

EL EXTRACTO ACUOSO DE LA CARNE

Dr. Luis Echenique ¹

Dr. Walter García Vidal ²

Dr. Washington Batro ³

Colaboradores:

Dra. María H. Baranda ⁴

Dr. J. Eduardo Ferrer ⁵

RESUMEN

El presente trabajo trata de recoger una parte de la labor realizada en el Instituto con motivo del desarrollo de una técnica de extracción acuosa de la carne. La acción precipitante del calor a 45°C, del alcohol a 68°, 83° y 96° y del calor y el alcohol a 68° combinados, sobre las proteínas disueltas en el extracto acuoso, demuestran

que en la carne en la etapa de maduración, puede observarse una relativa estabilidad y que la acción combinada del calor y el alcohol tiene un mayor efecto floculante que los otros factores.

El estudio del E.S. del extracto acuoso así como el estudio del extracto seco menor —E.S.M.— después de la eliminación de las proteínas por ebullición, amplían la base programada de trabajos, puesto que además de las referencias que aportan directamente con sus resultados, posibilitan la realización de una técnica sobre determinación comparada de los cuerpos biuréticos existentes en el filtrado procedente del extracto acuoso, con una solución de peptona al 1 %.

- 1) Jefe del Laboratorio de Microbiología Industrial del Instituto de Industria Animal.
- 2) Jefe de Repartición del Instituto de Industria Animal. Prof. de la cátedra Tecnología de la Carne.
- 3) Ex-Asistente de la cátedra Tecnología de la Carne.
- 4) Ayudante de la cátedra Tecnología de la Carne.
- 5) Ayudante de la cátedra Tecnología de la Carne.

INTRODUCCIÓN

El hecho de que la carne sea un alimento tan fácilmente perecedero explica el interés creciente por obtener mayores conocimientos de su evolución y por tanto, todo aquello que afecte el cuidado, la manipulación, la conservación y la higiene, considerados factores fundamentales en el mantenimiento de sus caracteres esenciales. Por ello, la investigación en el terreno de cualquiera de los factores mencionados, merece un lugar destacado, gracias a la cual, en los últimos años, han podido lograrse brillantes conquistas, como lo afirman reputados hombres de ciencia.

En este plano espiritual y al amparo de entrevistas posibles, desde diferentes ángulos, en el Instituto de Industria Animal, los docentes hemos dedicado nuestra atención al estudio de la evolución post-mortem, deteniéndonos en el ensayo de técnicas que en determinado momento puedan ayudar a los profesionales en ejercicio de funciones delicadas, enriqueciendo su capacitación.

Parte del trabajo realizado en el Instituto se da en el desarrollo de esta nota y está relacionado con la influencia del calor, con la influencia del alcohol y con la influencia del calor y el alcohol combinados sobre el extracto acuoso de la carne tomado en el período de maduración y su posterior evolución hacia la descomposición. Estos factores que ensayamos con la finalidad de pulsar la estabilidad o inestabilidad del extracto acuoso, van seguidos de técnicas de determinación del extracto seco en los filtrados, así como del estudio de la reacción del biuret.

Como se sabe, el músculo, después de faenado el animal, evoluciona de tal manera que se pueden distinguir tres etapas o sean la de irritabilidad, la de rigidez cadavérica y la de maduración. Esta última etapa y la que sigue en el tiempo hasta su desnaturalización debido a procesos microbianos han sido tomados en cuenta a los efectos de constituir la base del extracto acuoso.

Dos investigadores franceses, Rozier y Rosset (1, 2, 3) en estudios detallados de diferentes aspectos de los conocimientos, dicen que en los últimos cinco años, se han hecho grandes adelantos, tomando como base, la histología, la físico-química y la bioquímica del músculo.

Concretamente dicen: "La evolución de la carne es un fenómeno complejo cuyo análisis necesita el conocimiento de nociones de física, de química, de bioquímica." Refiriéndose después al mecanismo de la maduración dicen:

"Estos son, sin duda, los menos bien conocidos a pesar de la importancia que ellos tienen desde el punto de vista tecnológico, puesto que ellos determinan los tres caracteres esenciales de una carne, a saber: ternura, succulencia y sabor. Estos mecanismos entran en el cuadro general de los procesos autolíticos amicrobianos de los tejidos animales. Estos, el músculo en particular, poseen enzimas proteolíticas de las que la actividad no se manifiesta sino a cierto pH. Las enzimas musculares no tratan sino después de la acidificación".

El extracto acuoso obtenido de la carne madurada, pero sin salir de la etapa de madurez, es desde luego, diferente del que se obtiene cuando la carne sobrepasa el anterior estado y entra en descomposición.

Mientras el extracto acuoso del primer estado del músculo es amicrobiano y mantiene en solución los productos provenientes de la autólisis a expensas de enzimas proteolíticas, el extracto de carne en descomposición tiene como base la destrucción proteica con la intervención de abundante flora microbiana como elemento extraño que desarrolla una profunda actividad fermentativa.

Tomando esto en cuenta debemos pensar que tanto uno como otro extracto tienen en solución proteínas y sus derivados por hidrólisis. Por ello, todo conocimiento sobre este punto lo consideramos muy importante para el estudio que realizamos.

Así Calvet (4) describiendo las proteínas derivadas dice que son solubles en

agua los aminoácidos, los péptidos sencillos, los polipéptidos, las peptonas y las proteosas. Y ocupándose de las proteínas sencillas dice que: "las albúminas son solubles en agua y en los electrolitos diluidos, que son coagulables por el calor".

Rondoni (5) ocupándose de las proteínas dice: "Las soluciones de proteínas tienen los caracteres de los coloides emulsoides; por lo tanto, poseen una tensión superficial muy inferior a la del agua y una atracción interna o viscosidad mucho mayor. Son pues, coloides reversibles o hidrófilos. Muchos procesos de precipitación de las proteínas son fácilmente inteligibles con esta definición."

Mas adelante, el mismo autor dice: "que el albuminoide con partículas descargadas o proteína neutra se parece a los coloides suspensoides (se dice también que está desnaturalizada) y puede precipitar fácilmente por el calor o el alcohol. La coagulación o precipitación térmica se verifica a temperaturas diversas según los distintos albuminoides. Estos en solución, hasta por la simple conservación de sus soluciones acaban por desnaturalizarse, y dada la presencia casi constante de electrolitos, por precipitar. En realidad, el calor no hace más que acelerar este proceso, etc., etc."

Laguna (6) estudiando las proteínas simples menciona las albúminas y las globulinas y establece lo siguiente: "Las características de solubilidad, por lo menos en Medicina, han ido dejando su lugar a sus "constantes de movilidad en un campo eléctrico", de manera que se consideran propiamente albúminas las especies solubles en agua que tienen determinada movilidad electroforética y las globulinas, las especies que en su mayoría son insolubles en agua y que tienen movilidad electroforética distinta de aquellas."

Hablando después, de las proteínas derivadas dice: "Quizás las proteínas coaguladas representan una forma más comprensible como sucede con los productos insolubles formados por la acción del ca-

lor, del alcohol, de las altas presiones, etc., etc."

Grau (7) en su obra sobre la Carne y Productos Cárnicos dice que: "Las proteínas musculares se dividen en solubles e insolubles. A las primeras pertenecen el miógeno, albúmina que se disuelve en agua y las globulinas X solubles en soluciones salinas. Entre los insolubles se incluyen las denominadas proteínas estructurales que son responsables de la forma externa de los músculos. Entre ellos se encuentran la actina y la miosina, etc."

Lawrie (8) en su obra Ciencia de la Carne al hablar de las proteínas del músculo dice que pueden clasificarse en proteínas sarcoplásmicas solubles en agua o soluciones salinas diluidas que según un cuadro que adjunta, representan el 6 % y están constituidos por miógeno, globulinas, mioglobina y hemoglobina. En la clasificación incluye proteínas solubles en soluciones salinas concentradas y proteínas insolubles en soluciones salinas concentradas.

Pasando a otro punto de interés como antecedente de nuestro trabajo, queremos decir que Rozier y Rosset (1) al realizar el estudio bioquímico del músculo de los mamíferos adultos establecen que el agua constituye el 75,5 %, las proteínas el 18 %, los lípidos el 3%, el glucógeno y productos de su hidrólisis el 1,18 %, el nitrógeno no proteico el 1,57 %, las sustancias fosforadas solubles el 0,2 % y los metales el 0,43 %. Estos autores encuentran un 6 % de proteínas solubles en agua y lo obtienen por presión de un trozo de carne que en esas condiciones da un jugo llamado jugo de presión o "fracción miógena".

Grau (7) dice que "el tejido muscular contiene alrededor del 76 % de agua" y por tanto 24 % de sólidos.

Lawrie (8) dice que "En términos generales puede decirse que la carne contiene aproximadamente un 75 % de agua, un 18 % de proteína, un 3,5 % de sustancias no proteicas solubles y un 3 % de grasa".

Brandly y otros en su obra "Higiene de la Carne" (9) establecen: "El tejido mus-

"cular estriado está formado aproximadamente por 75 % de agua y 25 % de sólidos. Aproximadamente 4/5 partes de los sólidos son proteínas y el resto lo forman 'extractivos' y sólidos inorgánicos. De acuerdo con Mitchell, el contenido proteico tiende a ser más elevado en el músculo liso que en el músculo estriado".

Hemos querido hacer el enfoque de nuestro estudio con referencia a los elementos que estimamos son importantes a considerar puesto que como lo decíamos anteriormente, el extracto acuoso de la carne con sus elementos en solución será tratado con alcohol a distintas graduaciones, con el calor a determinada temperatura o con la acción combinada de estos elementos.

El extracto acuoso que estudiamos, previamente filtrado por papel común, floccula cuando se trata por el baño-maría hirviente. El flocculado queda en el filtro si es nuevamente sometido a la filtración y en este caso sólo nos interesa por ahora, para la obtención de datos, el líquido filtrante.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el Instituto disponemos de los elementos necesarios para el estudio que desarrollamos sobre las dos etapas de la evolución de la carne: la de maceración y la posterior a ésta o sea la de alteración.

La técnica que seguimos es la siguiente:

Obtención del extracto acuoso: en un vidrio reloj pesamos cinco gramos de carne desprovista de grasa, tendones y aponeurosis. La picamos o cortamos en pequeños trozos que ponemos en un mortero. Le agregamos diez mililitros de agua destilada y hacemos lo mejor posible el triturado. Esperamos un momento y volvemos a triturar bien en una operación que repetimos varias veces. La finalidad es de que el jugo de la carne pase hacia el agua y que ésta penetre en ella lo mejor posible a los efectos de asegurar el intercambio de los elementos solubles. Después agregamos otros diez mililitros de agua destilada y durante quince minutos repetimos la tri-

turación para intercambiar nuevamente el pase de los elementos solubles del músculo hacia el medio acuoso. Después filtramos por papel común y tomamos el ph al filtrado, cosa que puede hacerse con potenciómetro o papel adecuado. Nosotros hemos usado el papel para las determinaciones.

Esta es la técnica que hemos usado para la obtención del extracto acuoso de la carne madurada y también para la obtención del extracto de carne que envuelto en nylon o polietileno hemos conservado en heladera a 5°C mientras el proceso microbiano va progresivamente alterando su estructura y dándonos ph más altos hasta llegar a la zona alcalina.

TRATAMIENTO DEL EXTRACTO ACUOSO

Como hemos dicho anteriormente, el extracto acuoso puesto en tubo de ensayo ha sido tratado por el calor, por el alcohol o por la combinación de estos dos elementos, con la finalidad de observar la estabilidad de las sustancias en solución o su posible flocculación.

TRATAMIENTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA CARNE MADURADA POR EL CALOR

El extracto acuoso de la carne tiene entre otras sustancias solubles en el agua, cierta cantidad de albúmina que precipita por efecto del calor cuando éste llega a determinada temperatura que según autores como Rondoni (5) la sitúa entre 46°C y 65°C. Este autor, hablando de las proteínas musculares dice textualmente: "La temperatura de coagulación es de 46°C - 50°C para la miosina y de 55°C - 65°C para el miógeno; pero, la coagulación espontánea se verifica también a temperatura ambiente".

Gray ya mencionado (7) hablando de las proteínas musculares dice que: "La desnaturalización por la acción del calor ya se inicia con sólo elevar la temperatura ligeramente. A 40°C ya se producen en las proteínas de la carne procesos irreversibles que no pueden esclarecerse con

"facilidad debido a la diversidad de sustancias que entran en la composición de las proteínas musculares. Las albúminas se tornan cada vez más insolubles en agua, hasta que a los 60°C quedan completamente desnaturalizadas". Menciona después el alcohol como producto desnaturalizado de los mismos.

Lawrie, también ya mencionado (8), ocupándose de un problema parecido, pero no idéntico al estudiado por nosotros, como lo es la extracción salina, dice que: "Cuando se hace una extracción salina de las proteínas sarcoplásmicas, puede verse que a un ph 4,8 a 5,2, la precipitación es máxima. También puede verse que a temperaturas de 37°C a 45°C el ph final elevado no protege a las proteínas sarcoplásmicas de la precipitación (Scopes 1964). Por tanto, durante la glucólisis post mortem se producirá cierta precipitación de proteínas sarcoplásmicas, incluso aunque se alcance un ph final normal (próximo a 5,5)".

Indudablemente, para nosotros resultaba interesante conocer la respuesta del extracto acuoso de la carne al calentamiento, después de lo que exponen los profesores mencionados y también debemos agregar que uno de nosotros al publicar un trabajo (10) sobre la influencia de la temperatura sobre la prueba del alcohol realizada en la leche, demostraba que las leches recién ordeñadas eran más sensibles que después de varias horas, en virtud de la más alta temperatura, 37°C-38°C, circunstancia favorable a la precipitación de la caseína por el alcohol.

Tomando en consideración estos antecedentes resolvimos trabajar a la temperatura de 45°C en baño de maría, poniendo cada vez un tubo de ensayo conteniendo seis a ocho mililitros del filtrado obtenido según la técnica expuesta y tapado con algodón.

Una muestra de filtrado de carne bovina con un ph 5,4 se pone a 45°C y se observa periódicamente hasta que flocula en grandes flóculos a los 85'.

Otra muestra de filtrado de carne bovina con un ph 5,2 precipita a los 50' de calentamiento en el baño maría a 45°C.

Una muestra de carne bovina fresca, cuyo filtrado tiene un ph de 5,4 precipita a los 40' de calentamiento al baño maría a 45°C. Se detiene durante cinco minutos más a 45°C y se nota aumento del precipitado y también del tamaño de los flóculos.

Un filtrado de carne bovina con un ph 5,2 precipita a los 27' de estado a 45°C.

Otra muestra de filtrado de carne bovina con un ph de 5,3 precipita a los 60' de estado al B.M. a 45°C.

Una muestra de carne bovina congelada se trabaja después de tomar la temperatura ambiente. Su filtrado tiene un ph de 5,4. Precipitó a los 70' de B.M. a 45°C.

Una muestra de carne ovina congelada se trabaja también después de tomar la temperatura ambiente.

El ph de su filtrado es de 5,8 - 6. Flocluló a los 35' de B.M. a 45°C.

Otra muestra de carne bovina congelada se trabaja igual que las anteriores. El filtrado tiene un ph de 5,4. Flocluló a los 30' de B.M. a 45°C.

Una muestra de carne bovina cuyo filtrado tiene un ph de 5 resulta de interés singular al llevarlo el filtrado al B.M. a 45°C. Se observó durante 75' sin que hubiera floclulación. Había formado un gel. Se elevó la temperatura del B.M. a 75°C y también mantuvo un gel. Llevamos el B.M. a ebullición y entonces sí flocluló.

El filtrado de otra muestra de carne ovina con un ph de 5,8 flocluló a los 12' de B.M. a 45°C.

El filtrado de otra muestra de carne ovina pero esta vez de carne congelada, tiene un ph 5,8. Se lleva a B.M. a 45°C y durante 30' de observación no flocluló.

El filtrado de otra muestra de carne bovina congelada, con un ph 5,4 se lleva al B.M. a 45°C y durante 30' de observación no flocluló.

Tenemos en nuestro protocolo una cantidad de muestras analizadas que responden al cuadro expuesto anteriormente y

además tenemos también una cantidad de observaciones que hemos dado por terminadas cuando a los 30' de exposición a la temperatura de 45°C no han floculado.

Debemos hacer notar que en todos los casos a los que hacemos alusión, las pruebas de calentamiento han sido hechas enseguida de obtener el filtrado y de ninguna manera ha habido una exposición de la solución proteica a las posibilidades de precipitación espontánea a la que alude el Profesor Rondoni.

De un modo general, el filtrado atraviesa rápidamente el filtro de papel; tiene un color rosado claro, con ausencia de aspecto lechoso —hecho común en los filtrados de carne en descomposición y los flóculos son de tamaño mediano a grandes, ofreciendo un panorama de total claridad para su apreciación.

Los casos examinados han necesitado por lo menos 27' de calentamiento al B.M. a 45°C (salvo un caso ovino con 12') siendo frecuentes 40', 50' y 60'. Estos hechos parecerían revelar que en las condiciones de las experiencias, los filtrados con las sustancias nitrogenadas en solución, lejos de ofrecer una marcada propensión a la precipitación, están dotados de una relativa estabilidad. Además, en un caso hubo formación de gel, que fue destruido únicamente con la temperatura de ebullición.

TRATAMIENTO POR EL CALOR DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA CARNE EVOLUCIONANDO HACIA LA DESCOMPOSICION

Como dijimos anteriormente, las muestras de carne tanto bovinas como ovinas, han sido puestas para seguir su evolución, en heladera a una temperatura de 5°C, envueltas en nylon o polietileno y cada cierto tiempo hemos retirado una parte con el objeto de ser trabajada, aplicando la misma técnica que para la carne madurada. En general, las muestras utilizadas en esta etapa de la evolución corresponden a un trozo común que fue analizado en la primera etapa o sea de maduración y por tanto tenemos todos los antecedentes des-

de el momento mismo de la iniciación de la experiencia.

Damos a continuación algunos resultados obtenidos.

Se hace el filtrado de una muestra de carne bovina guardada en heladera durante 21 días. Tenemos un ph 6 a 6,1. Lo ponemos a baño-maría a 45°C durante dos horas y treinta minutos y lo retiramos sin flocular.

Se hace filtrado de una carne bovina que estuvo 26 días en heladera. Pertenece a la misma carne anterior. Tiene ph 6. Se pone en tubo al B.M. a 45°C y después de 90' se retira sin flocular.

Una tercera muestra de esta misma carne bovina se trabaja a los 30 días de conservación en la heladera. Tiene un ph 6. Se pone al B.M. a 45°C y hasta los 80' no hay floculación pero, a los 90' aparecen pequeños coagulitos.

Se hace filtrado con otra muestra de carne bovina conservada en heladera envuelta en polietileno.

Tiene un ph 5,7. Se pone en tubo al B.M. a 45°C y durante una hora y veinte minutos no floculó.

Esta carne estuvo cinco días en la heladera a 5°C y, pertenece a una muestra que anteriormente fue analizada y con un ph 5,4 floculó a los 40'.

Tres días después se trabaja otra muestra de la misma carne y su filtrado con un ph 6 no floculó en una hora y treinta minutos de estada en el B.M. a 45°C.

Una muestra de carne bovina conservada en heladera durante dieciocho días de un filtrado con ph 6,4 se pone al B.M. a 45°C, después de 30' se retiró sin flocular.

Se hace filtrado con carne bovina conservada durante veinte días en heladera. Tiene un ph 6. Floculó a los 59' de estada en B.M. a 45°C. Este tiempo es algo mayor del doble que empleó el filtrado de la carne originalmente o sean 27' para flocular.

Una muestra de carne bovina conservada en heladera durante 22 días es trabajada. El filtrado tiene un ph 6. Se lleva al B.M. a 45°C y floculó a los 47'.

Cinco días después repetimos la experiencia con otro trozo de esta misma carne. El filtrado da un ph 6,5 y puesto al B.M. a 45°C tiene que ser retirado a los 90' sin flocular.

Una muestra de otra carne bovina, conservada durante 25 días da un filtrado cuyo ph es de 6,7 a 7. Llevado al B.M. a 45°C no floculó en 90' de observación.

El filtrado de otra muestra de carne bovina conservada en heladera da un ph 6,2, se lleva al B.M. a 45°C y se retira sin flocular después de una hora y quince minutos de observación.

Se han hecho también algunos ensayos con carne ovina conservada en las mismas condiciones que la carne bovina y cuyos resultados no ofrecen diferencias sustanciales.

TRATAMIENTO DEL EXTRACTO ACUOSO POR EL ALCOHOL

El extracto acuoso de la carne obtenida de acuerdo con la técnica que hemos descrito, tiene cierta tendencia a conservar el estado de solución; pero como lo hemos explicado en el capítulo referente a su tratamiento por el calor, es capaz de precipitar.

Cuando hemos debido abordar el estudio del efecto del alcohol sobre el extracto acuoso y sobre todo en la forma y graduaciones que lo hacemos, nos encontramos solamente con referencias generalizadas en materia bibliográfica y que resultan insuficientes. Así Arthus (11) dice que el alcohol precipita las albúminas.

Calvet (4) hablando de la "desnaturalización de las proteínas" establece que "es debida a la acción de los ácidos, de los álcalis, del alcohol, etc., etc."

Laguna (6) cuando trata las proteínas coaguladas dice: "Presentan una forma más comprensible como sucede con los productos insolubles formados por la acción del calor, del alcohol, etc., etc.". Y cuando habla de la estabilidad de los sistemas coloidales dice: "En numerosos sistemas coloidales las partículas dispersas tienen la propiedad de atraer a las moléculas del solvente; en estas condiciones

"forman los llamados coloides liófilos a distinción de los coloides cuyas micelas no atraen a las moléculas del solvente y los cuales, por esta razón se denominan liófilos. Cuando el solvente es el agua se denominan hidrófilos e hidrófobos respectivamente".

"En el caso de las proteínas, sus partículas o micelas tienen características hidrófilas marcadas de manera que siempre están rodeados de una capa de moléculas de agua, la cual le permite a las partículas sostenerse separadas e impide su agregación y precipitación; todos los factores que tienden a destruir esta cubierta de moléculas de agua favorecen la precipitación de las partículas coloidales, como por ejemplo el alcohol, que tiene acción deshidratante". El subrayado es nuestro.

El Profesor Rondoni (5) dice: "Además de estos procesos de precipitación de las proteínas, debidos a los electrolitos (ácidos, bases y sales) son muy importantes los ocasionados por el alcohol y otros cuerpos dotados de la notable facultad de disminuir la tensión superficial del agua en que están disueltos, por lo cual tienen tendencia a concentrarse en la superficie de las partículas proteicas, y dada su pequeña constante eléctrica, a descargarlos y como consecuencia a hacerlos flocular".

El Profesor Holleman (12) dice: "La adición de alcohol a la disolución acuosa de una proteína determina la precipitación de esta sustancia inalterada; el alcohol concentrado los coagula y lo mismo ocurre cuando se hierven con agua."

El Profesor Niemeyer (13) dice que: "Entre los agentes desnaturalantes más conocidos podemos citar el calor, los ácidos y álcalis, muchos solventes orgánicos como el alcohol y la acetona, etc., etc."

Este mismo autor cuando habla de solventes orgánicos dice que: "El alcohol etílico y otros solventes orgánicos solubles en agua, como la acetona y diversos alcoholes alifáticos son también capaces de precipitar proteínas de sus soluciones acuosas posiblemente por un mecanismo

"de deshidratación como en el caso anterior." Y después agrega: "El poder desinfectante de las soluciones diluidas de alcohol a la temperatura ordinaria se atribuye precisamente a su poder coagulante de las proteínas bacterianas."

Hablando de las separaciones de las proteínas del plasma dice: "Si se trata el plasma por medio de concentraciones crecientes de estanol a baja temperatura, según los principios de Cohn, se pueden separar nuevas fracciones con bastante diferenciación entre ellas."

Después agrega: "En la denominada fracción IV-4 obtenida por precipitación con 40 por ciento de alcohol a pH 5,8 hay algunos A y B globulinas, además de un poco de albúminas", y después señala que "las enzimas pueden precipitar sin desnaturarse por el alcohol si se opera a temperaturas bajo cero."

Desde luego que es muy importante el mecanismo de la precipitación coloidal de las proteínas señalado por los profesores Laguna y Rondoni así como las referencias hechas al mismo problema por los Profesores Holleman y Niemeyer y tienen indudablemente mucho que ver y por eso los transcribimos, en el comportamiento que el alcohol a distintas graduaciones tiene sobre el extracto acuoso de la carne que estudiamos.

Las albúminas solubles en el agua destilada tienen una marcada afinidad por la misma y como lo dijimos en el capítulo anterior, en nuestras experiencias se describe una en que el calentamiento a 45°C del filtrado acuoso produjo un gel muy estable. Con respecto a este punto, es interesante destacar lo que dice Calvet (4): "Los sistemas coloidales liófilos presentan el estado de sal, forma que no posee rigidez mecánica (forma líquida); pero, que puede transformarse en gel, forma rígida de consistencia de gelatina cuajada."

Si bien la acción precipitante del calor, lo mismo que la del alcohol poseen antecedentes muy ilustrativos cuando han sido

experimentados en otro tipo de problemas biológicos, encontramos sin embargo, un vacío difícil de llenar cuando pretendemos aplicarlos al contenido proteico del sistema originado por la técnica de obtención del extracto acuoso.

Las pruebas del alcohol con el extracto acuoso de la carne que exponemos en este trabajo, han sido promovidas por el pensamiento puesto en una prueba equivalente que se efectúa en la leche y en la que uno de nosotros ha trabajado con bastante dedicación según las siguientes citas: 14, 15, 16, 17 y 18.

La prueba en la leche se realiza con alcohol a 68°-70° y nuestros primeros ensayos con el extracto acuoso de la carne fueron hechos también con alcohol a la misma graduación. Queríamos ver qué posibilidades presentaba esta prueba en la precipitación de las albúminas del extracto.

En los trabajos sobre la leche citados anteriormente, se demostraba la importancia que además de la acidez —ya conocida— en la precipitación de la caseína, tenía en aquel momento, la relación calcio-fósforo del medio de la reacción, al observarse que el aumento del calcio aumentaba también el efecto floculante del alcohol.

Si bien reconocemos que la composición y equilibrio salino de la leche y el extracto acuoso de la carne son disímiles, queríamos de igual modo saber cuál era la respuesta, a los efectos de orientar la investigación.

Damos estos antecedentes porque en realidad, el estudio inicial con la graduación alcohólica a 68° estuvo inspirada en aquellos trabajos y además porque tuvimos que extenderla a las graduaciones 83° y 96°.

TECNICAS DE LAS PRUEBAS DEL ALCOHOL

Una vez obtenido el filtrado de extracto acuoso, se pone un mililitro en un tubo de ensayo pequeño y se le agrega un mililitro de alcohol a 68°; se hace bien la mezcla y se observa después de ponerlo en una gradilla. Es conveniente tomar la temperatura ambiente del laboratorio donde se realiza el trabajo.

En todos los casos se produce por lo menos, inicialmente, una marcada turbidez. Se procede en la misma forma cuando se utilizan las graduaciones 83° y 96°.

En estas condiciones tomamos el filtrado del extracto acuoso de una carne bovina con un ph 5,4 y lo ponemos a razón de un mililitro en un tubo de ensayo.

Agregamos un mililitro de alcohol a 68°. Notamos opalescencia después de la mezcla y durante dos horas; pero no observamos floculación. El mismo extracto se mezcla en igual proporción con alcohol a 96°: inmediatamente se producen gruesos precipitados que caen al fondo del tubo en un medio de color rosado claro.

Guardamos este extracto durante seis días, en heladera a 5°C, al cabo de los cuales notamos olor a putrefacción y un ph 6.

La prueba del alcohol a 68° da opalescencia, pero no floculado; la prueba con alcohol a 83° da fuerte opalescencia inicial y pequeño precipitado a los 5' y la prueba con alcohol a 96° da rápidamente pequeños precipitados.

Hacemos una nueva experiencia con filtrado guardado en heladera durante cinco días. Tiene un ph 6,2.

Las pruebas con alcohol a 68°, 83° y 96° dan pequeños floculados.

Trabajamos una muestra de carne bovina cuyo filtrado tiene un ph 5,7. La prueba del alcohol a 68° da opalescencia en 20' de observación. La prueba a 83° da pequeños floculados y la prueba a 96° da grandes floculados.

Otra experiencia con carne bovina da un filtrado con ph 5,4: la prueba de alcohol a 68° da solamente turbidez.

Una muestra de carne bovina conservada en heladera, envuelta en polietileno, da un filtrado con ph 5,7. La prueba del alcohol a 68° da sólo turbidez en un período de tres días de observación.

Otra muestra de carne bovina conservada también en heladera, envuelta en polietileno, da un filtrado con ph 6,7 a 7. Tiene fuerte olor a putrefacción. La prueba del alcohol a 68° no da floculación.

Una muestra de carne bovina, picada, da un filtrado con ph 5,4. La prueba del alcohol a 68° no da floculado en un período de observación de 24 horas.

Una carne ovina congelada durante 20 días, da un filtrado con ph 5,8 a 6,2. La prueba del alcohol a 68° da una floculación instantánea.

Una carne bovina, fresca, da un filtrado con ph 5,2. La prueba del alcohol a 68° da un floculado a los 4'.

Una carne bovina conservada, envuelta en polietileno, en heladera, da un filtrado con ph 5,8.

La prueba del alcohol a 68° floculó a los 30'. La temperatura ambiente del laboratorio es de 25°C.

La prueba de este mismo filtrado con alcohol a 95°C floculó un minuto después de hecha la reacción.

Cuando se analizan los resultados obtenidos con pruebas de alcohol a 68°, 83° y 96° se comprueba que a medida que aumenta la graduación, también son más netos los efectos floculantes. Este proceso cobra una nitidez mayor sobre todo cuando los extractos acuosos pertenecen a carnes frescas con ph 5,2 5,4 ó 5,7: el floculado de la graduación 96° es rápido y casi siempre de gran tamaño. Cuando el filtrado ha estado en conservación en heladera o corresponde a una carne que ha sido envuelta en polietileno y conservada igualmente y, cuyo ph llega a 6 ó lo sobrepasa en la carne bovina o es de 6,5, 6,7, ó 7 en la carne ovina, el floculado siempre está presente empleando las graduaciones 83° y 96° y en forma de pequeños copos. En estos casos la graduación 68° puede dar solamente opalescencia.

Otro hecho a destacar es el resultado de las últimas experiencias. En efecto, la graduación 68° da floculados, algunos de ellos instantáneos como el de la carne ovina pero, aquí entra a jugar un nuevo factor que es el de la temperatura.

Las últimas experiencias fueron hechas al terminar el mes de setiembre y de ahí en adelante, cuando la temperatura ambiente del laboratorio era de 25°C más o

menos, mientras que las experiencias anteriores con resultados negativos fueron hechas con temperaturas ambientales entre 15° y 18°C. En realidad, la intervención del factor temperatura en estas pruebas del alcohol sirven como introducción al capítulo siguiente en que los factores precipitantes representados por el calor y el alcohol obran simultáneamente.

TRATAMIENTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA CARNE POR EL ALCOHOL Y EL CALENTAMIENTO A 45°

A medida que íbamos formando criterio con respecto a la acción independiente de factores precipitantes de las proteínas, como el calor y el alcohol, nos dábamos cuenta que sería muy ilustrativo desde distintos puntos de vista, tener algunas referencias sobre la acción simultánea de los mismos sobre el extracto acuoso de la carne. Así fue que abordamos esta parte del estudio del extracto obtenido de acuerdo a la técnica inicialmente descripta.

Una carne bovina, fresca, cuyo filtrado es de 5,4 es trabajada. Un mililitro de filtrado se pone como en ensayos anteriores en tubo de ensayo, le agregamos un mililitro de alcohol a 68°. Mezclamos y ponemos en B.M. a 45°C. A los dos minutos notamos fuerte opalescencia y a los cinco minutos ha floculado. Un tubo con la misma mezcla hace de testigo a temperatura de laboratorio y permanece sin flocular.

Una carne bovina conservada en heladera tiene un filtrado con ph 5,7. La prueba del alcohol a 68° llevada al B.M. a 45°C precipitó a los 5'. Un tubo testigo a temperatura ambiente permanece sin flocular. Tres días después hacemos filtrado con la misma carne. Tiene un ph 5,7 a 6. La prueba del alcohol a 68° llevada al B.M. a 45°C floculó a los 5'. Dejada al B.M. durante 5' más da precipitados mucho más grandes.

Se hacen dos pruebas simultáneas en tubos diferentes con filtrados de carne fresca a ph 5,4 y filtrado de carne conservada a ph 6,4 y alcohol a 68°.

Llevados al B.M. 45°C el tubo de carne fresca floculó a los 5' y el tubo de carne conservada floculó a los 10'. Trabajamos una carne bovina conservada en heladera durante 20 días cuyo filtrado tiene un ph 6. La prueba del alcohol a 68° llevada al B.M. a 45°C floculó a los 10'.

Al día siguiente tomamos una muestra de la misma carne, hacemos filtrado que da un ph 6. La prueba del alcohol a 68° llevada al B.M. a 45°C floculó a los 8'. Al día siguiente repetimos la prueba del alcohol con otra muestra de la misma carne y la floculación se produjo también a los 8'.

Cinco días después trabajamos otra muestra de la misma carne que nos da un filtrado con ph 6,5. La prueba del alcohol a 68° llevada al B.M. a 45°C floculó a los 15'.

Dos días después trabajamos otra muestra de la misma carne. El filtrado da un ph 6,7 a 7. La prueba del alcohol a 68° llevada al B.M. a 45°C floculó a los 25'. Una carne ovina conservada en heladera da un filtrado con ph 7. La prueba del alcohol a 68° llevada al B.M. a 45°C floculó a los 60'.

Trabajamos una carne bovina fresca, cuyo filtrado da un ph 5,2. La prueba del alcohol a 68° llevada al B.M. a 45°C floculó a los 6'.

Una carne bovina conservada en heladera da un filtrado con ph 6,2. La prueba del alcohol a 68° llevada al B.M. a 45°C floculó a los 5'.

Un filtrado conservado en heladera tiene un ph 5,8 a 6. La prueba del alcohol a 68° llevada al B.M. a 45°C floculó a los 30'.

Una carne bovina congelada cuyo filtrado tiene un ph 5,2 nos sirve de base para la prueba del alcohol a 68° llevada al B.M. a 45°C. floculó a los 5'.

Una carne bovina conservada da un filtrado con ph 7. La prueba del alcohol a 68° llevada al B.M. a 45°C floculó a los 10'. Se deja al B.M. 5' más y los floculados aumentan de tamaño.

Tomamos una carne bovina fresca. Hacemos filtrado con ph 5,4. La prueba del alcohol a 68° en B.M. a 45°C da gruesos flóculos a los 5'.

Tres días después otra muestra de la misma carne da un filtrado con ph 5,8. La prueba del alcohol a 68° en B.M. a 45°C flocula a los 3'.

Una carne bovina conservada en heladera da un filtrado con ph 6,2. La prueba del alcohol a 68° en B.M. a 45°C floculó a los 5'.

Una carne ovina da un filtrado con ph 5,8. La prueba del alcohol a 68° en B.M. a 45°C floculó a los 5'.

Una carne bovina, congelada, da un filtrado con ph 5,4 a 5,6. La prueba del alcohol a 68° en B.M. a 45°C floculó a los 5'.

Una muestra de carne bovina conservada en heladera da un filtrado con ph 6,4 a 6,5. La prueba del alcohol a 68° en B.M. a 45°C floculó a los 5'.

Otra muestra de carne bovina conservada en heladera da un filtrado con ph 6,5. La prueba del alcohol a 68° en B.M. a 45°C floculó en 10'.

Otra muestra de carne bovina conservada en heladera da un filtrado con ph 7. Tiene olor a putrefacción. La prueba del alcohol a 68° en B.M. a 45°C floculó en 11'.

Una muestra de carne ovina da un filtrado con ph 5,8. La prueba del alcohol a 68° en B.M. a 45°C floculó a los 4'.

Una muestra de carne ovina envuelta en polietileno fue conservada en heladera y tiene olor a putrefacción, da un filtrado con ph 6,7. La prueba del alcohol a 68° en B.M. a 45°C floculó a los 4'.

Una muestra de carne bovina fresca da un filtrado con ph 5,2. La prueba del alcohol a 68° en B.M. a 45°C floculó a los 4' en grandes precipitados.

Otra muestra de carne bovina envuelta en polietileno fue conservada en heladera. Da un filtrado con ph 6,4. La prueba al alcohol a 68° en B.M. a 45°C floculó a los 9'.

Una muestra de carne bovina conservada en heladera da un filtrado con ph 6,7 a 7. La prueba al alcohol a 68° en B.M. a 45°C floculó a los 19'.

Otra muestra de carne bovina fue conservada en heladera. Da un filtrado con ph 5,8. La prueba del alcohol a 68° en B.M. a 45°C floculó a los 4'.

Como vemos en la exposición protocolar precedente para estudiar el extracto acuoso de la carne con el tratamiento simultáneo del calor y del alcohol, todas las pruebas han sido hechas con alcohol a 68° porque es la graduación ensayada a temperatura de laboratorio en la que se producían resultados positivos y negativos.

Empleando la temperatura a 45°C al baño-maría, todas las pruebas con alcohol a 68° se han hecho positivas y por tanto, el efecto floculante del alcohol sobre las albúminas de la carne, disueltas en el agua del extracto, ha resultado eficientemente aumentado y como ya lo habíamos insinuado al examinar los ensayos a temperatura de laboratorio cuando ésta llegaba a 25°C se había notado una diferencia apreciable que ahora se confirma definitivamente.

Con respecto a los floculados, vemos que las carnes frescas en estado de maduración, dan extractos acuosos con tendencia a la precipitación en gruesos copos en un medio rosa claro mientras que los extractos de carnes en estado evolutivo hacia la descomposición dan precipitados con tendencia hacia los pequeños copitos en un medio turbio que a veces resulta casi lechoso.

Si tomamos en consideración el tiempo empleado en la reacción, vemos que es evidente la regularidad en los resultados de los extractos de la carne madurada no pudiendo decirse lo mismo de los extractos de la carne evolucionando hacia la putrefacción.

Sin embargo, en algún caso, ha podido observarse que muestras pertenecientes a una misma carne iban dilatando el tiempo de floculación a medida que los exámenes hechos con tres o cuatro días de diferencia acusaban también una mayor alteración.

SINTETIZANDO:

Con finalidades de estudio de mayor alcance hemos efectuado en el Instituto una serie de ensayos y trabajos conducentes a la obtención de resultados comparativos de tres factores determinantes de la floculación de las proteínas existentes en el extracto acuoso de las carnes bovinas y ovinas: el calor a 45°C en B.M., el alcohol a las graduaciones de 68°, 83° y 96° a temperatura ambiente y el alcohol a 68° a una temperatura de 45°C.

Podemos sintetizar algo de lo que consideramos más importante como logro de lo que nos habíamos propuesto, diciendo que el filtrado del extracto acuoso de la carne madurada tiene cierta estabilidad o bastante estabilidad como para resistir cierto tiempo el efecto floculante del calor a 45°C actuando aisladamente; que el alcohol demuestra acción creciente de su efecto floculante a medida que aumenta la graduación; y por último, que la acción combinada del alcohol y el calor sobre el extracto acuoso de la carne tiene un efecto floculante marcadamente superior a los anteriores.

Habiendo terminado la exposición sobre el trabajo realizado alrededor de los tres factores de acción floculante de las proteínas presentes en el extracto acuoso de la carne, pasamos ahora, como lo anunciamos anteriormente, a tomar en consideración parte de lo que hemos hecho para enfocar aspectos relacionados con el conocimiento de los valores del contenido de humedad de la carne, de materia seca de la misma, del extracto seco, del extracto que venimos estudiando, del extracto seco obtenido después de llevarlo a ebullición y por último de la reacción del biuret en el contenido del último filtrado.

El extracto acuoso de la carne y su extracto seco

Los conocimientos que el extracto acuoso de la carne nos iba dando a medida que adelantaban las investigaciones de la floculación determinada por los tres factores es-

tudiados, nos permitieron abordar la posibilidad de saber cómo era el extracto seco, su peso y algunos caracteres de su contenido y por tanto la posibilidad también de que éstos nos dieran mayor base o amplitud para la prosecución del programa de trabajos que veníamos realizando.

Pero antes de entrar al estudio del E.S. del extracto acuoso de la carne, nos pareció importante conocer el E.S. total de la carne que trabajábamos. Para esto, hicimos algunas determinaciones del E.S.T. de acuerdo con las técnicas conocidas sobre 10 gramos, en placa de Petri que era llevada a la estufa y mantenida a una temperatura de 102°C hasta que dos pesadas sucesivas fueran coincidentes.

Chaveau y Arloing (19) dicen que la carne de mamíferos tiene un 75 % de agua y 25 % de materia seca. Rozier y Rosset (1, 2, 3) dan para la carne un 75,5 % de agua y un 24,5 % de materia seca. Bartels (20) dice que el contenido total de agua en el músculo fresco asciende aproximadamente al 75 %; nosotros coincidimos en general con los autores mencionados, aunque en algunas de las determinaciones se notan diferencias que se distancian de los promedios referidos.

Damos a continuación un cuadro con los porcentajes de agua y materia seca —M. S.— que hemos encontrado en carnes bovinas y ovinas en la etapa de maduración

Muestra	Ovina	Bovina	Humedad	Materia seca
Nº				
1		Bovina	75%	25%
2		Bovina	74,62%	25,38%
3		Bovina	73,20%	26,80%
4		Bovina	72,30%	27,70%
5		Bovina	74,80%	25,20%
6		Bovina	74,80%	25,20%
7	Ovina		74,30%	25,70%
8	Ovina		74,55%	25,45%
9	Ovina		72,20%	27,80%

La carne bovina Nº 4 era de músculos glúteos.

La carne ovina Nº 9 era de la pierna (músculos gemelos).

Promedio de nueve determinaciones: 26 % M.S.

El extracto acuoso de la carne que venimos estudiando ha sido utilizado para determinar el extracto seco E.S. Procedemos así: Una vez que se ha desarrollado la técnica de obtención del extracto acuoso como hemos establecido al iniciar el trabajo, filtramos por papel de filtro común. En este filtrado, después de tomar el ph determinamos el peso del E.S. poniendo en un crisol previamente tasado, 20 mililitros del mismo.

El crisol con los 20 mililitros de filtrado, es llevado a una estufa a 70°-80°C hasta evaporación del líquido. Inmediatamente la estufa es puesta a una temperatura de 102°C y ahí permanece el crisol hasta que dos pesadas sucesivas sean coincidentes.

Damos a continuación un cuadro con los pesos de los extractos secos de los extractos acuosos filtrados pertenecientes a carnes maduradas.

<i>Extracto Seco</i>	<i>Bovino</i>	<i>% de filtrado</i>
<i>E.S.</i>		
1	Bovino 1gr.200	"
2	Bovino 0gr.900	"
3	Bovino 0gr.900	"
4	Ovino 1gr.	"
5	Ovino 1gr.	"

Las cinco muestras de E.S. suman 5 gramos o sea un promedio de un gramo.

Nosotros hemos visto anteriormente que un detallado trabajo pone de manifiesto la acción precipitante de varios factores; pero uno de ellos, el calor a 45°C nos interesa ahora, por cuanto elevando la temperatura, nos proponemos restar elementos que precipitan, del peso del E.S. recién expuesto en el cuadro sobre resultados en 100 mililitros de filtrado del extracto acuoso de la carne. Además, era también lo que adelantábamos al iniciar este capítulo de la investigación.

Cuando ponemos el extracto acuoso filtrado, en un tubo de ensayo o en un Erlhenmeyer que tapamos con algodón y llevamos a la ebullición, se produce un fuerte precipitado. El filtrado subsiguiente a la ebullición tiene todas las sustancias que contribuyen al peso del E.S. dado en el cuadro anterior, menos aquellas que han

precipitado por el calor. El filtrado acuoso obtenido según técnica que venimos dando, se pone entonces en un Erlhenmeyer que se tapa fuertemente con algodón. Aplicamos el mechero de gas bajo tela metálica y se lleva a ebullición suavemente evitando que la espuma moje el tapón. Esta operación la repetimos tres veces, dejando que la espuma se rompa y descienda a nivel del líquido. Enfriamos bien y filtramos en filtro común.

Veinte mililitros de este filtrado son puesto en un crisol previamente tasado y llevamos a la estufa a 70°-80°C hasta total evaporación del líquido. Después procedemos como en el otro E.S. Llevamos la estufa a 102°C hasta que dos pesadas sucesivas sean coincidentes. A este extracto seco más liviano que el anterior le llamamos extracto seco menor E.S.M.

Damos a continuación un cuadro con los resultados del extracto acuoso de la carne madurada una vez que ha sido llevado a temperatura de ebullición enfriado, filtrado y puesto en crisol para obtener el E.S.M.

EXTRACTO SECO MENOR — E.S.M. BOVINO

		<i>% de filtrado</i>	
1	0gr.850	"	
2	0gr.750	"	
3	0gr.950	"	Promedio de las
4	0gr.750	"	ocho muestras =
5	0gr.857	"	0gr.753,5
6	0gr.600	"	
7	0gr.600	"	
8	0gr.666	"	

Como decíamos, este extracto es menor que el anterior, por eso nos parece interesante dar algunos ejemplos que acusan esta diferencia.

DIFERENCIA ENTRE E.S. Y E.S.M. EN EL BOVINO

	<i>E.S.</i>	<i>E.S.M.</i>	<i>Diferencia por 100 de filtrado</i>
1	1gr.200	0gr.857	0gr.343
2	0gr.900	0gr.600	0gr.300
3	0gr.900	0gr.600	0gr.300
4	1gr.	0gr.666	0gr.334

*El promedio de la diferencia es de
0gr.319*

En la carne ovina hemos determinado también el E.S.M.

Damos a continuación un cuadro.

Ovino	E.S.M.	% de filtrado	Promedio
1	Ogr.800	"	Ogr.790
2	Ogr.850	"	
3	Ogr.810	"	
4	Ogr.700	"	

En una sola muestra ovina hemos obtenido la diferencia entre el E.S. que era de un gramo y el E.S.M. que era de Ogr.700 le queda Ogr.300.

Los resultados de los extractos secos E.S. y E.S.M. que se han expresado en los cuadros anteriores arrojan valores diferentes por la intervención de un nuevo factor como el calor a temperatura de ebullición para obtener el filtrado menor. Mientras que el filtrado que da el E.S. tiene en solución sustancias que se precipitan por el calentamiento a ebullición, el E.S.M. ya no los tiene puesto que han quedado en el filtro.

El filtrado destinado anteriormente a la determinación del E.S.M. tiene sustancias no precipitables por el calor, como aminoácidos, polipéptidos, peptonas y proteosas, algunas de las cuales en cambio poseen elementos que le son comunes y sirven para identificarlos por la reacción del biuret. Por esta causa nosotros hemos preferido un filtrado desprovisto de albúminas siempre presentes en el extracto acuoso de la carne y que según los resultados que hemos dado, el conjunto de cuerpos floculantes por el calentamiento representa más o menos la tercera parte del E.S. del primer filtrado. Esto nos hubiera dificultado enormemente la posible comparación de valores de sustancias biuréticas si no hubiéramos eliminado una parte previamente desde el momento que pretendemos utilizar esta reacción para seguir, si es posible, la evolución de la carne desde la maduración hacia la descomposición identificando o cuantificándolos en la parte más baja de la escala de la hidrólisis de las sustancias proteicas.

LA REACCION DEL BIURET

Refiriéndose a la reacción Biuret, dice Rondoni (5):

"El biuret es un cuerpo que se obtiene
"calentando urea seca, por condensación
"de dos moléculas de ésta y eliminación
"de amoníaco. Este cuerpo y como ha demostrado Schiff, todas las combinaciones
"de constitución amídica con dos grupos
"amídicos unidos a distintos átomos de
"carbono, da en solución fuertemente alcalina una reacción coloreada característica con las sales de cobre o de otros metales. Se comprende que también se obtendrá esta reacción con las proteínas, las cuales contienen grupos amídicos, etc., etcétera."

"La reacción se practica alcalinizando fuertemente la solución proteica (o de peptona o de otros cuerpos que contengan el grupo del biuret) con hidrato sódico o potásico y añadiendo después una gota de sulfato de cobre muy diluido: se obtiene un color violeta o rojo que aparece lentamente en frío, y a veces con más rapidez si se calienta de una manera moderada."

El mismo autor dice: "Se han definido comúnmente con el nombre de albumosas (o proteosas) y de peptonas una serie de derivados proteicos considerados productos de desintegración incompleta y por lo tanto de molécula bastante grande de aún intermediarias entre las proteínas y los aminoácidos o productos terminales de la escisión de los albuminoides. Las albumosas estarían caracterizadas por dar, como las proteínas, la reacción del biuret; pero, no precipitan por el calor: habrían pues perdido las propiedades eminentemente coloidales de las proteínas aunque conservarían ciertas agrupaciones atómicas características. Tampoco las peptonas coagulan por el calor y dan siempre la reacción del biuret; pero, pueden distinguirse de las albumosas, según Kühne porque no precipitan al saturar sus disoluciones con sulfato amónico, que por el contrario precipita las albumosas."

Calvet (4) hablando de las proteínas derivadas dice: "amino-ácidos: Son las moléculas o eslabones fundamentales que, unidos entre sí, constituyen las proteínas,

"son solubles en agua, dializables, y no dan la reacción del biuret."

Dice después que los péptidos sencillos y polipéptidos dan la reacción del biuret y con respecto a esta reacción establece que "se hace más débil a medida que las proteínas se hidrolizan y desaparece cuando la hidrólisis es completa."

Laguna (6) hablando de la reacción del biuret dice:

"Como la intensidad de la reacción del biuret es proporcional a la cantidad de uniones peptídicas y por lo tanto a la cantidad de proteína presente, y como las otras sustancias que pueden dar la reacción no se presentan habitualmente en la naturaleza, esta reacción suele usarse como método para la determinación cuantitativa de proteínas en diversos materiales orgánicos." Con respecto a la técnica de la reacción dice: "Se produce un color violeta en presencia de iones cúpricos en medio alcalino fuerte."

Holleman (12) dice que el biuret es una sustancia cristalina que funde a 103°C. Añadiendo a su disolución acuosa unas gotas de sulfato cúprico y una o dos gotas de potasa cáustica aparece una coloración que varía del rojo al violeta, muy característica ("reacción del biuret"). Dice también que las albumosas y las peptonas pueden prepararse a partir de cualquier proteína mediante hidrólisis adecuada y que dan la reacción del biuret. Refiriéndose a los polipéptidos que también dan la reacción, expresa que en particular los tetrapéptidos hasta los octopéptidos son sustancias muy semejantes a las peptonas.

Niemeyer (13) dice que: "La presencia de enlaces peptídicos puede reconocerse por medio de la reacción del biuret que consiste en tratar la proteína o el polipéptido con una solución de hidróxido de sodio y sulfato de cobre."

Como pensamos utilizar el filtrado que da origen al E.S.M. para hacer la reacción del biuret nos ha parecido conveniente citar las opiniones de los mencionados profesores a los efectos de precisar lo mejor posible, la naturaleza de las sustancias

contenidas en el extracto, por cuya causa nos hemos referido a los aminoácidos como últimos elementos de la hidrólisis proteica que a pesar de estar contenidos indeterminadamente en el filtrado que da el E.S.M. no dan la reacción y además, también nos hemos referido a los péptidos sencillos, a los polipéptidos, a las peptonas y a las albumosas que estando también presentes en el mismo extracto, son productores de reacciones positivas del biuret.

Según el Prof. Laguna (6), esta reacción ha sido utilizada para la determinación cuantitativa de las proteínas presentes en un medio orgánico; pero no hemos tenido la suerte de encontrar la técnica empleada y por tanto, sólo podemos hacer esta referencia.

Por este motivo hemos hecho una escala patrón que tiene un valor comparativo y nos permite expresar si la reacción es negativa, dudosa, débilmente positiva, identificándola por medio de los signos -, +, ++, etc. Esta escala la hicimos en base al caldo nutritivo Difco cuya fórmula es conocida.

TECNICA DE LA REACCION DEL BIURET

Una vez obtenido el filtrado que sirve de base al E.S.M. se ponen cuatro mililitros en un tubo pequeño de ensayo, agregamos un mililitro de soda cáustica al 20 %, mezclamos bien y por último agregamos con una pipeta pasteur, una gota de sulfato de cobre al seis por ciento en agua destilada.

Algunas veces, la coloración rosada o violácea es instantánea y parece que esto sucede cuando el extracto es rico en cuerpos biuréticos. Otras veces la coloración aparece lentamente; pero, en general, cuando va a ser positiva ya se nota a los treinta minutos a temperatura del laboratorio.

Hemos fijado las cantidades de los elementos que integran la reacción después de muchos tanteos en cuanto al número de mililitros del filtrado de la concentración del hidróxido de sodio y mismo de la dilución del sulfato de cobre.

Cuando la coloración rosada es evidente rápidamente, habiendo empleado cuatro mililitros del filtrado, hacemos otra, empleando solamente tres mililitros y agregando un mililitro de agua destilada para completar el volumen. Generalmente hemos probado también con cantidades decrecientes del filtrado hasta obtener a voluntad reacciones dudosas o negativas.

Como tubo o escala patrón hemos usado un tubo de ensayo en el que colocamos cuatro mililitros de caldo nutritivo Difco preparado para trabajos de bacteriología, un mililitro de soda cáustica al 20 % y una gota de sulfato de cobre al 6 %.

Los valores decrecientes se obtienen sustituyendo parcialmente el caldo por un volumen igual de agua destilada.

Damos a continuación algunos resultados obtenidos con esta técnica:

Pruebas del Biuret.

Una carne bovina conservada en heladera a 5°C tiene olor a putrefacción. Se hace el filtrado acuoso que tiene ph 6,7 y luego se lleva a ebullición de acuerdo con la técnica usada en la determinación del E.S.M. Se filtra, se enfría y se ponen cuatro mililitros en un pequeño tubo de ensayo, se agrega un mililitro de soda cáustica al 20 % y una gota de sulfato de cobre al 6 %. Se mezcla bien y se observa. La coloración rosada apareció en seguida: fue una reacción fuerte.

Otra carne bovina conservada en heladera da un filtrado con ph 6,8. Hacemos la técnica descripta. La reacción con cuatro mililitros es fuerte. Hacemos entonces otra prueba empleando solamente dos mililitros del filtrado y el biuret resulta netamente positivo. Por último, repetimos la prueba empleando sólo un mililitro de este filtrado y el biuret resulta positivo.

Una muestra de carne bovina fresca cuyo filtrado es de ph 5,8 es trabajada igualmente que las anteriores.

Hacemos la reacción del biuret con resultado negativo inicialmente, pero a los treinta minutos aparece una muy leve coloración rosada. Esta muestra de carne es la que aparece con el número tres en el

cuadro de Materia Seca y Humedad: tiene 26,80 % de M.S.

Al día siguiente se hace un nuevo filtrado y repite el resultado anterior débilmente positivo.

Una carne conservada en heladera, cuyo filtrado da un ph de 7 es trabajada de igual modo que las anteriores. Se hace el biuret y da una reacción positiva muy fuerte. Repitiendo pruebas con cantidades menores de filtrado hasta un mililitro dan reacciones positivas.

Una muestra de carne bovina, fresca, cuyo filtrado da un ph 5,4 es trabajada. El biuret es positivo a los treinta minutos. Hacemos pruebas con tres, dos y un mililitro cuya lectura es negativa a los treinta minutos; pero a las 24 horas resulta débilmente positiva la prueba con tres mililitros y negativas las otras.

Una muestra de carne ovina congelada es trabajada. El filtrado tiene un ph 5,8 a 6. Hacemos biuret que resulta inicialmente positivo.

Una muestra de carne ovina sin congelar que fue conservada en heladera es trabajada. El filtrado tiene un ph 6,7 y además tiene olor rancio. La reacción biuret da fuertemente positiva.

Una muestra de carne bovina, fresca, cuyo filtrado da un ph 5,4 es trabajada. El biuret es inicialmente negativo; pero a los 30' es positivo.

La carne anterior es puesta en heladera envuelta en nylon durante ocho días. El filtrado tiene un ph 7. El biuret resulta muy fuerte.

Trabajamos una muestra de carne bovina, fresca. Tiene un ph 5,4. El biuret hecho con cuatro mililitros de filtrado resulta negativo a dudoso. Esta muestra es la que aparece con el número cuatro en el cuadro de M.S. y Humedad; tiene 27,70 % de M.S.

Los resultados que preceden han sido comparados como dijimos anteriormente, con otro tubo en el que pusimos caldo nutritivo Difco que con cuatro mililitros da una reacción muy fuerte. Pero, este caldo que da un color ocre amarillento, tiene

además de peptona, otros componentes que como el extracto que lo integra, también da la reacción del biuret. Por este hecho nos ha parecido mejor hacer una escala patrón que contenga solamente una sustancia: la peptona.

De cualquier modo, la comparación hecha empleando el tubo con caldo Difco nos ha permitido observar que las reacciones biuréticas son más fuertes a medida que evoluciona la carne hacia la descomposición.

ESCALA PATRON DEL BIURET CON PEPTONA

De acuerdo con lo dicho anteriormente, hemos hecho una escala de valores crecientes de sustancia biurética empleando una solución de peptona Difco al uno por ciento. En tubitos incoloros y transparentes de doce centímetros de altura por uno de ancho ponemos en cinco de ellos, la solución.

En una gradilla y de izquierda a derecha ponemos 1/2 ml., 1 ml., 2 ml., 3 ml., y 4 ml. o sea cinco miligramos, un centigramo, dos centigramos, tres centigramos y cuatro centigramos de peptona.

Después igualamos con agua destilada hasta tener en todos los tubos un volumen de cuatro centímetros cúbicos.

Agregamos a cada uno de ellos un mililitro de hidróxido de sodio al veinte por

ciento y una gota de sulfato de cobre al tres por ciento en agua destilada con una pipeta pasteur.

En estas condiciones se desarrolla un color rosado que se ve nítidamente en los tubos con 2, 3 y 4 centigramos de peptona. En el tubo con 1 centigramo de peptona aparece un color violáceo en el que predomina el color rosado y en el tubo con 1/2 centigramo de peptona también de color violáceo, predomina el color azulado sobre el rosado; pero, éste puede verse si se observa atentamente. Esta ha sido la concentración de sulfato de cobre que nos ha parecido mejor por cuanto la dilución como la aconsejan algunos autores como Arthus (8) no puede indicarse al uno por ciento porque una gota no desarrolla el color rosado en forma apreciable y la concentración al seis por ciento da un color azul muy intenso que interfiere al rosado de los tubos que contienen cinco miligramos y un centigramo de peptona.

Cuando queremos determinar el contenido de cuerpos biuréticos en el filtrado en estudio, hacemos también la escala patrón y comparamos los colores de los tubos que se corresponden y podemos decir que cuatro mililitros de filtrado dan una reacción igual a la que dan tantos miligramos o centigramos de peptona. Generalmente, hacemos la lectura sin dificultad; pero, puede igualmente recurrirse a un comparador.

BIBLIOGRAFIA

- 1.— ROZIER, J. y ROSSET: Notions modernes sur structures du muscle. Recueil de Médecine Veterinaire (L'Ecole D'Alfort). Nº 104 - Abril de 1967.
- 2.— ROZIER, J. y ROSSET: Evolution du muscle des Animaux de boucherie après l'abattage. Aspects macroscopiques, physicochimique, biochimiques et histologiques. Recueil de Médecine Veterinaire (Alfort) Nº 5. Mayo de 1967.
- 3.— ROZIER, J. y ROSSET: Mecanismos de l'évolution du muscle des animaux de boucherie après l'abattage. Recueil de Médecine Veterinaire. (Alfort Nº 6). Junio de 1967.
- 4.— CALVET FERNANDO: Bioquímica para médicos, químicos y farmacéuticos. Editorial Alhambra S.A. Madrid. Año 1956.
- 5.— RONDONI, P.: Compendio de Bioquímica. Editorial Labor S.A., Madrid - Barcelona. Año 1929.
- 6.— LAGUNA, JOSE: Bioquímica. La Prensa Médica Mexicana. Año 1960.
- 7.— GRAU R. PROF.: Carne y Productos Carnicos. Traducido del alemán por el Prof. Bernabé Sanz Pérez y el Dr. Jaime Esain Escobar. Editorial Acriba. Zaragoza. España. Año 1965.

- 8.—LAWRIE, R.A.: Ciencia de la Carne. Zaragoza. Año 1967. Traducido por A. Marcos Barrado Doctor en Veterinaria.
- 9.—BRANDLY, PAUL J.; MIZAKI, GEORGE; TAYLOR KENNETH, E.: C.E.C.S.A. México. Primera edición en español de la tercera edición en inglés. Junio de 1971.
- 10.—ECHENIQUE, LUIS y ROSSI LEMA, LIBERO: Sensibilidad a la prueba del alcohol de las leches de nuestros tambos e influencia de la temperatura sobre la misma. Archivos de la Sociedad de Biología. Nº 4. Año 1937. Montevideo.
- 11.—ARTHUS, M.: Précis de Chimie Physiologique. París. Año 1918.
- 12.—HOLLEMAN, A.: Tratado de Química Orgánica. Barcelona. Año 1930.
- 13.—NIEMEYER, HERMANN: Bioquímica. Buenos Aires. Año 1968.
- 14.—ECHENIQUE, LUIS y ROSSI LEMA, LIBERO: Frecuencia de la positividad a la prueba del alcohol de las leches. Boletín Mensual. Dirección de Ganadería. Nº 3. Año 1936.
- 15.—ECHENIQUE, LUIS y SUAREZ, BERNARDO: Influencia de la alimentación sobre la leche: modificación química y sensibilización a la prueba del alcohol. Archivos de la Sociedad de Biología. Nº 2. Año 1935. Montevideo.
- 16.—ECHENIQUE, LUIS: Tenor elevado en calcio de los cardos de Castilla. (*Cynara cardunculus* L.) y Asnal (*Silibium marianum* L.) y su influencia sobre algunas propiedades de la leche. Archivos de la Sociedad de Biología. Nº 2. Año 1936. Montevideo.
- 17.—ECHENIQUE, LUIS y ROSSI LEMA, LIBERO: Leches coagulables a la prueba del alcohol. Revista de Medicina Veterinaria. Buenos Aires. Febrero-Marzo de 1937.
- 18.—ECHENIQUE, LUIS y ROSSI LEMA, LIBERO: La relación calcio-fósforo de las leches y las pasturas. Boletín Mensual de la Dirección de Ganadería. Nº 4. Año 1938. Montevideo.
- 19.—CHAUVEAU, A. y ARLOING, S.: Traité D'Anatomie Comparée des Animaux Domestiques. París. Año 1903.
- 20.—BARTELS, H.: Inspección Veterinaria de la Carne. Traducción del alemán por el Dr. Jaime Ezaim Escobar. Editorial Acribia. Zaragoza. España. Año 1971.

CONCLUSIONES

- 1º) En el Instituto de Industria Animal hemos desarrollado una técnica de extracción acuosa de la carne que nos permite estudiar en ella las sustancias solubilizadas.
- 2º) La naturaleza proteica de las sustancias solubles del extracto acuoso de la carne son investigadas por intermedio de técnicas precipitantes en que el calor, el alcohol a distintas graduaciones y el calor y el alcohol combinados, desempeñan papeles comparables y determinan la superioridad de este último.
- 3º) En la búsqueda por un mayor conocimiento del extracto acuoso de la carne, se dan las técnicas para la determinación del E. S. del extracto acuoso; para la determinación del E.S.M., una vez que el extracto acuoso ha sido llevado a ebullición y filtrado; y por último, una técnica para determinar comparativamente con una escala patrón hecha con una solución de peptona al 1 %, el contenido de cuerpos biuréticos en el filtrado que da origen al E.S.M.

CONCLUSIONS

- 1º) At the "Instituto de Industria Animal" we have developed a technique of aqueous extraction from the meat, which enable us to study in it, the substances in solution.
- 2º) The proteic nature of these from the aqueous meat extract are investigated by means of techniques of precipitation by heat; by alcohol at different graduations and by alcohol heat combined; although all of them perform a comparable role, we select the last one as the best.
- 3º) In the research for a better knowledge of the aqueous meat extract, the A. A. study the techniques for determination of the "Dry Extract" of the aqueous extract; for the determination of the "Minor Dry Extract" when the aqueous extract has been brought to the boiling point and filtered; and at last, one technique to specify with a comparative standard scale made with a solution of peptone at 1 %, the content of biuretic particles which remain in the filtration that originates the "Minor Dry Extract".