

PROCEDIMIENTO PARA INVESTIGAR PIGMENTOS BILIARES EN TEJIDOS ADIPOSO VACUNO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES PESQUERAS

Quím. Farm. Carlos A. Alvarez *

RESUMEN

El procedimiento se basa fundamentalmente en la extracción de la grasa del tejido adiposo en cuestión, con una mezcla de solventes. La mezcla formada por éter sulfúrico y alcohol etílico, el primero buen solvente de grasas no polar y el segundo polar, de gran poder disociante, que disuelve la Bilirrubina en sus dos estados: **directa o conjugada** con una o dos moléculas de ácido glucurónico, llamada también hepática y la **indirecta libre o extra-hepática**(1)

La designación de directa o indirecta obedece a su comportamiento frente al diazo-reactivo de Eherlich, con el cual da, la directa un color púrpura característico; la indirecta, requiere el agregado de alcohol etílico para producir esta reacción, dando lugar así a la reacción de Van der Berg^(3,1)

Hecha esta primer extracción, se filtra, si el filtrado es coloreado, (amarillo, amarillo verdoso), es un fuerte positivo si es incolora negativo. En caso de débil coloración se pasa a una segunda etapa; se elimina el éter sulfúrico por ebullición suave, se enfría y se filtra, filtrado coloreado, positivo, incoloro negativo.

Estos resultados pueden confirmarse con los reactivos conocidos de Hammarsten's o Eherlich, o mejor aún con espectrofotómetro.

* Jefe de Sección Lab. Bioquímica del I. de Inv. Pesqueras

FINALIDAD DEL TRABAJO Y SUS ANTECEDENTES

La finalidad de esta técnica es poder, determinar con una operación sencilla, como lo es una simple extracción, la Bilirrubina en grasas que se sospecha procedentes de animales ictericos y diferenciarlas de las pigmentadas de origen alimenticio o sea teñidas por carotenoides, lipocromos y aún hemoglobina en casos de tejido adiposo muy irrigados por el sistema vascular.

La Inspección Veterinaria en estos casos, retiene en cámaras las reses por 24 horas y lo hace por dos razones: 1) los carotenoides tienden a oxidarse, en consecuencia se decoloran y 2) las grasas pigmentadas de origen icterico o con bilirrubina, ésta se oxida a biliverdina dando color amarillo verdoso.

La utilización de la técnica propuesta permite que las reses en exámen tengan un diagnóstico confirmatorio en menos de 20 minutos, salvando reses que por su intensa pigmentación de origen alimenticio, por equivocación, tengan destino a decomiso con la consiguiente pérdida económica. Brinda mayor seguridad al técnico por tratarse de un método objetivo y no subjetivo como el citado, resuelve además el problema del estacionamiento en cámaras, donde el espacio es crítico.

Las reacciones hasta ahora aplicadas que se tiene conocimiento son las de: Alcohol-Eter, de Pietri, de Martín, de Lerche.⁽⁴⁾

Alcohol-éter.

Consiste en tratar por separado la grasa, con alcohol y luego con éter sulfúrico, al cabo de 1-2 horas, los lipocromos se solubilizan en éter, coloreándolo de amarillo o bien pigmentos biliares que se solubilizan en alcohol, haciendo lo mismo con este solvente.⁽⁴⁾

Prueba de Martin

Para confirmar el color amarillo en extracto alcohólico, cuya colaboración puede darla sustancias diferentes a los pigmentos biliares, se procede de la siguiente manera: depositar en

erlenmeyer 22 a 25 g. de tejido adiposo y tejido conjuntivo, exentos de sangre y muy desmenuzados, cubriendo la muestra con alcohol al 5% agitar bien y filtrar, al cabo de 30-120 minutos, si el filtrado es incoloro, resultado negativo, en lo referente a pigmentos biliares, si es amarillo, se mezclan 8 ml. del mismo con 10 a 20 gotas de H_2SO_4 conc. y se calienta a bañomaría hasta ebullición. En presencia de Bilirrubina, aparece color verde que con adición ulterior de más H_2SO_4 pasa a color azul.

Prueba de Lerche

Consiste en mezclar 5 g. de grasa con NaOH al 5%, llevarla a ebullición. Después de enfriar se agita con éter. La coloración verde del extracto inferior indica la presencia de Bilirrubina y el tono amarillo de la capa superior, la existencia de pigmentos carotenoides.

Reacción de Pietri (6)

Se pesan 5 A 10 g. de material a investigar, picado fino, pasar a un mortero. Colocar en tubo de ensayo y agregar acetona pura en cantidad suficiente para cubrir los tejidos. Si se utiliza suero u orina, de 10 a 12 cm^3 de acetona.

Calentar 4 minutos al bañomaría hirviente, evitando fuerte destilación de la acetona (punto de ebullición de la acetona 56.1 56.5 o C).

A veces se observa viraje al verde-verde azulado. Si no se produce, dividimos el contenido del tubo de tal manera de dejar un tubo testigo y continuamos trabajando con el restante.

Agregar de 3 a 5 gotas de ácido Clorhídrico puro y calentar en las mismas condiciones. En caso de resultar negativo agregar en mezcla caliente de 2 a 3 gotas de una solución de Nitrito de Sodio al 1/200 o 1/250.

Dejar enfriar, se ve después de mezclar pasar del amarillo al verdoso más o menos fuerte.

La reacción es muy delicada, al menor exceso de Nitrito de Sodio le impide formar el verde por continuación de una oxidación muy enérgica. Proceder a la adición de solución nitroso gota a gota.

DESCRIPCION DE LA TECNICA PROPUESTA

Materiales y método.

- 1 tubo de ensayo grande (aprox. 200 x 20 o 25 mm)
- 1 tubo de ensayo común (aprox. 150 x 16 mm.)
- 1 vaso de bohemia de 100 ml.
- 1 varilla de vidrio de 30 cms. aprox.
- 1 embudo (aprox. 10 cms. diámetro)

Bañomaría eléctrica o en su defecto calentador eléctrico blindado, regulable para bajas temperaturas.

Método

Poner en tubo de ensayo grande, 10 g. de grasa picada fina, agregar una mezcla de 20 cm³ de alcohol etílico 96° con 10 cm³ de éter sulfúrico.

Con varilla de vidrio desleer la grasa en la mezcla solvente unos minutos. Filtrar, a esta altura se puede determinar un positivo fuerte por coloración de la mezcla solvente (amarillo-amarillo-verdoso), o negativo en el caso de mezcla solvente incolora.

Si la coloración es débil, colocar el filtrado en vaso de bohemia de 100 cm³ y poner a evaporar el éter en bañomaría eléctrica o plancha eléctrica blindada, a esta altura no deben haber en el laboratorio ni mecheros prendidos y ni artefactos eléctricos con rulo expuesto prendidos ya que se va a realizar la evaporación de éter sulfúrico, altamente inflamable. Se calienta a ebullición suave hasta la eliminación del éter que se comprueba por la aparición de un precipitado compuesto de grasas neutras, fosfolípidos, insolubles en medio alcohólico, así también como los carotenoides extraídos por el éter, pero que quedan en medio alcohólico como gotitas oleosa en el fondo. Se enfría aprox. a 10-12 Grados C.

Se procede a una segunda filtración, filtrado coloreado positivo; incoloro, negativo.

Si disponemos de un espectrofotómetro en la región visible filtramos directamente en una cubeta (el filtrado conviene hacerlo por papel Wahtman 40) y hacemos la curva de absorción. La cubeta debe estar a 30-35 o C. La curva de absorción nos dará dos picos de máxima absorbancia, uno a 445 nm-450 nm y otro a 470-475 nm, el primero es característico de la bilirrubina

en medio alcohólico, esto se repetirá en cada muestra positiva, en caso de muestra negativa, dará una gráfica plana, es decir sin máximos.

Con el reactivo de Hammarsten's da color verde de mayor o menor intensidad de acuerdo a la concentración de bilirrubina se procede así, se toman 5 a 10 cm³ del filtrado y se agregan 2 ml. de dicho reactivo, realizar la lectura en los 5-10 primeros minutos.

Reactivo de Hammarsten's:

Mezclar: 1 vol. de HNO₃ en 19 vol. de HCl (ambos al 25%)
1 vol. de esta mezcla ácida con 4 vol. de alcohol 96°.

Con el reactivo de Eherlich; se toman 2 a 5 ml. de filtrado y se le agregan 0.25 ml. del reactivo diazotado, es decir, 5 ml. de reactivo de ehrlich con 0.15 ml. de solución de Nitrito de Sodio al 5 ‰. Para la reacción esperar 5 minutos da un color amarillo intenso, no el color típico de la Bilirrubina con dicho reactivo, rojo fucia.

Reactivo de Ehrlich:

Ac. sulfanílico 0.5 g.
HCl 7.5 cm³
Agua c.s.p. 500 cm³

RESULTADOS

A partir de Julio de 1975, el suscrito previa consulta con el Prof. Dr. García Vidal, catedrático de Industria de la Carne, el cual me brindó toda la información sobre la Bilirrubina y sus reacciones, estuvo controlando el método, es decir con la colaboración de la Insp. Veterinaria del M.A.P. en el Frigorífico nacional, con distintos médicos veterinarios de los cuales se puede mencionar larga lista de ellos, se sacaron muestras, se separaron las reses en las cámaras y simultáneamente, el laboratorio Químico de dicho Frigorífico fue ensayando el método, dando su resultado, paralelamente el suscrito retiraba muestras similares a las cuales se les hacía la curva de absorción en el Instituto de Investigaciones Pesqueras de la Facultad, con el espectrofotómetro Coleman 124 D con el siguiente resultado: las muestras positivas daban dos picos de máxima absorción: uno mayor en las 445-450 nm y otro menor a las 470-475 nm,

mientras que las muestras negativas dieron una gráfica plana o sin máximos. Se continúan las investigaciones para identificar el pico de las 475 nm, así como el método para dosificar la Bilirrubina.

DISCUSION

Por este método se intenta conseguir una extracción mayor de la bilirrubina en las grasas, en primer lugar; los lípidos comúnmente suelen estar combinados con proteínas, glúcidos, etc. por medio de enlaces débiles, precisamente el alcohol etílico solvente monopolar, o polar tiene un gran poder disociante y libera así a los lípidos pero a su vez es disolvente de las dos bilirrubinas, libre y conjugada; el éter sulfúrico solvente no polar pero con gran aptitud para disolver lípidos. Como se ve la combinación de ambos es bastante eficaz para la extracción de la Bilirrubina.

La extracción contiene distintas impurezas: el beta caroteno o carotenoides, solubilizados en parte por el éter se separan como gotitas oleosas una vez eliminado el éter; las grasas neutras y fosfolípidos; también son separados en forma de precipitado al eliminar el éter, completando esta separación al enfriar a 10° C aprox., impurezas estas que son separadas por filtración, o simple decantación.

CONCLUSIONES

El procedimiento propuesto es sencillo y bastante rápido, tiene fundamento científico así como confirmación química y espectrofotométrica, permite ser realizado aún en establecimientos rurales, con las limitaciones del caso.

AGRADECIMIENTOS

Debo agradecer al Dr. García Vidal, Director del Instituto de la Carne, mi primer orientador en este campo, recibiendo el estímulo de su parte.

Al Dr. José S. Bello, que trabajando con el suscrito, acumuló protocolos que incluyen gráficas del espectrofotómetro, en gran

número de ensayos con grasas proporcionadas por los frigoríficos exportadores.

A todos los integrantes del Instituto de la Carne que en una forma u otra se han interesado y han colaborado con el suscrito.

SUMMARY

The process is based principally in the extraction of the texture's fat with a mixture of solvents.

The mixture formed by Diethyl ether and ethyl alcohol. The first one is a good solvent of non-polar grease and the second polar is of a great dissociative power which dissolves the bilirubin in its two states: directly or joined with two molecules of Glucuronic Acid, called also hepatic, and the indirect one: free or extra-hepatic.

The reason for the name direct or indirect above mentioned, is due to the behavior toward the Diazo Reagent of Eherlich, with which the direct one forms a characteristic purple color and the indirect one requires the addition of alcohol to produce this reaction giving rise in this way to the Van der Berg reaction.

Once this first extraction is effected, it is then filtered. If the filtration is coloured (yellow, greenish yellow) it is a strong positive, if it is colourless this it is a negative. In the case of a weak colour, one should pass to a second stage; the Diethyl ether is eliminated by a gentle boiling, it is cooled and then filtered, coloured filtration, equal positive, and colourless equal negative.

These results can be confirmed by the well known reagents if Hammarsten's or Erlich, or even better with the Spectrophotometer.

BIBLIOGRAFIA

- 1) NIEMEYER Herman *bioquímica* 1968, *Inter Médica ed.* p. 284. Buenos Aires, Argentina.
- 2) FAURE M. Mlle. *Techniques de laboratoire.* J. Loiseleur Paris 1963, tomo I fascículo 2 p. 1248 ed. Masson et Cie.

- 3) *DEBRÉS P. Techniques de Laboratoire J. Loiseleur Paris 1963 ed. Masson et Cie. p. 52.*
- 4) *BARTELS H. Inspección Veterinaria de la Carne, Zaragoza (España), ed. Acribia, p. 316 -383, 1971.*
- 5) *PHILIP, B. and OLAF B., Allen Comercial Organiz. Analysis, Philadelphia (EE.UU), ed. Ainsworth Mitchell, p. 464, 1943.*
- 6) *Apuntes de Cátedra del Instituto de la Carne, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, Direct. Prof. García Vidal, 1981.*