



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CALPAÍNA, CALPASTATINA,
ELASTINA, COLÁGENO Y BASES VOLÁTILES, EN LA MADURACIÓN DE
CARNE DE BOVINO, DURANTE EL CONSUMO DE BETA-
ADRENÉRGICOS”.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

JESSICA JOSEFINA HURTADO RÍOS



MÉXICO, D.F.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Eduardo Mendoza Martínez

VOCAL: Profesor: Oscar Hernández Meléndez

SECRETARIO: Profesor: Israel García Cano

1er. SUPLENTE: Profesor: Carolina Peña Montes

2do. SUPLENTE: Profesor: Carmina Montiel Pacheco

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO S-132, DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA, DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA.

EL PRESENTE TRABAJO FORMA PARTE DE LAS ACTIVIDADES DEL PROYECTO DENOMINADO “ESTUDIO DEL PROCESO DE MADURACIÓN EN CARNE DE RES MEXICANA”, UNAM-UAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Israel García Cano

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Edith Ponce Alquicira

SUSTENTANTE:

Jessica Josefina Hurtado Ríos

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
Estructura muscular y composición del músculo.....	2
Proteínas musculares	6
Proteínas miofibrilares	6
Proteínas sarcoplásmicas	9
Proteínas tejido conectivo	9
Conversión de músculo a carne.....	11
Etapa de <i>pre rigor</i>	12
<i>Rigor mortis</i>	13
<i>Post rigor</i>	14
Factores que afectan a la calidad final de la carne.....	15
Factores <i>post rigor</i>	15
Maduración	15
Degradación de compuestos nitrogenados.....	19
Nitrógeno proteico	19
Nitrógeno no proteico.....	20
Ablandamiento <i>post rigor</i>	20
II. ANTECEDENTES.....	21
III. HIPÓTESIS.....	28
IV. OBJETIVOS.....	28
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS PARTICULARES.....	28
V. METODOLOGÍA	29
Obtención y preparación de las muestras	29
Condiciones de almacén de las muestras.....	30
Cuantificación de proteína.....	30
Extracción de proteínas sarcoplásmicas	31
Extracción de catepsinas.....	31
Extracción de proteínas miofibrilares	31

Especificidad por sustrato: actividad espectrofotométrica	32
Actividad elastinolítica.....	32
Actividad colagenolítica	32
Actividad de catepsina.....	33
Actividad de calpaína	34
Porcentaje de inhibición de calpastatina.....	34
Determinación del perfil electroforético.....	34
Determinación del perfil electroforético para nebulina.....	35
Determinación del perfil electroforético para calpaína y catepsina	35
Determinación de la actividad proteolítica por zimograma	35
Determinación de bases nitrogenadas volátiles totales	36
Análisis estadístico.....	37
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
Cuantificación de proteína.....	38
Especificidad por sustrato: actividad espectrofotométrica	39
Actividad elastinolítica.....	39
Actividad colagenolítica	42
Actividad de catepsina.....	44
Actividad de calpaína.....	47
Porcentaje de inhibición de calpastatina.....	50
Determinación del perfil electroforético.....	52
Determinación del perfil electroforético para nebulina.....	52
Determinación del perfil electroforético de actividad en gel para calpaína y catepsina	56
Determinación de la actividad proteolítica por zimograma para calpaína y catepsina.....	58
Determinación de bases nitrogenadas volátiles totales	59
VII. CONCLUSIONES	62
VIII. REFERENCIAS.....	63
ANEXO	76

RESUMEN

Los fármacos agonistas adrenérgicos se utilizan como estimulantes del crecimiento en animales domésticos, para reducir el contenido de grasa y aumentar la masa muscular. El clorhidrato de zilpaterol (CZ) es un agonista utilizado en algunos países, entre ellos México. Este trabajo pretende determinar la actividad enzimática de proteínas sarcoplásmicas (calpaína, catepsinas, calpastatinas, elastina y colágeno), la presencia de nebulina (proteína miofibrilar), así como evaluar la calidad en carne de bovino a la cual se le suministró CZ sometida a dos procesos de maduración (húmeda y en seco, ambos a 4°C), donde las muestras se tomaron a diferentes tiempos después del sacrificio (tiempo 0, 1, 3, 7, 14 y 21 días).

La actividad proteolítica de las proteínas sarcoplásmicas se determinó mediante la especificidad por sustrato y por espectrofotometría y espectrofluorimetría. Mientras que la presencia de nebulina se evaluó por medio de electroforesis en gel desnaturizante (SDS-PAGE). Por último, la calidad en la carne se determinó empleando como parámetro de medición las bases volátiles nitrogenadas totales (N-BVT).

Las actividades enzimáticas de calpaína, catepsina y calpastatina en carne con CZ, presentaron una actividad desigual con respecto a la carne sin CZ. Mostrando una diferencia no significativa entre los procesos de maduración (húmedo y seco). La actividad elastinolítica y colagenolítica, resultó mayor en carne con CZ, en comparación con la carne sin CZ, siendo similar en ambos métodos de maduración (húmedo y seco).

La presencia de nebulina (proteína miofibrilar) en carne sin CZ descendió con respecto al tiempo en ambos métodos de maduración, mientras que en carne con CZ, incrementa la presencia de nebulina, para ambos métodos de maduración.

El incremento de N-BVT en carne con y sin CZ para ambos procesos de maduración, no intervienen en el grado de frescura, debido a que los valores de N-BVT están por debajo del límite sugerido,

I. INTRODUCCIÓN

La carne se define como la porción comestible de animales sanos destinados para consumo humano. Está constituida primordialmente por tejido muscular y cantidades variables de tejido conectivo, epitelial, nervioso y adiposo, según la localización anatómica, edad, género y especie animal. La relación de estos tejidos se refleja en el rendimiento de la canal, así como en las características sensoriales y funcionales y, consecuentemente en el costo de la carne.

Los músculos animales se dividen en tres categorías: músculo liso, músculo cardíaco y músculo esquelético. El primero posee la organización estructural más simple de los tres tipos, su funcionamiento es involuntario y se encuentra localizado en los sistemas gastrointestinal, respiratorio y cardiovascular formando paredes de vasos sanguíneos. El segundo se encuentra en el corazón y en la raíz de los grandes vasos sanguíneos que se unen al corazón, es involuntario y estriado. El tercero actúa bajo control nervioso voluntario y constituye del 40% al 65% de peso de la canal. Existen más de 600 músculos unidos directa o indirectamente al esqueleto, con una posición tal que su contracción y relajación mantienen la postura y genera el movimiento corporal. La principal función del tejido muscular esquelético es transformar la energía química en energía cinética. Los procesos bioquímicos que proveen la energía necesaria para mantener el mecanismo de contracción-relajación muscular *in vivo* son similares a aquellos que tienen lugar en la etapa *post rigor* y que llevan a la transformación de músculo en carne. Por lo que es necesario conocer la bioquímica del músculo *in vivo* para comprender los cambios que se suscitan después de la muerte y que afectan la calidad final de la carne (Ponce, 2013).

Estructura muscular y composición del músculo

La unidad estructural del músculo esquelético es una célula muy especializada llamada fibra muscular, compuestas a la vez de miofibrillas, bastones cilíndricos largos y finos de aproximadamente uno a dos micrómetros de diámetro, su eje mayor es paralelo al de la fibra muscular, extendiéndose a todo lo largo de la fibra muscular (Forrest *et al.*,

1975). Los cortes transversales de las miofibrillas (*Figura 1*) presentan una serie de elementos estructurales de dos tipos distintos: los filamentos gruesos y delgados. Estos dan la apariencia de bandas claras y oscuras. La banda clara es monorrefringente cuando se observa con la luz polarizada, se describe como isotrópica y se llama banda I, contiene mayormente moléculas de actina. La amplia banda oscura presenta doble refringencia a la luz polarizada, es anisotrópica y se llama banda A, contiene moléculas de miosina y actina (Murai *et al.*, 1995). La banda I está dividida por una banda oscura estrecha llamada línea Z, que es una estructura densa tridimensional (Vigoreaux, 1994). La porción de miofibrilla comprendida entre dos líneas Z adyacentes se llama sarcómero, y comprende una banda A y dos medias bandas I que se localizan a cada lado de la banda A. El sarcómero es la unidad estructural repetitiva de la miofibrilla, así como la unidad básica en la que tiene lugar el ciclo de contracción-relajación muscular (Price *et al.*, 1981).

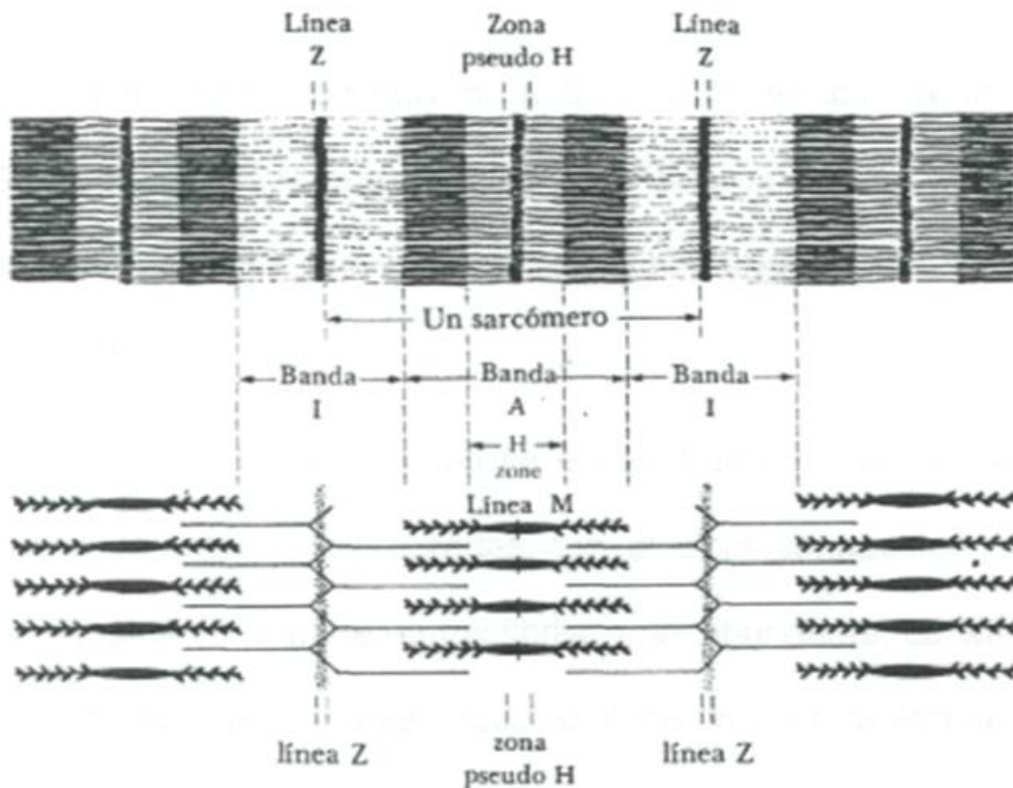


Figura 1. Microfotografía electrónica en el que se aprecian porciones de dos miofibrillas y un sarcómero, así como un diagrama correspondiente a un sarcómero en el que se muestran las distintas bandas, zonas y líneas (adaptado de McCormick, 1994).

La *Figura 2* muestra un diagrama de la organización del músculo esquelético, desde estructura macroscópica a nivel molecular. (A) músculo esquelético, (B) un haz de las fibras musculares, (C) una fibra muscular en la que se aprecian las miofibrillas, (D) una miofibrilla que muestra el sarcómero y sus distintas bandas y líneas, (E) un sarcómero en la que se ve la posición de los miofilamentos de la miofibrilla, (F-I) secciones transversales que muestran la disposición de los miofilamentos en diversas partes del sarcómero, (J) moléculas de actina G, (K) un filamento de miosina mostrando las relaciones de las cabezas con el filamento, (M) un filamento de miosina en el que se aprecian las regiones de cabeza y cola, y (N) meromiosina ligera y meromiosina pesada (Forrest *et al.*, 1975).

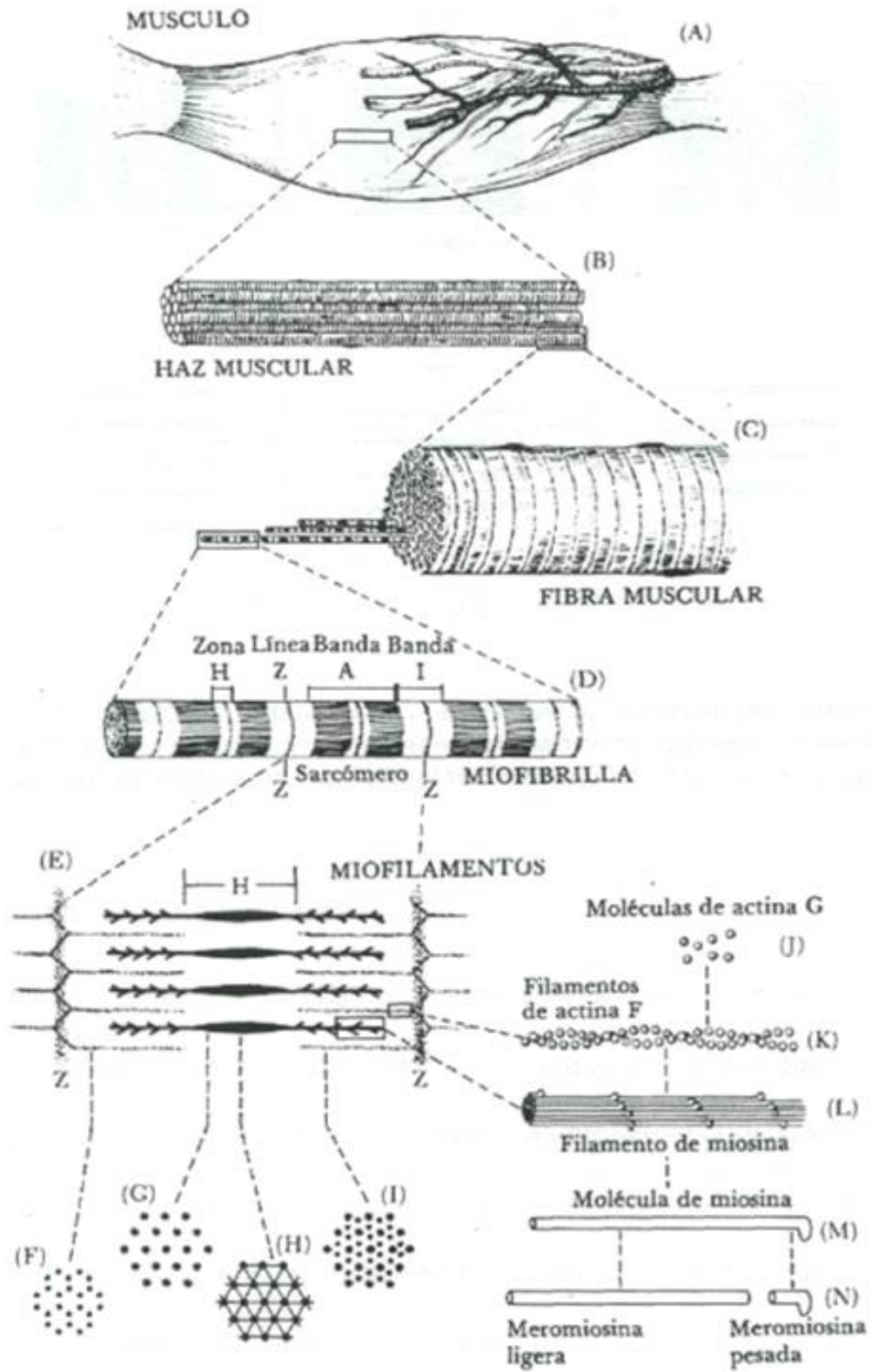


Figura 2. Organización del músculo esquelético.

Proteínas musculares

Existen varias clasificaciones de las proteínas cárnicas: en cuanto a su forma (globulares o fibrosas), localización celular (extracelulares, intracelulares), localización y solubilidad (sarcoplásmicas, miofibrilares, conectivas) ésta última es la más aceptada. (Forrest *et al.*, 1975). En este sentido, se clasifican como del sarcoplasma, solubles en agua y en soluciones salinas diluidas (se incluyen enzimas hidrosolubles y pigmentos); del tejido conectivo, insolubles en medio neutro (elastina, colágeno y reticulina) y las miofibrilares, solubles en soluciones salinas concentradas (Lawrie, 1985).

Proteínas miofibrilares

Las proteínas miofibrilares constituyen del 55 al 60% del total de la proteína del músculo. Basadas en sus funciones biológicas dentro del músculo, las proteínas miofibrilares pueden clasificarse en proteínas contráctiles y proteínas reguladoras (Forrest *et al.*, 1975) (Tabla 1).

Proteínas contráctiles.- En este grupo se encuentran la miosina y la actina, las cuales están directamente relacionadas con el ciclo de la contracción-relajación del músculo. La miosina es la proteína miofibrilar más abundante, constituye más de una tercera parte de la proteína del músculo, tiene un peso molecular aproximado de 500 kDa y contiene 2 cadenas pesadas (HCM) idénticas de aproximadamente 220 kDa cada una y cuatro cadenas ligeras (LCM) de aproximadamente 14 a 20 kDa dependiendo de la especie y tipo de músculo (Lawrie, 1985). La actina es la segunda proteína miofibrilar más abundante comprendiendo un 20% del total, su peso molecular es aproximadamente 45 kDa y tiene una estructura globular con menos de un 30% de α hélice (Price *et al.*, 1981).

Proteínas reguladoras.- Estas proteínas juegan un papel muy importante en el ciclo de la contracción-relajación. Se dividen en 2 grupos, las proteínas reguladoras mayores y las reguladoras menores (Lawrie, 1985).

Proteínas reguladoras mayores.- Son la tropomiosina y la troponina. La tropomiosina es la segunda proteína más abundante del filamento delgado y constituye aproximadamente el 7% de la proteína total de la miofibrilla, tiene un peso molecular aproximado de 68 kDa. La troponina es una proteína globular con un contenido alto de prolina. Constituye del 8 al 10% de la proteína miofibrilla. El complejo de troponina nativa consta de tres subunidades de pesos moleculares aproximadamente de 18, 23 y 37 kDa. Estas subunidades son llamadas troponina C, troponina I y troponina T (Zhao *et al.*, 1995).

Proteínas reguladoras menores.- Durante los últimos años se ha descubierto un amplio número de nuevas proteínas presentes en el músculo esquelético. Cuantitativamente la mayor parte de ellas no son importantes, pero se cree que tienen conexión con la estructura de los filamentos miofibrilares. Estas proteínas son por lo tanto clasificadas como proteínas reguladoras menores. La función precisa de muchas de ellas aún no se conoce. Estas proteínas se encuentran distribuidas en diferentes partes de la ultraestructura de los filamentos (Forrest *et al.*, 1975; Lawrie, 1985). La α -actinina es una proteína reguladora menor situada en la línea Z, fue primero identificada en músculos de vertebrados desde hace 30 años, está presente en muchos tipos de músculo y células no musculares tanto de vertebrados como de invertebrados (Mc Gregor *et al.*, 1994). La α -actinina es el mayor componente de la línea Z y está estimado que esta proteína constituye menos del 20% del total de la proteína de la línea Z en el músculo esquelético. Una de las posibles funciones de la α -actinina puede ser regular el ancho de los filamentos delgados al igual que la titina y la nebulina (Vigoreaux, 1994).

Proteínas de filamentos intermedios.- Maruyama *et al.* (1997) nombró por primera vez a la conectina y después fue nombrada titina, es un proteína filamentosa gigante (3, 000 kDa) que une el filamento de miosina a la línea Z. Existen varios trabajos sobre el anclaje de la titina sobre las bandas I y A, aunque todavía existen duda sobre su estructura (Vigoreaux, 1994). Existen 2 formas de titina en los músculos esqueléticos de vertebrados: α -conectina y β -conectina. La α -conectina es fácilmente degradada a

β -conectina (2,000 kDa) y un fragmento largo (1,200 kDa) por acción de proteasas (Kawamura *et al.*, 1995).

La nebulina es un filamento que también está asociado con los filamentos delgados (Ho *et al.*, 1986), tiene una subunidad con un peso molecular que varía de 600 a 900 kDa dependiendo del tipo de músculo o estado de desarrollo, la demostración de que los filamentos de nebulina son coextensivos con los filamentos delgados supone que la nebulina regula la longitud de los filamentos delgados (Vigoreaux, 1994). Se encuentra presente en el músculo estriado pero no en el cardíaco.

Fritz, *et al.*, (1993), sugieren que la titina puede ser importante en la blandura de la carne; esta proteína es degradada *post rigor* a un grado dependiente de la temperatura y el tiempo de almacenamiento. La degradación de la titina o nebulina está implicada en el incremento de la blandura de la carne (Ho *et al.*, 1986).

Tabla 1. Principales características de las proteínas miofibrilares del músculo (Maruyama *et al.*, 1997).

Proteínas	Peso Molecular	Contenido %	Localización
Contráctiles			
Miosina	500 kDa	42	Banda A
Actina	43 kDa	22	Banda I
Reguladoras mayores			
Troponina	70 kDa	5	Banda I
Tropomiosina	(33 kDa) x 2	5	Banda I
Reguladoras menores			
Proteína M	165 kDa	2	Banda A
Proteína C	135 kDa	2	Banda A
Proteína H	69 kDa	<1	Banda A
Proteína F	121 kDa	<1	Banda A
Proteína I	50 kDa	<1	Banda A
Proteína X	152 kDa	<1	Banda A
β -actinina	35 kDa + 32 kDa	<1	Fin de Banda I
γ -actinina	35 kDa	<1	Banda I
Filamentos intermedios			
Desmina	53 kDa	1	Periferia de miofibrillas entre discos Z
Vimentina	55 kDa	1	
Filamento elástico			
Conectina	2 X 10 ⁶ kDa	10	Unión A-I
Discos Z			
α -actinina	(95kDa) x 2 kDa	2	Discos Z
Proteína Z	50 kDa	<1	Discos Z
Eu-actinina	43 kDa	<1	Discos Z
Proteína 34 K	34 kDa	<1	Discos Z
ABP (filamina)	(250 kDa) x 2	<1	Discos Z
Otras Proteínas			
Vinculina	130 kDa	<1	Sarcolema
Nebulina	800 kDa	3	Banda I

Proteínas sarcoplásmicas

Las proteínas sarcoplásmicas son endocelulares, hidrosolubles y están disueltas en el sarcoplasma de la célula muscular. Tienen pocas propiedades funcionales, pero son importantes por su actividad enzimática, de transporte y almacenamiento de oxígeno; desde el punto de vista de calidad de la carne como alimento, la más importante es la mioglobina ya que está relacionada con el color de la misma (Olson *et al.*, 1976).

La mioglobina es un pigmento intracelular que se sintetiza en las mitocondrias (Kanner, 1994), estructuralmente está formada de una proteína globular compacta llamada globina, unida a un grupo prostético hemo. El grupo hemo es una ferroporfirina, capaz de realizar reacciones reversibles de oxidación y reducción. Cuando se oxigena la molécula de hierro forma el compuesto llamado oximioglobina (color rojo brillante en la carne al entrar en contacto con el oxígeno); cuando se reduce en ausencia de oxígeno forma la desoximioglobina (color púrpura de la carne); al oxidarse se forma la metamioglobina dando el color marrón de la carne oxidada (Forrest *et al.*, 1975).

Proteínas tejido conectivo

Las proteínas del tejido conectivo son: colágeno, elastina y reticulina. A pesar de que las proteínas del tejido conectivo juegan un papel importante en la dureza de la carne son pocas las observaciones indicadoras de que se alteran durante la maduración. El tejido conectivo tiene tres funciones principales: proporcionar fuerza mecánica a los órganos, mejorar la estructura del movimiento y promover el crecimiento y proliferación celular, sus propiedades físicas están determinadas principalmente por su composición y organización macromolecular. La principal propiedad funcional de estas macromoléculas es que son capaces de formar fibras, filamentos y redes con propiedades mecánicas indispensables en la estructura organizacional de un ser vivo (Bailey *et al.*, 1989).

Colágeno.- La proporción de colágeno en el músculo es generalmente pequeña, en el intervalo de 0.5 a 2%, pero es la proteína más abundante del tejido conectivo. Contiene un 30% de glicina y un 25% de prolina e hidroxiprolina. Cuanto más abunden estos aminoácidos, más rígido y resistente es el colágeno (López de Torre *et al.*, 1991). En el tejido muscular existen 5 tipos de colágeno: I, II, III, IV y V, se diferencian por su secuencia de aminoácidos y su estructura. El epimisio está constituido principalmente por colágeno tipo I, el perimisio contiene tipo I con poca cantidad de tipo III, la composición del endomisio es más heterogénea, contiene tipo I, III, IV y una pequeña cantidad de tipo V, siendo el tipo III el más predominante (Valin, 1995). La unidad estructural básica del colágeno es la molécula de tropocolágeno, que es larga y delgada y está formada por tres cadenas de polipéptidos enrollados en forma helicoidal, es una unidad muy fuerte y compacta. Las unidades están fuertemente unidas para dar firmeza y forma. Hay conexiones entre las unidades, lo que permite que éste tejido no se estire excesivamente. Estas uniones se denominan enlaces cruzados y están formados por puentes de lisina entre las diferentes cadenas. En la carne preparada para alimento, estos enlaces se rompen al cocinarla, son menores y menos estables en animales jóvenes, aunque estos tienen mayor cantidad de colágeno. Los animales viejos tienen menor porcentaje de colágeno pero con mayor número de enlaces (López de Torre *et al.*, 1991).

Elastina.- Difiere del colágeno y de la reticulina en su composición química, naturaleza física y comportamiento. La elastina es un componente minoritario en la piel, del tejido adiposo y del conectivo, pero en los ligamentos de los vertebrados y en las paredes de las grandes arterias constituye gran parte de la materia seca (Valin, 1995).

Este tejido tiene un aspecto amarillo y tiene fibras filamentosas. Da resistencia y elasticidad a la piel, se encuentra en gran cantidad en el músculo semitendinoso, el cual es amarillo debido a la alta cantidad de elastina (Alarcón Rojo, 1992). En el músculo bovino la elastina constituye menos del 6% del total del tejido conectivo. La contribución de esta red elástica a la dureza no es bien conocida, por lo que se

concluye que la elastina es de menor importancia comparado con el total del tejido conectivo (Valin, 1995).

Reticulina.- proteína del tejido conectivo menos conocida. Sus fibras son finas y onduladas, poseen cierto grado de ramificación y tienen aspecto distinto al colágeno, las cuales son más gruesas. La reticulina es más firme y bioquímicamente parecida al colágeno, probablemente une al colágeno en el endomisio, constituyendo ligamentos flexibles (Swatland, 1996).

Conversión de músculo a carne

El proceso posterior a la muerte lleva a la transformación gradual del músculo a carne (*Figura 3*). Este proceso se puede dividir en tres etapas (1) *pre rigor* caracterizada por que el músculo es aún elástico, (2) *rigor mortis* y (3) resolución o *post rigor*. El tiempo en el que ocurre esta transformación depende de varios factores, particularmente de la especie animal y del método de sacrificio. La calidad de la carne depende de las condiciones *ante mortem* y del manejo *post rigor* por lo que es necesario comprender los cambios que tienen lugar en esta transformación para asegurar la calidad final (Faustman, 1994).

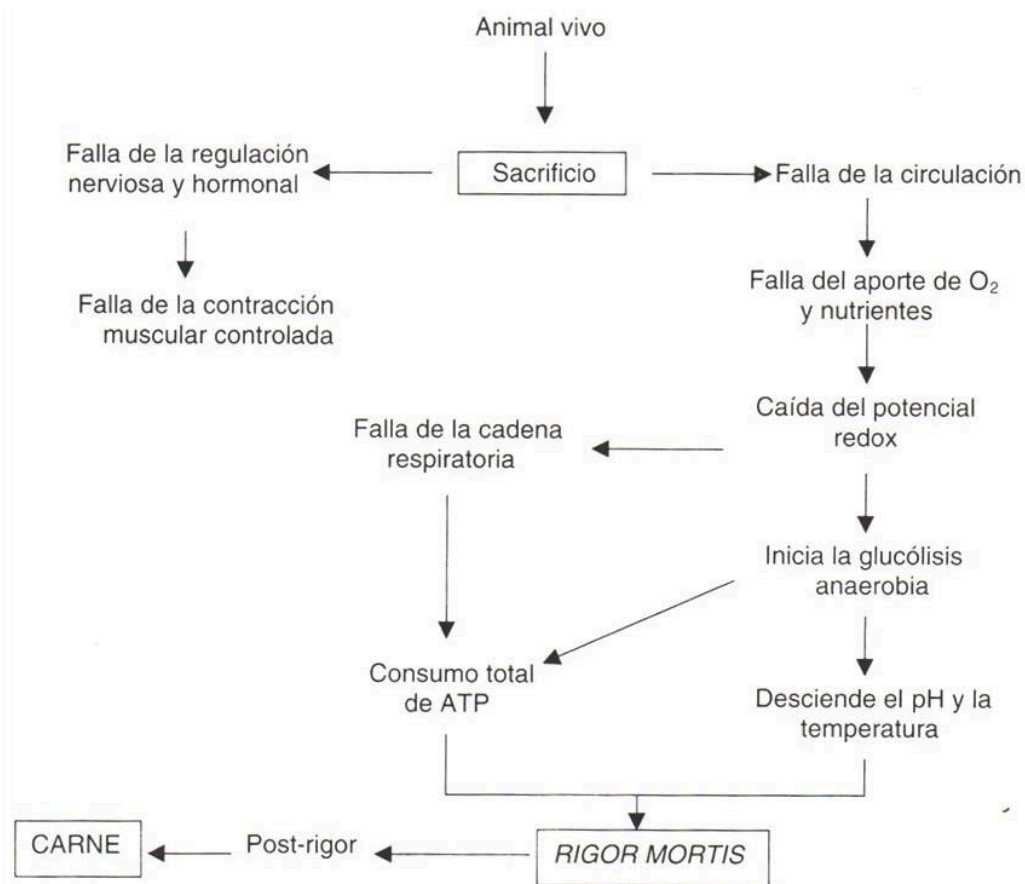


Figura 3. Diagrama de los principales cambios *post rigor* (Hui *et al.*, 2013, Pérez *et al.*, 2000).

Etapa de *pre rigor*.

El sistema circulatorio provee de oxígeno y nutrimentos al tejido muscular, además de eliminar los metabolitos de desecho. Con la exanguinación, la única fuente posible de oxígeno para soportar el metabolismo aerobio es aquel que se encuentra unido a la mioglobina. Posteriormente, cuando el oxígeno se agota, el tejido muscular adopta un metabolismo anaerobio, siendo la glucólisis la única vía para obtener energía. Con el establecimiento del metabolismo anaerobio, las reservas de glucógeno disminuyen y el ácido láctico se acumula en el tejido muscular, lo que lleva a una reducción del pH desde valores cercanos a 7 hasta 5.3 a 5.7, según la especie y el manejo. El pH final de la carne puede afectar las propiedades fisicoquímicas de la misma (Brust-Mascher *et al.*, 1999); y la miosina puede adoptar diversas isoformas en función del pH.

Se produce un fallo en los mecanismos que controlan la temperatura corporal, por lo que ésta tenderá a disminuir gradualmente de 38 °C a 10 °C (temperatura a la que se somete a la canal, tras el sacrificio). Una rápida acidificación cuando la temperatura corporal es aún elevada provoca la desnaturalización de proteínas, reducción de la solubilidad y una disminución de retención de agua (Hui *et al.*, 2013).

Rigor mortis

Posterior a la muerte, se pierde el control nervioso, por lo que se observa la aparición de impulsos localizados, que inician rápidos ciclos de contracción y relajación muscular. El *rigor mortis* se presenta poco después de la muerte en donde el tejido muscular se encuentra en un estado de rigidez sostenida y es inextensible. Los procesos que conducen al establecimiento del *rigor mortis* son similares a los que ocurren durante la contracción muscular. Sin embargo, la condición del rigor es irreversible, como consecuencia del agotamiento de las reservas de ATP que evitan la ruptura de los puentes cruzados entre actina y miosina; además carece de control nervioso.

El desarrollo de la glucólisis anaerobia y producción del ácido láctico se acompaña de una reducción de las reservas de glucógeno. Al igual que el glucógeno, las reservas del fosfato de creatina (CP) disminuyen gradualmente debido a que es utilizado para la refosforilación de ADP a ATP. El ciclo de concentración-relajación se detiene debido a la falla en los mecanismos que sintetizan ATP (*Figura 4*), hasta llegar a un estado de contracción sostenida por la formación irreversible del complejo actomiosina (Hui *et al.*, 2013).

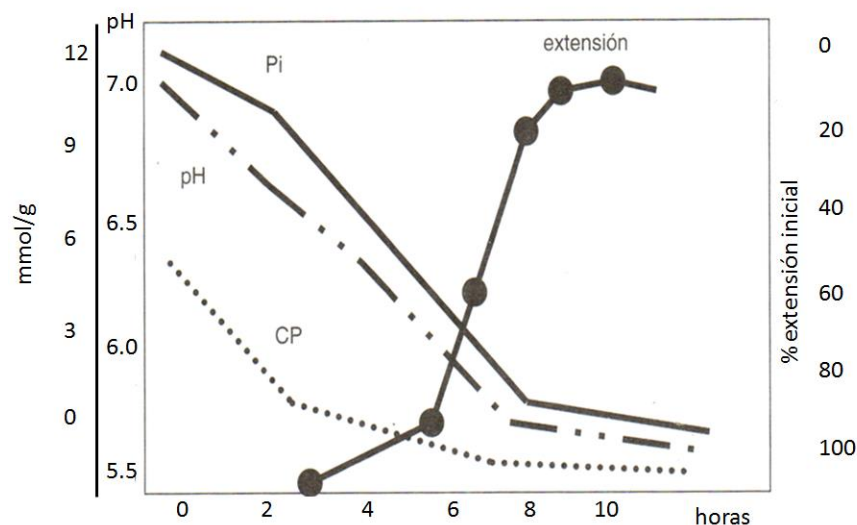


Figura 4. Cambios *post rigor* en la concentración CP y fósforo inorgánico, así como el cambio de pH y % de extensión en el tejido muscular (Hui *et al.*, 2013, Faustman, 1994)

Post rigor

Etapa donde el tejido muscular recupera gradualmente cierta elasticidad debido a la pérdida de la integridad del tejido, mejorando la textura y formando compuestos precursores de aroma a carne. El aumento en la suavidad se debe a la degradación de proteínas como la titina, nebulina, actina y miosina que da como resultado la pérdida de tensión y cambios en la estructura de las miofibrillas, además del debilitamiento de la línea Z por fragmentación de la desmina. Ahn *et al.* (2003) encontraron que el debilitamiento de los discos Z se debe principalmente a la liberación de fosfolípidos presentes en la línea Z, inducido por la alta liberación de iones Ca^{2+} .

Por efecto de los cambios *post rigor* las propiedades de membrana se ven alteradas y el tejido es susceptible a reacciones de degradación autolítica por acción de enzimas endógenas y exógenas. Las proteasas endógenas que debilitan la estructura miofibrilar pertenecen principalmente a dos grupos de sistemas enzimáticos, las catepsinas y las calpaínas, que actúan en forma cooperativa; aunque otros autores como Hori *et al.*, (2002) sugieren la presencia de serinproteasas como las miosinasas, las cisteínproteasas como las caspasas y el sistema proteolítico ubiquitina-proteosoma (Henning *et al.*, 1998; Du *et al.*, 2005).

Las catepsinas o proteasas lisosomales ácidas degradan a proteínas como la miosina y la actina, además de carbohidratos y lípidos, ya que los lisosomas están relacionados con la digestión intracelular. Estas enzimas se liberan de los lisosomas en la etapa *post rigor* cuando desciende el pH, debido a que la membrana de los lisosomas se rompe por la diferencia de presión ejercida por los iones H⁺ (García *et al.*, 2003).

Las calpaínas también son conocidas como factor activado por calcio o proteasas neutras activadas por calcio. Este grupo consta de dos tipos: las m-calpaínas que requieren alta concentración de calcio (300 µM), y las µ-calpaínas que requieren para su actividad una concentración menor a 5 µM de calcio. Estas también son llamadas calpaína I y II. Ambos tipos de calpaína se encuentran en el sarcoplasma y tienen una actividad óptima a pH entre 6.6 a 6.8, por lo que se cree que actúan primordialmente en la etapa del *pre rigor* (García *et al.*, 2003). Sin embargo, algunos autores sugieren que el sólo incremento de la concentración *post rigor* de iones de Ca⁺ en el sarcoplasma (hasta 0.2 mM) debilita la estructura de las miofibrillas y la de los filamentos intermediarios, en donde la desmina junto con la nebulina y titina son los principales responsables del ablandamiento *post rigor* (Tatsumi *et al.*, 2003).

Factores que afectan a la calidad final de la carne

Se ha reconocido desde hace tiempo que muchos parámetros durante la vida del animal pueden ejercer una influencia significativa sobre la calidad y la composición de la carne: la edad, el sexo, la nutrición, la funcionalidad muscular, el estrés, etc. Sólo recientemente se ha admitido que la calidad puede verse modificada, a veces en gran medida, al aplicar diversos tratamientos *post rigor*: el enfriamiento diferido o retardado, la maduración a alta temperatura, la estimulación eléctrica, las altas presiones, etc.

Factores *post rigor*

Maduración

La maduración, se refiere a los procesos físicos y químicos que ocurren al almacenar la carne a temperatura de refrigeración (2 – 5 °C) por un período de tiempo, generalmente de 7 a 21 días. Está establecido que la maduración aumenta la ternura de la carne durante el almacenamiento *post rigor* de las canales bajo condiciones de refrigeración,

este aumento en ternura es debido a la pérdida de la integridad de las miofibrillas *post rigor* (Hui *et al.*, 2013).

Básicamente existen dos formas fundamentales para la maduración de la carne: maduración en seco “dry aging” y en mojado o húmedo “wet aging”. La maduración en mojado o húmedo se realiza empacando la carne en un sistema al alto vacío en bolsas impermeables a la humedad y almacenadas bajo refrigeración (5 °C) por un periodo de tiempo definido. La maduración en seco tradicional expone la carne, con una gruesa capa de grasa subcutánea, sin empacar directamente a condiciones de refrigeración (5 °C) con control estricto de temperatura, humedad relativa y movimiento de aire (Lundesjö *et al.*, 2006).

La maduración *post rigor* se debe realizar a temperaturas específicas y controladas, porque temperaturas elevadas en la canal durante este periodo, aumentarán la velocidad de maduración, disminuyendo la ternura y favorecerán el desarrollo microbiano. La combinación de pH bajos y temperatura alta promueve una liberación temprana de calcio del retículo sarcoplásmico (Lundesjö *et al.*, 2006). Del mismo modo, si el almacenaje de glucógeno es más bajo, la glucólisis anaerobia será más baja de lo normal, por lo que la formación de ácido láctico será menor y el pH al final del *rigor mortis* no disminuirá, siendo aproximadamente de 6, trayendo como consecuencia el síndrome de *Dark Firm Dry* o carne Oscura Firme y Seca (Wulf *et al.*, 2002).

La maduración de la carne es un proceso muy variable dependiendo de factores biológicos (edad, sexo y tipo de músculo) y condiciones de procesado. Es un hecho demostrado que las proteasas del músculo son fundamentales en el desarrollo de la ternura y la calidad de la carne durante la maduración (Hui *et al.*, 2013).

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de cadenas polipeptídicas, teniendo como función principal el mantener el equilibrio entre síntesis y degradación de proteínas, el cual es un proceso importante en los organismos vivos (Berg *et al.*, 2002). El mecanismo de catálisis ocurre de la siguiente manera (*Figura 5*):

- 1) Formación del complejo de Michaelis entre sustrato y enzima.
- 2) Hidrólisis de enlace peptídico liberando péptidos y la enzima.

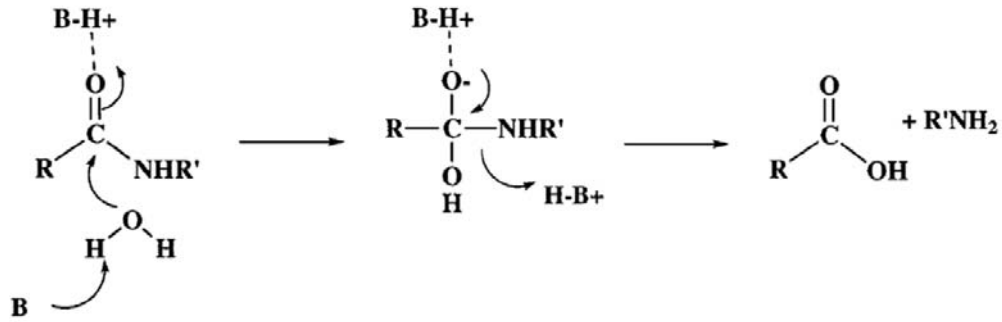


Figura 5. Catálisis de la hidrólisis de péptidos. Activación del carbonilo mediante un ácido general, activación de una molécula de agua mediante una base general y protonación del grupo amina saliente (Hedstrom, 2002).

Las enzimas proteolíticas poseen una especificidad extrema; pueden catalizar reacciones a bajas temperaturas y dentro del intervalo de pH de 2 a 9 e hidrolizan enlaces amídicos de sustitución (Hui *et al.*, 2013). El músculo contiene diversos tipos de proteasas en cantidades muy pequeñas, sus propiedades fisicoquímicas y catalíticas en una especie dada pueden variar con la edad, dieta, ejercicio y temperatura del hábitat entre otros. El manejo del animal y del músculo *post rigor* pueden tener un efecto profundo en la actividad de las enzimas endógenas que actúan para producir el ablandamiento *post rigor* (Hui *et al.*, 2013).

Muchos estudios han evaluado los cambios que ocurren en el músculo durante el almacenaje *post rigor* y la relación existente en la terneza de la carne. Un aumento en la temperatura de la canal temprano en el período de *post rigor* aumenta la velocidad del proceso de maduración y ocurrirá un aumento en la terneza de la canal (Lundesjö *et al.*, 2006).

Se han identificado dos sistemas proteolíticos endógenos de la carne que son las calpaínas y las catepsinas, estos pueden actuar en forma aislada, o bien, ambos pueden ejercer una acción cooperativa sobre el tejido muscular. Está aceptado que estos sistemas son los mismos en todos los músculos independientemente de la especie animal, ya que no existen diferencias (Kuber *et al.*, 2004). Dos de las proteínas estructurales de las miofibrillas han demostrado que cambian durante la maduración *post rigor*, la titina y la nebulina (Huff-Lonergan *et al.*, 1995).

Estudios sobre degradación de proteínas han demostrado que las calpaínas producen proteólisis sobre la troponina T, troponina I, tropomiosina, α -actinina, titina y nebulina (Zeece *et al.*, 1992). Se ha observado que la nebulina es degradada por las calpaínas, pero no hay un efecto de calpaínas sobre miosina y actina (Greaser *et al.*, 1995).

Solo el sistema proteolítico calpaína tiene todas las características necesarias para inducir los cambios *post rigor* que resultan en el ablandamiento de la carne (Aberle *et al.*, 2001). Las catepsinas lisosomales tienen un efecto conjunto con las calpaínas del músculo durante el proceso de acondicionamiento, pero se ha sugerido que las catepsinas son más importantes que las calpaínas en el rompimiento de la miofibrilla después del *rigor mortis* (Hui *et al.*, 2006).

Wheeler *et al.*, (1994) reportaron que un aumento en el tiempo de maduración de 24 h a 14 días mejora significativamente la ternura de la carne. Huff-Lonergan *et al.*, (1995) establecen que este aumento se debe a la pérdida de integridad de las miofibrillas y de otros elementos citoesqueléticos de la célula muscular. Dos de estos componentes estructurales de las miofibrillas, que se han comprobado que cambian durante la maduración son las proteínas titina y nebulina (Hui *et al.*, 2013).

Olson *et al.*, (1977) encontraron que músculos menos tiernos presentan menor degradación miofibrilar durante el almacenamiento *post rigor*. El primero y más notable cambio que ocurre en las proteínas miofibrilares durante el almacenamiento *post rigor* es el rompimiento de los discos o línea Z. Algunos estudios muestran que las enzimas

proteolíticas en forma individual contribuyen al rompimiento de las miofibrillas y de las estructuras del tejido conectivo (Hui *et al.*, 2013).

Algunos autores han discutido la estructura y función del colágeno y su comportamiento durante la maduración. Sugieren que la cantidad de enlaces inter- e intramoleculares pueden alterar las propiedades del músculo, especialmente la ternura. Se sabe que ciertas enzimas hidrolizan el colágeno y podrían jugar un papel importante alterando las propiedades del tejido conectivo durante la maduración (Bodwell *et al.*, 1971).

Degradación de compuestos nitrogenados

La degradación de estos compuestos va a producir alteraciones organolépticas importantes en la carne. Para una mejor comprensión de los mecanismos que aquí intervienen, los dividiremos en las alteraciones sufridas por el nitrógeno proteico y las que suceden sobre el nitrógeno no proteico (Oliveira, 2006).

Nitrógeno proteico

Los cambios autolíticos de las proteínas, se deben a la acción de catepsinas. Éstas producen la degradación (hidrólisis) de la proteína a péptidos y aminoácidos. El aumento de la concentración de aminoácidos libres en el músculo, constituye un medio adecuado para el crecimiento microbiano. Por acción enzimática producida por éstas bacterias se degradan los aminoácidos, descarboxilando o desaminando, originando de ésta manera, diferentes aminas biógenas (Huss, 1998). Estos productos finales nos van a influir fundamentalmente en el olor que vamos a percibir al examen organoléptico. A modo de ejemplo de algunos compuestos finales de la degradación de los aminoácidos mencionamos: arginina dará como producto final NH_3 ; histidina dará como producto final histamina; lisina dará como producto final cadaverina; ornitina dará como producto final putrescina; tirosina dará como producto final tiramina (Oliveira, 2006).

El interés inicial por la histamina de los alimentos surgió por su posible acción tóxica, directa o indirecta, tras el consumo de alimentos que la contenía en cantidades relativamente elevadas. La toxicidad de histamina parece ser reforzada por la

presencia de otras aminas semejantes como cadaverina y putrescina (Torry Research Station, 1989).

Nitrógeno no proteico

Según Oliveira (2006), la determinación de estos compuestos tiene amplia aplicación práctica, ya que éstos, son indicadores de frescura. Existe el óxido de trimetilamina (compuesto que tendría funciones de osmoregulador) que por reducción bacteriana, pasa a trimetilamina y luego por acción enzimática (no necesariamente bacteriana), se reduce a dimetilamina, monometilamina y amoníaco. Todos estos compuestos son volátiles y se les conoce como Bases Nitrogenadas Volátiles Totales (N-BVT), su determinación en una muestra analizada, nos indica la frescura de la misma, cuánto más fresco esté el producto más bajos serán los valores de N-BVT. Los métodos empleados para la determinación de ellas son el método de microdifusión de Conway, el de destilación directa y el de destilación por arrastre de vapor (Bertullo, 2001).

El método de destilación la AMC (Analytical Methods Committee of the Royal Society of Chemistry, 1994), propone el método para determinar N-BVT, el cual se basa en un procedimiento de semimicrodestilación. Los extractos o soluciones se alcalinizan con hidróxido de sodio. Las bases se destilan al vapor y se reciben en ácido estándar y se titulan por retroceso con álcali estándar. Se agrega formaldehído a la mezcla neutralizada y el ácido que se libera equivale a las bases volátiles que no son trimetilamina (Kirk *et al.*, 1996).

Ablandamiento *post rigor*

El ablandamiento *post rigor* sólo puede lograrse al romper las uniones de algunas proteínas estructurales, ya sea por los métodos físicos mencionados o por acción enzimática. En la maduración enzimática, se pueden distinguir entre la acción de enzimas exógenas aplicadas voluntariamente o no a la carne y enzimas endógenas.

II. ANTECEDENTES.

En el 2010, los productores de carne de bovino en EUA enfrentaron un aumento en sus costos de producción debido al incremento en los precios de granos. Estados Unidos es el tercer exportador mundial de carne de bovino, después de Brasil y Australia. Al mismo tiempo, EUA es el principal importador de carne de bovino, principalmente de crianza en pastizal, seguido por Rusia y Japón, Unión Europea, Corea del Sur, México y Canadá.

En México, el sector cárnico se divide generalmente en carne de bovino, porcino, caprino, ovino y aves, pasando de las 6,013,374 toneladas (canal) producidas en el año 2013 a 6,114,713 toneladas (canal) en el año 2014 (SAGARPA, 2014). En la *Figura 6* se muestra la conformación porcentual en la producción en México.

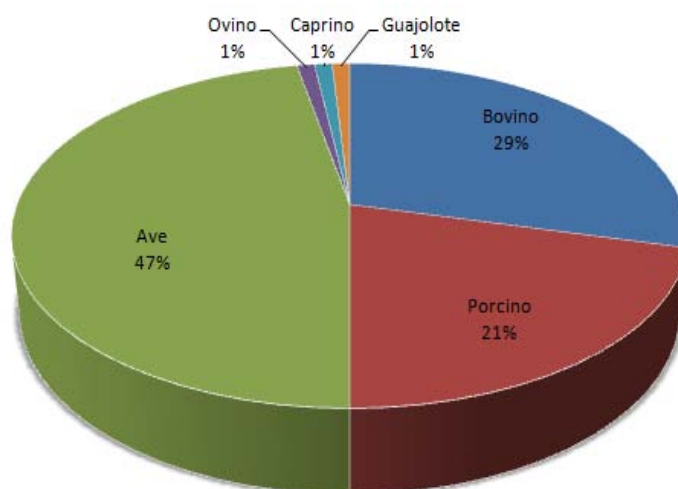


Figura 6. Conformación porcentual de la producción de carnes en México (SAGARPA, 2014).

La perspectiva nacional de carne de bovino durante el periodo de 2011-2020 estima una tasa media anual de crecimiento (TMAC) del 1.4%. En 2020, se proyecta que existan 6.8 millones de cabezas para la producción de carne, 4.1 millones en doble propósito y 2.5 millones de vacas lecheras especializadas.

Con respecto al consumo de carne de bovino, se proyecta un ligero aumento a lo largo del periodo de 2011-2020 (*Figura 7*). En 2011, se obtuvo un consumo aproximado de 1.9 millones de toneladas métricas (mtm) y en 2020 se estima que alcance 2.2 mtm. La

diferencia entre la producción de carne doméstica y el consumo interno está constituida por las importaciones. En los próximos años se prevé que el nivel de importaciones disminuya (Tabla 2).

Tabla 2. Producción y consumo de carne de bovino en México (SFA-SAGARPA, 2011).

Año calendario	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Carne	(miles de toneladas métricas)											
Producción	1,705.0	1,751.2	1,792.7	1,850.0	1,903.3	1,943.5	1,982.1	2,015.0	2,043.5	2,069.1	2,091.0	2,107.9
Importaciones	296.7	220.1	189.3	156.6	136.5	134.7	134.3	143.5	160.1	176.5	190.1	192.2
Consumo doméstico	1,960.8	1,885.3	1,894.0	1,918.3	1,951.1	1,989.6	2,027.8	2,070.0	2,115.2	2,157.4	2,193.1	2,212.1
Exportaciones	40.9	86.0	88.0	88.4	88.7	88.7	88.7	88.6	88.4	88.2	88.0	88.0

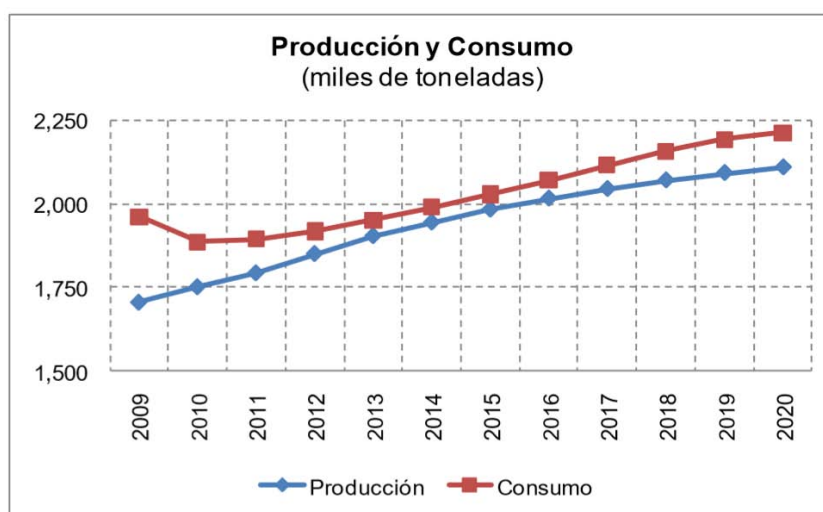


Figura 7. Perspectiva nacional de carne de bovino (SFA-SAGARPA, 2011).

Maximizar la eficiencia de producción, aumentar el rendimiento y tener una buena calidad en la carne, son puntos clave para la elección de estrategias usadas en la producción de la misma, uno de los métodos desarrollados para aumentar la eficiencia del crecimiento, mejorar la calidad de la carne y la composición de la canal es el uso de agonistas β adrenérgicos (β -AA) (Beermann, 2014).

Se conoce como promotores del crecimiento o β -AA a toda sustancia natural o de síntesis con actividad farmacológica que se administra a los animales sanos para acelerar la ganancia de peso y mejorar los índices de transformación de los alimentos. Estos agentes posibilitan un crecimiento más rápido y más eficiente del animal. Ello provoca alternativamente la reducción de los costos de alimentación y el tiempo de

alimentación que los animales pasan en el campo. También ayuda a criar animales con menos grasa, ya que el crecimiento acelerado ocurre principalmente en los tejidos musculares magros y no en la grasa animal (Rubio, 1996). Estos compuestos comprenden un grupo de derivados sintéticos con actividad oral, cuyo mecanismo de acción es similar al de las catecolaminas, epinefrina y noraepinefrina (Garza *et al.*, 1997).

Se ha estudiado el efecto del β -AA denominado clorhidrato de zilpaterol (CZ) en bovinos para carne y cerdo (Rincón *et al.*, 2010), así como de ractopamina (Quinn *et al.*, 2008); pero la información disponible acerca de ovinos es escasa.

En Europa no se permite el uso de β -AA en la producción animal (Kuiper *et al.*, 1998) por razones de salud pública. En México, se ha utilizado el CZ en bovinos y ovinos (Castellanos *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2009), y el clorhidrato de clenbuterol en ganado bovino, que es otro β -AA (Sillence *et al.*, 1993; Geesink *et al.*, 2006). Sin embargo, el uso indebido de clenbuterol causa problemas de salud, por lo cual, en México la norma NOM-061-ZOO-1999 prohíbe su uso. Esta norma excluye al clorhidrato de ractopamina (CR) y el CZ, que son fármacos con menor potencia en la broncodilatación, vasoconstricción y en la frecuencia cardíaca (Sumano *et al.*, 2002).

El clorhidrato de zilpaterol (*Figura 8*) deriva de las catecolaminas y pertenece al grupo de los agentes de partición, cuya característica principal es el desvío de la energía en la dieta para la síntesis de proteína en lugar de sintetizar grasa, con lo cual se incrementa la tasa de ganancia de peso y mejora la síntesis de proteína (Garcés *et al.*, 1998).

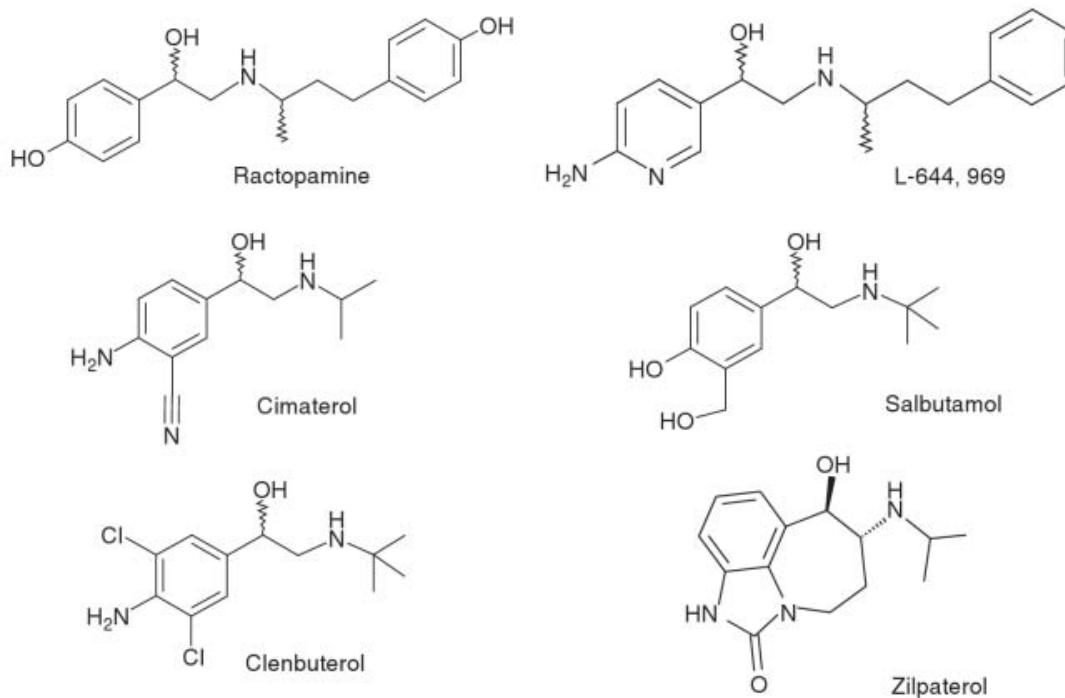


Figura 8. Estructura química de β -AA que han sido estudiados para la producción de carne (Beermann, 2014).

Los β -AA afectan directamente al tejido adiposo y al tejido muscular esquelético, su acción se encuentra mediada por receptores de membrana llamados receptores β -adrenérgicos, los cuales se encuentran integrados por tres subtipos β 1-AR, β 2-AR y β 3-AR, estos receptores funcionan uniéndose a proteínas G (transductoras de señales), seguida de esta unión la adenilatociclasa es activada, esta enzima es la responsable de la conversión de ATP a AMPc, el AMPc regula la función de la proteína cinasa A, que es una enzima responsable de la fosforilación de proteínas lo cual tiene impacto en señales que controlan las actividades metabólicas de las células musculares y de los adipositos (Mersmann, 2002).

En las células del músculo esquelético estas fosforilaciones tienen un impacto en el aumento de la síntesis de RNA lo que conlleva a un aumento en la síntesis de proteínas musculares en la célula, esto resulta en una hipertrofia, es decir que las células aumentan su tamaño pero no aumentan su cantidad. Otro efecto es el cambio de propiedades metabólicas de las fibras musculares, ya que el porcentaje de fibras

con metabolismo glicolítico aumenta y aquellas con metabolismo aerobio se ven disminuidas.

Los receptores β -AR se encuentran presentes en las células blanco, sin embargo su proporción varía ampliamente y es esta proporción la que determina su efecto en el tejido específico, por ejemplo, el tejido muscular esquelético bovino contiene receptores β 2-AR en mayor proporción que β 1-AR, lo que explica que los β 2-adrenérgicos sean más eficientes para el ganado bovino,

En el tejido muscular los β 2-adrenérgicos incrementan la masa muscular de un 8% a un 40 % mediante la síntesis de proteínas, así mismo, disminuye la degradación proteica. En comparación, los β 1-adrenérgicos tienen una mayor síntesis de proteínas, pero su masa muscular disminuye con respecto a los β 2-adrenérgicos (Anderson *et al.*, 2014; Beermann, 2014).

Tabla 3. Efectos comparativos de los β 1 y β 2 adrenérgicos (Anderson *et al.*, 2014).

	Tipo de adrenérgico	
	β 1	β 2
Síntesis de proteína	++	+
Degradación de proteína	NS	-
Proteína total	+	++
Lipogénesis	-	-
Lipólisis	NS	++
Deposición neta de grasa	-	-
Masa muscular	+	++
Área muscular de la sección transversal	+	++
Número de fibra muscular	NS	NS
Espesor de grasa externa	NS	-

Abreviación: NS, no significativo.

Los mecanismos intracelulares que controlan la conversión a proteína *in vivo* son similares a los cambios *post rigor* que dictan la suavidad de la carne. La administración de β 2-adrenérgicos aumenta el nivel de calpastatinas en el músculo esquelético, estos

son inhibidores de las calpaínas lo que inhibe la degradación de proteína (Anderson *et al.*, 2014).

La administración de estos compuestos afecta de manera directa la actividad de los componentes del sistema proteolítico de las calpaínas, la actividad de la μ -calpaína se ve disminuida, mientras que la actividad de las calpastatinas se ve aumentada. La fosforilación de la μ -calpaína por acción de la proteínasa A se traduce en una pérdida de actividad, el aumento en el AMPc a causa de la presencia de los β -AA que estimulan el funcionamiento de ésta enzima. El aumento en los niveles de actividad de las calpastatinas se atribuye a una regulación pretraduccional de los genes, ya que la concentración de mRNA es superior a la normal, esto se refleja en una mayor síntesis de enzima, esta regulación también se puede dar por fosforilación (Geesink, 2006).

En carne de bovinos tratados sin y con CZ, Avendaño *et al.*, (2006) muestran valores mayores de fuerza de corte (4.39 vs 5.11 kg cm⁻²), atribuible a una poca actividad enzimática durante la congelación, con cierta actividad proteolítica y por lo tanto, mejor suavidad de la carne.

El estudio de la carne y de su calidad, constituyen una de las principales áreas que integran la investigación en ganadería de engorda y tecnología de los alimentos (Rodríguez, 1986). El β -AA, clorhidrato de zilpaterol o también llamado “repartidor de energía” (Mersmann, 1998), presenta una serie de ventajas relacionadas no sólo con la mejora de la productividad, sino también con la calidad, pues la carne de animales tratados con β -AA tiene mayor tejido magro (Ricks *et al.*, 1984), así como aumento de la masa muscular.

Debido a que son pocos los estudios relacionados a la ingesta de CZ y los cambios bioquímicos en la actividad proteolítica de la carne, este trabajo pretende evaluar la presencia de nebulina durante la maduración, los cambios en la actividad de calpaína, calpastatina, catepsina, colagenolítica y elastinolítica, enzimas que actúan de forma coordinada degradando las proteínas de la fibra muscular disminuyendo el *rigor mortis* que se produce posterior al sacrificio. Así como la evaluación de la calidad, mediante la determinación de bases volátiles nitrogenadas totales (N-BVT) en carne de bovino a la

cual se le suministró clorhidrato de zilpaterol sometida a dos procesos de maduración (húmedo y seco, ambos a 4 °C), tomando diferentes muestras a diferentes tiempos después del sacrificio (tiempo= 0, 1, 3, 7, 14 y 21 días).

III. HIPÓTESIS

El suministro de clorhidrato de zilpaterol en la dieta de bovinos producirá un efecto antagónico en la actividad enzimática de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares; así como, el proceso de maduración en húmedo favorecerá la degradación proteolítica en comparación de la maduración en seco.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del clorhidrato de zilpaterol sobre las actividades enzimáticas de calpaína, catepsina, calpastatina, elastina y colágeno, así como la presencia de nebulina durante la maduración (húmeda y seca) en carne de bovino.

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar la actividad proteolítica de calpaína, catepsina, calpastatina, colágeno y elastina en la fracción sarcoplásmica de carne con y sin suministro de clorhidrato de zilpaterol durante su maduración en húmedo y seco, mediante la especificidad por sustrato.

Determinar la presencia de nebulina en la fracción miofibrilar durante los procesos de maduración en carne con y sin suministro de clorhidrato de zilpaterol mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

Evaluar mediante el método de bases volátiles nitrogenadas totales (N-BVT) la calidad de carne con y sin suministro de clorhidrato de zilpaterol durante su maduración en húmedo y en seco.

V. METODOLOGÍA

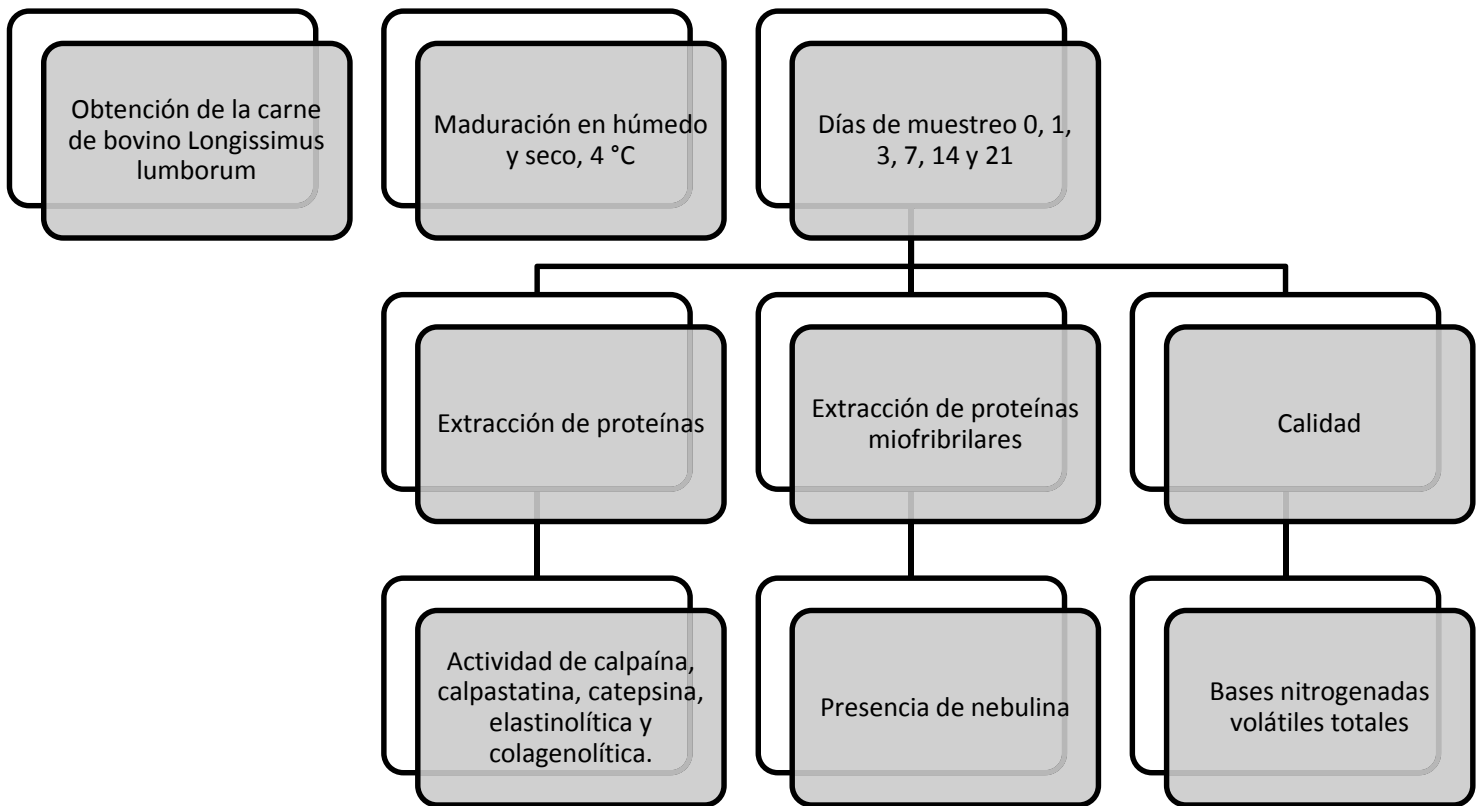


Figura 9. Diagrama general de trabajo.

Obtención y preparación de las muestras

Se seleccionaron 12 animales machos enteros jóvenes, línea F1 (cruza comercial cebú con pardo suizo) de características fenotípicas similares, de 20 a 22 meses de edad. Los animales pertenecientes a un rancho en el municipio de Ezequiel Montes tuvieron un periodo de engorda de 120 días. Los animales fueron separados en dos corrales en los últimos 30 días, previos a la matanza, a 6 de ellos se les suministró clorhidrato de zilpaterol (CZ) y 6 de animales a los que no se les suministró clorhidrato de zilpaterol en la dieta se trataron como control. Los animales se identificaron en pie y se trasladaron al Rastro TIF-338 “Distribuidora de Carnes del Bajío S.A. de C.V.” para su sacrificio y obtención de la canal. Las canales se mantuvieron en refrigeración entre 2 y 4 °C durante 24 h, después de lo cual se extrajo el M *Longissimus dorsi* (de la doceava vertebra torácica a la septima lumbar) en ambas mitades de la canal. Los

lomos se empacaron al vacío y se transportaron en envases isotermicos con geles refrigerantes al laboratorio de calidad de carne de la FMVZ-UNAM. Una vez en el laboratorio, los lomos de las medias canales izquierdas de cada tratamiento con y sin CZ se maduraron en seco y los lomos derechos en maduración húmeda. La carne sin empacar se colocó sobre rejillas dentro de una cámara de maduración con una humedad del 50-55% y una temperatura entre 2 y 4 °C, durante 21 días para la maduración en seco; en tanto que, los lomos empacados al vacío se mantuvieron dentro de la misma cámara bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo para la maduración húmeda. Los días de muestreo fueron 0, 1, 3, 7, 14 y 21. Esta parte fue realizada por el MVZ Francisco Ruiz López como parte de su tesis de maestría, (Ruíz-López, 2015).

Condiciones de almacén de las muestras

En cada día de muestreo se corto una chuleta de 2.5 cm de espesor de cada uno de los lomos, obteniendo 6 muestras (n=6) para cada tratamiento, estas muestras se empacaron al vacío y se congelaron a -80 °C para su posterior análisis en el laboratorio S132 de la UAM-I.

Cuantificación de proteína

De los extractos obtenidos de catepsinas, proteínas sarcoplásmicas y proteínas miofibrilares se determinó la concentración de proteína a través del método de Bradford (Bradford, 1976; Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, Hercules, California, E.U.A.) a una longitud de onda de 595 nm, utilizando un lector de microplacas. Se colocaron 160 µL de muestra y 40 µL de reactivo de Bradford, se homogeneizó y se incubó 5 min para que se llevara a cabo la reacción, posteriormente se procedió a leer en el espectrofotómetro (BioTek, Vermont, E.U.A.); calculando la concentración de proteína con base a una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, E.U.A.) como estándar. La cuantificación se realizó por triplicado utilizando un blanco con amortiguador de trabajo.

El método de Bradford se basa en la interacción entre el colorante hidrofóbico azul brillante de Coomassie G-250 (Bio-Rad) y los residuos aromáticos y básicos de las proteínas. El máximo de absorción pasa de 465 a 595 nm, que es percibido con un cambio de color rojo a azul.

Extracción de proteínas sarcoplásmicas

Se realizó la extracción de proteínas siguiendo la metodología descrita por Rodríguez Ramos (2012). Una fracción de 4 g de la muestra de carne, se homogenizó con 8 mL de la solución de extracción (amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7, 0.9% NaCl). Enseguida se procedió a centrifugar por 30 min a 2000 x g, a 4 °C en una centrífuga (Eppendorf 5810 R, Hamburgo, Alemania); se recuperó el sobrenadante para ser almacenado a -80 °C hasta la determinación de la actividad de calpaína, calpastatina, elastinolítica y colagenolítica.

Extracción de catepsinas

Las enzimas lisosomales se extrajeron según el método de Etherington *et al.*, (1990), modificada por Sárraga *et al.*, (1993). En la cual las muestras se homogeneizaron en una porción del músculo en cuatro partes (w/v) de 50 mM de amortiguador de acetato de sodio pH 5.0, EDTA 1 mM y 0.2% de Triton-X 100 enfriado con hielo. El extracto homogeneizado se sometió a agitación constante durante 1 h a 4 °C y luego se centrifugó a 7500 x g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se filtró para eliminar los residuos, se almacenó a -80 °C hasta la determinación de la actividad de catepsinas.

Extracción de proteínas miofibrilares

Las proteínas miofibrilares se extrajeron de acuerdo a la metodología reportada por García-Barrientos (2001). En la cual las muestras se homogeneizaron durante 2 min con hielo y agua desionizada en proporciones 1:1:1 (p/p/v). La mezcla anterior se

mantuvo en agitación constante en un baño con hielo durante 10 min, posteriormente, se filtró dos veces utilizando gasa para eliminar el tejido conectivo. Al filtrado obtenido se le adicionó agua desionizada en proporción 1:1.5 (v/v), previamente enfriada a 4 °C. Posteriormente, se sometió a agitación constante durante 15 min para precipitar las proteínas miofibrilares. Las muestras se centrifugaron a 4000 x g por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en un amortiguador de fosfatos de sodio 50 mM pH 7, NaCl 0.6 M para ser almacenado a 4 °C hasta la determinación de la presencia de nebulina en ambos procesos de maduración (húmedo y seco).

Especificidad por sustrato: actividad espectrofotométrica

Actividad elastinolítica

Se utilizó como sustrato Elastin-Congo Red (Sigma-Aldrich) a una concentración de 5 mg/mL resuspendido en un amortiguador de trabajo 50 mM Tris-HCl pH 7.6 (PBS). Se trabajó en tubos de 1.5 mL con un volumen de reacción de 1 mL utilizando 100 µL de muestra. Se hicieron reaccionar durante 60 min a 35 °C. Se detuvo la reacción a 4 °C en hielo por 10 min y posteriormente se centrifugó a 12000 x g durante 10 min a 4 °C. Se leyó la absorbancia del sobrenadante a 495 nm. Se reportó la actividad específica como el cambio en la absorbancia a 495 nm en 0.01 unidades por mg de proteína (U/mg proteína) (Kessler *et al.*, 1997). El blanco utilizado contenía la elastina resuspendida en PBS y el control positivo utilizó como muestra enzimática proteinasa K (Gene All, Seoul, Korea) 1 mg/mL.

Actividad colagenolítica

Se utilizó como sustrato colágeno Hide-Remazol Brilliant Blue R (Sigma-Aldrich) en una concentración de 5 mg/mL resuspendido en PBS. Se trabajó en tubos de 1.5 mL con un volumen de reacción de 1 mL utilizando 100 µL de muestra. Se hicieron reaccionar durante 90 min a 35 °C. Se detuvo la reacción a 4 °C en hielo por 10 min y

posteriormente se centrifugó a $12,000 \times g$ durante 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se leyó la absorbancia del sobrenadante a 595 nm. Se reportó la actividad específica como el cambio en la absorbancia a 595 nm en 0.01 unidades por mg de proteína (U/mg proteína) (Kessler *et al.*, 1997). El blanco utilizado contenía colágeno resuspendido en PBS y el control positivo utilizó como muestra enzimática tripsina (Sigma-Aldrich) 1 mg/mL.

El Elastin-Congo Red y el Hide-Remazol Brilliant Blue R, son sustratos insolubles con alto contenido de elastina y colágeno, que se encuentran unidos covalentemente a un cromóforo (elastin congo red y Remazol azul brillante, respectivamente). Su alto contenido de hidroxiprolina les permite tener sitios de reacción con el colorante. De esta manera al ocurrir la proteólisis, los péptidos provenientes de la proteína se solubilizan junto con el cromóforo y así puede ser medida la actividad proteolítica (Rinderknecht *et al.*, 1968).

Actividad de catepsina

Se determinó a través del método descrito por Rico *et al.*, (1991) . En una microplaca se colocaron 10 μL de muestra, 185 μL de amortiguador de fosfatos 40 mM pH 6.0, 10 mM caseína, 0.4 mM EDTA y 5 μL de sustrato 250 μM N-Suc-Leu-Tyr-NHMec (Sigma-Aldrich) e inmediatamente se procedió a determinar una fluorescencia a 360 nm de excitación y 460 nm de emisión con una sensibilidad de 60 durante 1 h, usando un espectrofluorímetro (BioTek, Vermont, E.U.A.). Se reportó la actividad específica como la cantidad de catepsina (por mg de proteína) que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato por minuto ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ de proteína).

En la determinación de las actividades de calpaína, calpastatina y catepsina, el fluoróforo (7-amido-4-metil-coumarina AMC o NHMec) liberado a partir de la hidrólisis enzimática con el sustrato (N-Suc-Leu-Tyr-NHMec), en el que son excitados los electrones de su molécula aromática, lo cual provoca la emisión de luz a una menor energía. La fluorescencia obtenida da como resultado una medida de la actividad enzimática (Fersht, 1980, Edelstein *et al.*, 1997).

Actividad de calpaína

Se determinó a través del método descrito por Crawford (1987). En una microplaca se colocaron 10 μ L de muestra (proteínas sarcoplásmicas), 185 μ L de amortiguador 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM CaCl_2 , 1 mM ditioneitol, 0.1% Triton X-100 y 5 μ L de sustrato 250 μ M N-Suc-Leu-Tyr-NHMec (Sigma-Aldrich) e inmediatamente se procedió a determinar la fluorescencia a 360 nm de excitación y 460 nm de emisión con una sensibilidad de 60 durante 1 h, en un lector de placas (BioTek, Vermont, E.U.A.). Se reportó la actividad específica como la cantidad de calpaína (por mg de proteína) que cataliza la conversión de 1 μ mol de sustrato por minuto (μ mol/min*mg de proteína).

Porcentaje de inhibición de calpastatina

Se determinó a través del método descrito por Ertbjerg *et al.*, (1999). Para la obtención de calpastatina, se calentaron 30 μ L de muestra a 100 °C durante 3 min., posteriormente se centrifugó a 14,000 x g durante 4 min. Se colocaron 10 μ L de muestra (calpaína), 175 μ L de amortiguador 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM CaCl_2 , 1 mM ditioneitol, 0.1% TritonX-100, 5 μ L sustrato 250 μ M N-Suc-Leu-Tyr-NHMec (Sigma-Aldrich) y se le adicionaron 10 μ L de sobrenadante de calpastatina en una microplaca e inmediatamente se procedió a determinar una fluorescencia a 360 nm de excitación y 460 nm de emisión con una sensibilidad de 60 durante 1 h. Una unidad de actividad de calpastatina se definió como la cantidad que inhibe una unidad de actividad de la calpaína (Ertbjerg *et al.*, 1999); por lo que la actividad específica se reportó como la cantidad de calpastatina (por mg de proteína) que cataliza la conversión de 1 μ mol de sustrato por minuto (μ mol/min*mg de proteína).

Determinación del perfil electroforético

Se realizaron SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes) para conocer el perfil electroforético del compuesto proteico y así determinar la masa molecular (Heusen *et al.*, 1980).

Determinación del perfil electroforético para nebulina.

Se prepararon geles SDS al 5 % de poliacrilamida co-polimerizada para las proteínas miofibrilares con una relación de 100:1 acrilamida:bisacrilamida, respectivamente; siguiendo la técnica descrita por Laemmli (1970). Para esta técnica se utilizó un gel concentrador (H₂O destilada, 1 M Tris-HCl pH 6.8, SDS 10 %, acrilamida 5 % (100:1, APS 10 % y TEMED) y un gel de separación (H₂O destilada, 2 M Tris-HCl pH 8.8, 10 % SDS, 4 % acrilamida, 10 % APS y TEMED). Se cargó en cada pozo 200 µg de proteína y el 20 % de amortiguador de carga (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 % SDS, 2.5 % glicerol, 0.05 % β-mercaptoetanol, 0.05 % azul de bromofenol). Los geles se colocaron en una cámara de electroforesis de proteínas (Mini-Protean 3Cell, Bio-Rad, Richmond, California, E.U.A.) que contenía amortiguador de corrida (25 mM Tris, 186 mM glicina y 1 % SDS) a 120 V durante 2 h. Posteriormente, los geles se lavaron con agua desionizada y se tiñeron con azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad) en 45 % metanol, 45 % agua y 10 % de ácido acético durante 12 h y posteriormente se destiñó con una solución 10:45:45 ácido acético: metanol: agua, respectivamente. Finalmente, el análisis de los geles se llevó a cabo en el fotodocumentador Gel Doc XR+ (Bio-Rad).

La masa molecular de las proteínas que se observaron en los geles se determinó por comparación con el marcador de alta masa molecular (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido).

Determinación del perfil electroforético para calpaína y catepsina

Se realizó siguiendo la metodología anteriormente descrita, solamente se cambió la preparación del gel SDS, el cual fue al 12.5 % de poliacrilamida co-polimerizada para las proteínas miofibrilares con una relación de 30:1 acrilamida:bisacrilamida, respectivamente.

Determinación de la actividad proteolítica por zimograma

Uno de los métodos más utilizados para la detección de compuestos proteicos con actividad proteolítica es el método zimográfico, el cual ayuda a revelar una masa molecular aproximada de la enzima estudiada. El sustrato utilizado en este caso fue la

gelatina, ampliamente utilizado por una gran variedad de proteasas. La gelatina es incorporada a la matriz de poliacrilamida, que tiene una estructura compacta y un tamaño de poro pequeño, limitando así la difusión lateral de la proteasa y permitiendo así mayor resolución (Heusen *et al.*, 1980).

El zimograma de gelatina (0.1% gelatina) se preparó pesando 8.5 mg de gelatina (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y se continuó como anteriormente se describió en la determinación del perfil electroforético. Después de correr los geles bajo las mismas condiciones anteriormente descritas, el zimograma se enjuagó con agua desionizada durante 30 min en agitación suave, posteriormente se lavó con una solución 2.5% de Tritón X100 por 30 min en agitación suave y luego se incubó con amortiguador de renaturalización (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 5 mM CaCl₂, 200 mM NaCl) durante 20 h a 37 °C. Se tiñió con azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad) al 45 % metanol, 45 % agua y 10 % de ácido acético durante 12 h y posteriormente se destiñó con una solución 10:45:45 de ácido acético, metanol y agua, respectivamente. El zimograma contenía un marcador (Molecular High Weight, Bio-Rad) y un control positivo (tripsina 0.1 mg/mL). Las proteínas con actividad proteolítica se identificaron como una banda clara o traslúcida en contra de un fondo azul.

Determinación de bases nitrogenadas volátiles totales

Se determinó a través del método descrito por el Codex Alimentarius (1968). En la cual se homogeneizaron 5 g de muestra con 15 mL de ácido tricloroacético 5 % (m/v). El extracto homogeneizado se centrifugó a 4000 \times g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se filtró y posteriormente se realizó la microdestilación en el destilador (Büchi, Destillation Unit K-350, Flawil, Suiza) con 10 mL del filtrado y 100 mL NaOH 20 % (m/v), recibiendo el destilado en un matraz Erlenmeyer con 50 mL ácido bórico 4 % (m/v), previamente adicionado con 3 gotas del indicador (Shiro T-Shiro). Finalmente se valoró el destilado con ácido clorhídrico 0.1 N, hasta el vire de verde a morado.

Paralelamente se realizó un blanco, destilando 10 mL de ácido tricloroacético en lugar de 10 mL del extracto (muestra).

Análisis estadístico.

Para el análisis de resultados se realizó un análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia del 5% y un nivel de confianza del 95%. Se utilizó el método de Tukey para la comparación de medias entre tratatamientos, así como para cada tiempo de maduración; para ello se empleó el paquete estadístico XLSTAT-Base (2015.5).

En las tablas y gráficas estadísticas los grupos con la misma letra indican que no hay diferencias significativas.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de proteína

En la *Tabla 4* y *Tabla 5* se observan los resultados obtenidos de la cuantificación de proteínas sarcoplásmicas y catepsinas en los diferentes días y procesos de maduración, así como del suministro de CZ.

Tabla 4. Contenido de proteínas sarcoplásmicas.

Tratamiento	Día 0 (mg/mL)	Día 1 (mg/mL)	Tratamiento	Día 3 (mg/mL)	Día 7 (mg/mL)	Día 14 (mg/mL)	Día 21 (mg/mL)	
Con zilpaterol	1±0.2	1±0.3	Seco	2±0.2	2±0.2	87±4	49±4	
				1±0.2	3±0.2	84±4	68±4	
	1±0.2	2±0.3		2±0.2	1±0.2	78±4	58±4	
				1±0.2	1±0.2	135±4	46±4	
	2±0.2	1±0.3		1±0.2	1±0.2	103±4	49±4	
				2±0.2	3±0.2	85±4	50±4	
	Húmedo	2±0.2	1±0.3	2±0.2	2±0.2	52±4	48±5	
				1±0.2	1±0.2	45±4	48±5	
		1±0.2	1±0.3	1±0.2	1±0.2	55±4	55±5	
				1±0.2	1±0.2	43±4	56±5	
		1±0.2	1±0.3	1±0.2	1±0.2	39±4	51±5	
				1±0.2	1±0.2	46±4	76±5	
	Sin zilpaterol	1±0.2	1±0.2	Seco	2±0.2	2±0.2	73±4	46±5
					3±0.2	1±0.2	121±4	55±4
2±0.2		1±0.2	58±4		63±4			
1±0.2		1±0.2	72±4		88±4			
1±0.2		2±0.2	1±0.2		2±0.2	85±4	87±4	
Húmedo		1±0.2	1±0.2	3±0.2	2±0.2	77±4	88±4	
				1±0.2	2±0.2	36±4	52±5	
		1±0.2	2±0.2	2±0.2	2±0.2	36±4	83±5	
				1±0.2	1±0.2	47±4	56±5	
		1±0.2	2±0.2	2±0.2	1±0.2	42±4	58±5	
				1±0.2	1±0.2	51±4	64±5	
				2±0.2	1±0.2	43±4	65±5	

Tabla 5. Contenido de proteínas (catepsinas).

Tratamiento	Día 0 (mg/mL)	Día 1 (mg/mL)	Tratamiento	Día 3 (mg/mL)	Día 7 (mg/mL)	Día 14 (mg/mL)	Día 21 (mg/mL)		
Con zilpaterol	67±5	*	Seco	11±5	13±2	41±4	22±3		
				16±5	14±2	42±4	38±3		
	*	71±5		14±5	19±2	37±4	28±3		
				28±5	18±2	49±4	37±3		
	84±5	39±5		15±5	13±2	43±4	34±3		
				15±5	12±2	45±4	34±3		
			Húmedo	51±4	53±4	26±5	55±5		
	122±5	68±5		66±4	49±4	27±5	54±5		
				55±4	55±4	26±5	60±5		
	109±5	26±5		58±4	52±4	28±5	58±5		
				57±4	46±4	22±5	46±5		
	127±5	52±5		62±4	43±4	39±5	59±5		
	Sin zilpaterol	48±5		26±3	Seco	*	17±2	29±4	27±2
						17±4	21±2	30±4	26±2
*		30±3	10±4	22±2		24±4	23±2		
			21±4	19±2		29±4	30±2		
58±5		32±3	18±4	22±2		36±4	23±2		
			14±4	18±2		22±4	27±2		
			Húmedo	43±3	35±3	21±3	35±3		
55±5		41±3		34±3	29±3	23±3	30±5		
				36±3	34±3	28±3	33±3		
82±5		44±3		40±3	35±3	23±3	39±3		
				36±3	35±3	26±3	50±3		
66±5		38±3		43±3	26±3	*	37±3		

*No se contaba con muestra, debido a que ya se habían realizado los demás determinaciones.

Especificidad por sustrato: actividad espectrofotométrica

Actividad elastinolítica

La actividad elastinolítica fue determinada, mediante la hidrólisis de la elastina, la cual es insoluble, por lo que su actividad se mide como la liberación de sus fragmentos

solubles, los cuales están unidos a un cromóforo para así ser medidos a una longitud de onda 495 nm.

En el presente trabajo se llevó a cabo la determinación de la actividad elastinolítica, la cual presentó mayor actividad en el día 3, así como una disminución gradual para los días 7, 14 y 21. Durante los días 0 y 1, es decir, las primeras 24 h después de la muerte del animal, se lleva a cabo el descenso del pH y se inicia el período de maduración de la carne (Maltin *et al.*, 2003), por lo que los días 0 y 1 no fueron sometidos a la maduración en húmedo y en seco. El análisis estadístico (*Figura 10*) mostró una diferencia significativa durante los días 0 y 1 en la actividad elastinolítica entre el tratamiento de maduración y el suministro o no de clorhidrato de zilpaterol (CZ) en la carne.

En la *Figura 10* se observa al día 3 de maduración un incremento de la actividad elastinolítica en la carne con y sin suministro de CZ; mientras que para la carne con suministro de CZ con maduración en seco, la actividad elastinolítica disminuye con respecto al día 1. Para el día 7 de maduración se observa un descenso de la actividad proteolítica, para ambos procesos de maduración. Lo cual se confirma por medio del análisis estadístico, donde el día 3 y 7 de maduración existe diferencia significativa entre los tratamientos, es decir, entre el tratamiento de maduración y el suministro o no de CZ en la carne.

En la *Figura 10*, se muestra de igual manera que estadísticamente hay diferencia entre el tiempo de maduración y los tratamientos (procesos de maduración con suministro o no de CZ) significativa en los días 3 y 7, mientras que no hay diferencia significativa para los días 14 y 21.

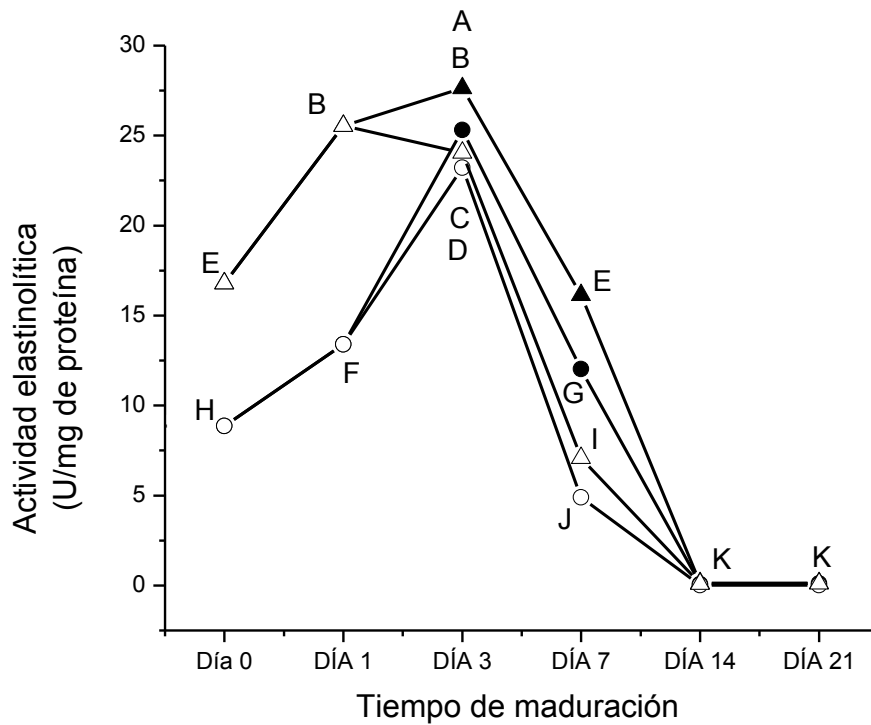


Figura 10. Determinación de la actividad proteolítica sobre elastina. Actividad en carne con suministro de CZ y maduración en seco (—△—); actividad en carne con suministro de CZ y maduración en húmedo (—▲—); actividad en carne sin suministro de CZ y maduración en seco (—○—); actividad en carne sin suministro de CZ y maduración en húmedo (—●—). Letras desiguales indican que hay diferencia significativa.

El análisis estadístico (Figura 11) de la actividad elastinolítica muestra una diferencia significativa entre los tratamientos (húmedo ó seco) y el suministro o no de CZ, lo cual repercutirá en la dureza de la carne, ya que la elastina forma parte del tejido conectivo, el cual forma el endomisio y perimisio.

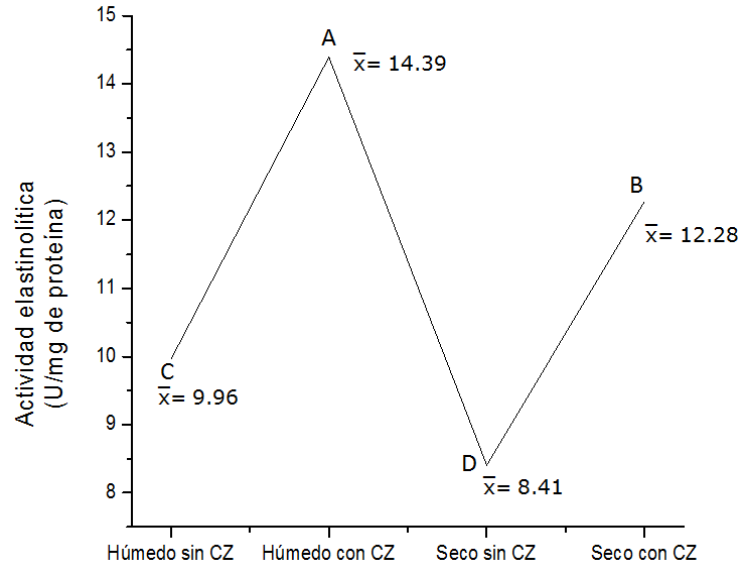


Figura 11. Análisis de la comparación de medias entre los tratamientos en la actividad elastinolítica. Letras desiguales indican que hay diferencia significativa.

Actividad colagenolítica

En la *Figura 12*, se observa un incremento de la actividad colagenolítica en el día 3 para la maduración en húmedo con y sin CZ, mientras que la actividad presenta un descenso en la maduración en seco. En el día 7 se observa una disminución de la actividad, mientras que para los días 14 y 21 se observa una actividad proteolítica mínima y constante, lo cual también se ve representado mediante el análisis estadístico el cual indica que no hay diferencia significativa en la actividad colagenolítica en los días 14 y 21, entre el tratamiento de maduración (húmedo o seco) con suministro o no de CZ, mientras que para los días de maduración 3 y 7 se mostró que hay una diferencia significativa en la actividad colagenolítica entre el tratamiento de maduración (húmedo o seco) con o sin suministro de CZ y el tiempo de maduración.

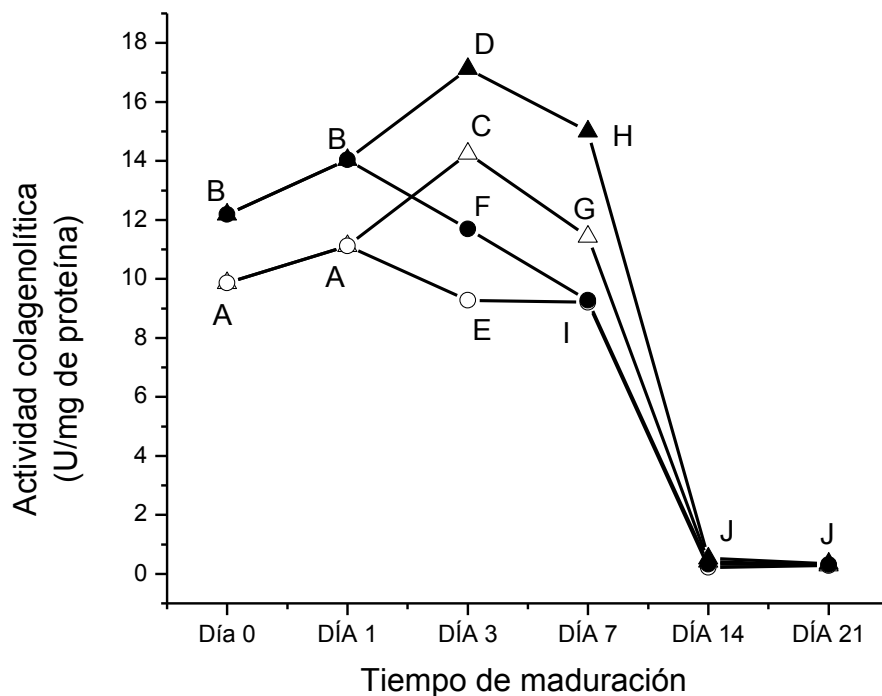


Figura 12. Determinación de actividad proteolítica sobre colágeno. Actividad en carne con suministro de CZ y maduración en seco (—△—); actividad en carne con suministro de CZ y maduración en húmedo (—▲—); actividad en carne sin suministro de CZ y maduración en seco (—○—); actividad en carne sin suministro de CZ y maduración en húmedo (—●—). Letras desiguales indican que hay diferencia significativa.

Comparando la actividad elastinolítica y colagenolítica, la elastina presentó mayor actividad proteolítica en comparación con el colágeno (Figura 10 y Figura 12, respectivamente). En cuanto a la diferencia entre el suministro de CZ, las muestras de carne con el β -AA presentaron una mayor actividad proteolítica con respecto a la carne sin CZ, así como en el tratamiento de maduración en húmedo. El análisis estadístico (Figura 11 y 13), muestra que hay una diferencia significativa en la actividad elastinolítica y colagenolítica y los tratamientos (húmedo ó seco) con suministro o no de CZ, lo cual repercutirá en la dureza de la carne.

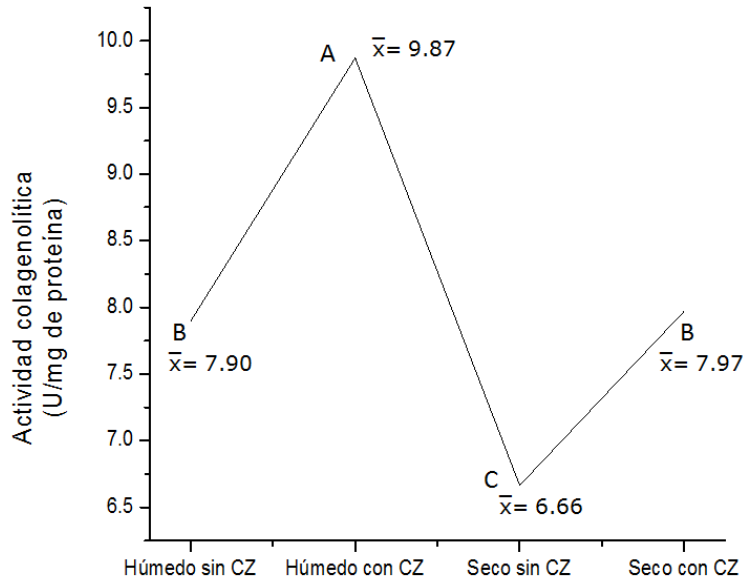


Figura 13. Comparación de medias entre los tratamientos en la actividad colagenolítica. Letras desiguales indican que hay diferencia significativa.

La dureza de la carne se debe en parte al tejido conectivo (colágeno y elastina) que forma el endomisio y perimisio, esta dureza secundaria depende del contenido de colágeno en el músculo, sin embargo, no se tiene certeza del debilitamiento del tejido conectivo durante la maduración. El músculo no contiene colagenasas en cantidades apreciables aunque otras proteasas pueden despolimerizar al colágeno por ruptura en la región del telopéptido. Esta ruptura puede eliminar los entrecruzamientos entre fibras adyacentes de colágeno en forma suficiente para que los monómeros de colágeno desnaturalizado se solubilicen, por lo que esto podría ser un factor para la disminución de la actividad colagenolítica, aunque también existen otras enzimas más importantes en la degradación de colágeno, las cuales son las catepsinas B, L y N, aunque sólo las dos primeras se han identificado en el músculo (Nychas *et al.*, 1988).

Actividad de catepsina

La actividad de catepsina se determinó mediante el sustrato fluorescente N-Succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (Rico *et al.*, 1991). Barret (1980) describe a los

ensayos flouométricos directos basados en el uso de AMC como sensibles, seguros y convenientes para la determinación de la actividad de catepsinas.

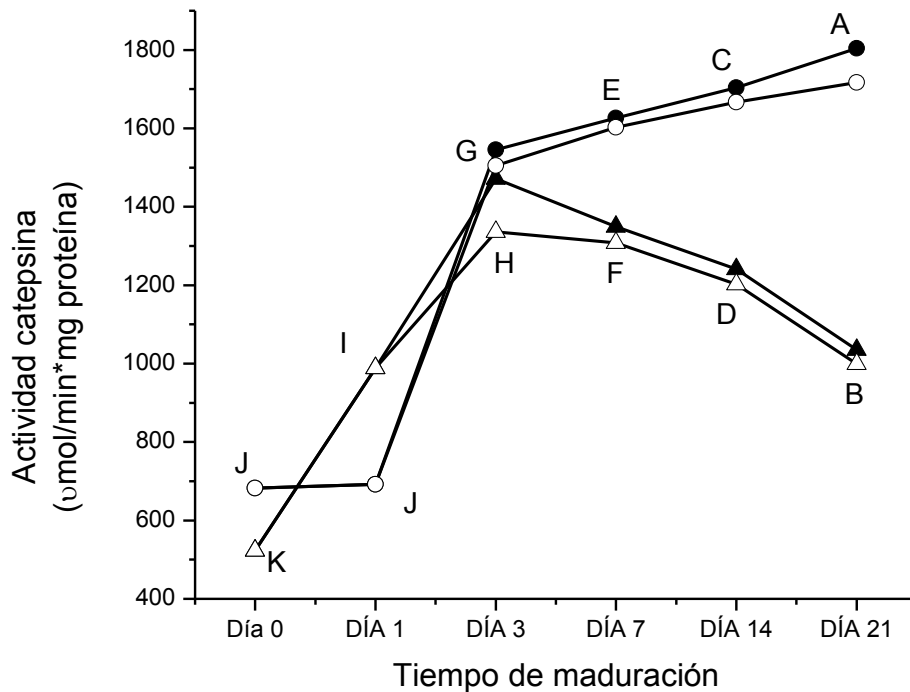


Figura 14. Determinación de la actividad de catepsina. Actividad en carne con suministro de CZ y maduración en seco (—△—); actividad en carne con suministro de CZ y maduración en húmedo (—▲—); actividad en carne sin suministro de CZ y maduración en seco (—○—); actividad en carne sin suministro de CZ y maduración en húmedo (—●—). Letras desiguales indican que hay diferencia significativa.

En la Figura 14, se observa un incremento en la actividad de catepsinas a partir del día 3 de maduración, el cual fue consecuente en los siguientes días de maduración en la carne sin CZ para ambos métodos de maduración, presentando una mayor actividad en la maduración en húmedo. Este incremento de actividad de catepsinas, se debe a la disminución del pH durante la etapa de *post rigor*, produciendo un efecto en las membranas lipoproteícas de los lisosomas, los cuales contienen enzimas con gran

actividad proteolítica (Lawrie, 1985). Si el pH inicial en muestras sin CZ para ambos métodos oscila en valores de 6.8 en los días 0 y 1 de maduración para ambos métodos, este disminuye a partir del día 3, reportando valores de pH 5.4 (Rodríguez, 2015); ocurriendo así una activación de las catepsinas durante la maduración.

El descenso de la actividad de catepsina (Figura 14) en carne con CZ para ambos métodos de maduración se puede deber al efecto del β -adrenérgico suministrado. Kretchmar *et al.*, (1990) determinaron que el uso de β -adrenérgicos reduce la actividad de catepsina. En cuanto al análisis estadístico (Figura 15), este mostró que hay diferencia significativa en la actividad de catepsinas y el tratamiento de maduración (húmedo o seco) con o sin suministro de CZ; también encontrando una diferencia significativa (Figura 14) entre los días de maduración y el tratamiento de maduración (húmedo o seco) con o sin suministro de CZ.

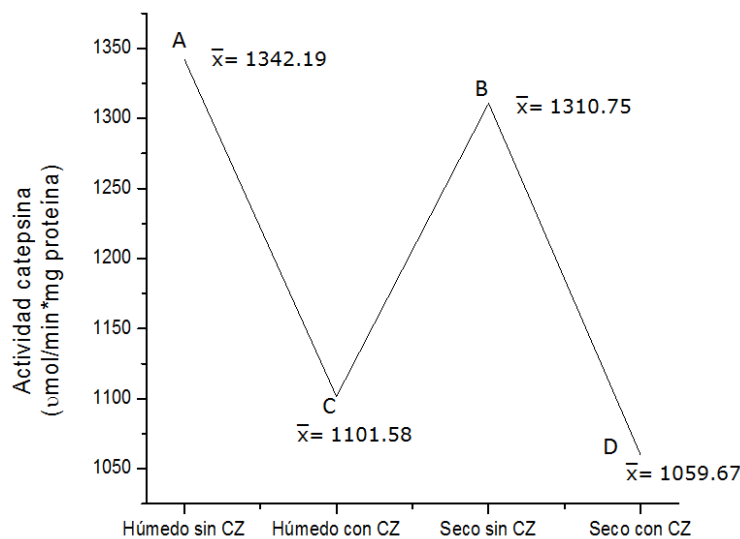


Figura 15. Comparación de medias entre los tratamientos en la actividad de catepsina. Letras desiguales indican que hay diferencia significativa.

La actividad de las catepsinas tiene una influencia predominante en los cambios en blandura durante la maduración *post rigor*, debido a que la catepsina se encuentra asociada con la degradación de colágeno (Mikami *et al.*, 1987; Johnson *et al.*, 1990).

Esto se observa en la *Figura 12*, donde la actividad colagenolítica se ve influenciada por la actividad de catepsina (*Figura 14*). A pesar de la disminución de la actividad colagenolítica tanto en carne con CZ, como en carne sin suministro de CZ con respecto al tiempo de maduración, la carne con CZ presentó una actividad colagenolítica superior (*Figura 12*), esto se debe a la disminución de la actividad de catepsinas en la carne con CZ al incrementarse el tiempo, en ambos procesos de maduración (*Figura 14*), por lo que no hay suficiente degradación de éstas enzimas sobre el colágeno. En cambio, la actividad de catepsina en carne sin CZ se incrementó con respecto al tiempo para ambos procesos de maduración (*Figura 14*), resultando así, una disminución de actividad colagenolítica en carne sin CZ en los dos procesos de maduración (*Figura 12*).

En cuanto a la actividad de elastina (*Figura 10*) se ve influenciada de la igual manera que la actividad de catepsinas, debido a que estas enzimas son parecidas, ambas son proteínas fibrosas del tejido conectivo con una estructura terciaria similar y se componen principalmente de glicina. La elastina y el colágeno son escleroproteínas y de igual manera se ven afectadas por la proteólisis del tejido conectivo durante la maduración debido a la presencia de proteinasas endógenas del músculo (catepsinas) (Bird *et al.*, 1980; Garrido *et al.*, 2006).

Actividad de calpaína

La actividad de calpaína se determinó utilizando el sustrato fluorescente N-Succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin, que al ser hidrolizado por la calpaína, libera AMC (7-Amino-4-methylcoumarin) el cual tiene una longitud de excitación, absorbe energía y emite una luz (Edelstein *et al.*, 1997).

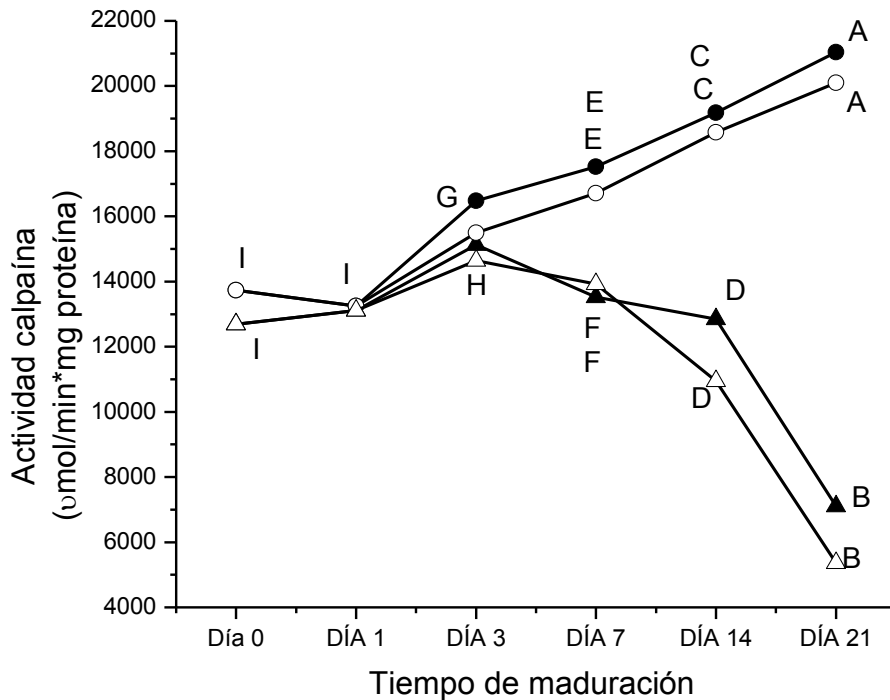


Figura 16. Determinación de la actividad de calpaína. Actividad en carne con suministro de CZ y maduración en seco (—△—); actividad en carne con suministro de CZ y maduración en húmedo (—▲—); actividad en carne sin suministro de CZ y maduración en seco (—○—); actividad en carne sin suministro de CZ y maduración en húmedo (—●—). Letras desiguales indican que hay diferencia significativa.

En la *Figura 16* se observa un incremento de la actividad de calpaína con respecto al tiempo de maduración en la carne sin CZ y un descenso de la actividad en la carne con CZ, para ambos tipos de maduración. En el análisis estadístico se observa que hay una diferencia significativa entre los tratamientos de maduración (húmedo ó seco) y el suministro o no de CZ (*Figura 17*), así como entre los tratamientos y el tiempo de maduración (*Figura 16*) a partir del tercer día, ya que durante las primeras 24 h después de la muerte del animal, se lleva a cabo la conversión de músculo a carne, por lo que no hubo diferencia significativa entre los días 0 y 1 de maduración.

Rodríguez (2015) reportó valores de pH de 5.4 posterior a las 24 h de iniciados ambos tipos de maduración. Kanawa *et al.*, (2002) reportaron que valores de pH 5.89 inactivan a la calpaína II y Alarcón-Rojo (1992) que valores de pH 7-8 activan a la calpaína I. Estos reportes, indican la influencia del pH sobre la actividad de calpaínas, por lo que en este trabajo se debería presentar una inactivación de la actividad de calpaína, debido a los valores de pH anteriormente reportados; sin embargo, Wulf *et al.*, (1996) reportaron que valores de pHs bajos están asociados con baja fuerza del corte y alta terniza, debido a que estas proteasas también pueden degradar a sus sustratos a pHs ácidos.

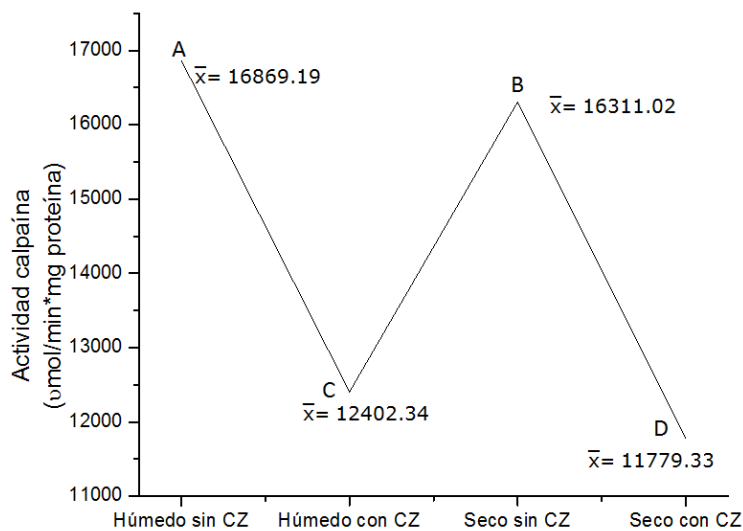


Figura 17. Comparación de medias entre los tratamientos en la actividad de calpaína. Letras desiguales indican que hay diferencia significativa.

También se han reportado conductas análogas entre las actividades de calpaína y catepsina (Hui *et al.*, 2013), lo cual se ve demostrado en el presente trabajo en la Figura 14 y 16, por lo que, el efecto que tienen los β -adrenérgicos sobre la actividad de las catepsinas, también influye en la actividad de las calpaínas.

Porcentaje de inhibición de calpastatina

El porcentaje de inhibición de la calpastatina se determinó mediante una diferencia de actividades, entre la actividad de calpaína y la actividad resultante de la adición de calpastatina sobre la actividad de calpaína.

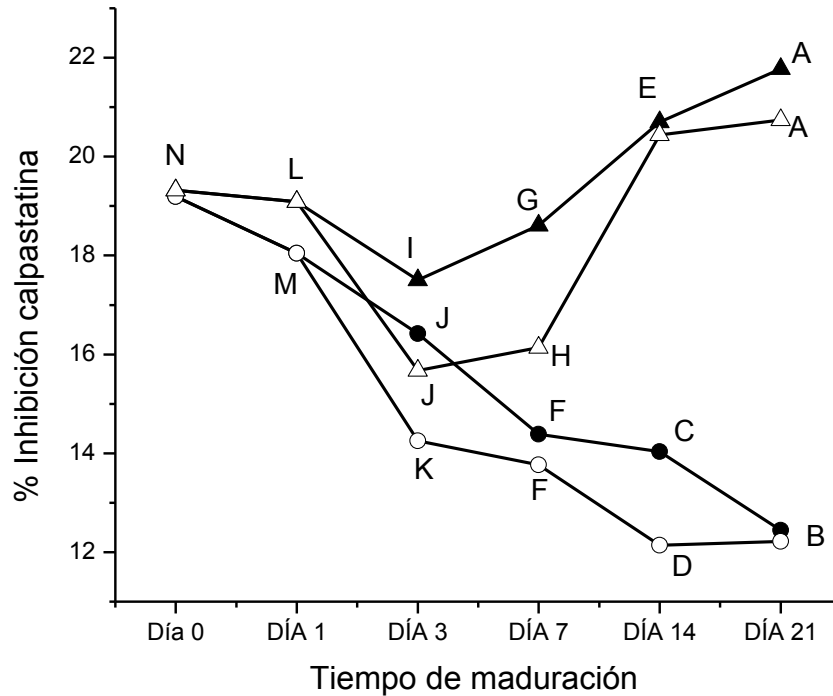


Figura 18. Determinación del porcentaje de inhibición de calpastatina. Actividad en carne con suministro de CZ y maduración en seco (—△—); actividad en carne con suministro de CZ y maduración en húmedo (—▲—); actividad en carne sin suministro de CZ y maduración en seco (—○—); actividad en carne sin suministro de CZ y maduración en húmedo (—●—). Letras desiguales indican que hay diferencia significativa.

Se ha reportado que la administración de β -adrenérgicos aumenta el nivel de calpastatinas en el músculo esquelético (Anderson *et al.*, 2014). Los β -adrenérgicos se unen a receptores de las membranas celulares activando las proteincinasas

dependientes de AMPc, las cuales aumentan el nivel de expresión del gen de la calpastatina por incremento de la transcripción del mismo (Cong *et al.*, 1998).

En la *Figura 18* se observa el incremento del porcentaje de inhibición de la calpastatina en la carne con suministro de CZ, siendo mayor en la maduración en húmedo, mientras que el porcentaje de inhibición de la calpastatina disminuye en la carne sin suministro de CZ, siendo de igual manera, mayor en la maduración en húmedo. Así mismo, el análisis estadístico realizado muestra que hay una diferencia significativa entre los tratamientos de maduración (húmedo y seco) y el suministro o no de CZ (*Figura 19*). También mediante el análisis estadístico entre los tratamientos y el tiempo de maduración (*Figura 18*) muestran que hay diferencia significativa en el porcentaje de inhibición de la calpastatina y el tiempo de maduración (1, 3, 7, 14, y 21) en los tratamientos (maduración, húmedo o seco) con o sin suministro CZ en la carne.

Lo anterior muestra el efecto que tiene el suministro de CZ en la maduración de la carne, repercutiendo en la actividad de calpaína, tal como lo mencionan Goll *et al.*, (2003), quienes observaron la influencia de la actividad proteolítica del inhibidor competitivo, calpastatina, sobre la actividad de las calpaínas. Esto también se puede observar en la *Figura 16* donde la actividad de calpaína en la carne sin CZ incrementa con respecto al tiempo en la maduración en húmedo.

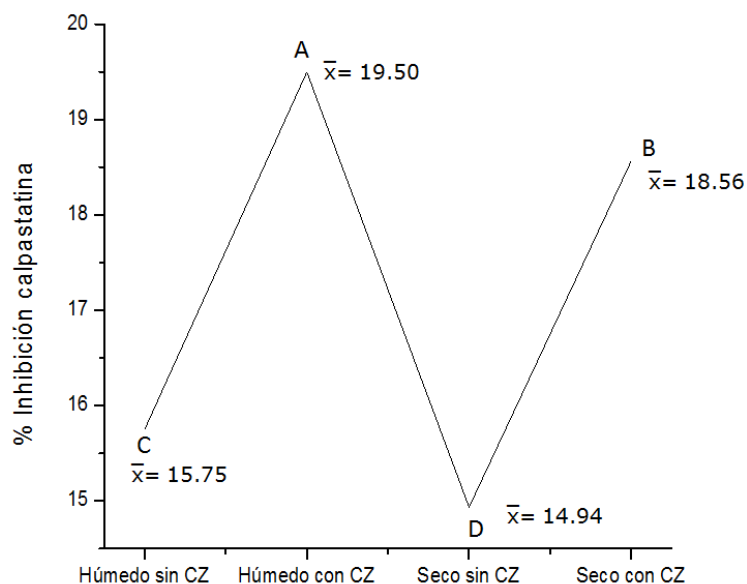


Figura 19. Comparación de medias entre los tratamientos en el porcentaje de inhibición de calpastatina. Letras desiguales indican que hay diferencia significativa.

Determinación del perfil electroforético.

El cambio de la proteína miofibrilar (nebulina) en carne con y sin CZ sometida a dos procesos de maduración del día 0 al día 21, fue seguido a través de electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), comparando las bandas obtenidas con un marcador de alto peso molecular (GE Healthcare).

Determinación del perfil electroforético para nebulina.

La degradación de proteínas miofibrilares tales como la titina, nebulina, desmina y troponina-T durante la maduración de la carne en refrigeración, mostró tener un efecto positivo para la ternura de la carne (Koohmaraie *et al.*, 1991; King *et al.*, 2003), mientras que la miosina, actina, actinina y tropomiosina se mantuvieron estables a lo largo de la maduración de la carne durante 28 días (Ho *et al.*, 1997). La nebulina, otro componente importante de la miofibrilla del músculo esquelético, es una proteína grande e insoluble, que constituye un conjunto de filamentos inextensibles en conjunción con los filamentos delgados de actina. Uno de sus extremos está anclado a

la línea Z y se considera que son importantes contribuyentes a la integridad miofibrilar (Robson, 1995). Es por ello que se determinó la presencia de nebulina durante ambos procesos de maduración, así como en la carne con o sin CZ. En la *Figura 20*, se observa una banda con peso molecular aproximado de 669 kDa durante el día 0 y 1, mientras que para el día 7 de la maduración en seco de carne sin CZ esta banda se desvanece. Al igual que en la figura anterior en la *Figura 21*, se observa una banda a los 669 kDa en el día 0 y 1 de maduración en húmedo sin CZ. El mismo comportamiento se observa en la *Figura 22 y 23*, sin embargo estas se desvanecen mínimamente con respecto al tiempo de maduración en húmedo y en seco en carne con CZ. Estas bandas podrían corresponder a la nebulina, con un reporte de peso molecular que varía de 500 a 900 kDa (Vigoreaux, 1994). Así mismo, en la *Figura 20, 21, 22 y 23*, se observa una banda con un peso molecular por arriba de los 158 kDa, la cual podría corresponder a una de las dos cadenas pesadas de la miosina (HCM) que corresponden a un peso molecular de 220 kDa (Caputo *et al.*, 1996). Descartando la posibilidad de que representen a otro tipo de proteínas miofibrilares, debido a que el peso molecular de estas es de 15 a 22 kDa para las cadenas ligeras de la miosina (LCM), 33 y 32 kDa para las subunidades de β -actinina, 35 kDa para γ -actinina, 53 kDa para desmina, 43 kDa para actina, 33 kDa para tropomiosina, 21 kDa para troponina I, 20 kDa para tropónina C, 39 kDa para troponina T y 3000 kDa para titina (Huff-Lonergan *et al.* 1995; Caputo *et al.*, 1996; Maruyama *et al.*, 1997).

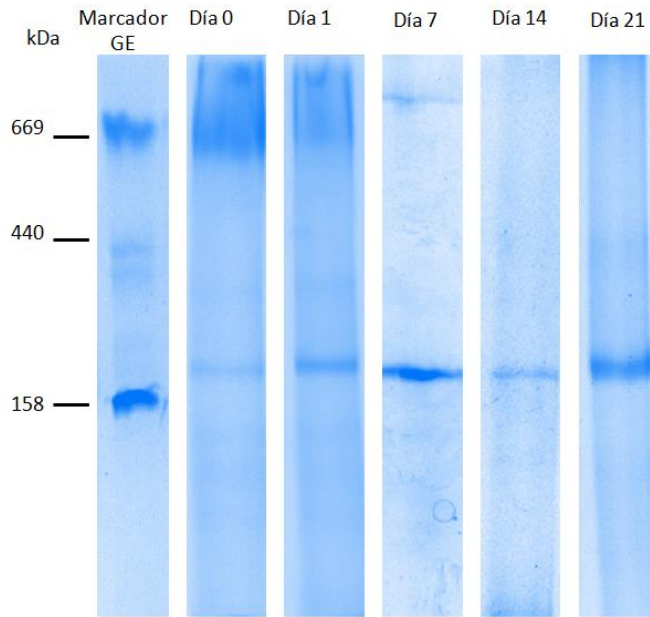


Figura 20. Perfil proteico de nebulina en carne sin CZ, maduración en seco almacenada a 4 °C durante 21 días. SDS-PAGE 5 %.

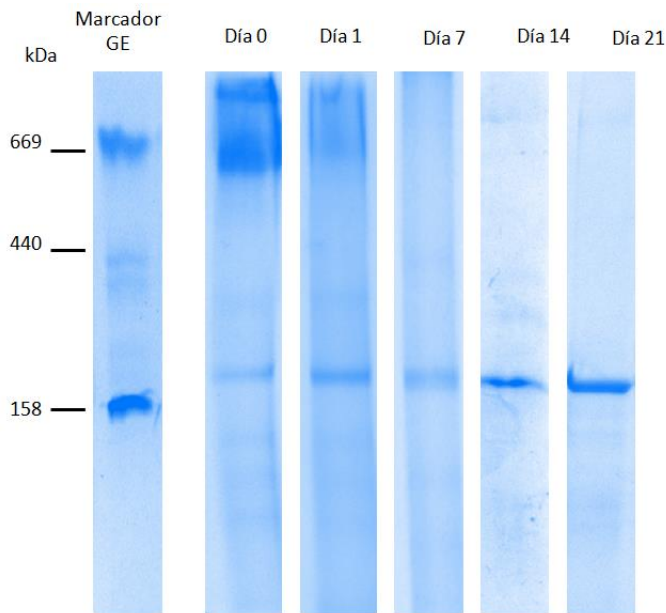


Figura 21. Perfil proteico de nebulina en carne sin CZ, maduración en húmedo almacenada a 4 °C durante 21 días. SDS-PAGE 5 %.

La carne sin CZ presenta un incremento en la actividad de calpaínas (*Figura 16*), debido a que se lleva a cabo la hidrólisis de la proteína miofibrilar (nebulina) (Thompson *et al*, 1993). Huff-Lonergan *et al.* (1995) reportaron la degradación de nebulina durante los primeros 7 días de maduración. Esto último se puede observar en las *Figuras 20 y 21*, donde las bandas de altos pesos moleculares desaparecen conforme transcurre el tiempo en ambos métodos de maduración, siendo notable la desaparición para el día 14.

En las *Figuras 22 y 23*, se observan bandas en pesos moleculares altos, las cuales persisten conforme transcurre el tiempo en ambos métodos de maduración en carne con CZ, por lo que la disminución de actividad de la proteasa, calpaína (*Figura 16*), así como el incremento de la actividad de su inhibidor, la calpastatina, son factores de una proteólisis *post rigor* más lenta en la nebulina.

Para poder confirmar estos resultados, se tendría que identificar la banda de interés por métodos de identificación de huella peptídica y compararlos en la base de datos de proteínas en sitios de internet específicos.

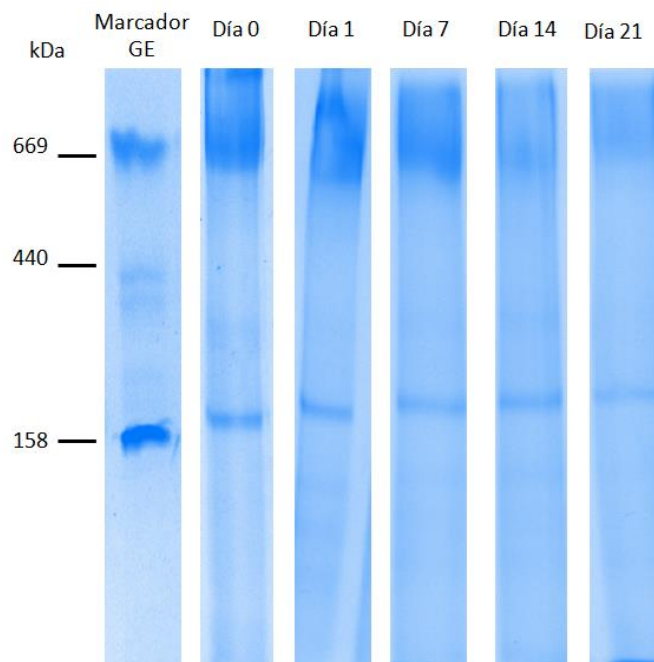


Figura 22. Perfil proteico de nebulina en carne con CZ, maduración en seco almacenada a 4 °C durante 21 días. SDS-PAGE 5 %.

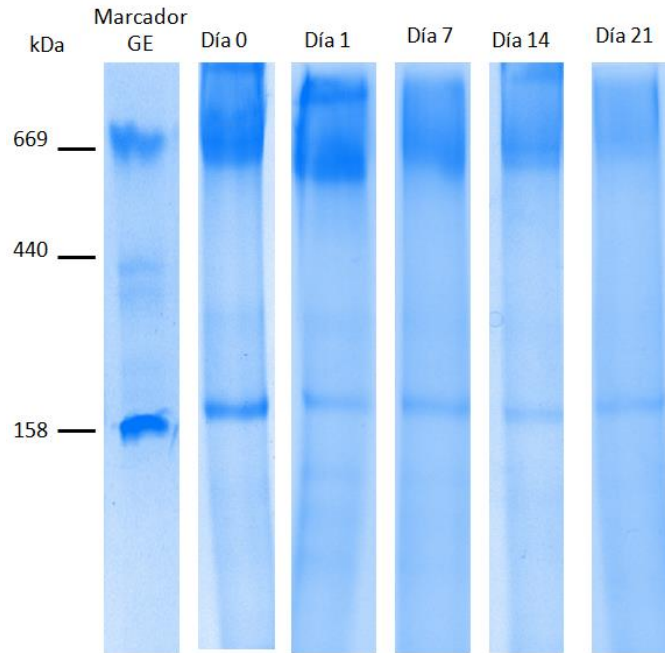


Figura 23. Perfil proteico de nebulina en carne con CZ, maduración en húmedo almacenada a 4 °C durante 21 días. SDS-PAGE 5 %.

Determinación del perfil electroforético de actividad en gel para calpaína y catepsina

Las muestras extraídas con los diferentes amortiguadores para la determinación de actividad de calpaína y catepsina, fueron sometidas a SDS-PAGE. Se utilizó un marcador de alto peso molecular (Molecular High Weight).

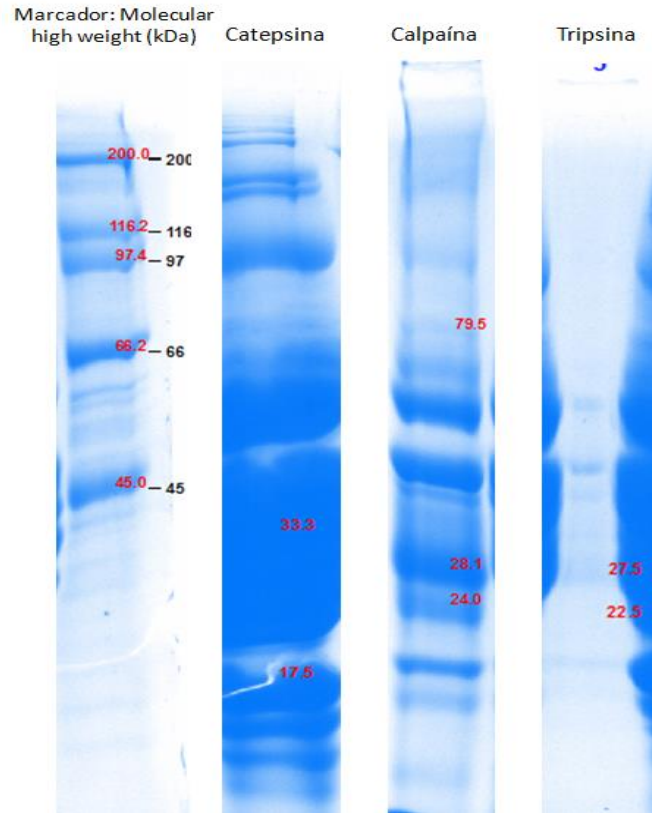


Figura 24. Perfil proteico de catepsina y calpaína en carne sin CZ, maduración en seco almacenada a 4 °C, día 3. SDS-PAGE 12.5 %.

En la *Figura 24*, se observa un par de bandas con pesos moleculares de 79.5 y 28.1 kDa en el carril de la calpaína, mientras que para la catepsina se observan diferentes bandas, donde la banda más acentuada tiene un peso molecular de 33.3 kDa y otra de 17.5 kDa; estas bandas se deben probablemente a la presencia de calpaína y catepsina, debido a que la calpaína cuenta con dos subunidades, una larga de 80 kDa y una corta de 28 kDa (Hui *et al.*, 2013); mientras que el rango de peso molecular para la catepsina es de 20 a 40 kDa (Nollet *et al.*, 2006). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, para corroborar estos resultados es necesario la identificación de proteínas por espectrometría de masas.

El control que se utilizó fue la tripsina, para la cual se observa una banda con peso molecular de 27.5 kDa, siendo su peso molecular de 23.3 kDa (Nollet *et al.*, 2006).

Determinación de la actividad proteolítica por zimograma para calpaína y catepsina.

Los resultados presentados en la *Figura 25* muestran las actividades presentadas para la catepsina y calpaína. En el carril de la calpaína se observa unas bandas con pesos moleculares de 91.5 y 21.6 kDa; lo cual podría ser atribuido a la subunidad corta de la calpaína que es de 21.6 kDa y a la subunidad larga de 80 kDa (Hui *et al.*, 2013).

El segundo carril del gel, se destinó para la actividad de catepsinas, determinando que los pesos moleculares de 46.2 y 18.8 kDa, presentando pesos moleculares similares a los reportados en la literatura, lo cuales son de 20 a 40 kDa (Nollet *et al.*, 2006).

La aparición de bandas biológicamente activas, se lograron observar al usar como sustrato gelatina, detectando de esta forma la activación de la fracción sarcoplásmica.

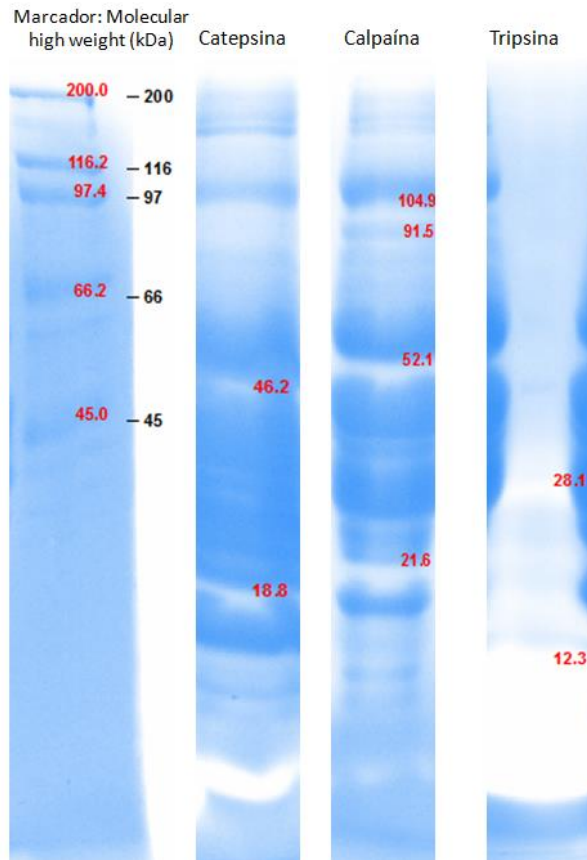


Figura 25. Actividad proteolítica de catepsina y calpaína en carne sin CZ, maduración en seco almacenada a 4 °C, en zimograma de gelatina al 0.1 %.

Determinación de bases nitrogenadas volátiles totales.

El contenido de nitrógeno básico volátil total se utiliza como índice representativo del estado de frescura, ya que aumenta a medida que se produce la alteración en la carne. En el presente trabajo se llevó a cabo la determinación del contenido de nitrógeno básico volátil total. En la *Figura 26* se observa un incremento de la cantidad de nitrógeno básico volátil total conforme pasa el tiempo para ambos procesos de maduración (seco y húmedo), sin importar el suministro o no de CZ. El límite máximo para bases volátiles totales, se sugiere de 30 mg N/100 g (Comité del Codex Alimentarius, NMX-F-362-S-SCF1, 2011) por lo que la carne con CZ y sin CZ madurada durante 21 días no pasa el límite, teniendo así carne que se considera fresca y adecuada para consumo.

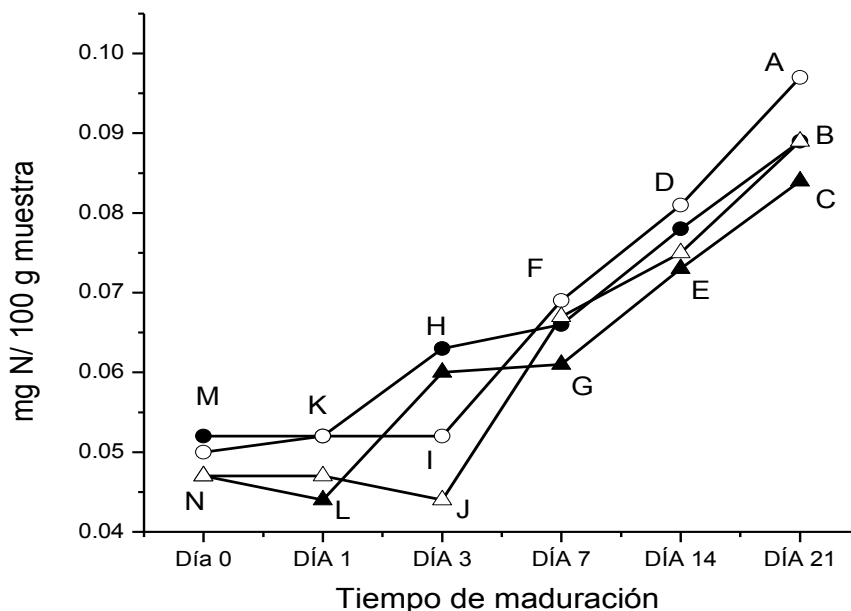


Figura 26. Determinación de bases volátiles totales. Actividad en carne con suministro de CZ y maduración en seco (—△—); actividad en carne con suministro de CZ y maduración en húmedo (—▲—); actividad en carne sin suministro de CZ y maduración en seco (—○—); actividad en carne sin suministro de CZ y maduración en húmedo (—●—). Letras desiguales indican que hay diferencia significativa.

El análisis estadístico (*Figura 26*) mostró que hay diferencias significativas en la cantidad de bases volátiles totales entre los días de maduración con respecto al tratamiento de maduración (húmedo y seco) y suministro o no de CZ, aunque si hay diferencia significativa en la cantidad de bases volátiles totales con respecto al tratamiento de maduración (húmedo y seco) y suministro o no de CZ entre los días 14 y 21 de maduración. Mediante otro análisis estadístico (*Figura 27*), se mostró que no hay diferencia significativa en la cantidad de bases volátiles totales con respecto a los tratamientos de maduración (húmedo o seco), pero si hay una diferencia significativa en la cantidad de bases volátiles totales con respecto al suministro o no de CZ.

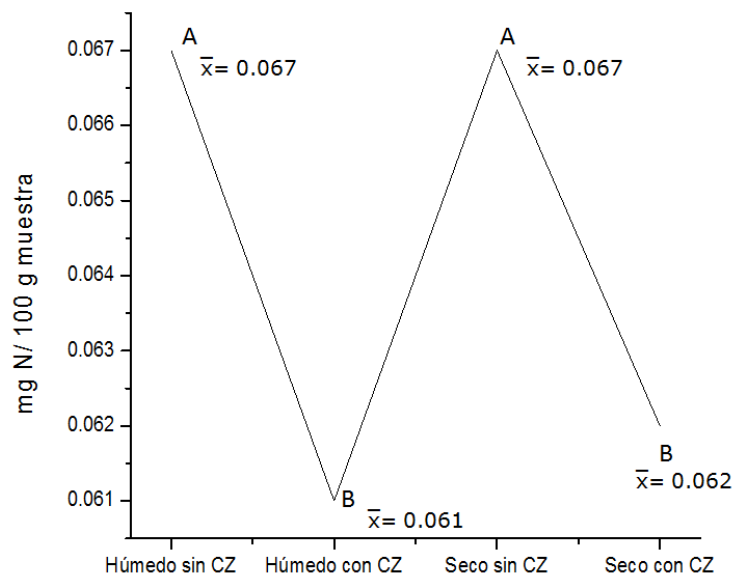


Figura 27. Análisis de las diferencias significativas entre los tratamientos en la determinación del contenido de nitrógeno básico volátil total. Letras desiguales indican que hay diferencia significativa.

Mediante la regresión lineal de los datos experimentales obtenidos de la actividad elastinolítica, colagenolítica, catepsina, calpaína, calpastatina y determinación de nitrógeno básico volátil total, se obtuvieron los valores del coeficiente de regresión (R^2), los cuales fueron de 0.992, 0.982, 1.000, 0.963, 0.966 y 0.936, respectivamente por lo que la regresión lineal se ajusta adecuadamente a los datos experimentales, lo que

significa que hay una correlación entre las actividades proteolíticas y la determinación de nitrógeno básico volátil total con los tratamientos de maduración (húmedo y seco) con o sin suministro de CZ.

El análisis de varianza (ANOVA) mostró que hay diferencia significativa entre los días de estudio en la actividad elastinolítica, colagenolítica, de catepsina, de calpaína, así como en el porcentaje de inhibición de calpastatina y en el contenido de nitrógeno básico volátil total con un valor de $p < 0.0001$ para cada una.

Igualmente, en el Anexo en las Tablas 1,2,3,4,5 y 6 se observa que hay diferencia significativa entre los días de estudio y el tratamiento, el suministro o no de CZ y el tipo de maduración (en húmedo o en seco) en la actividad elastinolítica, actividad colagenolítica, de catepsina, de calpaína, así como en el porcentaje de inhibición de calpastatina y en el contenido de nitrógeno básico volátil total con un valor de $p < 0.0001$ para cada una.

VII. CONCLUSIONES.

La determinación de la actividad proteolítica (elastinolítica, colagenolítica, catepsina, calpaínas y calpastatinas) demuestran que el suministro de clorhidrato de zilpaterol en carne de bovino ejerce un efecto significativo en comparación con la carne sin suministro de clorhidrato de zilpaterol. Así mismo, la carne que contiene clorhidrato de zilpaterol se ve afectada por el tipo de maduración (húmedo y seco), siendo la maduración en húmedo la que ejerce un efecto al incrementar la actividad proteolítica en la carne.

La degradación de nebulina durante la maduración (en húmedo y en seco), se ve afectada por el suministro de clorhidrato de zilpaterol, ya que la actividad de calpaína disminuye y el porcentaje de inhibición de calpastatina aumenta.

La calidad de la carne, determinada por N-BVT, no se ve afectada por el suministro de clorhidrato de zilpaterol durante la maduración en húmedo y en seco.

VIII. REFERENCIAS

Aberle, E, Forrest, J., Gerrad, D. and Mills, E. 2001. **Principles of Meat Science**. 4th edition. Kendall/Hunt Publishing Company. USA.

Ahn, D.H., Shimada, K. and Takahashi, K. 2003. **Relationship between weakening of z-disks and liberation of phospholipids during postmortem aging of pork and beef**. *Journal of Food Science*. 68:94-98.

Alarcón Rojo, A.D. 1992. **Notas de Bioquímica del Músculo**. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua.

Analytical Methods Committee of the Royal Society of Chemistry. 1994. **Official and Standardized Methods of Analysis**. 3rd edition. Royal Society of Chemistry, Cambridge. 332-334.

Anderson, P.T., Johnson, B.J. and Dikeman, M. 2014. **Metabolic Modifiers**. *Encyclopedia of Meat Sciences*. Volume 2. Elsevier Ltd. 2nd edition. 62-69.

Avendaño, R.L., Torres, R.V., Meraz, M.F.J., Pérez, L.C., Figueroa, S.F. and Robison, P.H. 2006. **Effect of two B-adrenergic agonists on finishing performance, carcass characteristics. And meat quality of feed lot steers**. *Journal of Animal Science*. 84:3259-3265.

Bailey, A.J., Light, N.D. 1989. **Connective tissue in meat and meat products**. *Elsevier Applied Science*, London.

Barret, A.J. 1980. **Fluorimetric assay for Cathepsin B and Cathepsin H with methylcoumarylamide substrates**. *Biochemical Journal*. 187:909-912.

Beermann, D.H. 2014. **Beta-Agonists**. *Encyclopedia of meat sciences*. Volume 2. United Kingdom: Academix Press. 2nd edition. 177-180.

Berg, J. M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. 2002. **Biochemistry**. 5th edition. New York: W.H. Freeman.

Bertullo, E. 2001. **Tecnología de los Productos de la Pesca. Guía de Trabajos Prácticos.** Instituto de Investigaciones Pesqueras. Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. Uruguay. Disponible en: www.pes.fvet.edu.uy Fecha de consulta: 16/09/2015.

Bird, J.W.C., Carter, J.H. Triemer, R.E., Brooks, R.M., Spanier, A.M. 1980. **Proteinases in cardiac and skeletal muscle.** *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 39, 20-34.

Bodwell, C.E., and McClain, P.E. 1971. **Chemistry of animal tissues. Proteins.** In: **The Science of Meat and Meat Products.** Price, J.F. and Schweigert. 2nd edition. Freeman, San Francisco. 78.

Bradford, M.M. 1976. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding.** *Analytical Biochemistry.* 72(2):248-254.

Brust-Mascher, I., LaConte, L.E.W., Baker, J.E. and Thomas, D.D. 1999. **Myosin light-change domain rotates upon muscle activation but not ATP hydrolysis.** *Biochemistry.* 38:12607-12613.

Campo, M.M.; Sanudo, C.; Panea, B.; Alberti, P.; Santolaria, P. 1999. **Breed type and ageing time effects on sensory characteristics of beef strip loin steaks.** *Meat Science.* 51 (4): 383-390.

Caputo, C. y Padrón, R. 1996. **Mecanismo de la contracción muscular.** En: Biofísica y Fisiología Celular. Latorre, R., López-Barneo, J., Bezanilla, F. y Llinás, R. Universidad de Sevilla Secretariado de Publicaciones. España. 614

Castellanos, R. A. F.; R. J. G. Rosado; G. L. A. Chel y A. D. A. Betancur. 2006. **Empleo del zilpaterol en novillos con alimentación intensiva en Yucatán, México.** *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal.* Vol. 14, Núm. 2.

Chacón, A. 2004. **La suavidad de la carne: implicaciones físicas y bioquímicas asociadas al manejo y proceso agroindustrial,** *Agron. Mesoamericana.* 15(2):225-243.

CODEX ALIMENTARIUS. 1968.

Cong, M., Thompson, V.F., Goll, D.E. and Antin, P.B. 1998. **The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity.** *Journal of Biological Chemistry.* 273:660-666.

Crawford, C. 1987. **Inhibition of chicken calpain II by proteins of the cystatin superfamily and alpha 2-macroglobulin.** *Biochemistry Journal.* 248(2):589-594.

Crawford, C., Brown, N.R. and Wills, A.C. 1993. **Studies of the active site of m-calpain and the interaction with calpastatin.** *Biochemical Journal.* 296(1):135-142.

Du, M., Zhu, M.J., Means, W.J., Hess, B.W. and Ford, S.P. 2005. **Nutrient restriction differentially modulates the mammalian target of rapamycin signaling and the ubiquitin-proteasome system in skeletal muscle of cows and their fetuses.** *Journal of Animal Science.* 83:117-123.

Edelstein, C.L., Ling, H., Gengaro, P.E., Nemenoff, R.A., Bahr, B.A. and Schrier, R.W. 1997. **Effect of glycine on prelethal and postlethal increases in calpain activity in rat renal proximal tubules.** *Kidney International.* 52:1271-1278.

Ertbjerg, P., Henckel, P., Karlsoon, A., Larsen, L.M., Møller, A.J. 1999. **Combined effect of epinephrine and exercise on calpain/calpastatin and cathepsin b and I activity in porcine longissimus muscle.** *Journal Animal Science.* 77:2428-2436.

Etherington, D.J., Taylor, M.A.J., Wakefield, D.K., Cousins, A. and Dransfield, E. 1990. **Proteinase (cathepsin B, D, L, and calpains) levels and conditioning rates is normal, electrically stimulated and high-ultimate pH chicken muscle.** *Meat Science.* 28:99-109.

Faustman, L.C. 1994. **Postmortem changes in muscle foods.** In: **Muscle foods: Meat, Poultry and Seafood Technology.** D.M. Kinsman, A.W. Kotula and B.C. Breidenstein (Eds). Chapman and Hall, Nueva York.

Fersht, A. 1980. **Estructura y mecanismo de los enzimas.** Editorial Reverté, S.A. España, Barcelona. 160, 161

Forrest, C.J., Aberle E.D., Hedrick, H.B., Judge, M.D. y Merkel, R.A. 1975. **Principles of Meat Science**. W.H. Freeman and Company, San Francisco. 21,26,30-32,36-38; 59-66; 129-131.

Fritz, J.D., Dietrich, L.J. and Greaser, M.L. 1992. **Cooking effects on tintin in fresh and processed beef products**. *Journal of Muscle Food*. 3:133-140.

García, B.R. 2001. **Efecto de las enzimas endógenas sobre las propiedades fisicoquímicas y estructurales de carne de bovino durante la maduración**. Tesis Maestría en Biotecnología. México. D.F. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

García, R., Pérez, I., Guerrero, I. y Ponce, E. 2003. **Maduración de la carne ¿Solución en ganado cebuino?**. *Tecnología de Alimentos*. México. 38(2):18-23.

Garrido P.A., Teijón, J.M., Villaverde, C., Mendoza, C. y Ramírez, J. 2006. **Fundamentos de bioquímica estructural**. Editorial TÉBAR, S.L. España, Madrid.

Garza, F.J.D., Basurto, G.R., Ramírez, M. del C., Montgomery, J.H., Ted, H. y Garza, F.J. 1997. **Respuesta productiva de novillos en finalización alimentados con distintos niveles de Zilpaterol**. (Resumen). En: Memorias del VII Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Especialistas en Nutrición Animal A.C. Puerto Vallarta, México.

Geesink, G., Kuchay, S., Chishti, H. and Koohmaraie, M. 2006. **μ -Calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins**. *Journal of Animal Science*. 84:2834-2840.

Goll, D.E., V.F. Thompson, H.Q. Li, W. Wei, & Cong, J.Y. 2003. **The calpain system**. *Physiological Review*. 83:731801.

Goll, D.E.; Thompson, V.F.; Taylor, R.G.; Zelewska, T. 1992. **Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin?** . *BioEssays*. 14(8): 549-556.

Graser, L.M. and Fritz, D.J. 1995. **Post.Mortem changes un myofibrillar proteins in relation to meat texture.** *Ecceamst.* 293-303.

Hedstrom, L. 2002. **Serine Protease Mechanism and Specificity.** *Chemical Reviews.* 102(12): 4501-4523.

Henning, R.S. and Guy S.S. 1998. **Properties of the caspases.** *Biochimica et Biophysica Acta.* 1387:17-31.

Heusen, C. and Dowdle, E.B. 1980. **Electrophoretic Analysis of Plasminogen Activators in Polyacrylamide Gels Containing Sodium Dodecyl Sulfate and Copolymerized Substrates.** *Analytical biochemistry.* 102:196-202.

Ho, C.Y., Stromer, M.H., and Robson, R.M. 1986. **Effect of electrical stimulation on postmortem titin, nebulin, desmin and troponin-T degradation and ustrastructural changes in bovina *Longissimus* muscle.** *Journal Animal Science.* 74:1563-1575.

Ho, C.Y., Stromer, M.H., Rouse, G., and Robson, R.M. 1997. **Effects of electrical stimulation and postmortem storage on changes in titin, nebulin, desmin, troponin-T, and muscle ultrastructure in *Bos indicus* crossbred cattle.** *Journal of Animal Science.* 75:366-367.

Hori, S., Yamada, M., Ohtani, S., Hori, C., Yokomizo, T., Webb, T. and Shimokawa, T. 2002. **Myonase is localized in skeletal muscle myofibris.** *Journal of Biochemistry.* 132:417-425.

Huff-Lonergan, E., Parrish, F.C. and Robson, R.M. 1995. **Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of nebulin in bovine longissimus muscle.** *Journal of Animal Sicence.* 73:1064-1073.

Huff-Lonergan, E., Parrish, F.C. and Roson, R. 1995. **Effects of Post Morten Aging Time, Animal Age, and Sex on Degradation of Titin and Nebulin in Bovine *Longissimus* Muscle.** *Journal of Animal Science.* 73:1064-1073.

Hui, Y. H., Guerrero, I. y Rosmini, M. 2013. **Ciencia y Tecnologia de Carnes.** Editorial Limusa, S.A. de C.V.Grupo Noriega Editores. Balderas 95, Mexico, D.F.

Huss, H.H. 1998. **El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad.** Documento Técnico de Pesca. No. 348. Roma, FAO. 202

Jaarsveld, F.P., Naudé, R. J. y Oelofsen, W. 1997. **The effects of Ca Ions, EGTA and Storage Time on Myofibrillar Protein Degradation, Levels of Ca²⁺ dependent Proteases and Cathepsins B, H, L, y D of Ostrich Skeletal Muscle.** *Meat Science*. 45:517-529.

Johnson, H.M., Calkins, C.R., Huffman, R.D., Johnson, D.D. and Hargrove, D.D. 1990. **Differences in cathepsin B + L and calcium-dependant protease activities among breed type and their relationship to beef tenderness.** *Journal of Animal Science*. 68:2371-2376.

Kanawa, J.R., J, R. y Takahashi, K. 2002. **Inactivity of m-calpain throughout postmortem aging of meat.** *Journal of Food Science* 67(2):635-638.

Kanner, J. 1994. **Oxidative processes in meat and meat products: Quality implications.** *Meat Science*. 36:169-189.

Kawamura, Y., Kume, H., Itoh, Y., Ohtsuka, S., Kimura, S. and Murayama, K. 1995. **Localization of three fragments of connection in chicken breasts muscle sarcomeres.** *Journal Biochemical*. 117: 201-207.

Kessler, E., Safrin, M., Abrams, W. R., Rosenbloom, J. y Ohman, D.E. 1997. **Inhibitors and Specificity of Pseudomonas aeruginosa Lasa.** *Journal of Biological Chemistry*. 272(15):9884-9889.

King, D.A., Dikeman, M.E., Wheeler, T.L., Kastner, C.L. and Koohmaraie, M. 2003. **Chilling and cooking rate effects on some myofibrillar determinant of tenderness of beef.** *Journal of Animal Science*. 81:1473- 1481.

Kirk, R.S., Sawyer, S.R. and Egan, H. 1996. **Composición y Análisis de Alimentos de Pearson.** Segunda edición. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. México.

Koohmaraie, M. 1990. **Quantification of Ca²⁺ dependent protease activities by hydrophobic and ion exchange chromatography.** *Journal of Animal Science.* 68:659-665.

Koohmaraie, M. 1992. **Ovine skeletal muscle multicatalytic proteinase complex (proteasome): purification, characterization and comparison of its effects of myofibrils with m-calpains.** *Journal of Animal Science.* 70:3697-3708.

Koohmarie, M and Shackelford, S.D. 1991. **Effect of calcium chloride infusion on the tenderness of lambs fed a beta-adrenergic agonist.** *Journal of Animal Science.* 69:2463-2471.

Kretchmar, D.H., Hathaway, M. R., Epley, R.J. and Dayton, W.R. 1990. **Alterations in postmortem degradation of myofibrillar proteins in muscle of lambs fed a β -adrenergic agonist.** *Journal Animal Science.* 68:1760-772.

Kuber, P.S., Busboom, J.R., Huff-Lonergan, E., Duckett, S.K., Mir, P.S., Mir, Z., McCormick, R.J., Dodson, M.V., Gaskins, C.T., Cronrath, J.D., Marks, D.J. and Reeves, J.J. 2004. **Effects of Biological Type and Dietary Fat Treatment on Factors Associated with Tenderness: I. Measurements on Beef Longissimus Muscle.** *Journal of Animal Science.* 82:770-778.

Kuiper, H.A., Noordam, M.Y., Dooren.Flipsen, M.M.H., Van Schilt, R. and Roos, A.H. 1998. **Illegal use Beta-adrenergic agonist.** *Journal of Animal Science.* 76:195-207.

Laemmli, U.K. 1970. **Cleavage of structural porteins during the assembly of the head of basteriophage T4.** *Nature.* 227:680-685.

Lawrie, R. A. 1985. **Meat Science.** *Pergamon Press Ltd.* Headington Hill Hall, London, pp. 91-158.

López de la Torre, G. y Carballo García, B.M. 1991. **Manual de Bioquímica y Tecnología de la carne.** Ediciones A. Madrid Vicente. Madrid, España. 21-31.

Lundesjö, M., Seyfert, M., Hunt, M. and Jonhson, D. 2006. **Dry aging of beef in a bag highly permeable to water and vapour.** *Meat Science.* 73:674-679.

Maltin, C., Balcerzak, D., Tilley, R., Delday, M. 2003. **Determinants of meat quality: Tenderness.** *Proceedings of the Nutrition Society.* 62:337-347.

Marayuma, K., Murakami, F. and Ohashi, K. 1977. **Connectin, an elastic protein of muscle. Characterization and function.** *Journal Biochemical.* 82:317-337.

Mc Gregor, A., Blanchard, A.D., Rowe, A.J. and Critchley, D.R. 1994. **Identification of the vinculin-binding site in the cytoskeletal protein α -actinin.** *Biochemical Journal.* 301:225-233.

McCormick, R.J. 1994. **Structure and properties of tissues.** En: *Muscle Foods: Meat, Poultry and Seafood Technology.* Kinsman, D.M., Kotula, A.W. and Breidenstein, B.C. Chapman and Hall, New York.

Mersmann, H. J. 1998. **Beta-Adrenergic Receptor Modulation of Adipocyte Metabolism and Growth.** *Journal Animal Science.* 80(1):E24-E29.

Mersmann, H. J. 2002. **Overview of the Effects of β -Adrenergic Receptor Agonists on Animal Growth Including Mechanisms of Action.** *Journal Animal Science.* 76(1):160-172.

Mikami, M., Whiting, A.H., Taylor, M.A.J., Maciewicz, R.A., Etherington, D.J. 1987. **Degradation of myofibrils from rabbit, chicken and beef by cathepsin 1 and lysosomal lysates.** *Meat Science.* 21:81-87.

Murai, S., Arata, T. e Inoue, A. 1995. **Binding of myosin and its subfragment-1 with antibodies specific to the two heads of the myosin molecule.** *Journal Biochemical.* 117: 974-979.

Nollet, L.M.L. and Toldrá, F. 2006. **Advanced technologies for meat processing.** Editorial Taylor & Francis Group. U.S.A, Florida.

Norma Oficial Mexicana **NOM-061-ZOO-1999.** Especificaciones zoosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal. Diario Oficial de la Federación. 11 de octubre de 2000.

NORMAS MEXICANAS **NMX-F-362-S-SCFI-2011**. Productos de la pesca-
Determinación de bases colátiles totales método de prueba.

Nychas, G.J., Dillon V.M. y Board R.G. 1988. **Glucose, the key substrate in the microbiological changes occurring in meat and certain meat products**. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 10:230.

Olson, D. G. and Parrish, F.C. 1977. **Relationship of myofibril fragmentation index to measures of beefsteak tenderness**. *Journal of Food Science.* 42(2):506, 508-509.

Olson, D.G., Parrish Jr., F.C., Stromer, M.H. 1976. **Myofibril fragmentation and shear resistance of three bovine muscles during postmortem storage**. *Journal of Food Science.* 41:1036-1041.

Olviera, Carlos. 2006. **Guí Didáctica del Deterioro del Pescado**. Facultad de Veterinaria-UDELAR. Montevideo. Disponible en: <http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/file.php/424/Peces.pdf> Fecha de consulta: 16/09/2015.

Pérez, L., Guerrero, I. y Ponce, E. 2000. **Estructura del músculo y conversión en carne**. En: Nuevas Tendencias en la Tecnología e Higiene de la Industria Cárnica. Rosmini, M., Pérez, J.A. y Fernández (Eds.). Universidad Miguel Hernández, Orihuela, España.

Ponce A.E. 2013. **Cambios bioquímicos pre y postmortem**. En: Ciencia y Tecnología de Carnes. Hui, Y. H., Guerrero, I. y Rosmini, M. Editorial Limusa, S.A. de C.V. Grupo Noriega Editores. Balderas 95, Mexico, D.F.

Price, J.F. y Schweigert B.S. 1981. **The science of meat and meat products**. W.H. Freeman and Company. San Francisco, E.U. 11-77.

Quinn, M.J., Reinhardt, C.D., Loe, E.R., Depenbusch, B.E., Corrigan, M.E., May, M.L. and Drouillard, J.S. 2008. **The effects of ractopamine-hydrogen chloride (Optaflexx) on performance, carcass characteristics, and meat quality of finishing feedlot heifers**. *Journal of Animal Science.* 86:902-908.

Ricks, C. A., Baker P. K., y Dalrymple, R.H. 1984. **Use of Repartitioning Agents to Improve Performance and Body Composition of Meat Animals.** *Proceedings Annual Reciprocal Meat Conference.* 37.

Rico, E., Toldrá, F. and Flores, J. 1991. **Effect od dry-curing process parameters on pork muscle cathepsin B, H and L activity.** *European Food Research & Technology.* 193:541-544.

Rincón, F.G.R., Barreras, S.A., Estrada, A.J.F., Obregón, J.F., Plascencia, J.A., Portillo, L.J. y Zinn, R.A. 2010. **Effects of level of dietary zilpaterol hydrochloride (B-agonist) on performance, carcass characteristics and visceral organ mass in hairy lambs fed all-concentrate diets.** *Journal of Applied Animal Research.* 38(1):33.38.

Rinderknecht, H., Geokas, M. C., Silverman, P., y Haverback, B.J. 1968. **A New Ultrasensitive Method for the Determination of Proteolytic Activity.** *Clinica Chimica Acta.* 21(2):197-203.

Robson, R. M. 1995. **Myofibrillar and cytoskeletal structures and proteins in mature skeletal muscle cells.** In: A. Ouali, F. Smulders, and D. Demeyer (Ed.) Proc. Workshop on Expression, Regulation and Role of Proteinases in Muscle Development and Meat Quality (In press). Audet Tejschriften bv, Nijmegen, The Netherlands.

Rodríguez, G.O. 2015. **Efecto de la ingesta del zilpaterol sobre la maduración y la actividad proteolítica en carne de bovino.** Tesis Licenciatura en Química de Alimentos. En revisión. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.

Rodríguez, R. E. R. 2012. **Cambios en la solubilidad y actividad proteolítica de la fracción miofibrilar y sarcoplásmica en la carne de ovino.** Tesis Licenciatura en Química de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.

Rodríguez, T. 1986. **Efecto de la estimulación eléctrica en la suavidad de la carne bovina.** Tesis Licenciatura en Tecnología de Alimentos. *Universidad de Costa Rica*, Carrera Interdisciplinaria en Tecnología de Alimentos. San José.

Romero, M.M., Pinos, J.M.R., Herrera, J.G.H., García, J.C.L., Salem, A.Z.M., Barcena, R. and Alvarez, G. 2009. **Influence of zilpaterol and mineral-yeast mixture on ruminal fermentation and growth performance in finishing steers.** *Journal of Applied Animal Research*. 35:77-81.

Rubio, M. 1996. **Efecto de los promotores del crecimiento en el ganado y en la carne.** *Ganadero* Vol. XXI, No.5, Sep-Oct.

SAGARPA. 2011. Disponible en: http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/estudios_economicos/escenariobase/perspectivalp_11-20.pdf Fecha de consulta: 06/10/2015.

SAGARPA. 2014. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/resumen-nacional-pecuario/> Fecha de consulta: 06/10/2015.

Sárraga, C., Gil, M. and García-Regueiro, J.A. 1993. **Comparison of Calpain and Cathepsin (B, L and D) Activities during Dry-Cured Ham Processing from Heavy and Light Large White Pigs.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 62:71-75.

Sillence, M.N., Hunter, G.G., Pegg, L., Brown, M.L., Matthews, T., Magner, M., Sleeman, M. and Lindsay, D.B. 1993. **Growth, nitrogen metabolism and cardiac responses to Clembuterol and Ketoclembuterol in rats and underfed cattle.** *Journal of Animal Science*. 71:2942-2951.

Soria, L.A., P. M. Corva. 2004. **Factores genéticos y ambientales que determinan la ternura de la carne bovina.** *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 12(2): 73-88.

Sumano, L. H.; C. L. Ocampo y O. L. Gutiérrez. 2002. **Clembuterol y otros β -agonistas, ¿Una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública?.** *Veterinaria México*. 33(2).

Swatland, H.J. 1996. **Connective tissue distribution patterns in beef detected by ultraviolet fibre optics.** *Food Science and Technology.-Leb.* 29:272-277.

Tatsumi, A. and Takahashi, K. 2003. **Structural changes in titin and nebulin filaments specific to calcium ions at 0.1 mM: Factors of meat tenderization during postmortem aging.** *Journal of Food Science.* 68(3):756-760.

Thompson, V. F., R. G. Taylor, D. E. Goll, E. J. Huff, and R. M. Robson. 1993. **Effect of p- and m-calpain on bovine skeletal muscle myofibrils and IZI brushes.** *Mol. Biol. Cell.* 4:386

Torry Research Station. 1989. **Non-Sensory Assessment of Fish Quality;** Torry Advisory Note No.91; Torry Research Station, MAFF. Aberdeen, Scotland. 1-6.

Valin, C. 1995. **Animal and muscle variability in tenderisation: Possible causes.** *Ecceamst.* 435-442.

Vigoreaux, J.O. 1994. **Alterations in flightin phosphorylation in Drosophila flight muscles are associated with myofibrillar defects engendered by actin and myosin heavy-chain mutant alleles.** *Biochemical Genetics.* 32(7):301-314.

Vigoreaux, J.O. 1994. **The muscle Z band; lessons on stress management.** *Journal of Muscle Research and Cell Motility.* 15: 237-255.

Wheeler, T.L. and Koohmaraie, M. 1994. **Pre rigor and post rigor changes in tenderness of ovine longissimus muscle.** *Journal of Animal Science.* 72:1232-1238.

Wulf, D.M., Emmett, R.S., Leheska, J.M. and Moeller, S.J.. 2002. **Relationships among glycolytic potential, dark cutting (Dark, Firm, and Dry) Beef, and Cooked Beef Palatability.** *Journal of Animal Science.* 80: 1895-1903.

Wulf, D.M., J.D., Tatum, R.D. Green, J.B., Morgan; B.L. Golden and G.C. Smith. 1996. **Genetic influences on beef longissimus palatability in Charolais and Limousin-Sired steers and heifers.** *Journal of Animal Science.* 74:2394-2405.

Zeece, M.G., Woods, T.L., Kee, M.A. and Reville, W.J. 1992. **Role of proteinases and inhibitors in postmortem muscle protein degradation.** *Reciprocal Meat Conference proceedings.* 45:51-61.

Zhao, X., Kobayashi, T., Malak, H., Gryczynki, I., Lakowicz, J., Wade, R. and Collins, J.H. 1995. **Calcium-induced troponin flexibility revealed by distance distribution measurement between engineered sites.** *Journal Biological Chemical.* 207: 15507-15514.

ANEXO

Análisis Estadístico

Análisis de Varianza ANOVA

- Variable dependiente: actividad elastinolítica.

Tabla 1. Análisis de varianza para la actividad elastinolítica.

Variable de respuesta	Fuente de variación	R ²	GL	Suma de Cuadrados	F-valor	Pr>F
Actividad elastinolítica	Modelo	0.992	23	28122.16	1467.395	<0.0001
	Tratamiento		3	1489.68	595.935	<0.0001
	Tiempo		5	24550.35	5892.695	<0.0001
	Tiempo*tratamiento		15	2082.13	166.588	<0.0001
	Error		262	219.98		
	Total		287	28342.14		

Significancia $\alpha=0.05$

- Variable dependiente: actividad colagenolítica.

Tabla 2. Análisis de varianza para la actividad colagenolítica.

Variable de respuesta	Fuente de variación	R ²	GL	Suma de Cuadrados	F-valor	Pr>F
Actividad colagenolítica	Modelo	0.982	23	9662.06	629.311	<0.0001
	Tratamiento		3	379.15	189.327	<0.0001
	Tiempo		5	8818.37	2642.056	<0.0001
	Tiempo*tratamiento		15	464.54	46.393	<0.0001
	Error		264	176.23		
	Total		287	9838.29		

Significancia $\alpha=0.05$

- Variable dependiente: actividad de catepsina.

Tabla 3. Análisis de varianza para la actividad de catepsina.

Variable de respuesta	Fuente de variación	R ²	GL	Suma de Cuadrados	F-valor	Pr>F
Actividad de catepsina	Modelo	1.000	23	42327940.33	40584.57	<0.0001
	Tratamiento		3	4755790.32	29842.57	<0.0001
	Tiempo		5	30489604.73	129812.13	<0.0001
	Tiempo*tratamiento		15	7082545.28	10412.61	<0.0001
	Error		244	11064.41		
	Total		267	42339004.74		

Significancia $\alpha=0.05$

- Variable dependiente: actividad de calpaína.

Tabla 4. Análisis de varianza para la actividad de calpaína.

Variable de respuesta	Fuente de variación	R ²	GL	Suma de Cuadrados	F-valor	Pr>F
Actividad de calpaína	Modelo	0.963	23	3612220694.53	300.05	<0.0001
	Tratamiento		3	1482716111.87	944.26	<0.0001
	Tiempo		5	334212138.92	127.70	<0.0001
	Tiempo*tratamiento		15	1795292443.75	228.66	<0.0001
	Error		262	138181683.59		
	Total		287	3750402378.117		

Significancia $\alpha=0.05$

- Variable dependiente: actividad de calpastatina.

Tabla 5. Análisis de varianza para la actividad de calpastatina.

Variable de respuesta	Fuente de variación	R ²	GL	Suma de Cuadrados	F-valor	Pr>F
Actividad de calpastatina	Modelo	0.966	23	2391.07	322.68	<0.0001
	Tratamiento		3	1034.75	1070.57	<0.0001
	Tiempo		5	485.05	301.11	<0.0001
	Tiempo*tratamiento		15	871.27	180.29	<0.0001
	Error		264	85.06		
	Total		287	2476.13		

Significancia $\alpha=0.05$

- Variable dependiente: determinación de bases nitrogenadas volátiles totales.

Tabla 6. Análisis de varianza para la actividad de bases nitrogenadas volátiles totales.

Variable de respuesta	Fuente de variación	R ²	GL	Suma de Cuadrados	F-valor	Pr>F
Actividad de bases nitrogenadas volátiles totales	Modelo	0.936	23	0.072	169.10	<0.0001
	Tratamiento		3	0.002	34.68	<0.0001
	Tiempo		5	0.067	722.11	<0.0001
	Tiempo*tratamiento		15	0.003	11.65	<0.0001
	Error		264	0.005		
	Total		287	0.007		

Significancia $\alpha=0.05$