

# CENNI SULLA STRUTTURA DEL MUSCOLO

Il fenomeno più appariscente che interviene dopo la morte è la rigidità cadaverica. Tra le teorie che tendono a spiegare il fenomeno la più attendibile è quella proposta da Szent-Gyorgy, leggermente modificata ai tempi nostri da Davies. Sciositicamente due sono i fenomeni che avvengono durante l'instaurarsi del *rigor mortis*: fenomeni chimici e fenomeni strutturali. In base a queste teorie si tende a identificare nel *rigor mortis* i meccanismi responsabili della contrazione muscolare.

La struttura della fibra muscolare striata è rappresentata da un grandissimo numero di sarcomeri o unità elementari che nei preparati istologici possono essere individuati come lo spazio compreso tra due fibre (Z). Queste linee scure perpendicolari all'asse del muscolo, sono in realtà i margini dei taframmi che sezionano a tutto spessore la fibra e la suddividono in un successione di piccoli cilindri. Ciascuno di questi, ossia il sarcomero, racchioglie in sé tutti gli elementi perché si verifichi la contrazione muscolare. Il sarcomero infatti ha una sua struttura: osservato al microscopio elettronico appare attraversato da due bande chiare, contigue alle strie Z, e da una banda intermedia scura.

La microscopia elettronica e le altre indagini fisiche e chimiche hanno dato ragione di queste differenze: nel sarcomero sono infatti raccolti a fascio due specie di proteine fibrose, la miosina che occupa la sezione di mezzo e la actina che si trova nelle porzioni chiare. Le fibre di actina sono ancorate con un estremo alla membrana Z e con l'altro si spingono fino al centro del sarcomero fino ad accavallare quando il muscolo è disteso, un piccolo tratto di miosina.

La struttura e la configurazione spaziale delle due proteine muscolari sono oggi conosciute. Si sa che la actina è in realtà l'intreccio di

sottili filamenti (doppio elice aperto) ciascuno dei quali porta in successione, come i grani di un rosario, tante sub-unità di una proteina globale la G-actina. La miosina, invece, è fatta di un solo spesso filamento dal quale si dipartono delle brevi ramificazioni laterali, come i rami del tronco di un pino, o meglio ancora, tenuto conto della disposizione spaziale, come i gradini che originano dall'asse di una scala a chiocciola. Ogni contatto tra actina e miosina avviene con un ordine estremo: i filamenti di miosina hanno un asse di simmetria esagonale in modo che, in sezione trasversa, ciascuno sia circondato da sei fibre di actina; queste ultime, invece, sono in rapporto con le ramificazioni che si dipartono da tre distinti filamenti di miosina.

## MODIFICAZIONI DEL MUSCOLO POST-MORTEM

L'essenza della contrazione muscolare sta nel fatto che i filamenti di actina si muovono verso il centro del sarcomero infilandosi tra i filamenti di miosina. Il contatto tra actina e miosina che è limitato ai segmenti estremi quando il muscolo è disteso, può così divenire sempre maggiore, fino ad interessare per tutta la loro lunghezza man mano che il sarcomero si accorcia come un teloscopio che si rinserra.

~~Ma, spiegato come il sarcomero si contrae, resta ancora inspiegato in quel modo lo faccia. In altre parole rimane da capire come agiscono le molecole di ATP per determinare lo scioglimento delle fibre di actina su filamenti di miosina.~~

~~Sembra, in base alle ipotesi più recenti, che i filamenti di actina e di miosina possono scorrere gli uni sugli altri perché sono in grado di collegarsi a vicenda con dei ponti obliqui che vanno poi incontro ad un riaccorciamento.~~

Per comprendere meglio queste ragioni bisogna rifarsi a quello che è lo stato delle proteine muscolari quando il tessuto è a riposo. L'osservazione ha già permesso di accertare che ADP e ATP si distribuiscono differenzialmente su queste proteine. Ogni subunità di G-actina fissa, infatti, una molecola di ADP mentre l'estremità di ogni ramificazione della miosina, lega una molecola di ATP. Il risultato è che, portando entrambi gli esteri fosforici una carica negativa, esiste repulsione tra la actina e l'estremità delle ramificazioni della miosina. D'altro canto, sull'asse principale della miosina esiste pure una carica negativa (forse dovuta alla fosforilesina) in modo che per effetto della repulsione elettrostatica le ramificazioni miosiniche oscillano senza potersi né collegare con la actina né avvicinare al filamento che le origina e si mantengono distese nello spazio che separa tra di loro le due proteine muscolari. Quando il muscolo è attivato, la depolarizzazione del sarcolemma e del reticolo sarcoplasmico consente il passaggio di ioni calcio, dall'intestizio all'intero sarcomero. Questo controllo modifica completamente la



disposizione delle cariche sulle proteine fibrose. Lo ione calcio, infatti, con le sue due cariche positive si collega, da un lato all'ADP che è alla superficie della actina e dall'altro all'ATP che è alla estremità delle ramificazioni della miosina, in modo da modificare queste ultime in saldi ponti che ancorano obliquamente l'una all'altra le due proteine fibrose. Inoltre il calcio, neutralizzando la carica negativa, dell'ATP, annulla anche la repulsione elettrostatica tra l'estremo della ramificazione e l'asse principale della miosina. La ramificazione, che è in realtà una catena peptidica, tende a disporsi nella sua configurazione naturale che è quella di una spirale o alfa elice, i cui anelli sono mantenuti inseriti da legami di idrogeno, o da legami idrofobici. Il ponte che collega l'actina alla miosina va così incontro ad una raccorciamento, costringendo le due proteine fibrose a scivolare lungo l'asse dell'altra.

Lo spostamento delle fibre sarebbe in realtà trascurabile se il processo che lo determina non si rinnovasse continuamente. Nella miosina, infatti, è dimostrato che esiste l'attività di un enzima ATP-asi, che scinde il legame fosforico ad un livello elevato energetico nella molecola della ATP.

Il luogo di azione di questo enzima si trova alla base di queste ramificazioni della miosina. Così quando il ponte peptidico tra actina e miosina si avvolge a spirale come una molla, dopo che gli ioni calcio hanno annullato la repulsione elettrostatica che lo manteneva disteso, la ATP può entrare nella sfera di azione dell'enzima ed essere scisso di ADP e fosfato. Il ponte è allora così interrotto nettamente in due e l'actina e la miosina perdono il vincolo che avevano contratto.

Tuttavia finché esiste l'ATP nell'ambiente il ciclo può sembrare rinnovarsi. L'ADP residuo alla scissione operata dall'ATP-asi, può infatti, essere immediatamente rifosforilato a spese dell'ATP e dell'ambiente, in un processo che probabilmente richiede la presenza di magnesio. La ramificazione peptidica della miosina riacquista così una carica negativa al suo estremo e viene nuovamente distesa dalla repulsione elettrostatica. In conclusione, il polipeptide disteso è pronto, e age all'azione degli ioni calcio a ristabilire un nuovo ponte con l'actin. contraendosi e facendo scivolare per un ulteriore tratto l'una lungo l'altra le due proteine muscolari. La contrazione ha fine soltanto quando gli ioni calcio sono allontanati dal contatto con le proteine muscolari. L'allontanamento richiede che venga messo in moto un meccanismo non ancora interamente noto detto "fattore di rilasciamento".

Dopo la morte dell'animale si ammette che il fenomeno del rigor mortis consista appunto in una contrazione muscolare che si svolge secondo lo schema descritto.

Il rigor mortis compare, nei vari muscoli, in diversi tempi e presenta diverse velocità di contrazione. La sua durata viene unanimemente attribuita ad una mancanza del fattore di rilasciamento per intervento di fattori non ancora noti.

La contrattura da irrigidimento si distingue però dalla contrattura muscolare normale per il fatto che la liberazione di ioni calcio, necessaria per innescare il fattore di rilasciamento, con depolarizzazione nei sistemi di membrana della fibra, non viene più logicamente regolata su impulsi nervosi, ma gli ordinati rapporti di polarizzazione della membrana della fibra e delle membrane del reticolo citoplasmatico legati alla estinzione del circolo vengono alterati. In questo momento inoltre, al cessare dello stimolo nervoso, inizia la scissione dell'ATP.

Lo sviluppo della rigidità cadaverica è causato dalla diminuzione dell'ATP e comporta un aumento del modulo di elasticità del muscolo.

Le cause che determinano la risoluzione della rigidità cadaverica o la frollatura della carne finora non sono state ancora spiegate in modo soddisfacente. Il miglioramento di sapore legato a questo fenomeno, nella carne di animali a sangue caldo, va presumibilmente legato a fenomeni autolitici. In tal caso potrebbero avere un ruolo predominante i cataboliti nucleotidici quali ad esempio il monofosfato di inosina. La concezione finora valida che la tenerezza della carne frollata sia dovuta a fermenti proteolitici è divenuta improbabile.

Allo stato di ipotesi si può pensare che durante la frollatura l'associazione tra i filamenti di actina e miosina, avvenuta durante il processo di irrigidimento venga allentata. Non è necessario per questa dissociazione, pensare per forza ad effetti proteolitici. Per lo meno si potrebbe pensare se con il catabolismo glicogenico e nucleotidico post mortale non si formino sostanze che possono spiegare una analoga azione dissociante sul complesso actomiosinico come polifosfati inorganici in determinate condizioni ioniche.

## Fenomeni chimici

Nel corso del raffreddamento dei muscoli dopo la macellazione, hanno luogo varie modificazioni fondamentali di carattere fisico e chimico, atte ad influire sulle caratteristiche di impiego dei muscoli stessi quali alimento ed interessanti la trasformazione dei muscoli in carne e quindi dell'influenza diretta sulle qualità della carne in parola.

## ASPETTO MACROSCOPICO DELL'EVOLUZIONE DEL MUSCOLO DOPO LA MACELLAZIONE

E' in uso da lungo tempo distinguere più fasi durante l'evoluzione della carne dopo l'abbattimento: fase di eccitabilità, fase di rigidità cadaverica, e fase di maturazione propriamente detta o di risoluzione della rigidità cadaverica.

a) Fase di eccitabilità muscolare: le fibre muscolari subito dopo l'abbattimento sono in grado di contrarsi; così i muscoli della carcassa



palpitante sono percorsi da contrazioni fibrillari spontanee più o meno violente che vanno man mano diminuendo di intensità. Successivamente il muscolo può ancora contrarsi sotto stimoli meccanici, chimici o elettrici. In qualunque modo sia provocato l'eccitamento muscolare, le fibre muscolari non si contraggono sincronicamente. La persistenza di questa fase dipende dalla temperatura ambiente e dalla qualità della carcassa. Essa è massima a 10 °C. Le contrazioni spontanee durano circa tre ore e per circa sette ore è possibile ottenere una risposta all'eccitamento elettrico.

- b) Fase di rigidità cadaverica.
- c) Fase di maturazione: nel corso di quest'ultima fase le masse muscolari si intensiscono; il rammolimento è accompagnato da un'essudazione rosata che si accumula tra gli spazi muscolari. Il muscolo sezionato si presenta umido e brillante. Il colore poi si modifica; in superficie i muscoli sono rossi, qualche volta colorati di bruno, mentre in corrispondenza del taglio il muscolo è più chiaro. Dal punto di vista organolettico la carne col passare del tempo si intensisce ed acquista un aroma particolare. Queste modificazioni macroscopiche, difficili da misurarsi e valutare esattamente, corrispondono a modificazioni fisico-chimiche più facili da seguire.

### Evoluzione del pH

Il pH del muscolo, immediatamente dopo l'abbattimento, è generalmente prossimo a 7,4, poi diminuisce progressivamente fino a raggiungere un valore finale caratteristico. La caduta del pH dipende dal potere tampone del muscolo, vale a dire che è in funzione della costante di dissociazione dei gruppi acidi e basici presenti. Intervengono a questo punto le proteine del muscolo, i composti fosforilati, la carnosina e l'anserina il cui insieme rappresenta 50 cg per 100 g di muscolo e per unità di pH.

Grossolanamente si tenga presente che la produzione dell'1% di acido lattico provoca una diminuzione del pH di 1,8. Il pH terminale dipende molto dalla specie dell'animale e dai muscoli. La sua velocità di caduta varia da muscolo a muscolo. ~~Durante la fase di rigidità cadaverica il pH aumenta di 1/10 di unità?~~

### Evoluzione dell'rH

Nello stesso momento in cui il muscolo acidifica acquista anche proprietà riducenti conseguenti all'interruzione dell'apporto di O<sub>2</sub> per mancato afflusso sanguigno. Questa diminuzione di potenziale di ossido-riduzione è tale che il muscolo diventa capace di ridurre il tetrionato e di liberare H<sub>2</sub>S. ~~Questa è una fase molto importante da ricordare.~~

~~frammento di carne introdotto in un terreno selettivo al tetrionato per la ricerca delle Salmonelle provoca la riduzione e la liberazione di H<sub>2</sub>S anche in assenza di microrganismi falsando così i risultati.~~ L'abbassamento dell'rH può permettere la moltiplicazione di germi anaerobi o facoltativi. Interviene sulla colorazione del muscolo provocando la riduzione della mioglobina, che, nella sua forma ridotta, è color porpora.

### Evoluzione della conducibilità del muscolo

Il passaggio di corrente elettrica tra due elettrodi situati nel muscolo aumenta durante la maturazione della carne. L'effetto è manifesto quando il senso della corrente è perpendicolare all'asse delle fibre muscolari. Questo è dovuto al passaggio di ioni attraverso i sarcolemmi ~~e spiega la penetrazione più facile dei sali nel corso della salagione della carne cotta rispetto a quella ancora palpitante.~~ La misura della resistenza del muscolo appena abbattuto e dopo la maturazione dà i valori seguenti: 1700 - 2000 ohm e 270 - 600 ohm a seconda del pH.

### Evoluzione della temperatura del muscolo

Subito dopo la morte la temperatura del muscolo si alza. Questo è un fenomeno osservato nel suino: l'aumento di temperatura può essere di 1 °C e può mantenersi a questo livello per un periodo più o meno lungo che corrisponde a una caduta rapida del pH. Questa elevazione termica corrisponde all'intensità delle reazioni biochimiche del muscolo. In seguito, in funzione di condizioni esterne, la carne ritorna in equilibrio con la temperatura ambiente.

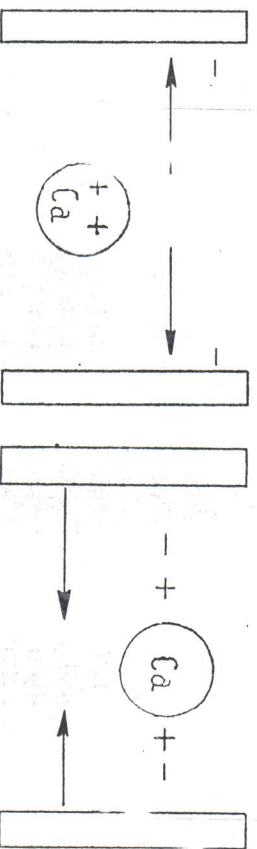
### Evoluzione del potere di ritenzione idrica del muscolo

Il potere di ritenzione idrica del muscolo è dato dalla sua capacità di trattenere per imbibizione una certa quantità d'acqua. Questa capacità determina la sua succulenza e le perdite in peso con la cottura. L'acqua rappresenta circa il 75% del peso del muscolo e si presenta in due stati: acqua libera e acqua legata.

L'acqua combinata, 5 - 10% dell'acqua totale, è fissata alle proteine e ai diversi costituenti della carne: in effetti per il loro carattere bipolare, le molecole dell'acqua possono legarsi alle proteine con forze elettrostatiche formando uno strato sottile alla periferia delle molecole che posseggono cariche elettriche. Queste molecole così idratate delimitano degli spazi capillari in cui è presente l'acqua libera. Fra le molecole esistono delle forze di attrazione: ponti di idrogeno tra i raggruppamenti peptidici o, tra i gruppi sulfidrilici, ponti disolfuri; dei ponti salini si trovano tra gli acidi e le basi azotate e sono presenti anche ponti metallici.



con l'intervento di cationi bivalenti. Ora, a seconda delle forze d'attrazione di diversa natura che esistono tra le molecole, gli spazi capillari sono più o meno voluminosi: a seconda poi delle loro dimensioni la quantità di acqua libera può variare. Questo potere di ritenzione idrica del muscolo è minimo a  $\text{pH} = 5,4$ ,  $\text{pH}$  della miosina. Ma la caduta del potere di idratazione della carne è dovuta per  $1/3$  alle variazioni del  $\text{pH}$  e per  $2/3$  alla scissione dell'ATP, alla liberazione di  $\text{Ca}^{++}$  e di altri ioni e al grado di denaturazione proteica. La figura mostra l'influenza del  $\text{pH}$  sulla quantità di acqua legata dalla quale si può dedurre la quantità di acqua libera, secondo l'evoluzione dopo morte. Questo fenomeno si spiega così: al  $\text{pH}$ , i legami elettrostatici e idrogenati sono massimi tra le molecole proteiche la cui struttura si rinserra espellendo acqua libera: si dice allora che il muscolo ha una struttura chiusa. Nel secondo caso le molecole di proteine sono unite per mezzo di ponti metallici, specialmente per mezzo degli ioni  $\text{Ca}^{++}$ : tutti fattori che permettono la loro liberazione dal sistema tubolare del sarcoplasma nel quale essi sono naturalmente fissati e la loro unione con le proteine strutturali (acidificazione) provoca un riavvicinamento delle molecole e di conseguenza diminuisce il potere di ritenzione idrica del gel proteico che costituisce la fibra muscolare. Inversamente tutti quei fattori che diminuiscono la ionizzazione del  $\text{Ca}^{++}$  e complessano gli ioni (presenza di polifosfati organici o minerali) aumentano il potere di ritenzione idrica della fibra muscolare e permettono l'allontanamento delle molecole per repulsione elettrostatica (struttura aperta) secondo lo schema:



STRUTTURA APERTA

STRUTTURA CHIUSA

Gli ioni  $\text{Mg}^{++}$  e  $\text{Zn}^{++}$  intervengono nello stesso modo degli ioni  $\text{Ca}^{++}$ . Gli ioni monovalenti  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^{++}$  hanno una azione più limitata. Allorquando il potere di ritenzione idrica è debole, una parte dell'acqua libera esuda. La quantità di questo liquido, ottenuto in seguito a pressione meccanica, ~~non~~ il potere di ritenzione idrica della carne.

~~che~~ il potere di ritenzione idrica diminuisce considerevolmente fino a raggiungere un valore teoricamente minimo, quando l'acidità è massima, ~~ma il fenomeno è facilmente percettibile solo quando la struttura della fibra muscolare è denaturata.~~

#### Evoluzione della estensibilità del muscolo

La perdita di estensibilità di un muscolo è sinonimo dell'inizio della rigidità cadaverica. Il muscolo, appena dopo la morte, conserva una estensibilità che gli permette di ritirarsi del 15% della lunghezza iniziale. Poi sopravviene il *rigor mortis*. Dopo la risoluzione del *rigor mortis* esso non riacquista più la estensibilità iniziale. Nel corso della rigidità cadaverica il muscolo non si raccorcia più in maniera percettibile se viene tenuto a  $15^\circ\text{C}$ , ma se la temperatura si eleva oltre a  $17^\circ\text{C}$  o si abbassa a  $0^\circ\text{C}$  il raccorciamento può essere notevole. La rigidità cadaverica sopravviene nel muscolo nello strato in cui esso si trova. Una volta che il *rigor mortis* si è stabilito il muscolo non potrà più allungarsi. Questa nozione è molto importante perché la lunghezza del muscolo al momento in cui si è stabilita la rigidità determina l'elasticità della carne. Un muscolo colpito da *rigor mortis* quando è contratto sarà più duro dopo la maturazione che un muscolo colpito allo stato di riposo.

#### MODIFICAZIONI BIOCHIMICHE DELLA CARNE DOPO L'ABBATTIMENTO

##### Trasformazione del glicogeno in acido lattico

Il muscolo vivente contiene glicogeno che viene quasi tutto utilizzato aerobicamente. L'acido lattico prodotto in anaerobiosi è generalmente poco e viene sempre ossidato o è stato per mezzo della circolazione sanguigna. Dopo la morte, l'apporto di sangue si arresta, la quantità di ossigeno fissata sulla mioglobina è esaurita e viene rapidamente consumata così la glicolisi aerobica si completa e porta alla formazione di acido lattico che si accumula nei tessuti. Questo fenomeno è molto importante perché è responsabile delle variazioni iniziali del  $\text{pH}$ , della capacità di ritenzione idrica del muscolo, ecc.

Numerosi enzimi cellulari intervengono in tutti questi stadi della degradazione del glicogeno in questa maniera:



Glicolisi anaerobia

↓  
ac. lattico

↓  
abbassamento pH

→ colore più vivace

→ basso potere di ritenzione idrica

→ attivazione cataprine

↓  
follatura

Esaurimento ATP

a) Fase di ritardo:

1)  $\begin{matrix} \nearrow CP \\ \searrow P \end{matrix}$

2) Glicolisi anaerobia

3) ricchezza in  $O_2$  del muscolo

b) Rigor mortis



## Glicogenolisi

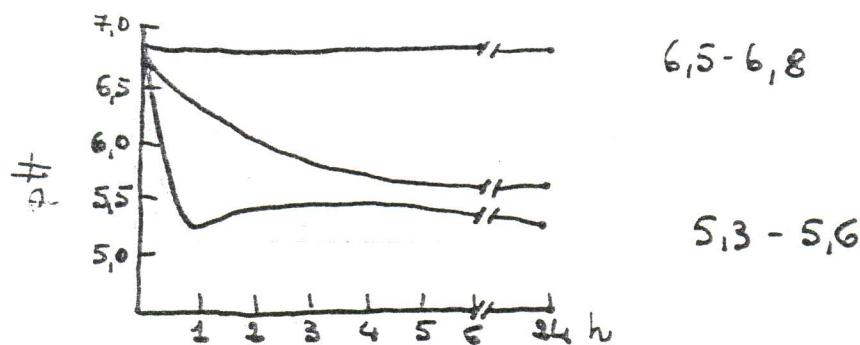
Fondamentale per

ostacolo batterico  
maturazione carne  
colore carne

Velocità dei processi di acidificazione

pH 1, pH 2 ecc

Come si misura il pH - (pH connettivo e grasso)  
Dove si " il pH - diverso



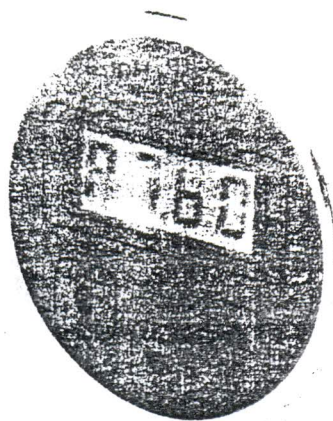
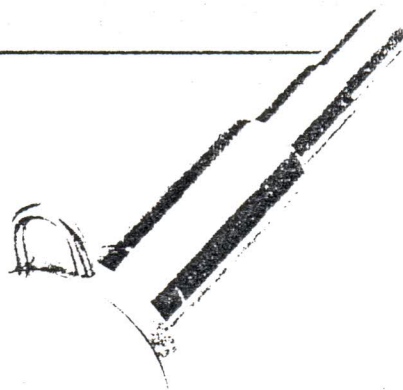
pH 24

|        |     |       |
|--------|-----|-------|
| Bovino | 5,5 | - 5,8 |
| Suino  | 5,6 | - 5,8 |
| Ovino  | 5,9 | - 6,2 |
| Equino |     |       |

Acidificazione insufficiente:  
carne strapassate, fessucolate, demeritate, mal  
dissanguate.

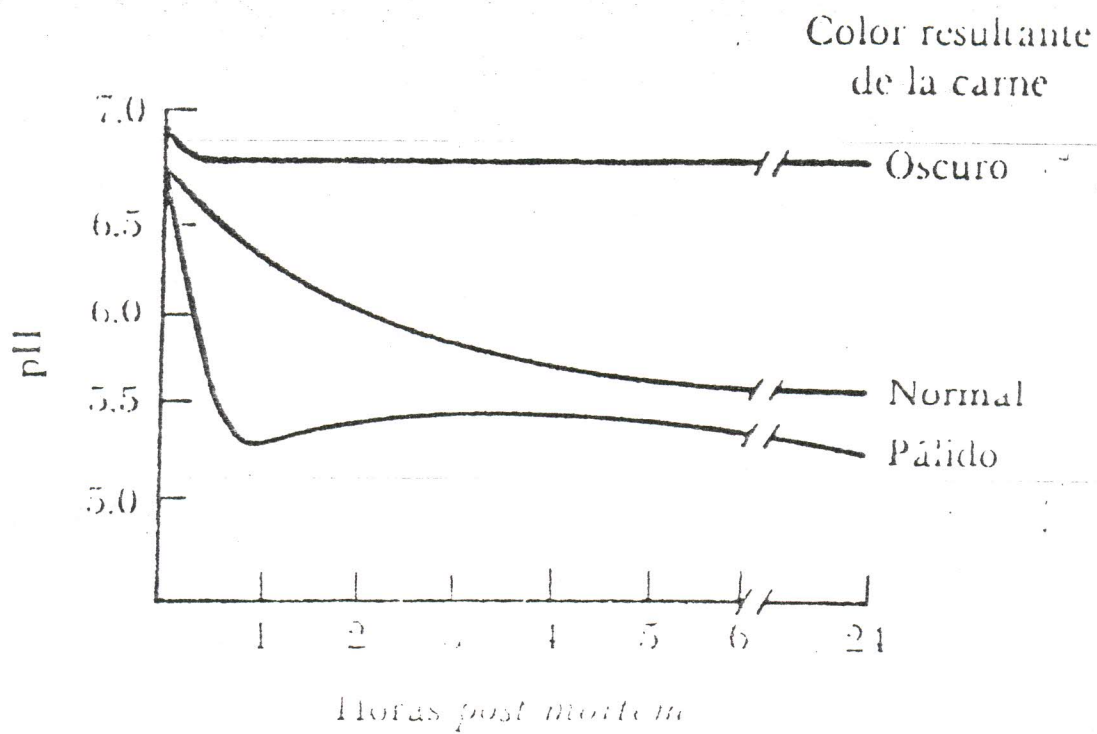
Acidificazione eccessiva  
origine batterica, stress





SONDA  
**pH-K21**

IL SISTEMA COMPUTERIZZATO DI CONTROLLO DELL'ACIDITÀ E ALCALINITÀ DELLE CARNI





## Denaturazione proteine

"una riorganizzazione fisica o intramolecolare che non implica idrolisi dei legami chimici che legano gli amminoacidi costituenti le catene polipeptidiche delle proteine"

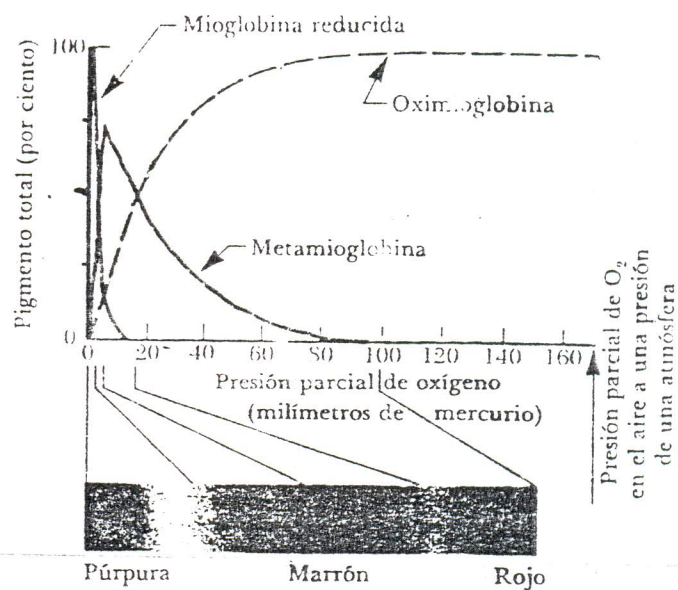
E' generalmente accompagnata da

- aumento di reattività dei vari gruppi chimici
- perdita attività biologiche (es. ormoni, enzimi)
- variazione della forma o delle dimensioni molecolari

Le proteine sono suscettibili di denaturazione se vengono assoggettate durante la frollatura a

- pH inferiori a quelli "in vivo"
- $t > 25^{\circ}\text{C}$  o  $< 0^{\circ}\text{C}$
- essiccamento
- concentrazioni saline non fisiologiche

Figura 8-6. Relación de la presión parcial de oxígeno de la atmósfera con los estados químicos del pigmento y con el color.



la produzione di metamioglobina è accelerata da tutte le cause che determinano la denaturazione della globina: basso pH,  $t^{\circ} > 25^{\circ}\text{C}$  o  $< 0^{\circ}\text{C}$ , concentrazioni saline non fisiologiche, luce UV.



# METODI USATI PER L'APPREZZAMENTO DELLE CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE

Diversi parametri possono essere presi in considerazione. I più facili da esplorare sono il pH e il potere di ritenzione idrico.

## MISURA DEL pH

Il pH si misura facilmente; esistono per questo diverse tecniche.

### Cartine indicatrici

Una delle più semplici consiste nell'utilizzare delle cartine indicatrici (cartine pH) imbevibili di una soluzione di indicazione colorata: il tornasole, il blu di bromofenolo, il blu di brotimolo per esempio. Entro i due punti estremi di viramento la carta può prendere differenti colori che vengono confrontati con quelli campione.

L'operazione è molto semplice e consiste nel praticare una piccola incisione in una massa muscolare e nell'introdurre la linguetta della cartina preventivamente umettata; si premono quindi i due lembi del muscolo sulla cartina per qualche secondo e dopo che quest'ultima si è colorata la si confronta con i colori campione. Questa tecnica ha per inconveniente la precisione media che è di 0,2-0,5 unità pH secondo la scala dei valori di scelta.

### Metodi colorimetrici *(non più utilizzati)*

I raffronti colorimetrici, come il raffronto di Bruère, possono rendere dei grandi servizi. La loro utilizzazione si attua attraverso la preparazio-

ne di 10 g di carne messa in un primo momento a macerare e della fil-  
trazione dopo l'aggiunta di un indicatore liquido colorato, il colore ot-  
tenuto viene quindi a sua volta raffrontato a quello di un campione.  
Più lungo del metodo della cartina indicatrice, la misura del pH realizza-  
ta attraverso il raffronto colorimetrico è però sensibilmente più precisa:  
l'errore di misura non è infatti superiore a 0,2 unità.

### Misure elettriche

Il metodo elettrico del pH è il metodo più moderno. Esso necessita del  
ricorso a un pHmetro portatile di cui esistono diversi modelli.

La misura è effettuata con un solo elettrodo costituito a sua volta dall'  
elettrodo di misura e dall'elettrodo di riferimento introdotto nello  
spessore della carne e immesso in un filtrato di macerazione. Il valore  
del pH è ottenuto immediatamente, attraverso la lettura diretta.

Questa tecnica è rapida e precisa ed il costo del materiale non è eccessi-  
vo sebbene occorra tener conto del fatto che esso è un apparecchio rela-  
tivamente fragile e delicato. La precisione della misura dipende esclusi-  
vamente dalla corretta realizzazione della misurazione stessa e dell'appa-  
recchio tanto che l'elettrodo dovrà essere accuratamente pulito dopo  
ciascuna misura. Malgrado ci sia qualche inconveniente, la misurazione  
elettrica deve comunque essere considerata come il metodo di elezione  
per la determinazione del pH.

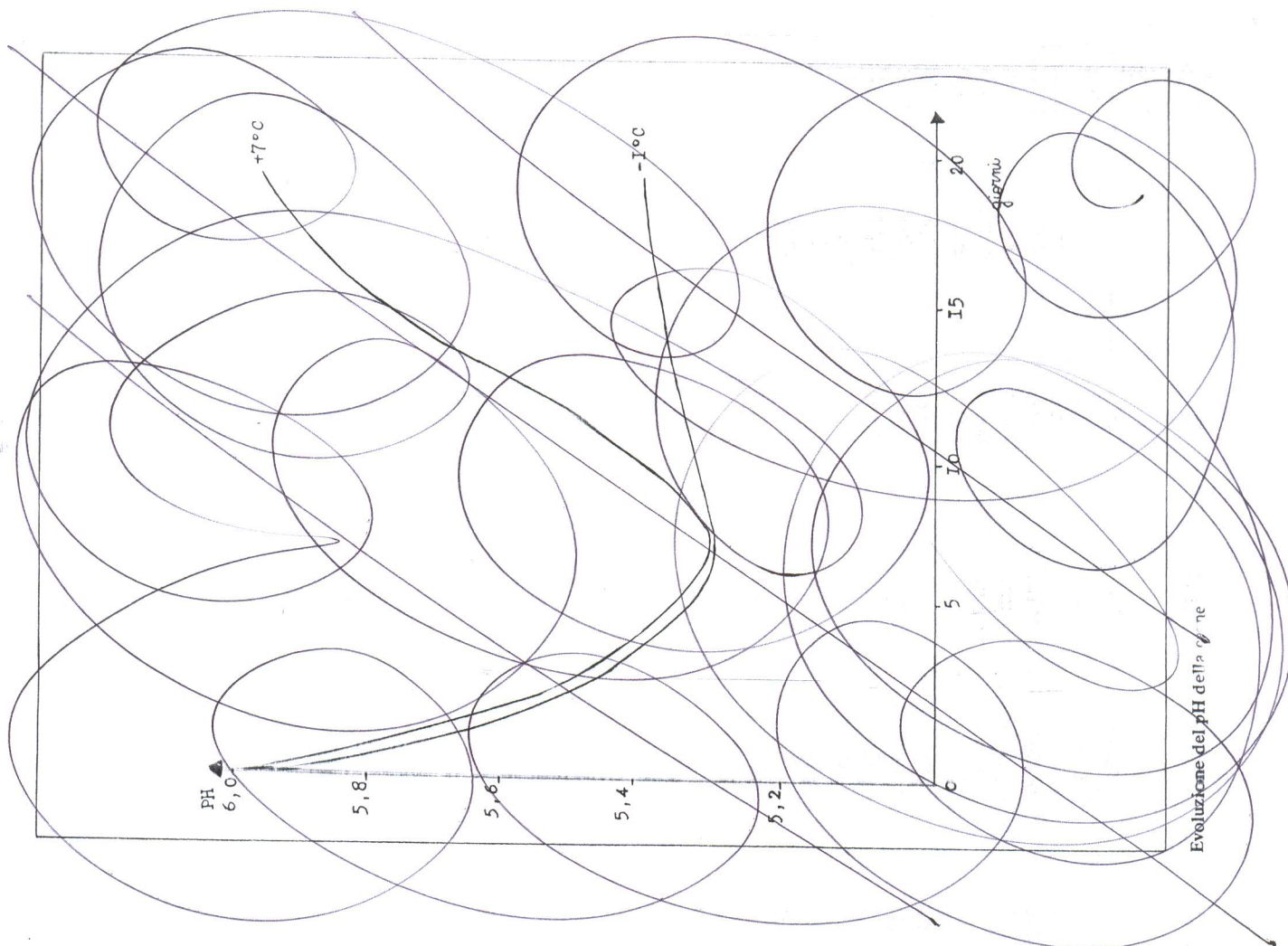
### Variazioni della misura

Nella figura seguente sono riportate le variazioni del pH del muscolo  
lungo-dorsale di bue conservato a  $-1^{\circ}\text{C}$  o a  $+7^{\circ}\text{C}$ . Si osserva una ca-  
duta rapida del pH nelle ore seguenti l'abbattimento attestanti un va-  
lore compreso tra 5,3 e 5,4. Questo fenomeno sembra sia dovuto allo  
svolgimento della glicogenolisi *post mortem*. Successivamente il pH del-  
la carne conservata a  $-1^{\circ}\text{C}$  subisce un aumento lento e progressi-  
vo, legato alle modificazioni chimiche che caratterizzano la maturazio-  
ne.

~~Il pH della carne conservata a  $+7^{\circ}\text{C}$  subisce invece un basso aumento  
che persiste dal 12-13 giorno, fino ad ottenere un valore almeno uguale a  
6,0.~~

~~Questa evoluzione è legata all'abbondante moltiplicazione di microorga-  
nismi di contaminazione e alle degradazioni chimiche che ne risultano.  
Pertanto da questo schema Dall'misura del pH si possono trarre due  
considerazioni:~~

Effettuato 36-48 ore dopo l'abbattimento esso permette di stabilire car-  
ni ad evoluzione anormale, carni cioè a pH anormalmente basso (carni





febbricitanti o carni (PSE) e carni a pH anormalmente elevato (carni strapazzate e carni DFD).

Effettuato diversi giorni dopo l'abbattimento esso ci informa sullo stato di conservazione della carne e di eventuali progressi delle alterazioni sotto l'influenza dei microrganismi di contaminazione.

## Muscoli PSE e DFD

Le carni PSE e DFD, creano, ciascuna per quanto la concerne, dei gravi problemi tecnologici.

Il caso di carni PSE, pallide, molli, essudate, il cui pH raggiunge molto precocemente dopo l'abbattimento dei valori anormalmente bassi, inferiori a 5,3-5,4 e varianti secondo la specie, è noto da molto tempo e quindi nessun professionista coscienzioso di fronte a queste carni, ne trascura la misura del pH. C'è tuttavia da notare che i continui progressi della ricerca zootecnica hanno contribuito a far diminuire notevolmente la frequenza di queste alterazioni. Ciò che non succede invece nel caso di carni DFD scure, anormalmente dure, asciutte, purtroppo in crescente aumento e di cui i professionisti devono oggi prendere in sempre maggior considerazione. Questo perché la valutazione obiettiva dell'appartenenza o meno a carni DFD non è sempre agevole poiché le classiche modificazioni descritte del colore e della consistenza fanno qualche volta difetto. Solo la misura del pH può fornire dei dati validi e orientare verso la diagnosi di tali carni.

Inoltre è necessario sottolineare che lo studio della evoluzione del pH di queste carni necessita di un protocollo rigido ed una scelta giusta dei muscoli utilizzati per la misura.

Sono state rivelate delle importanti modificazioni del pH, non solamente nei diversi muscoli ma ancora nelle differenti porzioni di uno stesso muscolo. / questo riguardo, si distinguono i muscoli omogenei, quali il grande roto, da quello il grande complesso, per i quali gli scarti di pH non superano le 0,1 unità, dai muscoli eterogenei, quali il retto dell'addome o il lungo anconeo rivelanti scarti di  $\pm 0,3$  unità.

Occorre raccomandare di limitarsi a misurare il pH a muscoli sufficientemente omogenei. A partire da calcoli statistici sono state elaborate delle formule che permettono di correggere gli eventuali scarti di pH, tra i vari muscoli e nei muscoli stessi.

~~Grossi è utilizzato per la misura il pettorale (grossa punta del petto) e il retto dell'addome (cerca del fianco = BF) la correzione da applicare è la seguente:~~

$$pH = 0,8204 + 0,5525pH(P) + 0,3128pH(BF)$$

~~Se si utilizza il pettorale e il lungo dorsale (falso filetto = FF):~~

$$pH = 1,2818 - 0,330pH(P) - 0,2049pH(FF)$$

~~Si prendono almeno 2 misure per muscolo e se applicando queste formule si ha che la carne quando il pH è misurato 24-48 ore dopo l'abbattimento è superiore a 6,0, questa carne dovrà essere considerata come carne DFD.~~

~~Ma quello che più conta, tra le altre cose, è che la misura del pH permette di stabilire l'età di conservazione delle carni.~~

~~Infatti, dalle misure effettuate a Nebeluk si deduce che è possibile distinguere, secondo il valore del pH, carni con "principio di putrefazione" (carni troppo vecchie o con un principio di alterazione da conservare entro la giornata) e "carni putrefatte" non commestibili. Questi valori sono riportati nella tabella seguente.~~

| Specie | Valori del pH nelle carni alterate  |                  |
|--------|-------------------------------------|------------------|
|        | Carne con principio di putrefazione | Carne putrefatta |
|        | pH                                  | pH               |
| Bovino | 6,2 - 6,7                           | > 6,7            |
| Suino  | 6,2 - 6,5                           | > 6,5            |
| Ovino  | 6,2 - 6,6                           | > 6,6            |
| Equino | 6,2 - 6,4                           | > 6,4            |

In pratica il professionista attento allorché troverà un valore di pH superiore a 6,0 procederà ad un'analisi chimica supplementare (dosaggio dell'TVN in particolare) al fine di scoprire una eventuale precoce alterazione della carne, impercettibile e non l'esame fatto sulla carne cruda ma rivelabile al momento della cottura e del consumo, attraverso un odore o un sapore anormale.

Bisogna anche considerare che sia dal punto di vista tecnologico che da quello igienico, il pH appare come uno dei parametri di misura indispensabili per stabilire la freschezza della carne.

Oltre la valutazione del pH, per diagnosticare meglio i muscoli PSE e DFD, si devono considerare altri metodi di analisi.

## METODI CHE PERMETTONO DI DETERMINARE IL TASSO DI DEGRADAZIONE DEI NUCLEOTIDI

Presente nel muscolo al momento dell'abbattimento, l'ATP scompare presto totalmente con l'instaurarsi della rigidità cadaverica. Nel tempo appaiono nel corso della maturazione, diverse sostanze, l'IMP in



particolare, degradato a sua volta fino allo stadio di ipoxantina, per azione enzimatica e batterica.

L'apprezzamento del tasso di questi differenti substrati e del rapporto delle loro concentrazioni, reso possibile dal progresso dell'analisi chimica, offrono un interesse di primo piano nell'apprezzamento della freschezza delle carni, sotto il duplice aspetto tecnologico e igienico.

### Dosaggio dell'ATP

Il dosaggio dell'ATP può essere facilmente realizzato oggi giorno attraverso la spettrofotometria dopo l'estrazione, attraverso l'acido perclorico, secondo il metodo descritto da Honikel e Fischer.

Si macinano da 1 a 8 g di carne per 30 secondi in presenza di 5-10 ml di acido perclorico 1 M e quindi il tutto viene poi filtrato; quindi 0,1 ml di filtrato vengono diluiti in 4,9 ml di tampone fosfato 0,1 M a pH 7. La misura consiste nel determinare l'assorbimento a 260 nm; il tampone fosfato viene utilizzato come prova sebbene necessiti il ricorso ad uno spettrofotometro. Il metodo è pratico e rapido giacché occorrono da 3 a 4 minuti per realizzare la totalità delle operazioni. Questi vantaggi sono tali che nei laboratori specializzati questo metodo ha soppiantato tutti gli altri: cromatografia o dosaggio enzimatico.

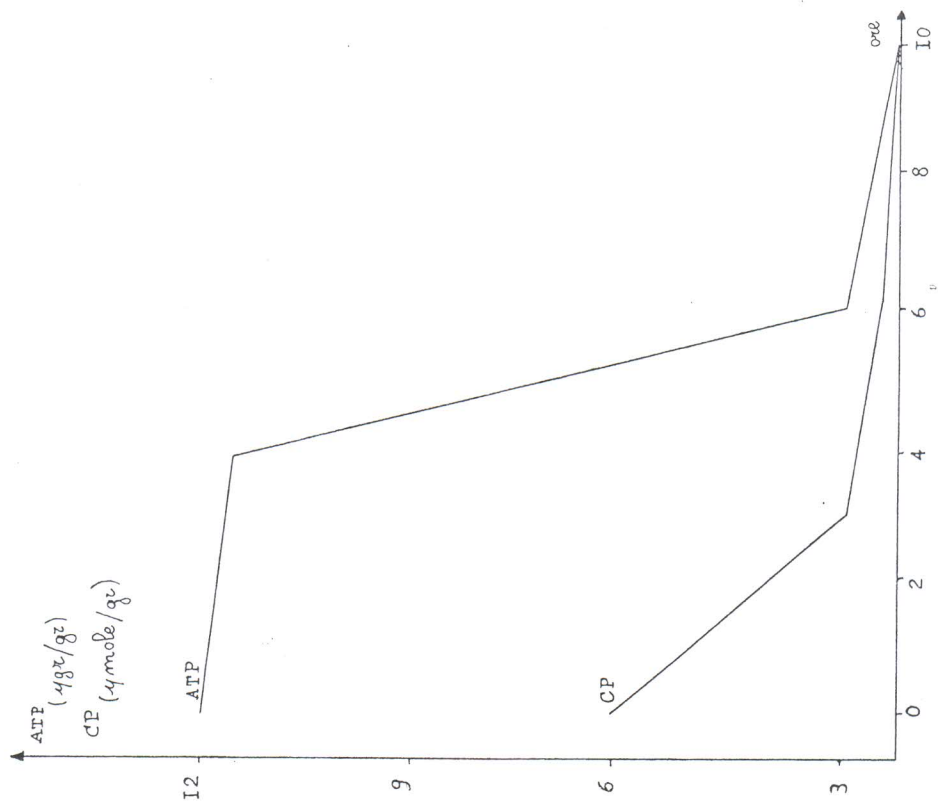
I risultati del dosaggio dell'ATP sono schematizzati nelle figure seguenti, a partire dai risultati ottenuti da Newbold dove si fa ugualmente vedere l'evoluzione del tasso di creatinfosfato (CP).

Si può constatare sulle tre figure che il tasso di ATP resta sensibilmente costante tanto che quello di creatinfosfato, necessario alla sua sintesi, resta sufficientemente elevato. Allorché la concentrazione di creatinfosfato cade al di sotto di 3  $\mu$  moli/grammo, il tasso di ATP comincia a calare.

La degradazione dell'ATP, molto rapida a 30 °C giacché essa è pressoché totale in 6-10 ore, è più lenta alle basse temperature<sup>1</sup> così come si può confrontare nelle rispettive figure. L'ultima figura ci fa vedere che il congelamento arresta i processi di degradazione dell'ATP; mentre essi riprendono con lo scongelamento, a una velocità più o meno rapida a

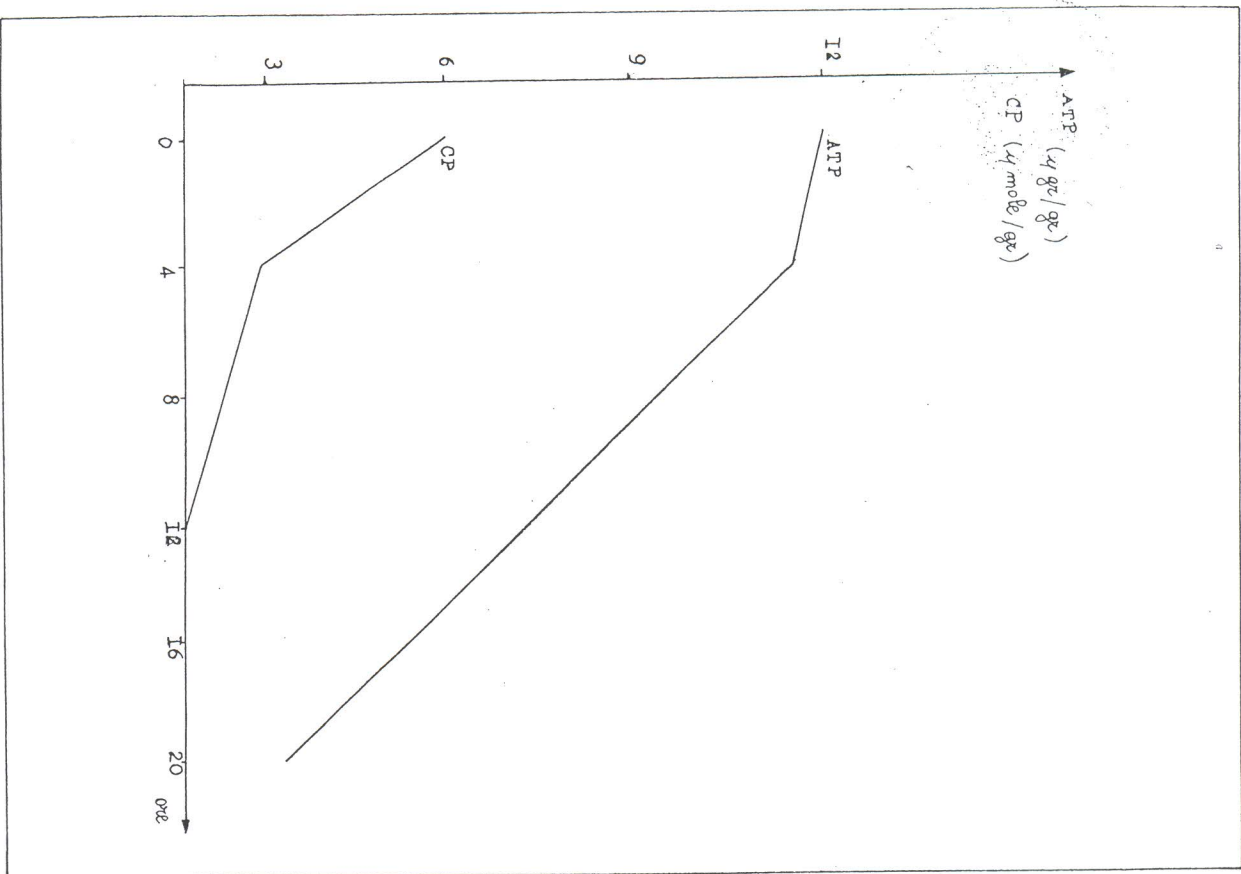
1 Diversi lavori hanno mostrato un relativo aumento della velocità di degradazione dell'ATP con temperature comprese tra i +6 °C e i -1 °C dovuto alla liberazione di una quantità più elevata di calcio. I risultati espressi da Newbold restano tuttavia corretti in valore assoluto.

Ai nostri occhi l'interesse di queste misure è legato soprattutto alla tecnologia delle carni congelate. C'è tuttavia da notare che il dosaggio dell'ATP residuo presente nelle carni permette di conoscere il periodo di tempo trascorso tra l'abbattimento e il momento della congelazione. Si può altresì presumere che lo stato entro il quale si troverà la carne dopo il suo abituale congelamento, può essere quello di una carne palpitante, di una carne in stato di rigidità cadaverica o di una carne in fase di maturazione. Si dovrà allora attuare a seconda del caso le tecniche di trattamento e di trasformazione più adatte.

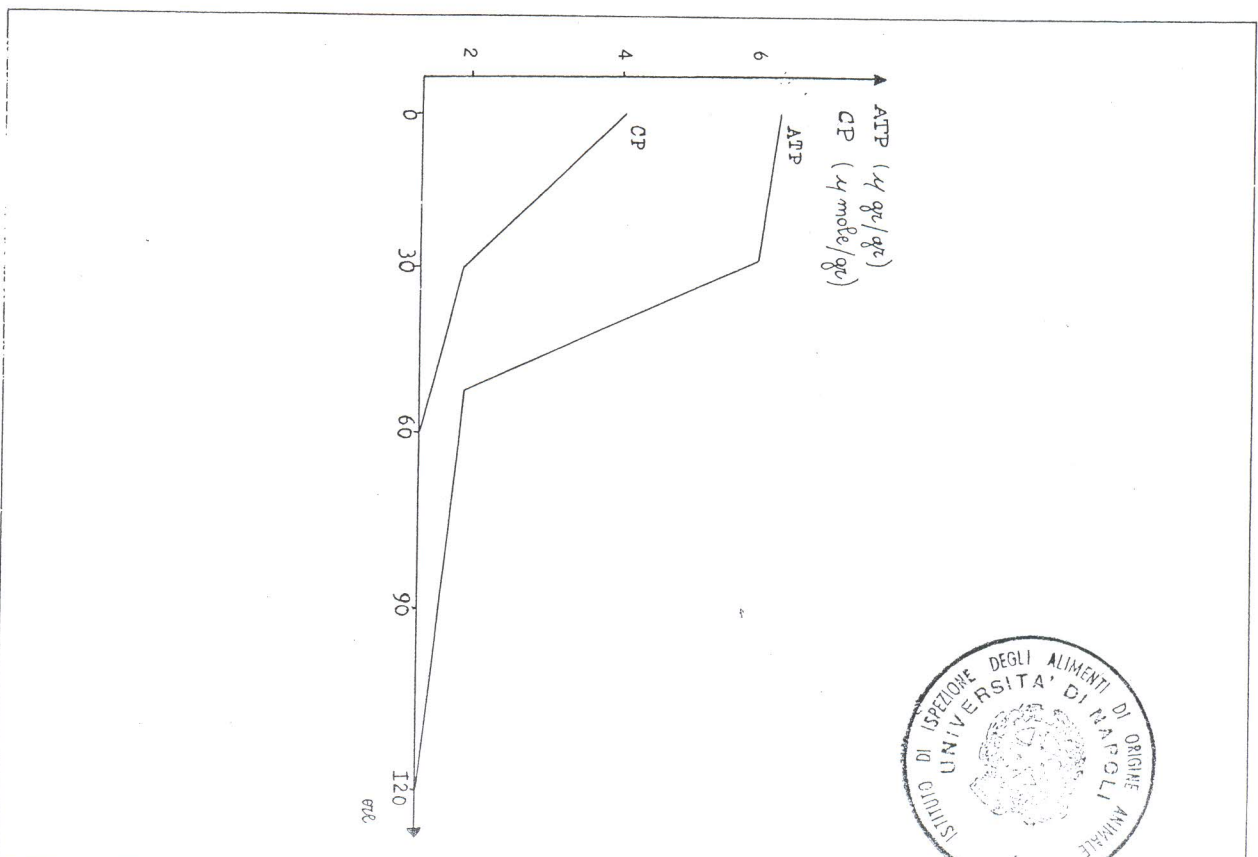


Evoluzione del tasso di ATP a 37 °C





Evoluzione del tasso di ATP a +1 °C



Evoluzione del tasso di ATP in carni congelate due ore dopo l'abbattimento, quindi scongelate e portate alla temperatura di 22 °C



seconda della temperatura alla quale quest'ultima operazione viene condotta.

A queste condizioni, la misura del tasso di ATP ci fornisce delle indicazioni interessanti sull' "età" delle carcasse, o meglio sul grado di evoluzione del muscolo nella ventina di ore seguenti l'abbattimento; la misura del tasso di ATP permette altresì di distinguere lo stato palpitante dallo stato di rigidità cadaverica.

Determinazione del rapporto IMP/ATP

Il rapporto della concentrazione di queste due sostanze in un campione di carne può essere determinato attraverso delle misure spettrofotometriche.

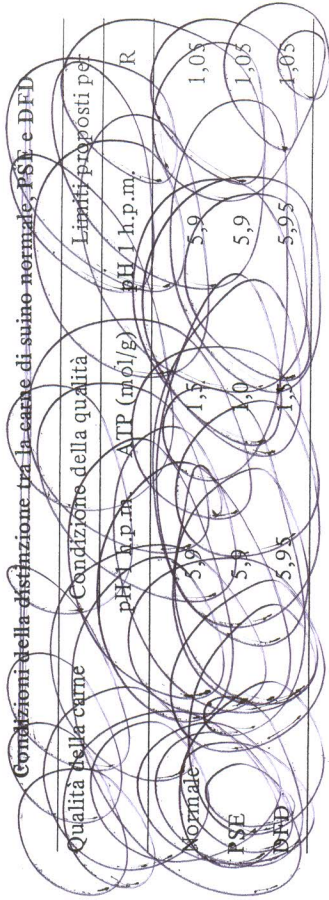
Il campione di carne è trattato come con la tecnica precedente attraverso il dosaggio dell'ATP e nel valutare il rapporto, designato con la lettera R, dell'assorbimento a 250 nm (massimo assorbimento dell'IMP) e a 260 nm (massimo assorbimento dell'ATP). L'interesse primario della determinazione di questo rapporto è quello di permettere una visione precoce delle carni a evoluzione normale, carni PSE e carni DFD. I lavori di Potthast e Hamm hanno rilevato in effetti delle differenze significative del tenore di ATP e di IMP delle carni normali da una parte, e delle carni PSE e DFD dall'altra, un'ora solamente dopo l'abbattimento come si vede nella tabella seguente.

Concentrazioni medie di ATP e di IMP nel muscolo di suino  
1 h e 24 h dopo l'abbattimento

| Nucleotide mole/g<br>di carne | Muscolo normale |           |          | PSE     | DFD |
|-------------------------------|-----------------|-----------|----------|---------|-----|
|                               | 1 h.p.m         | 24 h.p.m. | 1 h.p.m. |         |     |
| ATP                           | 2,0-5,0         | 0-0,2     | 0-0,6    | 0-1,45  |     |
| IMP                           | 1,0-3,0         | 6,8-8,0   | 4,4-7,1  | 3,0-6,1 |     |

Honikel e Fischer, Honikel e Hamm hanno dimostrato che queste differenze si traducono in una modificazione del valore R esprimente il rapporto IMP/ATP. Nelle carni normali, R è inferiore o tutt'al più uguale a 1,05. Per le carni PSE o DFD, R è sempre superiore a questo valore. Lo stesso rapporto IMP/ATP non permette altresì che di classificare le carni in due categorie: le carni a evoluzione normale e le carni ad evoluzione anormale. Tuttavia, secondo questi autori, una volta riconosciute le carni a evoluzione anormale, la misura del pH, effettuata ugualmente 1 ora dopo l'abbattimento permette di distinguere ~~le carni PSE~~ con

una certa certezza ~~di più del 97%~~ secondo ~~dati riprodotti nella seguente~~  
~~tabella~~ le carni ~~normali~~.



Semplice e rapido, l'apprezzamento del rapporto IMP/ATP attraverso lo spettrofotometro, eventualmente associato alla misura del pH, permette di scoprire in un tempo breve dopo l'abbattimento, le carni a evoluzione normale, carne PSE o DFD. Il tempo necessario per la misura è senz'altro ancora troppo lungo per essere compatibile con il ritmo di lavoro di una catena di abbattimento, restringendo quindi le possibilità pratiche di applicazione di questa elegante tecnica.

Diversi metodi di misura di ATP associati a reazioni enzimatiche e bicoluminescenti (Wettermark e coll.) sono allo studio nei diversi laboratori, questi metodi più costosi se confrontati con quelli imposti, ma molto rapidi apporteranno senza dubbio, in un prossimo avvenire, la soluzione al problema della diagnosi precoce delle carni a evoluzione anormale.

Determinazione del tasso di ipoxantina

L'ipoxantina rappresenta uno degli ultimi stadi della degradazione dei nucleotidi, per azione chimica o microbica.

Un metodo di dosaggio è stato messo a punto da Spinelli. Dopo eluzione su colonna, l'ipoxantina è trasformata in acido urico per azione dell'ipoxantina ossidasi. L'acido urico formato è allora dosato per lo spettrofotometro d'assorbimento a 290 nm. I risultati del dosaggio ottenuto sulle carni da von Gissel e coll. mostrano un aumento regolare del tasso d'ipoxantina con il tempo. Questi autori constatarono che una carne in cui ci siano dosi di 280-300 mg/g di ipoxantina è al limite del consumo. Si contiene più di 300 mg/g la carne è alterata e non adatta al consumo umano. Il dosaggio dell'ipoxantina è stato finora utilizzato per mettere in evidenza o meno lo stato di freschezza del pesce, ma costituisce anche un test obiettivo e affidabile che permette di giudicare la freschezza della carne, vista soprattutto sotto l'aspetto igienico.



## DOSAGGIO DELL'AZOTO BASICO VOLATILE (TVN) E DELLA TIROSINA

I composti usciti dalla degradazione delle proteine sono numerosi e i laboratori dispongono di un gran numero di metodi che permettono di caratterizzarli e di dosarli. Tra questi, due ricerche si sono imposte per la loro semplicità: il dosaggio dell'azoto basico volatile totale e il dosaggio della tirosina.

### Dosaggio dell'azoto basico volatile totale

L'azoto basico volatile totale o TVN corrisponde all'ammoniaca o alle ammine volatili uscite dalla degradazione delle proteine sotto l'azione degli enzimi della maturazione o soprattutto degli enzimi microbici. La tecnica di dosaggio è molto semplice, sia che si usi il macrometodo sia il micrometodo.

Nel macrometodo (Pantaleon e coll.), 10 g di carne viene miscelata con 10 ml di acqua; dopo l'espulsione delle proteine attraverso il ferrocianuro di zinco, il TVN è trasferito attraverso il carbonato di litio (20 cc di soluzione satura) e trascinato attraverso il vapore acqueo. Il distillato, raccolto in 20 cc d'acqua distillata addizionata a 5 gocce di alizarina sulfonata viene utilizzata come indicatore colorato, è titolato attraverso i valori dell'acido solforico.

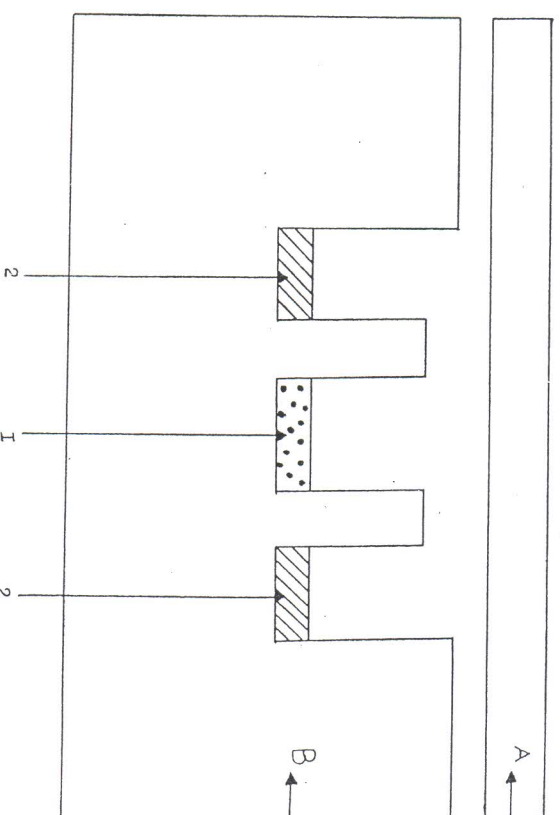
$$(\text{TVN mg}/100 \text{ g} = 17 \times n \text{ cm}^3 \text{ d'H}_2\text{SO}_4 \text{ N}/10)$$

Semplice e rapido questo metodo non presenta che l'inconveniente di un impianto vetrario voluminoso e poco malleabile in ragione della sua fragilità.

Il micrometodo sofferisce a questo inconveniente grazie all'utilizzazione di una cellula di Conway come si può vedere nello schema di funzionamento rappresentato dalla figura seguente.

Per la realizzazione pratica si prendono 10 g di carne che vengono miscelati con 100 ml di  $\text{H}_2\text{O}$ , quindi al miscuglio così ottenuto vengono addizionati 25 ml di acido trichloroacetico al 20% e quindi il tutto filtrato. Dopo aver messo nella parte centrale della cellula di Conway un reagente e cioè dell'acido bórico che assorbirà ulteriormente le TVN, 1 ml viene immesso nella corona della cellula; si aggiungono quindi 0,5 ml di acqua e 1 ml di soluzione satura di carbonato di potassio. La cellula viene ermeticamente chiusa, quindi fatta ruotare dolcemente per assicurare la mescolanza dei reattivi e per ultimo incubata 1 ora e 30 minuti a  $40^\circ\text{C}$  o 2 ore a  $35^\circ\text{C}$  o 3 ore alla temperatura di laboratorio. Il TVN mescolato e assorbito attraverso la soluzione di acido carbonico viene titolato direttamente nella cellula dell'acido carbonico N/50 (1 ml = 0,28 mg d'azoto).

A = coperchio girevole  
B = capsula



Sezione trasversale di una cellula di Conway (diametro = 15 cm).

1. reagente all'acido bórico.
2. filtrato.

Si ammette che per le carni crude fresche, refrigerate o congelate, il tenore in TVN x 100 g non deve superare 20 mg; al di sopra di questa cifra, esse si possono considerare allo stato iniziale di alterazione mentre il doppio di questa cifra corrisponde ad uno stato avanzato di putrefazione (per i prodotti insaccati freschi, crudi o cotti, il TVN non supera 60 mg/100 g e per i prodotti maturati, fermentati o essiccati 100 mg/100 g).

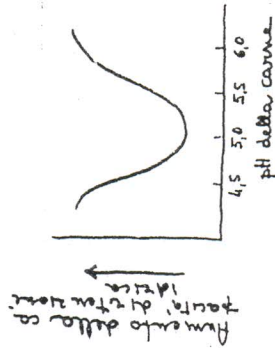
Facile da eseguire, elementare da interpretare e oltretutto affidabile, il

## Capacità di ritenzione idrica

Riguarda soprattutto l'acqua "libera", quella cioè che è immobilizzata dalla configurazione fisica delle proteine, ma non è legata ad esse.

Diminuisce se:

- ci si avvicina al punto isoelettrico della mioglobina
- diminuisce l'ATP
- le proteine sono denaturate



dosaggio del TVN si può considerare il metodo di elezione per determinare lo stato di conservazione delle carni.

Esso può essere praticato da persone senza alcuna esperienza di laboratorio e poi è applicabile anche a tutti i tipi di carne e in particolare alle carni congelate, per le quali la quantità di carne necessaria per l'analisi viene prelevata con la sgorbia senza aver bisogno di scongellarle, per cui

viene comunemente praticata per il sondaggio di lotti di carcase congelate; inoltre essa presenta il pregio di avere un costo molto modesto.

## Dosaggio della tirosina

La tirosina è l'aminoacido più precocemente liberato in occasione dell'alterazione della carne sotto l'azione dei microrganismi.

Una tecnica di dosaggio utilizza come prova di valutazione l'estratto di acido tricloroacetico preparato come per la reazione dell'acido tiobarbiturico (vedi sopra) e cioè si prendono 2,5 ml di estratto tricloroacetico che vengono diluiti con 2,5 ml di acqua; si aggiungono quindi 10 ml di soda 0,5 N e poi 3 ml di reagente di Folin diluito (1 parte di reagente e 2 parti di acqua); si mescola bene e il colore che apparirà dopo 15 minuti di riposo alla temperatura del laboratorio è misurato al fotocolorimetro a 660 nm. I risultati sono espressi in mg di tirosina per grammo di carne.

Utilizzando questa tecnica Strange ottenne i risultati rappresentati nella figura precedente dove si può vedere che il tasso di tirosina aumenta lentamente e regolarmente in funzione della durata di stoccaggio e di progresso dell'alterazione delle carni sotto l'influenza combinata della maturazione e dell'attacco da parte dei microrganismi. È significativo a questo riguardo constatare che l'aumento del tenore nella carne di tirosina è più rapido a +7 °C che a -1 °C.

Il significato di questo test e l'evoluzione del carattere misurato sono sovrapponibili in tutti i punti alle indicazioni date dal dosaggio del TVN ma non sono a nostra conoscenza lavori fissanti, come per il TVN, dei valori limite.

## MISURA DEL POTERE DI RITENZIONE IDRICA

Diversi metodi, designati dagli autori anglosassoni sotto il termine di Water Holding Capacity o WHC, permettono di misurare il potere di ritenzione idrico delle carni.

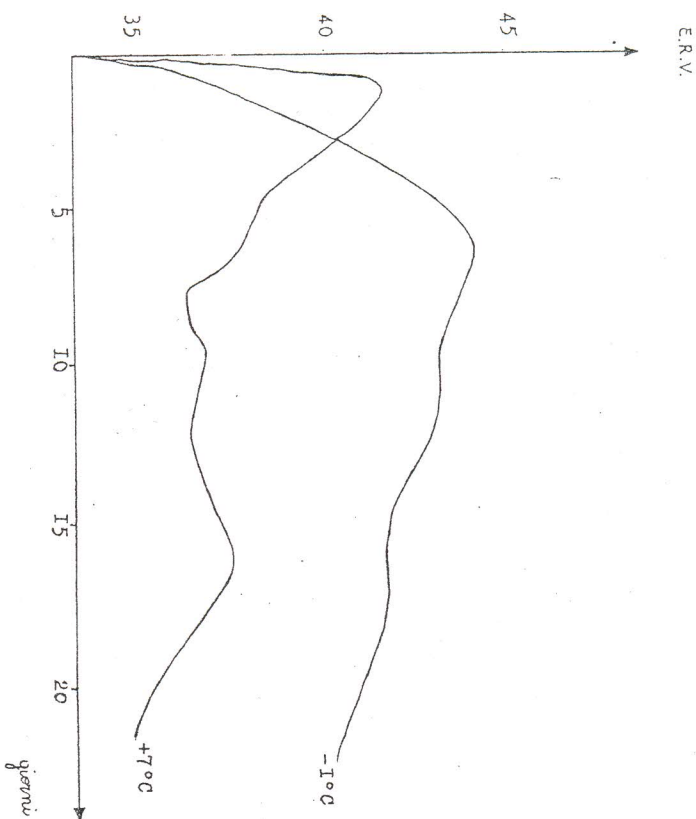
Alcune tecniche di misura procedono attraverso la centrifugazione di carne macinata su filtro di vetro ruvido seguita dalla misura del volume di liquido raccolto.

Altre, più numerose, che partendo dalla pressione esercitata, su di un campione di carne, da un torchio comandato a mano o attraverso un pistone cadente da un'altezza costante, con pressione e durata d'applicazione strettamente definite, permettono di misurare direttamente il volume d'acqua spremuto, oppure indirettamente, attraverso il calcolo dell'area disegnata dal succo raccolto su una carta assorbente.



## Extrait Release Volume

Un'altra tecnica, più elaborata, definita da Jay permette una misura più precisa: essa consiste nel determinare ciò che l'autore chiama l'*Extrait Release Volume (ERV)*.



Evoluzione del potere di ritenzione idrico della carne misurata attraverso l'Extrait Release Volume.

Si prendono 15 g di carne macinata a cui si aggiungono 60 ml di acqua, quindi il tutto viene lasciato a macerare per 2 minuti, dopodiché viene filtrato su carta Whatman; la misura si fa poi sul volume del filtrato.

Utilizzando quest'ultima tecnica Strange e coll. ottennero dei risultati, espressi nella figura precedente, a partire da campioni di muscolo lungo dorsale conservati a  $-1^{\circ}\text{C}$  e a  $+7^{\circ}\text{C}$ .

Le curve ottenute mostrano che l'PERV aumenta rapidamente negli istanti successivi l'abbattimento; questa evoluzione spiega la diminuzione del potere di ritenzione idrico delle carni associate alla perdita di ATP e alla caduta del pH.

Successivamente nelle carni conservate a  $-1^{\circ}\text{C}$  l'PERV diminuisce progressivamente in seguito a un leggero aumento del potere di ritenzione idrico associato all'aumento del pH e ai progressi della maturazione. Nelle carni conservate a  $+7^{\circ}\text{C}$  l'PERV diminuisce molto rapidamente e la sua caduta è tanto più marcata quanto più rapide sono le alterazioni subite dalla carne, secondo le ricerche di Strange, fino ad arrivare ad un valore di ERV nullo nella carne putrefatta.

Esprimendo la forza di legame dell'acqua alle proteine muscolari, l'PERV si trova in stretta relazione con il pH. In questo senso, misure prese tra le 36 e le 48 ore dopo l'abbattimento, permettono di precisare le indicazioni date con la determinazione del pH e di verificare, nei casi dubbi, il carattere anormalmente secco o anormalmente esudato di certe carni. Il valore dell'ERV può essere però modificato da un aumento dell'alterazione della carne in seguito allo sviluppo e all'azione di microrganismi di contaminazione. Questa misura realizzata dopo diversi giorni di conservazione permette allora di scoprire della carne in via di putrefazione. A questo proposito, diversi autori ammettono il valore di 20 ml come il limite oltre il quale le carni devono considerarsi alterate. C'è tuttavia da notare che la interpretazione dei risultati forniti attraverso questo test vanno presi con precauzione se non con riserva specialmente quando esistono variazioni di stato in diverse parti della carcassa stessa, tanto che questa sola misura non permette di distinguere tra la carne DFD e la carne in via di alterazione. La misura dell'ERV è una tecnica semplice e agevole per il controllo di routine sebbene però essa non possa essere considerata come un metodo integrativo.

## METODI CHE PERMETTONO DI DETERMINARE IL TASSO DI DEGRADAZIONE DELLE SOSTANZE GRASSE

Tre metodi sono utilizzati nella pratica quotidiana.

Uno consiste nel determinare il tasso di acidi grassi liberi, un altro è basato su una reazione dell'acido tiobaciturico, l'ultimo corrisponde alla determinazione dell'indice di Kreiss.



### Determinazione del tasso di acidi grassi liberi

Diverse tecniche sono state definite e analizzate da Mehlenbacher e tutte basate sullo stesso principio: estrazione degli acidi grassi liberi attraverso dei solventi organici appropriati (miscela alcool-etere di petrolio; miscela alcool-clorofornio; benzene; isopropanolo; miscela isopropanolo-toluene) e quindi dosati con una base forte.

Semplici come concetto, queste tecniche, nella pratica abbisognano per la loro messa in opera di attenzione; esse richiedono infatti particolari accorgimenti nella manipolazione dei solventi, sovente infiammabili; in compenso però esse ci assicurano una estrazione prolungata di acidi grassi.

I lavori svolti da diversi ricercatori hanno messo in evidenza un aumento del tasso di acidi grassi liberi in concomitanza con la durata di conservazione delle derrate. Infatti, secondo Monvoisin, il grasso addominale fresco di bue dà una acidità libera dello 0,28%. Per Lea, citato da Drieux e coll., questo tasso passa all'1,5%, per il grasso conservato 25 gg a 0 °C. Dopo 42 giorni a questa temperatura, esso si eleva fino a valori compresi tra 5 e 11%. Da ricerche effettuate Pearson asserisce che per le carni fresche poste in vendita nelle macellerie al dettaglio, il tasso di acidità libera varia da 0,38 a 1,75% per il grasso di bue. La variazione di gusto è percepibile dai consumatori allorché questo tasso è superiore al 2% sebbene sembri che in queste condizioni un tasso di accettabilità possa essere fissato a 1,8%.

### Reazione dell'acido tiobarbiturico (T.B.A.)

Messa a punto da Witte e coll. questa reazione è più facile e più rapida da mettere in opera che non il metodo precedente.

In pratica essa consiste nel misurare all'elettrofotometro l'intensità della colorazione rossa, che a sua volta rispecchia la reazione dell'acido tiobarbiturico con i diversi residui carbonici usciti dalla degradazione dei perossidi.

Per la sua realizzazione pratica si procede in questo modo: 20 g di carne sono macinati a freddo (4 °C) e miscelati con 30 ml di acqua e soluzione al 20% di acido tricloroacetico in acido formico 2M; il tutto viene poi messo in una provetta graduata di 100 ml e il recipiente prima servito alla macinatura viene risciacquato con 40 ml di acqua distillata che sono poi raccolti nella provetta graduata. Dopo aver aggiunto acqua distillata fino a raggiungere il valore di 100 ml; il contenuto della provetta viene omogeneizzato e poi filtrato. Quindi 5 ml di filtrato sono mischiati con 5 ml di acido 2-tiobarbiturico 0,005 M e il tutto conservato per 15 ore alla temperatura di laboratorio oppure 30 minuti a 100 °C; il colore rosso sviluppato è quindi misurato allo spettrofotometro a 530 nm.

Se è vero, come l'esperienza insegna, che esistono importanti variazioni individuali nelle varie carcasce conservate in identiche condizioni, l'esplorazione attraverso questo parametro può nondimeno permettere di distinguere le carcasce conservate da appena qualche giorno (meno di 5 giorni per esempio) da quelle che sono conservate da più lungo tempo (10 giorni e più).

### Determinazione dell'indice di Kreiss

Questa tecnica si basa sulla misura al fotocolorimetro di una colorazione rossa nata dalla reazione del fluoroglucinolo con i perossidi delle materie grasse, in mezzo acido. Molto sensibile, questa tecnica permette di scoprire gli stadi più precoci dell'ossidazione dei grassi sebbene tuttavia, essa sia troppo delicata per essere utilizzata nella pratica corrente. Esistono quindi diversi metodi che permettono di apprezzare la degradazione dei grassi. Tuttavia essi comportano l'uso di diversi parametri con anche differenti significati: così il tasso di acido di grassi liberi esprime il grado di idrolisi della materia grassa sotto l'influenza delle lipasi tissulari o microbiche, tanto che l'acido tiobarbiturico e l'indice di Kreiss misurano il loro tasso di ossidazione.

### METODI BASATI SULL'APPREZZAMENTO DEL COLORE DELLE CARNI

Le modificazioni di colore delle parti superficiali delle carni è un carattere facile da osservare e misurare.

I tecnici hanno a loro disposizione dei metodi sia soggettivi che oggettivi.

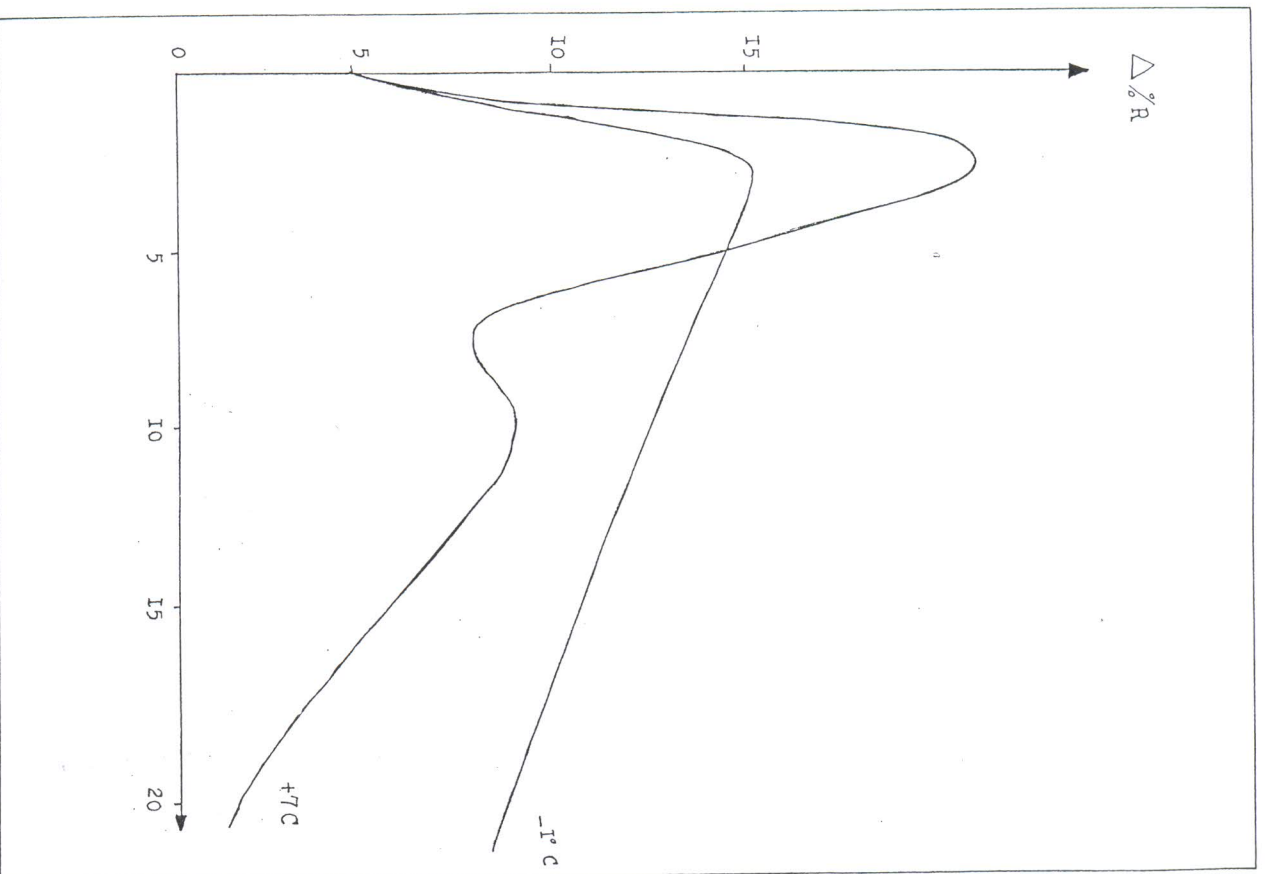
### Metodi soggettivi

Si basano sul raffronto tra il colore della carne in esame e una serie di campioni di colori. Così esiste tra l'altro, per esempio, una scala di colori proposti per i bovini dello Stato del Wisconsin (USA), e una scala, detta scala di Clausen, utilizzata in Danimarca per i suini.

~~Comunque diciamo che si può ugualmente apprezzare il colore della carne per mezzo di un colorimetro del tipo Labibond appositamente campionato. Questi metodi presentano il vantaggio di essere facili da realizzare.~~

~~Sebbene essi siano assai poco affidabili per la misurazione là dove i carni non rischiano di alterarsi, per cui il più delle volte non esiste che una concezione approssimativa tra il colore della carne e quello del campione, si può quindi dire che essi non apportano che un po' d'informazione in più al solo esame diretto delle carcasce.~~





Evoluzione del colore della carne

## Metodi obiettivi

Consistono nel determinare gli spostamenti tra la curva della carne ir esame e curve caratteristiche. La misura viene effettuata molto semplicemente per mezzo di uno spettrofotometro equipaggiato di una cellula speciale.

Si effettuano due misure: una a 630 nm, l'altra a 580 nm. Il valore preso per il giudizio è dato dalla differenza esistente tra queste due misure. Questo è il cosiddetto "colore valore" degli autori anglosassoni designato con la sigla  $\Delta\% R$  (Strange e coll.) che è misurato su dei muscoli lungo-dorsali di bue conservati a  $-1^\circ\text{C}$  o a  $+7^\circ\text{C}$ , ha dato i risultati illustrati nella figura seguente.

La  $\Delta\% R$  varia molto tra le due temperature di conservazione. A  $-1^\circ\text{C}$  dopo un aumento molto rapido, nelle prime ore dopo l'abbattimento, legato alla produzione di una notevole quantità di ossiemoglobina,  $\Delta\% R$  diminuisce lentamente e progressivamente. A  $+7^\circ\text{C}$ , dopo la stessa fase di aumento rapido, la curva assume una rapida e marcata diminuzione legata al colore scuro assunto dalla carne superficialmente e dovuto essenzialmente all'azione di fattori microbici. Il valore 10 sembra essere un valore limite a partire dal quale è possibile distinguere le carni fresche ( $\Delta\% R$  10) da quelle dove il colore si è alterato. Semplice, rapido e senza la necessità di effettuare alcun prelievo particolare, questo metodo può essere utilizzato con profitto nella pratica.

Si deve tuttavia segnalare la necessità di tener conto delle variazioni individuali dovute alla percentuale di mioglobina presente nei muscoli, legata all'età dell'animale e alla sua alimentazione.

## METODO DI RIVALTA PER LA DISTINZIONE TRA ESSUDATO E TRASUDATO

La reazione consiste nel lasciar cadere una goccia del liquido in esame in un cilindro contenente una soluzione molto diluita di ac. acetico (2 gocce di acido acetico in 200 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata). La goccia dell'essudato, avendo un peso specifico più alto, scenderà verso il fondo lentamente formando una lieve nubecola, simile a fumo di tabacco. La reazione non avviene se si tratta di trasudato; tale fenomeno è attribuito alla maggiore quantità di proteine presenti nell'essudato.

## METODO PER LA DIAGNOSI DIFFERENZIALE FRA ITTERO E ADIPOXANTOSI (Cantoni, Molnar, Gervasini)

In laboratorio, la diagnosi differenziale tra adipoxantosi ed ittero ai fini della ispezione delle carni, è assai problematica nonostante i numerosi metodi proposti. Noi proponiamo un metodo di facile e semplice attua-

zione basato sull'adsorbimento dei pigmenti biliari su ossido di alluminio attivato, che ci sembra avere risolto la questione.

Il metodo è il seguente: g 20-30 di grasso bovino vengono disciolti in mixer con ml 30-50 di clorofornio. Si filtra successivamente su filtro di carta per ottenere un liquido perfettamente limpido.

La soluzione clorofornica viene percolata attraverso una colonna di allumina neutra Merck (attività 1 sec. Brockman), preparata intasando la allumina secca in una colonna da cromatografia del diametro di mm 10-20 per una altezza di mm 50.

Percolata la soluzione si lava l'allumina con ml 50 di clorofornio puro per eluire tracce di grasso residuo e gli eventuali pigmenti carotinoidi. Successivamente si lava l'allumina con ml 20 di alcool etilico per eliminare il clorofornio e si esegue la reazione di Ehrlich diazotando in colonna con ml 2 di una miscela in parti uguali di acido solfanilico 1% in HCL e  $\text{NaNO}_2$  0,5% preparata al momento.

In presenza di bilirubina la parte superiore della colonna assume una colorazione violacea o rosa a seconda della quantità presente.

10 gamma di bilirubina danno un anello rosa ben visibile, ma al di sotto di questa quantità l'apprezzamento è ancora possibile.

#### RICERCA DEI SOLFITI

L'uso dell'anidride solforosa aggiunta solitamente come additivo sotto forma di biosolfati solfiti, bisolfiti o metabisolfiti può essere classificato nel seguente modo:

- 1) inibizione dell'imbrunimento enzimatico
- 2) inibizione di alcune reazioni enzimatiche, specialmente "imbrunimento enzimatico"
- 3) azione antiossidante e riducente
- 4) inibizione e controllo batterico

Esistono due metodi per riconoscere qualitativamente la presenza di solfiti nelle carni.

#### Metodo lento (Blanchard e Pantaleon)

*Principio.* I solfiti alcalini in mezzo cloridrico e in presenza di iposolfito di sodio e di tungstato di sodio, danno una reazione colorata specifica e molto sensibile.

*Reattivi.* Soluzione acquosa al 15% di ferrocianuro di K cristallizzato soluzione acquosa al 30% di acetato di Zn  
soluzione acquosa di tungstato di sodio cristallizzato

reattivo all'iposolfito di Bougault: iposolfito di sodio g 20, ac. cloridrico concentrato cc 200;  $\text{H}_2\text{O}$  distillata cc 20.

*Materiale.* Beuta pirex; carta da filtro; provetta graduata con tacca a 50 cc; provette.

*Tecnica.* 5 grammi di carne trita sono macerati in provetta graduata a 50 cc con 30-40 cc di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata. Dopo 20' di saltuaria agitazioni si procede alla defecazione previa macerazione.

0,5 cc di soluzione acquosa al 15% di ferrocianuro di K cristallizzato sono aggiunti al liquido di macerazione contenuto nella provetta graduata; dopo mescolamento si aggiungono 0,5 cc di soluzione acquosa al 30% di acetato di Zn, portando il volume totale a 50 cc con acqua distillata. Previa forte agitazione e riposo per qualche minuto, il miscuglio si filtra su carta.

Per la ricerca dei solfiti, a 0,5 cc di filtrato si aggiungono 0,3 cc di una soluzione acquosa di tungstato di sodio cristallizzato e successivamente 0,5 cc del reattivo all'iposolfito di Bougault.

L'estratto viene infine scaldato sino ad ebollizione; la presenza di solfiti è rivelata da una colorazione blu-celeste; successivamente, quando la concentrazione di solfito è superiore a 200 mg per mille, si ha la formazione di zolfo colloidale.

La reazione rimane valida per la ricerca dei solfiti addizionati a carne tritata sino al 7° giorno dal trattamento.

Il metodo permette di svelare nettamente sino a 25 mg di solfito anidro in 100 grammi di carne, il che equivale ad un centesimo circa della dose impiegata comunemente nella frode.

#### Metodo rapido (Kaplan)

*Principio.* I solfiti reagendo col verde di malachite lo decolorano.

*Reattivi.* Sciogliere 200 mg di verde di malachite purissimo in 1000 cc di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata. La soluzione rimane stabile per parecchie settimane se conservata in flaconi di vetro scuro.

*Materiale.* Capsula porcellana; spatola.

*Tecnica.* 3-4 grammi di carne tritata posti in una capsula di porcellana o anche su un comune foglio di carta oleata, vengono trattati con 0,5 cc del reagente impastato per circa due minuti con una spatola.

La carne normale assume una colorazione blu-verdastra; in presenza dei solfiti si ha completa decolorazione del reagente.



Con questo metodo è possibile mettere in evidenza quantitativi di solfati corrispondenti ad un quarto circa della dose comunemente impiegata come additivo.

(La dose normalmente usata come additivo è di 2 g di iposolfito per 10 Kg di carne).

## METODO PER DISTINGUERE LA CARNE FRESCA DA QUELLA CONGELATA

Il tessuto muscolare di bovino e di suino contiene due isoenzimi della transaminasi glutammico-ossalacetica (GOT), delle quali uno (il GOT<sub>s</sub>) si trova nel sarcoplasma e l'altro (il GOT<sub>m</sub>) nei mitocondri del muscolo. E' possibile separare i due isoenzimi tramite elettroforesi su carta o su acetato di cellulosa e metterli in evidenza cospargendo le strisce con un sistema rivelatore (aspartato-chetoglutarato-malato deidrogenasi/NADH/piridossalfosfato) in luce ultravioletta.

L'estratto della carne fresca e refrigerata mostra sull'elettroferogramma una sola banda, cioè quella del GOT<sub>s</sub>. Al contrario nell'elettroferogramma del succo di carne congelata (scongelata) si vedono due bande (GOT<sub>s</sub> e GOT<sub>m</sub>) in quanto il processo di congelamento danneggia le membrane dei mitocondri in modo tale che il GOT<sub>m</sub> passa nel sarcoplasma.

Gli isoenzimi GOT si possono mettere in evidenza sia con elettroforesi a basso voltaggio (100-150 V) che ad alto voltaggio.

### 1) Reattivi

GOT monotest per la determinazione della glutammato-ossalacetato-transaminasi della Boehringer, Mannheim GmbH.

Nicotamide-adenin-dinucleotide ridotto (NADH) sale sodico della Boehringer, Mannheim GmbH.

Nicotamide-adenin-dinucleotide ridotto (NADH) sale sodico della Boehringer, Mannheim GmbH.

Piridossalfosfato (Pyridoxal-s'-phosphosaure, Boehringer).

Reagenti per l'elettroforesi.

2) *Materiali.* Pressa semplice per spremere il succo dai muscoli (non indispensabile); apparecchio per elettroforesi; lampada a raggi U.V. (365 nm); pipette da ml 5; spruzzetta filtro di carta a pieghe; filtro di membrana (SM, 11305, poro  $\phi$  0,614 ditta Sartorius); strisce di acetato di cellulosa Cellogel misura 2,5x13 cm.

3) *Tecnica.* La carne non macinata viene sottoposta a leggera pressione assolutamente non superiore a 10 Kg/cm<sup>2</sup> per estrarre il succo.

Il succo può anche venir estratto con poca acqua dilavando la carne.

Si filtra prima su carta e poi su membrana (SM, 11305, poro  $\phi$  0,6  $\mu$  della ditta Sartorius).

Il succo così ottenuto viene diluito 1:1 con tampone fosfato 0,1 M; pH 7,5.

L'elettroforesi viene eseguita per 2 ore con un voltaggio di 150 volt usando un tampone fosfato 0,05 M, pH 7,5, preparato di frequente, conservato in frigorifero a +2 °C e cambiato ad ogni corsa elettroforetica.

Per l'elettroforesi si usano strisce Cellogel (Lambomethics), delle dimensioni di 2,5x17 cm.

La quantità di campione depositata è di circa 10 microlitri. La migrazione avviene dal catodo all'anodo.

Terminata l'elettroforesi le strisce, ancora umide, sono cosparse con il reagente sciogliendo il contenuto di 1 flaconcino di GOT monotest (Boehringer) in ml 2 di una soluzione di piridossalfosfato 0,005% in acqua (Pyridoxal-5'-phosphosaure Boehringer). A parte si sciogliono circa mg 3 di NADH (Boehringer) in ml 2,75 di tampone fosfato 0,1 M, pH 7,5 e si uniscono le due soluzioni.

La striscia può essere cosparsa del reagente due o tre volte. Essa va esaminata attentamente ed immediatamente dopo la spruzzatura.

Nel caso della carne fresca si osserva, su uno sfondo fluorescente, una fascia larga, scura (GOT<sub>s</sub>), verso l'anodo mentre per la carne congelata appare anche una seconda fascia scura e ben marcata (GOT<sub>m</sub>).

Il principio del metodo è il seguente:

GOT

1)  $\alpha$ -chetoglutarato + L-aspartato  $\longleftrightarrow$  L-glutamato + ossalacetato

MDH

2) Ossalacetato + NADH + H<sup>+</sup>  $\longleftrightarrow$  L-malato + NAD<sup>+</sup>

Nel caso si tratti di un apparecchio per elettroforesi ad alto voltaggio, l'elettroforesi è determinata dopo 60-90 minuti con una tensione di 1000 V e 20-30 mA (+3 °C). Successivamente si estrae la striscia e ancora umida, la si sparge finemente con il reagente. Lo spargimento può essere ripetuto da due a tre volte.

### Determinazione quantitativa dell'attività GOT e GPT estratte

*Estrazione.* 40 g di carne non macinata sono lasciati a contatto per 15' con agitazione occasionale con 20 ml di acqua distillata.

Si filtra l'estratto su carta e poi su membrana (Sartorius Membranfilter). L'estratto ottenuto viene usato per la determinazione.



4) Acqua a temperatura uguale a quella del campione, è poi versata in un altro sacchetto fino a un totale di un litro e mezzo.

5) Il procedimento è uguale al precedente. Questo metodo assicura che la proporzione acqua: acido cloridrico: pepsina: carne è immediata, e che di conseguenza il pH è il medesimo che con 100 campioni di carne. L'aggiunta di acqua in un altro sacchetto fino al volume totale di un litro e mezzo è necessaria per il migliore risultato meccanico dell'apparecchio.

Possibilità del metodo.

In pratica risulta che una persona può trattare o controllare 200 suini per ora.

## II. Metodo per identificare i suini infestati.

Il sistema della digestione collettiva ha evidenti vantaggi in zone dove la trichinosi non si riscontra mai o raramente.

Tuttavia tale sistema avrà solo un valore limitato per individuare nello stesso tempo quali animali sono infestati.

Il progetto di direttiva C.E.E., propone di usare la rimanenza del diaframma più 20 g di tessuto muscolare più precisamente definito. La ricerca di un insieme di campioni infestato richiede 100 digestioni separate (corrispondente alla ricerca unitaria di 10.000 = suini). Anche se la capacità in attrezzature locali e personale può essere raddoppiata in 2 o 3 giorni occorreranno circa 2 settimane prima che la ricerca sia compiuta.

Ciò è inaccettabile.

Per queste ragioni dovrebbe essere naturale usare il metodo tradizionale dei compressori, almeno perché questo permette una più rapida ricerca di 100 campioni. Tuttavia il metodo della compressione è considerato meno sicuro della ricerca mediante digestione, specialmente quando il livello di infestazione è basso o l'infestazione recente. Il metodo della digestione viene perciò usato come riferimento nel metodo ELISA.

In più il materiale di campione può essere considerato non adatto per la digestione dopo una ricerca per compressione. La compressione provoca un certo grado di disseccamento a cui le larve resistono solo con difficoltà.

Come risultato di ciò, gli sforzi vennero concentrati sul principio dello Stomacher per identificare i campioni infestati, cosicché il metodo della digestione potrebbe essere sfruttato con la più alta attendibilità.

Il materiale e l'attrezzatura sono gli stessi precedentemente descritti, con in più dei piccoli sacchi di plastica di buona qualità (dimensioni 10 x 15 cm) e una attrezzatura per saldare pellicole plastiche.

Il metodo in principio è il medesimo come per i piccoli insiemi. La rimanenza del diaframma da ogni suino è trattata come segue.

1) La rimanenza dei campioni (circa 3-5 g) è tagliata in pezzi di circa 1 g e messa in un mini sacchetto.

2) Per ogni grammo di campione vengono aggiunti 15 ml del liquido di digestione preparato prima.

3) Il mini sacchetto viene accuratamente saldato dopo averne espulsa tutta l'aria.

4) Una piccola etichetta con il numero del campione viene poi collocata nei labbri aperti del sacchetto e di nuovo saldati.

5) Sei o otto mini sacchetti vengono poi messi in una busta normale da Stomacher, contenente acqua a 41 °C. Il volume totale dei campioni e l'acqua devono essere 1 litro e mezzo.

6) Battere nello Stomacher per 12 minuti.

7) Versare ogni campione singolarmente in un cilindro graduato da 100 ml e lasciar riposare in proporzione al volume (più di 15 minuti).

8) Rinnovare il liquido sovrastante ed esaminare la rimanenza in una capsula per il conteggio delle larve come sopra descritto.

Questa tecnica ha il vantaggio che viene esaminata la maggior parte del materiale digerito e rende possibile esaminare al trichinoscopio circa 10 campioni ogni ora.

Il peso del diaframma usato qui è maggiore che quello dato nel progetto di direttiva C.E.E. dove viene accettato 1 g ma è tuttavia più realistico. Nessuno può togliere dalle carcasse piccoli campioni di 2 g alla velocità che è normalmente usata senza pericolo per le dita.

## DETERMINAZIONE DELL'UMIDITÀ - 125 °C

Metodo a forno d'aria (A.O.A.O. Prima Azione)

**Principio.** Il campione è seccato a 125 °C + - 1 °C per 2-4 ore. La perdita in peso è riportata come umidità.

**Materiale.** Stufa a secco; vetrini di orologio; essiccatore.

**Tecnica.** Pesare 10 g di materiale e sminuzzarlo in un vetrino di orologio preventivamente pesato.

Metterlo in stufa a 125 °C per 2-4 ore.

Togliere poi il vetrino e porlo in essiccatore a temperatura ambiente, lasciandolo per almeno 30 minuti.

Calcolo:

$$\text{Umidità in \%} = \frac{\text{Perdita in peso} \times 100}{\text{peso del campione}}$$

La precisazione del metodo è:  $\pm 0,1\%$ .



## PROVA DELLA DENSITA' DEL MIDOLLO OSSEO

Prova di Blanchard, Prudhomme, S. Etienne

*Principio.* Le variazioni del tenore in acqua della carcassa di un animale da macello vengono tradotte in variazioni analoghe del tenore in acqua del midollo osseo.

Più un midollo osseo è ricco di grasso, meno è denso ed inversamente più un midollo è ricco in acqua più è denso.

*Reattivi.* Alcool a 32° (D. = 0,963); alcool a 47° (D. = 0,940); alcool a 52° (D. = 0,930).

*Materiale.* Sega da macellaio; coltello; 3 flaconi a collo largo; capsula di porcellana.

### Tecnica

- 1) Preparare i flaconi versando in ciascuno una delle seguenti diluizioni di alcool: flacone I: alcool a 52°; flacone II: alcool a 47°; flacone III: alcool a 32°.
- 2) Sezionare un osso lungo all'altezza del terzo medio. Pareggiare accuratamente le superfici di sezione per evitare il prelevamento di frammenti di osso.
- 3) Con l'aiuto di un coltello prelevare un frammento di midollo osseo e conservarlo in un recipiente perfettamente secco (capsula di porcellana).
- 4) Portare in ciascun flacone un frammento di midollo osseo della grossezza di un piccolo pisello.

*Risultati.* Tutti i midolli che cadono nell'alcool a 32° possono essere considerati come aventi un tenore in acqua superiore al 50%.  
Tutti i midolli che galleggiano nell'alcool a 47° possono essere considerati come aventi un tenore in acqua inferiore al 40%.  
Se il midollo galleggia nell'alcool a 52°, esso ha un tenore in acqua inferiore al 25%.

| Flacone I | Flacone II | Flacone III | Conclusione                      |
|-----------|------------|-------------|----------------------------------|
| +         | +          | +           | Carne normale                    |
| -         | +          | +           | Carne per insaccati              |
| -         | -          | +           | Carne con infiltrazioni sierose  |
| -         | -          | -           | Carne idroemica e idrocachettica |

+ significa che il midollo galleggia nell'alcool corrispondente  
- significa che il midollo va a fondo nell'alcool corrispondente.

Per la preparazione degli alcoolli senza alcoolometro seguire lo schema:

Alcool a 32°    10 cc + 20,9 cc H<sub>2</sub>O distillata  
Alcool a 47°    10 cc + 10,9 cc H<sub>2</sub>O distillata  
Alcool a 52°    10 cc + 8,87 cc H<sub>2</sub>O distillata.

## PROVA DI COTTURA

Prova di Blanchard, Pantaleon e Poisson

*Principio.* La carne di un animale in buono stato di salute e di nutrizione, quando è sottoposta a cottura, perde una certa quantità di liquido che rappresenta dal 42,7 al 47,9% dell'acqua contenuta nel muscolo.

Certi stati patologici si traducono in una più grande labilità dell'acqua muscolare e la cottura permette allora di ottenere dal 49,35 al 63,7% dell'acqua contenuta nel muscolo.

Altre malattie invece portano ad un aumento della capacità di imbibizione della trama proteica; in questi casi il liquido di cottura non rappresenta più del 30,7 al 38% dell'acqua muscolare.

*Materiale.* Bagnomaria; bilancia; coltello; tubo di saggio delle dimensioni di cm 2,5 x 15; agitatore in vetro; tappo in vetro per coprire l'estremità aperta del tubo di saggio; cilindro di 10 cc graduato in decimi di cc.

*Tecnica.* Prelevare dai muscoli della coscia e perpendicolarmente all'asse longitudinale delle fibre muscolari, un pezzo di carne di 2-3 cm di spessore.

Prelevare da questa parte dei frammenti muscolari della lunghezza da 4 a 5 cm e dello spessore di 1 cm circa e pesarne 10 grammi sulla bilancia. (Non frantumare in pezzetti più piccoli).

Introdurre i frammenti muscolari sul fondo del tubo di saggio e coprire l'apertura con un tappo di vetro.

Portare il tubo a bagnomaria bollente e mantenerlo per almeno 10 minuti.

Decantare dalla provetta graduata il liquido liberato dalla cottura. Leggere il volume del "liquido di cottura" dopo raffreddamento, non dimenticando di tenere conto del volume occupato dal coagulo proteico raccolti sul fondo della provetta.

### Risultati.

Bovini

Liquido di cottura per 10 g di muscolo  
da 3,2 a 3,6 cc.

Carne di animale normale



Carne di animale con tessuto connettivo infiltrato di sierosità

superiore a 3,6 cc (da 3,7 a 5).

Carne di animale strappazzato

inferiore a 3,0 cc (da 2,3 a 2).

Equini

Liquido di cottura per 10 g di muscolo

Carne di animale normale

inferiore a 3,5 cc.

Carne di animale con tessuto connettivo infiltrato di sierosità

superiore a 3,6 cc.

## PROVA DI ROTHERA PER L'ACETONE

*Reattivi.* Solfato di ammonio 100 g; carbonato di sodio anidro 50 g; nitrato di sodio 3 g.

*Tecnica.* Agitare 10 g di carne in ml 15 di acqua distillata. Aggiungere un po' di reagente, agitare e lasciar riposare per 2-3 minuti. La presenza di acetone è rilevata dalla comparsa di una colorazione rossa.

Le carcasce con acetone non vanno al consumo umano.

\*

## PUZZO D'OSSEO

*Puzzo dell'osso.* E' dovuto alla crescita di germi anaerobi sporigeni putrefacenti, come *Cl. welchii*, e *Cl. putrefaciens*.

Il muscolo può mantenere il suo aspetto normale, ma può diventare grigio, verdastro e talvolta nero. Generalmente si manifesta nel quarto posteriore in corrispondenza dell'articolazione coxo-femorale. E' comune nei quarti d'importazione ma può verificarsi anche nei quarti di animali di macellazione familiare. Le cause non sono conosciute ma vi sono varie teorie secondo cui l'infezione sarebbe prodotta dalla lana contaminata del coltello o da affaticamento dell'animale prima della mattazione. Comunque probabilmente la causa principale è dovuta all'improprio raffreddamento della carcassa, specialmente in periodi di tempo umidi e caldi. Si ritiene che il processo putrefattivo inizi nel midollo o nel liquido sinoviale. Il puzzo d'osso è una alterazione locale che richiede il sequestro delle parti colpite, sebbene tale condizione possa diffondersi rapidamente e richiedere così l'asportazione delle parti colpite prima che si diffonda al muscolo ancora sano.

N.B. Il midollo osseo e il fluido sinoviale sono di reazione neutra e costituiscono una condizione ideale per la crescita di germi anaerobi.

## DOSAGGIO DELLE SOSTANZE INIBENTI

### Generalità

Agenti antimicrobici o antibiotici vengono utilizzati nell'allevamento per uso auxinico, profilattico e terapeutico.

Le funzioni auxiniche vengono espletate in seguito ad una migliore utilizzazione degli aminoacidi nella razione, in seguito alla riduzione della deaminazione e della decarbossilazione da parte della flora batterica intestinale, per l'assimilazione facilitata degli alimenti dovuta a particolari modificazioni istologiche della mucosa intestinale e delle ghiandole di Lieberkun; per la riduzione del numero dei microrganismi patogeni.

Gli antibiotici per uso auxinico vengono addizionati agli alimenti per il bestiame in bassa dose (20 ppm) e sono somministrati all'animale per tutta la vita, mentre per gli altri scopi vengono somministrati solo per brevi periodi e a dosi maggiori, per via orale, parenterale o intramammaria.

E' importante distinguere queste applicazioni perché l'uso degli antibiotici ai fini dell'incremento della crescita è programmabile, mentre gli usi ai fini profilattici e terapeutici non possono essere regolati perché sono in relazione con le cause della malattia ed il punto di vista del veterinario.

Questi ultimi motivi portano quindi ad una maggiore probabilità che residui di antibiotici siano presenti nei tessuti e nel latte.

Attualmente solo i fattori utilizzati come integratori alimentari sono soggetti a regolamentazione nella C.E.E. e possono essere somministrati senza l'intervento del veterinario. Gli alimenti medicati (contenenti più di 20 ppm di antibiotico) possono essere somministrati agli animali solo dietro prescrizione veterinaria e gli antibiotici somministrati per via parenterale possono essere usati, nella maggior parte dei paesi della C.E.E., solo da veterinari competenti.

~~La maggior parte dei paesi della comunità ha un proprio regolamento di controllo delle carni, quello italiano non prevede la presenza di antibiotici nelle carni, ma il settore che si occupa di queste cose è quello della presenza seguendo quanto disposto dall'art. 3 della legge 283.~~

La ricerca degli antibiotici assume un significato quando la si effettui nei confronti di carni e di visceri di animali macellati d'urgenza o di animali sospetti.

Tali carcasce sono esaminate perché è facile che questi animali siano stati trattati terapeuticamente prima della macellazione. Gli animali normali vengono controllati quando ci sia ragione di sospettare che residui di antibiotici possano essere presenti.

Nell'ultimo decennio si è avuto un uso molto esteso di tetracicline e di altri antibiotici nell'alimentazione animale.



Circa il 6% delle tetraciline ingerite viene assorbito e, conseguentemente, dei residui possono trovarsi in organi, muscoli e nelle ossa degli animali macellati.

Il muscolo, di solito, contiene le più basse concentrazioni di tetraciline, solo il 15-20% delle quantità rinvenute nel fegato e nei reni. Questo rapporto costante di quantità di residui riflette un equilibrio tra tessuti e sangue.

Dai molteplici esperimenti effettuati risulta chiaro che la concentrazione di tetraciline nel muscolo dipende quasi sempre dalla loro assunzione con l'alimentazione.

Controlli effettuati su animali macellati d'urgenza o di necessità o nei quali il referto microscopico indicava l'opportunità di un esame batteriologico delle carni, hanno rivelato, per il biennio 78-79 su 4249 bovini adulti e su 1798 vitelli, una positività di presenza di sostanze inibenti del 12,6% per i bovini adulti e del 33,4% nei vitelli.

Le percentuali di positività nel rene sono sempre più elevate di quelle riscontrabili nel muscolo perché il rene è un organo bersaglio per la maggior parte degli antibiotici.

Una positività del test nel rene e non nel muscolo può quindi essere interpretata come la conseguenza di una incompleta osservanza dei tempi di sospensione dopo il trattamento e la percentuale stessa di positività può dunque essere considerata indice dell'accuratezza di applicazione dei tempi di sospensione. Bisogna però anche considerare il sempre maggiore uso di farmaci a tropismo renale come, ad esempio, la gentamicina, che permane a livello renale per un mese almeno dopo l'ultimo trattamento.

Un altro punto di accumulo di antibiotici nell'animale, particolarmente delle tetraciline, sono le ossa. Un controllo delle ossa dei vitelli macellati tra la primavera 1975 e l'estate 1977 ha mostrato che più del 90% delle ossa contenevano tra 2 e 125 ppm di tetraciclina. Queste concentrazioni erano circa 10-500 volte maggiori di quelle riscontrate nel muscolo (Honikel & coll. 1978).

Per quanto riguarda l'effetto dei trattamenti dopo la morte dell'animale la carne viene consumata immediatamente dopo la macellazione ma può essere conservata a  $0^{\circ}\text{C}$  e  $+4^{\circ}\text{C}$  per alcune settimane o congelata e conservata a  $-17^{\circ}\text{C}$  e  $-20^{\circ}\text{C}$  per alcuni mesi. Studi sulla degradazione della clorotetraciclina e della ossitetraciclina nel muscolo, mostrano che durante un mese di conservazione, la concentrazione di clorotetraciclina cala debolmente, mentre quella della ossitetraciclina si mantiene costante. Il congelamento a  $-22^{\circ}\text{C}$  non ha mostrato effetti sulla concentrazione di entrambi gli antibiotici (Honikel & coll. 1978). Il riscaldamento della carne a  $65^{\circ}\text{C}$  per 60' in contenitore ermetico riduce al 20% la concentrazione iniziale di ossitetraciclina e di cloro-

tetraciclina, mentre temperature di  $75^{\circ}\text{C}$  per 60' hanno effetti lievemente maggiori.

Entrambi gli antibiotici vengono distrutti in 1' a  $115-120^{\circ}\text{C}$ . Nelle ossa dove la clorotetraciclina è legata agli ioni calcio, formando complessi chelati, la stabilità è molto più elevata. Il riscaldamento in autoclave a  $130^{\circ}\text{C}$  riduce la concentrazione di clorotetraciclina, nelle ossa macinate, da 48 a 8 ppm e  $140^{\circ}\text{C}$  sono necessari per distruggere tutto l'antibiotico.

Per quanto riguarda gli altri antibiotici quali la penicillina (la streptomina e il cloramfenicolo) si è visto che la cottura mediante arrostitimento per 20' a  $190^{\circ}\text{C}$  (temperatura esterna del forno) riduce il contenuto in penicillina del 60%, quello del cloramfenicolo del 30%.

La conservazione a  $-20^{\circ}\text{C}$  non riduce la quantità di penicillina e di cloramfenicolo.

I trattamenti termici riducono quindi più o meno massivamente le concentrazioni di antibiotici presenti negli alimenti, ma ne rimangono sempre delle tracce e i loro metaboliti di cui poco si conosce circa la eventuale pericolosità per il consumatore.

## Tossicità degli antibiotici

Per gli antibiotici negli alimenti vale sempre il concetto di tolleranza. Per tale termine si intende significare l'assenza di antibiotici entro i limiti di sensibilità del metodo analitico. Da un punto di vista scientifico tale concetto è discusso per quattro motivi:

- 1) la messa a punto di nuovi metodi più sensibili dei precedenti;
- 2) la presenza di metaboliti di cui non si conosce l'effetto tossico, pur essendo privi di attività antibiotica specifica;
- 3) il concetto, sostenuto da alcuni, che non è l'analisi, ma la dose, che rende un composto tossico;
- 4) la presenza sempre più frequente di residui di antibiotici negli alimenti.

Di conseguenza in questi ultimi anni, accanto ai tentativi di messa a punto di nuove metodiche e allo sviluppo di ricerca sulla eventuale tossicità di metaboliti, si è pensato di ammettere limiti di residui tollerabili di antibiotici basandosi sul calcolo della dose giornaliera accettabile (ADI) dall'uomo, partendo dalla dose senza effetto sull'animale da esperimento e applicando un fattore di sicurezza mai inferiore a 100 e che è modulato secondo la natura, le manifestazioni tossiche osservate alla dose immediatamente superiore a quella senz'effetto. Conoscendo i vettori dei residui (carne, latte, uova) si può passare facilmente dalla ADI alla tolleranza per ciascuno di questi vettori.



Rimane poi da controllare che le derrate alimentari contenenti questi livelli di antibiotici così calcolati non siano poi suscettibili d'avere una azione nefasta sulla flora del tubo digerente del consumatore.

Esiste un'altra corrente di ricercatori che non ritiene validi questi concetti e che è fautrice della sostituzione completa degli antibiotici negli alimenti per gli animali, perlomeno nel loro uso di auxinici.

C'è da dire che le manifestazioni tossiche da antibiotici derivano più da osservazioni e da dati sperimentali ottenuti in campo clinico che da quello dell'igiene degli alimenti. Ciò va tenuto presente interpretando le manifestazioni tossiche esercitate dagli antibiotici riportate di seguito.

A parte l'antibiotico-resistenza e l'azione sulla flora dell'apparato digerente, la maggior parte degli antibiotici è considerata come medicamenti con un grande margine di sicurezza. Tuttavia si conosce un certo numero di effetti secondari più o meno gravi e più o meno frequenti: le neutrotossicità e reazioni di ipersensibilità per i betalattamici; tossicità cocleo-vestibolare; nefrotossicità ed allergia per gli amminosidi; forte tossicità e azione curaroforme per i polipetidi; colorazione dei denti, disturbi epatici e renali, allergia per la tetraciclina, aplasia midollare per il cloramfenicolo; disturbi epatici molto accentuati per macrolidi.

E' da tenere presente che tutte queste manifestazioni tossiche si possono avere durante la terapia perché si hanno delle dosi senza effetto relativamente elevate (D.S.E.) quando si somministrano gli antibiotici in modo prolungato (3-6 mesi) per via orale, ad eccezione dell'aplasia midollare provocata dal cloramfenicolo, e delle diverse manifestazioni allergiche.

La tossicità del cloramfenicolo si manifesta mediante la depressione reversibile dell'eritropoiesi e una pancitopenia provocata da un'aplasia midollare irreversibile.

L'anemia si produce nell'uomo quando il tasso plasmatico del cloramfenicolo è superiore o uguale a 25 mg/ml; la seconda sindrome si è verificata in pazienti umani sottoposti a trattamenti con collirio con cloramfenicolo allo 0,25% per diversi mesi.

Non si possono trarre delle conclusioni definitive su questi dati ma è necessaria la prudenza nei confronti del cloramfenicolo.

Per la ricerca dell'antibiotico è necessario non applicare i metodi batteriologici perché sono poco sensibili (0,5 ppm) e si deve ricorrere alla cromatografia liquida HP, il cui limite di rivelabilità è di 5 ppb e che permette una valutazione quantitativa a partire da 10 ppb.

## Allergia

I residui di antibiotici presenti negli alimenti sono stati talvolta ritenuti responsabili di episodi allergici di consumatori di tali alimenti. Questa ipotesi non può essere esclusa, ma sono necessari alcuni chiarimenti.

Le allergie da residui rappresentano solo una piccola percentuale delle allergie alimentari.

La maggior parte di questi processi è dovuta ai costituenti normali degli alimenti. I residui sembra diano origine a manifestazioni poco gravi, come l'orticaria o l'edema di Quinke. Viceversa gli accidenti gravi, cioè lo shock anafilattico, le sindromi dermatologiche o viscerali, si osservano durante gli interventi terapeutici e fanno parte della patologia allergica da medicamenti.

Attualmente residui di antibiotici si possono trovare nel latte, nella carne di pollame, di bovino e di suino.

Gli antibiotici dotati di potere allergico sono le penicilline, il più spesso, le tetracicline, la trolendomicina e il cloramfenicolo.

Circa la natura del rischio della presenza di residui di antibiotici sembra che essi agiscano più come sostanze ad effetto scatenante in soggetti precedentemente venuti a contatto in seguito a trattamenti terapeutici, che come sostanze sensibilizzanti.

Per quanto riguarda le quantità scatenanti, per la penicillina si sono osservati fenomeni di intolleranza con concentrazioni nel latte di 10 U.I./ml, di 4 U.I./ml e di 0,06 U.I./ml e 0,03 U.I./ml di benzopenicillina.

## Fenomeni di resistenza

La resistenza di un batterio ad un antibiotico può essere naturale o acquisita.

Resistenza naturale viene denominata la situazione in cui tutti i ceppi di una specie batterica si rivelano insensibili all'azione di un antibiotico. La resistenza acquisita corrisponde, invece, per un determinato ceppo batterico all'acquisizione di un nuovo carattere che gli permette la crescita in presenza di dosi di un antibiotico superiori a quelle normalmente inibitrici.

Il nuovo carattere si manifesta con una modificazione del patrimonio genetico. I geni della resistenza possono essere localizzati in due tipi di molecole di DNA: nei cromosomi batterici o nei plasmidi, o soltanto in questi che sono elementi extranucleari.

I plasmidi possono essere trasmessi da un batterio ad un altro attraverso i meccanismi classici della genetica batterica.

A seconda della localizzazione dei geni si può parlare di resistenza cromosomica o plasmidica. La resistenza cromosomica appare spontaneamente in una composizione batterica in ceppi detti mutanti. Alcune di queste mutazioni possono contribuire a rendere il batterio resistente all'antibiotico; ma il carattere spontaneo presuppone che l'antibiotico non induca la mutazione. Il fenomeno è comunque raro e la sua frequenza si può considerare tra  $10^9$  e  $10^{10}$ .





# GENERALITÀ

## REFRIGERAZIONE

PERSEGUE LO SCOPO DI :

A. IMPEDIRE LA PUTREFAZIONE PROFONDA.

LA CONTAMINAZIONE PROFONDA DELLE CARNI PUO' REALIZZARSI DURANTE LA MACELLAZIONE O NELLE FASI DI PRE-MACELLAZIONE.

NELLE PRIME 10 h POST-MACELLAZIONE I CLOSTRIDI NON POSSONO MOLTIPLICARSI A CAUSA DELLE RISERVE DI OSSIGENO A LIVELLO MUSCOLARE.

B. OSTACOLARE LA MOLTIPLICAZIONE DEI MICRORGANISMI PATOGENI.

C. RALLENTARE LA MOLTIPLICAZIONE DEI MICRORGANISMI PSICROTROPI ALTERANTI.

RICORDANDO CHE:

- BISOGNA ASSOCIARE CALO  $T^{\circ}$  CON CALO DELL'  $A_w$
- A  $T^{\circ}$  DI REFRIGERAZIONE E CON U.R. 60-80% SI SVILUPPONO SOLO ALCUNE MUFFE.



**Fig. 3 : Vitesse de croissance des micro-organismes de surface sur de la viande de bœuf en fonction de la température.**

— A : odeur  
— B : poissage

(d'après SHAW, 1972)

