferentes – que seriam evidenciadas através de uma análise química mais completa. Holmes (1974, p. 382) observa que “era típico de Bernard considerar as propriedades fisiológicas como testes mais discriminantes de distinções químicas do que os testes químicos convencionais”.

Voltando aos estudos sobre a ação do suco pancreático, Bernard procurou testá-la sobre diversos tipos de gordura: óleo vegetal, manteiga e tocinho. No caso da manteiga, fez uma constatação interessante: a emulsão produzida, além de ter se tornado muito ácida, apresentava um odor pronunciado de ácido butírico. Reparou, então, que a emulsificação dos outros tipos de gordura pelo suco pancreático também liberava odores característicos. Procurou realizar um teste para verificar se a substância similar à albumina era essencial para isso. Precipitou-a com ácido acético concentrado e testou a ação do líquido restante. Mas este não agiu sobre as gorduras.

Intrigado, Bernard realizou um outro experimento – misturou suco pancreático e azeite de oliva – e pediu a químicos que analisassem a emulsão. Os resultados indicaram a presença de ácidos graxos. Bernard conhecia o trabalho de Chevreul sobre a constituição das gorduras ver (seção 2.1) e assim, foi capaz de concluir que o suco pancreático, além de emulsificar as gorduras, separava seus ácidos graxos (HOLMES 1974, p. 384).

Em seguida, Bernard procurou realizar experimentos fisiológicos sobre a ação do suco pancreático que testassem suas constatações. Bloqueando o duto pancreático, impediria a entrada desse suco no intestino e pode-

ria verificar se era essencial à digestão de gorduras. Depois de resolver alguns problemas experimentais, em geral associados às características fisiológicas do animal a ser utilizado, realizou um experimento importante com um cão. Bloqueou seus dutos pancreáticos, injetou sebo fundido em seu estômago, sacrificou-o após algum tempo e verificou que havia uns poucos vasos quilíferos em evidência e, ainda assim, bem magros. Além disso, a maioria dos vasos linfáticos e o duto torácico só continham linfa transparente, o que indicava a ausência do quilo leitoso característico da digestão de gordura. Concluiu que a quantidade de quilo formado tinha sido tão pequena que, se houvesse algum outro agente da digestão das gorduras além do suco pancreático, seu papel não era significativo.

Ainda em 1848, Bernard apresentou à "Sociedade Filomática" (Philomatic Society) suas conclusões sobre as funções digestivas do suco pancreático¹¹. Afirmou que esse suco continha uma substância orgânica particular que decompunha gordura neutra em ácidos graxos e glicerina. Sobre a bile, que muitos consideravam como o agente da digestão das gorduras, afirmou que tinha a capacidade de dissolver ácidos graxos. Através dos resultados de seus experimentos fisiológicos, concluiu que sem o suco pancreático, "não há emulsificação e, conseqüentemente, não há absorção de matérias gordurosas" (Bernard 1848, citado em HOLMES 1974, p. 387).

Os resultados e conclusões de Bernard sobre o suco pancreático tiveram grande repercussão. Na Alemanha, diversos fisiologistas passaram a fazer experimentos semelhantes aos descritos por ele. Na França, seu trabalho foi muito elogiado pela Academia de Ciências. Consideraram que, com isso, Bernard havia tornado completa a teoria da digestão: "agora, para cada uma das principais classes de nutrientes havia evidência persuasiva de que alguma metamorfose química, não só dissolução, ocorria" (HOLMES 1974, p. 394).

Por outro lado, alguns pesquisadores que procuraram repetir os experimentos de Bernard obtiveram resultados que pareciam contradizer suas conclusões e que geraram críticas ao seu trabalho. F.T. Frerichs, por exemplo, comparou a ação do suco pancreático com a da bile, saliva e soro de sangue sobre gordura e concluiu que, embora o suco fosse mais eficaz na

¹¹Holmes (1974, p. 387) ressalta que a forma com que Bernard descreveu seus experimentos e resultados fizeram-nos parecer mais decisivos e incontestáveis do que realmente eram.

emulsificação, a diferença entre os efeitos era pequena. Nos anos seguintes, Bernard continuou suas pesquisas sobre a secreção pancreática, visando dar mais suporte experimental às suas conclusões, e obteve resultados que a confirmaram decisivamente. Marcellin Berthelot (1827-1907) conseguiu isolar os ácidos graxos e glicerina resultantes da ação do suco pancreático sobre gorduras, mostrando que, como Bernard havia concluído, esse suco as decompunha (HOLMES 1974, p. 394-6).

CAPÍTULO 4

A ABORDAGEM QUÍMICA E AS TEORIAS SOBRE O PROCESSO NUTRICIONAL NA PRIMEIRA METADE DO SÉCULO XIX

O conhecimento químico sobre os compostos orgânicos derivado das análises e concepções químicas desenvolvidas nas primeiras décadas do século XIX foi aplicado em novas propostas de explicação dos fenômenos fisiológicos relacionados à nutrição. Desse modo, surgiram novas teorias sobre as transformações químicas envolvidas no processo nutricional, mais complexas e detalhadas, que incorporavam o conhecimento químico recente.

4.1. AS TEORIAS DE GMELIN E PROUT

Em 1827, Gmelin – que havia realizado pesquisas importantes sobre digestão, juntamente com Tiedemann¹ – apresentou uma teoria sobre nutrição animal e vegetal, fundamentada nos resultados recentes sobre a composição elementar das substâncias orgânicas, que seria muito comentada nos anos seguintes (HOLMES 1963, p. 70-1). Gmelin partiu do fato reconhecido de que os vegetais sintetizavam compostos orgânicos a partir de dióxido de carbono e água, síntese que se caracterizava pela remoção de oxigênio de um composto intermediário formado pela união de ambos (sendo, portanto, uma reação de redução). Considerou que quanto maior fosse a quantidade desse elemento removida, maior seria a complexidade do composto resultante, no sentido de uma maior “distância” com relação ao mundo inorgânico. Supôs, então, que os animais se caracterizavam por realizar o processo inverso, ou seja, oxidavam compostos orgânicos até resultarem compostos inorgânicos. Para dar suporte à sua idéia, apresentou uma lista de cerca de trinta substâncias de composição elementar conhecida, dispostas em ordem decrescente de proporção entre hidrogênio e oxigênio. Procurou mostrar que as primeiras substâncias da lista apareciam mais tardiamente no ciclo de um vegetal e que, por outro lado, as reações que ocorriam no organismo animal sempre originavam substâncias que apareciam no final da lista.

¹Suas pesquisas estão descritas na seção 3.2.

Assim, a “teoria dualista” de Gmelin considerava que “os vegetais aumentavam a complexidade dos compostos por redução, enquanto que os animais simplesmente os degradavam por oxidação” (HOLMES 1963, p. 69-70; FLORKIN 1972, p. 119). Essa idéia, central em sua teoria, permaneceu em discussão durante muitos anos e foi, inclusive, base para teorias de outros pesquisadores, como será visto numa próxima seção. Por outro lado, sua proposta de relacionar todas as substâncias orgânicas em uma ou duas séries foi logo descartada, à medida que a classificação de Prout foi se tornando amplamente aceita.

Paralelamente, Prout procurou estabelecer a seqüência de transformações químicas dos nutrientes no sentido de sua conversão a sangue e tecidos animais, partindo de sua classificação das substâncias alimentares e dos resultados de experimentos sobre digestão que realizara anteriormente. Com base na composição elementar característica dos compostos de cada classe de nutrientes e no fato dos organismos animais serem constituídos por representantes dos “albuminous” e dos “oily”, supôs que nenhuma modificação básica seria necessária para a assimilação de nutrientes dessas duas classes. Por outro lado, os “saccharine” deveriam ser convertidos a substâncias de uma das duas outras classes ao ser assimilados. Segundo Prout, durante a digestão os nutrientes de cada classe eram convertidos a variedades mais fracas e menos estáveis, pela adição de água a suas moléculas – o que ele demonstrava através da composição elementar de vários açúcares, e de óleos, que diferiam só no conteúdo de elementos da água – e passavam a formar o quimo, o qual era uniforme, independentemente dos compostos presentes. Na etapa seguinte, de absorção e assimilação, ocorria a remoção de parte dos elementos da água que haviam sido adicionados e os compostos do quimo eram absorvidos e transformados nos compostos do sangue. A água removida nesse processo seria exalada pelos pulmões. Prout considerou também que, nos capilares, uma parte do carbono da albumina do sangue era removida, transformando-a em gelatina, constituinte do tecido conjuntivo. O carbono removido seria eliminado na forma de gás carbônico, através da respiração (HOLMES 1963, p. 70-1; HOLMES 1964, p. 52-3). Com relação à fonte de nitrogênio para a conversão de nutrientes não nitrogenados em compostos nitrogenados, especialmente importante no caso de herbívoros, Prout manteve a suposição de que esse elemento era fornecido por uma substância altamente nitrogenada produzida no estômago e

duodeno a partir do sangue. A porção de sangue da qual o nitrogênio fora retirado era separada do restante pelo fígado e originava um dos componentes da bile, que se sabia ser bastante deficiente nesse elemento. Segundo Prout, o nitrogênio podia ser incorporado pelo animal a partir da atmosfera ou, inclusive, gerado (McCOLLUM 1957, p. 88-9).

A concepção geral de Prout sobre a nutrição animal foi inovadora ao incorporar a noção de constituintes moleculares, agrupados em classes definidas pela composição elementar, para explicar a conversão dos nutrientes nos constituintes do organismo animal. As teorias anteriores só levavam em conta a composição elementar dos materiais envolvidos, explicando os processos metabólicos em termos de trocas de elementos. Além disso, suas explicações químicas eram baseadas em resultados recentes da análise orgânica. Por outro lado, Prout não avançou muito no sentido do esclarecimento de processos como absorção e assimilação. Holmes (1964) chama a atenção para o fato de que o nível de detalhes das explicações de Prout caía muito quando ele passava da digestão, processo que já havia melhor estudado, para os processos que se seguiam. Também segundo Holmes (1964), apesar de Prout ter sido muito respeitado por seus contemporâneos como pesquisador em química animal e de sua classificação dos nutrientes ter sido amplamente aceita, suas idéias sobre o processo nutricional não chegaram a ser discutidas em tratados fundamentais sobre o assunto. Isso mostra que sua penetração e influência foi um tanto limitada para serem analisadas.

Prout supôs que durante o processo de digestão ocorria a adição de água às moléculas dos diversos nutrientes, convertendo-os em variedades mais "fracas", solúveis e menos estáveis. Desse modo dariam origem ao quimo, que era uniforme, independentemente do tipo de alimento ingerido (HOLMES 1964, p. 52). Como evidência, Prout apresentou fórmulas elementares de diversos açúcares e de óleos que só diferiam no conteúdo de elementos da água (HOLMES 1963, p. 71). Em seguida, durante as etapas de absorção e assimilação, parte da água incorporada era removida, resultando na formação dos componentes do sangue. Nos capilares, parte do carbono da albumina do sangue era removido para transformá-la em gelatina, constituinte do tecido conjuntivo. A água removida na absorção e o carbono retirado da albumina seriam eliminados através da respiração, este último na forma de gás carbônico.

Prout apresentou essas idéias sobre o processo nutricional em seu livro

de 1834, "Chemistry, Metereology and the Function of Digestion, Considered with Reference to Natural Theology". Num trabalho em Medicina publicado em 1840, reafirmou uma idéia sobre a fonte de nitrogênio para a conversão de nutrientes não nitrogenados em nitrogenados, que havia expressado em 1819. Considerou que esse elemento era fornecido principalmente através de uma substância altamente nitrogenada.

4.2. AS PESQUISAS DE BOUSSINGAULT E O DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE "INPUT-OUTPUT"

No final da década de 1830, Jean-Baptiste Boussingault(1802-1887), químico francês, retomou a questão da fonte de nitrogênio dos animais herbívoros e procurou verificar experimentalmente se ocorria, ou não, absorção desse elemento da atmosfera. A questão era antiga e estava associada, desde seu surgimento, ao fato de os vegetais apresentarem um conteúdo de nitrogênio bem inferior ao dos organismos animais. No final do século anterior Lavoisier havia concluído a partir de seus resultados experimentais que o nitrogênio que entrava nos pulmões na respiração era exalado sem ser alterado. Por outro lado, alguns pesquisadores no início do século XIX haviam chegado a resultados contraditórios a esse respeito e a questão permanecera em aberto. Sabia-se, através dos experimentos de Magendie em 1816, que os animais precisavam receber nitrogênio através de sua alimentação. Mas não havia evidências claras de que a quantidade ingerida na dieta era suficiente, nem de que esse elemento não era absorvido ou eliminado através da respiração (HOLMES 1987, p. 238).

Boussingault reconhecia a importância da dieta como fonte de nitrogênio. Em 1836, depois de determinar o conteúdo desse elemento em diversos vegetais, baseou-se nos resultados de Magendie e propôs que se considerasse o conteúdo de nitrogênio como medida do valor nutritivo de um alimento (McCOLLUM 1957, p. 101-2; GREENSTEIN & WINITZ 1961, p. 246; HOLMES 1974, p. 17). Nessa época ele se dedicava a investigar a fonte de nitrogênio dos vegetais e com esse objetivo havia desenvolvido um método experimental baseado na determinação do conteúdo de nitrogênio, carbono, oxigênio e hidrogênio dos vegetais em diversas etapas de crescimento e sob diversas condições de cultivo. Através de seus experimentos, realizados entre 1836 e 1838, havia mostrado que alguns tipos de vegetais absorviam

nitrogênio da atmosfera e também confirmado a utilização de gás carbônico pelos vegetais (HOLMES 1974, p. 17). Assim, ao decidir investigar se os animais herbívoros absorviam nitrogênio da atmosfera, Boussingault adaptou o método que havia utilizado anteriormente: procurou comparar as quantidades de cada um dos quatro principais elementos fornecidas na alimentação com as quantidades eliminadas através de secreções e excrementos. A alimentação era dosada de forma a manter o peso do animal constante. Segundo Holmes (1987, p. 238) Boussingault decidiu comparar as quantidades dos elementos simples, ao invés das substâncias constituintes dos organismos, para evitar problemas associados às incertezas ainda existentes quanto à composição química dessas substâncias.

Desse modo, em 1839 iniciou sua pesquisa. Realizou um primeiro experimento, de três dias de duração, com uma vaca. Determinou a composição elementar de uma amostra seca (1g) de cada tipo de alimentação fornecido (no caso, batata e feno), de cada excremento (urina e fezes) e do leite produzido. Considerou uniforme a composição desses materiais e, a partir da massa de cada um, quantificou a entrada e saída de cada elemento. Constatou que a quantidade de nitrogênio presente nos produtos eliminados era um pouco menor que a que havia sido ingerida na dieta, o que não era suficiente para concluir que havia ocorrido liberação desse elemento na respiração. Isso, por outro lado, parecia indicar que o nitrogênio do ar não era absorvido. Alguns meses depois Boussingault realizou um experimento similar com um cavalo e novamente constatou uma saída de nitrogênio um pouco menor que a entrada. Concluiu, então, que os resultados dos dois experimentos “pareciam estabelecer que o nitrogênio do ar não era, absolutamente, assimilado durante a respiração dos herbívoros” (BOUSSINGAULT 1839, citado em HOLMES 1987, p. 240). Indiretamente, seus resultados mostraram que um herbívoro devia obter através de sua alimentação a quantidade de nitrogênio que necessitava.

Através desses resultados, Boussingault procurou estabelecer o balanço completo da entrada e saída desses quatro elementos. O fato de os experimentos não incluírem a medida das trocas respiratórias impossibilitava que isso fosse estabelecido de forma direta. Como Holmes (1987, p. 240) observa, isso também não permitia avaliar a precisão dos resultados obtidos. Boussingault supôs que nenhum dos elementos presentes nos gases respirados era assimilado e, com base nisso, assumiu que as diferenças entre a

ingestão de carbono, hidrogênio e oxigênio através da dieta e sua eliminação através dos excrementos (e do leite, no caso da vaca), equivaliam à quantidade desses elementos eliminada na respiração. Considerou que o carbono saía todo na forma de gás carbônico e a partir disso calculou a quantidade desse gás que era expelida e a de oxigênio eliminada dessa forma. Como a proporção entre a quantidade de hidrogênio e o restante de oxigênio era próxima à da água, concluiu que representavam o vapor d'água expelido na respiração. Desse modo, Boussingault chegou ao balanço global de elementos de animais. Mais tarde, em 1844, procurou incluir a medida das trocas respiratórias nesse tipo de experimento. Nesse caso, usou um pombo, que por seu tamanho menor e pela natureza de seu excremento (semi-sólido) tornava mais fáceis e mais precisas as medidas experimentais. Mas não realizou simultaneamente a determinação dos gases respirados e a medida dos alimentos ingeridos e excrementos e, portanto, não chegou a estabelecer de forma direta o balanço de elementos. Seus resultados indicaram, novamente, que a saída de nitrogênio nos excrementos era menor que a entrada (a diferença significava cerca de 1/3 do nitrogênio presente na dieta). Isso levou Boussingault a concluir que esse elemento devia ser eliminado através da respiração (HOLMES 1987, p. 241-3).

Esses experimentos de Boussingault concretizaram a idéia de quantificar a entrada e a saída de elementos do organismo animal, já expressa por Lavoisier no final do século XVIII. Foram os primeiros experimentos em que se procurou estabelecer o balanço global de elementos e, em particular, o balanço de nitrogênio de um organismo animal, hoje fundamental em pesquisas sobre nutrição. Por outro lado, suas pesquisas marcaram o início dos estudos quantitativos sobre o metabolismo animal que se difundiriam na segunda metade do século, estimulados e fundamentados pelas teorias metabólicas de Liebig (FRUTON 1972, p. 403). Os métodos de pesquisa desenvolvidos por Boussingault foram considerados por seus contemporâneos como métodos que introduziam na fisiologia a "exatidão quantitativa associada à química" (HOLMES 1987, p. 245).

4.3 A TEORIA DUALISTA DE DUMAS

Jean Baptiste Dumas, proeminente químico francês, interessou-se pelos

experimentos de Boussingault sobre a fonte de nitrogênio dos vegetais e passou a acompanhar seus resultados. Designado pela Academia Francesa de Ciências como um dos examinadores dos trabalhos apresentados por Boussingault em 1838 e 1839, elogiou-os, enfatizando a importância do método que introduzira. Encadeou seus resultados sobre a absorção de nitrogênio da atmosfera por vegetais às trocas gasosas respiratórias e ao consumo de alimentos nitrogenados pelos animais herbívoros. Os vegetais absorveriam da atmosfera o gás carbônico e a água liberados pela respiração animal, e nitrogênio. Forneceriam, então, esses elementos aos animais ao serem consumidos como alimento. Em 1839, chamou Boussingault de “fundador da verdadeira estática de animais e vegetais” (HOLMES 1974, p. 18).

Dumas era professor de química orgânica na Sorbonne. Quando passou a lecionar na “École de Médecine” de Paris, em 1839, procurou dar ênfase à química animal em seu curso de química orgânica, para adequá-lo à formação dos novos alunos. Nesse contexto, foi apresentando sua visão química sobre a constituição e os processos internos do organismo animal com base nos resultados recentes de diversos pesquisadores, entre os quais Mulder e Boussingault. Dumas estendeu a idéia da ação inversa e complementar dos animais e vegetais sobre a atmosfera aos processos químicos internos desses organismos. Os vegetais seriam dotados de “aparelhos de redução” e os animais conteriam “aparelhos de combustão” (HOLMES 1974, p. 20). Essa concepção passou a guiar as reflexões e a interpretação de Dumas sobre as transformações químicas que ocorriam no organismo animal, que ele apresentava em suas aulas. Assim, supôs que essas transformações se constituíam numa série complexa de reações de combustão que ocorriam no sangue. A combustão ocorreria em etapas, originando diversos produtos intermediários até resultar em gás carbônico e água².

Dumas acreditava – como diversos outros químicos da época – que essas transformações podiam ser deduzidas a partir do conhecimento sobre as reações de substâncias orgânicas obtido “in vitro”. Portanto, descartava a necessidade de experimentação com animais vivos, defendida pelos fisiologistas. Assim, para desvendar as reações de combustão que ocorriam no sangue seria preciso conhecer a ação do oxigênio nesse fluido, o que, por sua

²Essas idéias de Dumas são bastante semelhantes às da teoria dualista de Gmelin, descritas anteriormente. Mas, não foi possível saber qual a relação entre esses cientistas e suas idéias, uma vez que essa questão não é abordada nos trabalhos consultados.

vez, era possível através do conhecimento da ação do oxigênio sobre compostos orgânicos. Como suporte para essas afirmações, Dumas apresentou algumas reações de oxidação parcial de substâncias orgânicas recentemente descobertas. Na época, os químicos estavam justamente “aprendendo a controlar as condições de reação de forma suficiente para produzir conversões limitadas de um composto a outro de maior grau de oxidação” (HOLMES 1974, p. 21).

Em 1841, na aula final de seu curso na “École de Médecine”, Dumas procurou sumarizar suas idéias sobre as interações entre vegetais, animais e a atmosfera, que afirmou ter desenvolvido junto com Boussingault. Desse modo, segundo Dumas e Boussingault, os vegetais absorviam gás carbônico e água e os decompunham em seus elementos constituintes para em seguida combiná-los – juntamente com o nitrogênio, que também era absorvido – produzindo substâncias orgânicas complexas: albuminóides, gorduras e carboidratos. Os albuminóides e as gorduras eram assimilados “quase intactos”, destinando-se ao crescimento e à renovação do organismo. Já os carboidratos, e também as gorduras³, seriam diretamente consumidas no processo respiratório. Assim, dividiram os nutrientes em “produtos assimiláveis” e “produtos combustíveis” (HOLMES 1974, p. 25). Nesse sentido, a digestão foi considerada como um processo simples, como uma mera dissolução, no qual os alimentos ingeridos eram colocados num “estado de divisão”, caso não o estivessem, de forma que pudessem passar para a circulação (HOLMES 1974, p. 26)⁴. Por outro lado, os nutrientes das três classes, em algum momento, passariam por uma série gradual de oxidações no sangue, fonte do calor animal e da “força” que os animais convertiam em movimento. Desse modo, originariam compostos cada vez mais simples, até resultarem compostos inorgânicos – gás carbônico, água e amônia – que seriam utilizados pelos vegetais, fechando o ciclo.

Holmes (1974, p. 21, 25-8) considera que as idéias de Dumas sobre os

³A única fonte consultada que descreve detalhadamente as idéias de Dumas – “Claude Bernard and Animal Chemistry”, de F.L. Holmes – não explica porque ele atribuiu às gorduras dois destinos metabólicos diferentes. Talvez Dumas tenha estabelecido condições que determinassem um ou outro destino para as gorduras, ou dividido esse nutriente em dois tipos.

⁴Holmes (1974) observa que, desse modo, Dumas desprezou todas as pesquisas que vinham sendo realizadas sobre digestão pelo fisiologistas, cuja conclusão era que o processo digestivo envolvia transformações químicas (ver seção 3.2).

processos químicos do organismo animal foram condicionadas por sua visão de que o conhecimento sobre esses processos era redutível a um problema da química orgânica. Dumas era um cientista bem sucedido em química orgânica e, por outro lado, não tinha experiência direta com questões fisiológicas. Desse modo, sem ter consciência da complexidade intrínseca a essas questões, sentiu-se à vontade para apresentar suas proposições, derivadas basicamente do conhecimento químico sobre as substâncias orgânicas. Por outro lado, suas idéias sobre os processos fisiológicos animais – publicadas ainda em 1841 – foram bastante influentes nos anos seguintes, pois encadeavam de forma clara e coerente esses processos, dando conta de sua contínua interação com o ambiente externo.

4.4 AS TEORIAS METABÓLICAS DE LIEBIG

Também no início dos anos 1840, outro químico influente, Justus von Liebig, publicou suas teorias químicas sobre o metabolismo animal, fundamentadas no conhecimento químico recente sobre as substâncias orgânicas. Durante a década de 1830, Liebig e os estudantes de seu laboratório⁵ haviam se dedicado a determinar a composição elementar do maior número possível de substâncias orgânicas, através do método de combustão simplificado que ele havia desenvolvido (ver seção 2.1). Liebig considerava fundamental conhecer a composição elementar de todos os compostos orgânicos. Segundo ele, esse conhecimento tornaria possível estabelecer as leis que determinam as reações químicas desses compostos, o que daria base para a compreensão de seu papel fisiológico. Nesse sentido, possibilitaria a elaboração de teorias químicas mais completas sobre os processos fisiológicos do organismo animal (HOLMES 1963, p. 73; HOLMES 1964, p. 17).

Já no final da década de 1830, impressionado com os resultados de Mulder sobre os albuminóides – que Julius Vogel, um dos seus estudantes, confirmara – Liebig passou a se dedicar mais sistematicamente à investigação de questões relacionadas à química animal. Para isso, ele e seus estudantes procuraram estender as pesquisas de Mulder sobre os albuminóides⁶.

⁵Depois de ter estudado na França com Gay-Lussac, Liebig voltou para a Alemanha e, em 1824, estabeleceu em Giessen um laboratório destinado à formação e treinamento de novos químicos, o primeiro no gênero (HOLMES 1964, p. 16).

⁶Paralelamente, Liebig instruiu alguns estudantes a realizar estudos sobre as substâncias das duas outras classes de nutrientes (de acordo com a classificação de Prout), gorduras e açúcares.

Determinaram a composição elementar e as propriedades físicas e químicas (características de solubilidade e reação) de diversos albuminóides isolados de materiais animais e vegetais. Através dos resultados obtidos, Liebig considerou confirmada sua suposição – derivada das pesquisas de Mulder – de que os vegetais continham albuminóides idênticos a cada um dos principais constituintes dos tecidos e fluidos animais (HOLMES 1964, p. 28; FLORKIN 1972, p. 149; HOLMES 1974, p. 30; GLAS 1979, p. 36).

Num artigo publicado em 1841, Liebig afirmou ter isolado albumina, fibrina e caseína vegetais. Com base nesses resultados, e supondo que as transformações químicas nos organismos vivos ocorriam no sentido de minimizar a necessidade de trocas de elementos⁷, Liebig concluiu que os animais herbívoros recebiam dos vegetais, já formados, seus constituintes nitrogenados. Os albuminóides vegetais seriam, portanto, assimilados diretamente, sem necessidade de mudanças em sua composição (ROSENFELD 1982, p. 9-10). Seguindo esse raciocínio, Liebig concluiu que esses resultados mostravam também que os nutrientes não nitrogenados não contribuíam para a constituição da estrutura organizada dos animais. Pois esta era composta por substâncias nitrogenadas cuja proporção de elementos era idêntica à dos nutrientes nitrogenados. Afirmou que o papel dos nutrientes não nitrogenados era o de fornecer carbono para a combustão respiratória, protegendo os constituintes nitrogenados do organismo do ataque do oxigênio absorvido na respiração. Assim, após a absorção, esses nutrientes seriam queimados no sangue, não chegando a ser assimilados (HOLMES 1964, p. 28; HOLMES 1974, p. 32).

Logo depois que Liebig publicou esse artigo (seu primeiro em química animal), Dumas e Boussingault publicaram suas idéias sobre a interação química entre animais, vegetais e a atmosfera (ver seção 4.3). Estas, em alguns aspectos, eram bastante semelhantes às idéias de Liebig sobre química agrícola, publicadas em 1840, e sobre os processos nutricionais do organismo animal. Isso desencadeou uma disputa entre Liebig e Dumas pela prioridade dessas idéias⁸, que fica clara através da correspondência entre

⁷ Glas (1978, p. 300) se refere a essa suposição de Liebig, presente também em seus trabalhos seguintes, como um princípio de “economia das transformações vitais”.

⁸ Segundo Holmes (1974, p. 28-9), a rivalidade entre os dois era antiga, vinha de questões relacionadas à estrutura química das substâncias orgânicas, sobre as quais os dois haviam divergido na década anterior.

ambos, entre Liebig e outros cientistas e nos artigos que cada um publicou, depois, sobre o assunto. Num desses artigos, Liebig expressou sua preocupação em publicar rapidamente suas idéias em química animal, expostas em suas aulas, para que não fossem apropriadas por autores que já haviam se apropriado de suas idéias em química agrícola. Em carta a um ex-aluno, Liebig chegou a acusar diretamente Dumas de plágio. Dumas escreveu um artigo defendendo-se. Liebig retrucou-o em outro artigo e estabeleceu-se uma grande discussão. Holmes (1974, p. 34-5) procura analisar os diversos aspectos dessa disputa e a trajetória das concepções de cada um deles e conclui que a dimensão que tomou não tem base em fatos. Possivelmente, segundo Holmes, isso tenha se ampliado por motivos como a disputa entre a Alemanha e a França pela primazia em ciência, assim como pelas rivalidades pessoais. Holmes ressalta que eles chegaram à mesma conclusão sobre o papel dos nutrientes nitrogenados e não nitrogenados por caminhos diferentes. Enquanto Dumas a deduziu a partir de sua concepção geral sobre o balanço das trocas materiais da natureza, Liebig partiu de suas suposições sobre os processos químicos do metabolismo animal. Além disso, embora ambos tivessem na química orgânica a base de suas teorias fisiológicas, havia diferenças fundamentais em suas concepções de nutrição. Dumas considerava que só os vegetais eram capazes de sintetizar novos compostos, atribuindo aos animais exclusivamente a degradação de substâncias orgânicas através de oxidação. Liebig, por outro lado, atribuía aos animais a síntese das substâncias dos nervos e do cérebro, que considerava dotadas de um nível superior de organização e que não tinham similares nos vegetais. Para Liebig os animais eram também capazes de transformar amido e alguns açúcares em gordura. Como a proporção entre carbono e hidrogênio dos primeiros era igual à das gorduras, bastaria remover oxigênio para realizar essa conversão (HOLMES 1974, p. 31-3). Essas diferenças resultaram num longo debate sobre a origem da gordura animal, envolvendo diversos cientistas, que será abordado numa próxima seção.

Assim, devido à disputa com Dumas, Liebig apressou-se em desenvolver e publicar suas idéias sobre química animal. Dedicou-se a desvendar as transformações químicas características do metabolismo animal através de uma abordagem estritamente química. Como Dumas e outros químicos

da época, Liebig pressupunha que essas transformações ocorriam segundo os mesmos princípios que regiam as reações "in vitro" das substâncias orgânicas. Assim, a partir do conhecimento desses princípios e da quantidade e composição das substâncias que entravam e saíam do organismo, procurou deduzir as reações intermediárias que ocorriam. Também como Dumas, Liebig não realizou experimentos com organismos vivos⁹: baseou-se nos resultados de suas análises e de experimentos realizados por outros pesquisadores para realizar suas deduções. A teoria química do calor desenvolvida por Lavoisier e sua idéia sobre a interrelação entre os processos fisiológicos, assim como as conclusões de Mulder sobre os albuminóides, também tiveram um papel fundamental no desenvolvimento das idéias de Liebig sobre o metabolismo animal.

À medida que finalizava a elaboração de alguma parte de sua teoria, Liebig a publicava, preocupado em garantir a prioridade de suas idéias. Assim, publicou um segundo artigo ainda em 1841, no qual definia princípios gerais do metabolismo. Pouco depois, no início de 1842, publicou outro artigo, detalhando as idéias sobre o processo nutricional expostas em seu primeiro artigo sobre química animal (HOLMES 1974, p. 37-8). Ainda em 1842, Liebig publicou um livro, "A Química Animal ou a Química Orgânica em sua relação com Fisiologia e Patologia" ("Die Thierchemie, oder die organische Chemie in ihrer Anwendung auf Physiologie und Pathologie"), no qual expôs toda sua teoria química sobre os processos metabólicos do organismo animal. Seu conteúdo, basicamente, era uma extensão das idéias contidas nos três artigos citados, com detalhes adicionais.

Liebig considerava que "a única fonte de 'força' para um animal era a força química obtida de seus alimentos"¹⁰ (HOLMES 1964, p. 43). Para ele, todas as atividades do organismo animal originavam-se de transformações dessa "força química", desde a produção de calor até a atividade muscular, o

⁹Segundo Holmes (1964, p. 25-6), Liebig realizou um único experimento com organismos vivos. Em 1840, determinou a ingestão e eliminação de carbono por um grupo de 855 soldados e calculou a quantidade desse elemento que devia ser atribuída à combustão respiratória. Mas, também segundo Holmes, seu experimento não foi mais preciso ou esclarecedor que os realizados por Boussingault anteriormente.

¹⁰Segundo Martins (1984, p. 85-6) a palavra alemã "Kraft", que atualmente é traduzida como "força", nessa época era utilizada com significados diversos, inclusive no sentido atual de "energia". Por outro lado, o termo "energia" só passaria a ter um significado preciso vários anos depois.

funcionamento dos órgãos, etc¹¹. Nesse sentido, reafirmou a teoria química do calor de Lavoisier: a única fonte do calor animal era a combinação do carbono e hidrogênio dos nutrientes com o oxigênio inspirado.

Na época, havia dúvidas sobre essa teoria, pois as evidências experimentais disponíveis não a confirmavam de forma decisiva. A dúvida era antiga: logo no início do século, pesquisadores que procuravam aumentar a precisão das medidas de Lavoisier das trocas gasosas respiratórias e da produção de calor, haviam chegado a resultados contraditórios (McCOLLUM 1957, p. 122; HOLMES 1964, p. 37). Além disso, experimentos como os de B. Brodie (1783-1862) – que em 1810 verificara que um animal decapitado esfriava rapidamente mesmo quando sua respiração era mantida artificialmente – levaram à conclusão de que a ação nervosa era fonte de calor animal. Certos experimentos haviam confirmado isso; outros, refutado (FRUTON 1972, p. 268).

Em 1822, a Academia Francesa de Ciências havia oferecido um prêmio para quem esclarecesse a questão. Dois trabalhos foram apresentados, um por César Despretz (1792-1863) e outro por Pierre Louis Dulong (1785-1818), com resultados experimentais muito próximos e conclusões diferentes. Ambos partiram da hipótese de Lavoisier, considerando que o oxigênio absorvido servia à combustão de carbono e hidrogênio, originando gás carbônico e água; a diferença entre o oxigênio absorvido e o oxigênio eliminado na forma de gás carbônico era atribuída à formação de água. Assim, ambos procuraram repetir os experimentos de Lavoisier (ver seção 1.2), desta vez medindo simultaneamente os gases respirados e o calor produzido por um animal, para que a variação da taxa respiratória não fosse fonte de erro na comparação dos dois processos. Além disso, usaram um calorímetro a água, mais adequado para manter normais as condições do animal. Este era colocado numa câmara rodeada de água; determinava-se a quantidade de oxigênio que entrava na câmara, a quantidade de gás carbônico que saía e a quantidade de calor absorvida pela água (determinada através da elevação de temperatura). Essa quantidade de calor era comparada com o

¹¹Holmes (1964, p. 42) observa que, por colocações desse tipo, Thomas Kuhn inclui Liebig entre os cientistas da época que já consideravam, implicitamente, o princípio de conservação da energia. Esse princípio ainda não havia sido enunciado formalmente quando Liebig escreveu o "Química Animal", mas seria proposto por J.R. Mayer ainda em 1842 e no ano seguinte por J.P. Joule (MARTINS 1984).

calor calculado a partir da quantidade de gás carbônico produzida e do calor de combustão do carbono (LEFÈVRE 1911, p. 8-9; LUSK 1922, p. 50-2); HOLMES 1964, p. 38-9). Desse modo, Despretz e Dulong constataram, independentemente, que o calor de combustão do carbono só dava conta de parte do calor absorvido pela água, em torno de 50 a 70%. Mesmo considerando que parte do oxigênio havia formado água e adicionando o calor de combustão do hidrogênio, o calor calculado não igualava o calor absorvido pela água. A partir desses resultados, Despretz concluiu que a respiração era a principal fonte do calor animal e que o restante poderia ser produzido pela "assimilação, movimento do sangue, fricção das diferentes partes" (DESPRETZ 1824, citado por LUSK 1922, p. 50 e por HOLMES 1964, p. 39). Por outro lado, também partindo desses resultados, Dulong concluiu que a combustão respiratória não fornecia o calor necessário para compensar as perdas de calor do animal e que, portanto, devia haver outra fonte de calor (HOLMES 1964, p. 39). Embora Despretz tenha recebido o prêmio da Academia, a teoria química do calor animal continuou sendo posta em dúvida, especialmente por fisiologistas.

Liebig não apresentou novas evidências que dessem suporte à sua visão sobre a origem do calor animal. Limitou-se a expressá-la com convicção e procurou explicar porque alguns experimentos, de outros pesquisadores, forneceram resultados que a contradiziam. Nesse sentido, Liebig considerou que nos experimentos de Despretz parte do calor absorvido pelo calorímetro devia ser atribuído ao resfriamento interno do animal. Porém, o próprio Despretz relatara em seu trabalho que havia tomado cuidados para evitar essas perdas. Além disso, Dulong, em experimentos similares, verificara que a temperatura interna do animal não se alterava. Liebig parece ter ignorado essas colocações. Holmes (1964, p. 34) ressalta que Liebig "não pesou objetivamente as evidências a favor ou contra suas conclusões" e procura explicar a convicção de Liebig a respeito da teoria química do calor. Conclui que estava ligada ao fato de que essa teoria era a única compatível com sua visão geral sobre as reações químicas, sua idéia de que os processos químicos internos e externos aos organismos vivos seguiam as mesmas leis e sua pressuposição do princípio de conservação da energia (HOLMES 1964, p. 40-1).

Liebig considerou que a oxidação respiratória dos nutrientes representava a soma de todas as transformações químicas que os alimentos sofriam

desde que entravam e até saírem do organismo animal. Ou seja, nenhuma outra reação podia ser considerada como fonte independente de calor – como Despretz havia suposto para explicar seus resultados – pois sua contribuição já estaria incluída na reação metabólica global, cujos produtos finais eram gás carbônico e água (HOLMES 1964, p. 41-2). Desse modo, Liebig estava considerando implicitamente em sua teoria a lei da soma constante de calor, conhecida como lei de Hess.

G.H. Hess (1802-1850) havia chegado a essa lei através de experimentos em termoquímica, realizados por volta de 1840. Havia verificado que o calor produzido numa reação química dependia exclusivamente do estado inicial e final das substâncias que participavam da reação. Assim, estabeleceu a lei da soma constante de calor: “a quantidade total de calor produzido na formação de um composto é uma constante, quaisquer que tenham sido as etapas intermediárias, e é igual à soma algébrica do calor liberado ou absorvido nessas etapas” (HOLMES 1964, p. 42; SCHELAR 1964, p. 227). Isso dava base à consideração de que o calor produzido na oxidação do carbono e hidrogênio dos nutrientes à dióxido de carbono e água fora do organismo animal era igual ao produzido no interior do organismo, nos processos metabólicos. Não se sabe se Liebig tinha conhecimento do trabalho de Hess ou se chegou independentemente à mesma conclusão. Schelar (1964, p. 227) observa que o periódico em que o trabalho de Hess foi publicado estava acessível a Liebig. De qualquer forma, a lei da soma constante de calor justificava as conclusões de Liebig.

Por outro lado, como consequência da suposição de que todas as atividades vitais provinham da força química produzida na oxidação dos alimentos, Liebig estabeleceu que os diversos processos fisiológicos do organismo animal mantinham-se interrelacionados de forma proporcional. Lavoisier já havia expressado essa idéia (ver seção 1.2), mas Liebig ampliou seu significado, relacionando essa proporcionalidade às transformações de uma mesma força. Além disso tornou-a mais persuasiva, associando-a às suas especulações sobre os aspectos químicos desses processos e embasando-a no conhecimento recente sobre a composição elementar das substâncias orgânicas.

Partindo desses princípios gerais sobre o metabolismo animal, de sua visão sobre reação química e da composição elementar das substâncias envolvidas, Liebig procurou deduzir as transformações químicas que definiam os processos metabólicos. Assim, elaborou um esquema detalhado sobre o

metabolismo das três classes de nutrientes e sua relação com a respiração, a realização de trabalho muscular e a produção de calor. Dividiu as três classes de nutrientes em dois grupos, de acordo com o papel fisiológico que lhes atribuía: nutrientes “plásticos”, representados pelas substâncias nitrogenadas animais ou vegetais, que seriam convertidos em tecidos e fluidos animais; e nutrientes “respiratórios”, incluindo as diversas substâncias não-nitrogenadas, que seriam oxidadas diretamente no sangue (FRUTON 1972, p. 269).

Liebig considerou que a albumina e a fibrina eram os principais nutrientes nitrogenados. Durante o processo digestivo seriam dissolvidas, passariam para o sangue e, através de um processo simples de solidificação – com pouca ou nenhuma modificação na composição química – converter-se-iam em fibrina muscular. Já como parte do tecido muscular, as proteínas seriam continuamente decompostas, em quantidade proporcional ao trabalho muscular realizado. Nessa decomposição as proteínas seriam separadas em duas partes: uma contendo a maior parte do nitrogênio e outra a maior parte do carbono. Ambas entrariam na corrente sanguínea e seriam gradualmente oxidadas, para produção de calor. Nesse processo, a parte nitrogenada seria convertida em uréia e produtos correlatos, que seriam excretados através dos rins. A parte “carbonácea” seria oxidada até dióxido de carbono, que seria exalado através dos pulmões. O carbono em excesso – com relação à necessidade de produção de calor para manutenção da temperatura – seria retido no fígado e transformado em ácido coleico (“choleic acid”), substância (ou mistura de substâncias) com grande proporção de carbono, que Liebig considerava ser o principal constituinte da bile. A bile, por sua vez, entraria no intestino e seria em grande parte reabsorvida, continuando esse ciclo até ser totalmente oxidada (HOLMES 1963; HOLMES 1964, p. 49-50). A gelatina era considerada por Liebig como um nutriente nitrogenado secundário, destinado à formação do tecido conjuntivo.

Segundo o esquema elaborado por Liebig, os nutrientes não nitrogenados – amido, açúcares, gorduras, etc – não participavam da formação de tecidos ou fluidos animais. Seram oxidados diretamente no sangue para produção de calor, quando a decomposição das proteínas dos tecidos não fornecesse substrato suficiente para a manutenção da temperatura corpórea. Esse era o caso dos animais herbívoros, que devido à menor quantidade de substâncias nitrogenadas ingerida na alimentação, apresentariam uma de-

composição mais lenta dos tecidos. Por outro lado, quando a absorção respiratória de oxigênio não fosse suficiente para oxidar os nutrientes não nitrogenados ingeridos, o amido e os açúcares ingeridos seriam convertidos em gordura (através da remoção de oxigênio de suas moléculas) e assim estocados, juntamente com a gordura ingerida (HOLMES 1964, p. 50-1).

Assim, direta ou indiretamente, os nutrientes ingeridos dariam origem ao trabalho muscular e forneceria o substrato da oxidação respiratória, que, por sua vez, produziria o calor animal. Isso explicava, segundo Liebig, a proporcionalidade entre esses processos metabólicos. Liebig reconheceu que suas conclusões eram especulativas e deveriam ser testadas através de experimentos fisiológicos. Mas, segundo Holmes (1964, p. 49), ele apresentou-as "com a confiança de quem tinha poucas dúvidas de que suas especulações seriam confirmadas". Liebig apresentou também as equações químicas que representavam as reações de adição, remoção e recombinação de elementos por ele descritas como características dos processos metabólicos. Eram equações hipotéticas, baseadas na composição elementar das substâncias envolvidas nesses processos, em geral balanceadas com os elementos da água, amônia ou oxigênio (substâncias que, supostamente, sempre estavam envolvidas), conforme fosse necessário. O próprio Liebig as considerou como tentativas, que serviriam de guia para novas investigações (HOLMES 1963).

A teoria de Liebig sobre o metabolismo animal foi bastante criticada nos anos seguintes, principalmente por ser derivada, quase exclusivamente, da composição elementar das substâncias orgânicas. Otto Kohlrausch, por exemplo, apesar de reconhecer que Liebig tornara mais clara que nunca a interrelação dos processos metabólicos, mostrou que suas conclusões sobre a origem do calor animal careciam de suporte experimental. O mesmo ocorria com sua suposição sobre a reabsorção da bile e sua participação na oxidação respiratória. Criticou também as equações apresentadas por Liebig, mostrando que era possível chegar a equações diferentes partindo das mesmas substâncias e adicionando ou removendo os elementos da água, oxigênio e amônia. Berzelius também criticou Liebig, dizendo que ele apresentava hipóteses como fatos estabelecidos e prevendo que em poucos anos suas equações estariam descartadas. As críticas de Berzelius foram especialmente duras para Liebig, que o admirava muito e a quem ele tinha dedicado seu livro (HOLMES 1963). A princípio, Liebig não aceitou as críticas e as

considerou ataques pessoais. Mas na terceira edição do "Química Animal", de 1846, introduziu modificações que indicavam que as tinha aceitado, embora não reconhecesse explicitamente. Chegou, inclusive, a suprimir as equações, afirmando que não tinham sentido sem confirmação experimental (HOLMES 1963).

Também nessa terceira edição, Liebig apresentou sua visão sobre a relação proporcional entre respiração e nutrição numa forma mais elaborada e detalhada. Descreveu quantitativamente a relação entre a taxa respiratória (entrada de oxigênio/saída de dióxido de carbono) e a composição elementar dos principais nutrientes. Com base nisso calculou, a partir da composição elementar de compostos das três classes de compostos nutrientes, as quantidades relativas de oxigênio absorvido e gás carbônico produzido em sua combustão (HOLMES 1964, p. 82). Calculou também o "valor respiratório" ou "capacidade de produzir calor" dos principais nutrientes, partindo de sua composição elementar e da idéia de que essa capacidade estava relacionada à quantidade de oxigênio necessária à sua combustão completa (LUSK 1922, p. 65). Sugeriu, então, que a partir da medida da taxa de gases respirados era possível calcular em que proporção estaria ocorrendo a oxidação de nutrientes não-nitrogenados e dos constituintes dos tecidos – mas não explicou como realizar esse cálculo (HOLMES 1964, p. 82).

Apesar das críticas direcionadas principalmente à sua natureza especulativa, a teoria metabólica de Liebig foi muito bem recebida pelos pesquisadores que se dedicavam a desvendar os fenômenos metabólicos. Tornou-se muito influente nos anos seguintes à sua publicação e contribuiu de forma fundamental para o desenvolvimento das pesquisas sobre o metabolismo animal: não só porque explicava e encadeava de forma muito clara e coerente os diversos processos metabólicos mas, principalmente, porque indicava caminhos para a investigação quantitativa desses processos. Sua idéia de que o metabolismo dos constituintes nitrogenados dos tecidos era a fonte do trabalho muscular e podia ser quantificado através da medida do nitrogênio excretado na urina, embora especulativa, indicava uma forma simples e direta de se obter informações quantitativas sobre esses processos (HOLMES 1964, p. 58). A partir dessa idéia, por exemplo, tornava-se possível determinar a influência da alimentação e da atividade física sobre o metabolismo das substâncias nitrogenadas. No mesmo sentido, sua

descrição quantitativa da relação entre respiração e nutrição, associada à sua idéia para medida do metabolismo dos tecidos e ao método de "input-output" de elementos de Boussingault, possibilitou o desenvolvimento de um método de quantificação das trocas metabólicas que levou ao esclarecimento de muitas questões a esse respeito (HOLMES 1964, p. 82; ver seção 7.1). Além disso, sua afirmação de que o metabolismo dos alimentos era a única fonte de energia para os animais estimulou os pesquisadores a considerar que, através da determinação cuidadosa dos tipos e quantidades de nutrientes ingeridos, podiam dar conta da energia gasta por um animal na produção de calor e trabalho (ver seção 7.2). Segundo Holmes (1964, p. 43), essa foi a principal contribuição de Liebig para as pesquisas subsequentes em calorimetria e metabolismo energético.

As especulações de Liebig sobre as reações metabólicas intermediárias acabaram sendo refutadas. Mas os caminhos indicados por ele para a investigação do metabolismo animal foram seguidos frutiferamente por diversos pesquisadores durante toda a segunda metade do século XIX.

CAPÍTULO 5

ORIGENS DA AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO VALOR NUTRICIONAL DOS ALIMENTOS

5.1 EXPERIMENTOS DE MAGENDIE SOBRE A ORIGEM DO NITROGÊNIO ANIMAL

Em 1816, Magendie retomou a questão da fonte de nitrogênio do organismo animal, que alguns pesquisadores ainda atribuíam à atmosfera. Com esse objetivo, decidiu verificar experimentalmente se uma dieta composta exclusivamente por substâncias não nitrogenadas era capaz de manter animais vivos. Assim, alimentou cães com açúcar e água destilada e verificou que não sobreviviam mais que um mês. Da mesma forma, manteve cães em dieta de manteiga ou azeite de oliva e obteve os mesmos resultados. Com base nesses experimentos, concluiu que, pelo menos em grande parte, o nitrogênio dos organismos animais era derivado de sua alimentação (LEICESTER 1974, p. 146).

Esses experimentos de Magendie, segundo Holmes (1974, p. 7), têm sido considerados como o "início da investigação científica da nutrição". Foi a primeira vez que se manteve animais em dieta de composição conhecida e controlada, por um período extenso de tempo, para obter informações sobre a importância nutricional de uma determinada substância.

5.2 ESTUDOS NUTRICIONAIS SOBRE A GELATINA

No final do século XVIII, a Inglaterra e a França enfrentavam problemas de escassez de alimentos para a população mais pobre. Na Inglaterra, um processo de redução de terras agrícolas resultou no aumento de preços e diminuição da disponibilidade de alimentos para uma crescente população de operários. Na França pós-Revolução Francesa, o problema da fome havia se tornado crítico (FRUTON 1972, p. 90-1; LEICESTER 1974, p. 145). Nesse contexto, estimulou-se a pesquisa científica de métodos agrícolas mais eficientes, que possibilitassem um aumento na produção de alimentos. Por outro lado, para amenizar o problema a curto prazo, defendeu-se o uso de gelatina na dieta dos pobres. Produzida a partir de ossos - material

que, normalmente, não era aproveitado - a gelatina era um nutriente barato. Além disso, durante o século XVIII a substância gelatinosa extraída dos ossos chegara a ser considerada como uma substância básica para a formação dos tecidos animais¹ (HOLMES 1974, p. 6). De acordo com as teorias sobre nutrição aceitas no final do século XVIII, era possível supor que a gelatina era nutricionalmente eficiente, pois, sendo uma "substância animal", não precisaria ser "animalizada" durante o processo de nutrição².

No início do século XIX, em 1812, Joseph D'Arcet (1777-1835) desenvolveu um novo processo para extração de gelatina, baseado na dissolução do fosfato de cálcio dos ossos com ácido clorídico. Esse processo possibilitava a produção de gelatina em maior escala e com um custo ainda menor. Algumas instituições se interessaram em introduzir gelatina nas sopas que forneciam a pobres e doentes. A Academia Francesa de Ciências foi consultada a respeito do valor nutricional dessa substância - se poderia substituir total ou parcialmente a carne - e sobre a possibilidade de efeitos danosos à saúde. Uma comissão foi nomeada para resolver a questão. Com base na literatura disponível e no fato de que a gelatina já vinha sendo utilizada como alimento sem causar problemas, concluiu que a gelatina podia ser considerada como a substância animal mais nutritiva. Para confirmar, realizou um experimento com pacientes de um hospital, cujo resultado foi considerado positivo. Na verdade, o resultado do experimento não acrescentou nada à questão, pois a gelatina foi fornecida com carne e legumes, na forma de caldo e os pacientes consumiram também carne assada durante o experimento. Com essa fraca base, em 1814, a Academia manifestou-se favorável ao uso de gelatina como alimento (McCOLLUM 1957, p. 75-6; HOLMES 1974, p. 7-8). Estudos realizados pela "Sociedade para Promoção das Artes", de Genebra, levaram a conclusões ainda mais favoráveis: os resultados indicaram que a gelatina era mais nutritiva que a carne.

Em 1816, Magendie relatou seus experimentos de dieta com cães, cujos resultados mostravam que os animais necessitavam de nitrogênio na dieta. D'Arcet considerou que isso também indicava que a adição de gelatina na dieta dos pobres - composta basicamente de vegetais - era importante por aumentar o conteúdo de nitrogênio. Estimulado por todos esses resultados,

¹Ver seção 1.1.

²Sobre a animalização dos nutrientes, ver seção 1.3.

D'Arcet patenteou em 1817 outro processo de extração de gelatina, baseado na passagem contínua de vapor através de uma câmara contendo ossos triturados (HOLMES 1974, p. 7-8).

No final da década de 1820, vários hospitais e outras instituições públicas serviam caldo de gelatina a seus pacientes e empregados, substituindo parcialmente a carne. Mas, nesse momento, Alfred Donné (1801-1878), médico de um dos primeiros hospitais a incorporar gelatina em suas refeições, passou a questionar esse uso e procurou realizar alguns testes. Substituiu seu próprio desjejum e almoço por caldo de gelatina e um pouco de pão e observou que passou a se sentir fraco e faminto, além de emagrecer. Procurou, então, alimentar cães só com gelatina, mas estes se recusaram a comer. Em 1831, com base nesses resultados, apresentou à Academia suas dúvidas quanto ao valor nutritivo da gelatina. Em seguida, outros médicos e farmacêuticos passaram a questionar os benefícios do uso dessa substância. A Academia, então, nomeou outra comissão para estudar o assunto. A "Comissão da Gelatina", como ficou conhecida, era presidida por Thenard e composta por Magendie, Chevreul e Dumas, entre outros. A Comissão procurou obter relatos das instituições que produziam e serviam gelatina, inspecionou essas instituições e realizou análises químicas do caldo de gelatina produzido. Mas, não chegou a nenhuma conclusão.

Entre 1836 e 1841, Magendie realizou um grande número de experimentos de dieta controlada com cães para a Comissão da Gelatina, partindo de sua experiência anterior. Em 1841, apresentou à Academia um relatório sobre o trabalho de pesquisa realizado pela Comissão, descrevendo esses experimentos, as dificuldades enfrentadas e os resultados obtidos (McCOLLUM 1957, p. 76-9; HOLMES 1974, p. 10-2). Assim, segundo Magendie, planejou-se uma primeira série de experimentos, em que os animais seriam alimentados com gelatina pura ou temperada, com gelatina misturada com pão, com carne ou ambos, em diferentes proporções. Outros cães seriam alimentados com o caldo de gelatina produzido por um hospital (o que tinha apresentado os melhores resultados) mais pão ou com uma quantidade equivalente de caldo de carne e pão, para que se pudesse comparar os resultados. Magendie logo se deparou com um problema: os animais se recusaram a comer gelatina pura e algumas das misturas só foram aceitas durante poucos dias. A Comissão considerou que esse fato, assim como a perda de peso de cães alimentados com gelatina e pão indicava que a

gelatina era um “nutriente insuficiente” (HOLMES 1974, p. 10). Assim, concluíram que a gelatina não era adequada como único alimento, mas que podia ser combinada com outros nutrientes sem problemas. Decidiram estender os experimentos a outros nutrientes isolados para, através de comparações, chegar a resultados mais decisivos.

Magendie procurou, então, manter cães em dieta só de albumina, fornecendo-lhes clara de ovo cozida ou crua. Novamente, os animais se recusaram a comer, mesmo quando foi oferecida uma mistura de clara de ovo e pão. Por outro lado, verificou que os cães aceitavam uma dieta só de fibrina de sangue. Mas, apesar de comerem bastante, foram perdendo peso e morreram num período de dois meses, com sintomas de inanição. Esses resultados surpreenderam a todos pois a albumina, que estava presente como constituinte do sangue e do ovo, já havia sido considerada como a principal fonte da matéria do organismo animal. No mesmo sentido, a fibrina de sangue, que apresentava as mesmas propriedades que a fibrina muscular, era considerada, segundo Magendie, “a substância nutritiva por excelência” (MAGENDIE 1841, citado em HOLMES 1974, p. 11). Curiosamente, cães mantidos em dieta só de glúten mantiveram-se vivos e saudáveis durante os três meses de duração do experimento. Diante desses resultados, Magendie supôs que o problema estava em alimentar os animais com uma única substância. Procurando explicar o resultado obtido com a dieta de glúten, considerou que devia conter resíduos de amido, não eliminados durante sua preparação. Além disso, com base nos resultados analíticos obtidos por G. Ladde em 1819, Magendie afirmou que o glúten podia ser separado em duas substâncias distintas de natureza albuminóide, uma das quais, denominada gliadina, dava origem a goma e mucilagem (McCOLLUM 1957, p. 78). Assim, a dieta de glúten teria fornecido aos cães uma mistura de nutrientes que havia garantido sua sobrevivência.

Magendie procurou, então, realizar novos experimentos de dieta, testando diversas combinações de albumina, fibrina e gelatina, pois ele considerava que a carne, um alimento excelente, era constituída por uma combinação natural dessas três substâncias (HOLMES 1974, p. 11). Mas os resultados foram, mais uma vez, surpreendentes: os cães mantidos nessas dietas também apresentaram sintomas de inanição.

Assim, depois de quase dez anos de estudos e centenas de experimentos, a Comissão da Gelatina chegou a poucas conclusões. No relatório apresen-

tado à Academia, Magendie justificou a demora (a expectativa era grande e a Comissão sofrera pressões para apressar seus trabalhos) com base nas dificuldades experimentais e na falta de *background* para avaliar a adequação de um nutriente. Nesse sentido, referiu-se à falta de padrões qualitativos ou quantitativos “para guiá-los na determinação do que é um nutriente adequado” (HOLMES 1974, p. 12). Entre as conclusões, afirmou que não era possível extrair de ossos um alimento que pudesse substituir total ou parcialmente a carne; que gelatina, albumina e fibrina em separado ou conjuntamente não eram suficientes para nutrir os animais e mantê-los com saúde e nem mesmo, num período maior, de mantê-los vivos. Por outro lado, a carne - onde a gelatina, albumina e fibrina estavam combinadas “de acordo com as leis da natureza orgânica” e associadas a outras substâncias, como gordura e sais - bastava para manter os animais bem nutridos por um período prolongado de tempo. Da mesma forma, ossos crus (no caso, fornecidos em maior quantidade) e glúten extraído de trigo ou de milho também eram suficientes para nutrir animais. Já a gordura pura sustentava os animais por algum tempo, mas de forma “imperfeita”, pois ocorria acumulação de gordura em todos os tecidos (McCOLLUM 1956, p. 76-7).

Magendie apresentou também sugestões para novas pesquisas e questionou as teorias sobre nutrição, dizendo que os trabalhos da Comissão da Gelatina tornavam evidente que, nessa área, a ciência estava ainda “em seus primeiros passos” (HOLMES 1974, p. 11). Os resultados e conclusões da Comissão foram bastante criticados pois, após tantos anos de pesquisa, esperava-se que fossem mais claros e conclusivos. Entre outros, Boussingault e Liebig os criticaram, considerando que os experimentos realizados por Magendie foram mal concebidos e que suas conclusões não se justificavam.

Holmes (1974, p. 13) considera que o que aconteceu à Comissão da Gelatina é o que acontece frequentemente aos cientistas quando são chamados a “resolver problemas ditados por necessidades sociais”, ao invés de problemas considerados solúveis com relação ao estado da ciência na época. Pois “simplesmente não havia meios técnicos ou conceituais suficientes para responder às questões colocadas à Comissão e portanto seus esforços para responder estavam fadados a parecer inadequados” (HOLMES 1974, p. 13). Isso impediu que se reconhecesse de imediato a importância das pesquisas realizadas por Magendie como parte dos trabalhos da Co-

missão, que acabaram mostrando que o fenômeno da nutrição animal era muito mais complexo do que se podia supor, a partir do conhecimento químico sobre as substâncias orgânicas. Mas isso não foi suficiente para demover os químicos do objetivo de desvendar os processos metabólicos exclusivamente através desse conhecimento. O próprio Dumas, que havia sido membro da Comissão da Gelatina, apresentou pouco depois do relato de Magendie sua teoria metabólica, elaborada exclusivamente a partir do conhecimento químico (ver seção 4.3).

Por outro lado, as pesquisas de Magendie definiram novos padrões para a avaliação da adequação nutricional de uma substância, dentro de uma forma de abordagem igualmente nova: os experimentos de dieta controlada. Isso fica claro quando se compara os experimentos nutricionais que eram realizados na época (por exemplo os de Donné sobre gelatina) citados anteriormente, com os experimentos de Magendie. Estes se destacam, principalmente, pela preocupação em estabelecer comparações (já que não se tinha noção do que era um nutriente “adequado”), pelo cuidado na definição das dietas a serem testadas e por considerarem a necessidade de se manter o experimento por tempo prolongado.

CAPÍTULO 6

A DESCOBERTA DA CAPACIDADE BIOSSINTÉTICA DO ORGANISMO ANIMAL

6.1 A CONTROVÉRSIA SOBRE A ORIGEM DA GORDURA ANIMAL

Entre 1842 e 1844, um aspecto do fenômeno nutricional foi o centro de um debate extenso nas sessões da Academia Francesa de Ciências: a questão da origem da gordura animal. Dumas e Liebig foram os protagonistas do debate; Payen e Boussingault participaram ativamente em defesa das teorias de Dumas e diversos outros pesquisadores contribuíram com os resultados de seus experimentos.

Na verdade, uma questão mais geral estava em discussão: se o organismo animal era capaz de produzir seus próprios constituintes ou estava limitado a recebê-los através de seus alimentos. De modo geral, Liebig e Dumas defenderam o mesmo princípio. Ambos consideravam que o organismo animal não era capaz de realizar sínteses orgânicas e, assim, os animais deviam receber dos vegetais, pré-formados, seus constituintes¹. Ambos, também, consideravam que os animais decompunham as substâncias ingeridas através de oxidações sucessivas, fonte do calor necessário para manutenção de sua temperatura corpórea. Mas, para Dumas, os animais só eram capazes de realizar reações de oxidação e Liebig, por outro lado, incluía outras possibilidades de transformação, através da adição, subtração ou recombinação de elementos. Assim, Liebig supunha que o organismo animal podia originar gordura a partir de amido e açúcares, através da remoção de moléculas de oxigênio. No apêndice de seu livro sobre química animal, Liebig relatou dois experimentos cujos resultados davam suporte à sua afirmação. Num deles, F. W. Gundlach havia mostrado que abelhas produziam cêra mesmo quando alimentadas só com mel ou só com açúcar. No outro, um amigo de Liebig havia mantido um ganso em dieta só de milho por trinta e seis dias e verificara que a quantidade de gordura acumulada no corpo do animal

¹Sobre as teorias metabólicas de Dumas e de Liebig, ver seções 4.3 e 4.4, respectivamente.

nesse período era muito maior que a contida no milho fornecido (HOLMES 1974, p. 56-7).

Dumas também considerava que a partir da composição elementar das substâncias orgânicas era possível deduzir suas transformações no interior dos organismos. Além disso, para Dumas (assim como para Liebig, e outros químicos da época), a realização "in vitro" de uma determinada reação orgânica era considerada como demonstração experimental de que essa e outras reações do mesmo tipo podiam ocorrer nos organismos vivos. Assim, com base na composição elementar dos diversos ácidos graxos conhecidos (em grande parte determinada por Chevreul), na recente demonstração experimental da conversão do ácido esteárico a ácido margárico por decomposição oxidativa (em 1840, por J. Redtenbacher) e no fato de que o ácido esteárico predominava na gordura de animais herbívoros e o ácido margárico na de carnívoros, Dumas procurou chegar às transformações químicas das gorduras no organismo animal. Supôs que os herbívoros assimilavam diretamente o ácido esteárico presente nos vegetais; os carnívoros, por sua vez, ingeriram esse ácido graxo e o decompunham por oxidação a ácido margárico, que era assimilado como constituinte da gordura dos carnívoros. De modo geral, segundo Dumas, as gorduras ingeridas eram emulsificadas e passavam para o sangue, onde os ácidos graxos que as constituíam eram oxidados em etapas sucessivas até originarem ácidos voláteis – então eliminados através da perspiração – ou ser totalmente decompostos em dióxido de carbono e água (HOLMES 1974, p. 51-3).

No final de 1842, Dumas e Payen criticaram os resultados e a conclusão proposta por Liebig a partir do experimento com o ganso. Apresentaram à Academia resultados analíticos que atribuíam ao milho 9% de gordura. Cálculos realizados a partir desse valor e dos dados apresentados por Liebig mostravam que a quantidade de gordura fornecida ao ganso através da dieta havia sido apenas um pouco menor que a gordura acumulada pelo animal durante o experimento. Supuseram, ainda, que essa diferença devia ser atribuída à gordura presente no animal antes do experimento. Essa colocação deu início ao debate, que se estenderia pelos anos seguintes.

Dois meses depois, Liebig publicou um artigo em resposta a Dumas. Usou os resultados de um experimento de balanço realizado por Boussingault em 1839, no qual ele determinara quantitativamente a ingestão de alimento por uma vaca e a saída de excrementos e leite (ver seção 4.2).

Liebig determinou a porcentagem de gordura em feno e batata (os alimentos que haviam sido fornecidos à vaca), calculou a quantidade de gordura ingerida e verificou que só correspondia a um quarto da gordura presente no leite produzido no mesmo período. Além disso, determinou a porcentagem de gordura em milho por dois métodos diferentes e chegou a um resultado de 4,67%, em oposição aos 9% constatados por Dumas e Payen. Também como evidência de que os animais eram capazes de produzir gordura a partir de outros nutrientes, Liebig ressaltou que o método de extração por éter utilizado para determinação de gordura incorporava aos resultados outros materiais solúveis em éter, como ceras e compostos de clorofila. Para se considerar que esses materiais também originavam a gordura animal, era preciso admitir que sofriam alterações químicas importantes. Porém, Liebig constatou que praticamente todo material ceroso ingerido por uma vaca aparecia em suas fezes (HOLMES 1974, p. 58-9). Assim, parecia que a visão de Dumas tornara-se insustentável.

Paralelamente, Boussingault havia chegado à questão da fonte da gordura animal, quando se dedicava a determinar experimentalmente quais os alimentos mais eficientes e baratos para criação de animais. Ao tomar conhecimento da controvérsia que envolvia Dumas e Payen, decidiu realizar experimentos de dieta controlada destinados especificamente ao esclarecimento dessa questão. Assim, nesses experimentos, Boussingault procurou determinar com precisão as quantidades de alimento ingerido e de leite produzido e o teor de gordura desses materiais. Os resultados indicaram que a quantidade de gordura fornecida pelos alimentos – no caso, feno e batatas – excedia, em pouco, a quantidade de gordura do leite produzido (HOLMES 1974, p. 63).

Enquanto isso, Payen obtivera dados favoráveis à visão de Dumas através de alguns amigos fazendeiros, aos quais pedira que observassem os efeitos sobre animais de mudanças diárias no tipo de alimentação. No início de 1843, Payen apresentou à Academia as novas evidências obtidas por ele, Dumas e Boussingault. Além disso, criticou o experimento das abelhas relatado por Liebig, alegando que estas podiam ter produzido cera a partir de gordura armazenada em seu organismo antes do experimento, e não a partir do açúcar ingerido. Por outro lado, Holmes (1974, p. 63) observa que eles amenizaram a concepção inicial de Dumas: segundo o relato de Payen, as gorduras ingeridas pelos animais eram assimiladas “mais ou me-

nos modificadas". Segundo Holmes (1974), essa mudança se deu porque eles haviam reconhecido que os materiais cerosos presentes em vegetais que eram incluídos na análise de gorduras eram distintos da gordura animal. Mas mantiveram a idéia de que só oxidações ocorriam em animais, considerando que os materiais cerosos poderiam ser oxidados tornando-se ácido esteárico ou oléico.

Liebig criticou-os em carta à Academia Francesa, por não haverem comentados os argumentos que apresentara em seu último artigo. Reafirmou que os materiais cerosos eram quase todos encontrados nas fezes e reapresentou os cálculos que fizera a partir dos experimentos de Boussingault. Além disso, colocou em dúvida a possibilidade de conversão de cêra em ácido esteárico no sangue, argumentando que a cera tinha um ponto de fusão mais alto que a temperatura de um animal e não era saponificável, o que tornava difícil que passasse para o sangue.

A carta de Liebig foi lida numa sessão da Academia. Payen procurou rebater reafirmando o teor de gordura do milho que haviam determinado. Dumas criticou o fato de Liebig ter combinado os resultados experimentais de Boussingault com suas próprias análises do feno, batata e leite. Argumentou que o teor de gordura em alimentos e leite era muito variável e que, portanto não tinha sentido usar os resultados obtidos a partir de feno e batata de uma localidade e leite de determinada vaca para tirar conclusões sobre um experimento realizado em outro lugar e com outra vaca. Assim, considerou que os cálculos e conclusões de Liebig não tinham valor. Pouco depois, Boussingault fez estimativas sobre a entrada e saída de gordura em seu experimento de 1839 e reconheceu que a quantidade desta no leite excedia à recebida pela vaca através da dieta. Para explicar esses resultados desfavoráveis, considerou que a extração de gordura por éter podia não ser completa.

O debate continuou, através de cartas, artigos e relatos à Academia Francesa de Ciências. Holmes (1974, p. 68) observa que, a essa altura, o foco da discussão havia mudado. Dumas já havia admitido a formação de gordura no organismo animal e a questão, agora, era sobre qual tipo de nutriente podia ser convertido em gordura. Dumas, Payen e Boussingault consideravam possível a conversão de materiais cerosos em gordura; Liebig mantinha que amido e açúcares davam origem à gordura animal. Num artigo publicado em junho de 1843, os três químicos franceses chegaram

a admitir a possibilidade de transformação de açúcar em gordura, mas pareciam fazer questão de manter a divergência com Liebig: supuseram que, se esse fosse o caso, o processo deveria ocorrer durante a digestão, com o açúcar dando origem a ácidos graxos. Liebig, por outro lado, afirmava que o açúcar era convertido no sangue em gordura neutra (HOLMES 1974, p. 70-1).

Também em junho de 1843, Jules Pelouze (1807-1867) relatou à Academia os resultados de suas pesquisas recentes sobre fermentação. Havia descoberto que, sob determinadas condições, cuidadosamente controladas, era possível produzir ácido butírico a partir de açúcar, através de fermentação. Ressaltou o significado de sua descoberta para o debate que se dava sobre a fonte da gordura animal: de acordo com seus experimentos o açúcar podia originar um ácido graxo sob condições brandas, sem necessidade de alta temperatura ou reagentes enérgicos, de forma compatível com as condições internas de um organismo animal (HOLMES 1974, p. 77-80).

A descoberta de Pelouze representava o tipo de evidência experimental considerada suficiente pelos químicos como demonstração de que tal reação – e reações análogas – ocorriam no organismo animal. Mas Payen procurou minimizar seu significado. Disse que já haviam previsto esse tipo de transformação e que, além disso, o conteúdo de ácido butírico da manteiga era pequeno. Por outro lado, Holmes (1974, p. 82) ressalta que, enquanto os químicos franceses pudessem mostrar que a entrada de matéria gordurosa através da alimentação dava conta da gordura armazenada, secretada ou eliminada pelos animais, eles podiam assumir que não havia formação de gordura no organismo animal.

Evidências decisivas nesse sentido vieram através de um experimento de balanço realizado pelo próprio Dumas, junto com um importante zoologista, Henri Milne-Edwards (1800-1885). Seu objetivo era mostrar que abelhas alimentadas só com mel produziam cera a partir da gordura armazenada em seu corpo. Mas os resultados mostraram que essa gordura, mais as substâncias gordurosas ingeridas através do mel não davam conta da cera produzida. Além disso, ao final do experimento as abelhas ainda continham gordura no corpo. Assim, tiveram que concluir que as abelhas produziam cera.

Payen ainda procurou reduzir a importância desses resultados para o debate, questionando se a demonstração da conversão de açúcares em cera

equivalia à da conversão de açúcares em gorduras. Nos meses seguintes outros pesquisadores, como Charles Chossat e Lyon Playfair, apresentaram resultados experimentais aparentemente desfavoráveis à visão de Dumas, Payen e Boussingault. Já em 1844, Jean François Persoz relatou seus experimentos de dieta controlada com os gansos. Selecionou animais de tamanho e peso similares e, antes de iniciar o experimento, sacrificou um deles e pesou seu sangue, fígado, a gordura ao redor dos intestinos e a gordura presente nos tecidos subcutâneos e em outras partes do corpo. Alimentou os outros gansos exclusivamente com milho, pesou-os diariamente e, após sacrificá-los, repetiu a quantificação de gordura corpórea. Seus resultados confirmaram claramente a formação de gordura pelo organismo animal.

A questão parecia decididamente resolvida, mas Boussingault ainda procurou realizar alguns experimentos de dieta controlada para certificar-se dessa conclusão. Holmes (1974, p. 96) supõe que Boussingault insistiu nisso porque queria julgar a questão através dos padrões rigorosos que estava procurando estabelecer para experimentos nutricionais. Assim, entre outros, procurou repetir os experimentos de Playfair e os de Persoz. Considerava que o período destinado a cada tipo de dieta nos experimentos de Playfair – um dia – não possibilitava qualquer conclusão sobre a fonte da gordura do leite. Procurou, então, estender o período experimental, testando as mesmas dietas. Manteve duas vacas por dezessete dias em dieta de beterraba, pesando-as diariamente e determinando o conteúdo de gordura dos alimentos, excrementos e leite. Verificou que a quantidade de gordura no leite excedia a quantidade fornecida na alimentação. Por outro lado, notou que o animal havia perdido mais peso que o peso da gordura do leite produzido durante o período do experimento. Assim, supôs que essa gordura devia derivar das próprias reservas do animal. Em seguida, alimentou-as com feno durante quinze dias, nos quais as vacas ganharam peso. Constatou que a quantidade de gordura fornecida pelo feno era maior que a presente no leite produzido e nos excrementos. Testou, então, uma dieta exclusiva de batatas e obteve resultados similares aos obtidos com a dieta de beterraba. Boussingault procurou testar a adequação nutricional dessas duas dietas. Considerou que uma alimentação adequada devia fornecer substâncias nitrogenadas em quantidade suficiente para compensar a perda de nitrogênio nas excreções, carbono suficiente para repor o consumo respiratório e sais suficientes – fosfato em particular – para repor as

perdas nas excreções. Uma vez que, segundo suas análises, a dieta de batata ou beterraba satisfazia esses critérios, concluiu que o problema dessas dietas estava no suprimento inadequado de gordura. Boussingault repetiu também o experimento de Persoz com gansos e confirmou seus resultados (HOLMES 1974, p. 96-103). Depois de finalizar todos os experimentos destinados a resolver a questão da gordura animal, já em meados de 1845, Boussingault enviou uma carta à Academia relatando seus resultados e conclusões. Reconheceu que os animais podiam produzir sua gordura a partir de nutrientes diversos. Por outro lado, ainda insistiu que alimentos como a batata e a beterraba eram menos eficientes para a engorda de animais do que alimentos mais ricos em gordura, como grãos.

Holmes (1974, p. 108-9) ressaltava que o significado dessa controvérsia sobre a origem da gordura animal foi além do esclarecimento dessa questão: o debate como um todo foi um teste para a abordagem química dos fenômenos metabólicos proposta por Liebig e Dumas. A discussão evidenciou a falta de suporte experimental das proposições de ambas as partes e, desse modo, obrigou-os a procurar evidências que as ressaltassem. Também nesse sentido, mostrou que não era tão simples deduzir as transformações químicas internas dos organismos animais a partir do conhecimento sobre a composição e as reações características das substâncias orgânicas "in vitro". Por outro lado, ficou enfatizada a importância de se considerar as condições fisiológicas sob as quais essas transformações ocorreriam, como Magendie e Donné ressaltaram em suas intervenções no debate. O próprio Boussingault incorporou em suas pesquisas posteriores a preocupação com a dimensão fisiológica. Ainda em 1845, por exemplo, ele procurou determinar o local da formação de gordura no organismo animal e para isso incluiu em seus experimentos análises do conteúdo estomacal, do quilo, etc. (HOLMES 1974, p. 112-3).

6.2 A DESCOBERTA DA FUNÇÃO GLICOGÊNICA DO FÍGADO

Em 1848, Claude Bernard decidiu verificar através de experimentos fisiológicos onde ocorria a destruição do açúcar no interior do organismo animal. Havia se dedicado recentemente a estudos sobre o diabetes, sem ter chegado a resultados conclusivos. Como o principal sintoma dessa doença

era a presença de açúcar na urina, Bernard acreditava que sua causa devia estar ligada a problemas na destruição dessa substância – daí seu interesse em determinar o local dessa destruição (FLORKIN 1972, p. 197). Supunha, em acordo com a visão predominante na época, que o açúcar presente no sangue provinha diretamente dos alimentos e era consumido no processo respiratório. Supunha também que, normalmente, esse nutriente era destruído nos pulmões – o que o levava a considerar o diabetes como uma doença dos pulmões. Entretanto, só depois de vários meses e muitos experimentos – enfrentando diversas dificuldades técnicas e problemas inerentes à complexidade das condições fisiológicas – Bernard pode concluir que suas suposições iniciais estavam erradas. Através de sua pesquisa verificou que o açúcar presente no sangue não era destruído no organismo animal: ao contrário, era produzido, independentemente de uma fonte alimentar imediata, no fígado.

A história da descoberta da função glicogênica do fígado foi estudada por diversos historiadores, que procuraram estabelecer a seqüência de raciocínio e experimentação seguida por Bernard, que o levou a essa descoberta. Entre estes, destacam-se J. M. D. Olmsted e F. G. Young, que procuraram compreender o caminho seguido por Bernard através da análise das diversas obras em que ele trata do assunto (FLORKIN 1972). M. Grmek e F. L. Holmes foram ainda mais longe e analisaram também anotações de laboratório de Bernard no período que antecedeu a descoberta, a partir das quais acompanharam cada um de seus passos na direção dessa descoberta. Desse modo, curiosamente, ambos constataram que a descrição dos acontecimentos apresentada por Bernard no artigo que publicou em 1848 (ano em que constatou a descoberta), em sua tese de doutorado, de 1853, e em seu livro sobre medicina experimental, publicado em 1865, não estava de acordo com seus registros de laboratório. Através de pesquisas cuidadosas, Grmek (1968) e Holmes (1974) mostraram que a descoberta da função glicogênica do fígado foi muito mais difícil e cheia de erros e acertos do que Bernard procurou mostrar em seus relatos “públicos”. Nesta seção, são descritas de forma resumida as principais etapas dessa descoberta, com base nos trabalhos de Holmes e Grmek, que dão idéia das dificuldades teóricas e experimentais enfrentadas por Bernard até chegar à conclusão de que o açúcar presente no sangue era produzido pelo fígado.

Partindo da hipótese de que o açúcar era destruído nos pulmões, Ber-

nard realizou um primeiro experimento: colocou tecido pulmonar recém retirado de um coelho em contato com uma solução de glicose, em banho-maria a 45°C. Verificou que a glicose desaparecia após algumas horas², o que parecia confirmar sua hipótese. Entretanto, ao repetir o teste com tecidos de outros órgãos – fígado, coração, vesícula, e, novamente, pulmão – deparou-se com resultados bastante confusos. A glicose também desaparecia em contato com outros tecidos, menos no caso do tecido hepático e, em oposição ao resultado anterior, pulmonar. Resolveu, então, abordar a questão de outra forma, mais direta. Injetou solução de glicose na veia jugular direita de um cão e retirou amostras de sangue da artéria carótida direita, ou seja, após passagem pelos pulmões³. Detectou açúcar nas amostras, o que indicava que essa substância não era destruída nesse órgão. Repetiu o experimento, retirando amostra de sangue da própria veia onde injetara o açúcar e constatou que, embora tivesse percorrido o sistema circulatório, o sangue ainda continha essa substância, em quantidade similar. Esse resultado parecia descartar sua segunda hipótese: o açúcar também não era destruído ao passar pelos capilares e tecidos. Depois de novas repetições e resultados inesperados, considerou que devia seguir o açúcar que entrava na circulação naturalmente, através do sistema digestivo. Alimentou um cão com sacarose, glicose e amido e depois de 3 horas coletou amostras de sangue de diversas veias e artérias. O açúcar estava presente em todas as amostras, embora a intensidade da reação fosse variável, indicando quantidades diferentes. Ou seja, nenhuma pista sobre o local da destruição do açúcar (GRMEK 1968, p. 146-8; HOLMES 1974, p. 411-6).

Paralelamente, Bernard procurou examinar novamente, "in vitro", se algum tecido ou fluido animal provocava a destruição de glicose quando em contato com essa substância. Não obteve, porém, resultados que esclarecessem a questão. Realizou novos experimentos de injeção intravenosa de solução de glicose e obteve resultados confusos. Repetiu o experimento em que o animal era alimentado com carboidratos e constatou, novamente, a

²Claude Bernard usava o reagente de Barreswil para detectar qualitativamente a presença de glicose. Era possível estimar se havia pouco ou muito açúcar pela intensidade da reação. Quase sempre ele procurava confirmar o resultado através de fermentação.

³Holmes (1974, p. 413) considera esse experimento de Bernard como um experimento de "input-output" a nível de órgão, uma vez que a sua idéia foi de analisar o sangue que entrava e o que saía dos pulmões.

presença de açúcar em amostras de sangue retiradas de vários pontos do sistema circulatório. Curiosamente, ao examinar amostras de sangue e outros fluidos corpóreos de uma cadela em jejum, encontrou açúcar no sangue mas não nos conteúdos estomacal e intestinal. Segundo Holmes (1974, p. 421), esse resultado desviou a atenção de Bernard do problema da destruição do açúcar e indicou-lhe a questão da origem do açúcar presente no sangue. Antes, no entanto, esses resultados precisavam ser confirmados.

Bernard procurou, então, investigar a presença de glicose no sangue de uma animal que não tivesse recebido nenhum carboidrato em sua alimentação. Analisou amostras de sangue de um cão mantido em jejum por 6 dias e constatou que o açúcar estava presente em quantidade muito pequena, pois a reação com o reagente de Barreswil foi fraca, assim como o resultado do teste de fermentação. Em seguida, alimentou o cão exclusivamente com carne durante 8 dias e repetiu as análises. Dessa vez, verificou a presença de açúcar, em quantidades diversas, no sangue retirado de vários locais. Chamou a atenção, entretanto, a grande quantidade detectada no sangue da veia porta e a ausência dessa substância no estômago e intestino do animal. Esses resultados surpreenderam Bernard e levantaram diversas questões, particularmente a da origem do açúcar encontrado na veia porta. Segundo Grmek (1968, p. 151) e Holmes (1974, p. 422), os fatos eram tão surpreendentes que Bernard chegou a duvidar da especificidade do reagente de Barreswil.

Outros experimentos do mesmo tipo foram realizados para fornecer novas informações e confirmaram os resultados anteriores. Bernard supunha, agora, que algum órgão próximo ao sistema portal fornecia o açúcar encontrado. Procurou comparar o conteúdo de glicose – usando o teste de Barreswil e de fermentação – do sangue das extremidades da veia porta, das veias que formavam o sistema porta e dos órgãos a eles conectados. Constatou que o sangue próximo à entrada da veia no fígado continha muito açúcar, ao contrário do sangue da outra extremidade e das veias próximas. Entre os órgãos, só o tecido do fígado continha açúcar, e em grande quantidade. Com base nesses resultados, Bernard supôs que o fígado estava associado à produção do açúcar presente no sangue da veia porta, embora soubesse que o fluxo da corrente sangüínea levaria as substâncias produzidas no fígado na direção oposta à essa veia. Procurou examinar tecido hepático de diversos animais e em todos constatou a presença de grandes quantidades de

açúcar. Realizou ainda novas análises de amostras de sangue de animais mantidos em jejum, através das quais confirmou, novamente, que o açúcar era encontrado no sangue independentemente de uma fonte alimentar direta. Os resultados desses experimentos mostraram também que após um jejum muito prolongado o fígado dos animais já não continha açúcar. Isso o levou a supor que o fígado devia formar açúcar a partir dos nutrientes e estocá-lo. Mas alguns resultados pareciam inexplicáveis. Por exemplo em alguns casos era possível detectar açúcar no sangue de um animal em jejum, mas não em seu fígado. Alterou as condições experimentais – reduziu o período de jejum, combinou-o com dieta sem carboidratos – e a forma de matar os animais, voltou a questionar a eficácia do teste de Barreswil. Experimentos subsequêntes mostraram que o açúcar sempre estava presente no fígado e no sangue dos animais que não o haviam recebido da alimentação (GRMEK, 1968, p. 151-3; HOLMES 1974, p. 425-5).

Quanto à presença de açúcar na veia porta, cujo sangue *entra* no fígado, Bernard considerou que podia estar ocorrendo um refluxo de sangue do fígado para essa veia quando abria o abdomen dos animais, depois que o movimento circulatório havia cessado. Através de experimentos nos quais fechava a veia porta antes de abrir o abdômen, confirmou sua hipótese. Além disso, constatou que o sangue das veias supra hepáticas continha açúcar e, desse modo, confirmou que o fígado era a fonte de açúcar presente no organismo animal (GRMEK 1968, p. 153; FRUTON 1972, p. 197). Por outro lado, Grmek (1968, p. 153) e Fruton (1972, p. 197) observam que Bernard só pôde chegar a essa conclusão porque seu reagente não era suficientemente sensível para detectar o açúcar que sempre está presente no sangue portal, fato que certamente o confundiria.

Em outubro de 1848, Bernard apresentou à “Sociedade de Biologia” os resultados de sua pesquisa. No mesmo ano, foi publicado seu trabalho “Sobre a origem do açúcar na economia animal”. Seu relato, como foi dito, apresenta os experimentos que realizara nos últimos meses numa seqüência ordenada e lógica, bastante diferente do que foi constatado por Grmek e Holmes a partir de suas anotações de laboratório. Bernard omite os resultados confusos e contraditórios que obteve até corrigir determinados erros na concepção dos experimentos e as diversas dificuldades e dúvidas que enfrentou ao longo dessa pesquisa. Através de seu relato, segundo Grmek (1968, p. 143), Bernard dá a impressão de que logo após o início dos

experimentos havia percebido que sua suposição inicial – de que o açúcar tinha origem alimentar e era destruído no organismo animal – estava errada. O que não corresponde, como foi visto, às suas anotações de laboratório.

A descoberta de que o organismo animal era capaz de produzir açúcar independentemente de uma fonte alimentar dessa substância significou o fim da teoria dualista de Dumas e da visão, prevalecente na época, de que o açúcar presente no sangue provinha diretamente da alimentação (LEICESTER 1972, p. 169). O próprio Bernard ressalta isso em seu artigo de 1848, reforçando sua posição de crítico contundente da visão dos químicos sobre o metabolismo animal e, principalmente, da forma com que chegaram às suas conclusões – sem levar em conta as condições fisiológicas (HOLMES 1974, p. 441-3; ver seções 4.3 e 4.4). Por outro lado, Holmes observa que a teoria de Dumas já saíra bastante enfraquecida da controvérsia sobre a origem da gordura animal, quando ficou demonstrado que os animais eram capazes de produzir gordura a partir de outros nutrientes (ver a seção anterior).

Alguns anos depois, em 1857, Bernard relatou o isolamento e purificação – realizados com a ajuda de Pelouze – de uma substância similar ao amido, a partir de tecido hepático. Considerou que o açúcar era produzido no fígado a partir dessa substância, à qual se referiu como “matéria glicogênica”, através da ação de um fermento. Concluiu, então, que a função glicogênica do fígado envolvia dois processos distintos: a criação da matéria glicogênica e a sua transformação em glicose (FLORKIN 1972, p. 200; FRUTON 1972, p. 407; LEICESTER 1974, p. 169; HOLMES 1974, p. 441).

As descobertas de Bernard sobre a função glicogênica do fígado influíram em sua visão sobre o processo nutricional. A partir dessas descobertas Bernard estabeleceu o conceito da nutrição indireta: os alimentos ingeridos seriam “dissolvidos e modificados” pelos sucos digestivos, depois incorporados ao meio ambiente interno do organismo animal, utilizados na elaboração dos constituintes de suas células e, dessa forma, assimilados (FLORKIN 1972, p. 202; FRUTON 1972, p. 408). Para Bernard, o fenômeno metabólico envolvia processos de “destruição” e “criação” orgânicas, inversos e conectados, que asseguravam a vida das células e a continuidade das “trocas” nutricionais (FLORKIN 1972, p. 206). As idéias de Bernard sobre nutrição e metabolismo não foram amplamente aceitas por seus contemporâneos. Segundo Florkin (1972, p. 207) só depois de muito tempo – e muita pesquisa – foram estabelecidas evidências experimentais que deram suporte às suas idéias.

CAPÍTULO 7

ESTUDOS QUANTITATIVOS SOBRE O METABOLISMO: ORIGENS DA CALORIMETRIA MODERNA

7.1 URÉIA COMO MEDIDA DO METABOLISMO DE COM- POSTOS NITROGENADOS E A QUESTÃO DA FONTE DO TRABALHO MUSCULAR

A teoria metabólica de Liebig e o método de “input-output” de elementos de Boussingault indicaram caminhos para investigações quantitativas sobre o metabolismo animal (ver seções 4.2 e 4.4). A idéia de Liebig de que o metabolismo dos constituintes nitrogenados dos tecidos era a fonte do trabalho muscular e podia ser quantificado através da medida do nitrogênio urinário, era particularmente atraente. Assim, deu origem a diversas pesquisas, algumas realizadas justamente com o objetivo de testá-la, que são descritas a seguir. Por outro lado, a combinação dessa idéia com a sugestão de Liebig de determinar a proporção entre a oxidação de nutrientes não-nitrogenados e compostos nitrogenados a partir da taxa respiratória e com o método de “input-output” de Boussingault, deu base para a quantificação do balanço global das trocas metabólicas. Pesquisas experimentais direcionadas para essa quantificação geraram informações importantes para o desenvolvimento do conhecimento sobre o metabolismo animal, em particular sobre o metabolismo energético, que também são descritas nesta seção.

Partindo da visão de Liebig sobre o metabolismo nitrogenado e com o objetivo de determinar a taxa de metabolismo de tecidos necessária para manter as funções fisiológicas básicas do organismo animal, F. T. Frerichs procurou determinar a taxa de excreção de uréia (como medida do nitrogênio urinário) de animais mantidos em jejum. Ao compará-la essa taxa com a taxa de excreção de uréia por animais em dieta nitrogenada, verificou que a primeira era muito menor que a segunda. Supôs, então, que o excedente de proteína destes – em relação à quantidade necessária para manter a atividade muscular – era oxidado no sangue, como os carboidra-

tos e gorduras, antes mesmo de se tornarem constituintes dos tecidos, ao contrário do que Liebig acreditava (HOLMES 1964, p. 91 e 109).

Essa conclusão de Frerichs, publicada em 1848, foi sustentada por diversos fisiologistas, entre os quais Frederick Bidder (1810-1894) e Carl Schmidt (1822-1894). Na mesma década, Bidder e Schmidt realizaram uma série de experimentos com animais (cães e gatos), com base no método de "input-output" de elementos de Boussingault e nas teorias de Liebig (HOLMES 1964, p. 92). Seu objetivo era estabelecer o balanço global das trocas de elementos, característico do metabolismo animal, e observar o efeito de diversas condições nutricionais: jejum, ingestão de alimento suficiente para manter o peso e ingestão de excesso de alimento (no caso, carne). Assim, determinaram a entrada de alimentos através da alimentação e a saída desses alimentos através da urina e fezes e do gás carbônico expirado¹. A entrada de oxigênio era calculada indiretamente, supondo-se que equivalia à quantidade necessária para oxidação dos nutrientes e de proteína corpórea. A partir da quantidade de nitrogênio excretada na forma de uréia, calculavam a quantidade de proteína metabolizada e a quantidade de carbono, hidrogênio e oxigênio correspondente a esse metabolismo. A diferença entre a quantidade de carbono eliminada através da respiração, urina e fezes e a quantidade equivalente ao metabolismo de proteínas era atribuída ao metabolismo de gordura. A partir dessa quantidade de carbono, por sua vez, calculavam a quantidade de hidrogênio e oxigênio associada a esse metabolismo. O hidrogênio e oxigênio restantes eram associados à eliminação de água na respiração, e assim chegavam a um balanço total (LUSK 1922, p. 78-80).

A partir dos resultados obtidos nesses experimentos, Bidder e Schmidt concluíram, em 1852, que havia um mínimo de metabolismo necessário à manutenção da vida e característico de cada espécie animal que podia ser constatado em experimentos com animais em jejum. Referiram-se a esse mínimo como "metabolismo típico". O aumento nas taxas metabólicas relacionado ao consumo de um excesso de proteínas (no caso, observado em animais em dieta de carne), caracterizado pelo aumento do consumo de oxigênio, produção de calor, evaporação de água e excreção de uréia, foi por

¹ A determinação do gás carbônico expirado foi realizada em alguns períodos de uma hora durante os experimentos e o resultado utilizado para cálculo da quantidade média expelida por hora (LUSK 1922, p. 77).

eles denominado "Luxusconsumption". O excedente de proteína em relação às necessidades do "metabolismo típico" – que consumia a proteína corpórea – seria oxidado diretamente no sangue, da mesma forma que gordura e carboidratos (LUSK 1922, p. 80). Assim, sua conclusão estava de acordo com a de Frerichs e em oposição à visão de Liebig. Se eles estivessem certos, a determinação do nitrogênio não poderia ser considerada como medida do metabolismo de tecidos.

Os resultados e a conclusão de Frerichs intrigaram Theodor L. von Bischoff (1807-1882), na época um colaborador direto de Liebig e defensor de suas idéias. Bischoff resolveu, então, realizar uma série de experimentos para determinar os efeitos de diferentes dietas sobre a excreção de nitrogênio urinário. Primeiro, Bischoff se dedicou a aperfeiçoar os métodos de controle e medida da ingestão de alimentos e das excreções. Depois, contando com um método simples, rápido e preciso para determinação da uréia presente na urina – baseado na titulação com nitrato de mercúrio – desenvolvido por Liebig em 1851, Bischoff passou a determinar diariamente o *input* (através dos alimentos) e o *output* (através da urina, na forma de uréia) de nitrogênio de um cão, variando a quantidade total de alimento e a proporção de proteína e gordura na dieta (HOLMES 1964, p. 92-3). Aumentando em etapas a quantidade de proteínas da dieta, verificou que esses aumentos na ingestão de nitrogênio não resultavam em aumentos correspondentes do nitrogênio urinário. Parte permanecia retido, resultando um aumento do peso do animal. Bischoff considerou que esses resultados confirmavam a visão de Liebig e se opunham a Frerichs e ao conceito de "Luxusconsumption" introduzido recentemente por Bidder e Schmidt. Por outro lado, Bischoff considerava que, se o animal não ganhasse nem perdesse peso, a saída de nitrogênio deveria igualar a entrada. Mas, alguns de seus resultados mostravam uma excreção de nitrogênio muito menor que a ingestão, chegando a 1/3 em alguns experimentos. Além disso, Bischoff pressupunha que, para uma mesma dieta, a excreção de uréia devia ser constante, o que seus resultados contradiziam: as taxas diárias médias de excreção de uréia em três séries de experimentos com o mesmo animal, mantido sob a mesma dieta (1 libra – 454g – de carne por dia) foram significativamente diferentes (HOLMES 1987, p. 253). Havia também diferenças significativas entre as taxas diárias, num mesmo experimento.

Bischoff procurou explicar essas discrepâncias nos resultados, atribuindo-

as a problemas experimentais específicos, como as diferenças nas condições nutricionais do animal resultantes de dietas precedentes ao período experimental e as variações no peso do animal nos intervalos entre os experimentos. Considerou que as diferenças entre as taxas diárias de excreção de uréia eram devidas ao fato da urina não ser excretada continuamente, à medida em que é formada. Assim, a uréia determinada diariamente poderia não coincidir com a uréia formada diariamente (HOLMES 1987, p. 255). Quanto aos resultados que mostravam uma excreção de nitrogênio menor que a ingestão, sem que fosse registrado aumento de peso, Bischoff não chegou a nenhuma explicação convincente e admitiu que poderiam haver outras formas de eliminação de nitrogênio ainda desconhecidas. Isso poderia impossibilitar a abordagem proposta por Liebig, independentemente da confirmação de sua teoria sobre a fonte do trabalho muscular (HOLMES 1964, p. 95).

Bischoff publicou seus resultados em 1853, considerando que, apesar das discrepâncias, confirmavam as idéias de Liebig (HOLMES 1987, p. 253). Mas continuou intrigado com os resultados obtidos, inclusive porque outros pesquisadores nos anos seguintes também constatarem uma eliminação de nitrogênio menor que a ingestão alimentar. Assim, logo que Carl Voit (1831-1908) foi contratado como seu assistente, em 1856, Bischoff incumbiu-o de examinar todas as possíveis fontes de erro dos procedimento experimentais que utilizava nas pesquisas sobre o metabolismo nitrogenado. Voit, então, procurou verificar a presença de nitrogênio na urina em outras formas que não a de uréia e se as fezes continham nitrogênio, mas em ambos os casos não detectou quantidades que pudessem alterar os resultados dos experimentos de Bischoff. Certificou-se também da uniformidade de nitrogênio nas amostras de carne a partir das quais era calculada a ingestão desse elemento. Decidiu, então, realizar experimentos similares aos que Bischoff havia realizado, tomando cuidados adicionais para certificar-se de que todo nitrogênio excretado seria coletado. Treinou o cão para que só urinasse quando removido da gaiola experimental e realizava a determinação de uréia imediatamente, antes que ocorresse qualquer decomposição. Alimentou o cão antes e depois do período do experimento com pão para poder distinguir as fezes atribuídas à dieta experimental, composta exclusivamente de carne (HOLMES 1987, p. 256-8).

Os resultados dos experimentos de Voit mostraram um balanço entre a

ingestão e a eliminação de nitrogênio. Isso indicava, para Bischoff e Voit, que a produção de uréia era uma medida adequada do metabolismo muscular e, já em 1857, iniciaram uma nova série de experimentos para investigar os efeitos de dietas diferentes sobre o metabolismo das substâncias nitrogenadas. Determinaram a quantidade de nitrogênio eliminada (através da urina e das fezes) por cães em jejum, em dietas compostas exclusivamente por substâncias nitrogenadas (no caso, carne) em quantidade controlada e crescente, em dietas mistas de carne e gordura – nas quais mantinham um desses componentes contante enquanto variavam o outro – e em dietas de carne e carboidratos. A partir dessa quantidade e da composição elementar da carne – já que consideravam que só as substâncias corpóreas eram consumidas nessa via metabólica – procuraram calcular o total de carbono, oxigênio e hidrogênio consumidos nesse metabolismo. Se esse total era menor que a quantidade desses elementos ingerida como carne, atribuíam a diferença à assimilação ao organismo e, se fosse maior, consideravam que haviam sido consumidos tecidos corpóreos. Calculavam a redução ou o ganho de peso equivalente a essa consideração e comparavam com a diferença no peso do animal, medido no início e final do experimento. Se esses valores não fossem correspondentes, assumiam que havia ocorrido ganho ou perda de gordura ou de água (HOLMES 1964, p. 95-6; HOLMES 1987, p. 257-60). Na verdade, essa suposição permitia o ajuste de seus cálculos, independentemente de quais fossem os resultados obtidos.

A diferença entre a excreção de carbono, hidrogênio e oxigênio e a entrada desses elementos através da alimentação foi atribuída por Bischoff e Voit às perdas através da respiração e da perspiração, da mesma forma que por Bidder e Schmidt. Mas, ao contrário deles, Bischoff e Voit não realizaram experimentos respiratórios para testar essa hipótese (HOLMES 1987, p. 258).

Bischoff e Voit realizaram esses experimentos durante dois anos, com determinações diárias. Verificaram que o aumento na ingestão de alimentos nitrogenados resultava em aumento na excreção de uréia, mesmo que o animal não realizasse trabalho muscular significativo. Esse resultado aparentemente contradizia a visão de Liebig sobre a fonte do trabalho muscular e sua idéia de que a excreção de nitrogênio era medida do metabolismo dos tecidos. Mas Bischoff e Voit ainda não estavam convencidos disso e consideraram que uma maior ingestão de substâncias nitrogenadas resultava

num aumento do volume de plasma sangüíneo – já que a primeira etapa do metabolismo dessas substâncias consistia na sua transformação em constituintes do sangue – e exigia um aumento de trabalho muscular interno para a circulação do sangue. Isso explicaria o aumento na excreção de uréia (HOLMES 1964, p. 97; FLORKIN 1972, p. 159). Estendendo essa explicação, consideraram que a taxa de decomposição dos tecidos era controlada por um tipo de “efeito complexo de ação de massa”: mantinha-se proporcional “à massa de tecido, à quantidade de oxigênio disponível e à quantidade de nutrientes que chegava aos tecidos ou ao volume de plasma sangüíneo” (HOLMES 1964, p. 97).

Bischoff e Voit interpretaram todos os seus resultados sob o ponto de vista das teorias metabólicas de Liebig. Concluíram que esses resultados estabeleciam que os compostos nitrogenados eram a “fonte da força física e do fenômeno do movimento”, assim como as gorduras e carboidratos podiam originar “só calor e nunca movimento” (BISCHOFF & VOIT 1960, reproduzido em LUSK 1922 p. 87). Assim, consideraram ter demonstrado que a teoria de Liebig sobre a divisão de nutrientes entre “plásticos” e “respiratórios”, estava correta. Seu trabalho foi publicado em 1860, sob o título: “As leis da nutrição dos carnívoros, estabelecidas através de novas investigações”.

Paralelamente aos experimentos de Bischoff e Voit, Edward Smith chegou a resultados que o levaram a questionar a teoria de Liebig. Smith realizou um grande número de observações sobre os efeitos de diversas condições ambientais e de atividade sobre a taxa de eliminação de dióxido de carbono, em humanos. Coletava o ar expirado num determinado período e, a partir da média do volume coletado e da taxa de respiração, calculava a quantidade de gás carbônico formada por hora. Em algumas das situações, nas quais ele próprio era o “objeto de pesquisa”, determinou também a quantidade de uréia excretada, variando a ingestão de substâncias nitrogenadas e a quantidade de trabalho realizado. Desse modo, notou que a excreção de uréia variava pouco em relação ao trabalho realizado, ao contrário da eliminação de gás carbônico, que aumentava proporcionalmente à realização de trabalho (McCOLLUM 1957, p. 122-3; SCHELAR 1964, p. 228).

Segundo McCollum (1957, p. 123), os estudos respiratórios de Smith, cujos resultados foram publicados em 1857 e 1859, tiveram influência sobre fisiologistas e químicos lançando dúvidas sobre a fonte do trabalho muscu-

lar. Essa influência foi limitada, entretanto, pela importância atribuída à visão de Liebig.

No ano seguinte, 1860, Voit resolveu testar diretamente a hipótese de que o metabolismo de tecidos era a fonte do trabalho muscular, a partir de uma implicação estabelecida pelo próprio Liebig: a excreção de nitrogênio urinário devia aumentar se o animal realizasse trabalho. Assim, Voit determinou a eliminação de nitrogênio por um cão em repouso e correndo intermitentemente num tipo de esteira rolante ("treadmill"), mantida a mesma dieta. Comparando os resultados, verificou, ao contrário do que esperava, que não havia ocorrido aumento significativo nessa eliminação, apesar da grande diferença de trabalho realizado. Mas não abandonou a teoria de Liebig, como se poderia esperar. Procurou explicar esses resultados de forma compatível com a teoria em que confiava. Considerou que nos períodos de repouso o metabolismo de tecidos continuava a gerar energia que era transformada em energia elétrica que, por sua vez, era transformada em energia mecânica quando o músculo se contraía durante a movimentação. Como evidência, citou uma descoberta de Emil du Bois-Reymond (1818-1896), que havia detectado a diferença de potencial existente na superfície de um músculo. Assim, a produção de energia derivada da decomposição das substâncias dos tecidos podia ser constante e a utilização dessa energia podia variar (HOLMES 1964, p. 99-100).

O questionamento efetivo da teoria de Liebig começou em 1861, com um trabalho de Moritz Traube (1826-1894). Traube considerou que a oxidação de substâncias não nitrogenadas estava associada à produção de energia muscular, ao contrário do que Liebig supunha. Argumentou referindo-se a fatos como o de que grandes animais utilizados para realização de trabalhos pesados eram herbívoros – portanto ingeriam baixa proporção de substâncias nitrogenadas. Também baseou-se em resultados experimentais que mostravam que a respiração animal se acelerava mais para acompanhar a realização de trabalho físico do que para produzir calor de forma a compensar um ambiente frio. Considerou ainda que os resultados recentes das pesquisas de Bischoff e Voit confirmavam sua visão e não a de Liebig (HOLMES 1964, p. 101-2; FLORKIN, 1972, p. 161).

Poucos anos depois, Adolf Eugen Fick (1829-1901) e F. J. Wislicenus, ambos professores de fisiologia em Zurich, procuraram realizar um experimento que testasse de forma decisiva a teoria de Liebig sobre a fonte do

trabalho muscular. Mantiveram-se em dieta composta exclusivamente por substâncias não-nitrogenadas e subiram o pico "Faulhorn", de 1656 metros de altura, coletando a própria urina e determinando seu conteúdo de uréia. A dieta de carboidratos e gordura foi mantida por 17 horas antes, durante as 6 horas de subida e por sete horas depois. Calcularam o trabalho realizado durante a subida e a energia equivalente à decomposição de uma quantidade de proteína correspondente à quantidade de uréia produzida no mesmo período. Na época ainda não havia sido determinado diretamente o calor liberado na decomposição de proteínas em substâncias que o organismo eliminava. Assim, nesses cálculos, Fick e Wislicenus estimaram esse valor através da soma do calor liberado na combustão dos elementos constituintes das proteínas, como era comum na época (SCHELAR 1964, p. 228). Comparando os resultados, mostraram que a energia gasta na realização de trabalho tinha sido maior que a que podia derivar dessa decomposição. Concluíram, portanto, que a oxidação de substâncias não-nitrogenadas contribuía para a realização de trabalho muscular (HOLMES 1964, p. 102; SCHELAR 1964, p. 228). Seus resultados e conclusões foram publicados em 1866 e, por seu significado, logo foram comentados e discutidos por diversos pesquisadores.

Voit, na época trabalhando com Max von Pettenkofer (1818-1901), considerou que os resultados de Fick e Wislicenus não refutavam a visão de Liebig e voltou a defender sua hipótese sobre a reserva muscular de energia derivada do metabolismo protéico.

Por outro lado, em seguida, John Bennet Lawes (1814-1900) e Joseph Henry Gilbert (1817-1901) pronunciaram-se contra a visão de Liebig, partindo do experimento de Fick e Wislicenus e retomando um trabalho anterior, de sua autoria, que não havia se destacado. Nesse trabalho, publicado em 1852, apresentavam evidências que contradiziam a teoria de Liebig. Havia observado que durante a realização de esforço ocorria imediatamente um aumento no ritmo respiratório e na intensidade da respiração. Havia também realizado um experimento, com dois porcos, determinando a eliminação de uréia mediante a ingestão de diferentes quantidades de proteína – um porco recebia o dobro do outro – e sob as mesmas condições de atividade física. Desse modo, constataram que a eliminação de uréia acompanhava a ingestão de proteína e parecia independente da atividade muscular (McCOLLUM 1957, p. 126; SCHELAR 1964, p. 228).

Ainda em 1866, Edward Frankland (1825-1899), químico inglês, considerou que o experimento de Fick e Wislicenus deixava evidente que a teoria de Liebig estava errada. Por outro lado, reconhecia as limitações de seus cálculos e ponderou que seus resultados só poderiam ser considerados decisivos quando fosse determinado diretamente o calor de combustão de proteínas e fosse levado em conta o equivalente mecânico desse calor (HOLMES 1964, p. 103; McCOLLUM 1957, p. 127). Procurou, então, realizar essa determinação.

Há pelo menos duas décadas já havia sido criticada a suposição de que o calor de combustão de um determinado nutriente era equivalente à soma do calor de combustão de seus elementos. Em 1845, Helmholtz mostrou que essa suposição estava errada, através de algumas determinações diretas em substâncias similares: a quantidade de calor liberada na combustão de uma determinada substância podia ser consideravelmente menor que o calor calculado a partir do calor de combustão de seus elementos constituintes (HOLMES 1964, p. 76-7). Depois disso, outras pesquisas em termoquímica evidenciaram que o calor de combustão de um composto não dependia só do número de átomos dos elementos presentes, mas também do tipo de ligação entre eles. Nesse sentido, são considerados importantes os trabalhos de Pierre Antoine Favres (1813-1880) e Johan Theobald Silbermann, de 1852, e de J. Thomsen (1826-1909), a partir de 1854, na determinação do calor de combustão de diversos compostos orgânicos (SCHELAR 1964, p. 229; FLORKIN 1972, p. 238). Mas no caso de substâncias orgânicas complexas, como a maioria dos nutrientes, havia dificuldades práticas derivadas do fato de que a oxidação completa dessas substâncias não era possível só em presença de oxigênio. Assim, o cálculo do calor de combustão de nutrientes continuou sendo feito a partir de sua composição elementar e do calor de combustão dos elementos presentes. O problema só seria resolvido em 1865, quando Marcelin Berthelot introduziu procedimentos experimentais – por exemplo, o uso de clorato de potássio – que tornaram possível a determinação direta do calor de combustão de substâncias orgânicas complexas.

Frankland é citado como o primeiro a realizar uma série extensiva de determinações do calor de combustão de compostos nutrientes (McCOLLUM 1957, p. 127-8; HOLMES 1964, p. 103). Para isso, utilizou um calorímetro a água desenvolvido por Lewis Thomson. A amostra do nutriente era misturada com clorato de potássio antes de ser introduzida no

aparelho e o calor liberado em sua combustão completa era calculado a partir da elevação de temperatura da água que envolvia o local da combustão. Com relação a seu objetivo de refazer os cálculos de Fick e Wislicenus, Frankland considerou que a energia que o organismo podia obter através da oxidação de proteínas equivalia à diferença entre o calor de combustão dessas substâncias e o calor de combustão da uréia, principal produto final do metabolismo de substâncias nitrogenadas no organismo humano. Assim, determinou o calor de combustão de tecido muscular, gordura bovina e albumina purificada e da uréia, ácido úrico e ácido hipúrico. A partir dos valores obtidos e considerando o equivalente mecânico do calor estabelecido por Joule – ou seja, que o calor necessário para elevar em 1°C a temperatura de 1 kg de água, equivale a 423 kgm² de energia mecânica – Frankland refez, então, os cálculos de Fick e Wislicenus. Mostrou que os valores obtidos por eles para a energia que podia derivar da decomposição de proteínas durante o período do experimento eram superestimados e que, portanto, seus resultados eram ainda mais significativos (McCOLLUM 1957, p. 128); SCHELAR 1964, p. 229). Ou seja, a energia correspondente ao metabolismo de proteínas só dava conta de uma pequena parte do trabalho realizado durante a subida do “Faulhorn” e, portanto, a oxidação de substâncias não-nitrogenadas havia sido responsável pela maior parte de energia gasta no trabalho muscular. Desse modo, Frankland confirmou as conclusões de Fick e Wislicenus, estabelecendo evidências decisivas contra a visão de Liebig. Segundo Fick e Wislicenus e Frankland, as proteínas eram os constituintes estruturais dos músculos, “como o ferro de uma máquina a vapor” e “só precisavam ser substituídas para compensar o desgaste”. Já os carboidratos e as gorduras eram os “combustíveis”, oxidados para produção de calor e movimento (HOLMES 1964, p. 109-10).

Enquanto isso, Liebig estava envolvido com as aplicações práticas de suas teorias, principalmente na agricultura. Mas também se interessava em acompanhar os experimentos sobre o metabolismo que vinham sendo realizados – em especial os que seus seguidores, Bischoff, Voit e Pettenkofer estavam realizando em Munique. Sabia da crescente oposição às suas teorias metabólicas e, em 1870, procurou responder às críticas. Reconheceu

²Um quilográmetro equivale ao trabalho necessário para elevar um quilograma à altura de um metro.

que sua idéia de que a secreção de uréia era medida de trabalho muscular e do metabolismo de tecidos estava errada e admitiu que poderia ocorrer a oxidação de proteínas no sangue, na respiração. Por outro lado, manteve que o metabolismo nitrogenado era a fonte do trabalho muscular. Procurou justificar os resultados de Fick e Wislicenus com a mesma explicação apresentada anteriormente por Voit, sobre a reserva muscular de energia derivada do metabolismo protéico, sem citá-lo. Considerou, por fim, que pouco “trabalho frutífero” vinha sendo feito em fisiologia animal e criticou diretamente diversas pesquisas de Voit (HOLMES 1964, p. 104-6).

Segundo Holmes (1964), Voit recebeu essas observações de Liebig como um ataque pessoal e, num trabalho publicado no mesmo ano (1870), voltou-se contra toda a teoria de Liebig sobre o metabolismo de tecidos. Apresentou os resultados de um experimento que havia realizado em 1868, que mostravam que a taxa de excreção de nitrogênio de um animal em dieta altamente protéica era muito maior que a de um animal ingerindo pouca proteína, mantidas as mesmas condições ambientais e de atividade física. Partindo desses resultados, Voit concluiu que parte das proteínas ingeridas eram oxidadas diretamente no sangue sem que se tornassem parte dos tecidos organizados. Esses resultados mostravam também que a excreção de nitrogênio não podia ser considerada como medida do metabolismo dos tecidos. Voit foi ainda mais longe e considerou que os resultados de seus experimentos anteriores, assim como de experimentos de outros pesquisadores, haviam deixado evidente que não ocorria o metabolismo de tecidos associado ao metabolismo muscular e independente do processo respiratório, como Liebig propunha.

Assim, depois de ter confiado completamente na teoria de Liebig e, inclusive, de tê-la defendido mesmo à frente de evidências experimentais que a contradiziam, Voit acabou reforçando decisivamente sua refutação. Interessante que isso tenha acontecido, de acordo com o relato de Holmes, após a decepção de Voit com Liebig – resultado dos “ataques” de Liebig aos seus trabalhos – apesar dos resultados apresentados por Voit como base de sua conclusão datarem de 1868.

Cabe observar que Voit não deixou de reconhecer, nesse artigo de 1870, a importância das idéias metabólicas de Liebig como “ponto de partida essencial para toda pesquisa, inclusive a sua, em nutrição” (HOLMES 1964, p. 108). Por outro lado, considerou que as próprias pesquisas derivadas des-

sas idéias as tinham derrubado e que já não tinha sentido fazer suposições e tirar conclusões sobre os processos metabólicos internos ao organismo animal partindo, exclusivamente, do conhecimento químico. Nesse sentido, considerou que qualquer suposição deveria, primeiro, ser testada através de experimentação em animais.

7.2 TERMOQUÍMICA, CALORIMETRIA E O CONHECIMENTO SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO

A afirmação de Liebig de que a “força química” derivada do metabolismo dos nutrientes era a única fonte de energia para os animais, associada à idéia da interrelação entre os processos fisiológicos, sugeria que era possível estabelecer um balanço energético do organismo animal. Pois, de acordo com essa visão, a partir da determinação dos tipos e quantidades de nutrientes ingeridos e do conhecimento da quantidade de calor produzida em sua oxidação, era possível conhecer a energia disponível para um animal. Essa energia, por sua vez, deveria dar conta do gasto energético de um animal na realização de suas atividades vitais. Isso estimulou uma série de pesquisas sobre o metabolismo energético, principalmente depois que o princípio de conservação da energia foi demonstrado claramente e à medida que se tornou amplamente aceito. Quando isso aconteceu, foram desaparecendo as dúvidas de que a oxidação de nutrientes era a fonte do calor animal e do trabalho muscular, mesmo antes de demonstrações experimentais mais conclusivas (HOLMES 1964, p. 46 e 78). A visão de Liebig a esse respeito foi considerada, com pouca alteração, como uma aplicação desse princípio a fenômenos biológicos. Nesse contexto, suas idéias metabólicas “pareceram mais significativas que nunca, pois pareciam descrever e proporcionar caminhos para investigar os processos de transformação da energia no organismo animal” (HOLMES 1964, p. 78).

Em 1845, Hermann von Helmholtz (1821-1894), fisiologista alemão, resolveu verificar experimentalmente se a força mecânica e o calor produzido no organismo animal podia provir de transformações químicas, conforme Liebig afirmava. Supôs que, se assim fosse, as contrações musculares deveriam provocar alteração na composição química do músculo. Procurou, então, realizar um experimento que testasse essa suposição. Estimulou com uma corrente elétrica intermitente, até a exaustão, um de dois músculos cor-

respondentes de uma rã, mantendo o outro em repouso. Em seguida isolou cada um desses músculos e extraiu as substâncias solúveis em água e em álcool de cada um. Verificou que a quantidade de substâncias solúveis em álcool do músculo submetido à contração era maior e a de solúveis em água era menor que a do músculo que se manteve em repouso. Considerou que esse resultado mostrava que durante a contração muscular ocorriam transformações químicas no músculo. Holmes (1964, p. 73-4) afirma que esse experimento foi citado durante muito tempo como “a melhor evidência de tais transformações”.

Por outro lado, ainda havia dúvidas sobre a teoria química do calor, associadas aos experimentos de Despretz e Dulong, nos quais o calor de combustão do carbono e hidrogênio convertidos em gás carbônico e água não dava conta do calor liberado pelo animal (ver seção 4.4). Partindo de um novo valor do calor de combustão do hidrogênio determinado em experimentos recentes – maior que o que fora utilizado por Despretz e Dulong – Liebig procurou refazer seus cálculos. Considerou também que as medidas diretas do calor de combustão do carbono não eram confiáveis, devido a problemas técnicos ainda não resolvidos, e procurou determinar esse valor indiretamente, subtraindo do calor de combustão de etileno (“olefiant gas”), álcool e éter o calor equivalente ao hidrogênio presente. Com esses novos valores, Liebig chegou a proporções entre o calor de combustão calculado e o calor medido no calorímetro que variavam de 0,83 a 1,04. Concluiu, num artigo publicado em 1845, que a combustão de carbono e hidrogênio correspondia exatamente ao calor produzido por um animal (HOLMES 1964, p. 74-5). Mas essa conclusão de Liebig não era compatível com os resultados de seus cálculos. Afinal, não se podia afirmar que havia uma concordância exata.

Também em 1845, Helmholtz mostrou o que havia de errado nos cálculos de Despretz, Dulong e nos novos cálculos de Liebig. Todos haviam assumido que o calor de combustão dos nutrientes, que forneciam o carbono e hidrogênio, era equivalente a seu conteúdo desses elementos. Como foi visto na seção anterior, na época ainda não haviam sido realizadas medidas diretas do calor de combustão dos principais nutrientes, devido a dificuldades técnicas que só mais tarde seriam superadas. Mas, Helmholtz realizou algumas medidas em substâncias similares e mostrou que tal suposição estava errada. Assim, mostrou que os resultados de Despretz e Dulong

não podiam ser considerados como evidências contra a teoria química do calor (HOLMES 1964, p. 76-7). Ainda em 1845, Julius Robert Mayer (1814-1878) chamou a atenção para outra fonte de erro comum em pesquisas calorimétricas. As medidas do calor liberado pelo organismo animal eram consideradas medida da energia produzida metabolicamente. Assim, considerava-se que o calor era a única forma pela qual a energia metabólica deixava o organismo. Mayer ressaltou que essa consideração só era válida se nenhuma outra forma de energia fosse produzida (FLORKIN 1972, p. 238). Por exemplo, se o animal realizasse algum tipo de trabalho muscular, parte da energia metabólica era transformada em energia mecânica e não seria liberada como calor.

Os resultados dos experimentos respiratórios de H. V. Regnault (1810-1878) e J. Reiset (1818-1896), publicados em 1849, vieram reforçar a idéia da relação entre respiração e nutrição. Regnault e Reiset projetaram um sistema fechado no qual o oxigênio inspirado e o gás carbônico expirado pudessem ser determinados com precisão. Através desse sistema realizaram uma série de medidas desses gases com animais de diversas espécies e alimentados com diferentes nutrientes. Verificaram que a relação entre a quantidade de oxigênio eliminado na forma de gás carbônico e a quantidade consumida, depois denominada "quociente respiratório", variava segundo a espécie animal e, numa mesma espécie, dependia das condições fisiológicas do animal. Verificaram também que a influência da dieta era a mais importante: dependendo do tipo de alimento ingerido, o quociente respiratório variava de 0,62 a 1,04. Para um animal alimentado com cereais, por exemplo, esse valor ficava próximo à unidade; o mesmo animal alimentado com carne apresentava valores próximos ao limite inferior da faixa de variação. Observaram que animais em jejum apresentavam um quociente respiratório praticamente igual ao associado a uma dieta de carne e concluíram que, durante inanição, os animais sobreviviam de sua própria carne³(LEFÈVRE 1911, p. 10-1; LUSK 1922, p. 56-60; McCOLLUM 1957, p. 129-30).

Assim, Regnault e Reiset forneceram evidências experimentais conclusivas da relação entre o fenômeno respiratório e a oxidação dos nutrientes.

³ Alguns anos antes, em 1846, Bernard havia chegado à mesma conclusão, a partir da observação, casual, de que a urina de coelhos em jejum apresentava-se límpida e ácida como a de carnívoros - e não turva e alcalina como é a urina desses animais normalmente, por serem herbívoros (SCWARTZ & BISHOP 1958; HOLMES 1974, p. 258).

No mesmo sentido, deram base experimental à idéia de que a relação entre a quantidade de oxigênio absorvida e a de dióxido de carbono expelido – o quociente respiratório – estava associada ao tipo de substância que estava sendo consumida no metabolismo.

A determinação das trocas gasosas respiratórias era uma limitação das pesquisas experimentais anteriores em que se procurava estabelecer o balanço global de elementos característico do metabolismo animal, descritas na seção anterior. Nessas pesquisas, de modo geral, a entrada e saída de elementos através da respiração era determinada diretamente por períodos curtos e considerada como taxa média das trocas respiratórias ocorridas durante o período total do experimento (como, por exemplo, nos experimentos de Boussingault e de Bidder e Schmidt). Ou então, essas trocas respiratórias eram calculadas a partir da diferença entre a entrada de elementos através da alimentação e a saída através da urina e fezes. Em suas determinações do balanço metabólico global, Bischoff e Voit optaram pelo cálculo indireto da saída de elementos através da respiração e transpiração. Mas reconheciam o valor limitado dessa determinação, baseada em suposições e decisões arbitrárias sobre quanto atribuir à formação de gás carbônico e quanto à formação de água. Reconheciam também a limitação de se extrapolar as taxas obtidas em períodos curtos para o período total do experimento (HOLMES 1987, p. 261).

Assim, partindo do conhecimento da necessidade de realizar medidas respiratórias simultâneas às demais determinações em experimentos metabólicos e considerando que o uso de animais maiores, como cães, possibilitava resultados mais precisos, Voit sugeriu a Pettenkofer que projetasse um aparelho respiratório grande e suficiente para que um cão, ou mesmo uma pessoa, pudesse permanecer confortável durante um período de vários dias (FLORKIN 1972, p. 234; HOLMES 1987, p. 261). Pettenkofer era químico e trabalhava no Instituto de Fisiologia de Munique, assim como Bischoff e Voit. Como havia trabalhado na melhoria de sistemas de ventilação de ambientes, tinha experiência na determinação das taxas de renovação de ar necessárias para se obter um ambiente confortável. A partir da sugestão de Voit empenhou-se na construção de um aparelho para determinação das trocas gasosas respiratórias de grande porte e que possibilitasse medidas de alta precisão. Em 1862 o aparelho estava pronto e ajustado. Possibilitava uma precisão média de 0,3% na determinação de gás carbônico e água

eliminados na respiração.

Através desse aparelho, Pettenkofer e Voit realizaram uma série de experimentos metabólicos, em que a eliminação de dióxido de carbono e água através da respiração e transpiração e a excreção de carbono, oxigênio, nitrogênio e hidrogênio através da urina e fezes eram determinadas direta e simultaneamente. Partindo do conhecimento mais preciso do *input-output* de cada um desses quatro elementos e através de um raciocínio semelhante ao de Bidder e Schimdt em sua tentativa de estabelecer o balanço global de elementos de um organismo animal, Voit e Pettenkofer chegaram a importantes conclusões sobre os processos metabólicos. Assim, por exemplo, para estabelecer quais substâncias corpóreas eram consumidas no metabolismo de um homem em jejum⁴, partiram da quantidade total de nitrogênio eliminada através da urina e a quantidade de carbono, hidrogênio e oxigênio eliminada na urina e através da respiração e transpiração, por 24 horas. Considerando que cada grama de nitrogênio urinário equivalia, aproximadamente, à decomposição de 6,25g de proteína de carne (partindo da proporção de nitrogênio nesse tipo de proteína), calcularam a quantidade de proteína corpórea que havia sido metabolizada. A partir dessa quantidade calcularam a quantidade de carbono equivalente ao metabolismo de proteínas. A diferença entre a quantidade total de carbono eliminada e a quantidade equivalente ao metabolismo protéico foi atribuída ao metabolismo de gordura, já que nenhum tipo de carboidrato havia sido ingerido e considerando desprezível nesse contexto experimental o metabolismo de glicogênio. Assim, a partir dessa quantidade de carbono e da composição elementar de gordura animal, calcularam a quantidade de gordura metabolizada. Para conferir esses resultados, calcularam a quantidade de oxigênio necessária para a combustão do carbono e hidrogênio presentes na proteína e gordura metabolizada, descontada a quantidade desses elementos eliminada através da urina, e compararam com a quantidade de oxigênio absorvida, determinada diretamente a partir de dados experimentais. Nesse caso, consideraram que a diferença entre o peso do indivíduo e de suas excreções (urina e gases expirados) ao final das 24 horas e seu peso inicial mais o da água que ingeriu durante o experimento, equivalia ao oxigênio absorvido.

⁴Na verdade, forneciam uma pequena quantidade de extrato de carne ao homem, com o objetivo de evitar o incômodo que consideravam ser causado pelo jejum total. Em seus cálculos, descontaram os elementos assim ingeridos (FLORKIN 1972, p. 234).

A diferença entre esses valores ficou dentro dos limites de erro experimental e Pettenkofer e Voit consideraram confirmados seus cálculos, concluindo, então, que o organismo animal em jejum mantém-se através do consumo de sua própria proteína e gordura corpóreas (LUSK 1917, transcrito em FLORKIN 1972, p. 234-7).

Voit e Pettenkofer confirmaram, através de seus experimentos, que a quantidade de oxigênio necessária ao metabolismo dependia da composição química das substâncias metabolizadas. Isso ficaria evidente através da variação da relação entre o volume de dióxido de carbono expirado e o volume de oxigênio inspirado, associada ao tipo de nutriente consumido, como Regnault e Reiset haviam observado (LUSK 1917, transcrito em FLORKIN 1972, p. 237). Assim, através de seu aparelho respiratório, Voit e Pettenkofer determinaram, com precisão, o quociente respiratório (RQ) equivalente ao metabolismo de proteína, carboidrato e gordura. Para carboidratos, o RQ era igual à unidade; para proteína, igual à 0,78 e para gordura, 0,71. Assim, confirmaram que o consumo de oxigênio e, conseqüentemente, a produção de dióxido de carbono, era proporcional à quantidade de oxigênio nas moléculas do nutriente. Seus resultados foram publicados em 1866.

Paralelamente, como foi visto na seção anterior, a determinação direta do calor de combustão de nutrientes tornou-se possível, depois que M. Berthelot resolveu os problemas práticos associados a isso, em 1865. O conhecimento das taxas de metabolismo de cada classe de nutrientes – através das medidas de “input-output” de elementos e da noção de quociente respiratório – e de seu calor de combustão, tornava possível determinar sua contribuição para as necessidades energéticas totais de um organismo animal. Segundo Holmes (1964, p. 113), a determinação da contribuição energética de cada classe de nutriente, assim como das necessidades energéticas totais, sob diversas condições, passou a ser o principal foco de atenção dos pesquisadores em nutrição nas últimas décadas do século XIX.

Nesse sentido, as pesquisas de Max Rubner (1854-1932) sobre energética nutricional foram particularmente importantes e estabeleceram fatos fundamentais em nutrição. Já na década de 1880, Rubner, que era assistente de Voit em seu laboratório, preocupou-se em estabelecer o valor calórico real das proteínas. Considerou que, para carboidratos e gorduras, o calor de combustão determinado em calorímetro era equivalente ao valor calórico desses nutrientes no metabolismo, já que os produtos iniciais e finais eram

os mesmos. O metabolismo de proteínas, entretanto, produzia substâncias que ainda continham energia química e que eram excretadas. Na época era comum determinar o valor calórico das proteínas descontando-se de seu calor de combustão o calor de combustão da uréia considerada o único produto final significativo de seu metabolismo. Mas em 1866 Voit e Pettenkofer haviam observado que a quantidade de carbono presente na urina de cães em jejum ou alimentados exclusivamente com carne era muito maior que a atribuída à uréia presente. Havia notado também que em cães mantidos em jejum ocorria um aumento na excreção de outras substâncias nitrogenadas, como creatinina e ácido úrico. Rubner procurou, então, determinar diretamente o calor de combustão da urina sob diversas condições nutricionais, visando chegar ao valor calórico real das proteínas metabolizadas.

Assim, a partir do calor de combustão de cada grama do resíduo de urina e da relação entre carbono e nitrogênio presentes, calculou o valor calórico equivalente a cada grama de nitrogênio urinário, para cão em jejum, alimentado com carne e alimentado com proteína isolada de carne. Determinou também o calor de combustão de cada grama de fezes, em cada uma das condições, e de cada grama de carne e de proteína de carne. Partindo, então, do calor de combustão da carne, descontou o calor equivalente à quantidade de nitrogênio urinário e às fezes, na dieta de carne. Descontou também o calor perdido na secagem da urina e da carne e em outros procedimentos experimentais. Assim, Rubner chegou ao que considerava ser o valor calórico real da carne, 4,0 quilocalorias por grama. Verificou que esse valor equivalia a 75% do valor obtido no calorímetro e concluiu que apenas essa porcentagem da energia presente na carne estava disponível ao organismo, considerando que os cerca de 25% restantes eram perdidos através das excreções. Da mesma forma, calculou o valor calórico da proteína de carne isolada e da proteína corpórea metabolizada durante o jejum por grama – respectivamente 4,24 e 3,84 quilocalorias por grama. Através desses resultados, Rubner recalculou o calor total produzido pelo homem em jejum e repouso do experimento de Voit e Pettenkofer: 2.374 quilocalorias (FLORKIN 1972, p. 239-41). Também a partir desses resultados e do valor calórico de gordura e carboidratos determinados por F.K.A. Stochmann (1832-1882), Rubner propôs um valor calórico médio para cada classe de nutrientes: 4,1 quilocalorias por grama de proteína ingerida, 9,3 kcal/g de gordura e 4,1 kcal/g de carboidratos, com exceção de celulose

(LEFÈVRE 1911 p. 836; FLORKIN 1972, p. 242). Esses resultados foram publicados em 1885.

Florkin (1972, p. 241) e McCOLLUM (1957, p. 130-1) relatam que, no decurso dessa pesquisa, Rubner verificou que a taxa metabólica de produção de calor de animais de tamanhos diferentes, em jejum e repouso, era proporcional à área de sua superfície corpórea. Segundo McCollum, Rubner chegou a estabelecer uma relação entre essa superfície e as necessidades nutricionais do organismo animal. Também segundo McCollum, essa lei já havia sido proposta em 1839 por P.J. Robiquet (1780-1840)e, segundo Florkin, por Sarrus e Rameaux, no mesmo ano. A lei da área de superfície corpórea foi confirmada em 1885 através dos experimentos de Charles Richet (1850-1935) (LUSK 1922, p. 93).

Ainda em 1885, Rubner introduziu o conceito de "isodinamia" entre diferentes compostos nutrientes. Considerando que a quantidade de energia fornecida por um nutriente ao organismo era igual ao número de calorias que produzia no interior desse organismo, afirmou que "os pesos de dois tipos de nutrientes simples ou complexos são isodinâmicos se produzirem no interior do organismo a mesma quantidade de calor" (RUBNER 1885, citado em LEFÈVRE 1911, p. 856). A partir do valor calórico de diversos nutrientes, calculou as quantidades energeticamente equivalentes, isodinâmicas: 100g de gordura equivaleria a 228g de amido, a 235g de sacarose, a 225g de fibrina, etc. Rubner procurou testar experimentalmente essa idéia, substituindo a ingestão de determinada quantidade de um nutriente por um animal (ou o jejum) pela quantidade isodinâmica de outro nutriente, e comparando a produção de calor em cada caso. Desse modo considerou confirmados os valores dos equivalentes isodinâmicos que havia calculado anteriormente, já que as diferenças não eram significativas (LEFÈVRE 1911, p. 857-60).

Depois, já em seu próprio laboratório em Marburg, Rubner construiu um calorímetro que possibilitava determinações precisas em períodos relativamente longos (24hs) e acoplou a esse calorímetro um aparelho para medida das trocas gasosas respiratórias. Desse modo podia determinar as taxas metabólicas e respiratórias, segundo o método de Pettenkofer e Voit, calcular a produção de calor a partir dessas taxas e, simultaneamente, medir de forma direta o calor liberado pelo animal. Seu objetivo era demonstrar que o calor animal era produto do metabolismo e que era quantitativamente igual à energia química dos nutrientes metabolizados. Considerando

que o calor era a fonte do trabalho muscular, Rubner mantinha o animal em repouso durante o experimento, para evitar que parte do calor produzido no metabolismo fosse gasto na realização de trabalho. Essa visão de que o trabalho muscular derivava do calor era bastante comum na época e era compartilhada por diversos fisiologistas importantes, entre os quais E. F. W. Pflüger (1829-1910) e T. W. Engelmann (1843-1909), além de Pettenkofer e Voit (FLORKIN 1972, p. 244). Assim, realizou uma série de determinações com cão em repouso e em diferentes condições nutricionais: em jejum, em dieta composta exclusivamente por gordura, em dieta de carne e gordura e em dieta de carne. A diferença entre o calor calculado a partir do metabolismo e o calor determinado diretamente foram mínimas, como se pode observar através de seus resultados, expressos na Tabela 1 (FLORKIN 1972, p. 242):

Tabela 1: Comparação entre medidas indiretas e diretas do calor liberado por um animal sob diferentes condições de alimentação. Resultados obtidos por Rubner, publicados em 1894.

alimentação	duração do experimento (dias)	calor calculado a partir do metabolismo, por dia (kcal)	calor medido no calorímetro, por dia (kcal)	diferença (%)
jejum	5	1296,3	1305,2	- 142
	2	1091,0	1056,6	
gordura	5	1510,1	1498,3	- 0,97
gordura e carne	8	2492,4	2488,0	
	12	3985,4	3958,4	
carne	6	2249,8	2276,9	- 0,42
	7	4780,8	4769,3	+ 0,43

Desse modo, Rubner demonstrou experimentalmente que a energia derivada da oxidação dos nutrientes dava conta do calor liberado pelo animal em repouso, confirmando a teoria química do calor e provando que o metabolismo era a única fonte de energia do organismo animal (FLORKIN 1972, p. 242). Segundo Florkin, com base nesses resultados de Rubner, publicados em 1894, essa idéia de que o organismo animal derivava sua

energia do metabolismo tornou-se amplamente aceita. Holmes (1964, p. 113) considera que através desses resultados Rubner também demonstrou que o princípio da conservação de energia era válido para os organismos vivos, o que na época já era amplamente mas ainda não havia sido provado experimentalmente. Por outro lado, Florkin (1972, p. 243) argumenta que o que Rubner demonstrou foi a validade da lei de Hess para os organismos vivos, já que não tratou da relação entre calor e trabalho, um dos principais aspectos da primeira lei da termodinâmica. Segundo Florkin essa lei foi demonstrada para organismos vivos através dos experimentos de W. C. Atwater (1844-1907), que são descritos a seguir.

Atwater, fisiologista norte-americano, havia participado de pesquisas metabólicas nos laboratórios de Voit e de Rubner, na Alemanha. Ao retornar aos Estados Unidos, no final da década de 1880, empenhou-se na realização de um programa amplo e extensivo de pesquisas em nutrição, associado ao "U. S. Department of Agriculture" e com base nas estações experimentais agrícolas dos Estados Unidos. O programa incluía o estudo dos padrões de dieta norte-americanos, a análise química de alimentos, determinação do valor calórico de alimentos, de sua digestibilidade e "utilização intestinal", determinação das necessidades energéticas humanas e estudo econômico da produção e utilização de alimentos (IHDE & JANSEN 1974).

Em 1892, com a colaboração de E. B. Rosa, Atwater começou a construção de um calorímetro a água, equipado para medidas respiratórias e de tamanho que possibilitasse experimentos longos com seres humanos. Seu modelo foi o calorímetro construído por Pettenkofer. Paralelamente, junto com C. F. Langworthy, Atwater procurou compilar todas as pesquisas sobre o metabolismo que incluíssem a determinação experimental do "input-output" de matéria e energia. Concluiu que, em geral, as pesquisas já realizadas continham mais confirmações parciais de teorias do que fatos comprovados experimentalmente. Essa compilação foi publicada em 1897.

No mesmo ano, o calorímetro ficou pronto. O programa de pesquisa de Atwater previa a realização de uma série numerosa de experimentos metabólicos através dos quais a determinação do "input-output" de matéria e energia em humanos fosse completa e possibilitasse o conhecimento global do metabolismo de matéria e energia pelo organismo humano. Como ponto de partida Atwater dispunha, por um lado, de um aparelho que possibi-

tava medidas calorimétricas e respiratórias precisas, já aperfeiçoado através do trabalho de diversos pesquisadores, em especial Pettenkofer. Por outro lado, os princípios da calorimetria respiratória e química já haviam sido definidos, progressivamente, através das pesquisas de Bischoff, Voit, Pettenkofer, Rubner e Laulanié, entre outros.

Entre 1897 e 1902, Atwater realizou um grande número de experimentos metabólicos e calorimétricos, em parte com a colaboração de Rosa e em parte com F. G. Benedict. Esses experimentos foram divididos em 3 grupos: experimentos em condições de repouso, experimentos em condições de trabalho muscular e experimentos de jejum e repouso. Uma série de 55 experimentos, nas três condições básicas, foram realizados com o objetivo de estabelecer o balanço metabólico de nitrogênio, o ganho ou perda de proteína e gordura e o balanço energético global. Antes de cada experimento, procuravam determinar a dieta que melhor se adequava ao organismo do indivíduo que seria submetido às determinações experimentais, de forma que fossem mantidas as condições de equilíbrio necessárias. Nos experimentos de repouso, que em geral duravam 4 dias, o indivíduo realizava o mínimo possível de atividade física e era alimentado com a "dieta de equilíbrio", isto é, com as quantidades mínimas de cada classe de nutrientes necessárias à sua manutenção (determinada anteriormente). Eram determinados o peso, a composição química (C, N, H, H_2O , proteínas, gordura, carboidrato) e o calor de combustão dos alimentos fornecidos na dieta, das fezes e da urina. Através do calorímetro respiratório, eram determinados a quantidade de dióxido de carbono e de água eliminados na respiração e transpiração. O balanço metabólico era estabelecido a partir desses dados, de forma similar à de Voit e Pettenkofer. O balanço de nitrogênio e carbono era determinado diretamente a partir da entrada e saída desses elementos. Para estabelecer o ganho ou perda de proteínas, o consumo metabólico dessas substâncias era calculado multiplicando-se a quantidade de nitrogênio excretada pela proporção de nitrogênio em proteína. Por sua vez, o ganho ou perda de gordura era calculado a partir da diferença entre a quantidade total de carbono ganha ou perdida no experimento e a quantidade de carbono associada ao consumo de proteínas, multiplicando-se pela proporção de carbono das gorduras. No balanço de energia, comparavam o valor obtido através de calorimetria indireta (calor de combustão do total de alimentos ingeridos menos o calor de combustão equivalente ao ganho

ou perda de proteína e gordura, menos o calor de combustão das fezes e da urina) com o calor medido diretamente no calorímetro. Desse modo, verificaram que a diferença entre esses valores era menor que 2%, confirmando para seres humanos que o calor derivado da oxidação dos nutrientes equivalia ao calor liberado pelo organismo, em condição de repouso – o que Rubner já havia verificado para animais. Através desses experimentos de repouso, Atwater verificou que o gasto energético diário (equivalente à produção de calor no período) de um homem adulto de 70 Kg, em repouso e a 20°C, ficava em torno de 2250 quilocalorias.

Nos experimentos de trabalho muscular, o indivíduo realizava diariamente uma determinada quantidade de trabalho (em geral em bicicleta ergométrica) e era alimentado com a “dieta de equilíbrio” determinada anteriormente para as condições experimentais. Os balanços metabólico e energético eram estabelecidos da mesma forma que nos experimentos de repouso. Comparando a quantidade de calor obtida através de calorimetria indireta com a quantidade de calor medida no calorímetro – que, no caso, incluía o calor liberado pelo indivíduo e o calor produzido na bicicleta ergométrica, equivalente ao trabalho por ele realizado – verificaram que a diferença era menor que 2%. Assim, através dos resultados dos experimentos de repouso e de trabalho, Atwater mostrou que a lei de conservação da energia era válida em organismos vivos – no caso, para o organismo humano (LEFÈVRE 1911, p. 198-9, 223, IHDE & JANSENN 1974).

Os experimentos em que o indivíduo permanecia em jejum e repouso, por sua vez, eram realizados de forma similar. Os balanços metabólico e energético também eram estabelecidos da mesma forma. Nesse caso, a diferença obtida entre a quantidade de calor determinada direta e indiretamente chegou a ser próxima de 5%. Lefèvre (1911, p. 202) explica que nos experimentos de jejum, em que o calor liberado resulta da oxidação de substâncias do próprio organismo, a contribuição do glicogênio, desconsiderada nesse tipo de experimento, passa a ser significativa e interfere no resultado final.

Através de seus experimentos, Atwater verificou também que um aumento na quantidade de trabalho realizada (medida em jejum) era acompanhado de um aumento proporcional da quantidade de calor liberada, assim como no gasto energético total do indivíduo (calor liberado pelo indivíduo + calor equivalente ao trabalho realizado). Ou seja, mostrou que as neces-

sidades energéticas humanas aumentavam proporcionalmente ao aumento da atividade muscular. Além disso, seus resultados confirmaram, de forma mais precisa, que o quociente respiratório estava relacionado diretamente ao tipo de dieta e que as quantidades dos gases envolvidos nas trocas respiratórias eram proporcionais à produção de energia. Por outro lado, mostraram que a relação entre a quantidade de oxigênio consumida e o calor produzido podia ser considerada constante, em média (desconsiderando-se as condições extremas de jejum e trabalho muito pesado), ao contrário da relação entre o gás carbônico eliminado e o calor produzido. Lefèvre (1911, p. 45 e 215) mostra que esses resultados de Atwater também confirmaram a validade do princípio da termoquímica respiratória e deram base para estudos nesse sentido.

A Tabela 2 (LEFÈVRE 1911, p. 215) resume e exemplifica os resultados obtidos por Atwater nesses experimentos.

Atwater realizou também estudos experimentais sobre a capacidade de gorduras, carboidratos e proteínas substituírem-se mutuamente em relação ao fornecimento de energia ao organismo animal. Seus resultados confirmaram a "lei isodinâmica" estabelecida por Rubner alguns anos antes (IHDE & JANSSEN 1974).

Assim, os experimentos calorimétricos de Atwater solucionaram, de forma conclusiva, as principais questões relativas ao metabolismo energético do organismo animal. Os resultados de suas numerosas pesquisas, em grande parte publicados em 1903, tiveram repercussão internacional (IHDE & JANSSEN 1974). Atwater foi o responsável pelo estabelecimento da calorimetria respiratória nos Estados Unidos e, segundo Pike e Brown (1967, p. 8), foi um dos primeiros pesquisadores americanos a contribuir de forma fundamental ao desenvolvimento da ciência da nutrição.

Paralelamente, Rubner investigou o destino de cada classe de nutrientes e sua importância para a realização dos processos internos do organismo, como "combustível fisiológico". Para isso, planejou experimentos nos quais a utilização dos nutrientes na realização de trabalho e produção de calor para manutenção da temperatura corpórea fosse reduzida a um

Tabela 2: Valores do quociente respiratório e calor eliminado por homem sob diversas condições de alimentação e atividade física. Resultados obtidos por Atwater, publicados em 1903 (extraída de LEFÈVRE 1911).

Tipo de experimento	CO ₂ eliminado		O ₂ consumido		quociente respiratório (vol CO ₂ /vol O ₂)	calor total (kcal)	coeficiente térmico de CO ₂ (3) (kcal)	coeficiente térmico de O ₂ (4) (kcal)
	peso (g)	volume(1) (l)	peso (g)	volume(2) (l)				
jejum (média de 4 experimentos)	676,1	342,2	676,6	473,6	0,727	2197	3,25	3,247
repouso, dieta na qual menos de 50 % da energia vinha de carboidratos	794,5	404,5	670,6	496,4	0,862	2287	2,878	3,410
repouso, 50 % da energia fornecida por carboidratos	790,7	402,6	648,0	453,6	0,887	2227	2,816	3,430
repouso, 75 % da energia fornecida por carboidratos	809,7	412,3	628,3	439,8	0,937	2175	2,687	3,460
trabalho moderado (90.000 a 1000.000 kgm ¹²), dieta rica em gordura	1205,9	613,9	1053,5	737,5	0,833	3570	2,960	3,388
trabalho moderado, dieta rica em carboidratos	1286,9	655,1	1081,6	757,1	0,865	3699	2,874	3,420
trabalho pesado (230.000 kgm), dieta rica em gordura	1682,6	856,6	1512,7	1058,9	0,809	5128	3,048	3,390
trabalho pesado, dieta rica em carboidratos	1825,3	929,2	1465,6	1025,9	0,906	5142	2,817	3,500
trabalho muito pesado (630.000 kgm)	3073,6	1564,9	2903,4	2033,4	0,770	9314	3,030	3,210

(1) peso de CO₂ eliminado/1,964

(2) peso de O₂ consumido/1,428

(3) calor total/peso de CO₂ eliminado, calculado por Lefèvre (1911)

(4) calor total/peso de O₂ consumido, calculado por Lefèvre (1911)

¹² 1 kgm = 9,8j.

mínimo. Procurou manter cães em repouso e em ambiente cuja temperatura fosse igual à sua temperatura interna. Em cada experimento foi fornecido ao animal a mesma quantidade de calorias, através de um só tipo de nutriente. Medidas calorimétricas mostraram que para cada 100 calorias fornecidas na forma de proteínas, o organismo animal liberava 131 calorias, ou seja, para tornar fisiologicamente utilizáveis 100 calorias vindas de proteínas o organismo animal gastava 31 calorias de suas próprias reservas. No mesmo sentido, 100 calorias de gordura resultavam na liberação de 113 calorias e 100 calorias de carboidratos resultavam na liberação de 106 calorias. Rubner denominou esse feito de “ação dinâmica específica” de cada classe de nutrientes. Concluiu que quanto menor fosse a ação dinâmica específica de um alimento, mais próximo esse alimento estaria da forma adequada à utilização fisiológica e, portanto, maior seria sua eficácia enquanto “combustível fisiológico” (LEFÈVRE 1911, p. 876-9). Seus resultados foram publicados em 1902.

Desse modo, no início do século XX estavam definidos os princípios da calorimetria moderna e estabelecidos os principais fatos do metabolismo energético animal. Os pesquisadores dispunham, depois de muito esforço e estudo, de uma metodologia para investigação quantitativa dos aspectos energéticos da nutrição.

CAPÍTULO 8

O CONHECIMENTO SOBRE A NECESSIDADE NUTRICIONAL DE MINERAIS

O avanço do conhecimento sobre a composição química dos fluidos e tecidos do organismo animal, a partir do século XVIII, levou ao reconhecimento da presença freqüente de elementos minerais como constituintes da matéria orgânica. Em meados do século XIX sabia-se, por exemplo, que o fosfato de cálcio era o principal constituinte dos ossos, cuja composição incluía, em proporção muito menor, bário e magnésio. Sabia-se também que o ferro fazia parte da hemoglobina e da hematina, constituintes do sangue, o qual continha também fósforo, sódio, cobre, magnésio, chumbo e flúor, em menores quantidades. À medida que esse conhecimento foi se tornando disponível, surgiram questões relativas à fonte desses elementos para o organismo animal. Diversos pesquisadores procuraram verificar experimentalmente se era necessário, ou não, que a dieta fornecesse elementos inorgânicos aos animais.

O desenvolvimento histórico do conhecimento sobre os experimentos minerais parece ter sido pouco estudada por historiadores da ciência. Da literatura consultada, só McCollum (1957) e McCay (1973) referem-se a esse aspecto da história da nutrição. Entretanto, ambos apresentam descrições pouco detalhadas das pesquisas sobre as necessidades minerais realizadas durante o século XIX e início do século XX. Por isso, cabe observar que a descrição e as conclusões sobre o assunto apresentadas a seguir estão condicionadas à limitação do material disponível.

No final do século XVIII era comum a idéia de que os vegetais eram capazes de produzir as substâncias inorgânicas que continham, gerando-as ou transmutando-as. Desse modo, L. N. Vauquelin procurou realizar um experimento com galinhas para verificar se o organismo animal também era capaz de originar matéria inorgânica. Constatou que a entrada de substâncias minerais – no caso, fosfato de cálcio, carbonato de cálcio e sílica – através da alimentação havia sido menor que a saída, através dos excrementos e dos ovos. Concluiu, então, em 1799, que havia ocorrido transmutação de elementos pelo organismo das galinhas. Sua conclusão foi aceita por pes-

quisadores importantes como Fourcroy e Berzelius, e manteve-se por vários anos (McCOLLUM 1957, p. 85-6; McCAY 1973, p. 174). Por outro lado, McCay (1973, p. 173) afirma que, numa revisão sobre química animal publicada em 1803, W. B. Johnson relatou que havia sido verificado que galinhas alimentadas com fosfato de cálcio apresentavam ossos mais fortes e que a ingestão dessa substância por crianças com raquitismo dava bons resultados. No final da década de 1830 ficou demonstrado experimentalmente que os vegetais deviam obter do solo seus elementos inorgânicos. Paralelamente, reforçaram-se as idéias sobre a origem externa das substâncias inorgânicas constituintes do organismo animal. Em seu livro "Essais de Statique Chimique", de 1841, Dumas e Boussingault afirmaram que os resultados de um experimento de Dumas e Prévost com ovos havia demonstrado conclusivamente que um embrião não criava os minerais presentes em seu organismo. Através de análises de ovos frescos e após incubação, haviam verificado que o conteúdo de matéria inorgânica mantinha-se o mesmo. Portanto, as substâncias inorgânicas do ovo haviam sido transferidas ao pintinho¹ (McCAY 1973, p. 175). No mesmo sentido, em 1842, C. J. E. Chossat mostrou experimentalmente que o suprimento de cálcio pela dieta era importante para manter a composição dos ossos. Manteve pombos em dieta de trigo e água e verificou que ocorria perda de matéria inorgânica e que seus ossos tornavam-se muito frágeis. Ao contrário, quando a dieta era suplementada com carbonato de cálcio os ossos dessas aves mantinham-se normais. Esse experimento e outros similares que Chossat realizou em seguida despertaram grande interesse em pesquisadores envolvidos com nutrição animal, particularmente dos que estavam interessados na aplicação desse conhecimento à criação animal (McCOLLUM 1957, p. 323; McCAY 1973, p. 174). Seus resultados davam suporte à idéia de que os animais deviam receber de sua alimentação as substâncias inorgânicas que constituíam seu organismo.

Em seu livro sobre economia rural, publicado em 1844, Boussingault considerou evidente a necessidade nutricional de minerais: já que os ossos continham grande quantidade de fosfato de cálcio, os elementos desse sal deveriam ser supridos pela dieta. Considerou que a questão estava

¹W. Prout havia realizado experimentos similares a partir de 1816, focalizando alguns elementos minerais. Mas, devido à variação do conteúdo de cálcio na casca de ovo para ovo, considerou que não podia concluir se ocorria, ou não, transmutação de elementos (McCAY, 1973, p. 174).

em determinar a quantidade de matéria mineral que deve ser fornecida pela alimentação. Para tentar resolvê-la realizou análises do conteúdo de substâncias inorgânicas de diversos alimentos, e determinou a entrada e saída dessas substâncias – através de seus experimentos de balanço – em bezerros, vaca em lactação e durante gestação, e em cavalo adulto. Constatou que tanto o bezerro quanto a vaca retinham cálcio, fósforo, potássio, sódio e magnésio, fornecidos pela dieta, em quantidade significativa. Desse modo, e porque seu objetivo estava na aplicação desse conhecimento à criação animal concluiu que “nenhum criador ou alimentador deve ignorar a influência das substâncias minerais na nutrição” (BOUSSINGAULT 1844, citado em McCAY 1973, p. 177). Nos anos seguintes, realizou outros experimentos com o objetivo de avaliar a importância nutricional de elementos minerais. McCollum (1957, p. 325) descreve um experimento de Boussingault com dois grupos de três bois, ambos mantidos na mesma dieta vegetal, um recebendo suplemento de sal e o outro não. Depois de um mês, observou que a aparência e atividade dos animais do grupo que recebera sal eram bastante superiores às dos que só receberam o sal presente nos vegetais da dieta. Esses últimos apresentaram queda e emaranhamento dos pelos, couro áspero, andar diferente e “temperamento frio”. Assim, seus resultados evidenciaram que um animal devia receber sal em sua dieta.

Paralelamente, em 1847, Liebig relatou numa carta a W. A. Hofmann sua observação de que, enquanto o sangue e a linfa continham fosfato de sódio, os fluidos externos aos vasos sanguíneos e linfáticos continham fosfato de potássio e de magnésio. A partir disso concluiu que um animal herbívoro que não habitasse o litoral precisava receber cloreto de sódio em sua dieta, já que os vegetais praticamente só lhes forneciam sais de potássio (McCOLLUM 1957, p. 327).

Na mesma época, J. F. Simon (1816-1904) mostrou, através da análise do sangue de uma menina com clorose (anemia ferropriva), que a administração de ferro metálico ou tintura de ferro provocava um aumento significativo no conteúdo de hematina desse fluido e, assim, era eficaz no tratamento da anemia. No início do experimento o sangue da paciente continha 1,431 g de hematina por 100 ml (segundo Simon o normal era 6,209 g) e após 7 semanas de tratamento com ferro esse conteúdo aumentara para 4,598 g (McCOLLUM 1957, p. 347). O ferro estava presente em remédios utilizados no tratamento da anemia há séculos muito antes de sua desco-

berta enquanto elemento. Mas só depois do desenvolvimento de métodos analíticos estes revelaram a presença de ferro no sangue e o baixo conteúdo desse elemento no sangue de indivíduos anêmicos. Na primeira metade do século XIX, foi possível associar esses fatos e recomendar conscientemente o uso de ferro nesse tratamento. McCollum afirma que, aparentemente, foi essa experiência clínica de Simon que estabeleceu o significado do tratamento da anemia através da ingestão de ferro. Poucos anos depois, em 1849, F. Verdeil publicou resultados experimentais que estabeleciam uma relação entre o fornecimento de ferro pela dieta e a composição do sangue. Analisando amostras do sangue de um cão após 18 dias de dieta só de carne e após dieta de pão e batata, verificou que o sangue continha mais ferro e menos potássio após a dieta de carne (McCAY 1973, p. 158).

Assim, no início dos anos 1850, diversos pesquisadores reconheciam que a alimentação devia fornecer aos animais determinados elementos e substâncias inorgânicas que faziam parte da composição química de seus fluidos e tecidos corpóreos, e havia evidências experimentais que davam suporte a isso. Entretanto, muitas das evidências disponíveis não eram conclusivas. O experimento de Verdeil, por exemplo, não estabelecia que o ferro era nutricionalmente essencial, limitava-se a relacionar a ingestão desse elemento com alterações na composição do sangue. Além disso, restavam diversas dúvidas: sobre a forma na qual esses elementos deviam ser fornecidos ao organismo, sobre as quantidades necessárias, sobre o papel fisiológico dos diversos elementos minerais, em particular dos que estavam presentes em pequenas quantidades – como o magnésio, o cobre, o flúor, entre outros². Nesse sentido, diversas pesquisas foram realizadas durante a segunda metade do século XIX e início do século XX direcionadas ao esclarecimento de questões relacionadas à nutrição mineral. Algumas dessas pesquisas, que caracterizam esse movimento, são relatadas a seguir³.

As conseqüências sobre o organismo animal da falta de determinados

² McCollum (1957, p. 328) observa que, em geral as tentativas de avaliar a importância fisiológica dos constituintes do organismo baseavam-se nas quantidades em que esses constituintes estavam presentes. Dessa forma, considerava-se que os elementos e substâncias presentes em quantidades muito pequenas não desempenhavam nenhuma função importante, já que quantitativamente não eram significativos (McCAY 1973, p. 162).

³ Na seção 10.1 também são descritas algumas pesquisas realizadas com o objetivo de avaliar a necessidade nutricional de minerais, cujos resultados evidenciaram a existência de outras substâncias nutricionalmente essenciais, ainda desconhecidas: as vitaminas.

elementos minerais na alimentação foram examinadas por diversos pesquisadores durante a segunda metade do século XIX e evidenciaram a importância fisiológica desses elementos. Estudos sobre o raquitismo mostraram experimentalmente que essa doença estava relacionada à deficiência de cálcio e fósforo na dieta. Nesse sentido, foram importantes as pesquisas de F. Roloff (1830-1885) e E. Voit, entre outros. Entre 1869 e 1879, Roloff realizou pesquisas sobre o raquitismo. Notou que essa doença era favorecida em crianças que recebiam pouco cálcio em sua alimentação e que era comum entre cães, mesmo os que, aparentemente, eram bem alimentados. Procurou, então, realizar uma série de experimentos com cães: estes eram mantidos em dietas simplificadas – compostas, basicamente, de carne (cujo conteúdo de cálcio é muito baixo), amido, açúcar e gordura – suplementadas alternadamente com diversas substâncias inorgânicas. Após um período que variava de algumas semanas a poucos meses, matava os animais, examinava e analisava seus ossos. Desse modo constatou que os cães que haviam recebido suplemento de fosfato de cálcio apresentavam ossos normais quanto à forma e composição, ao contrário dos cães que não haviam recebido. Os ossos desses últimos continham baixa quantidade de cinzas e alguns apresentavam um raquitismo acentuado. Seus resultados evidenciaram que a falta de fósforo e cálcio provocava o raquitismo. Roloff produziu raquitismo também em animais de outras espécies – porco, cabra, coelho – privando-os de fosfato de cálcio (McCAY 1973, p. 181). De forma semelhante, Erwin Voit mostrou experimentalmente que uma dieta deficiente em cálcio provocava raquitismo em 4 semanas. Em 1880 publicou seu trabalho, que incluía uma extensa revisão da literatura a respeito do raquitismo.

Os efeitos sobre o sangue da falta de ferro na alimentação também foram objeto de pesquisas experimentais. H. von Hösslin, por exemplo, procurou examinar os efeitos sobre o conteúdo de hematina do sangue de um animal que não recebesse ferro em sua alimentação. Manteve um cão em dieta composta de caseína, bacon, gordura de porco fundida e amido e constatou uma queda acentuada no conteúdo de hematina do sangue. Em seguida, forneceu-lhe um suplemento de ferro e verificou um significativo aumento nesse conteúdo. McCollum (1957, p. 340-350) ressalta que a dieta fornecida “era tão deficiente em todos os elementos inorgânicos e em todas as vitaminas” que o cão certamente adoeceria se o experimento tivesse sido

estendido por mais umas poucas semanas. Por outro lado, seu experimento mostrou que o ferro fornecido pela dieta era fisiologicamente importante para o animal. Os resultados de Hösslin foram publicados em 1882.

Com relação ao ferro e ao fósforo, havia particularmente dúvidas quanto à forma na qual deviam ser fornecidos ao organismo. Algumas observações clínicas indicavam que o ferro inorgânico não era eficaz no tratamento da anemia. No mesmo sentido, a verificação da presença de sulfato de ferro nas fezes de animais que haviam ingerido ferro em forma inorgânica – por Heller, em 1847 – deu origem a discussões sobre se as formas orgânicas do ferro eram mais adequadas para satisfazer as necessidades nutricionais desse elemento (McCOLLUM 1957, p. 351; McCAY 1973, p. 162). Com o objetivo de resolver essa questão, Gustav von Bunge (1844-1920) sugeriu a seu aluno Carl A. Socin a realização de experimentos de dieta purificada. Socin procurou comparar a adequação nutricional de diversos compostos de ferro, orgânicos e inorgânicos, fornecidos como suplementos de uma dieta básica composta por proteína, gordura e carboidratos – todos em forma purificada – e cinzas do leite como fonte de minerais⁴. Entretanto, devido à falta de vitaminas (na época ainda desconhecidas), nenhum composto de ferro foi capaz de tornar a dieta adequada e a questão inicial não foi esclarecida. Outros pesquisadores que realizaram experimentos de dieta purificada confirmaram os resultados de Socin: os animais morriam independentemente da forma em que o ferro fosse fornecido. Até o final do século a utilização de ferro pelo organismo animal foi examinada por diversos pesquisadores, sob diversos aspectos (McCOLLUM 1957, p. 350). Estudos sobre a absorção de diferentes compostos de ferro e sua distribuição nos fluidos e tecidos corpóreos foram realizados, com base em experimentos que consistiam no fornecimento de ferro – na forma de sais ou através de alimentos que o continham – a animais, que depois eram mortos e tinham seu conteúdo gastrointestinal, sangue, músculo e órgãos analisados para determinação do conteúdo desse elemento. Mas os resultados desses estudos mostraram-se contraditórios com relação à forma em que o ferro era utilizado. Fritz Voit, por exemplo, procurou determinar a absorção de ferro no intestino e constatou que era baixa para qualquer forma em que o elemento fosse inge-

⁴Os experimentos de Socin são descritos na seção 10.1, que trata da descoberta das vitaminas.

rido. Seus resultados foram publicados em 1892. Por outro lado, em 1891, A. J. Kunkel verificou que os suplementos de ferro inorgânico fornecidos a um cão alimentado só com leite eram utilizados na formação de sangue e estocados principalmente no fígado. M. Cloetta, por sua vez, manteve cães em dieta de leite durante certo tempo, depois forneceu-lhes sangue ou derivados de hemoglobina e matou-os após algumas horas. Determinou o conteúdo de ferro do trato gastrointestinal e concluiu, em 1896, que o ferro fornecido – na forma orgânica – não havia sido absorvido (McCAY 1973, p. 167-9).

Outros pesquisadores procuraram verificar em que forma o ferro era melhor aproveitado na produção de hemoglobina. E. Hausermann, por exemplo, realizou uma série de experimentos nesse sentido. Produzia anemia em animais através de dietas compostas exclusivamente por leite e arroz e depois fornecia-lhes um suplemento de ferro inorgânico (na forma de sais) ou de alimentos ricos nesse elemento. Ratos anêmicos melhoravam um pouco com o suplemento de sais de ferro, mas ainda mais com o de alimentos. Gatos também. Filhotes de cão apresentavam a mesma resposta a ambos os suplementos. Seus resultados foram publicados em 1897. No mesmo ano, Eger verificou que cães anêmicos e submetidos a uma sangria, regeneravam sangue rapidamente em dieta de carne e que a adição de sais de ferro a essa dieta não melhorava a regeneração. Por outro lado, constatou que uma dieta de arroz e leite suplementada com sais de ferro não foi suficiente para que um cão nas mesmas condições se recuperasse (McCAY 1973, p. 169-70).

Na verdade, nenhum desses experimentos possibilitava o esclarecimento da questão inicial - se as necessidades de ferro do organismo animal podiam ser supridas através de formas orgânicas e/ou inorgânicas desse elemento. Nos experimentos de dieta purificada, como os de Socin, a deficiência de outras substâncias nutricionalmente essenciais na dieta fornecida aos animais impedia que se avaliasse a adequação nutricional dos diferentes compostos de ferro fornecidos como suplemento. Essa limitação só seria percebida depois do reconhecimento da existência das vitaminas: até lá, todos os experimentos de dieta purificada estariam destinados a fracassar (ver seção 10.1). Nos experimentos em que se comparava a eficiência de suplementos de sais de ferro com suplementos de alimentos naturais ricos em ferro, os pesquisadores desconsideravam o fato de que alimentos como carne, ossos

e vegetais verdes forneciam diversos outros nutrientes – não só vitaminas, mas também outros minerais e, inclusive proteínas, carboidratos e/ou gorduras. Por outro lado, nos experimentos destinados a detectar a absorção de ferro, o ainda limitado conhecimento fisiológico sobre o processo de absorção de nutrientes e sua especificidade, assim como os limites da precisão dos métodos analíticos utilizados, impossibilitaram a obtenção de resultados conclusivos. Assim, durante a primeira década do século XX, ainda havia pesquisadores que consideravam que o ferro inorgânico não podia ser utilizado pelo organismo para formação de hemoglobina (McCAY 1973, p. 171), enquanto diversos outros discordavam dessa suposição.

Com relação ao fósforo, como foi dito, também havia dúvidas sobre a necessidade nutricional de compostos orgânicos desse elemento. Sabia-se que era utilizado na forma de fosfato de cálcio, necessário à formação e manutenção da estrutura óssea. Sabia-se também que estava presente em todos os tecidos do organismo animal e vegetal, essencialmente na forma orgânica. Desse modo, questionava-se se o organismo animal era, ou não, capaz de sintetizar compostos orgânicos de fósforo. No final do século XIX e início do século XX, diversos pesquisadores procuravam verificar experimentalmente se proteínas fosforiladas e compostos como lecitina, cefalina e ácidos nucleicos eram componentes indispensáveis da alimentação animal. McCollum (1957, p. 205-6) cita as pesquisas de F. Steinitz, H. Zadik, R. Leipziger e P. Ehrlich – publicadas em 1898, 1899, 1900 e 1900, respectivamente – realizadas com o objetivo de avaliar a importância nutricional de proteínas fosforiladas, em comparação com proteínas que não contêm fósforo. Todas essas pesquisas basearam-se em experimentos de dieta purificada, com diversos animais (cães, ratos, galinhas, pombos) e todas tiveram como resultado a morte dos animais experimentais. Da mesma forma, W. Falta (1875-1950) e C. T. Noeggerath procuraram verificar se ácidos nucleicos, lecitina e colesterol eram eficazes como suplementos de fósforo de dietas purificadas. Verificaram que nenhum desses compostos, nem o conjunto deles, tornaram adequadas as dietas fornecidas aos animais. Seus resultados foram publicados em 1905. Nenhum desses pesquisadores considerou que outros nutrientes essenciais poderiam estar ausentes das combinações de nutrientes purificados que forneciam como dieta em seus experimentos. Assim, seus resultados experimentais não possibilitaram o esclarecimento da questão da necessidade nutricional de compostos orgânicos de fósforo.

Segundo McCollum (1957, p. 335) muitos outros estudos sobre esses compostos foram realizados na primeira década do século XX, focalizando sua importância nutricional, seu papel fisiológico, sua distribuição entre os diversos tecidos corpóreos. Entretanto, até a descoberta das vitaminas, ainda restavam dúvidas sobre a essencialidade nutricional de fósforo na forma orgânica .

O reconhecimento da importância fisiológica e da essencialidade nutricional de elementos minerais presentes em quantidades mínimas nos tecidos e fluidos corpóreos – os microelementos – também esteve condicionada à descoberta das vitaminas, ao desenvolvimento de métodos analíticos apropriados e ao avanço do conhecimento sobre os processos metabólicos, entre outros fatores. Desse modo, esse reconhecimento só se daria em meados do século XX.

CAPÍTULO 9

O CONHECIMENTO FISIOLÓGICO, QUÍMICO E NUTRICIONAL SOBRE AS PROTEÍNAS NA SEGUNDA METADE DO SÉCULO XIX E INÍCIO DO SÉCULO XX

9.1. IDÉIAS SOBRE DIGESTÃO, ABSORÇÃO E ASSIMILAÇÃO DE PROTEÍNAS

Em meados do século XIX estava estabelecida a importância das proteínas como constituintes principais dos tecidos e fluidos animais e como nutrientes fundamentais para esses organismos. Alguns aminoácidos já eram conhecidos como produtos da hidrólise de proteínas. A glicina havia sido isolada em 1820 por Henri Braconnot (1781-1855), quando ele investigava se os albuminóides eram decompostos em açúcar pela ação de ácidos, como o amido e outros materiais que havia analisado. Tentou com gelatina: adicionou ácido sulfúrico, depois neutralizou com carbonato de cálcio, filtrou e evaporou a solução resultante até virar um xarope. Depois de um mês observou que alguma substância presente havia se cristalizado. Separou os cristais e verificou que tinham sabor doce. Assim, denominou a substância descoberta de “açúcar de gelatina” – que depois foi chamada de “glicocola” e, mais tarde (1848), de glicina, por Berzelius. No mesmo ano, Braconnot isolou outra substância, branca e cristalina, através da hidrólise ácida de tecido muscular e de lã e denominou-a “leucina”¹. Mais tarde, Berzelius classificou ambas como “aminoácidos”. Já em 1846, Liebig descobriu outro aminoácido (embora não o reconhecesse como tal), como produto da hidrólise alcalina de um albuminóide. Depois de fundir caseína com hidróxido de potássio concentrado, dissolveu-a em água quente, acidificou-a com ácido acético e, após resfriamento, separou uma substância cristalina. No ano seguinte, depois de obter a mesma substância a partir da hidrólise de fibrina e de albumina de soro, denominou-a “tirosina”. Aos poucos esses

¹ A leucina havia sido identificada no ano anterior (1819) por J.L. Proust (1755-1826), como produto de fermentação em queijo, e não fora associada aos albuminóides. A ciotina também já havia sido descoberta – em 1810, por W.H. Wollaston (1766-1828), a partir de cálculos urinários – mas também não fora relacionada a essas substâncias (IHDE 1964, p. 358; ROSENFELD 1982, p. 38).

aminoácidos foram sendo isolados a partir de outras proteínas e caracterizados quimicamente. No entanto, ainda não se conhecia a constituição das proteínas. (VICKERY & SCHMIDT 1931; McCOLLUM 1957, p. 46-7; IHDE 1964, p. 358-9; LEICESTER 1974, p. 174; ROSENFELD 1982, p. 37-9).

Havia muitas questões a serem resolvidas sobre as proteínas, tanto em relação à sua constituição química como em relação ao seu destino, enquanto nutrientes, no interior do organismo animal. Para esclarecer esses pontos, as proteínas e seus produtos de digestão passaram a ser objeto de estudo de diversos pesquisadores, sob diversos aspectos e formas de abordagem. Isso levou a descobertas importantes e a concepções e teorias fundamentais para a ciência da nutrição, como será visto nesta e nas duas próximas seções.

A partir da década de 1850 e durante a de 1860, os estudos sobre a digestão de proteínas enfocavam os produtos resultantes da ação da combinação pepsina-ácido clorídrico sobre essas substâncias. Esses produtos haviam sido denominados "peptonas" por Lehmann em 1853 e eram diferenciados das proteínas por não coagularem pelo calor e não serem precipitados pela maioria dos sais que provocam a precipitação de proteínas². Procurava-se desvendar a natureza química das peptonas e das transformações que as originavam a partir dos albuminóides. Os resultados da análise elementar das proteínas e de seus produtos de digestão eram muito similares e, desse modo, diversos pesquisadores consideravam as peptonas como proteínas numa forma mais solúvel. Havia, também, a visão de Liebig e Dumas de que as proteínas não sofriam modificações básicas durante o processo de digestão e eram assimiladas quase intactas – a qual ainda era bastante influente e seria um dos pólos de discussão. Discutia-se se havia, ou não, mais de uma peptona, se o processo digestivo no qual eram produzidas envolvia mudança na proporção dos átomos das moléculas de proteína ou só um rearranjo e, portanto, se as peptonas deviam ser consideradas como substâncias químicas distintas das proteínas ou como proteínas que haviam perdido algumas de suas propriedades características.

Paralelamente, durante a década de 1850, Thomas Graham (1805 - 1869) – entre outros pesquisadores – estudava a difusão de substâncias

²Ver seção 3.2.

através de membranas animais. Verificou que substâncias gelatinosas como os albuminóides difundiam-se lentamente, ao contrário de substâncias cristalinas como a sacarose. Suas observações e sua técnica de diálise – descrita em 1861 – foram logo aplicadas ao estudo da ação de fermentos³ digestivos que agiam sobre os albuminóides. Verificou-se que à medida que a combinação pepsina – ácido clorídrico agia sobre esses nutrientes aumentava a quantidade de substâncias mais rapidamente difusíveis através de membranas animais (McCOLLUM 1957, p. 68; FRUTON 1972, p. 71 e 131). A verificação de que peptonas eram difusíveis foi considerada evidência de que as proteínas eram convertidas a peptonas durante o processo digestivo para assim se tornarem passíveis de serem absorvidas através da membrana intestinal.

Até o final da década de 1860, os estudos sobre digestão de proteínas se concentravam na ação do suco gástrico, apesar de já ter sido descrita a ação das secreções pancreáticas sobre esses nutrientes, por Claude Bernard, em 1856, e por L. Covisart (1824 - 1882), em 1857 (GREENSTEIN & WINITZ 1961, p. 250). Nesse campo de estudos, foram importantes as pesquisas de Willy Kühne (1837-1900), que havia sido aluno de Claude Bernard, sobre a digestão pancreática de proteínas, cujos resultados foram publicados em 1867. Nessas pesquisas, Kühne obteve secreção pancreática através de fistula, preparou infusões de tecido pancreático em água e testou a ação de ambos sobre fibrina de sangue. Verificou que esses fluidos convertiam a fibrina em peptona, mais rapidamente que a pepsina. A peptona obtida não era coagulável, dava reação de Millon⁴ – a qual era considerada na época como indicador para proteínas (HOLMES 1979, p. 176) – e era difusível através de membrana animal (usou pergaminho). Observou também que essa peptona era similar, nas características de solubilidade, à peptona resultante da digestão péptica de fibrina e que ambas eram distintas com relação à outras propriedades – por exemplo, na capacidade de formar

³Na época o nome “fermento” ainda era utilizado para designar tanto os agentes de fermentação como os princípios ativos presentes nos sucos digestivos, cujo modo de ação “através de contato” apresentava características similares à fermentação (ver seção 3.2).

⁴Em 1849, Eugène Millon (1812-1867) descreveu o comportamento de albuminóides (com exceção da gelatina) frente a um reagente preparado através da dissolução de mercúrio em ácido nítrico fumegante seguida de diluição em água. Quando aquecida a mistura, ocorria formação de um precipitado cor de tijolo, o que ficou conhecido como reação de Millon (McCOLLUM 1957, p. 47)

um sal solúvel de chumbo na presença de excesso de acetato de chumbo, característico da peptona produzida pela ação de pepsina (GREENSTEIN & WINITZ 1961, p. 250).

Entre os produtos resultantes da digestão de fibrina pelos fluidos de origem pancreática, Kühne encontrou também leucina e tirosina, que considerou resultantes da decomposição de peptona. Segundo Greenstein e Winitz (1961), Kühne associou esse resultado aos resultados de W. Kölliker e H. Müller, que em 1856 haviam relatado a presença de leucina e tirosina no conteúdo intestinal de um homem e de diversos animais experimentais logo após ingestão de alimentos proteicos, os quais não haviam sido encontrados no conteúdo gástrico dos mesmos, nem no conteúdo intestinal de animais em jejum. Concluiu, então, que esses aminoácidos originavam-se da ação da secreção pancreática, que ele havia verificado *in vitro*.

Como foi visto, a leucina e a tirosina já haviam sido identificadas entre os produtos da hidrólise ácida ou alcalina de diversos materiais protéicos e, assim como a glicina, já haviam sido isoladas em forma relativamente pura, cristalina, e sua composição elementar estava estabelecida. Com base na visão de metabolismo derivada de Liebig, eram considerados como produtos intermediários no catabolismo de proteínas constituintes dos tecidos, ou seja, na “metamorfose regressiva”⁵ pela qual passavam até serem convertidas em uréia que, então, era eliminada (HOLMES 1979, p. 175).

Essa visão era bastante aceita nos anos 1860 inclusive por Kühne que, portanto, interpretou seus resultados partindo das idéias de “metamorfose regressiva” e de “Luxusconsumption”⁶.

Kühne concluiu então, que a maior parte da peptona – que ele verificara ser rapidamente difusível e que considerava como uma modificação das proteínas nesse sentido – era absorvida no intestino delgado. A parte restante seria decomposta pela secreção pancreática dando origem aos aminoácidos encontrados, dentro do processo de “metamorfose regressiva”. Desse modo, Kühne considerou que a idéia de “Luxusconsumption” estava correta, mas que o processo de oxidação se dava no intestino e não no sangue (HOLMES 1979, p. 176).

⁵Ver seção 4.4.

⁶Segundo a idéia de “Luxusconsumption” proposta recente por Bidder e Schmidt (ver seção 7.1) a proteína ingerida em excesso (com relação à necessidade diária) era oxidada diretamente no sangue.

Apesar das conclusões de Kühne terem se encaixado na visão corrente de metabolismo, seus resultados experimentais davam margem a novas especulações sobre o processo de digestão de proteínas que só se concretizariam muitos anos depois. Nas décadas seguintes, de 1870 e 1880, a origem dos aminoácidos produzidos nesse processo continuou a ser atribuída à metamorfose regressiva ou, alternativamente, à ação de bactérias, segundo alguns pesquisadores (HOLMES 1979, p. 177). Assim, as peptonas continuaram a ser o foco da atenção nas pesquisas sobre digestão de proteínas.

De um outro ponto de vista, havia as questões relacionadas à necessidade nutricional de proteínas. Se as peptonas representavam a forma na qual as proteínas eram absorvidas, era razoável supor que poderiam substituir as proteínas na dieta. Para testar essa hipótese, diversos pesquisadores realizaram experiências de dieta controlada com animais. Segundo McCollum (1957, p. 69), o primeiro pesquisador a realizar experimentos nesse sentido foi Pal Plosz (1844 - 1902), cujos resultados foram publicados em 1874. Plosz manteve um cão, durante 18 dias, em dieta de "leite artificial", contendo 5% de peptona - resultante da digestão de fibrina de sangue por um extrato da mucosa gástrica com ácido clorídrico diluído - como única fonte de nitrogênio. Como ao final dos 18 dias o cão havia engordado, concluiu que havia usado a peptona em substituição à proteína. Isso parecia confirmar a idéia de que as proteínas eram absorvidas nessa forma. Outro exemplo, da mesma época, são os experimentos de Leo Richard Maly (1839 - 1891), que alimentou pombos jovens com uma dieta de peptona (como única fonte de nitrogênio), amido, celulose, goma, óleo e cinzas. Constatou que os pombos cresceram, sugerindo que usaram a peptona no lugar de proteína. Greenstein e Winitz (1961, p. 252) observam que os resultados desses experimentos são questionáveis, pois a ausência de proteínas entre as peptonas não estava assegurada. Na verdade, fornecia-se aos animais uma mistura complexa de produtos da clivagem de proteínas que podia, inclusive, contê-las.

Paralelamente, Kühne continuou suas pesquisas sobre digestão pancreática de proteínas. Num artigo publicado em 1876, denominou de "tripsina" o princípio ativo do suco pancreático que agia sobre proteínas e apresentou os resultados de experimentos "in vivo" que confirmavam sua descoberta anterior. Kühne introduziu fibrina no intestino delgado de um cão, na alça intestinal em que o duto pancreático introduzia a secreção

pancreática. Depois de 4 horas o animal foi morto e o conteúdo dessa alça intestinal foi separado. Kühne constatou que a maior parte da fibrina havia sido degradada e isolou, dentre os produtos de degradação, peptona, leucina e tirosina. Concluiu, portanto, que os mesmos produtos originavam-se da ação do princípio pancreático "in vitro" ou "in vivo". A quantidade de peptona obtida no experimento "in vivo", entretanto, foi muito menor do que esperava a partir dos resultados "in vitro" (GREENSTEIN & WINITZ 1961, p. 251).

Ainda no mesmo artigo, Kühne relatou sua observação de que a digestão de proteínas por pepsina era incompleta e resultava um produto resistente a esse fermento⁷. Verificou também que esse produto, uma peptona podia ser digerido pela tripsina, com produção de leucina, tirosina e um outro tipo de peptona que, por sua vez, era resistente à tripsina (VICKERY & OSBORNE 1928, p. 396). Esses resultados deram origem à concepção de Kühne sobre a estrutura das proteínas. Supôs que indicavam que as moléculas de proteínas eram compostas por dois tipos de grupos: um que resistia à ação dos fermentos, que ele denominou "grupo anti", e outro que era decomposto, o "grupo hemi".

Em seguida, trabalhando com Russel H. Chittenden (1856 - 1943) e Richard Neumeister (1857 - 1906), Kühne procurou desenvolver procedimentos que possibilitassem a separação dos diversos produtos da digestão de proteínas, cuja inexistência era uma limitação para todos os pesquisadores que se dedicavam a esse assunto⁸. A base de seu método era o processo de "salting out", ou seja, a precipitação fracionada dos produtos de digestão a partir de soluções de sais, no caso, cloreto de sódio, sulfato de magnésio e sulfato de amônia, em diversas concentrações e diversas condições de temperatura e reação (VICKERY & OSBORNE 1928, p. 397; FRUTON 1972, p. 114; HOLMES 1979, p. 178). Através desses procedimentos, muito trabalhosos, separaram diversas substâncias produzidas pela ação de pepsina, de tripsina ou de ácido sobre proteínas, que consideraram intermediários

⁷Segundo Vickery e Osborne (1928 p. 396) essa observação já havia sido feita por Georg Meissner, em 1859, a qual foi "tratada com ceticismo ou completamente desconsiderada" até que Kühne a repetiu.

⁸Na época, diversos químicos se dedicavam ao desenvolvimento de métodos para isolamento e caracterização de proteínas e seus produtos de decomposição. Ver a seção seguinte, 9.2.

da transformação de proteínas e peptonas. Para estas últimas, propuseram uma definição mais precisa (pois havia muita confusão a respeito do que se considerava como peptona): eram os produtos da digestão de proteínas que não precipitavam por saturação com sulfato de amônia e que davam reação de biureto⁹ positiva (McCOLLUM, 1957, p. 70; HOLMES 1979, p. 178).

Com base nos resultados dessas análises, Kühne, Chittenden e Neumeister fizeram suposições sobre a sequência das transformações às quais as proteínas estavam sujeitas durante o processo digestivo. De forma resumida, segundo Vickery e Osborne (1928, p. 397), concluíram que a pepsina agia sobre as proteínas convertendo-as em sintonina e em seguida quebrando-a em duas partes, classificadas como albumoses primárias. Uma delas, protoalbumose, era solúvel em água e a outra, heteroalbumose, solúvel em solução de sais neutros. Ainda sob ação da pepsina, as albumoses primárias eram transformadas em albumoses secundárias ou deutero-albumoses, cujo número era incerto e as quais eram difíceis de distinguir e estas a peptonas solúveis, denominadas anfopeptonas por ainda conterem os grupos anti e hemi. Já no intestino delgado, a tripsina agia sobre as anfopeptonas quebrando-as em duas partes: anti-peptonas, resistentes à ação de tripsina, e hemipeptonas, que eram logo decompostas, dando origem a leucina, tirosina e outros aminoácidos. Para compatibilizar essa visão com novos resultados experimentais – por exemplo, verificou-se que na hidrólise ácida ocorria formação de uma substância insolúvel pouco digerível por enzimas e que originava só anti-peptonas – Neumeister elaborou um esquema mais complexo, que publicou em 1887.

Ainda segundo Vickery e Osborne (1928, p. 396), a “hipótese dos grupos hemi e anti” deu a base para praticamente todas as pesquisas fisiológicas e a maioria dos estudos químicos sobre proteínas até o final do século XIX. Os métodos de “salting out” desenvolvido por Kühne e seus cola-

⁹Em 1833, Ferdinand Rose (1809 - 1861) observou que albuminas em contacto com solução alcalina de sulfato de cobre davam origem a uma cor azul-violeta. Mais tarde, em 1848, Gustav H. Wiedemann (1826-1899) constatou que essa cor era produzida por uma substância que ele denominou “biureto”. A “reação de biureto” passou a ser amplamente utilizada como teste para detectar a presença de proteínas. Mas a elucidação de seu mecanismo só se daria no início do século XX, a partir dos trabalhos de Emil Fischer em síntese de polipeptídeos (GREENSTEIN & WINITZ 1961, p. 627; FRUTON, 1972, p. 100-1). Sabe-se hoje que a reação de biureto positiva para proteínas depende da existência de, pelo menos, duas ligações peptídicas.

boradores foram muito utilizados na separação de produtos de hidrólise de proteínas, mas os resultados não eram quimicamente significativos, pois não era possível caracterizar como espécies químicas únicas as diversas "substâncias" isoladas. Assim, essas "substâncias" foram sendo denominadas apeptonas, parapeptonas, antipeptonas, heteroalbumoses, protoalbumoses, etc., sem serem definidas quimicamente de forma clara. Isso resultou em confusão, pois alguns pesquisadores não obtinham os mesmos resultados que outros, sob as mesmas condições (McCOLLUM 1957, p. 71) – uma situação que se estenderia até o início do século XX.

Paralelamente, durante as décadas de 1870 e 1880, outra questão polarizava a atenção de fisiologistas e químico-fisiologistas e era objeto de diversas pesquisas: qual o destino metabólico das peptonas que, segundo os experimentos de Kühne e outros, desapareciam no intestino? Kühne havia suposto que eram absorvidas. Mas, ao contrário do que se esperava, verificou-se que não eram encontradas no sangue, a não ser em quantidades mínimas, logo após a digestão de proteínas¹⁰. Experimentos com introdução de peptonas diretamente no sangue (através de injeção intravenosa) de animais, ora resultavam na intoxicação destes, ora indicavam que as peptonas desapareciam rapidamente – a partir do que A. Schmidt-Mühlheim supôs que sofriam transformação química imediata. Em 1881, Franz Hofmeister (1850-1922) realizou o mesmo tipo de experimento, injetando peptona no sangue de animais, e verificou que a maior parte desta era eliminada através da urina. Estendendo o experimento, injetou-a subcutaneamente, procurando com isso reproduzir a velocidade de entrada no sangue da peptona absorvida no intestino. O resultado foi o mesmo: a maior parte foi eliminada na urina. Hofmeister inferiu, então, que durante o processo de absorção as peptonas deviam sofrer algum tipo de mudança antes de entrarem na circulação, que as tornasse atóxicas e que impedisse de serem eliminadas diretamente. Senão, segundo ele, a conversão de proteínas em peptonas durante a digestão não teria sentido. Partindo dessas considerações e supondo que essa mudança envolvia algum tipo de combinação, considerou que isso ocorria no interior das células brancas do sangue, presentes em abundância na membrana mucosa intestinal (HOLMES 1979, p. 177).

¹⁰Esses resultados seriam contestados e confirmados experimentalmente diversas vezes até a primeira década do século XX.

Para testar sua hipótese, Hofmeister realizou experimentos nos quais animais eram mortos em intervalos diversos após alimentação e tinham seus órgãos analisados com relação ao conteúdo de peptona. Para isso, preparava extratos de tecidos, separava as proteínas por precipitação e estimava a quantidade de peptona presente através da intensidade da reação de biureto. Com esse procedimento, verificou que só era possível detectar peptona regularmente na membrana mucosa intestinal e que a quantidade desta chegava a um máximo ao mesmo tempo (durante o período de digestão) que ocorria a maior excreção na urina. Embora considerasse o primeiro resultado como suporte à sua visão, considerou que o segundo reforçava a idéia de que a peptona era intermediária na "metamorfose regressiva". Por fim, concluiu que esse tipo de pesquisa não possibilitava entender quais mudanças as peptonas sofriam, e em que local, durante o processo de absorção (HOLMES 1979, p. 177-8). Hofmeister realizou ainda outros experimentos visando responder essa questão, mas novamente concluiu que os resultados não eram decisivos.

Já no final dos anos 1880, Neumeister – que havia trabalhado com Kühne no desenvolvimento dos procedimentos de "salting out" – passou a se dedicar à mesma questão. Para detectar peptona, em seus experimentos, utilizou os testes previstos na definição de peptona que haviam introduzido, ou seja, a fração dos produtos de digestão de proteínas que permanecia solúvel em solução saturada de sulfato de amônia e que dava reação de biureto positiva. Neumeister injetou peptona no intestino delgado de um coelho e verificou, após certo tempo, que não era possível encontrar peptona no sangue. Depois, injetou peptona diretamente no sangue e esta apareceu na urina, confirmando o resultado obtido por Hofmeister. Procurou também fazer comparações, injetando do mesmo modo diversas proteínas e albuminoses, verificando o que acontecia. De seus resultados, concluiu que as peptonas eram "substâncias estranhas" no sangue e, como Hofmeister, que deviam sofrer transformações na membrana mucosa do trato digestivo. Em seguida Neumeister procurou testar isso experimentalmente, colocando soluções de peptona em contato com pedaços de mucosa intestinal e verificou que esta desaparecia da solução, o que parecia confirmar sua suposição.

Ao tratar da questão específica do tipo de transformação que as peptonas sofriam, que as fazia desaparecer frente às análises, Neumeister considerou que havia duas alternativas: ou eram reconvertidas a proteínas,

ou eram quebradas em moléculas menores. Nesse sentido, depois de rever as evidências experimentais apresentadas por outros pesquisadores a favor de cada uma das alternativas, concluiu que eram pouco convincentes. Pois os que defendiam a idéia da formação de proteínas não haviam usado métodos que garantissem que o que consideravam peptona não incluía proteína. Pelo outro lado, a conversão de peptonas em aminoácidos (verificada experimentalmente) podia ser atribuída a reações secundárias – por exemplo, pela ação de bactérias presentes no intestino. Assim, Neumeister procurou detectar a presença de leucina, tirosina e triptofano (o qual ele mesmo identificara como produto da decomposição de proteínas) nos fluidos em contato com partes da membrana intestinal que haviam provocado o desaparecimento de peptona. Chegou a detectar quantidades muito pequenas de tirosina e de triptofano, mas os resultados foram irregulares e não permitiram tirar conclusões (HOLMES 1979, p. 179).

Assim, por volta de 1890, depois de muitos experimentos, por diversos pesquisadores, a questão do destino metabólico das peptonas permanecia sem solução. Continuavam a coexistir concepções diferentes, pois os resultados disponíveis não possibilitavam decidir entre uma ou outra. Com isso, a visão de que as peptonas eram formas difusíveis de proteínas – originadas sem mudanças básicas – a partir das quais estas eram novamente formadas, permanecia influente, aparecendo em tratados importantes de fisiologia e de química fisiológica da época. Sobre a decomposição de peptonas a aminoácidos argumentava-se que, se fosse significativa, seria um desperdício de energia química (HOLMES 1979, p. 180).

A situação permaneceu confusa até o final do século XIX. Diversos pesquisadores continuaram estudando os aparentemente inúmeros produtos da digestão de proteínas, novos aminoácidos foram isolados a partir de hidrolisados protéicos, mas não se chegou a nenhum resultado que esclarecesse a questão geral do metabolismo desses nutrientes. As relações químicas e metabólicas entre esses diversos produtos permanecia obscura.

Por outro lado, depois das pesquisas de Neumeister – cujos resultados foram publicados entre 1880 e 1890 – e até o final do século, a questão do destino fisiológico das peptonas foi praticamente deixada de lado. Isso perdurou até que, por volta de 1890, Otto Conheim (1873-1953) a retomou, tendo como ponto de partida os trabalhos de Neumeister. Depois de confirmar, da mesma forma que Neumeister, que as peptonas desapareciam

quando colocadas em contato com pedaços de mucosa intestinal, Conheim procurou verificar se, nesse tipo de experimento, ocorria um acréscimo de proteínas nos pedaços de mucosa. Segundo ele, isso deveria ocorrer se houvesse regeneração de proteínas. Para isso realizou numerosos experimentos, mas não conseguiu detectar a formação de proteínas. Procurou, então, analisar a solução da qual as peptonas haviam desaparecido. Verificou que esta não dava reação de biureto e que continha aproximadamente a mesma quantidade de nitrogênio que antes – usando para essa determinação um método recentemente desenvolvido por Johann G.C.T. Kjeldahl (1849-1900), bastante preciso. A partir desses resultados concluiu que a peptona era clivada, por ação da membrana mucosa, sendo convertida em produtos cristalinos (HOLMES 1979, p. 180). Em seguida, para verificar se a decomposição era determinada pela própria mucosa ou por ação enzimática, preparou um extrato aquoso da membrana mucosa e repetiu o experimento. Chegou ao mesmo resultado, o que indicava que a ação era enzimática. Além disso, obteve cristais de leucina e tirosina a partir da solução resultante, confirmando, de forma mais clara, sua conclusão anterior.

A partir do extrato aquoso da membrana mucosa intestinal, Conheim procurou isolar a enzima que agia sobre as peptonas, aplicando os procedimentos de precipitação fracionada desenvolvidos por Kühne (HOLMES 1979, p. 181). Assim, purificou parcialmente a enzima presente e mostrou que era diferente da tripsina, denominando-a, então, “erepsina” e concluindo que era produzida na própria mucosa intestinal. Através de outros experimentos de digestão “in vitro”, mostrou que a erepsina agia sobre peptonas e algumas albumoses, mas não sobre proteínas intactas (FRUTON 1972, p. 431).

Desse modo, os resultados de Conheim, publicados em 1901, mostraram que a digestão de proteínas não parava nas peptonas, dando suporte experimental decisivo à visão de que estas eram decompostas em aminoácidos. Sua pesquisa, segundo Holmes (1979, p. 181), foi “uma continuação da longa tradição de experimentos em digestão derivada diretamente das realizações de Tiedemann e Gmelin e de T. Schwann no início do século XIX”. Foi também, de certa forma, uma “extensão lógica dos experimentos realizados por Kühne em 1867”, usando métodos analíticos mais avançados, só então disponíveis.

Conheim considerou que os aminoácidos assim originados eram, na

maior parte, usados como fonte de energia, submetidos à combustão. Supôs também que parte deles podiam ser utilizados, nas células, para a síntese de proteínas (HOLMES 1979, p. 181).

As implicações das pesquisas de Conheim são consideradas na seção 9.3, juntamente com os estudos sobre química de proteínas e de experimentos de dieta com hidrolisados protéicos, os quais são descritos na próxima seção.

9.2 A QUÍMICA DE PROTEÍNAS E AS HIPÓTESES SOBRE SUA ESTRUTURA

Depois que a teoria das proteínas de Mulder foi descartada – por não dar conta de novas evidências experimentais – muitos anos se passaram sem que fosse proposta outra teoria sobre a estrutura dessas substâncias que explicasse seu comportamento químico e a relação entre os diversos representantes dessa classe. Já se reconhecia a limitação da análise elementar para caracterização química dessas substâncias, mesmo quando combinada com a determinação de reações frente a certos reagentes. Além disso, os métodos disponíveis para isolamento e purificação de proteínas eram ainda bastante limitados, de forma que, em geral, os pesquisadores utilizavam misturas complexas de proteínas em suas análises – o que restringia ainda mais o significado químico dos resultados.

Interessados em desvendar a natureza química dessas substâncias, tão importantes como constituintes do organismo animal, diversos químicos passaram a investigá-las em meados do século XIX. Procuraram testar novos reagentes, submetê-las a processos químicos como hidrólise e oxidação (mais suaves que a combustão, base da análise elementar) e desenvolver procedimentos que tornassem possível o isolamento, purificação e identificação tanto das proteínas como de seus produtos de reação e decomposição. Esses estudos, diversos em seus objetivos e métodos, evidenciaram a complexidade dessa classe de substâncias. Ao mesmo tempo, contribuíram para a compreensão de sua constituição química, tornando disponíveis novos métodos de análise e produzindo conhecimento empírico sobre essas substâncias, como será visto a seguir.

Nos anos 1850, Prosper-Sylvain Denis (1799-1863) desenvolveu um novo procedimento para separação fracionada de proteínas, partindo da observação de que muitas proteínas insolúveis em água eram solúveis em soluções de

sais neutros. Denis aplicou esse procedimento na separação dos constituintes protéicos do sangue humano e seus resultados mostram que eram muitas, e diversas, as proteínas presentes (McCOLLUM 1957, p. 57; FRUTON 1972, p. 121).

Na mesma década, pesquisadores em química agrícola realizaram estudos sobre os componentes albuminóides de vegetais. Entre estes, destacaram-se os trabalhos de Heinrich Ritthausen (1826-1912) – que havia sido estudante de Liebig – que se dedicou a extrair, de forma fracionada, as proteínas presentes em diversos tipos de sementes. Para isso, procurou separar sucessivamente, as proteínas solúveis em água e em soluções bastante diluídas de ácidos e álcalis. Ritthausen mostrou, através de seus resultados (publicados em 1862), que havia nos vegetais uma grande diversidade de proteínas, muito maior do que se podia imaginar (McCOLLUM 1957, p.58).

Por outro lado, métodos hidrolíticos eram muito utilizados pelos químicos em pesquisas sobre proteínas, seguidos de tentativas de isolamento e identificação dos produtos resultantes, os quais, em geral, eram considerados fragmentos estruturais dessas substâncias. O objetivo, de modo geral, era o de obter informações a respeito de sua constituição química. Assim, Ritthausen, dando continuidade à sua pesquisa, submeteu a hidrólise as diversas proteínas vegetais que havia separado e procurou identificar os produtos resultantes. Entre esses detectou tirosina e leucina e identificou dois novos aminoácidos, ácido glutâmico e ácido aspártico, como constituintes de proteínas. Em suas conclusões, publicadas em 1872, Ritthausen considerou que a diversidade das proteínas, e sua individualidade, estava relacionada às diferenças na proporção dos diversos aminoácidos presentes (GLAS 1979, p. 129; FRUTON 1972, p. 122). Segundo Glass (1979), os resultados de Ritthausen foram negligenciados por seus contemporâneos e só seriam reconsideados no final do século, por Thomas Burr Osborne. No ano seguinte, 1873, Hlasiwetz e Habermann relataram a identificação dos mesmos aminoácidos e também de amônia, como produtos da hidrólise de caseína com ácido sulfúrico em presença de zinco (FRUTON 1972, p. 110).

Também em 1872, Otto Nasse (1839 - 1903) publicou os resultados de seus estudos sobre proteínas. Com base num método para determinação da amônia liberada durante a hidrólise alcalina de proteínas, desenvolvido por R. Thiele, verificou que proteínas diferentes continham proporções diferentes de amônia (McCOLLUM 1957, p. 52). Verificou também que

a quantidade de amônia liberada na hidrólise alcalina era maior que na hidrólise ácida dessas substâncias e que, no caso de hidrólise alcalina, essa liberação ocorria primeiro rápida e em seguida lentamente. Supôs, então, que as proteínas continham dois tipos de grupos que liberavam amônia por hidrólise, ou seja, que o nitrogênio presente estava ligado de duas formas diferentes nas proteínas. Concluiu que era provável que o nitrogênio "fracamente ligado" estava ligado da mesma forma que o nitrogênio de uma amida ácida ou da uréia, pois este era rapidamente liberado como amônia por hidrólise ácida. Mas, sua conclusão não foi considerada até o final do século (VICKERY & OSBORNE 1928, p. 415).

Pouco depois, em 1875, Paul Schützenberger (1829-1897) descreveu seus experimentos de hidrólise alcalina de diversas proteínas, usando barita (hidróxido de bário). Nesses experimentos, manteve as soluções alcalinas de proteínas sob aquecimento, em recipientes fechados, por vários dias, e depois determinou a proporção relativa de amônia, dióxido de carbono e ácido oxálico. A partir dos resultados propôs que grupos "ureido" e oxamida faziam parte da estrutura da molécula de proteína (VICKERY & OSBORNE 1928, p. 395; FRUTON 1972, p. 111; GLAS 1979, p.80). Seu trabalho recebeu muita atenção na época, mas depois sua visão foi descartada, pois novos experimentos não confirmaram seus trabalhos.

Paralelamente, como foi visto na seção anterior, diversos pesquisadores se dedicavam a estudar o processo de digestão de proteínas, sua decomposição pelas enzimas digestivas, procurando identificar os produtos resultantes. Esses estudos também originaram concepções sobre a estrutura química das proteínas, como a de Kühne e seus colaboradores, descrita anteriormente.

Os esforços no sentido de isolamento de proteínas individuais e dos produtos resultantes de sua decomposição, levaram ao desenvolvimento de novos procedimentos químicos com esse objetivo. Em 1878, Camille Méhu (1835 - 1887) verificou que proteínas em solução aquosa eram precipitadas quantitativamente e sem alterações irreversíveis (pois continuavam solúveis em água ou em solução de sais neutros) através de saturação por sulfato de amônia. Sua descoberta foi confirmada por Adrianus Heynsius (1831 - 1885) em 1884 e, no ano seguinte, Heynsius e Kühne relataram o uso desse sal na separação fracionada de misturas contendo proteínas, albumoses e

peptonas. Depois, como foi visto na seção anterior, Kühne, Neumeister e Hofmeister chegaram a elaborar um conjunto de procedimentos de "salting out" utilizando vários sais em diversas concentrações e condições de temperatura e acidez, o qual aplicaram na separação de produtos de digestão de proteínas. Seu método foi bastante utilizado por outros pesquisadores para a separação dos produtos resultantes da hidrólise de proteínas.

No mesmo sentido, novos reagentes foram sendo introduzidos nas pesquisas sobre proteínas. Em 1886, Ernest A. Schulze (1840 -1912) e E. Steiger relataram que, adicionando ácido fosfotúngstico a um extrato aquoso de tremoço estiolado, obtiveram um precipitado branco e abundante, a partir do qual isolaram um novo aminoácido, arginina. Outros químicos da época também fizeram uso desse novo reagente em suas pesquisas. Em 1889, Edmund Drechsel (1843-1897) hidrolisou caseína com ácido clorídrico e cloreto estanoso, e adicionou ácido fosfotúngstico à mistura. Obteve um precipitado que, depois de lavado e tratado com hidróxido de bário para remoção do precipitante, deu origem a um produto básico na forma cristalina. Este, depois de ser estudado por outros químicos e pelo próprio Drechsel, foi reconhecido como sendo um novo aminoácido presente em hidrolisados protéicos, a lisina (McCOLLUM 1957, p. 53; McCAY 1973, p. 100-1). Segundo McCollum (1957), a descoberta da histidina (outro aminoácido básico) realizada paralelamente por Albecht Kossel (1853 - 1927) e Sven G. Hedin (1859 - 1933), também esteve associada à precipitação por ácido fosfotúngstico. Já McCay (1973) relata que Kossel isolou esse aminoácido a partir do precipitado obtido pela adição de cloreto de mercúrio ao hidrolisado de protamina com ácido sulfúrico e que Hedin obteve histidina através de um procedimento que envolvia um sal de prata¹¹. McCollum afirma também que a utilização do ácido fosfotúngstico na separação de aminoácidos básicos foi importante para que se verificasse a grande variação das proteínas com relação a esses constituintes, além de ter sido fundamental para a descoberta da presença desses aminoácidos em proteínas de diversas fontes.

Com relação à separação de aminoácidos resultantes da hidrólise de proteínas, um passo importante foi dado por Theodor Curtius (1857 - 1928),

¹¹Como os artigos de Kossel e de Hedin não se encontram disponíveis, não foi possível saber se o ácido fosfotúngstico esteve, ou não, presente na descoberta da histidina.

no início da década de 1880. Curtius verificou que, após esterificação, era possível destilar vários aminoácidos, à baixa pressão, sem que fossem decompostos. Mais tarde, já no final do século, Emil Fischer (1852 - 1919) retomou a técnica desenvolvida por Curtius e a utilizou para separação dos aminoácidos presentes em hidrolisados de proteínas. Depois de destilar, de forma fracionada (à vacuo e à baixa temperatura de ebulição), os ésteres dos aminoácidos presentes na mistura, Fischer hidrolisou cada fração desses ésteres, obtendo os aminoácidos na forma cristalina. Desse modo, isolou e identificou três novos aminoácidos como constituintes de proteínas: valina e prolina em 1901, e hidróxiprolina em 1902 (ROSENFELD 1982, p. 40).

Assim, gradativamente, várias substâncias foram sendo identificadas como produtos da clivagem de proteínas. Por outro lado, os diversos procedimentos empregados nas pesquisas davam origem a uma grande variedade de produtos, de identidade e pureza incertas, cuja caracterização muitas vezes diferia de um pesquisador para outro, e aos quais "foram dados nomes que logo desapareceriam do vocabulário químico" (FRUTON 1972, p. 111). Além disso, a questão sobre como distinguir quais produtos faziam parte da estrutura das moléculas de proteínas e quais eram formados durante os procedimentos experimentais estava sempre presente. Alguns pesquisadores consideravam os resultados da hidrólise por enzimas digestivas como critérios para essa distinção (GLAS 1979, p. 80). Entretanto, como foi visto na seção anterior, esses resultados também eram confusos e diferiam de um pesquisador para outro, pois os produtos resultantes eram numerosos e seu isolamento e caracterização química era difícil. Outro problema era que a quantidade total dos produtos que podiam ser isolados e identificados só correspondia a uma parte, em peso, das proteínas inicialmente presentes. Isso indicava que havia outras substâncias a serem reconhecidas (FRUTON 1972, p. 110).

Vários outros processos químicos utilizados no estudo de compostos orgânicos mais simples também foram aplicados em estudos sobre proteínas na segunda metade do século XIX. Assim, essas substâncias foram submetidas à oxidação (com permanganato de potássio, ácido crômico, peróxido de hidrogênio), à fusão com álcalis, e a modificações químicas por ação de cloretos, brometos e iodetos. Novamente, eram muitos e diversos os produtos resultantes e, muitas vezes, quimicamente indefinidos (FRUTON 1972,

p. 111).

Durante a segunda metade do século XIX, houveram também tentativas de síntese de substâncias similares a peptonas, a partir de aminoácidos. Num trabalho publicado em 1871, Eugen Schaal relatou que, por aquecimento de asparagina a 180°C , obteve um novo produto. Este foi estudado por diversos pesquisadores. No final da década de 1890, Hugo Schiff (1834 - 1915) concluiu que era um polímero e verificou-se que dava reação de biureto, característica de algumas peptonas e de proteínas. Curtius também se dedicou à síntese: em 1881 obteve ácido hipúrico a partir de cloreto de benzoil e glicinato de prata e, em 1883 relatou a formação da glicina anidrido a partir de uma solução aquosa de glicinato de etila. Em 1891, Schützenberger chegou a um produto que também dava a reação de biureto, através do aquecimento de uma mistura de diversos aminoácidos e uréia. Mas até o final do século pouco se sabia sobre a estrutura química desses produtos e sobre sua relação com a constituição das proteínas (FRUTON 1972, p. 116; ROSENFELD 1982, p. 43).

Assim, no final do século XIX, havia muitos dados empíricos disponíveis a respeito da constituição química das proteínas, mas fazia falta uma teoria que os explicasse de forma coerente. Considerava-se, em geral, que as moléculas de proteínas eram compostas por várias partes diferentes que podiam ser separadas após hidrólise ácida, alcalina ou enzimática. Diversos aminoácidos haviam sido isolados a partir de hidrolisados de diversas proteínas animais e vegetais e alguns pesquisadores os consideravam como constituintes dessas substâncias.

Fruton (1979, p. 4) ressalta que "uma das características mais notáveis das especulações sobre a estrutura das proteínas no século XIX é a falta de ênfase nos aminoácidos como unidades estruturais das proteínas". Da mesma forma, outras substâncias eram consideradas como partes das moléculas de proteínas: diversas peptonas e albumoses, assim como amônia e sulfeto de hidrogênio, entre outras. Ao mesmo tempo, havia pesquisadores que negavam que as proteínas eram moléculas definidas e as consideravam como colóides organizados na estrutura das moléculas vivas (FLORKIN 1972, p. 279-85). Nesse contexto, a partir dos resultados de novas pesquisas, foram sendo elaboradas novas hipóteses sobre a estrutura química das proteínas, que seriam anunciadas logo nos primeiros anos do século XX.

Em seus estudos sobre as protaminas¹² iniciados em 1894, Kossel verificou, através da identificação dos produtos de sua hidrólise, que eram constituídas essencialmente por alguns poucos aminoácidos, entre os quais havia uma grande proporção de arginina. Verificou também, assim como outros pesquisadores, que essas substâncias podiam ser digeridas por tripsina, o que indicava que estavam relacionados às proteínas. Supôs, então, que as protaminas podiam ser consideradas como as mais simples das proteínas. Mais tarde, já em 1901, apresentou sua hipótese sobre a estrutura das proteínas, partindo dos resultados de suas pesquisas e de sua suposição anterior. Segundo Kossel, as proteínas mais complexas deviam ser constituídas de um núcleo central, composto pelos aminoácidos comuns a todas elas (entre os quais a arginina seria o predominante), em torno do qual estariam ligados mais aminoácidos e outras unidades estruturais maiores. Como evidência, apresentou dados sobre o conteúdo de arginina de diversas proteínas (VICKERY & OSBORNE 1928, p. 406-7; FRUTON 1972, p. 118; GLAS 1979, p. 130). Segundo Vickery e Osborne (1928), a hipótese do “núcleo protamina” de Kossel não teve muita repercussão na época, pois foi “completamente obscurecida” pelo surgimento da hipótese de polipeptídeos (que será considerada a seguir), melhor embasada empiricamente. Por outro lado, provavelmente, foi Kossel o primeiro a enfatizar a necessidade de considerar a questão da estrutura das proteínas em termos do arranjo das unidades de aminoácidos (FRUTON 1972, p. 111; FRUTON 1979, p. 5).

Paralelamente, logo no início do século XX, Emil Fischer e Franz Hofmeister chegaram independentemente, e por caminhos diferentes, a uma explicação sobre a estrutura das proteínas que esclareceu a questão e indicou a direção que a química dessas substâncias tomaria a partir de então.

Fischer começou a estudar proteínas em 1899. Dedicou-se primeiro a pesquisas sobre aminoácidos, “para chegar a novos pontos de vista e métodos para seus derivados complexos” (FISCHER 1906, citado em FRUTON 1979, p. 5). Partindo de trabalhos de Curtius sobre a destilação fracionada de ésteres de aminoácidos, Fischer aplicou sua técnica para separação dos aminoácidos presentes em hidrolisados de proteínas. Verificou

¹²O termo “protamina” foi introduzido em 1874 por F. Meischer (1844 - 1895) para designar uma substância básica presente no esperma de salmão, que ele havia descoberto. Mais tarde, depois de diversos estudos sobre essa e outras bases similares, o termo passou a denotar toda a classe dessas substâncias (VICKERY & OSBORNE 1928, p. 406).

que através de hidrólise das diversas frações era possível obter diversos aminoácidos isolados, na forma cristalina. Paralelamente, partindo dos trabalhos de Curtius sobre a formação de glicina anidrido – constituída a partir de duas moléculas de glicina – Fischer supôs que se o anel desse composto pudesse ser rompido, daria origem a uma combinação de dois aminoácidos. Isso foi possível através da fervura em solução concentrada de ácido clorídico e em 1901 Fischer publicou um artigo sobre a síntese de glicilglicina. Passou, então, a se dedicar ao desenvolvimento de métodos para “combinar em ligação similar à de anidrido, sucessivamente e com intermediários definíveis, as moléculas de vários aminoácidos” (FISCHER 1901, citado em FRUTON 1972, p. 116). Assim, Fischer publicou uma série de artigos, entre 1901 e 1903, sobre a síntese de “polipeptídeos” – termo introduzido por ele para designar os compostos resultantes da combinação de aminoácidos – considerando que nas proteínas os aminoácidos estava ligados da mesma forma, como amidas.

Por sua vez, Hofmeister, que acabara de realizar estudos sobre a digestão de proteínas (descritos na seção anterior), abordou a questão da estrutura dessas substâncias por um outro ponto de vista. Em 1902, publicou um artigo no qual fez uma revisão do problema. Partindo da suposição de que as proteínas eram constituídas por aminoácidos interligados e dos dados experimentais disponíveis até então, discutiu teoricamente as diversas possibilidades de ligação dos aminoácidos. Descartou a ligação direta de átomos de carbono, argumentando que se assim fosse não seria possível decompor as proteínas em unidades definidas, através de hidrólise. Considerou também improvável que fosse uma ligação do tipo éter ou éster, com um oxigênio entre dois carbonos, pois senão os aminoácidos que possuíam um grupo hidroxila deveriam ser mais freqüentes como produtos de hidrólise de proteínas do que vinha sendo constatado experimentalmente e, por outro lado, desse modo os aminogrupos das proteínas estariam livres conferindo-lhes características alcalinas. Supôs, então, que a ligação entre aminoácidos se dava através de um átomo de carbono e um de nitrogênio e considerou três possibilidades dessa ligação:

a) $\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-}$; b) $\text{CH}_2\text{-NH-CO-}$; c) $\text{-CH}_2\text{-NH-C(NH)-}$

Destas, descartou a primeira por ser estável e deixar livre os grupos carboxila dos aminoácidos, o que tornaria as proteínas ácidas. E descartou a terceira forma por ser estável à hidrólise ácida. Sobre a segunda, enu-

merou diversas evidências favoráveis: o fato das proteínas conterem pouco nitrogênio amino e de seus produtos de hidrólise conterem muito; de que a reação de biureto era dada por muitas substâncias que continham esse tipo de ligação, assim como as proteínas e seus produtos de hidrólise parcial como as peptonas; de que vários produtos sintéticos de aminoácidos continham esse grupo e muitos deles davam a reação de biureto e de que esse tipo de ligação era encontrado na natureza, em diversos compostos. Assim, concluiu que era dessa forma que os aminoácidos estavam ligados nas proteínas (VICKERY e OSBORNE 1928, p. 415-7; GLAS 1979, p. 132).

Nos anos seguintes, novas evidências experimentais deram suporte à hipótese de polipeptídeos, muitas vindas de trabalhos subsequêntes em síntese de polipeptídeos de Fischer e seus colaboradores. Em 1907 haviam conseguido produzir uma cadeia constituída por dezoito unidades de aminoácidos. No caso, três leucinas e quinze glicinas, ligados através de ligações peptídicas. Havia também verificado que diversos polipeptídeos sintéticos eram hidrolisados por enzimas do trato digestivo, como tripsina e pancreatina, que eram precipitados pelos mesmos reagentes que precipitavam proteínas e seus produtos de hidrólise parcial e que davam reação de biureto (FRUTON 1972, p. 117; ROSENFELD 1982, p. 43). Desse modo, a hipótese de polipeptídeos passou a ser a base de novas pesquisas sobre as proteínas, que possibilitaram o desenvolvimento do conhecimento sobre essas substâncias. Além disso, deu base para os estudos subsequêntes sobre as propriedades nutricionais das proteínas, como será visto na próxima seção.

É importante observar que a elucidação da constituição química das proteínas só foi possível mediante o desenvolvimento teórico da química orgânica na segunda metade do século XIX, o que Fruton (1972, p. 101-7) relata de forma clara. Conceitos como os de estrutura química baseada no arranjo espacial de átomos, de valência e de estereoisomerismo, característicos dessa segunda metade do século XIX, foram fundamentais para o desenvolvimento da química de proteínas.

9.3 NOVAS IDÉIAS SOBRE O METABOLISMO E O VALOR NUTRICIONAL DAS PROTEÍNAS

Paralelamente aos estudos sobre a ação das enzimas digestivas sobre

proteínas, foram desenvolvidas algumas pesquisas experimentais com o objetivo de testar a adequação nutricional dos produtos da clivagem enzimática desses nutrientes, como foi visto anteriormente. Considerava-se que, se essa adequação fosse demonstrada, estaria confirmado que as proteínas eram clivadas na digestão e absorvidas na forma desses produtos. No entanto, nessas pesquisas eram fornecidos aos animais misturas complexas desses produtos, que, inclusive, podiam ainda conter proteínas. Assim, os resultados obtidos eram bastante questionáveis; não se podia afirmar que as proteínas eram nutricionalmente substituíveis por seus produtos de hidrólise enzimática. Conseqüentemente nada acrescentavam à questão do destino metabólico das proteínas.

Já no final do século XIX, L. Blum (que trabalhava no laboratório de Hofmeister) resolveu testar, separadamente, a adequação nutricional de alguns dos produtos resultantes da digestão "in vitro" de proteínas. Estabeleceu como critério a capacidade de manter o equilíbrio de nitrogênio de animais (no caso, cães). Verificou que alguns produtos eram adequados nesse sentido como o "protoalbuminóide" obtido através da hidrólise de caseína por pepsina, que era tão eficiente quanto a própria caseína. Já o "heteroalbuminóide" obtido a partir de fibrina do sangue não mantinha os animais em equilíbrio de nitrogênio, ao contrário da fibrina. Partindo desses resultados, Blum procurou levantar as possíveis causas dessas diferenças no valor nutricional com base em trabalhos recentes em química de proteínas, de Friedrich N. Schulz (1871 -1956) e de Walther Hausmann (1877 - 1938)(publicados em 1898 e 1899, respectivamente). Schulz havia descrito um método para distinguir duas formas de enxofre presente em proteínas e Husmann havia desenvolvido um método para quantificar as três formas nas quais o nitrogênio está presente nas proteínas (amida, diaminoácidos. monoaminoácidos). Blum supôs que as diferenças na composição química dos produtos testados poderiam determinar as diferenças nutricionais. Procurou, então, comparar quimicamente a caseína, que era considerada adequada nutricionalmente, à gelatina, que se sabia ter baixo valor nutricional. Desse modo, observou que a caseína apresentava alta porção de nitrogênio na forma amida, ao contrário da gelatina. Além disso, o conteúdo de nitrogênio diamino era maior na caseína que na gelatina, enquanto que o conteúdo de nitrogênio monoamino de ambas era semelhante. Blum baseou-se também nos resultados de Ernest Peter Pick (1872 -1960)

(publicados em 1899), que mostravam que o protoalbuminóide era rico em tirosina e grupos indólicos, ao contrário do heteroalbuminóide. Sabendo que a gelatina também não continha tirosina e grupos indólicos, concluiu que ambos deviam ser especialmente importantes para o organismo animal e que sua presença era indispensável para a formação de proteínas (GREENSTEIN & WINITZ 1961, p. 253-4)¹³.

Apesar dos diversos estudos realizados com o objetivo de saber se os produtos da digestão de proteínas podiam substituí-las na nutrição animal, até o início do século XIX ainda não havia resposta para essa questão. Mas, em 1902, Otto Loewi (1873 - 1961), publicou um trabalho com resultados esclarecedores, obtidos através de experimentos de dieta controlada cuidadosamente realizados. Para testar se animais necessitavam de proteínas intactas na dieta ou se eram capazes de sintetizá-las, Loewi procurou manter cães em dieta cuja única fonte de nitrogênio eram produtos da digestão pancreática completa de caseína (HOLMES 1979, p. 181; segundo GREENSTEIN & WINITZ 1961, p. 254, Loewi utilizou os produtos da autólise de tecido pancreático). Considerou que se os animais permanecessem em equilíbrio de nitrogênio estaria demonstrado que estavam utilizando a proteína digerida fornecida na dieta para sintetizar proteína corpórea. Do contrário, mesmo num curto período de tempo, deveriam perder nitrogênio e chegariam a um balanço negativo desse elemento. Procurando garantir que não houvesse proteínas nem peptonas presentes entre os produtos de digestão que fariam parte da dieta dos animais, Loewi estabeleceu como critério a reação de biureto negativa e realizou os testes. Loewi se preocupou também em fazer com que a dieta fosse bem aceita pelos animais e para isso testou diversas combinações de nutrientes não-nitrogenados com a proteína digerida, com diversos cães. Desse modo, verificou que os animais se mantiveram em equilíbrio de nitrogênio e observou, inclusive, que um dos cães – que havia sido mantido em jejum antes do experimento – havia retido nitrogênio, atingindo um balanço positivo (GREENSTEIN & WINITZ 1961, p. 254-5; HOLMES 1979, p. 181-2).

Loewi concluiu, então, que “o total de produtos finais com reação negativa de biureto substituem a proteína nutritiva, ou seja, podem tomar o

¹³Como será visto a seguir, no final da década de 1860 L. Hermann já havia suspeitado que o baixo valor nutricional da gelatina podia estar relacionado à ausência de tirosina. (McCOLLUM 1957, p. 81; McCAY 1973, p. 93).

lugar de todas as porções de proteína corpórea destruída durante o metabolismo". E que, para isso "... o animal pode também sintetizar proteína e não tem que depender da proteína nutriente ..." (LOEWI 1902, citado em GREENSTEIN & WINITZ 1961, p. 255). Segundo Holmes (1979, p. 182), esse trabalho de Loewi e o de Conheim publicado no ano anterior, cujos resultados reforçavam-se mutuamente, estimularam a realização de novos experimentos com dieta controlada, em número crescente ano a ano. No mesmo sentido, os trabalhos de Fischer sobre a composição química das proteínas e a síntese de polipeptídeos, publicados na mesma época, deram base química à visão de que as proteínas podiam ser decompostas em aminoácidos e ressintetizadas a partir dessas unidades, além de possibilitarem um maior conhecimento sobre os produtos da hidrólise de proteínas. Desse modo, a partir do início do século XX as pesquisas sobre nutrição protéica passaram a focalizar os aminoácidos. Diversos pesquisadores procuraram confirmar que as unidades estruturais das proteínas podiam substituí-las nutricionalmente.

No ano seguinte, 1903, Y. Henderson e A.L. Dean, ambos fisiologistas norte-americanos, relataram sua tentativa de verificar se era possível manter um cão em equilíbrio de nitrogênio alimentando-o com proteína submetida à hidrólise ácida. Assim, forneceram uma dieta de carne hidrolisada por ácido sulfúrico (sob aquecimento, durante dez dias), amido e sebo, e observaram que o cão ficou em balanço negativo de nitrogênio. Logo depois, em 1904, V. Henriques e C. Hansen também relataram experimentos com ratos nos quais não obtiveram equilíbrio de nitrogênio quando substituíram caseína por hidrolisado ácido dessa proteína. Mas verificaram que ao introduzir caseína hidrolisada por enzimas pancreáticas, obtinha-se balanço positivo em pelo menos metade dos casos. E que, usando o extrato alcóolico desse hidrolisado, os ratos mantinham-se em equilíbrio de nitrogênio (McCAY 1973, p. 110 e 113). Novos experimentos realizados por Henriques e Hansen, publicados em 1905, mostraram que ratos jovens cresciam e permaneciam saudáveis em dieta cuja única fonte de nitrogênio era tecido pancreático ou membrana mucosa intestinal de cão submetidos à autólise. Considerando que esses autolisados eram compostos principalmente de aminoácidos e compostos simples de aminoácidos, concluíram que os ratos haviam sintetizado proteína para seu crescimento (McCOLLUM 1957, p. 210).

Em 1904, Emil Abderhalden (1877 - 1950) – que havia sido aluno de Fischer – iniciou uma série de experimentos de dieta controlada, utilizando produtos da hidrólise de proteínas de composição conhecida. Primeiro, Abderhalden procurou reproduzir a seqüência da digestão de proteínas do organismo animal usando pepsina, tripsina e erepsina, visando chegar a uma mistura contendo só aminoácidos, que seria fornecida a cães em substituição à proteínas. A dieta consistiu de carne completamente hidrolisada, mais sebo, glucose, amido e cinzas de osso. Em 1907, relatou os resultados desses experimentos: cães adultos, saudáveis, mantiveram-se em equilíbrio de nitrogênio e cães adultos e jovens, previamente mantidos em jejum, ganharam peso (GREENSTEIN e WINITZ 1961, p. 255-6). McCay (1973, p. 113) relata que Abderhalden, juntamente com P. Rona, também procurou verificar o que ocorria quando ratos eram mantidos em dieta de caseína intacta e hidrolisada através de procedimentos diferentes. Desse modo, também observou que os ratos alimentados com caseína e com hidrolisados enzimáticos dessa proteína mantinham-se em balanço positivo de nitrogênio, ao contrário dos ratos alimentados com caseína hidrolisada por ácido. Repetiram o experimento com cães e obtiveram resultados semelhantes. Também segundo McCay, Abderhalden chegou a supor, procurando explicar esses resultados, que as proteínas eram quebradas excessivamente na hidrólise por ácidos. A resposta para essa questão viria do trabalho de F.G. Hopkins, que em 1906 mostraria que o triptofano, um aminoácido que é destruído na hidrólise ácida, era nutricionalmente indispensável (FRUTON 1972, p. 432).

A idéia de que determinados aminoácidos são essenciais nutricionalmente foi surgindo através dos trabalhos de diversos pesquisadores. Segundo McCollum (1957, p. 81) e McCay (1973, p. 93), no final da década de 1860 Ludimar Hermann (1838 - 1914) já havia suposto que a ausência de tirosina estava relacionada ao baixo valor nutricional da gelatina. Hermann sugeriu a T. Escher, seu aluno, que testasse essa suposição através de experimentos de dieta no qual fornecesse gelatina suplementada com tirosina. Assim, entre 1869 e 1874, Escher realizou estudos com esse objetivo e verificou que cães alimentados com uma mistura de gelatina, amido, açúcar, sebo e manteiga perdiam peso e que quando adicionava pequenas quantidades de tirosina os cães passavam a manter seu peso. Mas McCay relata que Escher adicionava caldo de carne à mistura para tornar o sabor agradável

aos animais – o que certamente interferiu nos resultados dos experimentos. Esses resultados não foram confirmados por outros pesquisadores da época e o trabalho de Escher só seria retomado no início do século XX. Em 1900, como já foi citado, Blum realizou experimentos a partir dos quais concluiu que tirosina e compostos indólicos eram indispensáveis para a formação de proteínas pelo organismo animal. Mas as primeiras evidências diretas de que a inadequação nutricional de uma proteína podia ser corrigida através da adição de aminoácidos viriam das pesquisas de M. Kauffmann, publicadas em 1905.

Antes disso, em 1898, Karl A. H. Mörner (1854 - 1917) havia isolado cistina a partir de hidrolisado de proteínas. Sabia-se que esse aminoácido continha enxofre e que a gelatina só continha traços desse elemento, o que evidenciava a deficiência em cistina da gelatina. Em 1901, Frederick Gowland Hopkins (1861 - 1947) e Sidney William Cole (1877 - 1951) isolaram e purificaram o triptofano a partir dos produtos da hidrólise de caseína por tripsina e verificaram que a gelatina não continha esse aminoácido. Partindo desses fatos e tendo conhecimento dos trabalhos de Escher e de que seus resultados não haviam sido confirmados, N. Kauffmann se dedicou a realizar novos experimentos de dieta com gelatina. Quando manteve cães em dieta na qual gelatina havia sido suplementada com tirosina, triptofano e cistina, verificou que os cães chegaram a um balanço positivo de nitrogênio, que se manteve por um curto período. Kauffmann voltou a testar a dieta em si mesmo, mas não obteve um balanço positivo de nitrogênio durante o período de experimento. Seus resultados foram publicados em 1905 (McCOLLUM 1957, p. 81-2; McCAY 1973, p. 114-5). Greenstein e Winitz (1961, p. 259) relatam que, nesse trabalho, Kauffmann apresentou tabelas contendo a composição de aminoácidos de diversas proteínas e, com base nisso, procurou analisar suas propriedades nutricionais. Segundo esses autores, essa parece ter sido a primeira vez que o valor nutricional de proteínas foi avaliado a partir de seu conteúdo de aminoácidos.

No ano seguinte, 1906, E.G. Willcock e F.G. Hopkins publicaram seus estudos sobre a importância nutricional do triptofano. Sabiam que a zeína, uma proteína do milho, era deficiente nesse aminoácido, assim como em lisina. Através de um experimento no qual mantiveram ratos jovens em dieta composta de zeína (como única fonte de nitrogênio), amido, açúcar, manteiga, óleo de fígado de bacalhau e cinzas de aveia e de biscoito para

cães¹⁴, verificaram que os animais reduziram o seu crescimento e em 14 dias acabaram morrendo. Ao contrário, ratos submetidos a uma dieta similar, na qual caseína era a fonte de nitrogênio, mantiveram-se vivos. Procuraram então suplementar a dieta de zeína com triptofano e observaram que os ratos, apesar de ainda apresentarem crescimento abaixo do normal, sobreviveram por um período maior, de 28 dias. Assim, concluíram que o triptofano tinha um papel essencial na nutrição animal e supuseram que o fato de os ratos não haverem retomado o crescimento normal poderia ser atribuído a outras deficiências da zeína, como a falta de lisina ou de algum outro aminoácido (McCOLLUM 1957, p. 208-9; GREENSTEIN & WINITZ 1961, p. 260; McCAY 1973, p. 115).

Logo surgiram novas evidências confirmando os resultados de Willcock e Hopkins. Nesse sentido, foram importantes as pesquisas de Abderhalden que introduziam um novo tipo de procedimento experimental: para verificar a importância nutricional de determinado aminoácido, procurava removê-lo de uma proteína nutricionalmente adequada para depois testar, com experimentos de dieta controlada, a adequação dessa proteína sem o aminoácido e após suplementação com o mesmo. Desse modo, Abderhalden alimentou cães com um hidrolisado de caseína do qual havia retirado o triptofano e observou que perdiam peso e ficavam em balanço negativo de nitrogênio. Em seguida, verificou que, após suplementação com triptofano, os animais passaram a reter nitrogênio e recuperaram peso, confirmando que o triptofano era um aminoácido cuja presença na dieta era indispensável (GREENSTEIN & WINITZ 1961, p. 260). Do mesmo modo, concluiu que a prolina não era um aminoácido essencial. Seus resultados foram publicados em 1907 e novas pesquisas experimentais seguiram-se, por diversos pesquisadores, estabelecendo a essencialidade, ou não, de outros aminoácidos.

Assim, no início do século XX, questões fundamentais sobre o papel das proteínas na nutrição animal foram sendo esclarecidas, principalmente através de experimentos de dieta controlada. Ao mesmo tempo, problemas surgidos na realização desses experimentos levantaram outras questões, que,

¹⁴ Antes, haviam testado a adequação nutricional da mistura de aveia e biscoito para cães e constatado que o crescimento de ratos era mantido. Assim, consideraram que as cinzas dessa mistura devia suprir adequadamente os minerais necessários aos ratos (McCOLLUM 1957, p. 208).

por sua vez, originaram novas pesquisas e contribuíram diretamente para a descoberta das vitaminas – o que será abordado na próxima seção. Por outro lado, paralelamente, restavam dúvidas sobre o destino metabólico das proteínas e dos produtos de sua digestão. Na falta de evidências conclusivas, continuaram as discussões sobre se as proteínas eram absorvidas como aminoácidos ou se eram ressintetizadas antes de serem absorvidas. Alguns pesquisadores ainda procuravam demonstrar que esses nutrientes eram absorvidos na forma de albumoses ou peptonas. Assim, diversas pesquisas foram realizadas com o objetivo de resolver essa questão, em geral procurando detectar a presença de alguns desses produtos no sangue. Escrevendo sobre o estado da química fisiológica no “Annual Reports on the Progress of Chemistry” entre 1905 e 1913, W.D. Halliburton comenta brevemente algumas dessas pesquisas, que caracterizam a controvérsia. Em 1904, Max Bergmann (1886 -1944) e Leo Langstein (1876 - 1933) afirmaram ter encontrado albumose no sangue de animais durante a digestão, enquanto Abderhalden e Carl Oppenheimer (1874 - 1941) obtiveram resultados opostos (HALLIBURTON 1905). No ano seguinte, segundo Halliburton (1905), levando-se em conta os resultados de Loewi e o fato de não ter sido possível detectar aminoácidos no sangue, considerou-se “provisoriamente” (de modo geral) que as proteínas eram ressintetizadas no epitélio absorptivo do intestino. Mas alguns experimentos realizados no sentido de testar essa hipótese não a confirmaram. Já em 1906, John Beresford Leather (1864 - 1956) e Edward Provan Cathcart (1877 - 1954) observaram um pequeno aumento na quantidade de nitrogênio não protéico no sangue durante o processo de absorção e nenhum aumento na quantidade de proteínas coaguláveis, o que foi considerado evidência de que aminoácidos eram absorvidos como tal. O fato de o aumento de nitrogênio não protéico ter sido pequeno foi atribuído à remoção dos aminoácidos do sangue para as células dos tecidos – onde dariam origem às proteínas, assim assimiladas – ou para o fígado, onde seriam convertidos a uréia, eliminada na urina (HALLIBURTON 1907). Em 1907, Abderhalden, Pryn e London procuraram seguir o trajeto de leucina e de glicina-alanina, fornecidas oralmente, no organismo animal e verificaram que permaneciam no estômago algum tempo, começavam a ser absorvidos quando chegavam ao duodeno e já não podiam ser detectadas nas partes inferiores do intestino. No mesmo ano, Abderhalden e Rona concluíram que o epitélio intestinal era o principal local da síntese de proteínas, já que não

era possível detectar aminoácidos no sangue durante a absorção, embora não descartassem a possibilidade dessa síntese ocorrer também nas células dos tecidos (HALLIBURTON 1908).

Foi necessário o desenvolvimento de novos métodos químicos analíticos de detecção de aminoácidos para que se pudesse chegar aos resultados que resolveram a questão – o que só aconteceu em 1912. Otto Folin (1867-1934) e W. Denis aperfeiçoaram métodos para determinação quantitativa de uréia, amônia e nitrogênio total em matéria animal e aplicaram esses métodos na análise de amostras de sangue portal e sistêmico, de tecido do fígado e muscular (retiradas simultaneamente) de animais em jejum e em diversos estágios do processo de absorção após ingerirem alimentos com alto teor de proteínas. Consideraram que os aminoácidos estariam representados pela fração de nitrogênio que não fosse uréia, nem amônia nem proteína. Verificaram que essa fração, que era pequena no sangue e tecidos de animais em jejum, aumentava logo que a absorção começava e diminuía novamente quando terminava o processo de absorção (McCOLLUM 1957, p. 72). Isso possibilitava concluir que os aminoácidos resultantes da digestão de proteínas eram absorvidos, chegando à corrente sanguínea. Também em 1912, Donald Van Slyke (1883-1971), que ano anterior havia descrito, juntamente com Cullen, um método analítico que permitia determinar diretamente o nitrogênio de aminoácidos (nitrogênio α -amínico) em hidrolisados de proteínas e em extratos de tecidos animais, publicou resultados que confirmavam os de Folin e Denis. Através de seu método Van Slyke mostrou que a quantidade de nitrogênio α -amínico presente no sangue de animais após a digestão de carne era maior que o dobro da presente no sangue de animais em jejum (HALLIBURTON 1913, p. 231; McCOLLUM 1957, p. 72).

CAPÍTULO 10

A DESCOBERTA DAS VITAMINAS

A idéia de que determinados compostos orgânicos presentes em alimentos em quantidades mínimas eram essenciais nutricionalmente – ou seja, a idéia da existência das “vitaminas” – surgiu a partir dos resultados de estudos e pesquisas em duas áreas de pesquisa, a princípio distintas: a de necessidades nutricionais e a de patologia de doenças como escorbuto e beribéri, depois classificadas como doenças de deficiência nutricional. Este capítulo procura traçar o desenvolvimento histórico do conceito de vitaminas, que precedeu o isolamento e caracterização química das diversas vitaminas. A seção 10.1 relata as pesquisas sobre requerimentos nutricionais, baseadas em experimentos de dieta purificada, que evidenciaram a existência de substâncias essenciais desconhecidas. A seção 10.2 aborda os estudos sobre o escorbuto e o beribéri, cujos resultados levaram à idéia de doenças de deficiência nutricional, relacionada à essencialidade das vitaminas. Por fim, a seção 10.3 trata da formulação do conceito de vitaminas propriamente dito e discute as diversas interpretações da descoberta das vitaminas, por diferentes autores.

10.1 ESTUDO SOBRE NECESSIDADES NUTRICIONAIS

Durante a segunda metade do século XIX os experimentos de dieta controlada com animais difundiram-se de forma crescente e ganharam importância como método de pesquisa em estudos sobre nutrição, especialmente na determinação de requerimentos nutricionais e na avaliação nutricional de determinados nutrientes. À medida que se acumulou conhecimento sobre as necessidades nutricionais e sobre a diversidade química dos alimentos – ou seja, a multiplicidade de substâncias presentes num mesmo alimento – os pesquisadores procuraram aprimorar esses procedimentos experimentais. Já nas últimas décadas do século XIX, estava estabelecido que o homem, assim como outros animais, necessitava de proteínas, gorduras, carboidratos e determinados minerais para sobreviver e se manter saudável. Como já estavam disponíveis os métodos químicos que possibilitavam a separação de diversos nutrientes presentes num alimento e sua

purificação (na medida do possível), desenvolveu-se a idéia de se utilizar, nesses experimentos, dietas simplificadas, compostas de nutrientes purificados, combinados de acordo com o objetivo do experimento e com base no conhecimento estabelecido sobre necessidades nutricionais. Desse modo tornava-se possível controlar mais completamente o que se fornecia aos animais, o que determinaria resultados mais precisos nos experimentos de dieta controlada.

Assim, para testar a importância nutricional dos elementos minerais fornecidos pelos alimentos, Joseph Forster, fisiologista alemão, procurou manter cães em dieta na qual minerais estivessem praticamente ausentes. Alimentou-os com tecido muscular – do qual havia extraído as substâncias solúveis em água – mais açúcar, amido e gordura. Observou que os animais passaram a apresentar distúrbios nas funções dos órgãos e, principalmente, nos sistema muscular e nervoso e que morriam num período mais curto do que animais mantidos em jejum completo. Concluiu, então, que certos elementos minerais eram nutricionalmente essenciais (McCOLLUM 1957, p. 327-8; IHDE & BECKER 1971, p. 10-1). Seu trabalho foi publicado em 1873.

Procurando explicar porque os cães mantidos em dieta sem minerais morriam antes que cães mantidos em jejum, Gustav von Bunge, outro fisiologista alemão, supôs que no metabolismo protéico ocorria formação de ácido sulfúrico (a partir do enxofre presente nas proteínas), o qual era neutralizado pelos elementos básicos fornecidos pelos alimentos. No caso, a falta desses elementos impediria essa neutralização e o ácido sulfúrico formado acumular-se-ia e causaria o envenenamento dos animais. Para testar sua hipótese, von Bunge sugeriu a Nicholas Lunin (1853-1937), seu aluno, a realização de um experimento de dieta simplificada, isenta de minerais, à qual seriam adicionadas bases para neutralização do ácido sulfúrico. Lunin realizou uma série de experimentos. Primeiro, alimentou ratos com caseína, açúcar e água e verificou que morriam entre 11 e 21 dias. Depois, forneceu a mesma dieta mais bicarbonato de sódio em quantidade suficiente para neutralizar o ácido formado a partir do enxofre presente na caseína, e os ratos sobreviveram por 12 a 30 dias. Testou com carbonato de potássio, mas a sobrevivência não aumentou. Procurou, então, manter os ratos em dieta de caseína, gordura de leite, lactose e uma mistura de sais similar às cinzas do leite, mas também não obteve resultados melhores com essa re-

produção artificial de leite. Por outro lado, ratos alimentados só com leite sobreviveram saudáveis durante dois meses (McCOLLUM 1957, p. 204, 328-9; IHDE & BECHER 1971, p. 11). Lunin concluiu, a partir desses resultados, que “outras substâncias indispensáveis para a nutrição devem estar presentes no leite além de caseína, gordura, lactose e sais” (LUNIN 1880, citado em McCOLLUM 1957, p. 204). Mas não procurou investigar essa suposição, a qual acabou também não obtendo a atenção de outros pesquisadores, na época.

Paralelamente, com base no fato de que a morte dos animais, em geral, era precedida de perda de apetite, Voit atribuiu o fracasso de experimentos de dieta composta por nutrientes purificados ao fato de os animais as considerarem inapetentes: “homem e animais raramente toleram misturas tão insípidas” (VOIT 1881, citado em McCOLLUM 1957, p. 204; BECHTEL 1984, p. 272).

Mais tarde, já em 1891, Carl A. Socin – outro aluno de Bunge, que continuava estudando a importância das substâncias inorgânicas – relatou os resultados de experimentos de dieta simplificada realizados com o objetivo de verificar a importância de diferentes compostos de ferro. Para isso, elaborou uma dieta composta de soro de sangue, gordura, celulose, açúcar, amido e cinzas do leite, a qual suplementava com ferro na forma de cloreto férrico, hemoglobina, hematina ou hematogênio (o qual era preparado através da digestão de gema de ovo desengordurada com suco gástrico artificial). Alimentou ratos com essa dieta e manteve um grupo-controle em dieta de gema, amido e celulose. Os ratos mantidos na dieta simplificada sobreviveram no máximo 32 dias, independentemente da fonte de ferro, enquanto que os do grupo controle mantiveram-se saudáveis durante todo o período de experimento, 99 dias.

Com base nesses resultados, Socin concluiu que a gema de ovo devia conter alguma substância desconhecida que era essencial. Outros pesquisadores confirmaram os resultados de Socin, verificando que a causa da morte dos animais não era a falta de um suprimento adequado de ferro. Mas sua conclusão sobre a presença de um nutriente essencial desconhecido na gema não recebeu atenção nos anos seguintes (McCOLLUM 1957, p. 205; IHDE & BECKER 1971, p. 11-2).

Até o final desse século e no início do século XX, diversos outros experimentos com dietas de nutrientes purificados foram realizados, quase

sempre resultando na morte dos animais. Em alguns desses experimentos, entretanto, foi possível manter os animais vivos e saudáveis. Isso pode ser explicado pelo fato de os pesquisadores incluírem, entre as substâncias consideradas purificadas, algumas que certamente traziam consigo “impurezas” que garantiam a sobrevivência dos animais. Assim, por exemplo, manteiga ou óleo de fígado de bacalhau fizeram parte de dietas de nutrientes purificados. Além disso, nem sempre os procedimentos de isolamento e purificação asseguravam a ausência de outras substâncias. Em outros casos, como nos experimentos de Henriques e Hansen (citados na seção anterior) só foi possível manter o crescimento e saúde de ratos em dieta purificada quando se forneceu autolisados de tecido pancreático ou de mucosa intestinal de cão, nos quais certamente podiam estar presentes vitaminas, sem que se tivesse consciência disso.

Em 1905, C. A. Pekelharing (1848-1922), um pesquisador holandês, publicou os resultados de seus experimentos com dietas de nutrientes purificados através dos quais chegou a importantes conclusões. Pekelharing alimentou ratos com uma massa assada de caseína, albumina de ovo, farinha de arroz, sebo e sais, mais água e observou que em poucos dias emagreceram, perderam a aparência saudável e o apetite, e que sobreviveram, no máximo, por quatro semanas. Em seguida verificou que se fornecesse além dessa massa uma pequena quantidade de leite os animais mantinham-se saudáveis. Observou que a quantidade de proteína, gordura e carboidratos fornecida pela quantidade de leite introduzida na dieta era insignificante quando comparada ao que a massa provinha. Procurou, então, remover a caseína e a gordura do leite e adicionou o soro resultante à dieta dos ratos, em quantidade muito pequena. Novamente, os animais permaneceram saudáveis durante o experimento, o que o levou a concluir que havia alguma “substância desconhecida no leite, que mesmo em quantidades muito pequenas era de suprema importância para a nutrição”. Pois, na ausência dessa substância “(...) o organismo perde seu poder de assimilar devidamente as principais partes do alimento, bem conhecidas, perde o apetite e, em aparente abundância os animais morrem de necessidade” (PEKELHARING 1905, citado em McCOLLUM 1957, p. 207; BECHTEL 1984, p. 272; IHDE & BECKER 1971, p. 2). Mas, segundo McCollum e Bechtel, op. cit., as conclusões de Pekelharing permaneceram, aparentemente, desconhecidas por outros pesquisadores dedicados a estudos em nutrição, pois

seu artigo foi publicado em holandês e teve pouca divulgação, sendo citado em inglês pela primeira vez em 1926.

Logo depois, num artigo publicado em 1906 – mesmo ano em que publicou seu trabalho sobre a essencialidade do triptofano – F.G.Hopkins se refere à necessidade nutricional de substâncias desconhecidas como explicação para a morte dos animais mantidos em dietas compostas de proteína, carboidrato, gordura e sais minerais: “o organismo animal é ajustado para viver com tecidos vegetais ou de outros animais, e esses contêm inúmeras substâncias além de proteínas, carboidratos e gorduras (...). O campo está quase inexplorado; só é certo que existem muitos fatores menores em todas as dietas, dos quais o organismo faz uso” (HOPKINS 1906, citado em IHDE & BECKER 1971, p. 2, e em McCOLLUM 1957, p. 209). Além disso, Hopkins associou esses fatores nutricionais à doenças como raquitismo e escorbuto, as quais, como será visto na próxima seção, já vinham há muito tempo relacionadas à dieta.

Mas, essa explicação para o fracasso dos experimentos de dieta de nutrientes purificados não foi aceita por outros pesquisadores da época, que propunham outras explicações. Por volta de 1909, ao realizar experimentos desse tipo com ratos, Elmer V. McCollum (1879-1967) chegou aos mesmos resultados de seus antecessores, ou seja, verificou que os animais morriam apesar da dieta fornecida estar, aparentemente, balanceada. McCollum considerou que a falta de sabor dessas dietas provocava inapetência dos animais e era responsável pelo fracasso dos experimentos, retomando a proposição de Voit de muitos anos antes. Um trabalho de I.P. Pavlov, publicado em 1897, reforçava essa idéia, ao mostrar a influência do apetite sobre a função secretória das glândulas digestivas e a importância do “flavor” na seleção dos alimentos pelos animais (McCOLLUM 1957, p. 213; IHDE & BECKER 1971, p. 28-9). Assim, McCollum procurou melhorar o sabor das dietas sintéticas, testando novas combinações de nutrientes ou introduzindo gordura de bacon, flavorizantes, etc., para que se tornassem mais atrativas. Entretanto, continuou não conseguindo elaborar uma dieta de nutrientes purificados que mantivesse a saúde dos animais.

Paralelamente, em 1909, Thomas Burr Osborne (1859-1929) e Lafayette B. Mendel (1872-1939) iniciaram uma série de pesquisas sobre o valor nutricional de diferentes proteínas, procurando determinar se uma proteína podia ser substituída por outra e verificar a essencialidade de determinados

aminoácidos. Para isso, passaram a realizar experimentos com dietas compostas de substâncias purificadas. Logo se depararam com a dificuldade de elaborar uma dieta desse tipo que fosse nutricionalmente adequada aos animais, pois os primeiros experimentos fracassaram. Por outro lado, observaram que os ratos que tiveram acesso às próprias fezes e as comeram estavam em melhores condições nutricionais que os que foram impedidos disso. Em seguida, verificaram que se os ratos mantidos em dieta purificada comessem as fezes de ratos alimentados com alimentos naturais, mantinham-se em condições ainda melhores do que se comessem suas próprias fezes. Essa observação foi útil para evitar essa fonte de erro muito comum anteriormente.

Osborne e Mendel consideraram, a princípio, que nos alimentos havia um equilíbrio quantitativo entre íons e elementos inorgânicos, nutricionalmente essenciais, que não se conseguia reproduzir nas dietas preparadas através da combinação de nutrientes isolados, atribuindo a isso o fracasso dos experimentos. Prepararam, então, um "leite sem proteínas" em pó¹, que continha basicamente lactose, a mistura de sais do leite, pigmentos e outras substâncias desconhecidas. Elaboraram uma dieta composta desse produto, uma proteína isolada, amido e sebo, com a qual alimentaram ratos jovens. Verificaram que com essa dieta o crescimento e a saúde dos animais eram mantidos, assim como a reprodução. O uso do leite desproteinado possibilitou a Mendel e Osborne a realização de sua pesquisa sobre o valor nutricional de diferentes proteínas através da qual chegaram a importantes resultados e conclusões. Verificaram que certas proteínas – como a caseína, a lactalbumina e a albumina de ovo – eram nutricionalmente completas, pois como única proteína da dieta eram capazes de manter o crescimento e a saúde dos animais. Por outro lado, proteínas como a zeína e a gliadina não garantiam a saúde dos animais. Mas, quando suplementadas com determinados aminoácidos, passavam a produzir o mesmo efeito que as proteínas completas. Desse modo confirmaram, decisivamente, trabalhos anteriores sobre a essencialidade de aminoácidos como o triptofano, a lisina e a histidina (McCOLLUM 1957, p. 214-5; GREENSTEIN & WINITZ

¹Para isso separavam a caseína após coagulação através de acidificação e, do soro resultante, separavam as lactalbuminas após coagulação por aquecimento. O soro resultante, praticamente livre de proteínas, passava por um processo de secagem (McCOLLUM 1957, p. 214).

1961, p.264-5; IHDE & BECKER 1971, p. 28-9).

No decorrer da série de experimentos que realizaram, Osborne e Mendel procuraram reproduzir artificialmente a mistura de lactose, íons e sais inorgânicos que constituíam o “leite desproteinado”, determinada por análise química. No final de 1912 Mendel chegou a relatar que haviam tido sucesso em substituir o “leite desproteinado” pela mistura artificial como suplemento para dietas de nutrientes isolados e purificados. Mas, após mais alguns meses de experimentos, tiveram que rever essa afirmação, pois os novos resultados a contradisseram (McCOLLUM 1957, p. 215).

10.2 ESTUDOS SOBRE DOENÇAS DE DEFICIÊNCIA NUTRICIONAL

Doenças como escorbuto, beribéri e raquitismo, reconhecidas no início deste século como doenças de deficiência nutricional, já haviam sido descritas há muitos séculos e há muito tempo sua cura e prevenção era associada à alimentação, com base na própria experiência humana. Algumas observações mais sistemáticas sobre a incidência, a cura e a prevenção de doenças tornaram mais clara sua relação com determinados alimentos. Já no final do século XIX e início do século XX, pesquisas sobre o escorbuto e o beribéri, em particular, contribuíram para o desenvolvimento da teoria das doenças de deficiência nutricional e do conceito de vitaminas, como será visto a seguir.

Desde o século XVI há relatos da ocorrência de escorbuto em longas viagens marítimas e durante batalhas e guerras. Segundo Sharman (1977), essa doença chegava a ser a principal causa de morte entre marinheiros, inclusive mais do que combates e naufrágios. Em meados do século XVIII, James Lind (1716-1794), um cirurgião naval escocês, procurou experimentar diversas formas de tratamento em marinheiros com escorbuto, sistematicamente, e verificou que o suco de frutas cítricas causava recuperação rápida. Lind relatou seus experimentos e a história dessa doença em seu “Tratado sobre o escorbuto”, publicado em 1753, no qual mostra o valor de frutas e vegetais frescos na cura e prevenção do escorbuto. Lind defendeu uma reforma na

dieta da Marinha Britânica que só foi implantada em 1795, incorporando o suco de limão como componente obrigatório. Isso resultou em grande

redução na incidência da doença, que por volta de 1800 estava praticamente controlada². Ainda no século XVIII, em 1785, outro trabalho importante sobre o escorbuto foi publicado, por Gilbert Blane, no qual considera “singular” a eficácia do suco de limão na prevenção e cura dessa doença, mais eficiente que qualquer outro remédio conhecido para qualquer outra doença (CODELL CARTER 1977, p. 121).

Mais tarde, em 1840, George Budd publicou um trabalho no qual resume o conhecimento adquirido sobre o escorbuto. Considerando as diversas frutas e outros vegetais então associados à cura da doença, referiu-se a um “elemento essencial aos vegetais antiescorbúticos” que deveria ser, posteriormente, descoberto. Depois, numa série de artigos publicados em 1842, Budd chega a classificar doenças como escorbuto, raquitismo e certas desordens oculares como doenças resultantes de deficiências nutricionais (CODELL CARTER 1977, p. 120-1; BECHTEL 1984, p. 271). Segundo Codell Carter (1977, p. 122), com base em diversos artigos da literatura médica da época, embora a substância que prevenia e curava o escorbuto não fosse conhecida, este era tratado como “uma doença inteiramente compreendida e completamente passível de prevenção”. Durante a segunda metade do século XIX o escorbuto foi se tornando uma doença rara, com a qual poucos médicos tinham experiência direta. Desse modo, também tornaram-se raros novos estudos a esse respeito.

O beribéri, por outro lado, havia sido registrado desde o século II entre os orientais (no ocidente as primeiras descrições datam do século XVII), mas sua incidência não era significativa antes do século XIX. À medida que os processos de polimento de cereais a vapor difundiram-se e o consumo de arroz polido substituiu o de arroz integral, verificou-se o crescimento do beribéri, muito rápido nas últimas décadas do século XIX. Nessa época tornou-se endêmica em prisões, navios, nas guerras e em determinadas regiões, expandiu-se para novas áreas, tornou-se epidêmica em outras (CODELL CARTER 1977, p. 124-5; IHDE & BECKER 1971, p. 6). Codell Carter relata que, no final dos anos 1870, essa doença ainda era considerada pela ciência como “um tópico exótico e pouco familiar” e que cerca de trinta anos depois, no editorial de uma das principais revistas em medicina

²Ihde e Becker (1971, p. 4-5) afirmam que muitos médicos ainda duvidavam da eficácia do suco de limão, por não ser uniforme na prevenção do escorbuto. Os autores citados atribuem isso a “problemas associados à preservação e adulteração” do suco de limão.

afirmava-se que provavelmente não havia doença cuja etiologia houvesse sido mais discutida do que o beribéri.

Entre 1850 e 1880, diversos "pesquisadores em medicina" atribuíram o beribéri à alimentação insuficiente. Alguns referiam-se à quantidade total de alimento consumida, outros à deficiências qualitativas – por exemplo, baixa proporção de proteína e gordura. Por volta de 1880 estava claro que essa doença estava associada à dieta, pois era significativa sempre em regiões onde o arroz era o alimento principal (CODELL CARTER 1977, p. 125).

As primeiras observações sistemáticas cujos resultados evidenciaram a relação entre beribéri e dieta foram realizadas na década de 1880 por Kamemhiro Takaki, na época oficial-médico do Hospital Naval de Tóquio. Depois de analisar as dietas oferecidas pela Marinha Japonesa, Takaki chegou à conclusão de que a proporção de carboidratos nessas dietas era muito alta. Considerando que uma proporção de nitrogênio e carbono de pelo menos 1:15 era necessária para a manutenção da saúde e tendo verificado que essa proporção nas dietas estudadas variava de 1:17 a 1:32, Takaki concluiu que essa deficiência de substâncias nitrogenadas em relação à ingestão de carboidratos era a causa do beribéri. Conseguiu com que se fizessem mudanças nas dietas fornecidas aos marinheiros: mais carne, mais vegetais e, em algumas refeições, cevada em substituição ao arroz. Como resultado, houve uma redução impressionante nos casos de beribéri, e em pouco tempo a doença estava erradicada da Marinha Japonesa. Em 1885 Takaki publicou esses resultados, que foram comentados nos principais periódicos em medicina da Europa. Mas sua visão sobre a causa do beribéri foi pouco aceita e logo descartada, pois haviam diversas evidências epidemiológicas, inclusive registradas antes de suas observações, que a contradiziam. Havia populações amplamente afetadas pela doença sem que houvesse deficiência de substâncias nitrogenadas na dieta ou mesmo de qualquer outro nutriente considerado importante. Havia, também, casos de beribéri entre pessoas que se alimentavam quase exclusivamente de proteína (CODELL CARTER 1977, p. 126-8; IHDE & BECKER 1971, p. 6-7).

Assim, a idéia de que alguma deficiência na dieta provocava o beribéri parecia incompatível com os fatos e, ainda na década de 1880 e nas duas décadas seguintes, outras explicações foram propostas e diversos pesquisadores se dedicaram a resolver essa questão.

Nessa época, final do século XIX, as pesquisas em microbiologia, em pleno crescimento, traziam resultados importantes sobre a causa de diversas doenças. Os trabalhos de Louis Pasteur (1822-1895) e de Robert Koch (1843-1910), a partir da década de 1860, demonstrando o papel dos microorganismos como agentes patogênicos, deram origem à teoria dos germes como causa das doenças, que foi tornando-se mais e mais importante à medida que eram identificados os microorganismos responsáveis por determinadas doenças e que eram desenvolvidos, e aplicados com sucesso, procedimentos para o combate desses agentes (IHDE & BECKER 1971, p. 13-6; BECHTEL 1984, p. 270). Com isso, estabeleceu-se entre os pesquisadores em patologia e medicina a tendência de atribuir todas as doenças em estudo a microorganismos, que então procuravam isolar e identificar. Doenças como o beribéri, escorbuto, raquitismo, entre outras, passaram a ser consideradas, ou reconsideradas, com base na teoria dos germes, que então dominava a pesquisa médica.

Em 1883, C. A. Pekelharing, que era professor de patologia, e C. Winkler, que era revisor em neurologia, foram enviados a Java pelo Governo holandês para investigar a causa do beribéri. Christiaan Eijkman (1858-1930), microbiologista que havia sido aluno de Koch, acompanhou-os como assistente. Concluíram que essa doença era um tipo de polineurite e chegaram a isolar do sangue de pacientes e do ar, bactérias que consideravam possíveis causadoras do beribéri. Ao retornarem à Europa, Pekelharing e Winkler estavam convencidos que a causa da doença era microbiológica, embora ainda não tivessem identificado o agente de forma definitiva.

Eijkman permaneceu em Java como diretor de um novo laboratório de patologia e bacteriologia ligado a um hospital militar, continuou estudando o beribéri e chegou a descobertas importantes. Observou que algumas galinhas que eram mantidas para uso em experimentos passaram a apresentar sintomas de uma polineurite similar ao beribéri: andar trêmulo e dificuldade em ficar no poleiro, fraqueza nas pernas e arqueamento anormal das juntas do joelho e tornozelo. À medida que a doença progredia, as galinhas passavam a ficar deitadas e a fraqueza dos músculos das asas ficava evidente quando tentavam se erguer. Logo já não conseguiam comer, os músculos respiratórios ficavam paralisados, os olhos cobertos por uma membrana. Eijkman examinou as galinhas mas não encontrou nenhum microorganismo que pudesse ser o causador da polineurite. Tentou transmitir

a doença a galinhas saudáveis mantendo-as em contato com as doentes, mas não conseguiu.

Repentinamente, segundo Ihde e Becker (1971, p. 3)³, as galinhas doentes foram se recuperando e ficaram curadas. Ao investigar o que poderia ter ocasionado essa recuperação, Eijkman notou que haviam ocorrido mudanças na alimentação das galinhas. Embora normalmente as aves fossem alimentadas com arroz cru não polido, durante alguns poucos meses (justamente aqueles nos quais ele observara o desenvolvimento da doença) haviam sido alimentadas com arroz polido cozido que sobrava do hospital. Com a interrupção desse fornecimento, o arroz não polido voltou a ser o alimento das galinhas. Supondo, portanto, que a doença estava associada ao consumo de arroz polido, Eijkman realizou alguns experimentos com galinhas e confirmou sua hipótese. Galinhas mantidas em dieta de arroz polido em 3 ou 4 semanas passavam a apresentar sintomas de polineurite, ao contrário das mantidas com arroz não polido, que permaneciam saudáveis. Verificou também que a ingestão de arroz não polido curava a doença. Procurando explicar esses resultados, Eijkman supôs que no endosperma do arroz devia estar uma toxina, ou algum material a partir do qual uma toxina era produzida por influência de um microorganismo, que causava a doença. Por sua vez, o efeito dessa toxina era anulado ou reduzido, ou sua formação era impedida, por alguma substância presente nas camadas externas desse cereal. Assim, possivelmente devido à sua formação de microbiologista, Eijkman chegou a uma hipótese derivada da teoria dos germes para explicar a causa do beribéri (CODELL CARTER 1977, p. 132).

Os resultados dos estudos de Eijkman, publicados em 1897, foram negligenciados por vários anos, pois seus argumentos resultavam de analogia e muitos os consideraram pouco convincentes. Muitos médicos, inclusive, alegavam que a polineurite das galinhas não tinha relação com o beribéri humano (CODELL CARTER 1977, p. 130; BECHTEL 1984, p. 270).

Para verificar se a incidência de beribéri em humanos também estava relacionada ao consumo de arroz polido, Eijkman havia orientado A. G. Vorderman, que na época era médico inspetor em Java, na realização de

³A partir daí, a descrição dos fatos segue o trabalho de Ihde e Becker (1971). Há outras versões desses fatos, como a apresentada por Codell Carter (1977, p. 128-9), que afirma que Eijkman foi examinar o tipo de alimentação que as galinhas recebiam antes que houvesse sinais de recuperação.

um estudo epidemiológico com base na população carcerária da ilha, pois, em geral, os prisioneiros eram alimentados com o tipo de arroz consumido pela população local: em 27 prisões servia-se arroz não polido e em outras 74 consumia-se arroz polido. Os resultados de Vorderman, relatados em 1897 e 1898, mostraram claramente a correlação entre a incidência de beribéri e o consumo de arroz polido como principal componente da dieta (IHDE & BECKER 1971, p. 8-9; CODELL CARTER 1977, p. 129-30). Outros estudos realizados nos anos seguintes considerando populações de diversas regiões confirmaram essa correlação. Mas essas evidências não foram consideradas suficientes por outros pesquisadores pois não estavam sujeitas a controle restrito.

Os experimentos de Eijkman foram continuados por seu sucessor na direção do laboratório de patologia, Gerrit Grijns (1865-1944), que confirmou seus resultados. Grijns procurou também testar a hipótese de Eijkman e verificou que também era possível provocar polineurite em galinhas mantendo-as em dieta de proteína concentrada, no caso, carne de cavalo cozida, o que contrariava a hipótese da toxina presente no endosperma do arroz. Em 1901 publicou um artigo relatando seus resultados e propôs que a causa do beribéri era a falta de alguma substância essencial que o pericarpo do arroz continha. Mas sua idéia, publicada numa revista acessível, não recebeu muita atenção nos anos seguintes (CODELL CARTER 1977, p. 132). A maioria dos pesquisadores continuou considerando o beribéri como uma doença transmissível e procurando o agente causador (BECHTEL 1984, p. 270). Ihde e Becker (1971, p. 16) afirmam que vários pesquisadores alegaram ter descoberto esse agente, alguns deles atribuindo o beribéri a protozoários, outros a bactérias, outros ainda a nematelmintos.

Paralelamente, nas últimas décadas do século XIX, alguns pesquisadores levantaram a questão de que o escorbuto podia ser causado por microorganismos, o que deu origem a novas pesquisas sobre essa doença. Codell Carter (1977, p. 122-123) cita um patologista russo, T. Stazevich, que por volta de 1886 afirmou que o escorbuto era uma "forma de envenenamento séptico". Cita também um trabalho de Wilhelm Koch, de 1889, no qual considera o escorbuto, a hemofilia e outras doenças como formas diversas de uma doença infecciosa do sangue. E afirma que até o final do século havia, na literatura médica, referências dispersas a explicações do escorbuto com base em toxinas e microorganismos, mas que essas explicações eram

“geralmente céticas e freqüentemente refutadas”.

Por outro lado, algumas pesquisas realizadas na primeira década do século XX contribuíram para que o beribéri e o escorbuto passassem a ser vistos definitivamente como doenças de deficiência nutricional. Partindo de sua idéia sobre a presença de uma substância no pericarpo do arroz que neutralizava o efeito da toxina presente no endosperma, Eijkman se dedicou a isolar essa “antitoxina”. Verificou que o extrato aquoso de resíduos do polimento de arroz curavam a polineurite em galinhas e que os alimentos eficazes em prevenir e curar essa doença perdiam essa capacidade quando aquecidos acima de 120°C. Em 1906, quando publicou esses resultados, Eijkman reconheceu que apesar do beribéri ser causado por uma dieta de alimentos amiláceos, não havia evidências que indicassem a presença de toxinas nesses alimentos (CODELL CARTER 1977, p. 132-3).

Paralelamente, Alex Holst (1861-1931) e Theodor Frölich (1871-1953), ao estudar o “beribéri de bordo” – doença com alguns sintomas semelhantes aos do beribéri e que recentemente fora constatada entre a tripulação dos navios noruegueses – resolveram adotar procedimentos similares aos utilizados por Eijkman e por Grijns em suas pesquisas sobre beribéri. Assim, procuraram induzir o “beribéri de bordo” em porquinhos da Índia, em experimentos de dieta controlada. Alimentaram os animais com alimentos cozidos ou secos e, ao contrário do que esperavam, estes contraíram uma doença similar ao escorbuto que podia ser curada através da ingestão de vegetais frescos (McCOLLUM 1957, p. 217). Holst e Frölich publicaram seus resultados em 1907 e, procurando explicá-los, disseram que evidências anteriores associavam o escorbuto à dieta e que escorbuto e beribéri freqüentemente apareciam juntos (CODELL CARTER 1977, p. 134). Continuando seus experimentos, observaram que uma mesma dieta podia provocar beribéri em galinhas, escorbuto em porquinhos da Índia e ambas em porcos, o que Holst relatou já em 1911 num encontro da Sociedade de Medicina Tropical e Higiene. Codell Carter (1977, p. 134) resalta que através dos trabalhos de Holst e Frölich, “beribéri, escorbuto e beribéri de bordo foram todas vistas como causalmente ligadas a dietas deficientes e, portanto, como teoricamente ligadas uma a outra”.

Ainda na década de 1900, William Fletcher, em 1907, e Henry Fraser e Thomas Stanton, em 1909, publicaram os resultados de estudos sobre beribéri, com pequenos grupos de pessoas, cuidadosamente controlados. Es-

ses resultados confirmaram a ligação entre o consumo de arroz polido como principal componente da dieta e a incidência dessa doença em humanos, já constatada anteriormente através de estudos epidemiológicos. Codell Carter (1977, p. 130) afirma que esses estudos controlados foram decisivos para “persuadir a opinião médica de que o beribéri estava ligado à dieta deficiente”. Pouco tempo depois, Fraser e Stanton extraíram dos resíduos de polimento de arroz a substância responsável pela cura do beribéri, mostrando que era solúvel em álcool (BECHTEL 1984, p. 171). No mesmo artigo, publicado em 1910, procuraram mostrar que a eficácia de um cereal em curar o beribéri estava associada a seu conteúdo de fósforo. Partindo desse resultado, Schaumann considerou que o beribéri, assim como outras doenças cuja etiologia era similar – cita o escorbuto, o raquitismo, a osteomalacia, a pelagra – deviam ser causadas por uma deficiência de fósforo. No ano seguinte, 1911, Casimir Funk conseguiu isolar numa forma mais pura, a partir dos resíduos do polimento de arroz, a substância que curava o beribéri e mostrou que, pelo menos essa doença, não era provocada pela falta de fósforo (CODELL CARTER 1977, p. 134).

Paralelamente, é importante notar, os pesquisadores que se dedicavam a isolar os microrganismos responsáveis por essas doenças, não conseguiram obter resultados que representassem algum avanço nesse sentido, o que também deixava mais espaço para os que as associavam a deficiências na dieta.

10.3 O CONCEITO DE VITAMINAS

Assim, por volta de 1910, tanto as pesquisas sobre necessidades nutricionais conduzidas através dos experimentos de dieta controlada, como as pesquisas sobre doenças como o escorbuto e o beribéri, realizadas através de estudos e experimentos com animais, além dos progressos no isolamento da substância capaz de curar tais doenças, convergiam no sentido de dar suporte à idéia de que determinadas substâncias orgânicas, presentes nos alimentos em quantidades mínimas, eram essenciais à manutenção da saúde e da vida. Pouco depois, independentemente, Casimir Funk (1884-1967) e Frederick

Gowland Hopkins (1861-1947) estabeleceram de forma clara o conceito de vitaminas, associado à idéia de doenças de deficiência nutricional, inte-

grando as evidências vindas dos dois campos de pesquisa (CODELL CARTER 1977, p. 135; BECHTEL 1984, p. 273).

Em 1906, como foi visto anteriormente, Hopkins havia atribuído o fracasso dos experimentos de dieta controlada à existência de substâncias desconhecidas nos alimentos que não eram incluídas nas dietas experimentais, elaboradas a partir de nutrientes purificados. No mesmo artigo também chegou a relacionar a falta dessas substâncias a doenças como raquitismo e escorbuto. Em seguida, Hopkins continuou seus experimentos de dieta controlada com animais e em 1912 publicou resultados que davam suporte à sua idéia inicial. Manteve grupos de ratos jovens alimentados com misturas de caseína, gordura, carboidratos e sais minerais e outros grupos de ratos com a mesma dieta mais uma pequena quantidade de leite fresco. Observou que os ratos sem leite logo tiveram seu crescimento interrompido, ao contrário dos que haviam recebido a pequena adição de leite. Depois de dezoito dias, transferiu esse suplemento para os ratos que não o haviam recebido e percebeu que estes retomaram o crescimento enquanto os outros pararam de crescer e chegaram a perder peso depois de algum tempo. Através desses resultados mostrou que alguma substância (ou substâncias), presente em alimentos naturais como o leite, era essencial para assegurar a utilização dos nutrientes purificados fornecidos através da mistura artificial e garantir o crescimento dos animais (SHARMAN 1977, p. 97). Com base nesses resultados, introduziu o conceito de “fatores acessórios”: substâncias adicionais – em relação aos quatro grupos de nutrientes reconhecidos – necessárias em quantidades mínimas para uma nutrição adequada, de natureza ainda desconhecida (BECHTEL 1984, p. 273).

No mesmo ano, Funk – que no ano anterior havia relatado a obtenção da substância que prevenia e curava o beribéri em uma forma mais pura – publicou um artigo, “A etiologia das doenças de deficiência”, no qual faz uma revisão sobre o assunto, agrupando as evidências de que a ausência de determinados fatores nutricionais era responsável pelo beribéri, pela polineurite das aves, pelo beribéri de bordo, pelo escorbuto, pela pelagra e raquitismo, classificando essas doenças como doenças de deficiência nutricional (CODELL CARTER 1977, p. 135-6). Considerou que as diversas doenças estavam associadas à deficiência nutricional de substâncias diferentes e sugeriu o

nome de “vitaminas” para esses nutrientes essenciais⁴.

Assim, Hopkins chegou ao conceito de “fatores nutricionais acessórios” através de experimentos de dieta purificada e, por outro lado, Funk estabeleceu o conceito de doenças de deficiência nutricional relacionando-as à deficiência de “vitaminas”. Pesquisas subseqüentes confirmaram as conclusões de Hopkins e Funk. Em 1915, através das pesquisas de McCollum e Davis, já se distinguiam dois tipos de vitaminas, ambas imprescindíveis para o crescimento e a saúde dos animais experimentais: uma encontrada em certas gorduras e denominada, a princípio, “fator A solúvel em gordura” e outra presente no extrato aquoso de certos alimentos, o “fator B solúvel em água”, que logo foi também associado à cura do beribéri (SHARMAN 1977, p. 97; BECHTEL 1984, p. 273; MCCOLLUM 1957, p. 217-9).

Assim, de acordo com o que foi descrito, a descoberta das vitaminas não esteve relacionada a uma determinada descoberta experimental nem ao trabalho de determinado pesquisador, mas à conjunção de evidências resultantes de diversos estudos sobre necessidades nutricionais e sobre as doenças depois reconhecidas como doenças de deficiência nutricional – o que Bechtel (1984) mostra claramente em seu artigo.

A descoberta das vitaminas, por outro lado, é um dos episódios mais discutidos da história da ciência da nutrição, sendo tratada de forma diversa pelos diversos historiadores que o estudaram. Nesse sentido, o aspecto mais controverso refere-se ao motivo pelo qual as vitaminas foram descobertas tão tarde, considerando-se que, pelo menos no final do século XIX, já havia evidências suficientes da existência desses nutrientes e que já na década de 1880 havia pesquisadores que suspeitavam dessa existência. McCollum (1957), que participou da descoberta da vitamina A, considera que a confiança dos pesquisadores em nutrição nos métodos químicos de análise de alimentos, considerando que revelavam os nutrientes que estavam presentes, retardou o reconhecimento de que havia outras substâncias nutricionalmente essenciais além de proteínas, carboidratos, gorduras e minerais. Follis Jr. (1960), por outro lado, procura mostrar que desde o final da década de 1850 já havia conhecimento suficiente para que fosse elaborado o conceito de doenças de deficiência, o que não aconteceu devido à

⁴A palavra original, em inglês, “vitamine” foi usada como uma contração de “vital amine”. Quando se descobriu que nem todas as vitaminas eram aminas, o “e” final foi retirado e a palavra tornou-se “vitamin” (BECHTEL 1984, p. 273).

ampla influência da teoria de que agentes “positivos” – os microorganismos e seus produtos – eram os causadores de doenças. Ihde e Becker (1971) partem dos trabalhos de McCollum e de Follis Jr. e procuram mostrar que a aceitação geral da teoria dos germes causadores de doença, da visão de Liebig e de Voit sobre nutrição, da visão de Schmidt e Bunge sobre o papel nutricional dos minerais e a crença na análise química de alimentos, retardaram o reconhecimento das vitaminas por parte dos pesquisadores em nutrição que vinham das áreas de fisiologia, química fisiológica e de medicina. Atribuem a descoberta das vitaminas aos químicos agrícolas que realizavam pesquisas nas estações experimentais agrícolas dos Estados Unidos, em geral com objetivos práticos, como o desenvolvimento de rações. Entre esses, incluem Hopkins, Osborne, Mendel, McCollum e Davis.

As conclusões de Follis Jr. e de Ihde e Becker, por sua vez, são contestadas diretamente e de forma bastante clara por Codell Carter (1977) e por Aronson (1986). Em seu artigo sobre o surgimento da teoria das doenças de deficiência, Codell Carter procura mostrar que, embora a teoria dos micróbios como causa das doenças tenha induzido alguns dos pesquisadores que estudavam o beribéri e o escorbuto a procurar determinada-mente um microorganismo causador ou mesmo a interpretar erradamente as evidências disponíveis, essa teoria, em certos sentidos contribuiu para a compreensão mais completa dessas doenças. Primeiro porque estabeleceu um novo padrão para o conhecimento científico de uma doença: a teoria dos micróbios não só explicava a causa da doença, mas também outros fatos relacionados, por exemplo, sobre a extensão da doença e sobre certos tipos de imunidade, relacionando-os ao comportamento dos microorganismos. Assim, o fato de se conhecer a forma de prevenir e curar uma doença – como era o caso do escorbuto, que antes era citado como um ideal – passou a não ser mais suficiente para considerá-la compreendida. Segundo Codell Carter, por esse motivo retomou-se o estudo do escorbuto no final do século XIX, e também por isso os pesquisadores não se contentaram em saber que determinado tipo de dieta prevenia e curava o beribéri, mas buscavam a compreensão teórica dessa doença. Além disso, através dessa teoria chegou-se a hipóteses que ao serem testadas levaram a resultados importantes. Por exemplo, as tentativas de isolamento da antitoxina presente nos resíduos do polimento de arroz, que levaram ao isolamento, na medida do possível, do nutriente que prevenia e curava o beribéri; também, os estudos

demográficos de Fletcher e Braddon, que partiam da idéia de que o beribéri era uma doença infecciosa. Codell Carter também conclui, ao contrário de Follis Jr. e de Ihde e Becker, que pesquisadores da área médica, como Eijkman e Funk, também contribuíram para o estabelecimento do conceito de vitaminas.

Aronson, por sua vez, considera que não se pode concluir que houve resistência por parte dos pesquisadores da área médica devido à teoria dos micróbios como causa de doença – pois as evidências não eram, de forma alguma, conclusivas – nem que a descoberta das vitaminas deveu-se aos químicos agrícolas, que não estavam sob a influência dessa teoria. Em seu artigo de 1986, Aronson reexamina os episódios citados por McCollum e por Ihde e Becker – o que inclui também alguns dos que foram considerados por Follis Jr. – e também os relatos de Hopkins e de Mendel sobre a descoberta das vitaminas. Conclui que o conhecimento empírico sobre as doenças de deficiência, que as relacionava há muito tempo a determinadas dietas, e mesmo as primeiras observações mais sistemáticas a esse respeito, eram apenas esboços” e não podem ser considerados como uma “tradição anterior de pesquisa em doenças de deficiência vitamínica” (ARONSON 1986, p. 636). Considera que as conclusões, anteriores à de Hopkins, de que os fracassos nos experimentos de dieta purificada eram devidos à falta de um nutriente essencial, apesar de corretas, estavam baseadas em evidências que depois se mostraram erradas. E que, por outro lado, as pesquisas médicas sobre o beribéri realizadas no início do século, na verdade contribuíram diretamente para a descoberta das vitaminas. Além disso, Aronson mostra que Hopkins, apesar de trabalhar numa estação experimental agrícola, vinha de círculos médicos, assim como Mendel (que participou da descoberta da vitamina A junto com Osborne e paralelamente a McCollum e Davis).

A partir das evidências e argumentos apresentados pelos diversos historiadores, concluiu-se que o estabelecimento do conceito de vitaminas resultou da conjunção de pesquisas sobre necessidades nutricionais e sobre doenças de deficiência. Através dos trabalhos de McCollum (1957) e de Ihde e Becker (1971), que abordaram mais detalhadamente as pesquisas em nutrição, fica claro que a confiança dos pesquisadores nos métodos químicos de análise de alimentos então disponíveis e na base teórica da ciência da nutrição – que na época restringia as necessidades nutricionais às necessidades de proteínas, carboidratos, gorduras e minerais – dificultou

o reconhecimento da existência de outras substâncias, desconhecidas e nutricionalmente essenciais. No mesmo sentido parece certo que a aceitação incondicional da teoria dos germes causadores de doença por parte de alguns pesquisadores, dificultou a descoberta de outros tipos de causa. Por outro lado, cabe observar que a história da descoberta das vitaminas destaca as dificuldades envolvidas nas descobertas científicas. Olhando para o passado, do ponto de vista do conhecimento atual, fica parecendo que as evidências disponíveis (pelo menos desde as últimas décadas do século XIX) deixavam óbvia a existência dessas substâncias. Mas, através dos fatos históricos aqui descritos, pode-se notar que, para os pesquisadores da época, as coisas não foram tão fáceis assim.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A pesquisa histórica realizada possibilitou o levantamento e o encadeamento de fatos que marcaram o desenvolvimento da ciência da nutrição, no período considerado. Desse modo, foi possível acompanhar historicamente esse desenvolvimento e chegar a algumas conclusões gerais a esse respeito, as quais são apresentadas e discutidas a seguir.

– No início do século XX estavam estabelecidos os principais conceitos e métodos experimentais da ciência da nutrição, que indicariam a direção das pesquisas nessa área a partir de então. Nem todos os nutrientes essenciais haviam sido detectados e as diversas vitaminas ainda não haviam sido descobertas, mas isso era uma questão de tempo, pois estudos nesse sentido já estavam em andamento. Restavam ainda inúmeras questões a serem esclarecidas – relacionadas, principalmente, aos aspectos bioquímicos do processo nutricional e à disponibilidade fisiológica dos diversos nutrientes, assim como à quantificação das necessidades nutricionais. Entretanto, como foi visto, a ciência da nutrição já contava com uma base teórica e experimental e com métodos próprios.

– O desenvolvimento histórico da ciência da nutrição esteve sujeito a controvérsias, disputas, tentativas e erros e numerosas dificuldades. Diversos episódios exemplificam isso, evidenciando aspectos que podem ser considerados comuns à ciência como um todo, associados à própria atividade científica, enquanto atividade humana.

A controvérsia sobre a origem da gordura animal, por exemplo, mostra como a discussão de uma questão científica pode envolver e ser influenciada por fatores pessoais – no caso, a disputa entre Liebig e Dumas. Os acontecimentos associados à controvérsia, descritos na seção 6.1, mostram que um cientista pode decidir-se a defender sua própria teoria mesmo diante de fatos experimentais claramente discordantes. Por outro lado, esse episódio da história da nutrição evidencia como uma discussão científica pode dar origem a informações importantes para o desenvolvimento da ciência. No caso, ambas as partes envolvidas foram obrigadas a embasar seus argumen-

tos através de demonstrações experimentais. Através dos experimentos realizados com esse objetivo, foram esclarecidas, por exemplo, questões relacionadas à própria experimentação nutricional, como a necessidade de um período experimental mais extenso do que normalmente era praticado, observada por Boussingault. Além disso, fica claro como, muitas vezes, é difícil obter evidências conclusivas, que não deixem espaço para outras interpretações – ainda mais quando o conhecimento disponível sobre o assunto em questão é ainda bastante restrito, como nesse caso. A história da idéia de considerar o “output” de uréia como medida do metabolismo dos tecidos, relatada na seção 7.1, também exemplifica como os cientistas podem levantar hipóteses razoáveis, que tornem compatíveis, com a teoria que defendem, evidências aparentemente contrárias. Nesse caso, ressalta-se a hipótese da reserva muscular de energia derivada do metabolismo protéico, levantada por Voit para justificar as evidências experimentais que contradiziam a teoria de Liebig. Também nesse caso, pode-se observar como um cientista pode demorar a reconhecer que sua teoria foi refutada.

As dificuldades intrínsecas à pesquisa científica, por sua vez, podem ser observadas através da história dos estudos nutricionais sobre a gelatina, descrita no capítulo 5. Nesse caso, pode-se notar que a limitação do conhecimento sobre as necessidades nutricionais – o que, na época, significava um desconhecimento quase total – impossibilitou a realização de experimentos que produzissem resultados esclarecedores. Desse modo, a Comissão da Gelatina não pode chegar a nenhuma conclusão, apesar dos numerosos experimentos que realizou no decorrer de diversos anos. No mesmo sentido, é interessante acompanhar o desenrolar da pesquisa que levou Claude Bernard à descoberta da função glicogênica do fígado, relatado na seção 6.2. Nesse caso, como foi visto, as dificuldades enfrentadas por Bernard foram diversas, associadas tanto ao conhecimento fisiológico e nutricional da época – ponto de partida de sua investigação – quanto à própria complexidade das condições fisiológicas do organismo animal. Também no mesmo sentido, cabe notar as numerosas dificuldades enfrentadas pelos pesquisadores envolvidos em estudos sobre as proteínas, como foi visto no capítulo 10. Pode-se considerar, nesse caso, que a complexidade química dessas substâncias foi a causa principal dessas dificuldades. A multiplicidade das proteínas, o fato de serem constituídas por unidades estruturais diversas, a própria diversidade dos aminoácidos e a susceptibilidade de cada um aos di-

versos procedimentos químicos utilizados nos diversos estudos, certamente confundiram os pesquisadores.

A história da descoberta das vitaminas, descrita no capítulo 10, também mostra como pode ser difícil e demorado o estabelecimento de um novo conceito científico. Esse episódio, entretanto, evidencia principalmente como a confiança incondicional no conhecimento considerado estabelecido pode dificultar aos cientistas a aceitação de uma conclusão incompatível com esse conhecimento. Como foi visto, o sucesso da teoria dos germes causadores de doença fez com que diversos pesquisadores procurassem isolar o micro-organismo responsável por doenças como escorbuto e beribéri e resistissem à idéia de que a ausência de algum nutriente podia provocar uma doença. No mesmo sentido, a confiança nos métodos químico-analíticos – então considerados bastante desenvolvidos – esteve associada à dificuldade de aceitar a existência de substâncias químicas que não podiam ser detectadas analiticamente.

– A formação diversa dos pesquisadores que realizaram estudos sobre nutrição no século XIX, em geral, condicionou sua visão sobre o problema em estudo. Nesse sentido, ficam evidentes as diferenças entre a forma de abordagem e os aspectos enfatizados (ou levados em conta) em pesquisas conduzidas por químicos e por fisiologistas, particularmente na primeira metade do século XIX. Nessa época, a interação entre fisiologia e química – embora crescente – ainda não era suficiente para que os químicos reconhecessem a complexidade das condições fisiológicas e, por outro lado, para que os fisiologistas reconhecessem o quanto o conhecimento químico poderia ser útil na elucidação de questões metabólicas.

Assim, por exemplo, pode-se comparar a pesquisa experimental sobre o valor nutricional da gelatina conduzida por Magendie – enquanto membro da Comissão da Gelatina – e as considerações teóricas de Dumas sobre a mesma questão. O desenvolvimento da pesquisa por Magendie e as conclusões apresentadas no relatório da Comissão, descritos no capítulo 5, mostram sua preocupação com a avaliação biológica desse nutriente, certamente associada à sua formação em fisiologia. Já as suposições de Dumas, apresentadas no mesmo ano (ver seção 4.3), evidenciam sua formação química; baseiam-se exclusivamente na composição química da gelatina. Cabe no-

tar que como foi visto, a visão de Dumas e de Liebig caracterizam a visão química dos processos metabólicos em seu extremo: ambos, assim como diversos outros químicos da época, procuravam deduzir os processos metabólicos a partir do conhecimento químico sobre as substâncias envolvidas nesses processos. Chegavam a considerar que a obtenção de determinado tipo de reação química entre substâncias orgânicas em laboratório constituía prova experimental de que reações do mesmo tipo podiam ocorrer nos organismos vivos (ver seção 6.1). Com base nesses critérios, como foi visto nas seções 4.3 e 4.4, Liebig e Dumas elaboraram teorias químicas detalhadas (porém imaginárias) sobre os processos metabólicos.

Os fisiologistas mais eminentes da primeira metade do século XIX não se arriscaram, como esses químicos, a propor generalizações teóricas sobre o metabolismo animal. Provavelmente por estarem envolvidos mais diretamente com as condições fisiológicas em que ocorriam os processos metabólicos e, portanto, mais conscientes de sua complexidade. Por outro lado, é importante lembrar como as teorias de Liebig foram particularmente frutíferas e deram base para inúmeras e diversas pesquisas sobre o metabolismo animal realizadas na segunda metade do século XIX (ver seções 4.4, 7.1 e 7.2). Mas foram fisiologistas – principalmente Claude Bernard – que chamaram a atenção para a precariedade das conclusões derivadas exclusivamente do conhecimento químico e defenderam a necessidade de estudar “in loco” os processos internos ao organismo animal.

A interpretação dos resultados obtidos experimentalmente também pode ser associada à formação do pesquisador, no contexto da história da nutrição. Pode-se citar, por exemplo, a hipótese levantada por Eijkman (apresentada na seção 10.2) ao constatar a relação entre o consumo de arroz polido ou com casca e a incidência de polineurite entre as galinhas de seu laboratório. Provavelmente devido à sua formação de microbiologista e à influência da teoria dos germes causadores de doença Eijkman supôs a existência de uma toxina no endosperma de arroz e de uma antitoxina no pericarpo desse cereal.

– O desenvolvimento do conhecimento científico sobre nutrição, em geral, esteve condicionado pelo conhecimento químico disponível sobre as substâncias orgânicas e pela evolução do conhe-

cimento fisiológico sobre os processos metabólicos. Cabe observar, entretanto, que durante o século XIX foi crescente a aproximação entre a fisiologia e a química – a primeira incorporando os métodos analíticos e o conhecimento teórico da segunda e esta, dirigindo-se a objetos de pesquisa e questões antes restritos à primeira, além de recorrer a alguns de seus procedimentos experimentais. Os resultados dessa aproximação também estão refletidas no desenvolvimento da ciência da nutrição e, num sentido mais amplo, determinaram o surgimento da bioquímica.

Assim, a partir do final do século XVIII – que marca o início da química moderna – as teorias sobre o fenômeno nutricional estiveram associadas diretamente ao conhecimento sobre a composição e o comportamento químico das substâncias constituintes dos fluidos e tecidos animais e vegetais. Os resultados da análise elementar de substâncias orgânicas e a idéia de reação química como adição, subtração e recombinação de elementos deram base às idéias de Lavoisier sobre o processo nutricional (e outros processos fisiológicos) descritas na seção 1.2. Da mesma forma, geraram as teorias sobre a “animalização” dos nutrientes relatadas na seção 1.3. A noção de constituintes moleculares – associada à difusão e melhoria dos procedimentos para separação e purificação de substâncias presentes em materiais orgânicos – também foi logo incorporada às idéias e pesquisas sobre o fenômeno nutricional. Isso fica evidente, por exemplo, na pesquisa sobre digestão de Tiedemann e Gmelin (seção 3.2) e na classificação dos nutrientes de Prout e suas conclusões sobre as necessidades nutricionais (seções 2.2 e 4.1). No mesmo sentido, as teorias metabólicas de Liebig e Dumas derivavam diretamente do conhecimento químico da época (década de 1840), como foi visto nas seções 4.3 e 4.4. Nesse caso, por exemplo, a descoberta de que as proteínas vegetais e animais eram praticamente idênticas em sua composição elementar – por Mulder – deu base às idéias sobre assimilação direta desses nutrientes.

Por outro lado, o avanço do conhecimento sobre o processo digestivo como um todo dependeu da combinação de conhecimentos e de procedimentos químicos e fisiológicos. A incorporação de métodos de análise química por fisiologistas que estudaram o processo de digestão fica evidente através das pesquisas de Eberle, Müller, Schwann, Bernard – entre outros – relatadas na seção 3.2. Os resultados e conclusões dessas pesquisas, como foi visto, dependeram dos resultados obtidos nas análises dos sucos e

conteúdos gastrointestinais. Mas, nesse caso, o desenvolvimento de técnicas experimentais fisiológicas e da fisiologia do aparelho digestivo também foram fundamentais. A obtenção dos diversos fluidos digestivos frescos em quantidade e sem alteração só foi possível a partir do aperfeiçoamento das técnicas de produção de fístulas de animais. Da mesma forma, o acesso aos conteúdos gástricos foi facilitado através dessas técnicas. Além disso, só através do estudo do funcionamento do aparelho digestivo foi possível constatar a participação do suco pancreático e da bile na digestão. A determinação do local preciso de entrada desses fluidos no intestino, por exemplo, foi fundamental para Bernard em sua pesquisa sobre a digestão pancreática, descrita na seção 3.2.

Essas observações podem ser estendidas aos estudos sobre a digestão de proteínas realizados na segunda metade do século XIX, que são relatados na seção 9.1. Esses estudos e as teorias sobre o metabolismo protéico deles derivadas, estiveram condicionados pelo conhecimento químico sobre essas substâncias. Nesse sentido, as diversas substâncias identificadas como produtos da digestão de proteínas foram incluídas nas hipóteses sobre o metabolismo protéico. Desse modo, as dificuldades envolvidas no isolamento, purificação e identificação desses produtos e a limitação dos métodos químicos disponíveis para isso, contribuíram diretamente para a demora no esclarecimento das questões relacionadas à nutrição protéica, como foi visto no capítulo 9 como um todo. O aperfeiçoamento desses métodos também influenciou diretamente no significado dos experimentos de dieta purificada. À medida que a obtenção de nutrientes purificados para elaboração das dietas experimentais foi sendo garantida – através dos procedimentos mais adequados e eficazes – os resultados desses experimentos puderam evidenciar a falta de algum nutriente essencial desconhecido (ver seção 10.1). Além disso, só depois que a purificação de nutrientes atingiu um nível satisfatório, os experimentos de dieta purificada puderam ser utilizados para determinação da essencialidade de diversos nutrientes.

O desenvolvimento do conhecimento sobre os requerimentos energéticos dos animais, por sua vez, esteve associado aos avanços da química, particularmente da termoquímica, e da física – nesse caso, da termodinâmica. Como foi visto na seção 7.2, o estabelecimento do princípio de conservação da energia e da lei de Hess, nos anos 1840, deu suporte à teoria química do calor e à consideração de que o calor produzido na combustão dos nutrien-

tes devia ser igual dentro ou fora do organismo animal. Ou seja, forneceram a base teórica para o desenvolvimento da calorimetria na segunda metade do século XIX. Além disso, o desenvolvimento da termoquímica possibilitou medidas diretas do calor de combustão dos diversos nutrientes e eliminou uma fonte de erro comum nos estudos nutricionais calorimétricos: o cálculo do calor de combustão de uma substância através da soma do calor de combustão de seus elementos constituintes. No mesmo sentido, para que as pesquisas calorimétricas sobre o metabolismo produzissem resultados significativos, foi primeiro necessário reconhecer que, em caso de trabalho muscular, parte da energia metabólica era convertida em energia mecânica e não seria liberada como calor – o que foi observado por Mayer em 1845, mas só foi demonstrado conclusivamente por Atwater no início do século XX (ver seção 7.2).

Cabe ressaltar também que, de modo geral, os avanços obtidos na química e na fisiologia ao longo do século XIX e no início do século XX eram logo incorporados às pesquisas em nutrição. Isso pode ser explicado pelo fato de que químicos e fisiologistas importantes – algumas vezes, os mesmos que haviam participado desses avanços – estiveram envolvidos nessas pesquisas.

– **Nem sempre o conhecimento científico disponível numa determinada época contribuiu para o avanço do conhecimento em nutrição. Pelo contrário, algumas vezes o conhecimento disponível chegou a dificultar o esclarecimento de determinadas questões.** Assim, por exemplo, a descoberta de que as proteínas vegetais e animais apresentavam composição elementar praticamente idênticas (ver seção 2.5), gerou e deu base à idéia de que esses nutrientes não precisavam sofrer alterações químicas significativas para serem assimiladas. Desse modo, num certo sentido, essa descoberta acabou confundindo os químicos com relação às transformações digestivas das proteínas (ver seções 4.3 e 4.4).

A descoberta de que as “peptonas” eram difusíveis através de membranas animais, na década de 1850, também dificultou o esclarecimento do processo de digestão das proteínas. Como foi visto na seção 9.1, essa descoberta deu base à suposição de que as “peptonas” representavam o produto final da digestão de proteínas, forma na qual seriam absorvidas

através da mucosa intestinal. A partir disso, as peptonas permaneceram como foco da atenção nas pesquisas sobre a digestão protéica por mais de trinta anos, embora alguns aminoácidos fossem frequentemente identificados entre os produtos dessa digestão. Considerava-se que, se as peptonas já eram passíveis de absorção, a conversão das proteínas em aminoácidos representaria um desperdício de energia metabólica.

A participação da teoria dos germes causadores de doença na história da descoberta das vitaminas (ver seções 10.2 e 10.3) também exemplifica como o conhecimento disponível pode contribuir negativamente para o esclarecimento de determinadas questões. Como foi visto, o sucesso dessa teoria levou os pesquisadores a procurarem determinadamente os microorganismos responsáveis pelo beribéri, escorbuto, etc., o que acabou atrapalhando o reconhecimento das doenças de deficiência nutricional e, conseqüentemente, a descoberta das vitaminas. No mesmo sentido, a confiança no conhecimento disponível sobre as necessidades nutricionais dificultou o reconhecimento da importância nutricional das vitaminas, substâncias que não eram detectadas pelos métodos analíticos (ver seções 10.1 e 10.3).

– Nem sempre todas as possibilidades de um método experimental disponível ou as implicações de uma descoberta foram prontamente exploradas nas pesquisas sobre nutrição. Nesse sentido, pode-se supor que algumas questões relativas à nutrição poderiam ter sido resolvidas antes do que foram, uma vez que o conhecimento e os métodos necessários para isso – os pré-requisitos – já estavam anteriormente disponíveis. Para exemplificar isso, pode-se retomar a idéia de que as proteínas eram absorvidas como peptonas. Como foi dito, essa idéia perdurou por mais de trinta anos, até que, em 1881, Hofmeister a refutou experimentalmente (ver seção 9.1): injetou uma solução de peptonas no sangue de animais e verificou que saíam na urina ou provocavam intoxicação. Desse modo concluiu que, como essas substâncias não eram aproveitadas pelo organismo quando inseridas na circulação sanguínea, não deviam ser absorvidas como tal. Esse tipo de experimento e o critério utilizado para definir se uma substância apresentava-se na forma “assimilável”, havia sido proposto e aplicado por Claude Bernard em estudos sobre digestão na década de 1840, e desde então já havia sido utilizado por diversos pesquisadores

(ver seção 3.2). Assim, pode-se supor que a idéia de que as proteínas eram absorvidas como peptonas poderia ter sido submetida a esse teste experimental muitos anos antes.

Os fracassos enfrentados nos experimentos de dieta purificada, associados ao desconhecimento da essencialidade das vitaminas, também poderiam, provavelmente, ter sido superados antes do que foram. Como visto na seção 10.1, em 1880 Lunin concluiu que alguma substância desconhecida presente no leite era nutricionalmente essencial, já que pequenas quantidades desse alimento tornava adequadas dietas experimentais que, sem esse suplemento, levavam à morte dos animais. Por outro lado, foi visto na mesma seção que em 1909 Osborne e Mendel prepararam “leite desproteínado”, cuja adição tornou possível a determinação da essencialidade de determinados aminoácidos antes do reconhecimento das vitaminas. Além disso, desde a década de 1870, pelo menos (ver seção 9.1), eram incluídas nas dietas experimentais as cinzas de alimentos considerados adequados para suprimento das necessidades de minerais – sem que se soubesse exatamente quais eram os minerais nutricionalmente essenciais. Somando-se a isso o fato de que na década de 1880 já estavam disponíveis procedimentos que possibilitavam a separação das proteínas do leite, pode-se considerar que a idéia de suplementar as dietas experimentais com leite desproteínado poderia ter sido aplicada bem antes – pelo menos, já havia os pré-requisitos – em experimentos para a avaliação nutricional das proteínas e de seus produtos de digestão.

Além disso, de acordo com o que foi descrito na seção 9.3, a hipótese de que o baixo valor nutricional da gelatina estava relacionado à ausência do aminoácido tirosina em sua molécula foi levantada no final da década de 1860, por L. Hermann. Entretanto, essa hipótese foi abandonada depois que os resultados experimentais obtidos por Escher entre 1869 e 1874, que a confirmaram, não puderam ser repetidos por seus contemporâneos. O fato de que Escher acrescentava caldo de carne à dieta experimental torna duvidoso o valor de seus resultados, já que seu objetivo era testar a suplementação da gelatina por tirosina e o caldo de carne deve ter fornecido outros aminoácidos. Por outro lado, como foi visto, a hipótese de Hermann só seria retomada no início do século XX e, além disso, os pesquisadores que a retomaram enfrentaram problemas relacionados à inadequação das dietas experimentais, a relação entre o baixo valor nutricional da gelatina

e a ausência de determinados aminoácidos essenciais em sua molécula só seria esclarecida em 1905. Com base nesses fatos e no que foi observado no parágrafo anterior, pode-se considerar que a hipótese levantada por Hermann poderia ter sido melhor explorada nas últimas décadas do século XIX. Desse modo, a própria questão da essencialidade nutricional de determinados aminoácidos, implícita nessa hipótese, poderia ter sido evidenciada antes do que realmente foi.

Através desses exemplos, pode-se concluir que nem todas as descobertas científicas foram logo aproveitadas para o esclarecimento de questões nutricionais, nem todas as possibilidades dos métodos experimentais disponíveis em cada momento foram prontamente exploradas, nem sempre as idéias apresentadas pelos cientistas foram devidamente examinadas. Diversos fatores devem ter contribuído para isso, em cada caso, particularmente. Mas, de modo geral, essa conclusão pode ser estendida à ciência como um todo: não se pode considerar que o estabelecimento de determinado fato científico implique, subsequente, em seu aproveitamento para a resolução de questões relacionadas. Ao contrário, é possível que tal fato acabe dificultando ou retardando o esclarecimento de determinadas questões, ou que seja ignorado.

– Os principais métodos experimentais utilizados nas pesquisas em nutrição durante todo o século XIX já se encontravam esboçados no início desse século. Foi possível localizar, historicamente, versões “preliminares” do método de balanço, dos experimentos de digestão “in vitro” e “in vivo” e dos experimentos de dieta (“feeding experiments”). Apesar das diversas modificações que essas versões preliminares sofreram ao longo do século XIX - incorporando os avanços teóricos e experimentais da química, fisiologia e do próprio conhecimento nutricional - pode-se constatar que as idéias centrais, os princípios básicos desses métodos, foram mantidas. Ou seja, acompanhando a evolução desses métodos, pode-se verificar como os procedimentos estiveram condicionados pelo conhecimento científico disponível na época.

1. Experimentos de digestão “in vitro” e “in vivo”

Verificou-se que a idéia de realizar experimentos de digestão “in vitro” e “in vivo” para verificar o que acontecia aos alimentos durante o pro-

cesso digestivo data de meados do século XVIII, concretizada através das pesquisas de Réaumur e Spallanzani, como foi visto na seção 3.2. Transcorrido mais de um século, basicamente o mesmo tipo de experimento foi utilizado nos estudos sobre a digestão de proteínas – abordado na seção 9.1 – e possibilitou o esclarecimento de diversas questões relacionadas a isso. Entretanto, foi possível observar que os procedimentos e resultados de Réaumur e de Spallanzani – que em sua época representaram um grande avanço – estiveram limitados pelo parco conhecimento químico e fisiológico então disponível. Já nos anos 1820, como foi visto na seção 3.2, a pesquisa de Tiedemann e Gmelin sobre o processo digestivo incorporou aos experimentos de digestão “in vitro” e “in vivo” os métodos de análise química desenvolvidos recentemente, assim como o conhecimento sobre os constituintes moleculares da matéria orgânica e sua composição elementar. Da mesma forma, o desenvolvimento de métodos para isolamento e purificação de substâncias orgânicas possibilitou a descoberta dos princípios ativos dos sucos digestivos e a preparação de sucos “artificiais”, então utilizados nos experimentos de digestão “in vitro”. Os mesmos experimentos, mais a noção de catálise e o conhecimento sobre a composição química dos nutrientes, levaram ao esclarecimento da ação química digestiva. No caso das proteínas, as dificuldades envolvidas na elucidação de sua estrutura, dificultaram também a compreensão de seu processo digestivo (ver capítulo 9) – o que, em grande parte, ocorreu através de experimentos de digestão “in vitro” e “in vivo”. Por outro lado, o aperfeiçoamento das técnicas de experimentação fisiológica facilitaram o acesso aos sucos digestivos – em seguida utilizados nos experimentos “in vitro” – e aos conteúdos gastro-intestinais após digestão “in vivo”.

2. Método de balanço

A idéia de obter informações quantitativas sobre os processos fisiológicos do organismo animal através da determinação do que entra e do que sai desse organismo – base dos experimentos de balanço – foi aplicada por Lavoisier, no final do século XVIII, ao estudo das trocas respiratórias e da produção de calor animal¹, como foi visto na seção 1.2. Através de sua

¹Holmes (1987) observa que no século XVII Sanctorius já havia realizado experimentos de balanço, nos quais pesava os alimentos que ingeria e suas excreções. Entretanto, ressalta as limitações de seus resultados associadas ao desconhecimento da composição química da matéria orgânica.

teoria química do calor animal, de sua idéia da interrelação entre os processos fisiológicos e dos procedimentos que desenvolveu para medida das trocas respiratórias, Lavoisier forneceu a base para os experimentos de balanço químico (de elementos) e energético que seriam realizados no século seguinte. Chegou, inclusive, a planejar experimentos de balanço global de elementos do metabolismo animal, que incluíam a entrada através dos alimentos e gases inspirados e a saída através dos gases expirados e excreções. Assim, no final do século XVIII, o método de "input-output" já havia sido proposto e, com relação às trocas respiratórias, realizado.

Já em meados do século XIX, Boussingault procurou concretizar a idéia de estabelecer o balanço global de elementos do organismo animal. Através de numerosos experimentos de "input-output" – relatados nas seções 4.2 e 6.1 e no capítulo 8 – desenvolveu procedimentos adequados, definiu critérios e evidenciou as possibilidades de aplicação desse método. A partir da suposição de que a assimilação de nutrientes pelo organismo animal, em condições de equilíbrio, destina-se à reposição de gastos e perdas, considerou que os experimentos de balanço indicavam a utilização de determinados nutrientes, por exemplo os minerais (ver capítulo 8). Através de seus experimentos relacionados à questão da origem da gordura animal, descritos na seção 4.1, Boussingault reconheceu a necessidade (nesse caso, válida para todo experimento nutricional) de um período experimental mais longo, associada à necessidade de adaptação à dieta experimental. Reconheceu também que o estado nutricional prévio do animal podia interferir nos resultados dos experimentos (no caso, reservas de gordura).

Na segunda metade do século XIX, como foi visto nas seções 7.1 e 7.2, diversos pesquisadores procuraram obter informações quantitativas sobre o metabolismo animal através de experimentos de "input-output" de elementos. Nesse sentido, enfrentaram diversas dificuldades, associadas particularmente às tentativas de estabelecer o balanço global de elementos. Nesse caso, para que pudessem chegar aos seus objetivos, foi preciso reconhecer a necessidade de medidas simultâneas das trocas respiratórias e nutricionais, e desenvolver aparelhos adequados a isso. Foi preciso, também, introduzir cuidados que garantissem a precisão das medidas – por exemplo, com relação à coleta dos excrementos. Paralelamente, foram incorporados métodos analíticos mais precisos e rápidos, adequados à necessidade de numerosas determinações. Assim, até o final do século, o método de

“input-output” havia sido aprimorado em diversos sentidos e tornara-se fundamental em estudos sobre nutrição. Particularmente, havia sido reconhecido o significado de se determinar o balanço de nitrogênio do organismo animal como critério para avaliação da adequação protéica de uma dieta, e do valor nutricional de determinada proteína ou aminoácido.

3. Experimentos de dieta

A idéia de submeter animais a dietas de composição química conhecida e controlada e observar sua resposta fisiológica foi aplicada por Magendie em 1816, num experimento destinado a verificar a necessidade nutricional de substâncias nitrogenadas, descrito no capítulo 5. A partir de então, essa idéia deu base para o desenvolvimento de um método experimental de pesquisa especificamente adequado ao estudo das necessidades nutricionais, que seria fundamental para o desenvolvimento da ciência da nutrição. Assim, a mesma idéia esteve por trás da descoberta da existência das vitaminas, evidenciada através de experimentos com dietas purificadas, relatados na seção 10.1. Por outro lado, da mesma forma que os experimentos de digestão e de “input-output”, a realização dos experimentos de dieta esteve condicionada pelo conhecimento científico disponível ao longo do século XIX. Nesse caso, porém, o sucesso dos experimentos – com relação ao significado dos resultados – dependeu mais diretamente do esclarecimento de diversos aspectos da química de alimentos e da própria nutrição animal.

A realização de experimentos de dieta controlada só se tornou possível a partir de um mínimo de conhecimento sobre a composição química dos alimentos e dos fluidos e tecidos corpóreos. Nesse sentido, o conhecimento disponível no início do século XIX deu base para os experimentos de Magendie. A importância desse conhecimento químico estava em fornecer “pistas” sobre as necessidades nutricionais, derivadas da suposição de que as substâncias constituintes dos fluidos e tecidos corpóreos poderiam ser derivadas da alimentação. Por outro lado, as limitações impostas pelo parco conhecimento sobre as necessidades nutricionais ficam claras através dos experimentos realizados com o objetivo de determinar o valor nutricional da gelatina, descritos no capítulo 5. Como foi visto, apesar de realizar diversos experimentos de dieta controlada, a Comissão da Gelatina não pode chegar a nenhuma conclusão, devido, em grande parte, à falta de critérios para avaliação do valor nutricional dessa substância.

Já na segunda metade do século XIX, considerava-se que a alimentação

devia fornecer aos animais proteínas, gordura, carboidratos e minerais. Além disso, o desenvolvimento de métodos de isolamento e purificação dos diversos nutrientes presentes nos alimentos, possibilitou um controle cada vez maior sobre a composição das dietas experimentais, como foi visto na seção 10.1. No mesmo sentido, o desenvolvimento do conhecimento sobre as necessidades nutricionais – em parte derivado dos próprios experimentos de dieta controlada – possibilitou a elaboração de dietas mais adequadas aos objetivos de pesquisa. Assim, por exemplo, as dietas experimentais do final do século XIX podiam conter um tipo de proteína, um de carboidrato e um de gordura, mais as cinzas de um alimento (ou combinação de alimentos) considerado adequado como, por exemplo, o leite. Surgiram, então, os experimentos de dieta purificada, que acabaram mostrando que o conhecimento químico sobre os alimentos e o conhecimento sobre as necessidades nutricionais era, ainda, limitado.

O desenvolvimento dos experimentos de dieta resultou em alterações nos critérios de avaliação, adequando-os aos objetivos experimentais. Assim, na primeira metade do século XIX, uma dieta era considerada adequada se fosse capaz de manter a saúde, o peso ou a sobrevivência dos animais durante o período experimental. Esses critérios, associados ao tipo de dieta testada na época – que podia ser composta por um único nutriente (ver capítulo 5) – conduzia a resultados que, na verdade, não esclareciam nada. Os mesmos critérios, mais tarde associados a um conhecimento maior sobre as necessidades nutricionais, possibilitaram a obtenção de resultados mais confiáveis. Paralelamente, na segunda metade do século XIX, surgiram critérios mais específicos: por exemplo, o conteúdo de hemoglobina do sangue para testar o valor nutricional de determinado composto de ferro (ver capítulo 8) e o equilíbrio de nitrogênio para avaliar o valor nutricional de determinada proteína (ver seções 9.1 e 9.3). A manutenção do crescimento dos animais experimentais também passou a ser considerada como critério para avaliação nutricional de nutrientes.

No mesmo sentido, cabe observar que, a princípio, diversas espécies de animais eram utilizadas nos experimentos nutricionais: galinhas, gatos, cães, vacas, cavalos, porquinhos-da-Índia, etc. Já no início do século, pode-se notar que o uso de ratos nesses experimentos começa a se tornar significativo (TODHUNTER 1962).

Os experimentos de dieta controlada surgiram, portanto, da própria

necessidade de investigar o valor nutricional dos alimentos. Ou seja, foram desenvolvidos especificamente para estudos nutricionais, numa época em que a nutrição era objeto de estudo de pesquisadores de áreas científicas diversas. Gradualmente foi sendo reconhecida a importância desse tipo de experimento para a pesquisa em nutrição e, desse modo, sua utilização foi crescente na segunda metade do século XIX. Entretanto, apesar desse reconhecimento, sua difusão ampla foi retardada, provavelmente devido aos numerosos fracassos enfrentados pelos pesquisadores que adotavam os experimentos de dieta purificada até virada do século XX – que, como foi visto, se tornaram mais freqüentes à medida que a purificação dos nutrientes se tornava mais eficiente. Por outro lado, os resultados positivos obtidos no início do século XX estimularam definitivamente a realização desse tipo de experimento. Estes, então, tornaram-se característicos da ciência da nutrição, que na época esboçava sua emancipação.

LISTA BIBLIOGRÁFICA

- 1 ARONSON, N. Resistance to discovery: vitamin, history and careers. *Isis*: **17** (289): 630-46, 1986.
- 2 BECHTEL, W. Reconceptualization and interfield connections: the discovery of the link between vitamins and co-enzymes. *Philos. Sci.*, (51): 265-92, 1984.
- 3 CODELL CARTER, K. The germ theory, beriberi, and the deficiency theory of disease. *Med. Hist.*, **21**: 119-36, 1977.
- 4 COLEMAN, W. The cognitive basis of the discipline: Claude Bernard on physiology. *Isis*, **76**: 49-70, 1985.
- 5 DIDEROT, D. & D'ALEMBERT, J.R. *Encyclopédie, ou dictionnaire raisonné des arts et des métiers, par une société des gens de lettres*. New York, Pergamon, 1969. v. 2, p. 1066-7.
- 6 DIXON, M. The history of enzymes and of biological oxidations. In: NEEDHAM, J. (ed.). *The chemistry of life*. Cambridge, Cambridge University, 1971. p. 15-37.
- 7 FÄRBER, E. The development of protein chemistry. *J. Chem. Educ.*, **15**: 434-44, 1938.
- 8 FLORKIN, M. *A history of biochemistry*. Amsterdam, Elsevier, 1972. 343 p.
- 9 FOLLIS JR., R.H. Cellular pathology and the development of the deficiency disease concept. *Bull. Hist. Med.*, **34** (4): 219-317, 1960.

- 10 FRUTON, J.S. *Molecules and life: historical essays on the interplay of chemistry and biology*. New York, Wiley-Interscience, 1972. 579 p.
- 11 ———. The emergence of biochemistry. *Science*, **192** (4237): 327-34, 1976.
- 12 ———. Early theories of protein structure. *Ann. New York Acad. Sci.*, **325**: 1-15, 1979.
- 13 GLAS, E. The protein theory of G.J. Mulder. *Janus*, **62**: 289-308, 1975.
- 14 ———. The Liebig-Mulder controversy. *Janus*, **63**: 27-46, 1976.
- 15 ———. Methodology and the emergence of physiological chemistry. *Stud. Hist. Philos. Sci.*, **9** (4): 291-312, 1978.
- 16 ———. *Chemistry and physiology in their historical and philosophical relations*. Delft, Delft University, 1979. 199 p.
- 17 ———. Bio-science between experiment and ideology, 1835-50. *Stud. Hist. Philos. Sci.*, **14** (1): 39-57, 1983.
- 18 GREENSTEIN, J.P. & WINITZ, M. *Chemistry of the amino acids*. New York, John Wiley & Sons, 1961. 760 p.
- 19 GRMEK, M.D. First steps in Claude Bernard's discovery of the glycogenic function of the liver. *J. Hist. Biol.*, **1**: 141-54, 1968.
- 20 GROSS, M. The lessened locus of feelings: a transformation in French physiology in the early Nineteenth Century. *J. Hist. Biol.*, **12** (2): 231-71, 1979.
- 21 GUGGENHEIM, Y.K. Mechanistic views on nutrition in the XVIIIth Century. *Koroth*, **9** (3-4): 384-92, 1986.

- 22 HALLIBURTON, W.D. Physiological chemistry. *Annual Rep. Prog. Chem.*, 1: 169-91, 1905.
- 23 ———. Physiological chemistry. *Annual Rep. Prog. Chem.*, 2: 212-37, 1906.
- 24 ———. Physiological chemistry. *Annual Rep. Prog. Chem.*, 3: 227-55, 1907.
- 25 ———. Physiological chemistry. *Annual Rep. Prog. Chem.*, 4: 226-60, 1908.
- 26 ———. Physiological chemistry. *Annual Rep. Prog. Chem.*, 9: 221-41, 1913.
- 27 HOLMES, F.L. Elementary analysis and the origins of physiological chemistry. *Isis*, 54 (175): 50-81, 1963.
- 28 ———. Introduction. In: LIEBIG, J. *Animal Chemistry; on organic chemistry in its application to physiology and pathology*. New York, Johnson Reprint, 1964.
- 29 ———. *Claude Bernard and animal chemistry; the emergence of a scientist*. Cambridge, Harvard University, 1974. 541 p.
- 30 ———. The transformation of the Science of Nutrition. *J. Hist. Biol.*, 8 (1): 135-44, 1975.
- 31 ———. Early theories of protein metabolism. *Ann. New York Acad. Sci.*, 325: 171-87, 1979.
- 32 ———. The intake-output method of quantification in physiology. *Hist. Stud. Phys. Biol. Sci.*, 17 (2): 235-70, 1987.
- 33 IHDE, A.J. An inquiry into the origins of hybrid sciences: astrophysics and biochemistry. *J. Chem. Educ.*, 46 (4):

193-6, 1969.

- 34 ———. *The development of modern chemistry*. New York, Dover, 1984. 851 p.
- 35 IHDE, A.J. & BECKER, S.L. Conflict of concepts in early vitamin studies. *J. Hist. Biol.*, 4 (1): 1-33, 1971.
- 36 IHDE, A.J. & JANSSEN, J.F. Early American studies on respiration and calorimetry. *Mol. Cell. Biochem.*, 5 (1-2): 11-6, 1974.
- 37 JANKO, J. From physiological chemistry to biochemistry. *Acta Hist. Rerum Nat. Techn.*, 9: 223-79, 1977.
- 38 KOHLER, R.E. The history of biochemistry: a survey. *J. Hist. Biol.*, 8 (2): 275-318, 1975.
- 39 KUHN, T.S. *A estrutura das revoluções científicas*. São Paulo, Perspectiva, 1975. 262p.
- 40 LAVOISIER, A. Elements of chemistry. (1785). In: MAYNAR, H. (ed.). *Great books of the western world*. Chicago, Encyclopedia Britannica, 1952. v. 45, p. 1-133.
- 41 LAVOISIER, A.L. & LAPLACE, P.S. de. Mémoire sur la chaleur. (1780). In: *Oeuvres de Lavoisier*. Paris, Imprimerie Impériale, 1862. v. 2, p. 283-333.
- 42 LAVOISIER, A.L. & SEGUIN. Premier mémoire sur la respiration des animaux. (1789). In: *Oeuvres de Lavoisier*. Paris, Imprimerie Impériale, 1862. v. 2, p. 688-703.
- 43 LEFÈVRE, J. *Chaleur animale et bioénergétique*. Paris, Masson e Cie., 1911. 1107 p.
- 44 LEICESTER, H.M. *Development of biochemical concepts from ancient to modern times*. Cambridge, Harvard Univ.

Press, 1974.

- 45 LUSK, G. A history of metabolism. (1922). In: GOLDBLITH, S.A. & JOSLYN, M.A., *Milestones in nutrition*. Westport, AVI, 1964, p. 19-94.
- 46 MARTINS, R. de A. Mayer e a conservação da energia. *Cad. Hist. Fil. Sci.*, (6): 63-84, 1984.
- 47 McCAY, C.M. *Notes on the history of nutrition research*. Bern, Han Huber, 1973. 234 p.
- 48 McCOLLUM, E.V. *A history of nutrition*. Boston, Houghton Mifflin, 1957. 451 p.
- 49 MENDELSON, E. *Heat and life*. Cambridge, M.A., Cambridge University, 1964. 208p.
- 50 PARTINGTON, J. *A short history of chemistry*. 2. ed. London, MacMillan, 1951.
- 51 PIKE, R.L. & BROWN, M.L. *Nutrition: an integrated approach*. New York, John Wiley & Sons, 1967.
- 52 PROUT, W. On the ultimate composition of simple alimentary substances, with some preliminary remarks on the analysis of organized bodies in general. *Phil. Mag.* 3: 31-40, 1828.
- 53 ROSENFELD, L. *Origins of clinical chemistry: the evolution of protein analysis*. New York, Academic Press, 1982. 366 p.
- 54 SHARMAN, I.M. Vitamins: essential dietary constituents discovered. *Endeavor* 1: 97-102, 1977.
- 55 SCHELAR, V.M. Thermochemistry and animal metabolism. *J. Chem. Educ.*, 41: 226-9, 1964.

- 56 SCHILLER, J. Physiology's struggle for independence in the first half on the 19th century. *Hist. Sci.*, **7**: 64-87, 1968.
- 57 SCHWARTZ, G. & BISHOP, P.W. *Moments of discovery*. New York, Basic Books, 1958. v. 2, p. 624-7.
- 58 TODHUNTER, E.N. Development of knowledge in nutrition. *J. Am. Diet. Assoc.*, **41**: 328-34, 1962.
- 59 VICKERY, H.B. Liebig and proteins. *J. Chem. Educ.*, **19**: 73-9, 1942.
- 60 VICKERY, H.B. & OSBORNE, T.B. A review of hypotheses of the structure of proteins. *Physiol. Rev.*, **8** (4): 393-446, 1928.
- 61 VICKERY, H.B. & SCHMIDT, C.L.A. The history of the discovery of the amino acids. *Chem. Rev.*, **9**: 169-318, 1931.