



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

---

---

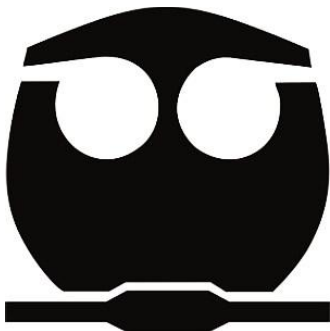
**“EFECTO DE LA INGESTA DEL ZILPATEROL SOBRE LA  
MADURACIÓN Y LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN CARNE DE  
BOVINO”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:  
OSCAR RODRÍGUEZ GARCÍA**

**MEXICO, D.F.**

**2016**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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:** EDUARDO MENDOZA MARTINEZ

**VOCAL:** CAROLINA PEÑA MONTES

**SECRETARIO:** ISRAEL GARCÍA CANO

**1ER. SUPLENTE:** JUAN CARLOS RAMIREZ OREJEL

**2NDO. SUPLENTE:** HIRAM FERNANDO RAMIREZ CAHERO

### **SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

Laboratorio S-132. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa.

### **ASESOR DEL TEMA:**

---

Dr. Israel García Cano

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

Dra. Edith Ponce Alquicira

### **SUSTANTE:**

---

Oscar Rodríguez García

# Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, que me formó desde el bachillerato y que será por siempre mi fuente del saber, mi casa donde se forjó mi profesión como científico, de nutrir día con día cada aspecto de mi vida siendo una mejor persona y ver de manera diferente la vida tanto espiritual como humanamente.

A la **Universidad Autónoma Metropolitana (Unidad Iztapalapa)** por ser el lugar que me permitió realizar de principio a fin el presente trabajo de investigación.

Al **Dr. Israel García Cano**, primero que nada por la confianza que me brindó al ofrecerme todo este trabajo experimental, también por cada una de las enseñanzas, asesorías, consejos y comentarios no solamente en el ámbito científico, sino también como parte de mi formación de vida y sinceramente como un amigo. Por ser esa persona tan admirable, llena de muchos conocimientos, apasionado con la ciencia y su trabajo que realiza día con día.

A la **Dra. Edith Ponce Alquicira** que se merece todo mi respeto, admiración, agradecimiento y reconocimiento por ser una persona dedicada, apasionada por su trabajo y transmitir esa calidez y tranquilidad a la hora de trabajar. Por brindarme el apoyo para poder realizar el presente trabajo, por integrarme a su equipo de trabajo, por sus comentarios, paciencia y dedicación.

Al **MVZ Francisco Ruiz** quien con su apoyo colaboro con el traslado de las muestras al laboratorio S-132 de la UAM-I, por su colaboración en la primera etapa del presente trabajo y de manera muy personal, por sus comentarios y sugerencias. A la **Dra. María Salud Rubio Lozano** por sus observaciones y comentarios para mejorar el presente trabajo.

Al **H. Jurado** por su tiempo, consejos y aportaciones al presente.

A mi hermana **Nancy Irene Rodríguez García** quien siempre ha sido mi compañía, que me ha brindado momentos de felicidad y apoyo incondicional.

Y mis más profundos y sinceros agradecimientos a **mis padres**, quienes sin ellos yo no podría ser lo que soy actualmente. De manera puntual a mi madre **Claudia García Pérez**, quien de ella aprendí que se debe ser constante, responsable y puntual para poder tener éxito.

A mi padre **José Luis Rodríguez López** quien de él aprendí a que nunca hay que limitarse frente a cualquier circunstancia, de que cada día es un motivo para hacer las cosas mejor y siempre donde tenga que ir se debe imponer mi carácter y no confundir con terquedad.

**Gracias a los dos** por apoyarme día con día en los días bueno, días malos, en los triunfos, en las derrotas y sobre todo por levantarme en los momentos más difíciles que atravesé como estudiantes y por brindarme esa cuna de amor que hace que cada día los valore más y más.

# Dedicatorias

Primero que nada, quiero dedicar este trabajo a 3 personas que fueron y serán muy especiales en mi vida y que ahora están en un mejor lugar:

A mi abuelito paterno **José Pablo Rodríguez Sandoval**, por ser una persona que me apoyo desde que inicie mi carrera y siempre que llegaba de la universidad me daba motivos y aliento para no dejarme caer ante los obstáculos y siempre seguir adelante.

A mi abuelita **Irene Calvillo Juárez**, que desde que tengo uso de razón fue la persona que siempre me enseñó que la base del éxito y de la felicidad se concentra en la familia.

Y a mi tío **Martín Pascual Báez Mercado**, quien siempre apoyo a todos sus sobrinos y como enseñanzas nos dejó que el dinero y el poder no tienen por qué cambiar a una persona y sobre todo tener disciplina y constancia en todo lo que nosotros quisiéramos hacer.

A toda la familia **Rodríguez-García**, que siempre han sido una motivación muy importante para poder alcanzar mis sueños y ser un apoyo muy grande para mí.

A mis amigos de la carrera por ser parte de mi vida y ser como unos hermanos y por estar en la buenas, en las malas, por brindarme sus consejos, por su ayuda y su apoyo en todo momento: **Abraham (Tachy-Chino) Rodríguez J., David (61) Rodríguez G., Enrique Olguín M., Felipe de Jesús (Pelipe) Morón V., Giovanni (Gio-Oso) Aldana G., Isaías (Yisus) López Alcaraz, Juan Pablo (El Man) Barbosa, Marcel (Chaparro) Bautista D., María de Lourdes (Lou) Piña A., Neftalí (Nefta-Nepalí) Vargas Mandujano, Néstor (Tribi) Rubén Serrano y Luis Guillermo (Topo) Delgadillo Zempoalteca.**

Por último, quiero hacer una dedicatoria a todas las personas que estuvieron en esta etapa de mi vida (Enero – Agosto 2015) en el cual permanecí enfermo de un tumor cerebral. Cada una de estas personas me dio una parte de ellas en la manera de afrontar este obstáculo y día con día salir adelante y para todos ellos solo puedo decir...

## ¡¡¡GRACIAS A TODOS!!!

|   |   |
|---|---|
| <b>José Luis Rodríguez López</b>          | <b>Claudia García Pérez</b>                   |
| Nancy Irene Rodríguez García              | Vicente Magaña Santos                         |
| <b>María Camerina Rodríguez López</b>     | <b>José Pablo Magaña Rodríguez</b>            |
| Christian Enrique Magaña Rodríguez        | Luis Alberto Magaña Rodríguez                 |
| <b>María del Rosario Magaña Rodríguez</b> | <b>Lía Sofía Magaña Márquez</b>               |
| Isabel Márquez                            | Ángel Báez Rodríguez                          |
| <b>Juana María Rodríguez Calvillo</b>     | <b>Luis Rodríguez Sandoval</b>                |
| Saidy Alicia Báez Rodríguez               | María Esperanza Rodríguez García              |
| <b>José Enrique Pablo Rodríguez López</b> | <b>Guadalupe Teresita Rodríguez Rodríguez</b> |
| Juan Ricardo Rodríguez Rodríguez          | Alicia Santos Valencia                        |
| <b>José Teófilo Rodríguez López</b>       | <b>Víctor Rodríguez Santos</b>                |
| José Ángel Rodríguez Santos               | Luz Elena Calvillo Juárez                     |
| <b>Armando Rodríguez Sandoval</b>         | <b>Claudia Rodríguez Calvillo</b>             |
| Eduardo Iván Rodríguez Rodríguez          | María Elena Pérez                             |
| <b>Jacobo García García</b>               | <b>Elizabeth García Pérez</b>                 |
| Jacobo García Pérez                       | Gloria Estephany Munguía García               |
| <b>Adrián Sánchez Carrasco</b>            | <b>Eduardo Goddard Esquinca</b>               |
| Amaury Jair Reyes Martínez                | David Rodríguez Guadarrama                    |
| <b>Abraham Rodríguez Juárez</b>           | <b>Felipe de Jesús Morón Vázquez</b>          |
| Enrique Olguín Martínez                   | Isaías López Alcaraz                          |
| <b>Giovanni Aldana Gutiérrez</b>          | <b>Marcel Alberto Bautista Donis</b>          |
| Juan Pablo Barbosa                        | Neftalí Vargas Mandujano                      |
| <b>María de Lourdes Piña Alcántara</b>    | <b>Luis Guillermo Delgadillo Zempoalteca</b>  |
| Néstor Rubén Serrano                      | Mariana Cano Rodríguez                        |
| <b>Ana Cristina Bernabé Aragón</b>        | <b>Roberto Pedraza Moreno</b>                 |
| Rodrigo Alejandro Aldana Faustino         | José Luis Ponce Rodríguez                     |
| <b>Omar Silva Pérez</b>                   | <b>Emma Carolina Varela Mendoza</b>           |
| Karen S. Traconis Lozano                  | Tania Berenice Garduño Hernández              |
| <b>Vanessa Larios Arellano</b>            | <b>Marco Antonio León Félix</b>               |
| Esmeralda Paz Lemus                       | Eduardo Noé Nieto Falcón                      |
| <b>Laura García Romero</b>                | <b>Jorge Alberto Reza Campos</b>              |
| Enrique Vargas Rosas                      | Israel García Cano                            |
| <b>Dra. Edith Ponce Alquicira</b>         | <b>Adriana López Arvizu</b>                   |
| Leonardo Álvarez Vázquez                  | Sergio Méndez Borja                           |

# Frases

“Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo”

**(Albert Einstein)**

“El amor de la familia y la admiración de los amigos es mucho más importante que la riqueza y el privilegio”

**(Charles Kuralt)**

“Encuentra un trabajo que te guste y no volverás a trabajar ni un solo día de tu vida”

**(Confucio)**

“El ayer es historia, el mañana un misterio y el día de hoy es un regalo, por eso se le llama presente”

**(Eleanor Roosevelt)**

“No progresas mejorando lo que ya está hecho, sino esforzándote por lograr lo que aún queda por hacer”

**(Khalil Gibran)**

“No es arrogancia si puedes sostenerlo”

**(Muhammad Ali)**

“Nuestra mayor gloria no está en no haber caído nunca, sino en levantarnos cada vez que caemos”

**(Oliver Goldsmith)**

“El éxito no se logra sólo con las cualidades especiales. Es sobre todo un trabajo de constancia, de método y de organización”

**(Thomas John Sargent)**

# Resumen

La carne forma parte de una dieta equilibrada y está presente en muchos países en el mundo incluido México. La carne y los productos cárnicos contienen importantes niveles de proteínas, vitaminas, minerales y micronutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo que impactan en la salud de los seres humanos.

La relevancia e importancia de este alimento ha llevado al ser humano a sobre explotar al ganado bovino alterando su fisiología con  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ AA) que aumentan la síntesis de proteína y por ende la masa muscular.

Diferentes estudios han reportado el uso  $\beta$ AA en diferentes especies de animales usados en el ganado (aves, bovinos, equinos, ovinos, etc.), los estudios se han encaminado principalmente en los efectos fisiológicos en los animales y toxicidad de  $\beta$ AA presentes en carne. Con respecto a la actividad enzimática endógena de la carne existen algunos reportes con diferentes especies animales que incluyen la carne de bovino, pero no se ha reportado la cuantificación de la actividad enzimática cuando es sometida a maduración siendo esta investigación pionera en este rubro.

El objetivo es evaluar el uso de un  $\beta$ -adrenérgico (clorhidrato de zilpaterol comercializado por Zilmax®) y cómo afecta la actividad enzimática endógena de la carne a los diferentes días de maduración, combinado también con diferentes condiciones de maduración (húmeda y seca) y contrastarlos con un control (animales sin suministro de zilpaterol). Los parámetros que se tomaron en cuenta son: el pH, solubilidad de proteínas y cuantificación de proteínas tanto miofibrilares y sarcoplásmicas; complementado un perfil de proteínas mediante una electroforesis en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE, zimografía, actividad enzimática (reacción de Anson y de Kunitz) y actividad gelatinolítica para la interpretación conjunta de resultados.

Para el presente estudio se seleccionaron 12 bovinos machos jóvenes, línea F1 de una cruce comercial con características fenotípicas similares, los cuales fueron sometidos a período de engorda de 80 a 100 días. El estudio se realizó con *Longissimus dorsi* el cual posee una gran cantidad de receptores  $\beta$  que aumenta el volumen por la síntesis de proteína en el músculo del animal. La mitad de este grupo se les suministro una dieta con zilpaterol y a la otra mitad con una dieta control. La maduración se llevó a cabo durante 21 días.

Los resultados obtenidos en la medición de pH indican que conforme pasa el tiempo el pH disminuye, principalmente en las muestras en seco y con zilpaterol debido a la pérdida de agua y de acuerdo a un análisis de Duncan con intervalo de confianza del 95% establece que no hay diferencia entre los tratamientos y tipo de maduración.

En la actividad de proteasas neutras se observa una tendencia de una disminución de la actividad conforme pasa el tiempo y la mayor actividad se presenta en la maduración húmeda y con zilpaterol. Mediante el análisis de Duncan indica que si existe una diferencia entre tratamientos y maduración a excepción de dos interacciones, la primera es muestras con zilpaterol a los dos diferentes tipos de maduración y muestra seca con zilpaterol contra húmeda sin zilpaterol.

Para la actividad de proteasas ácidas se observa la tendencia de disminución de actividad, pero para el día 3 ocurre un ligero aumento debido a la liberación de proteasas ácidas de la membrana lisosomal, en el análisis de Duncan establece que si existe diferencia entre tratamientos y tipo de



maduración a excepción de la muestra seca con zilpaterol contra muestra húmeda sin zilpaterol. Esto ocurre también en la actividad total (actividad gelanoltica).

En la zimografía tanto en sustrato gelatina y caseína se observó una banda de actividad a consecuencia de la actividad de las proteasas neutras y ácidas (por las proteasas antes ya mencionadas) y para poder identificarlas se requiere mandar a secuenciar las bandas que generaron esta banda de actividad.

En conjunto se puede establecer que los valores de pH tienden a disminuir con un ligero aumento en el día 3, la actividad de las proteasas neutras disminuye debido a que actúan y se degradan (autólisis), en el caso de las proteasas ácidas ocurren ligeros aumentos de actividad debido a la liberación de más proteasas ácidas provocadas por la degradación de la membrana lisosomal. La actividad enzimática aumenta cuando las muestras son tratadas con zilpaterol y en maduración en húmedo ya que favorece la actividad catalítica lo cual repercute en sus propiedades organolépticas y sensoriales de la carne como ternura, jugosidad, aroma, sabor, textura y color (Garriz, 2011).

# Símbolos y abreviaturas

|                                |   |                 |  |
|--------------------------------|---|-----------------|--|
| $\beta_1, \beta_2$ y $\beta_3$ | receptores beta adrenérgicos            | mL              | mililitro  |
| <b><math>\beta</math>AA</b>    | <b>alfa beta adrenérgico</b>            | <b>mM</b>       | <b>mili molar</b>  |
| %                              | porcentaje                              | mU              | mili unidad enzimática   |
| <b>°C</b>                      | <b>grados Celsius</b>                   | <b>NA</b>       | <b>no aplica</b>   |
| $\mu$ g                        | microgramo                              | NADA            | New Animal Drug Application  |
| <b><math>\mu</math>L</b>       | <b>micro litro</b>                      | <b>nm</b>       | <b>nanómetro</b>   |
| ®                              | marca registrada                        | NOM             | Norma Oficial Mexicana   |
| <b>AC</b>                      | <b>adenilciclasa</b>                    | <b>NPN</b>      | <b>nitrogenados no proteicos</b>   |
| ADP                            | adenosin difosfato                      | P               | probabilidad   |
| <b>AMP</b>                     | <b>adenosin monofosfato</b>             | <b>p/v</b>      | <b>peso/ volumen</b>   |
| AMP <sub>C</sub>               | adenosin monofosfato cíclico            | PDC             | proteasas dependientes del calcio  |
| <b>ANOVA</b>                   | <b>análisis de varianza</b>             | <b>pH</b>       | <b>potencial hidrógeno</b>   |
| ARN                            | ácido ribonucleico                      | PI              | potencial de ionización  |
| <b>ATGL</b>                    | <b>lipasa adiposa de triglicéridos</b>  | <b>PKA</b>      | <b>proteincinasa</b>   |
| ATP                            | adenosintrifosfato                      | PM              | peso molecular   |
| <b>aw</b>                      | <b>actividad acuosa</b>                 | <b>PNAC</b>     | <b>proteasas neutras activadas por calcio</b>                            |
| CE                             | Consejo Europeo                         | ppb             | partes por billón  |
| <b>cm<sup>2</sup></b>          | <b>centímetro cuadrado</b>              | <b>ppm</b>      | <b>partes por millón</b>   |
| CZ                             | clorhidrato de zilpaterol               | Pr              | promedio   |
| <b>DE</b>                      | <b>desviación estándar</b>              | <b>PSE</b>      | <b>pálida, suave y exudativa</b>   |
| DFD                            | oscura, firme y secas                   | r <sup>2</sup>  | coeficiente de correlación   |
| <b>DL<sub>50</sub></b>         | <b>dosis letal, 50%</b>                 | <b>REDOX</b>    | <b>reducción-oxidación</b>   |
| EPOC                           | enfermedad pulmonar obstructiva crónica | rpm             | revoluciones por minuto  |
| <b>F</b>                       | <b>valor de Fischer de tablas</b>       | <b>S</b>        | <b>maduración en seco</b>  |
| FAC                            | factor activado por calcio              | SAS             | Statistical Analysis Software  |
| <b>FDA</b>                     | <b>Food and Drug Administration</b>     | <b>SDS-PAGE</b> | <b>electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico</b> |
| FOIA                           | A Freedom of Information                | T               | tripsina   |
| <b>g</b>                       | <b>gramo</b>                            | <b>TIF</b>      | <b>Tipo Inspección Federal</b>   |
| h                              | hora                                    | TNBS            | ácido sulfónico trinitrobenceno  |
| <b>H</b>                       | <b>maduración en húmedo</b>             | <b>trat-h</b>   | <b>maduración húmeda sin zilpaterol</b>                                  |
| HSL                            | hormona sensible a lipasa               | trat-hz         | maduración húmeda con zilpaterol   |
| <b>kDa</b>                     | <b>kilo Dalton</b>                      | <b>trat-s</b>   | <b>maduración seca sin zilpaterol</b>                                    |
| kg                             | kilogramo                               | trat-sz         | maduración seca con zilpaterol   |
| <b>M</b>                       | <b>molaridad</b>                        | <b>V</b>        | <b>Volt</b>  |
| m/s                            | metro/segundo                           | v/v             | volumen/ volumen   |

# Índice general

|                              |     |
|------------------------------|-----|
| Agradecimientos.....         | III |
| Dedicatorias.....            | IV  |
| Frases.....                  | VI  |
| Resumen.....                 | VII |
| Símbolos y abreviaturas..... | IX  |
| Índice general.....          | X   |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I. Introducción.....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Generalidades.....   | 1         |
| 1.2 Composición de la carne.....   | 2         |
| 1.3 Conversión de músculo en carne.....  | 9         |
| 1.4 Tipos de maduración en la carne.....   | 12        |
| 1.5 $\beta$ -adrenérgicos. ( $\beta$ -agonistas en canal de bovinos y ovinos).....       | 14        |
| <b>II. Antecedentes.....</b>   | <b>25</b> |
| <b>III. Hipótesis.....</b>   | <b>27</b> |
| <b>IV Objetivos.....</b>   | <b>27</b> |
| 4.1 Objetivo general.....  | 27        |
| 4.2 Objetivos particulares.....  | 27        |
| <b>V. Metodología.....</b>   | <b>28</b> |
| 5.1 Obtención de las muestras de carne.....  | 29        |
| 5.2 Tratamiento de maduración.....   | 29        |
| 5.3 Medición de pH.....  | 30        |
| 5.4 Extracción de proteínas miofibrilares.....   | 30        |
| 5.5 Extracción de proteínas sarcoplásmicas.....  | 30        |
| 5.6 Determinación de la concentración de proteína.....                                   | 30        |
| 5.7 Perfil de proteínas: electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)..... | 31        |
| 5.8 Zimogramas.....  | 31        |
| 5.9 Determinación de proteasas ácidas y neutras.....                                     | 32        |
| 5.10 Actividad gelanolítica.....   | 32        |
| <b>VI. Resultados y discusión.....</b>   | <b>34</b> |
| 6.1 Toma de muestra y recepción.....   | 34        |
| 6.2 pH.....  | 34        |

|   |           |
|---|-----------|
| 6.3 Extracción de proteínas .....   | 40        |
| 6.4 Proteínas miofibrilares .....   | 40        |
| 6.4.1 Cuantificación de proteínas .....   | 40        |
| 6.4.2 Perfil de proteínas por SDS-PAGE .....  | 41        |
| 6.5 Proteínas sarcoplásmicas.....   | 44        |
| 6.5.1 Cuantificación de proteínas .....   | 44        |
| 6.5.2 Perfil de proteínas por SDS-PAGE .....  | 45        |
| 6.5.3 Reacción de Kunitz .....  | 48        |
| 6.5.4 Reacción de Anson .....   | 53        |
| 6.5.5 Actividad gelanolítica .....  | 57        |
| 6.5.6 Zimogramas.....   | 61        |
| <b>VII. Conclusiones.....</b>   | <b>65</b> |
| <b>VIII. Perspectivas futuras.....</b>  | <b>65</b> |
| <b>IX Referencias.....</b>  | <b>67</b> |
| <b>Apéndice. Valores de pH, concentración de proteína y actividad de proteasas.....</b> | <b>74</b> |
| <b>Análisis estadísticos .....</b>  | <b>77</b> |

# I. Introducción

## 1.1 Generalidades

### Características de los bovinos

Los bovinos son mamíferos que pertenecen a la familia de los bóvidos. Son animales rumiantes, que se caracterizan por la alimentación y sistema digestivo complejo ya que son estrictamente herbívoros. Son capaces de digerir hierbas, forrajes (pastos), entre otros (*Figura 1*).

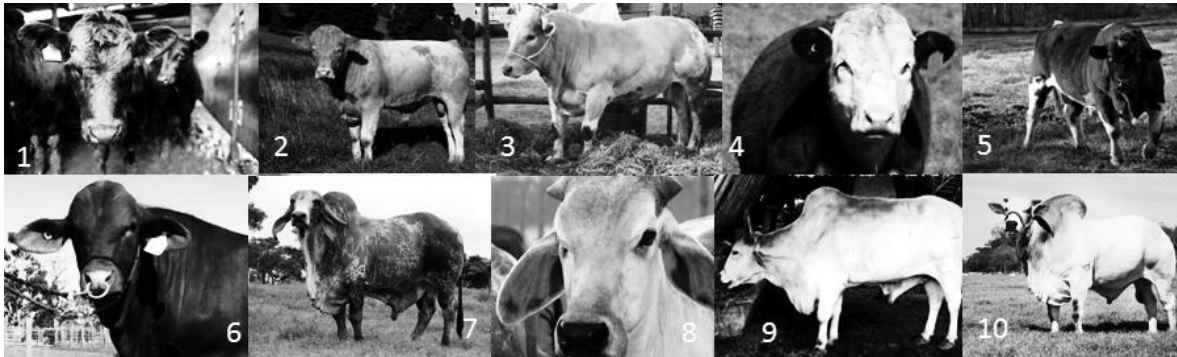


**Figura 1** Ganado bovino (Enciclopedia alfabética del campo).

### Razas para producción de carne

Aunque casi todas las razas existentes al final de su etapa productiva son destinadas al sacrificio y aprovechamiento de su carne, existen algunas razas más especializadas en este aspecto por sus altas ganancias de peso, por desarrollar una gran masa muscular, por tener un crecimiento más rápido o por la calidad de su carne. El tipo carne pueden dividirse según su calidad en primera, segunda y tercera, clasificación realizada según la suavidad, la jugosidad y el sabor de la carne. Las razas que producen carne de primera son en general las razas de origen europeo que pertenecen al grupo *Bos taurus* y son: Aberdeen Angus, Charolais, Hereford y Shorthorn. Las razas que producen carne de segunda son el producto de cruces entre razas europeas anteriormente mencionadas con la raza Cebú (perteneciente al grupo *Bos indicus*) y son: Santa Gertrudis, Brangus y Charbray. Las razas que producen carne de tercera son: cebú y criolla. Las principales razas cebuinas que existen en el mundo son: Brahman, Guzarat, Nerole, Sahiwal, Gyr

e Indobrasil (*Figura 2*). La raza criolla no tiene características muy definidas; sin embargo, 80% del consumo de carne en América Latina proviene de ésta y del cebú.



**Figura 2** Razas especializadas en carne; (1) Angus, (2) Charolais, (3) Blanco azulbelga, (4) Hereford hembra, (5) Hereford macho, (6) Santa Gertrudis, (7) Gyr, (8) Cebú Brahman, (9) Guzserat, (10) Nerole (Enciclopedia alfabética del campo).

## Razas de doble propósito

Las razas de doble propósito se crearon con el fin de obtener animales que, además de tener una gran capacidad de producir leche, produjeran la mayor cantidad de carne. Las principales razas de doble propósito son: Pardo Suizo, Simmental, Shorthorn lechera y Red Poll (*Figura 3*).



**Figura 3** Razas de doble propósito; (Izquierda) Pardo suizo, (centro) Shorthorn, (derecha) Red Poll (Enciclopedia alfabética del campo).

## 1.2 Composición de la carne

La composición química promedio del tejido muscular del bovino, libre de grasa subcutánea, consiste en agua (65-80%), proteína (16-22%), lípidos (1.5%-13%), hidratos de carbono (0.5-1.5%) y cenizas (1%), pero son muchos los factores que afectan esta composición, particularmente la alimentación y la genética de los animales (Fennema, 1996; Serra *et al.*, 2004).

El agua es el componente principal de los líquidos extracelulares y en ella se encuentran disueltos o suspendidos numerosos componentes químicos; por ello sirve como medio de transporte de nutrientes entre el lecho vascular y las fibras musculares. La composición lipídica de la carne se puede dividir en lípidos del tejido muscular y los propios del tejido adiposo, los primeros se depositan en dos compartimientos diferentes y algunos lípidos lo hacen dentro de la fibra muscular (intracelulares), pero la mayoría se localiza en el tejido adiposo asociado a los septos de tejido conectivo laxo que se encuentra entre los fascículos musculares; este último tipo de depósito de grasa se le conoce como veteado, marmoleado o "marbling". El conjunto de ambos compartimientos constituye la grasa intramuscular. En general se considera que los lípidos del músculo (grasa intramuscular) tiene un grado superior de insaturación que los del tejido adiposo (Piironen *et al.*, 2002). Por otra parte la oxidación de los ácidos grasos altamente insaturados que se encuentran en la membrana de la fibra muscular puede ser muy importante en algunas de las reacciones de deterioro de la carne (Fennema, 1996; Morrissey *et al.*, 1998) afirman que al incrementarse el grado de insaturación de estos lípidos musculares se reduce su estabilidad oxidativa.

Se ha reportado que el contenido elevado de ácidos grasos saturados del músculo de mamíferos ha sido fuente de controversia acerca de su papel en la producción de ciertas formas de arteriosclerosis. Sin embargo, hasta la fecha no existe evidencia científica que demuestre que las grasas del tejido muscular son perjudiciales para la salud cuando se consumen en cantidades razonables. El colesterol es el esteroide más abundante en los tejidos animales y se sintetiza a partir del acetil-coenzima A, siendo el hígado el principal lugar de síntesis. Así como sucede con la totalidad de los lípidos del plasma sanguíneo, el colesterol se encuentra asociado con proteínas formando complejos lipoproteicos que aseguran su transporte. Su metabolismo incluye la producción de ácidos biliares y de hormonas esteroideas, tales como progesterona, testosterona, estradiol y cortisol o es su precursor de vitamina D. Su excreción se realiza principalmente como esteroides en la bilis (Aranda *et al.*, 2002). El contenido promedio de colesterol de la carne fluctúa entre 70 y 75 mg/100g de carne por debajo del límite en el cual afecta la salud (Fennema, 1996). Se requieren ingerir 400 g de carne bovina al día para alcanzar el límite máximo de 300 mg recomendado (Jiménez, 2000).

El contenido de hidratos de carbono de la carne es muy bajo y el glucógeno, que es el hidrato de carbono del músculo más importante, fluctúa entre 0.5 y 1.3%. Los hidratos de carbono restantes

son mucopolisacáridos asociados al tejido conectivo, glucosa, otros mono y disacáridos intermediarios del metabolismo glucolítico (Aberle *et al.*, 2001).

La carne también es una importante fuente de vitaminas del complejo B particularmente tiamina, niacina, riboflavina, pirodoxina y cianocobalamina. También es una fuente de vitamina A cuyo contenido es mayor que las de las otras vitaminas liposolubles. La carne es rica en hierro, cobre, zinc y selenio. El hierro en la carne tiene alta biodisponibilidad y se encuentra asociado a la proteína mioglobina. Esta proteína es la que provee oxígeno y le da color al tejido muscular rojo. Por lo tanto, la carne se considera una fuente inestimable de este mineral en la dieta humana (Pearson y Gillet, 1999). La carne es relativamente pobre en calcio (con aproximadamente 100 mg/100g de carne) y contiene generalmente 60 a 90 mg de sodio y 300 mg de potasio/100 g de carne fresca. Como los minerales y vitaminas solubles del complejo B están presentes en la porción magra de la carne, su concentración varía dependiendo de la cantidad de tejido graso y hueso de cada pieza de carne así como del proceso de cocción (Fennema, 1996).

Las proteínas son el componente principal de la carne. Generalmente se clasifican por su solubilidad en: sarcoplásmicas (mioglobina, hemoglobina y enzimas asociadas a la glucólisis, al ciclo del ácido cítrico y a la cadena transportadora de electrones), miofibrilares (entre otras, actina, miosina, troponina, tropomiosina, actinina  $\alpha$  y  $\beta$ , proteína C y proteína M) y del estroma (constituyentes del tejido conectivo y proteínas fibrilares asociadas, que son comparativamente insolubles). En el músculo se encuentran además de proteínas, otros componentes nitrogenados no proteicos (NPN) tales como aminoácidos, péptidos sencillos, creatina, fosfato de creatina, creatinina, algunas vitaminas, nucleósidos y nucleótidos, incluido el adenosintrifosfato (ATP) (Rodríguez, 2012).

## **Proteínas de la carne**

Las proteínas miofibrilares constituyen del 55% al 60% del total de la proteína del músculo. Basadas en sus funciones fisiológicas dentro del músculo, las proteínas miofibrilares pueden clasificarse en proteínas contráctiles y proteínas reguladoras (González, 2003).



## **Proteínas contráctiles**

En este grupo se encuentran la miosina y la actina, las cuales están directamente relacionadas con el ciclo contracción-relajación del músculo. La miosina es la proteína miofibrilar más abundante y constituye más de una tercera parte de la proteína del músculo, esta proteína tiene un peso molecular de 500 kDa y contiene cuatro cadenas pesadas idénticas de aproximadamente 220 kDa cada una y dos cadenas ligeras de aproximadamente 14 a 20 kDa dependiendo de la especie y tipo de músculo. La actina es la segunda proteína miofibrilar más abundante comprendiendo un 20% del total, su peso molecular es aproximadamente 42 kDa tiene una estructura globular (G-actina) con menos de un 30% de  $\alpha$ -hélice que se polimeriza formando los filamentos de F-actina del filamento delgado. (Tehver y Thirumalai, 2010).

## **Proteínas reguladoras**

Estas proteínas juegan un papel muy importante en el ciclo de la contracción-relajación. Se dividen en dos grupos: las proteínas reguladoras mayores y reguladoras menores (Andújar *et al.*, 2003).

### **Proteínas reguladoras mayores**

En este grupo se incluye a la tropomiosina y el complejo troponina (*Tabla 1*). 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 (kilo Dalton). La troponina es una proteína globular con un contenido alto de prolina, constituye del 8 al 10% de la proteína miofibrilar. Los tres componentes del complejo de la troponina son: troponina I (PM 22 kDa) la cuál por si misma inhibe la actomiosina ATP-asa en presencia o ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$ ; la troponina C (PM 18 kDa) que se fija reversiblemente a los iones  $\text{Ca}^{+2}$  y la troponina T (PM 37 kDa) que se une a la tropomiosina y fija los otros dos componentes al filamento delgado (González, 2003).

**Tabla 1** Proteínas miofibrilares del músculo esquelético de vertebrados (González, 2003).

| Proteínas                     | Peso Molecular  | Contenido % | Localización                             |
|-------------------------------|-----------------|-------------|--|
| <b>Contráctiles</b>           |                 |             |  |
| Miosina                       | 200 kDa         | 43          | Banda A                                  |
| Actina                        | 43 kDa          | 22          | Banda I                                  |
| <b>Reguladoras Mayores</b>    |                 |             |  |
| Troponina                     | 70 kDa          | 5           | Banda I                                  |
| Tropomiosina                  | (33 kDa) x 2    | 5           | Banda I                                  |
| <b>Reguladoras Menores</b>    |                 |             |  |
| 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         |             | Banda A                                  |
| Proteína 1                    | 50 kDa          |             | Banda A                                  |
| Proteína X                    | 152 kDa         |             | Banda A                                  |
| $\alpha$ -Actinina            | 35 kDa + 32 kDa |             | Fin de la banda I                        |
| Actinina                      | 35 kDa          |             | Fin de la banda I                        |
| <b>Filamentos Intermedios</b> |                 |             |  |
| Desmina                       | 53 kDa          | 1           | Periferia de miofibrillas entre discos Z |
| Vimentina                     | 55 kDa          | 1           | Periferia de miofibrillas entre discos Z |
| Conectina                     | 2x106 kDa       | 10          | Unión A-I                                |
| <b>Discos Z</b>               |                 |             |  |
| a-actinina                    | (95kDa) x 2     | 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                                 |
| <b>Otras Proteínas</b>        |                 |             |  |
| Vinculina                     | 130 kDa         | <1          | Sarcolema                                |
| Nebulina                      | 800 kDa         | 3           | Banda I                                  |

## Proteínas reguladoras menores

Cuantitativamente la mayor parte de ellas no son importantes, pero se cree que tienen conexión con la estructura de los filamentos miofibrilares (*Tabla 1*). La  $\alpha$  actina 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  $\alpha$ -actina es regular el ancho de los filamentos al igual de la titina y la nebulina (Vigoreaux, 1994).

## Proteínas sarcoplásmicas

Las proteínas sarcoplásmicas son endocelulares e hidrosolubles, constituyen la masa fluida que baña a las miofibrillas proporcionando energía y capacidad de sintetizar proteína y haciendo posible la eliminación de ciertos desechos metabólicos. Se encuentran en el fluido que se desprende de la carne (sarcoplasma) durante el proceso de descongelación. Tiene pocas propiedades funcionales pero son importantes por su actividad enzimática, de transporte y

almacenamiento de oxígeno; desde el punto de vista de calidad de carne como alimento, las más importante es la mioglobina ya que está relacionada con el color de la misma (González, 2003).

## Catepsinas

Zeece *et al.*, (1992) reportaron que existen en todas las células, organelos celulares denominadas lisosomas que contienen enzimas con actividad proteolítica, entre ellas se encuentran las catepsinas que son reconocidas por su participación en el ablandamiento postmortem (*Tabla 2*).

Los lisosomas tienen membranas lipoproteicas intactas a los niveles *in vivo* de pH, pero que se rompen al descender el pH *postmortem* o cuando el tejido sufre una lesión grave, liberando enzimas proteolíticas. Las enzimas de los lisosomas intervienen en la degradación de proteínas, polisacáridos y lípidos, además de otros compuestos, ya que los lisosomas están relacionados con la digestión intracelular. Cuando los lisosomas se rompen se destruye la célula, debido a que las enzimas contenidas son capaces de degradar los componentes principales de esta (Andújar *et al.*, 2003)

Estudios histoquímicos han reportado la localización de las catepsinas y han explicado su participación en el ablandamiento de la carne. Se ha encontrado que al cuarto día de maduración, las catepsinas están más difundidas en la fibra muscular lo que permite deducir que una vez degradada la membrana de los lisosomas durante el descenso de pH *postmortem* la acción de las enzimas se incrementa con el tiempo de almacenamiento. Se ha reportado que a temperaturas de almacenamiento aumenta el rompimiento de las membranas lisosomales (Sancho *et al.*, 1997), causando una degradación extensiva de las proteínas miofibrilares. Las catepsinas tienen un pH óptimo ácido. De las 8 enzimas reportadas como existentes en los lisosomas de la célula del músculo, solo cuatro han sido caracterizadas (Koochmaraie *et al.*, 1990).

**Tabla 2** Propiedades funcionales de las catepsinas in Vitro (Carballo y López de Torre, 1991).

| Catepsinas | Acción   | PM (kDa) | PI      | pH      | Sustrato*        |
|------------|----------|----------|---------|---------|------------------|
| <b>B</b>   | Exo Endo | 25       | 5-5.2   | 4.6     | A, M, C          |
| <b>D</b>   | Endo     | 42       | 5.5-6.5 | 3-5     | A, M, TT, TI, LZ |
| <b>H</b>   | Exo ENdo | 28       | 7.1     | 5.5-6.5 | A, M             |
| <b>L</b>   | Endo     | 24       | 5.8-6.1 | 4-6.5   | A, M, TT, TI, C  |

\* **A:** actina, **M:** miosina, **TT:** troponina, **TI:** troponina I, **LZ:** línea Z, **C:** colágeno.

## Calpaína

El sistema proteolítico de las calpaínas (*Tabla 3*) ha sido nombrado como factor activado por calcio (FAC), proteasas neutras activadas por calcio (PNAC) y proteasas dependientes del calcio (PDC).

Las calpaínas son proteasas con dos sub-unidades, 80 y 30 kDa. El sistema proteolítico de las calpaínas consta de dos tipos: de acuerdo a la concentración de calcio que requieren para activarse, la II-calpaína (1-5mM) y la m-calpaína (80-120 mM) también han sido llamadas calpaína I y II (González, 2003).

**Tabla 3** Propiedades funcionales de las calpaínas *in vitro* (Carballo y López de Torre, 1991).

| Calpaínas | Acción | PM kDa                    | pH    | Sustrato*       |
|-----------|--------|---------------------------|-------|-----------------|
| I y II    | Endo   | 80 y 30 (dos subunidades) | 6.5-8 | D, TT, TI, T, C |

\* **D**: desmina, **TT**: troponina T, **TI**: tropomiosina, **C**: conectina.

Las condiciones óptimas para la activación de las calpaínas es a 25°C y pH 7.5, sin embargo el requerimiento mínimo de calcio para la activación de calpaínas parece ser independiente de la temperatura (Cottin *et al.*, 1991).

## Tejido conectivo

Las proteínas del tejido conectivo son: colágeno, elastina y reticulina (*Tabla 4*). Estas juegan un papel importante en la dureza de la carne. 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 esta macromolécula es la de formar fibras, filamentos y redes con propiedades mecánicas indispensables en la estructura organizacional de un organismo (González, 2003).

**Tabla 4** Composición colágeno y elastina en diferentes tejidos bovinos (González, 2003).

| Tejido           | Colágeno (%) | Elastina (%) |
|------------------|--------------|--------------|
| Tendón           | 95           | 1            |
| Piel             | 50           | 5            |
| Sistema vascular | 40           | 50           |
| Hueso            | 25           | -            |
| Pulmón           | 15           | 20           |
| Riñón            | 4            | -            |

|                |   |     |
|----------------|---|-----|
| <b>Hígado</b>  | 2 | -   |
| <b>Músculo</b> | 2 | 0.1 |

Se ha comprobado que la unidad fundamental del colágeno, el tropocolágeno, está formado por tres cadenas polipeptídicas en hélice, unidas por enlaces que se entre cruzan cuando aumenta la edad del animal, por lo que es una proteína difícil de atacar por enzimas digestivas. Al calentarse se transforma en gelatina de bajo valor biológico. El colágeno contiene un 30% de glicina y un 25% de prolina e hidroxiprolina. Cuando más abunden estos aminoácidos, más rígido y resistente es el colágeno. La edad no influye en el contenido pero sí en la calidad debido a que aumenta el número de enlaces. El colágeno es la proteína más abundante de los mamíferos. Solo en los músculos forma el epimisio, endomisio y perimisio (Carballo y López de Torre, 1991).

Es necesario hacer una marcada distinción entre los músculos de soporte y de los de locomoción, aquellos músculos que se utilizan para mover el peso de la canal no solo estarán más ejercitados, sino que son el punto de convergencia de todas las capas de tejido conectivo (epimisio y endomisio). Los músculos que están cerca de la espina dorsal poseen funciones de soporte y por tanto son más suaves (Velazco, 1999). Se sabe además que la dureza de corte es siempre mayor cuando éste se hace transversalmente al eje de las fibras. Por tanto, las oportunidades de encontrar cortes duros son mayores en el cuarto delantero.

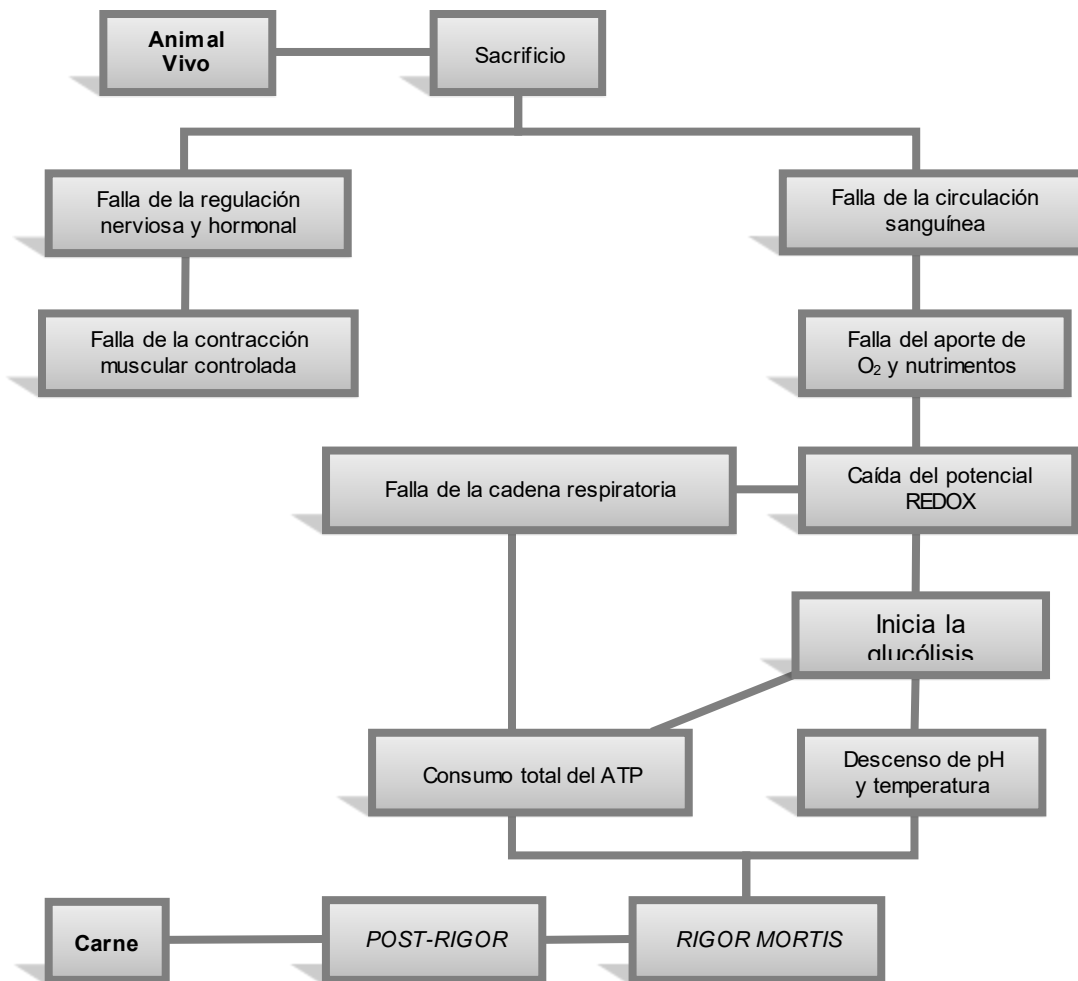
### **1.3 Conversión de músculo en carne**

Los hechos que deberán producirse para la conversión óptima de los músculos en carne son bastante complejos. El pH deberá descender como consecuencia de la formación de lactato por glucólisis anaerobia. Una baja producción de lactato puede traducirse en la obtención de carnes oscuras, firmes y secas (DFD), que son carnes con un pH final elevado de más de 6.0. Por otro lado, un exceso de lactato formado con rapidez mientras los músculos se encuentran aún calientes, genera un descenso muy rápido del pH y puede originar carnes pálidas, blandas y exudativas (PSE) (Onega, 2003). Tras el sacrificio, debido al fenómeno conocido como *rigor mortis* los músculos parecerán consistentes como resultado de la formación de enlaces cruzados entre sus filamentos gruesos y delgados (González, 2003). Sin embargo, la formación de un exceso de enlaces cruzados puede provocar dureza en la carne. El largo periodo que transcurre durante la conversión de los músculos en carne es llamado acondicionamiento o maduración, y durante el

mismo se liberan las propias enzimas de la carne (Swatland, 1991). Así, por ejemplo, las proteinasas comienzan la digestión de las proteínas de la carne fragmentándolas lo que se traduce en un ablandamiento lento (Andújar *et al.*, 2003).

## Rigor mortis

El proceso bioquímico hasta el comienzo de la rigidez cadavérica o *rigor mortis* puede dividirse en dos fases (*Figura 4*): Una primera fase en la que la flexibilidad y la elasticidad del músculo permanecen inalteradas.



**Figura 4** Principales cambios postmortem (Ponce, 2006).

Esta fase tiene una duración variable, de 1 a 20 h, dependiendo de la reserva de glucógeno y creatinfosfato, así como de la temperatura del músculo. La hidrólisis del ATP aumenta como consecuencia de la disminución progresiva del pH, pero permanece compensada por la capacidad

de resíntesis del ATP. Una segunda fase en la que la extensibilidad y elasticidad disminuyen rápidamente en unas 2 o 3 h. Esto se debe a la desaparición del ATP y al incremento de la concentración de calcio que conduce a la unión irreversible de actina y miosina, dando lugar a la instauración de la rigidez cadavérica (Onega, 2003).

## ***Post-rigor***

El almacenamiento de la carne a temperaturas por arriba de la congelación (0-5°C) por periodos cortos (días) a varias semanas, ha sido ampliamente usado para mejorar la palatabilidad de la carne. Sin embargo, este largo tiempo de almacenamiento de la carne, incrementa la merma de la canal (Tehver y Thirumalai, 2010).

La dureza aumenta a medida que el músculo entra en rigor y alcanza un máximo a las 24 h *postmortem*. A medida que transcurre el estado *postmortem* la dureza disminuye gradualmente, esta reducción es rápida durante los primeros días de conservación y a continuación su velocidad desciende. Después de 10 días de almacenamiento a 1°C se alcanza aproximadamente un 80% de la reducción total de la dureza inicial (Dransfield, 1994). Este comportamiento puede verse alterado cuando las canales de vacuno se enfrían muy rápido. Inmediatamente después del sacrificio se puede alcanzar en la musculatura superficial una temperatura de 15°C o menor, cuando todavía el músculo contiene un 25% del total de ATP. En estas circunstancias, el músculo se contrae y los sarcómeros experimentan un encogimiento de hasta 40% de su longitud en reposo, este fenómeno denominado acortamiento por frío, se acompaña de un endurecimiento considerable de la carne (Penny, 1984).

La blandura de la carne ocurre en dos pasos, una fase rápida y después una lenta, el rápido incremento en la blandura es debido principalmente al debilitamiento de las miofibrillas y el proceso lento, sobre todo es causado por el debilitamiento del endomisio y perimisio (Takahashi, 1996).

Se han estudiado algunos métodos de ablandamiento de la carne: la estimulación eléctrica en la canal después del sacrificio (Moribo *et al.*, 1999; Morton *et al.*, 1999), el acondicionamiento a altas temperaturas (Hildrum *et al.*, 1999), la suspensión pélvica de la canal (Thompson, 2002) y diversos métodos mecánicos de tenderización y la inyección de proteasas exógenas.

La primera prueba positiva de que la estructura miofibrilar se altera durante la maduración, se observa en las miofibrillas, estas son más cortas y tienen menos sarcómeros íntegros que las que se obtienen a partir de músculos sin madurar. Cuando se observan bajo microscopio, estos fragmentos miofibrilares cortos y los discos Z se observan pálidos (Penny, 1984).

Los músculos al entrar en estado de rigor no se pueden estirar debido a la unión de la actina con la miosina, sin embargo, después de mantenerlos durante unos días a 0 – 4°C, los músculos pueden de nuevo estirarse aproximadamente la misma longitud que tenía cuando estaban en pre-rigor, pero ahora el estiramiento ya no es reversible. Mediante un examen de microscopio electrónico se puede observar que el estiramiento del músculo separa los filamentos I de sus uniones con los discos Z y como consecuencia del debilitamiento de los discos Z, la carne madurada rinde al homogeneizarla una cantidad mayor de fragmentos más pequeños que la carne sin madurar.

El grado de fragmentación ha sido utilizado por diversos investigadores para medir la magnitud de la maduración, se ha observado que el número de las miofibrillas aumenta de 1-4 sarcómeros con el periodo de maduración, sin embargo, otros investigadores utilizaron el cambio de turbidez a 540 nm para medir el grado de fragmentación, observando que la turbidez aumenta durante la maduración. El cambio del grado de fragmentación, si bien es una medida de la modificación estructural de las miofibrillas, corresponde significativamente con el aumento de la blandura de la carne cocinada después de la maduración. Así, el grado de debilitamiento de discos Z es un factor importante en la reducción de la dureza durante el período de maduración (Penny, 1984).

## **1.4 Tipos de maduración en la carne**

### **Maduración húmeda**

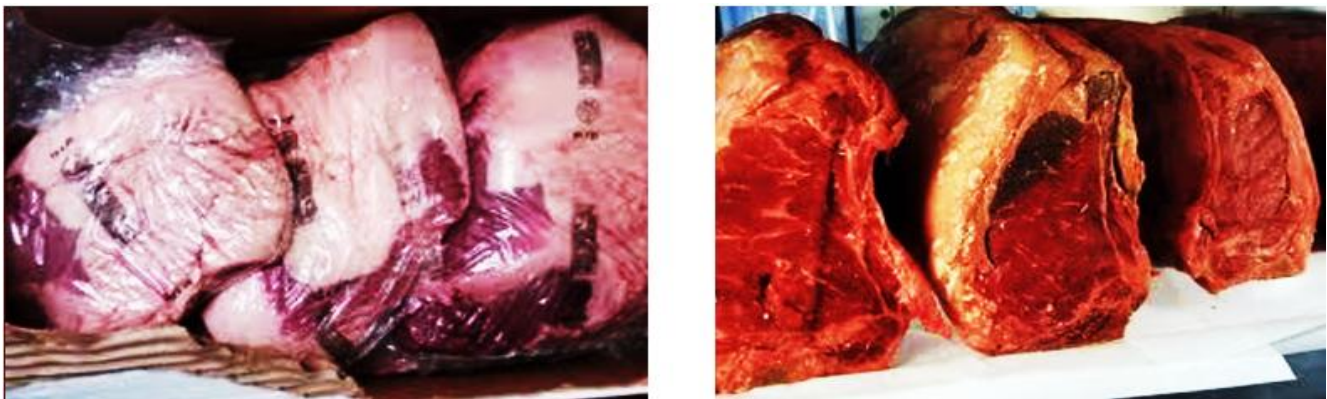
Es la maduración de la carne en bolsas al vacío bajo condiciones de refrigeración de 0-1°C. Obviamente, la humedad y la velocidad del aire no son requerimientos necesarios para la maduración en húmedo. Porque la mayor parte de la carne es envasada al vacío en el sitio de la



fabricación de la canal (corte), la maduración en húmedo es el método predominante de *postmortem* actualmente (*Figura 5*).

El proceso de maduración continúa cuando un corte principal o sub-principal ha sido colocado en la empacadora al vacío. En el momento en el que el corte llega a la tienda “al por menor”, al menos 7-10 días normalmente transcurridos después del sacrificio, debido a la participación de la plantas empacadoras de canales en frío y fabricación, inventario de almacenamiento, el envío al almacén del minorista, y subsecuentemente el envío al siguiente minorista. Por lo tanto, el tiempo asociado con la rápida tenderizado (7-10 días) y que es asociado con el movimiento del producto al minorista son similares. Sin embargo, el tiempo de maduración adicional es generalmente benéfico.

La maduración seca y húmeda, ambas resulta en un grado similar de palatabilidad de la costilla y el filete de lomo; no obstante, se puede distinguir una diferencia de sabor. La carne que se madura en húmedo libera más sangre, suero y tiene sabores metálicos, mientras, que la carne madurada en seco tiene un sabor “brown-roasted beefy” (Parrish, 2008).



**Figura 5** Carne en condiciones de maduración húmeda (izquierda) y maduración seca (derecha) (U.S. Meat).

## Maduración seca

Es el proceso tradicional de colocar una canal entera o cortes grandes (sin cubierta o embalaje) en un cuarto de refrigeración durante 21 a 28 días, a una temperatura de 0-1°C y una humedad relativa de 80-85%, con una velocidad de ventilación de aire de 0.5 a 2.5 m/s (*Figura 5*). Estas tres condiciones, aunque varía ampliamente en las prácticas comerciales, son extremadamente

importantes en la adecuada maduración *postmortem* de las canales, así como costillas de ternera y lomo. Demasiada humedad permitiría un excesivo crecimiento de microorganismos, mientras que poca humedad podría encoger desmesuradamente la carne. El 85% de humedad relativa es la condición ideal para que haya un crecimiento lento de microorganismos y haya poca pérdida de humedad. El desarrollo de la terneza podría ser acelerada por la maduración a altas temperaturas, pero acelera el crecimiento microbiano que se convertiría en un serio problema en este tipo de condición.

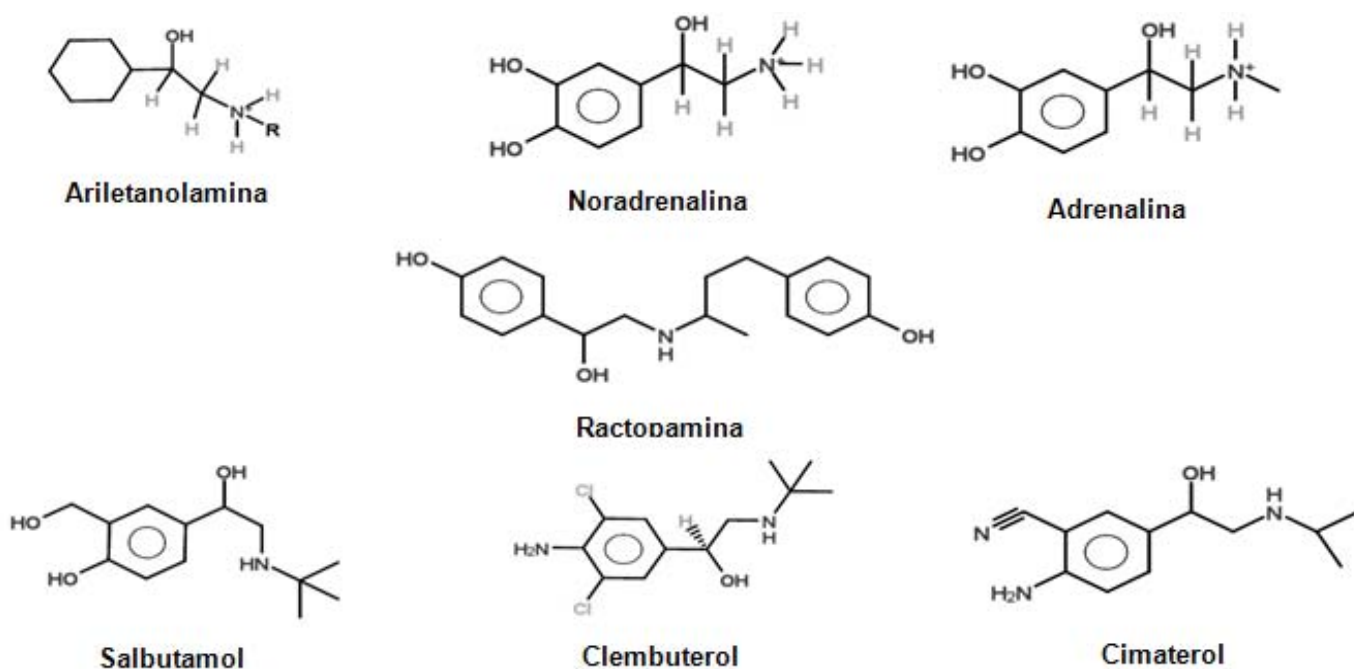
La velocidad del aire es esencial porque actúa como un medio para remover la humedad del área refrigerada. Una velocidad de aire insuficiente permitiría un exceso de humedad que se condensaría en el producto y daría como resultado un mal sabor a la carne y aromas, así como favorecer el deterioro. Una alta velocidad del aire, por otra parte, resultaría en un secado excesivo en la superficie con pérdidas de peso y en el momento del deshuesado y corte, generaría piezas de carne considerablemente pequeñas (Parrish, 2008).

## **1.5 $\beta$ -adrenérgicos. ( $\beta$ -agonistas en canal de bovinos y ovinos)**

El grupo de fármacos recientemente incorporados que se utilizan en la producción animal para mejorar la retención de nitrógeno, son llamados “repartidores de energía” o  $\beta$ -agonista adrenérgicos ( $\beta$ AA). Son agentes químicos que actúan a nivel de los receptores adrenérgicos, derivando la energía de los alimentos y de la lipólisis hacia la síntesis proteica muscular (Mersmann, 1998). En teoría, la utilización de estas sustancias presenta una serie de ventajas relacionadas no sólo con la mejora de la producción, sino también con la calidad, pues la carne de animales tratados con  $\beta$ AA tiene mayor tejido magro (Domínguez-Vara *et al.*, 2010).

### **Estructura química de los $\beta$ -agonistas adrenérgicos**

Las propiedades que hace diferente la respuesta intrínseca de los  $\beta$ AA radican en las características de sus grupos constituyentes que propician una distinta farmacocinética, la cual determina la magnitud del efecto y la persistencia de residuos en los tejidos animales. Por ejemplo, el clenbuterol para presentar actividad, requiere de un anillo aromático con un grupo hidroxilo en la posición  $\beta$  del grupo alifático (*Figura 6*).



**Figura 6** Estructura química de algunos  $\beta$ -agonistas.

Al mismo tiempo, la presencia del cloro en clembuterol lo hace más liposoluble en sus análogos y por consecuencia tiende a difundirse profundamente en los tejidos, minimizando su excreción; sin embargo, todos los  $\beta$ AA serían más liposolubles de no ser porque la amina, que todos tienen y estos se encuentran a un pH fisiológico menor al del estómago. Esta respuesta es determinada por los tipos de receptores adrenérgicos encontrados en la membrana celular, a los cuales, el  $\beta$ AA se unirá para llevar a cabo su respuesta fisiológica (Sumano *et al.*, 2002).

## Zilpaterol

El Zilpaterol es comercializado por Zilmax® (*Figura 7*) y del cual el compuesto activo es el clorhidrato de zilpaterol este tiene un peso molecular de 297.8 g/mol, su fórmula molecular es  $C_{13}H_{19}N_3O_2HCl$ . Dentro de sus características químicas y físicas es un polvo blanco, soluble en agua sin importar su pH, es poco soluble en metanol y prácticamente insoluble en otros solventes orgánicos y es estable a temperatura ambiente. El producto tiene 4.58% de zilpaterol y 95.42% olote de maíz y se recomienda una dosis de 0.15 mg de clorhidrato de zilpaterol por kg de peso

vivo por día. El clorhidrato de zilpaterol se absorbe más rápido por vía oral, aproximadamente 12 h después del consumo y su eliminación se presenta de modo bifásico con una primera fase de disminución rápida (12.5 h de vida media), seguida de una remanencia todavía medible al octavo día.



**Figura 7** Clorhidrato de zilpaterol comercializado por ZILMAX® que es producido por Intervet®.

El clorhidrato de zilpaterol se excreta rápidamente; 60% de la dosis administrada en 24 h y 90% en 48 h mediante la orina que es la vía principal de excreción, ya que a través de ella se elimina el 86% del compuesto y a través de las heces se excreta el resto (14% del compuesto) (MSD Animal Health).

## Clembuterol

El clembuterol o (RS)-1-(4-amino-3,5-diclorofenil)-2-(ter-butilamino) etanol, es un compuesto que tiene un peso molecular de 277.19 g/mol, su fórmula molecular es  $C_{12}H_{18}N_2Cl_2O$ . Este  $\beta$ AA se caracteriza por ser un polvo sintético, de color blanco, anhídrido, soluble en agua y alcohol; con un punto de fusión de 75°C. Es sintetizado por VENTIPULMIN® (Figura 8). De acuerdo a su farmacocinética, tanto en el humano como en otras especies estudiadas, la absorción del clembuterol se da entre 15 y 45 min, los niveles plasmáticos máximos se alcanza en 2 h y se distribuye en la mayoría de los tejidos incluyendo la placenta.

Se elimina predominantemente por vía renal y tiene una vida media de tres a 6 h. Se elimina preferentemente como fármaco no metabolizado. El clembuterol tiene una toxicidad aguda de moderada a alta.

La DL50 es de 80-180 mg/kg. La administración de dosis mayores de 40 µg desencadena la sintomatología (Dirección General de Epidemiología).



**Figura 8** Clorhidrato de Clenbuterol comercializado por VENTIPULMIN®.

## Ractopamina

El clorhidrato de ractopamina es un derivado de la familia de los  $\beta$ -adrenérgicos que actúa incrementando el flujo sanguíneo, dando consigo una hipertrofia de las fibras musculares esqueléticas, un aumento de la síntesis proteica y una disminución en la degradación de la proteína muscular. Además, la ractopamina ejerce una activación directa para promover la hidrólisis de los triglicéridos y disminuir la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, lo que provoca una menor acumulación de grasa (*Figura 9*). Se usa principalmente en cerdos pero también se usa en el ganado bovino, no se tiene muchos estudios acerca de esta sustancia, pero en cerdos se recomienda una dosis de 5 a 10 ppm para aumentar la tasa de ganancia de peso y mejorar la eficiencia alimenticia, además de que aumenta el porcentaje de rendimiento de la canal e incrementa la carne magra (LAPISA).



**Figura 9** Clorhidrato de ractopamina comercializado por LAPISA®.

## Receptores $\beta$ -adrenérgicos

Los receptores  $\beta$ -adrenérgicos son proteínas conformadas por 450 a 600 aminoácidos y tienen un peso molecular de 40 a 50 kDa (Soria y Arias, 1997). Se conocen tres subtipos de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, los cuales son  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ . Drennan (1994) describió a los receptores  $\beta_1$  en el miocardio y los receptores  $\beta_2$  en el sistema nervioso central y en el conducto bronquial; Ganong (2001) indicó que ambos subtipos de receptores  $\beta$  incrementan el adenosin monofosfato cíclico (AMPc); estos receptores consisten en una proteína que atraviesa la membrana celular siete veces, formando tres asas intracelulares y tres extracelulares a los que se unen la adrenalina y la noradrenalina. En la mayor parte de las células de los mamíferos se han encontrado receptores  $\beta$ -adrenérgicos; sin embargo, su distribución y proporción varían de un tejido a otro, en cada especie animal (Mersmann, 1998). Por ejemplo, en ovinos los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  coexisten en el bíceps posterior del animal y en el área del músculo *Longissimus dorsi* (Ekpe *et al.*, 2000).

Un ejemplo de cómo actúa un receptor de la membrana celular, es la formación del complejo agonista-receptor  $\beta$ -adrenérgico (Figura 10), con la intervención de la proteína G (reguladora de nucleótidos de guanina) que activan la enzima adenilciclase (AC) y en consecuencia incrementa un segundo mensajero intracelular, el AMPc. Este actúa sobre un efector secundario llamado proteincinasa (PKA), el cual modifica el funcionamiento celular para generar otros efectos (Mersmann, 1998; Ferguson, 2001).

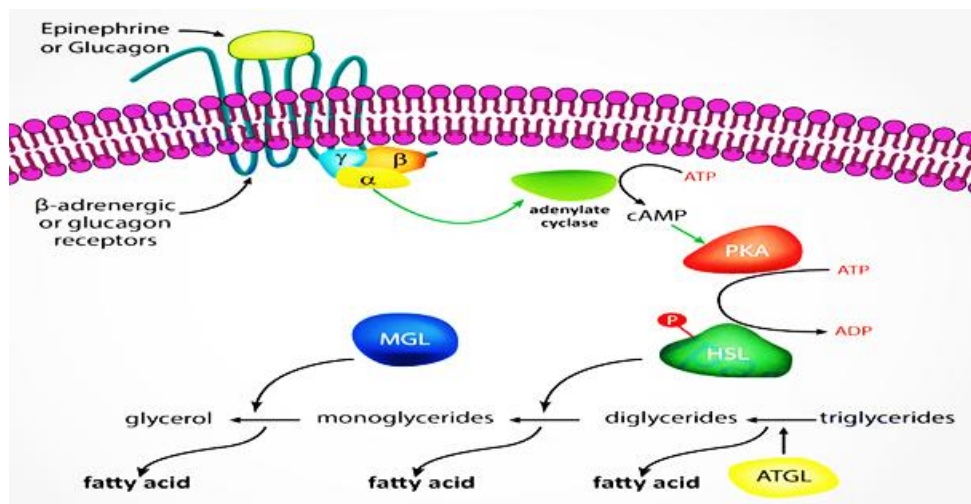


Figura 10 Activación de los receptores  $\beta$ AA mediante hormonas (Medical Biochemistry Page).

## Mecanismos de acción de los $\beta$ AA en el metabolismo

**Tejido adiposo.** Los  $\beta$ AA aumentan marcadamente el metabolismo degradativo de los lípidos en el adipocito, por lo tanto, impiden y reducen la deposición de grasa (Mersmann, 1998; 2002; Van Hoof *et al.*, 2005). La activación de los receptores  $\beta$ AA causa un aumento en el AMPc que activa a la proteincinasa A, la cual a su vez fosforila a la hormona sensible a la lipasa. La lipasa fosforilada es la forma activa que inicia la lipólisis (Mersmann, 2002).

Los ácidos grasos son producidos y exportados del adipocito para ser usados como fuentes oxidativas por otros tejidos. La síntesis de ácidos grasos y la esterificación de ácidos grasos dentro del triacilglicerol, que es la primera molécula energética almacenada en el adipocito, ambos procesos son inhibidas por los  $\beta$ AA. Por lo tanto, un aumento en el catabolismo (lipólisis) y una reducción en el anabolismo (lipogénesis) de los lípidos en el adipocito, conducirá a una hipertrofia reducida del adipocito y en consecuencia a una reducción del depósito de grasa en la canal (Smith, 1998; Mersmann, 1998). Sin embargo, se han indicado que algunos  $\beta$ AA en adipocitos en determinados animales no han tenido efecto alguno (Mills y Mersmann, 1995).

**Tejido muscular.** Los  $\beta$ AA aumentan la perfusión sanguínea hacia el músculo, así como una mayor disponibilidad de energía y aminoácidos, en consecuencia aumenta la síntesis y retención de proteína que favorece la hipertrofia muscular, principalmente de los músculos del cuarto trasero del animal (Li *et al.*, 2000; Ekpe *et al.*, 2000; Castellanos *et al.*, 2006).

En el músculo, además de la hipertrofia (*Figura 11*), ocurren cambios en el tipo de fibra muscular, también hay cambios en la proporción del ARN de transcripción para proteínas musculares como la miosina y actina (González, 2003)



**Figura 11** Hipertrofia muscular.

En ovinos y bovinos se ha observado que aumenta el peso de los músculos en 40%, y que la magnitud de la respuesta varía dependiendo del  $\beta$ AA suministrado, así como de la influencia de factores como la especie, la raza, la edad, el sexo y la dieta (Mersmann, 1998).

## **Efectos de los $\beta$ AA en el ganado (comportamiento productivo)**

En estudios realizados con ovinos alimentados con el  $\beta$ AA clorhidrato de zilpaterol (CZ) (López *et al.*, 2003; Anaya *et al.*, 2005; Salinas *et al.*, 2006; Mondragón, 2008), o con el protoplasma (Koochmaraie *et al.*, 1996) no se mejoró la respuesta productiva. En contraste, en un estudio en ovinos que recibieron CZ (Salinas *et al.*, 2004) se mejoró la ganancia de peso en 60%. También en bovinos se han observado efectos significativos sobre la ganancia de peso atribuible al CZ (Garza *et al.*, 1997; Garcés *et al.*, 1998; 1999; Castellanos *et al.*, 2006; Avendaño-Reyes *et al.*, 2006). En los años 60's se demostró que podía aumentarse la tasa de crecimiento animal al darle sustancias que promueven mayores concentraciones de AMPc en la célula, por ejemplo, cafeína, teofilina, nicotina y epinefrina.

Posteriormente, Domínguez-Vara *et al.* (2010) indicaron que podía manipularse el crecimiento animal con el uso de clenbuterol en la dieta. Mersmann (1998) señaló que determinados  $\beta$ AA no inducen el mismo efecto en todas las especies, debido posiblemente a que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos del tejido "blanco" no se activan adecuadamente, o bien, porque los mismos receptores se inactivan rápido; o tal vez porque algunas especies tienen un número limitado de estos receptores, lo cual disminuye la respuesta. Debido a estas variaciones, los efectos producidos en el metabolismo de los nutrientes por el suministro de un  $\beta$ AA son difíciles de comprender, pero se han aprovechado con fines prácticos en la producción animal (Domínguez-Vara *et al.*, 2010).

## **Características de la canal**

Los  $\beta$ AA disminuyen el contenido de grasa en la canal de ovinos y bovinos (Castellanos *et al.*, 2006). También se ha observado que aumenta el área del *Longissimus dorsi* en ovinos (Salinas *et al.*, 2004; Shackelford *et al.*, 1992; Mondragón, 2008) y bovinos (Garcés *et al.*, 1998; Avendaño-



Reyes *et al.*, 2006; Castellanos *et al.*, 2006); además, en bovinos y ovinos (Li *et al.*, 2000; Mondragón, 2008), aumenta la retención de proteína muscular. En la actualidad, estos efectos han tenido un impacto importante debido a la creciente demanda de carne magra por parte del consumidor, enfatizando en la composición de la canal con menos grasa, tanto intramuscular como de cobertura y mayor masa muscular (Nourozi *et al.*, 2005; Mohammadi *et al.*, 2006). Esto también se traduce en mayor beneficio económico (Cañeque y Sañudo, 2000). Sin embargo, en otros estudios, no se ha encontrado efecto alguno sobre la disminución de grasa en la canal de ovinos (Koochmaraie *et al.*, 1996) y en bovinos (Garza *et al.*, 1997; Zorrilla *et al.*, 1998); así como en el área del *Longissimus dorsi* y la retención de proteína muscular en ovinos (Salinas *et al.*, 2006).

## Calidad de la carne

Las características deseables o indeseables dependerán según el destino de la carne (López *et al.*, 2000). La carne requiere canales con determinado contenido de grasa, lo que no sucede con los cortes finos, por la preferencia de carne marmoleada o con determinado contenido de grasa intramuscular que le permita mantener buena textura, jugosidad y sabor; por lo que la calidad de la carne que se obtiene en términos de sus propiedades físicas y químicas al utilizar  $\beta$ AA, puede representar una oportunidad de mercado. Otra característica de la carne, es que le confiere buena aceptación por parte del consumidor, es su ternura (medida como la fuerza necesaria para cortarla). La ternura es considerada internacionalmente un parámetro fundamental de calidad porque incide directamente en el precio de venta de los diferentes cortes de una canal, de tal manera que aquellos cortes de mayor valor suelen ser los más tiernos y por ende la cocción es rápida (Bianchi *et al.*, 2004).

En ovinos, los  $\beta$ AA modifican la ternura de 10.9 a 8.2 kg por  $\text{cm}^2$  (Koochmaraie *et al.*, 1996), posiblemente porque en músculo hay mayor degradación proteica en los primeros 20 días *postmortem*; esto se debe a la actividad de las enzimas calpastatinas que inhiben a las proteasas, lo que a su vez impide la degradación de las proteínas musculares, dando como resultado una carne menos suave. Mondragón (2008) indicó que el zilpaterol aumentó el contenido de agua, proteína y la dureza del músculo *Longissimus dorsi* en la carne de ovinos con alimentación intensiva. En carne de bovinos tratados sin y con zilpaterol, (Avendaño-Reyes *et al.*, 2006) indicaron valores mayores ( $P < 0.05$ ) de fuerza de corte (4.39 de 5.11 kg por  $\text{cm}^2$ ), atribuible a que

probablemente se presenta poca actividad enzimática durante la congelación, con cierta actividad proteolítica y por lo tanto, mejor suavidad de la carne (Chacón, 2004). La ternera establecida por la industria cárnica ovina de Estados Unidos y Nueva Zelanda indica que para retener o acceder a nuevos mercados debe ser menor o igual a una fuerza de corte de 5 kg por cm<sup>2</sup> (Bickerstaffe, 1996). Referente a estudios sensoriales en la carne de rumiantes tratados con  $\beta$ AA hay poca información en México. Mondragón (2008) indicó que la barbacoa de ovinos en engorda tratados con zilpaterol no presentó diferencias en el estudio sensorial. En carne de cerdos tratados con ractopamina, tampoco se modificó la palatabilidad del músculo *Longissimus dorsi* (Stoller *et al.*, 2003).

## **Intoxicación por $\beta$ AA**

Información sobre efectos dañinos a la salud pública por el uso indebido de clenbuterol en Estados Unidos y la Unión Europea (Mitchell y Dunnavan, 1998), originaron su prohibición en casi todo el mundo. En México, en el periodo de 2002 a 2006 se registraron 192 brotes de intoxicación por clenbuterol, con un total de 1,300 casos; sin que hasta el momento se informen defunciones; los casos por estado fueron: Jalisco (625 casos), Ciudad de México (326 casos), Guanajuato (144 casos), Nayarit (45 casos), Hidalgo (43 casos). El alimento consumido por las personas estuvo implicado en la mayoría de los brotes en el 70% de los casos fue el consumo de hígado de res, dentro de un periodo de tiempo de 30 min a seis h posterior a la ingesta, presentaron dos o más de las siguientes manifestaciones: taquicardia, cefalea, palpitaciones, náuseas, ansiedad, angustia y malestar general (Vallejos *et al.*, 2007), con duración de 40 h en promedio (Serrano *et al.*, 2002). Para evitar intoxicaciones, los residuos de clenbuterol en productos animales no deben superar concentraciones de 0.5  $\mu$ g por kg en hígado y riñón, 0.1  $\mu$ g por kg en músculo y 0.05  $\mu$ g por L de leche, los cuales son los límites máximos de residuos recomendados por el Comité para Productos Medicinales Veterinarios de la Agencia Europea de Evaluación del Medicamento (Serrano *et al.*, 2002). En el caso del clorhidrato de zilpaterol, los límites máximos de residuos para los diferentes tejidos comestibles son: hígado y riñón 30, tejido adiposo 20 y músculo 1 ppb.

En el año 2000, la SAGARPA en el Estado de Jalisco, identificó reses cuya corpulencia no correspondía con el fenotipo de la raza equivalente; la misma dependencia en Querétaro, detectó la producción clandestina de clenbuterol. En el año 2001, se notificó un brote de intoxicación que

resultó positivo por esta sustancia en humanos asociado al consumo de hígado de res y otras vísceras.

En el caso de clorhidrato de zilpaterol y ractopamina, cuando se usan adecuadamente en la producción animal, no deben representar riesgo a la población que consume productos cárnicos de animales alimentados previamente con estos  $\beta$ AA; debido a sus propiedades químicas, estos compuestos se consideran de baja magnitud de riesgo asociado con el consumo de tejidos de animales tratados (Smith, 1998). No obstante, en diferentes trabajos realizados en ovinos y bovinos se reportan niveles de residuos variables. Sin embargo, los resultados obtenidos pueden diferir de acuerdo con el  $\beta$ AA empleado, dosis, unidad de producción y características de los animales empleados; por lo tanto, es necesario desarrollar más investigaciones para conocer los factores que originan esta variación, de tal manera que nos permitan fundamentar el uso de los  $\beta$ AA o su definitiva eliminación en la alimentación del ganado.

## **Legislación de los $\beta$ AA**

En México existe una legislación sobre el uso de  $\beta$ AA en productos alimenticios para consumo animal, está bajo la NOM-061-ZOO-1999. Especificaciones Zoosanitarias de los Productos Alimenticios para Consumo Animal.

Prohíbe el uso de ingredientes activos y/o aditivos alimenticios que comprobadamente puedan ser nocivos para la salud pública o represente riesgo zoonosario, el único  $\beta$ AA prohibido es el clenbuterol (*Tabla 5*).

En Estados Unidos, la FDA (Food and Drug Administration) establece mediante la FOIA (A Freedom of Information) un código NADA (New Animal Drug Application) para cada sustancia aplicada en veterinaria y animales destinados para consumo humano, así como el uso legal en ciertas especies, tratamientos y dosis recomendadas como seguras.

En tanto en la Unión Europea, la Directiva 96/22/CE del Consejo prohíbe de manera absoluta el uso de sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias  $\beta$ -agonistas (con excepciones terapéuticas).

**Tabla 5** Comparación normativa en diferentes países sobre el uso de  $\beta$ AA en animales.

| País          | Legislación  | Status  |
|---------------|--|---|
| México        | NOM-061-ZOO-1999   | No permite uso de <b>clenbuterol</b> y exime el uso de clorhidrato de <b>zilpaterol y clorhidrato de ractopamina</b> .  |
| EE.UU.        | Food and Drug Administration<br>Código FOIA (A Freedom of Information) | <p><b>Clenbuterol (140-973):</b> Uso aprobado sólo para tratamiento de EPOC (Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica) en caballos.</p> <p><b>Ractopamina (140-863):</b> Uso aprobado en aumento de tasa de peso y generación de carne magra.</p> <p><b>Zilpaterol (141-284):</b> Uso aprobado para aumentar la tasa de peso, mejorar la eficiencia de la alimentación del ganado y supresión del estro o calor (en etapa de celo) antes de los 20 a 40 días del sacrificio y en la alimentación</p> |
| Unión Europea | Directiva 96/22/CE del Consejo   | Todos los <b><math>\beta</math>-agonistas</b> son de uso ilegal   |

## II. Antecedentes

La carne es el producto más valioso que se puede extraer del ganado y se compone de proteínas y aminoácidos, minerales, grasas y ácidos grasos, vitaminas y de pequeñas cantidades de hidratos de carbono. Desde el punto de vista nutricional, la importancia de la carne se deriva de su contenido de proteína de alta calidad, que contienen todos los aminoácidos indispensables y minerales y vitaminas altamente biodisponibles. El consumo anual *per cápita* de carne se ha duplicado desde el año 1980 en los países en desarrollo debido al crecimiento de la población y de los ingresos económicos, junto con el cambio de las preferencias de alimentos, están aumentando la demanda de productos pecuarios. La FAO (Food and Agriculture Organization) estima que la producción mundial de carne se duplicará para el año 2050, la mayor parte de lo que se espera en los países en desarrollo. El mercado de la carne en crecimiento ofrece una importante oportunidad para los ganaderos y procesadores de carne en estos países, sin embargo, el aumento de la producción ganadera y el procesamiento seguro y la comercialización de la carne y sus productos con higiene representa un gran reto. En México, para poder satisfacer la demanda de carne de bovino permiten el uso de  $\beta$ AA en su legislación vigente para animales de ganadería destinados para el consumo humano (NOM-EM 015-ZOO-2002).

Las investigaciones sobre los  $\beta$ AA aplicados a los animales de ganadería, se han enfocado desde la perspectiva de la medicina veterinaria a partir de 1948 por el investigador Ahlquist, año en el que se iniciaron los estudios sobre la eficiencia y mecanismos de acción de los  $\beta$ AA y la clasificación de los receptores adrenérgicos  $\alpha$  y  $\beta$ . Desde 1980 se descubrió que el uso de  $\beta$ AA son promotores de crecimiento muscular, mejora el rendimiento de crecimiento en bovinos, mejora la eficiencia de la alimentación y el peso corporal final en el animal vivo (Montgomery *et al.*, 2009 a y b). En la década de los 90's se encontró que también incrementan el peso de la canal en bovinos y se genera carne magra, debido a que reduce la deposición de grasa en el músculo (Hilton *et al.*, 2009).

En Sudáfrica en el 2009, en el Animal Nutrition and Animal Products Institute, se llevó a cabo un estudio con bovinos de la raza Bonsmara y arrojó como resultados que la carne tratada con zilpaterol se obtiene con un menor contenido de grasa (magra) y se establece por primera vez que la terneza de la carne con zilpaterol y el envejecimiento está relacionado con la actividad de la calpastatina y fragmentación miofibrilar (Strydom *et al.*, 2009).

A partir del año 2006, en México, comienzan las investigaciones de los  $\beta$ AA en carne destinada para consumo humano. En la Universidad Nacional de Tamaulipas se realizó un estudio con peli buey (oveja doméstica) en el que se encontró que la carne que se produce, tienen un menor contenido de grasa en comparación a los animales que no se les suministró zilpaterol (Salinas-Chavira *et al.*, 2006). En este mismo año en la Universidad Autónoma de Baja California, trabajaron con bovinos de la raza Brangus y Charolais, en el cual no se encontró diferencia en el color de la carne de los animales que fueron suministrados con y sin zilpaterol y la suavidad se clasificó como “media” en los animales que se trataron con este  $\beta$ AA (Avendaño-Reyes *et al.*, 2006).

En el año 2010, en la Facultad de Veterinaria de la UNAM, se demostró que el uso de zilpaterol y ractopamina inducen cambios en el metabolismo de las fibras tipo I (contracción lenta) y las fibras tipo IIa y IIb (contracción rápida) (Pérez, 2010). En la Universidad del Estado de Colorado en el 2014, se demostró en ganado bovino Continental Steers, además de generar un aumento muscular en la zona de las costillas (*Longissimus dorsi*), también se observó un aumento muscular en la zona de piernas traseras y el lomo (Arp *et al.*, 2014).

Hasta el momento no existen precedentes internacionales y tampoco en México de como el uso de  $\beta$ AA como el zilpaterol afecta la actividad enzimática endógena bajo condiciones de maduración húmeda y seca. Por todo lo anterior, en el presente trabajo pretende comparar si el uso de clorhidrato de zilpaterol y el tipo de maduración afecta al pH de la carne, y disminuye o aumenta la actividad proteolítica endógena.

### **III. Hipótesis**

Las muestras de carne con zilpaterol y maduras en húmedo, tendrán una mayor actividad enzimática debido a que aumentan las proteínas musculares y aumentan la cantidad de enzimas endógenas.

### **IV Objetivos**

#### **4.1 Objetivo general**

- Evaluar la actividad enzimática endógena de proteasas ácidas y alcalinas de muestras de carne con y sin zilpaterol bajo diferentes tipos y tiempos de maduración.

#### **4.2 Objetivos particulares**

- Evaluar el efecto de la presencia y ausencia del zilpaterol en el pH de la carne.
- Determinar la actividad enzimática de proteasas que participan en el proceso de maduración para los diferentes tipos y tiempos de maduración y tratamientos con y sin zilpaterol.
- Comparar el perfil de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas para los diferentes tipos y tiempos de maduración mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizante (SDS-PAGE).
- Encontrar las condiciones adecuadas para observar la presencia de actividad de proteasas neutras y ácidas en zimogramas en sustrato caseína y gelatina.

## V. Metodología

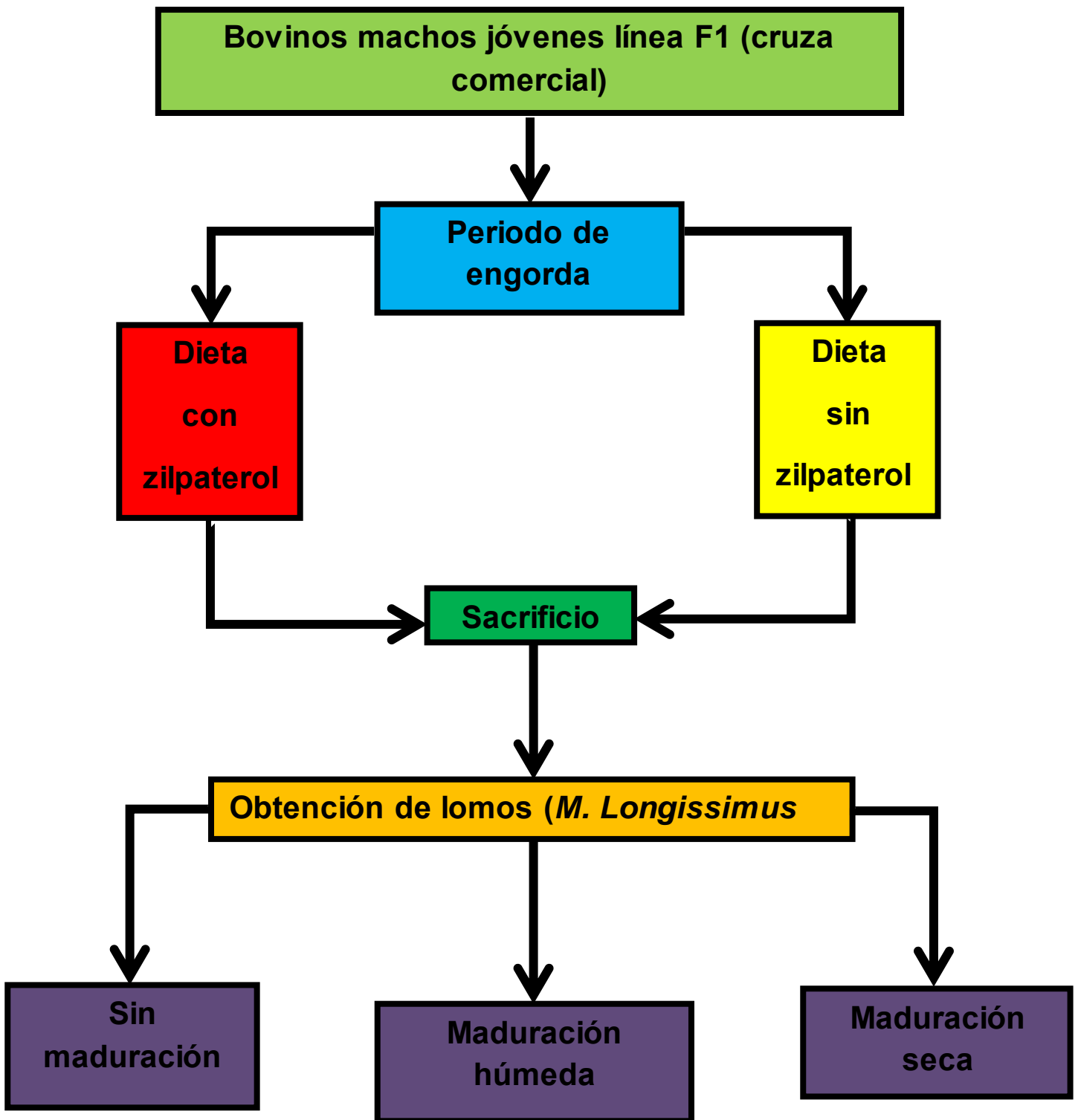


Figura 12 Obtención de la muestras de bovino



## 5.1 Obtención de las muestras de carne

Se trabajó con la zona *M. Longissimus dorsi* de canales de bovino procedentes de machos enteros jóvenes, línea F1 (cruza comercial) de características fenotípicas similares, con un periodo de engorda de 80 a 100 días y a los cuales se les suministró una dieta con y sin zilpaterol.

Los animales fueron plenamente identificados con sistema de marcado y fotografía individual. Además los animales con y sin zilpaterol fueron separados por tratamientos en diferentes corrales antes de iniciar el experimento. El sacrificio se llevó en un rastro Tipo Inspección Federal (TIF), una vez que se obtuvieron las canales identificadas se mantuvieron en refrigeración entre 2 y 4°C durante 24 h, transcurrido este tiempo se obtuvieron 6 lomos (de la doceava vertebra torácica a la séptima lumbar) de la media canal derecha y 6 de la media canal izquierda, tanto del grupo de animales con el tratamiento con zilpaterol y del grupo de animales sin zilpaterol para obtener un total 12 lomos de cada tratamiento.

## 5.2 Tratamiento de maduración

La maduración en seco, se realizó colocando los cortes sin ningún tipo de cobertura sobre rejillas dentro de un madurador, con un 50-55% de humedad y una temperatura de entre 2-4°C durante 21 días.

En tanto, la maduración en húmedo se realizó empacando los cortes al vacío y manteniendo sobre rejillas dentro de un madurador con un 50-55% de humedad y una temperatura de entre 2 y 4°C durante 21 días.

Los días de muestreo fueron: día 0 (día que se obtuvo en el sacrificio), día 1 (se considera que no hay efecto en la maduración) y día 3, 7, 14 y 21 (los cuales se considera que hay efecto en las proteasas para las condiciones de maduración).

Las muestras de carne llegaron al laboratorio S-132 del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, en envases isotérmicos y empacados al vacío, en hieleras con geles refrigerantes para realizar diferentes determinaciones.

### **5.3 Medición de pH**

Se analizó mediante la inserción de un electrodo de penetración (Orion®, Thermoscientific), la determinación se realizó por triplicado en diferentes zonas de la carne. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y un análisis de diferencias (Duncan) en SAS® (Statistical Analysis System).

### **5.4 Extracción de proteínas miofibrilares**

Las muestras se homogenizaron durante 2 min con hielo y agua desionizada en proporciones 10 g carne/10 g hielo/10 mL agua. La mezcla anterior se homogenizó (Ultra-Turrax T18 Basic®) durante 10 min, posteriormente se filtró 2 veces con gasa y al filtrado se le adicionaron 30 mL de agua desionizada a 4°C y se agitó durante 10 min. Las muestras se centrifugaron a 4,000 rpm durante 15 min a 4°C (Eppendorf 5810R). El sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en una solución amortiguadora que contenía: fosfato de sodio 50 mM pH 7 y NaCl 0.6 M. El extracto de proteínas miofibrilares se colocó en un tubo de plástico (para cada una de las muestras, a diferentes tiempos y condiciones de maduración) y se almacenó a -20°C (García-Barrientos, 2007).

### **5.5 Extracción de proteínas sarcoplásmicas**

Se tomó una muestra de 4 g de carne, se homogenizó con 8 mL de amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7 y 0.9% NaCl. Enseguida se centrifugó durante 30 min a 4,000 rpm (Eppendorf 5410R), se recuperó el sobrenadante en un tubo de plástico y se almacenó a -80°C (Rodríguez, 2012).

### **5.6 Determinación de la concentración de proteína**

Se determinó la concentración de proteína de cada fracción mediante la técnica de Bradford (Hyung-Keun *et al.*, 2012) para el extracto de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas. En una microplaca se colocaron 10 µL del extracto de proteína, 150 µL de cada uno de los amortiguadores en los que se encontraban resuspendidas las proteínas (fosfatos 50 mM para proteínas miofibrilares y fosfatos 20 mM para sarcoplásmicas) y 40 µL de reactivo de Bradford.

Para el blanco, se colocaron 10  $\mu$ L de cada uno de los amortiguadores en lugar de muestra de proteína y posteriormente se homogenizó cada reacción y se dejó reposar durante 5 min. La absorbancia se midió a 595 nm (biofotómetro Synergy™ HT®). Se realizaron por triplicado las determinaciones. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y Análisis de diferencias (Duncan) en SAS®. Se utilizó albúmina sérica bovina para la realización de la curva estándar.

## **5.7 Perfil de proteínas: electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS - PAGE)**

Esta técnica se realizó en condiciones desnaturizantes usando SDS al 10% en un gel concentrador y un gel separador de poliacrilamida al 10% de concentración. Para la realización de los geles se siguió las instrucciones descritas por el proveedor (Bio-Rad).

La muestra se preparó de la siguiente manera: en un tubo de plástico de 0.6 mL, se mezclaron 10  $\mu$ L de amortiguador de carga (SDS 10%, 49.5% de glicerol, 25.2% de una solución buffer Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 11.7% agua desionizada, 3.6% de azul de bromofenol y 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol) con 25  $\mu$ L de cada una de las muestras se tomaron 30  $\mu$ L de esta mezcla y se colocaron en el gel de poliacrilamida. Para cada gel se colocaron 5  $\mu$ L de marcador de alto peso molecular (Bio-Rad). La electroforesis se llevó a cabo en una cámara electroforética Mini-Protean™ (Bio-Rad) en una solución 1X (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y SDS 1%) durante 30 min a 80 V y posteriormente a 120 V durante 1 h.

Terminada la electroforesis se enjuagó el gel en agua desionizada, se tiñó durante 12 h en una solución de azul de Coomassie (azul de Coomassie G-250 1.17 mM, 45% v/v de metanol, 45% v/v agua y 10% v/v ácido acético glacial) y se destiñó en una solución que contenía 10% metanol, 10% ácido acético y 80% agua, durante un día (González, 2003). Finalmente el gel se analizó en el equipo Molecular Imager Gel Doc™ (Bio-Rad).

## **5.8 Zimogramas**

Esta técnica se llevó a cabo en condiciones no desnaturizantes, en un gel concentrador y separador de poliacrilamida al 10% de concentración, con 1% caseína y 1% gelatina. Se siguieron

las mismas condiciones de la electroforesis desnaturalizante, sólo que se utilizó un amortiguador de carga sin  $\beta$ -mercaptoetanol. Al terminar la electroforesis se lavó el gel con agua desionizada, se colocó durante 30 min en solución Tritón X-100 2.5%, y se incubó durante 12 h a 37°C en una solución de renaturalización (50 mM Tris-HCl, CaCl<sub>2</sub> 50 mM, NaCl 200 mM, pH 7.6). Finalmente el gel se enjuagó con agua desionizada, se tiñó con azul de Coomassie durante 12 h, se destiñó y se analizó en el documentador de geles (Casales, 2012).

## **5.9 Determinación de proteasas ácidas y neutras**

Para proteasas ácidas (reacción de Anson) se tomaron 600  $\mu$ L del sustrato hemoglobina 1% p/v en un amortiguador universal a pH 5 (0.025 M ácido bórico, 0.025 M ácido fosfórico y 0.025 M ácido acético) y se colocaron en tubos de plástico el cual se incubó durante 10 min a 37°C, posteriormente se adicionaron 150  $\mu$ L del extracto de proteínas sarcoplásmicas y se incubaron por 15 min a 37°C. La reacción se detuvo con 150  $\mu$ L ácido tricloroacético al 50% p/v. La mezcla se incubó durante 10 min a 4°C en hielo, posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm a temperatura ambiente por 15 min. Se tomaron 200  $\mu$ L del sobrenadante y se colocaron en una microplaca de 96 pozos. Se midió la absorbancia en un lector de placas a 280 nm. El blanco de la reacción consistió en sustituir el extracto de proteína sarcoplásmica por amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 6 y 0.9% NaCl. Para cada una de las muestras se realizó un blanco de muestra, en el cual al sustrato se le adicionó ácido tricloroacético, posteriormente se incubó a 37°C por 10 min, se añadió el extracto de proteína sarcoplásmica y se centrifugó a 14,000 rpm (Ruiz, 2013).

Para las proteasas neutras (Reacción de Kunitz) se realizó la metodología descrita anteriormente; sin embargo, se usó caseína al 1% p/v como sustrato en un amortiguador de fosfato de sodio a pH 7 (Rodríguez, 2012). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y análisis de diferencias (Duncan) en SAS®.

## **5.10 Actividad gelanolítica**

La actividad sobre la gelatina se determinó con la gelatina succinilada (con anhídrido succínico) en una concentración de 200  $\mu$ g/mL. La gelatina succinilada se preparó de acuerdo a la técnica descrita por Cruz, (2011). En 10 mL de buffer de borato de sodio 50 mM pH 8.5 se disolvieron 200

mg de gelatina, a la cual se le adiciona poco a poco la misma cantidad de anhídrido succínico, manteniendo el pH entre 8.0-8.5 con solución de NaOH.

La solución anterior se colocó en una membrana de diálisis Spectra/Por7® de 1 kDa y se colocó en una solución de borato de sodio 50 mM pH 8.5, en con agitación constante durante 12 h a temperatura ambiente. Posteriormente a la diálisis, la gelatina succinilada se colocó en un tubo de plástico para su mantenimiento a una temperatura de 4°C. Por último se realizó una cuantificación de la concentración de proteína de la gelatina succinilada mediante la técnica descrita por Bradford. Para la determinación de la actividad, en una microplaca se mezclaron 100 µL de buffer de boratos 50 mM a pH 8.5, después se colocaron 30 µL la muestra de extracto de proteínas sarcoplásmicas y por último 20 µL de gelatina succinilada. Inmediatamente se mezcla con un agitador y se incubó durante 10 min a 37°C. Una vez transcurrido dicho tiempo se agregaron 50 µL de una solución de TNBS (ácido 2, 4, 6- trinitrobenzen sulfónico) al 0.03% se incubó a temperatura ambiente por 20 min (Baragi *et al.*, 2000). Se colocó un blanco de reacción con 130 µL de buffer de boratos 50 mM a pH 8.53 y 20 µL de gelatina succinilada. La absorbancias de cada reacción se midió en un lector de placas a 450 nm. Se realizó triplicado de cada medición. La determinación se llevó a cabo en el orden indicado para evitar que la reacción inicie antes de la incubación a 37°C. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y análisis de diferencias (Duncan) en SAS®.

## VI. Resultados y discusión

### 6.1 Toma de muestra y recepción

El músculo *M. Longissimus dorsi* se utilizó ya que posee una mayor cantidad de receptores  $\beta 1$  adrenérgicos y  $\beta 2$  adrenérgicos, responsables de la lipólisis del tejido adiposo y aumento de la masa del músculo estriado respectivamente.

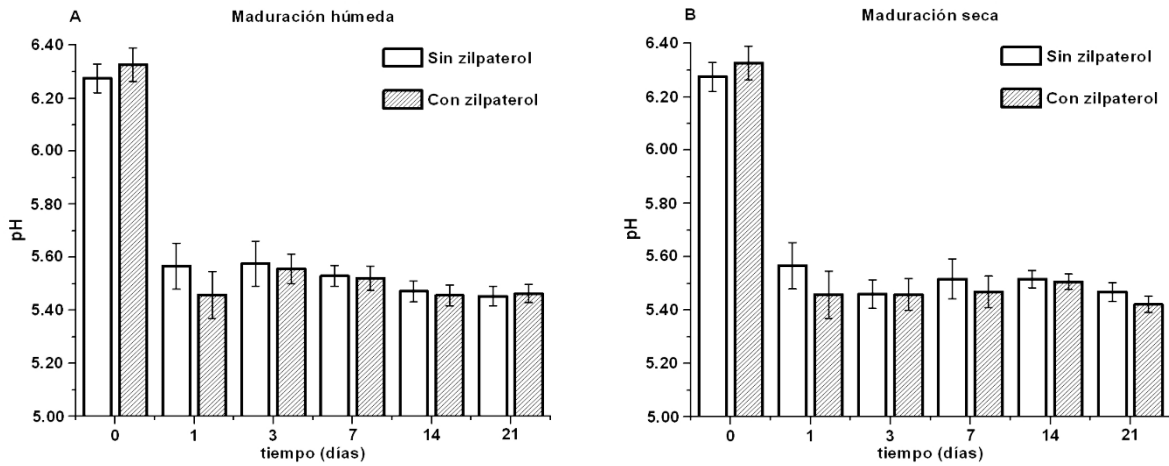
Las muestras se recibieron selladas al vacío en un envase isotérmico a una temperatura de 4°C y no tuvieron contacto con el medio ambiente.

### 6.2 pH

La medición de pH se realizó mediante un electrodo de penetración, el cual se introdujo en zonas diferentes de la muestra de carne para obtener una media de esta variable y promediar con las 6 muestras de carne por tratamiento y maduración. Los valores los podemos observar en el “Apéndice” al final del presente trabajo en la *Tabla 1* la cual nos permite hacer una correlación de la actividad proteolítica en función del pH, conforme a los días de maduración y al tipo de tratamiento (con y sin zilpaterol).

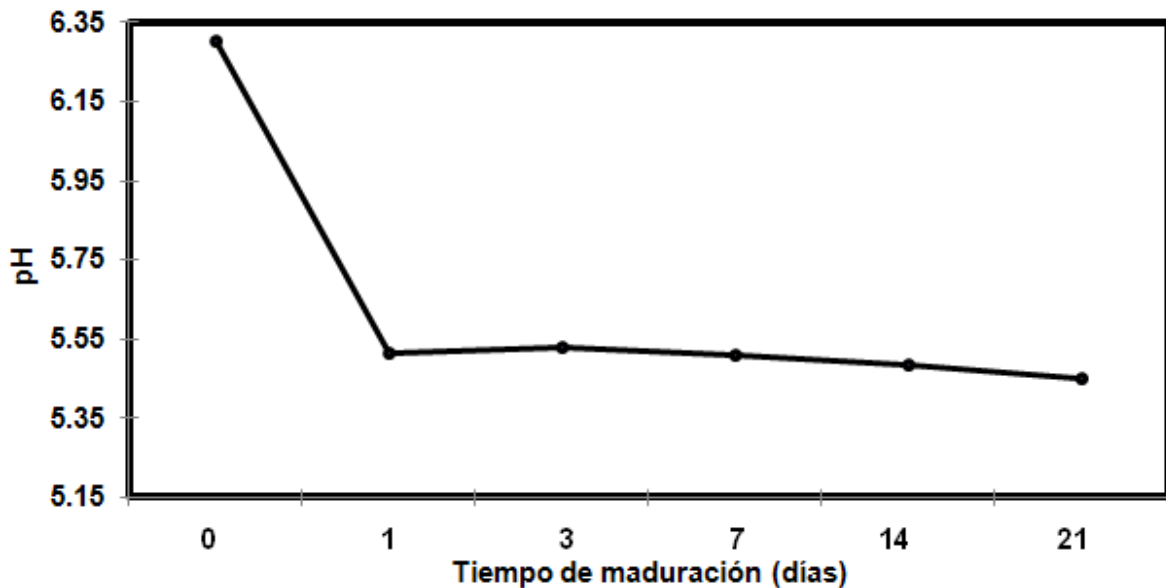
Podemos observar que los valores más altos registrados se encontraron para el día 0 tanto para las muestras con zilpaterol (6.33) y sin zilpaterol (6.28), mientras que los valores más bajos se presentaron para el día 21 tanto para los dos tratamientos y tipos de maduración.

También podemos contemplar que para los dos tratamientos y en las dos condiciones de maduración existen ligeras variaciones de pH entre los días 3 al 21. Para las muestras sin zilpaterol y maduración en húmedo hay un aumento de 5.57 a 5.64 y en la maduración en seco el aumento ocurre de 5.46 a 5.52 hasta el día 7 con respecto al día 3. En las muestras con zilpaterol y maduración en húmedo ocurre un aumento en el pH del día 1 al 3 de 5.46 a 5.57; y las muestras en maduración en seco el aumento ocurre del día 7 al 14 de un pH de 5.47 a 5.51, este comportamiento lo podemos observar en la *Figura 13*.



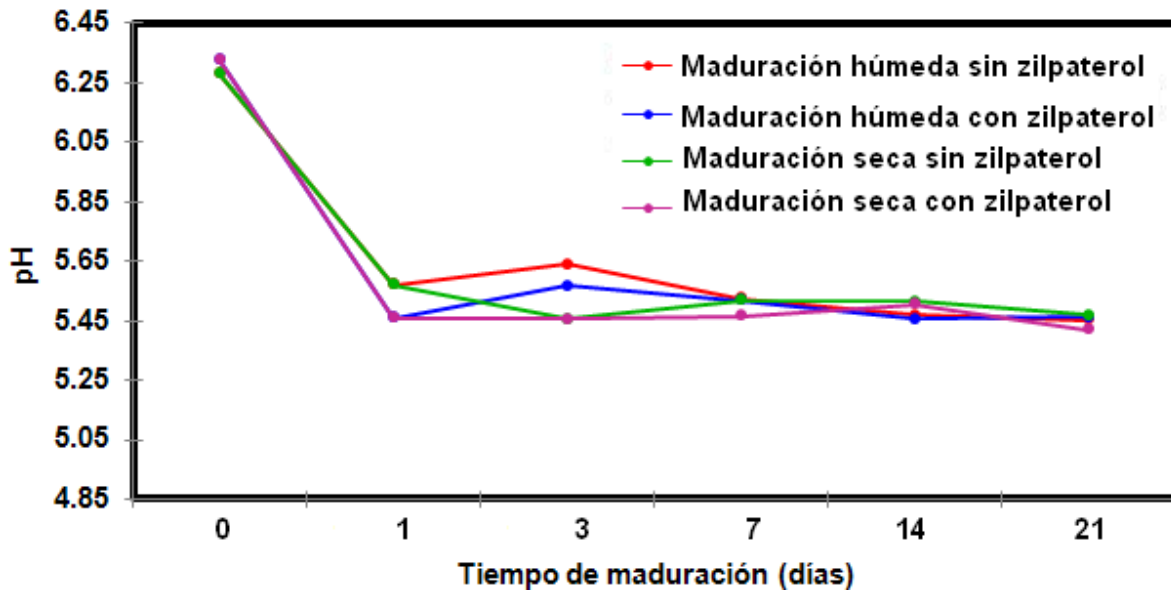
**Figura 13** Promedio de pH ( $\bar{x}$ ) contra tiempo de muestreo. **(A)** Condiciones de maduración húmeda y **(B)** condiciones de maduración seca.

De manera general podemos observar en la *Figura 14*, que independientemente del tratamiento y del tipo de maduración se registra una tendencia de una disminución de los valores de pH conforme pasa el tiempo de maduración, generando un ligero aumento de pH debido a las reacciones ácido-base entre carbonatos, fosfatos y proteínas intramusculares y que generan un sistema de amortiguamiento, en la cual a partir del día 7 es sobrepasado por la generación de iones  $H^+$  provenientes del ácido láctico.



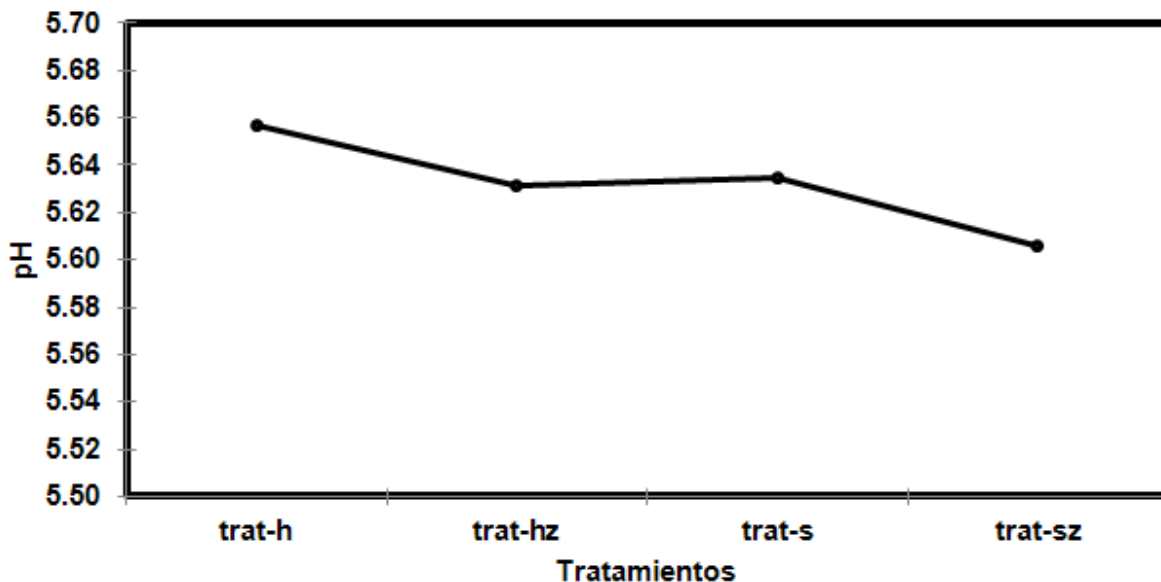
**Figura 14** Promedio general de pH contra tiempo de maduración. \* Para los días 0 y 1 promedio de 12 muestras de carne y para los días 3, 7, 14 y 21 promedio de 24 muestras de carne (con zilpaterol y sin zilpaterol).

De manera más detallada observamos en la *Figura 15*, la tendencia de pH es la misma que anteriormente se describió, pero en la maduración húmeda el descenso de pH es más lento conforme al tiempo en comparación de las muestras en maduración en seco debido a que estas muestras pierden agua por lo que concentran los iones  $H^+$ .



**Figura 15** Valores promedio de pH ( $x$ ) contra tiempo de maduración para cada tratamiento.

En cuanto a los tratamientos en la *Figura 16*, las medias nos indican de manera más clara que los tratamientos en maduración en seco disminuyen el pH de manera rápida debido a esa concentración de iones  $H^+$  a comparación de las muestras en húmedo, esto solo para las muestras de los días 3, 7, 14 y 21.

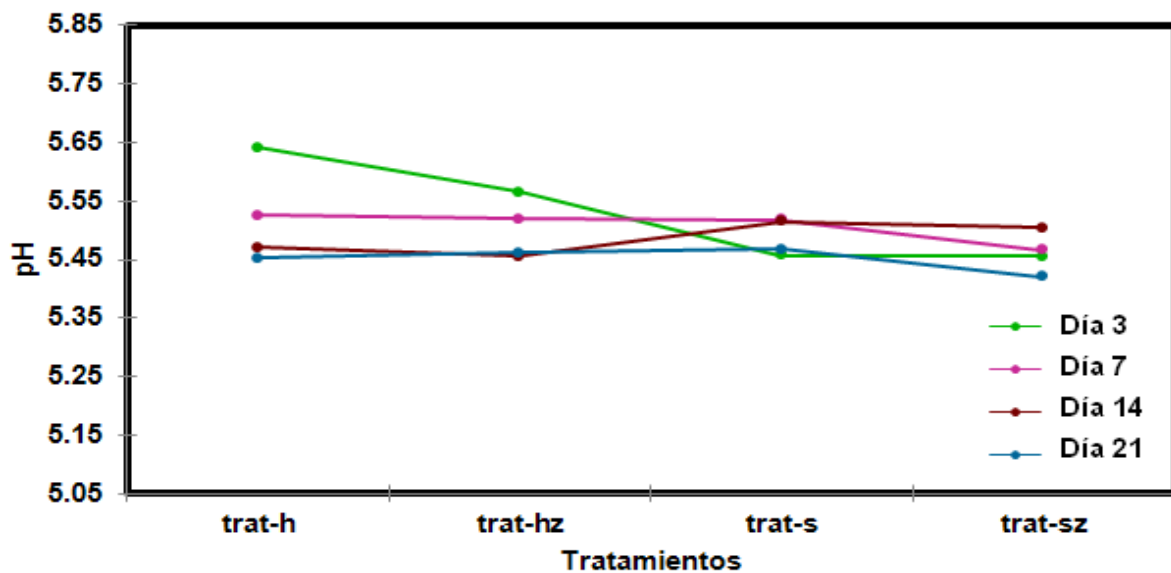


**Figura 16** Promedio total de la suma de promedios de pH ( $x$ ) de los días 3, 7, 14 y 21 contra tratamientos. \* trat-h: maduración húmeda sin zilpaterol; trat-hz: maduración húmeda con zilpaterol; trat-s: maduración seca sin zilpaterol; trat-sz: maduración seca con zilpaterol.



Por otro lado como se verá más adelante, las muestras con zilpaterol tienen un mayor contenido de proteína y como lo establece Lean *et.*, 2014, en el cual demostró que el volumen de músculo permite una mayor cantidad de producción de ácido láctico y por consecuencia que el pH disminuya.

Por último, la *Figura 17* nos detalla a los diferentes tiempos como disminuye el pH para cada uno de los diferentes tratamientos y condiciones de maduración, pero se observa que para el día 3 al 21 el pH oscila entre 5.4-5.65, excluyendo los días 0 y 1 por no estar en condiciones de maduración.



**Figura 17** Valores promedio de **pH** de 6 muestras de carne contra tratamientos para los diferentes tiempos de maduración. \* trat-h: maduración húmeda sin zilpaterol; trat-hz: maduración húmeda con zilpaterol; trat-s: maduración seca sin zilpaterol; trat-sz: maduración seca con zilpaterol.

De acuerdo a la literatura (con respecto a todo tipo de carne de bovinos), después del sacrificio del animal durante las primeras 10-12 h del faenado, la canal se encuentra en la etapa de *rigor mortis*. Esta etapa se caracteriza por la falta de regulación nerviosa y hormonal, también por la falta de nutrientes, la alteración del equilibrio osmótico y la falta de aporte de oxígeno la cual se ve reflejada en la baja disponibilidad de ATP y al mismo tiempo que descienda el pH debido a la acumulación del ácido láctico que proviene de las reservas de glucógeno del animal (Gigena, 2008).

El pH del tejido es de 7.0-7.2 y en la etapa del *rigor* desciende hasta 6.1-6.4 (Boles y Pegg, 2011), este descenso no es tan drástico debido a la permeabilidad de la membrana celular que mantiene en equilibrio de los iones  $H^+$ , este procesos se conoce como osmorregulación y está activo en esta

etapa. Posteriormente los tejidos entran a la etapa de *post rigor*, la cual tienen una duración de 24 h y donde se alcanza un pH final de 5.4-5.5 debido a la transformación del músculo a carne a consecuencia del proceso de maduración que realizan enzimas proteolíticas (proteasas neutras y proteasas ácidas) que generan ruptura de las proteínas estructurales (miofibrilares) y generan procesos oxidativos, la cinética de estas reacciones enzimáticas se ven favorecidas debido a colapso de la osmorregulación, a la poca resistencia que presenta la membrana celular (nula permeabilidad) lo que genera un incremento de estas reacciones que liberan iones  $H^+$  al medio.

Para el día 1 pasaron aproximadamente 24 h después del sacrificio, el pH descendió a 5.57 por lo que las muestras se encontraban en el inicio de la etapa *post rigor*. Este descenso de pH se debe a que la membrana celular pierde resistencia a la permeabilidad de los iones  $H^+$ , por lo que ya no es capaz de mantener el proceso de osmorregulación debido a la conversión del glucógeno a ácido láctico

En la maduración húmeda para las muestras sin zilpaterol, se observa en el día 3 ocurre un aumento de pH a 5.64, se debe probablemente varios fenómenos uno es cuando el ácido láctico está a nivel intracelular ocurre una neutralización principalmente por bicarbonato, fosfatos y proteínas intramusculares con residuos de glutamina.

Por otro lado, en la maduración en seco (tratamiento sin zilpaterol) para el día 3, ocurre una disminución de pH a 5.46, para el día 7 hay un aumento a 5.52 y se mantiene para el día 14 y en el día 21 disminuye a 5.47. Aquí también se puede interpretar que la reserva de glucógeno se transformó a ácido láctico hasta agotarse en el día 3, para el día 7 y 14 ocurrieron reacciones ácido-base y de trans y desaminación que incrementaron ligeramente el pH en la carne y por último el descenso en el día 21 ocurre por los procesos oxidativos que acidifican el medio.

Existe una diferencia tanto en los valores obtenidos de pH, así como el comportamiento de estos a través de los 21 días y esto se debe a la maduración.

Como ya se había mencionado las condiciones de maduración son diferentes, en el caso de la maduración en húmedo las muestras se colocan en envases lo que permite que no haya pérdida de agua en la carne y mantenga las condiciones idóneas para llevarse a cabo todas las reacciones anteriormente descritas (transformación de glucógeno, proteólisis, reacciones ácido-base, reacciones de trans y desaminación y procesos oxidativos) a diferencia de la maduración en seco que la pierde gradualmente con el paso del tiempo.

En contraste, la maduración en seco al tener una pérdida gradual de agua en la carne, las reacciones enzimáticas y químicas son menos favorecidas, por lo que las variaciones de pH son mínimas. Esto se puede observar que para el día 3 en la maduración en húmedo hay un ligero aumento de pH mientras que en la seca el aumento es hasta el día 7 y permanece hasta el día 14. El descenso de pH en la húmeda ocurre en el día 7 a diferencia de la maduración en seco que se presenta hasta el día 21, debido a estas diferentes condiciones que afectan la cinética de las reacciones químicas y biológicas.

Una mayor cantidad de agua ( $A_w$ ) en la maduración en húmedo favorece la cinética de la transformación del glucógeno a ácido láctico, así como las reacciones de proteólisis que degradan las proteínas miofibrilares de la carne, las reacciones de trans y desaminación, por lo que la maduración es más rápida en húmedo que en seco por la disponibilidad constante de agua. Por lo que las reacciones ocurren más rápido en la maduración en húmedo que en la seca.

Debido a esto, no es válido hacer un análisis en forma directa (es decir día con día) ya que las condiciones de maduración son diferentes y por ende las cinéticas de las reacciones se llevan a diferentes tiempos.

Se puede realizar una comparación de valores de pH a las diferentes condiciones de maduración, ya que en la maduración en húmedo se registran valores altos en comparación a la maduración en seco. Se esperaría que los valores en húmedo fueran más bajos por las condiciones ideales para las reacciones, pero se observa lo contrario. La pérdida gradual de agua en las muestras de carne genera un efecto de concentración de iones  $H^+$  y al tener una menor cantidad de agua se presentan condiciones ligeramente ácidas en la carne en seco.

Entre los diferentes tratamientos de la carne, en el día 0 con zilpaterol presenta un valor mayor que las muestras sin zilpaterol debido a que estas muestras contienen una mayor proporción de masa muscular y esto se ve reflejado en una mayor cantidad de proteína, así como mayor volumen de reserva de glucógeno que se transforma a ácido láctico y disminuye el pH más rápido.

Mediante un análisis de varianza elaborado en el software SAS® (*Tabla VII*) y excluyendo valores del día 0 y 1 debido a que se busca evidencia estadística entre la interacción de tratamiento, maduración y tiempo de la misma, ya que la muestra 0 no se considera carne sino músculo y para la muestra del día se considera que esta en la etapa de *rigor mortis* y esto es para todo los análisis estadísticos mostrado en el presente trabajo.

Este análisis de varianza indica que se obtuvo una  $r^2$  de 0.812 lo cual no es muy lineal debido a esas variaciones de aumento y disminución de pH desde el día 3 al 21 en ambos tratamientos y tipo de maduración. Y mediante el análisis de Duncan (*Tabla VIII*) establece que no hay diferencia en los valores de pH entre tratamientos y tipo de maduración, lo cual indica que estos cambios no son significativos.

### **6.3 Extracción de proteínas**

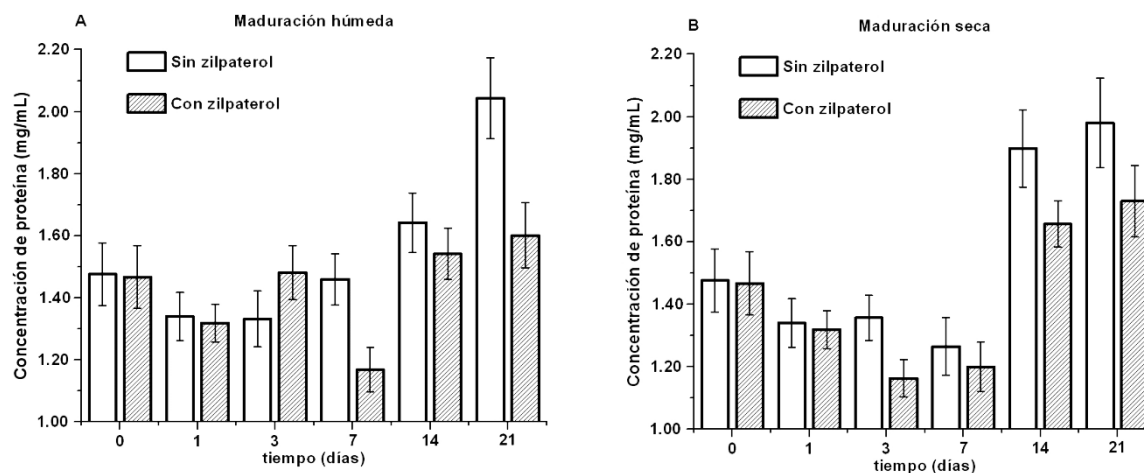
Las proteínas miofibrilares tienen una estructura fibrosa, debido a su configuración de cadenas laterales que son hidrofóbicas y por ende son insolubles en agua. Por lo que para mantener su estabilidad para las posteriores determinaciones, las proteínas miofibrilares se colocaron en una solución amortiguadora de fosfato de sodio 50 mM pH 7 y NaCl 0.6 M. El amortiguador tiene la función de mantener el pH aproximadamente a 7 y no alterar la estructura de las proteínas y para no favorecer la desnaturalización. El adicionar cloruro de sodio favorece en la solubilidad de las proteínas miofibrilares, la solubilidad no es total sino parcial debido a la cadena hidrofóbicas que presentan este tipo de proteínas. Las proteínas sarcoplásmicas al ser endocelulares e hidrosolubles, constituyen una masa fluida que rodea a las proteínas miofibrilares (González, 2003). Se utilizó una solución amortiguadora de fosfatos 20 mM, pH 7 y 0.9% NaCl con el propósito de estabilizar y evitar que exista una variación de pH que afecte su estructura nativa.

### **6.4 Proteínas miofibrilares**

#### **6.4.1 Cuantificación de proteínas**

La cuantificación de proteína miofibrilar se realizó mediante el ensayo de Bradford. En la *Tabla II* se puede observar los valores obtenidos desde el día 0 hasta el día 21 para los tratamientos con zilpaterol y sin zilpaterol.

En la *Figura 18* podemos observar que también se presenta este mismo efecto de aumento y disminución de concentración de proteína miofibrilar como los valores obtenidos de pH. Además de notar que los valores de concentración del tratamiento sin zilpaterol son mayores que las fueron tratadas con zilpaterol.



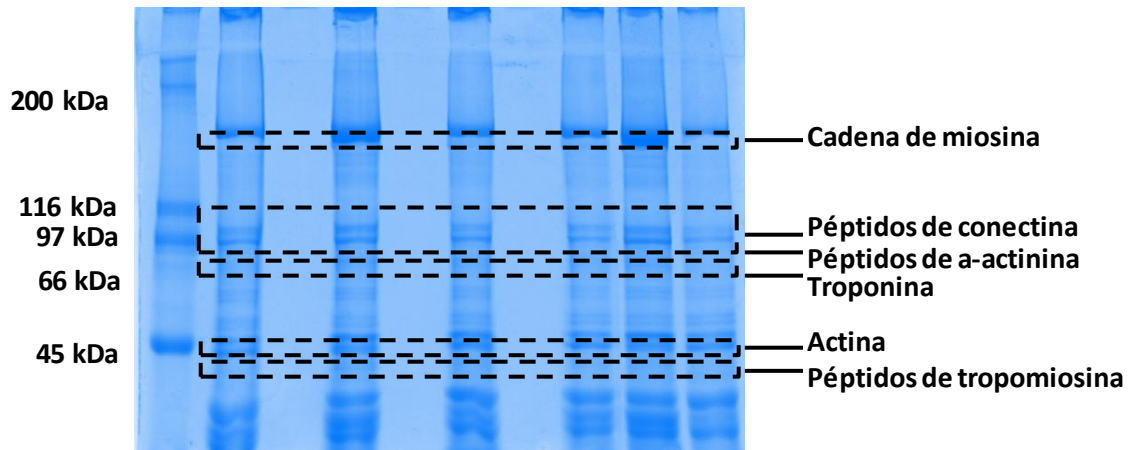
**Figura 18** Promedio ( $\bar{x}$ ) de **concentración de proteínas miofibrilares** (mg/mL) contra tiempos de muestreo. **(A)** Condiciones de maduración húmeda y **(B)** condiciones de maduración seca.

Este aumento de concentración de proteína se origina de la proteólisis endógena de la carne, particularmente proteasa neutras (calpaína) y proteasas ácidas (catepsina) y que más adelante se detallaran. Para las muestras en maduración en húmedo la concentración es mayor debido a las condiciones de maduración, ya que las muestras se colocaron en bolsas selladas al vacío por lo que no hay pérdida de agua y las enzimas tienen un medio favorable para realizar su catálisis en el sustrato (proteínas miofibrilares) ya que la temperatura es de 0-1°C y el agua está disponible para llevar reacciones de todo tipo, en cambio la maduración en seca no se sellan al vacío, se mantiene a la misma temperatura que la húmeda pero hay una ligera pérdida de agua lo cual limita que la actividad enzimática sea más lenta (Parrish, 2008).

#### 6.4.2 Perfil de proteínas por SDS-PAGE

El perfil proteico se realizó con una electroforesis en condiciones desnaturizantes con SDS (dodecilsulfato sódico) para dar una carga negativa a las proteínas y separar solo por tamaño y peso molecular.

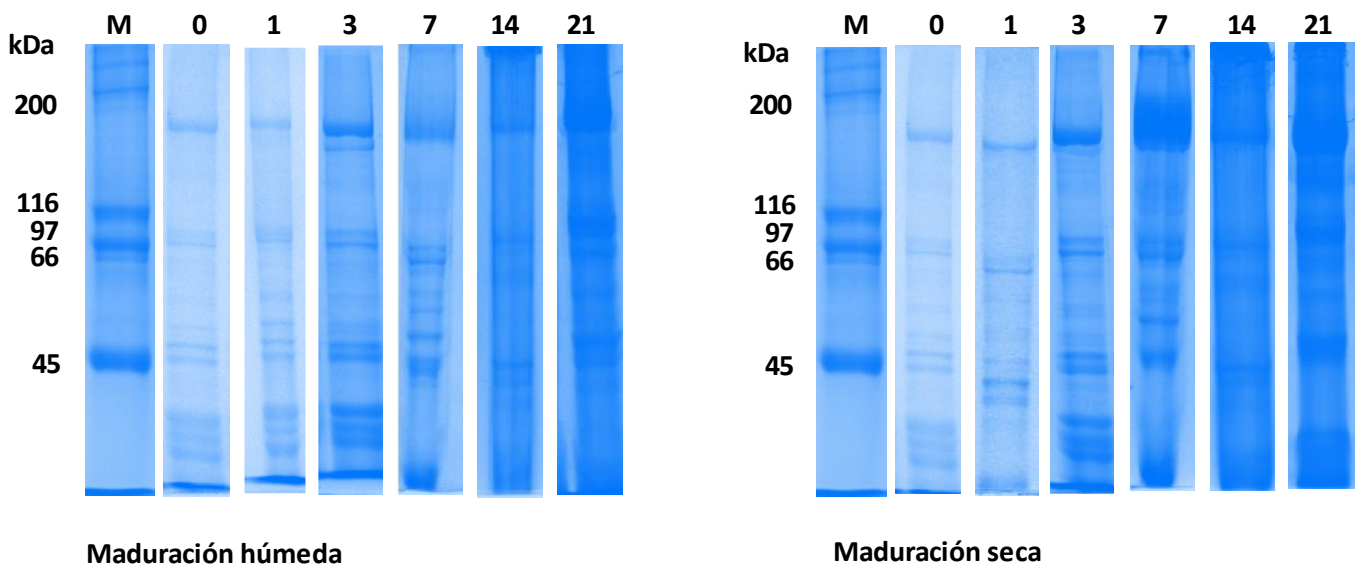
La *Figura 19* muestra las bandas que de acuerdo al trabajo de Rodríguez (2012) son: cadena de miosina (220 kDa), péptidos de conectina (106 kDa), péptidos de  $\alpha$ -actina (95 kDa), troponina (70 kDa), actina (43 kDa) y péptidos de tropomiosina (33 kDa).



**Figura 19** Perfil de **proteínas miofibrilares**, SDS al 10%. M; marcador de peso molecular Bio-Rad®; Los números en la parte superior (1-6) indican las muestras **sin zilpaterol** del día 0.

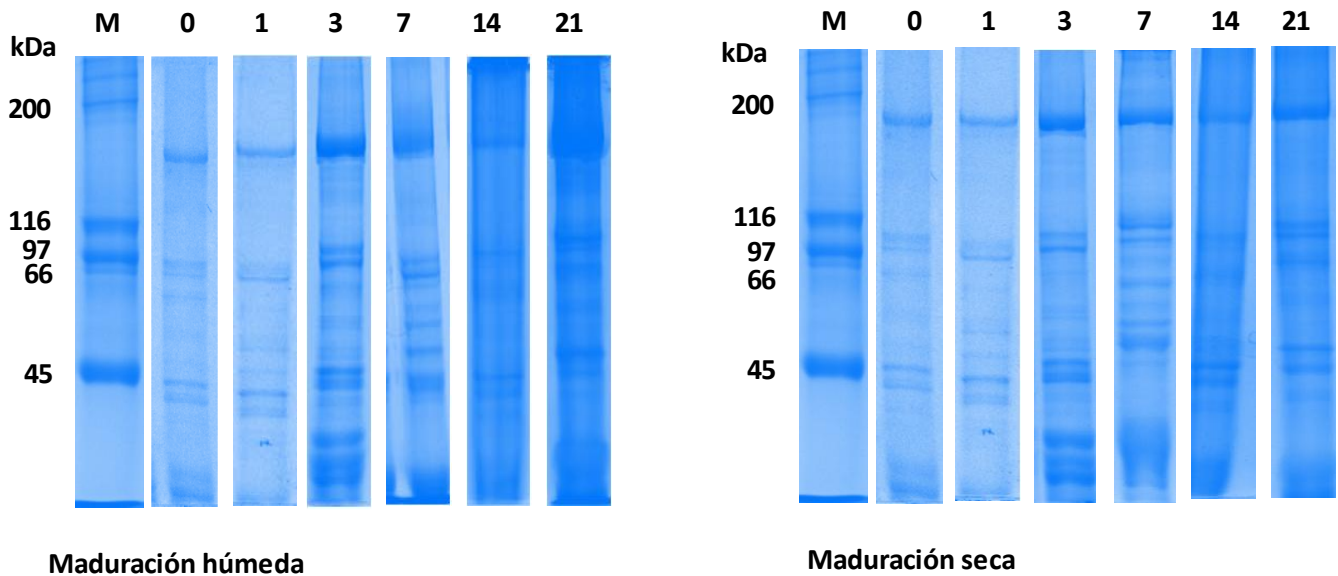
Para las siguientes figuras del perfil de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas así como los zimogramas con caseína y gelatina como sustratos, se tomaron los carriles de una de las muestras para comparar el perfil de proteínas conforme a los días de muestreo, el tipo de maduración y por tipo de tratamiento (con o sin zilpaterol).

Podemos observar en la *Figura 20* el perfil de proteínas de las muestras de carne sin zilpaterol sometidas a maduración húmeda y seca, en la cual, la banda de la cadena de miosina se ve una mayor intensidad conforme pasan los días para la actina y conectina.



**Figura 20** Perfil de **proteínas miofibrilares**. Los números en la parte superior indican los diferentes días de maduración para las muestras de carne **sin zilpaterol**, (izquierda) maduración húmeda, (derecha) maduración seca. SDS-PAGE al 10%. M: Marcador alto peso molecular Bio-Rad®.

Por otro lado, en la *Figura 21* se observa el perfil de proteínas miofibrilares para las muestras de carnes tratadas con una dieta con zilpaterol para los dos tipos de maduración. En la figura apreciamos el mismo aumento de intensidad en las bandas de la miosina, actina y conectina.



**Figura 21** Perfil de **proteínas miofibrilares**. Los números en la parte superior indican los diferentes días de maduración para las muestras de carne **con zilpaterol**, (izquierda) maduración húmeda, (derecha) maduración seca. SDS-PAGE al 10%. M: Marcador alto peso molecular Bio-Rad®.

En el caso de la degradación de la actina que es menor en la maduración húmeda, esto posiblemente se deba a la sobre exposición de bandas que hay cerca de los 43 kDa y que básicamente a partir de este peso molecular se encuentran proteínas de menor peso molecular como la  $\alpha$ -actinina y polipéptidos que son el resultado de la degradación de las proteínas de mayor peso molecular como nebulina, la miosina y actina y que no permite que este definidas correctamente (Rodríguez, 2012).

El perfil de las proteínas miofibrilares con zilpaterol también mediante el software, se obtuvo como intensidad para la miosina un valor de 496,090 para el día 0, para la actina 159,320 y para la conectina de 146,860. Para el día 21 para maduración húmeda respectivamente fueron de 1,922,613, 341,110 y 349,013 y para la maduración seca 1,031,198, 396,901 y 341,110 en ese mismo orden. Aquí la intensidad es mayor a la que presentan las muestras en maduración seca, que combinadas con un pH ligeramente ácido por la concentración de iones  $H^+$ , favorece la proteólisis y la desnaturalización al mismo tiempo.

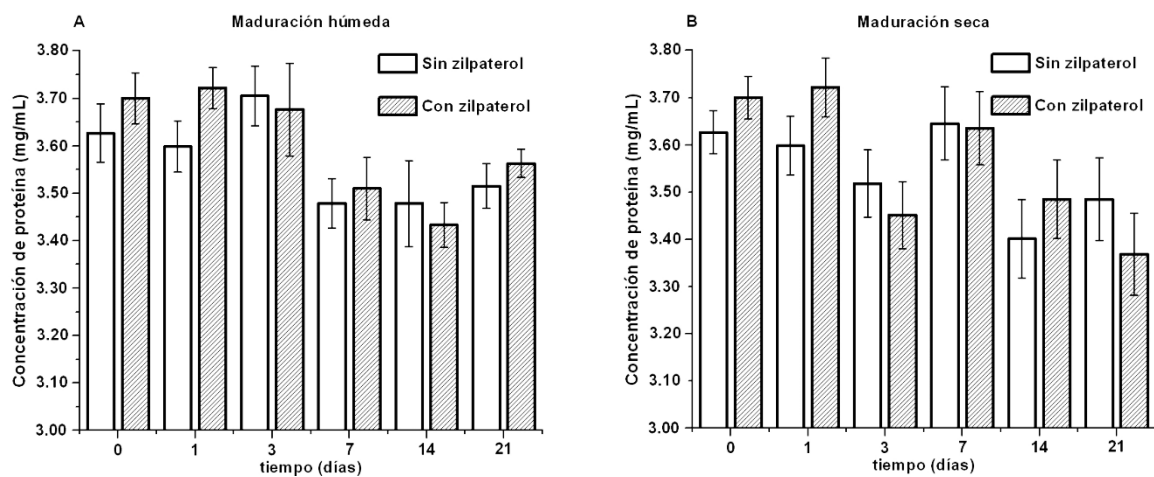
Estos valores nos revelan que la intensidad de las bandas es mucho mayor en las muestras de carne sin zilpaterol, con excepción de la miosina, que es mayor en el tratamiento con zilpaterol y que posiblemente se deba a un menor contenido de proteína.

## 6.5 Proteínas sarcoplásmicas

### 6.5.1 Cuantificación de proteínas

La determinación de proteínas sarcoplásmicas se realizó también mediante la técnica de Bradford, al conocer la concentración la podemos relacionar con la actividad de proteasas neutras, ácidas y actividad gelatinolítica. En la *Tabla III* se pueden apreciar los valores para los dos tratamientos del día 0 y 1 que comienzan en 3.63 y 3.60 mg/mL (sin zilpaterol) y en 3.70 y 3.72 mg/mL (con zilpaterol) hasta el día 21 el cual presenta una menor concentración de proteínas sarcoplásmicas.

En la *Figura 22* se observa que para la maduración en húmedo hay una tendencia cuando pasan los días disminuye el pH y hay un incremento pequeño en la concentración de proteínas en las muestras con zilpaterol. Este mismo fenómeno ocurre en la maduración en seco pero ocurre un aumento en el día 7 y posteriormente ocurre un descenso.



**Figura 22** Promedio ( $\bar{x}$ ) de **concentración de proteínas sarcoplásmicas** (mg/mL) contra tiempos de muestreo. **(A)** Condiciones de maduración húmeda y **(B)** condiciones de maduración en seco.

Cuando las proteasas llevan a cabo su actividad proteolítica endógena, principalmente las calpaínas, estas se degradan mediante un proceso de autólisis (Kinbara *et al.*, 1998; Sorimachi *et al.*, 1997; Sorimachi, 1999; Suzuki, 1999). En el caso de la proteasas ácidas ocurre una



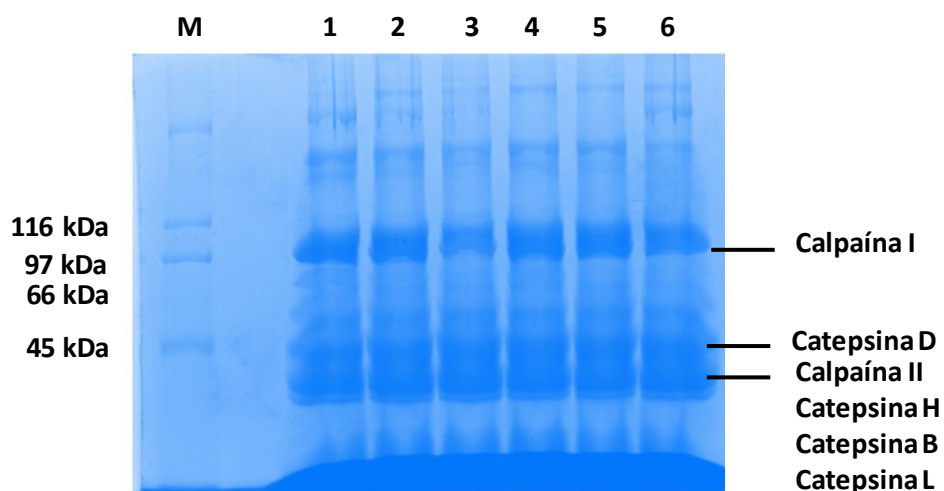
degradación más lenta que las de las calpaínas pero la catepsina D es inhibida por la presencia de NaCl mientras que la catepsinas B, L y H están activas actúan y se degradan (López, 2015).

Con este tipo de proteínas sarcoplásmica ocurre lo contrario (con respecto a la concentración de proteína miofibrilar) debido a que estas se encuentran rodeando a las proteínas miofibrilares que son estructurales y constituyen una masa fluida que está formada por enzimas de esta naturaleza, hormonas, anticuerpos, glicoproteínas, fosfoproteínas. Por lo que estas proteasas realizan su actividad y se degradan, como toda enzima es susceptible a la desnaturalización por temperatura y pH. En este caso el descenso de pH afectara la estructura terciaria de las proteasa neutras que además, una vez llevado a cabo su catálisis, como podemos observar para el día 3 se degrada o se desnaturaliza, mientras que las proteasas ácidas se activan conforme disminuye el pH en la cual pueden reorganizar su estructura y llevar su actividad catalítica y degradarse de la misma manera. Esto pasa en el día 3 en el cual hay un aumento de concentración excepto en la muestra húmeda con zilpaterol, en la cual posiblemente se degradaron por tiempo las proteasas neutras y se cuantifico menos (Zhang, 2009).

### **6.5.2 Perfil de proteínas por SDS-PAGE**

Se realizó un perfil de proteínas sarcoplásmicas para poder hacer una comparación entre las bandas de proteínas sarcoplásmicas reportadas en la literatura y que son responsables de la maduración en la carne. En la *Figura 23* nos muestra una representación del perfil de proteínas sarcoplásmicas conforme a lo reportado en la literatura (González, 2003).

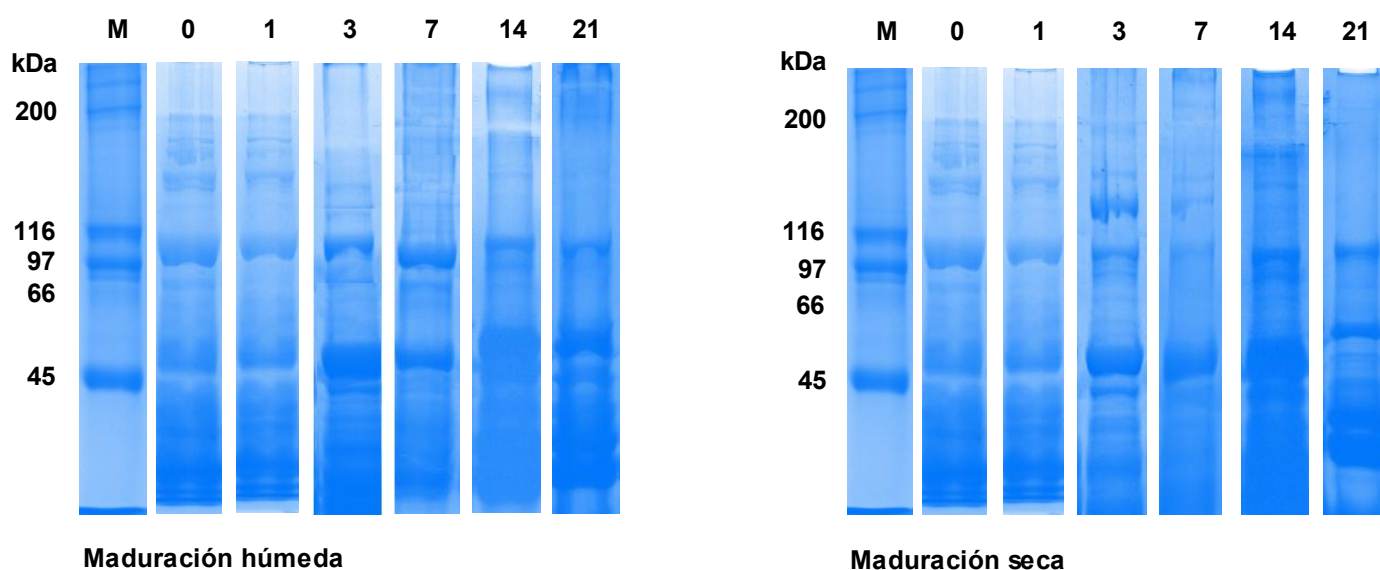
Las bandas a 110 kDa son el complejo de calpaína (I y II), calpaína I a 80 kDa, la catepsina D a 42kDa y las catepsinas L, B y H a 24, 28 y 25 kDa.



**Figura 23** Perfil de **proteínas sarcoplásmicas** (bandas). SDS-PAGE al 10 %. Los números en la parte superior (1-6) indican las muestras **sin zilpaterol** para el día 0. M; Marcador alto peso molecular Bio-Rad®.

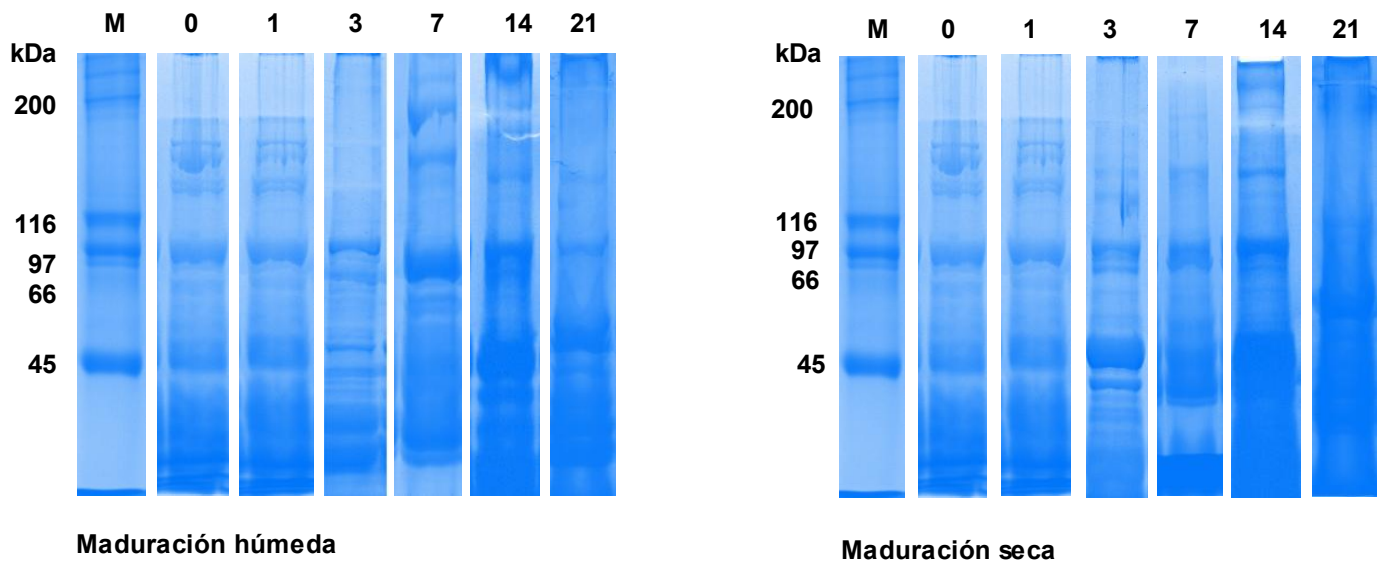
En el caso del perfil de las proteínas sarcoplásmicas en la mayoría de los geles, se observan que no están definidas las bandas debido a la interferencia de iones y compuestos con carga eléctrica que altera el campo eléctrico de la electroforesis.

El perfil de proteínas sarcoplásmicas para las muestras de carne sin zilpaterol para ambos tratamientos (*Figura 24*) se muestran una similitud en las bandas del día 0 al 21 aumenta la degradación de las proteasas sarcoplásmicas.



**Figura 24** Perfil de **proteínas sarcoplásmicas**. Los números en la parte superior indican los diferentes días de maduración para muestras de carne **sin zilpaterol**, (izquierda) maduración húmeda, (derecha) maduración seca. SDS-PAGE al 10 %. M: Marcador alto peso molecular Bio-Rad®.

Mientras en el perfil de proteínas sarcoplásmicas para las muestras de carne con zilpaterol (*Figura 25*) hay una mayor cantidad de proteínas para el día 14 y 21 por debajo de los 45 kDa.



**Figura 25** Perfil de **proteínas sarcoplásmicas**. Los números en la parte superior indican los diferentes días de maduración para muestras de carne **con zilpaterol**, (izquierda) maduración húmeda, (derecha) maduración seca. SDS-PAGE al 10 %. M: Marcador alto peso molecular Bio-Rad®.

En todos los gels se presenta un cambio y la mayoría de estas bandas tiene una irregularidad debido a que en el modo de extracción de estas proteínas sarcoplásmicas hay iones como potasio, bicarbonato y algunas proteínas cargadas que tienen efecto sobre el campo eléctrico de la electroforesis.

Los perfiles responden al mismo comportamiento que la concentración de las proteínas sarcoplásmicas, cabe mencionar que posiblemente existan bandas que correspondan a glicoproteínas como hormonas y anticuerpos de un peso molecular aproximado a 53 kDa, fosfoproteínas y calcecuestrina de 60 kDa y hemoglobina de 64 kDa, de acuerdo a lo reportado en la literatura (Campbell y McLennan, 1981).

De acuerdo con el software Image Lab™ 3.0, la intensidad de la calpaína I es de 1,719,630, para la catepsina D es de 3,624,660 y para la calpaína II, catepsina H, B y L es de 2,154,510. Para las muestras del día 21 sin zilpaterol sometidas en maduración húmeda los valores de intensidad son para la calpaína I es de 1,351,698, para catepsina D es de 4,616,886 y las calpaína II, catepsina H, B y L es de 9,095,832.

Los valores de intensidad para la maduración seca de las muestras sin zilpaterol en el mismo orden que el anterior son 790,258, 3,991,660 y 3,390,110, respectivamente. Estos valores indican que las calpaína I disminuyen su intensidad debido a que tiene un proceso de autólisis, el cual al realizar su actividad catalítica se degrada. Debido a la gran cantidad de otras proteínas sarcoplásmicas es difícil identificar las bandas especialmente las calpaína II y catepsinas H, B y L debido a que su peso molecular oscila entre los 24-30 kDa. La intensidad de la zona de las calpaínas H, B y L aumenta el valor de densidad óptica debido a que estas se liberan de la membrana lisosomal cuando el pH desciende a 5.5, además esta banda puede contener péptidos de la degradación de la calpaína I, la calpaína II y otras proteasas presentes en el citoplasma.

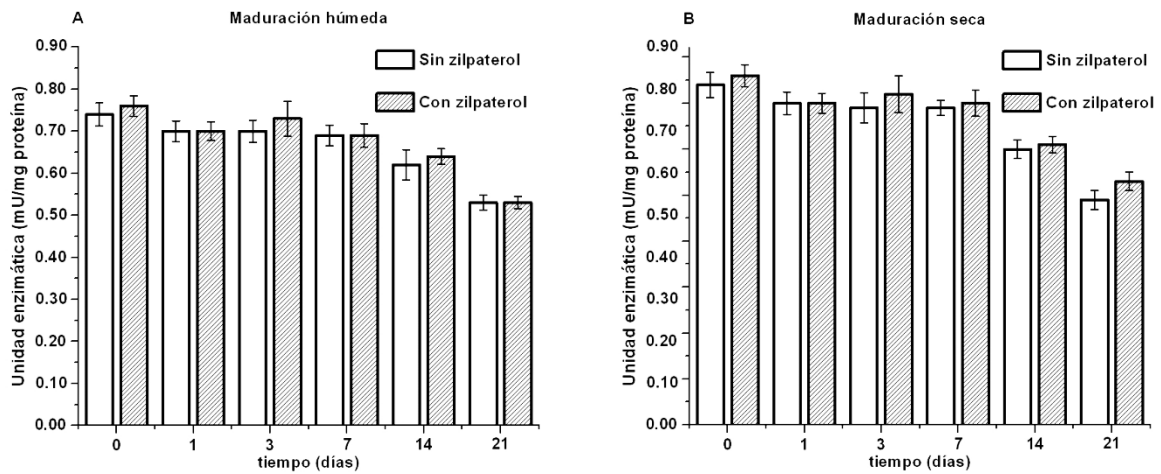
En el caso de las muestra con zilpaterol, los valores para el día 0; calpaína 2,407,410, catepsina D 3,576,600 y para la calpaína II, catepsinas H, B y L es de 3,270,510. Para el día 21 para las muestras de maduración húmeda existe una disminución de 453,560, 3,026,085 y 4,300,695, respectivamente. Y finalmente, los valores para las muestras de este mismo día pero sometidas en condiciones de maduración seca los valores son 2,172,564, 702,612 y 4,571,720.

Podemos establecer que las tanto para las muestras con y sin zilpaterol los valores indican que hay una disminución de la intensidad de la calpaína I. La mayor degradación se presenta en las muestras en maduración húmeda y sin zilpaterol debido a la cantidad de agua que permite su actividad.

### **6.5.3 Reacción de Kunitz**

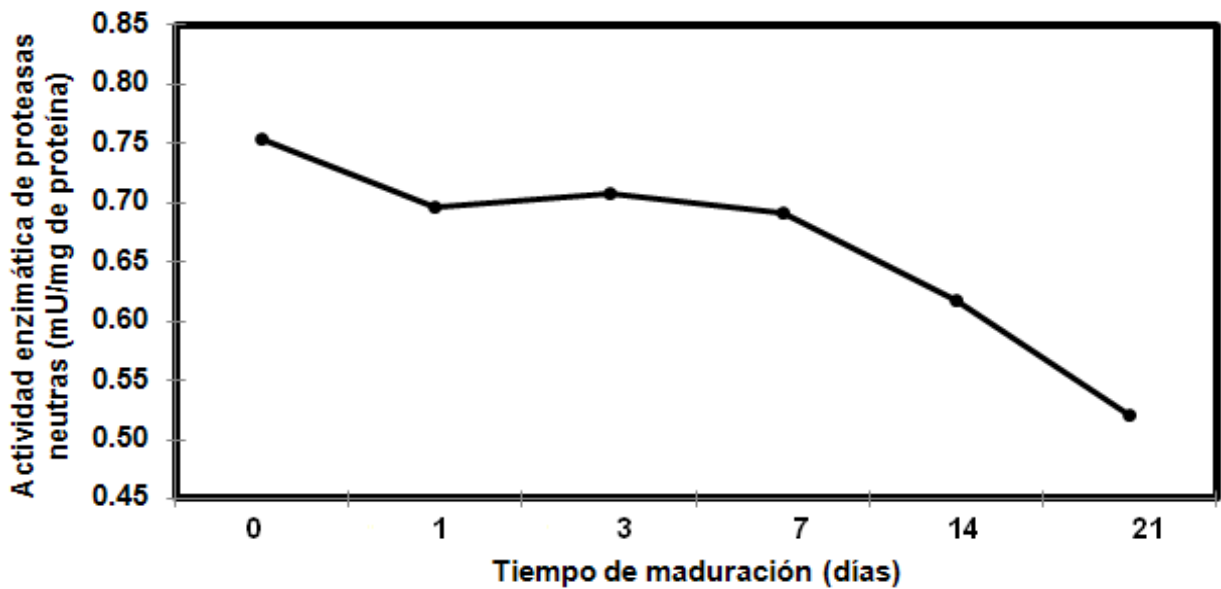
La determinación de la actividad de proteasas neutras (calpaína I y II) se realizó para poder cuantificar la actividad enzimática endógena como lo podemos observar en la *Tabla IV* y para poder hacer un contraste con los resultados de pH y como varia estos valores a los diferentes días, tipo de maduración y tratamiento de la muestra.

En los resultados podemos contemplar que la mayor actividad se presentó tanto para las muestras sin y con zilpaterol en el día 0 y la variación de estos valores concuerda de manera directa con los valores de pH, es decir hay una tendencia de la disminución de la actividad enzimática. En lo general en las muestras húmedas y con zilpaterol presentan mayor actividad (*Figura 26*).



**Figura 26** Promedio ( $\bar{x}$ ) de **actividad proteolítica de proteasas neutras** (U/mg de proteína) contra tiempos de muestreo. **(A)** Actividad enzimática en sustrato caseína para las muestras en maduración húmeda, **(B)** actividad enzimática en sustrato caseína para las muestras en maduración seca.

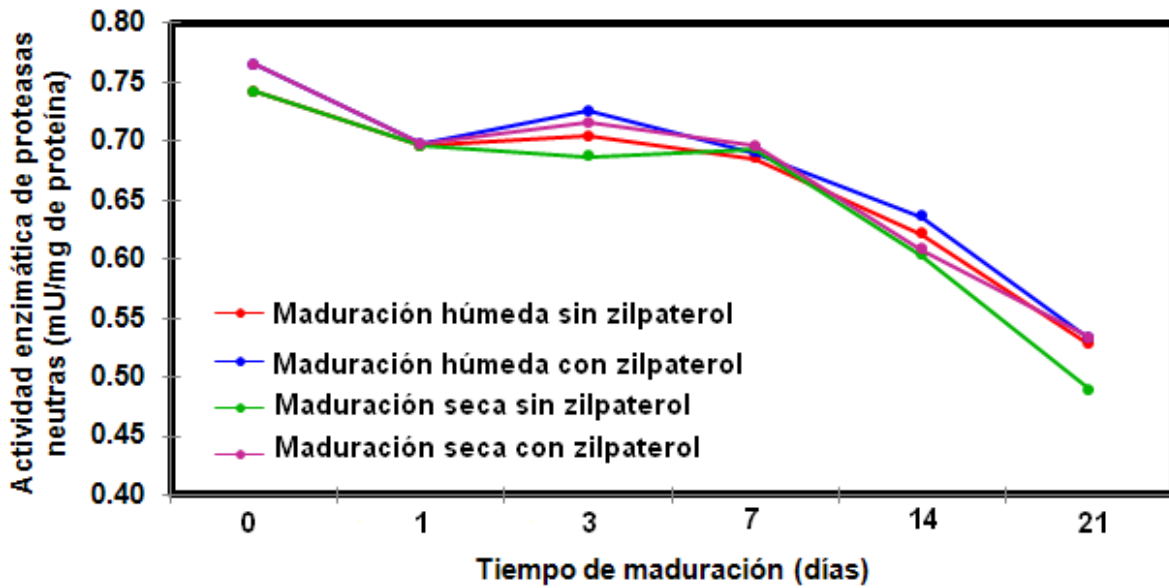
En la *Figura 27* se observa de manera general que la actividad de las proteasas independientemente del tipo de tratamiento y de maduración disminuye conforme a los días, en el cual hay un ligero aumento para el día 3 y puede estar relacionado con la renaturalización de proteínas y su actividad.



**Figura 27** Promedio general de **actividad proteolítica de proteasas neutras** (U/mg de proteína) contra tiempo de maduración. \* Para los días 0 y 1 promedio de 12 muestras de carne y para los días 3, 7, 14 y 21 promedio de 24 muestras de carne (con zilpaterol y sin zilpaterol).

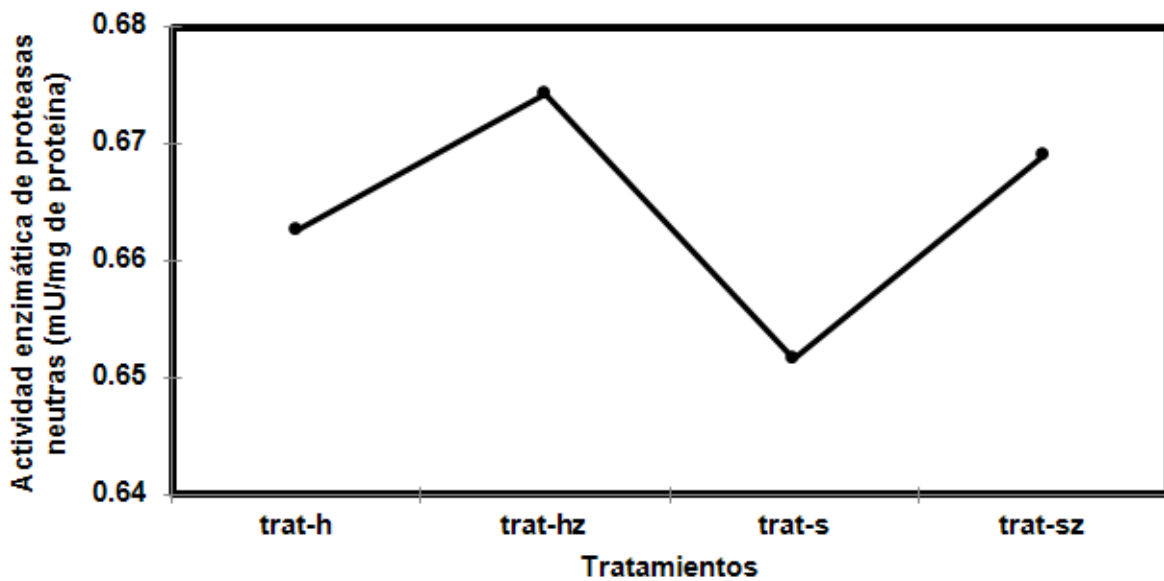
En la *Figura 28* se observa una disminución de la actividad de proteasas neutras, pero en la mayoría de los días las muestras que tienen mayor actividad fueron las que se sometieron a maduración en húmedo y con zilpaterol, posteriormente las muestras en maduración húmeda sin

zilpaterol, luego las muestras en maduración en seco con zilpaterol y finalmente las muestras secas sin zilpaterol.



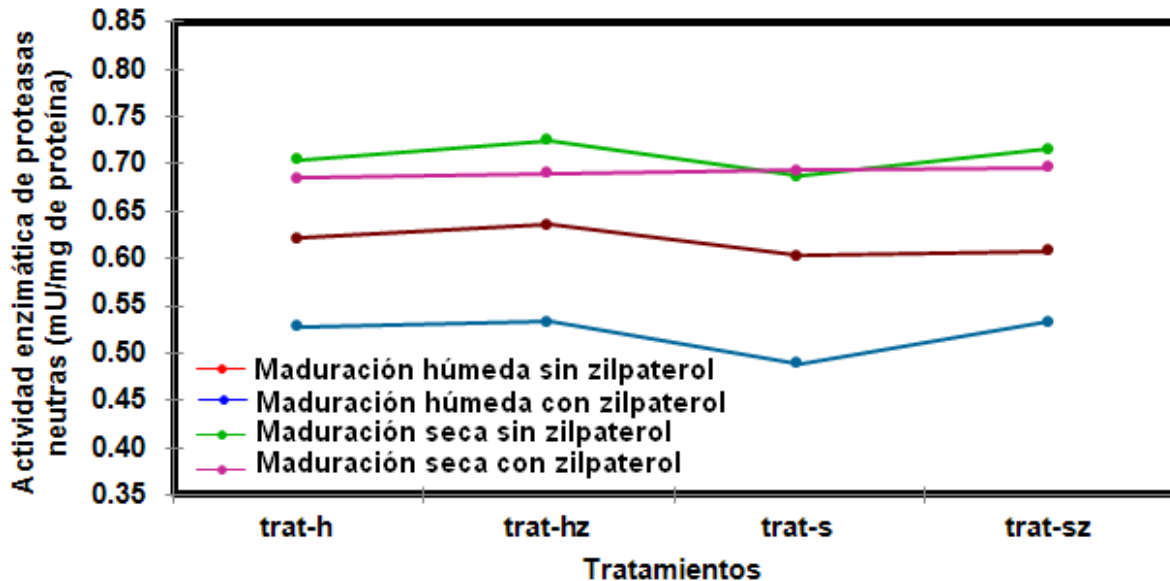
**Figura 28** Promedio ( $x$ ) de actividad proteolítica de proteasas neutras (U/mg de proteína) contra tiempo de maduración para cada tratamientos.

En la *Figura 29* se observa que los tratamientos con zilpaterol presentan mayor actividad que las muestras que no contiene zilpaterol, de manera análoga este esquema nos muestra que los tratamientos en maduración en húmedo tienen mayor actividad que las muestras que están en maduración en seco. Los valores oscilan entre 0.62 y 0.65 mU/ mg de proteína.



**Figura 29** Promedio total de la suma de promedios de actividad proteolítica de proteasas neutras ( $x$ ) de los días 3, 7, 14 y 21 contra tratamientos. \* trat-h: maduración húmeda sin zilpaterol; trat-hz: maduración húmeda con zilpaterol; trat-s: maduración seca sin zilpaterol; trat-sz: maduración seca con zilpaterol.

Y por último, en la *Figura 30* se presentan los valores promedios para cada uno de los tratamientos y tipo de maduración conforme a los diferentes días, para los días 3 y 7 se presenta la mayor actividad, también se distingue las variaciones de aumento y disminución de las actividades de las proteasas neutras y para el día 14 y 21 hay una disminución progresiva.



**Figura 30** Valores promedio de **actividad proteolítica de proteasas neutras** (U/mg de proteína) de 6 muestras de carne contra tratamientos para los diferentes tiempos de maduración. \* trat-h: maduración húmeda sin zilpaterol; trat-hz: maduración húmeda con zilpaterol; trat-s: maduración seca sin zilpaterol; trat-sz: maduración seca con zilpaterol.

En el tratamiento de la carne sin zilpaterol podemos observar que para el día 0 al 1 existe una disminución de pH de 6.28 a 5.57, el día 0 presenta la mayor actividad enzimática de las proteasas neutras (durante todo el muestreo en este tratamiento) debido a que las proteasas neutras se activan después de la muerte del animal y el pH favorece su actividad catalítica. Para el día 1 existe una disminución debido a ese descenso de pH.

En la maduración en húmedo (sin zilpaterol) para el día 3 ocurre un aumento de la actividad enzimática con respecto al día 1, ocasionado por el aumento de pH y por una ligera activación de las proteasas neutras. En el día 7 hasta el día 21 hay una caída de la actividad enzimática inducida por la presencia de ácido láctico, el cual altera su sitio catalítico y también afecta la estructura y provoca una degradación de las proteasas.

Para la maduración en seco ocurre el mismo fenómeno pero en diferentes tiempo, por causa de las condiciones de poca humedad y que afecta la actividad enzimática. Para el día 3 ocurre una disminución de la actividad a la par que el pH, en el día 7 ocurre un aumento de pH por lo que

activa de nuevo a la proteasas neutras y hay un ligero aumento de la actividad y para el día 14 y 21, hay una disminución de la actividad provocada por el pH ácido.

Entre las diferentes condiciones de maduración y como se ha explicado en otras determinaciones (pH y concentración de proteína), en la maduración en húmedo presenta una mayor actividad con respecto a la maduración en seco, debido a esas condiciones de humedad constante que le permite a las proteasas neutras actuar sobre las proteínas miofibrilares.

En el tratamiento con zilpaterol para los días 0 y 1 se observa una disminución de la actividad enzimática con respecto a la muestras sin zilpaterol, en el tratamiento con maduración húmeda en el día 3, al haber un aumento ligero de pH también hay un ligero aumento de la actividad enzimática de las proteasas y para el día 7 hasta 21 hay una disminución de la actividad enzimática.

Finalmente en la maduración en seco, en el día 3 ocurre un aumento de la actividad enzimática y el pH se mantiene igual que en el día 1, y la actividad disminuye en el día 7 y 14, aun cuando hay un aumento de pH, y para el día 21 siguió ocurriendo una disminución de pH y de la actividad.

Las muestras en maduración en húmedo presentan una mayor actividad de las proteasas a diferencia de las muestras en maduración en seco.

Las muestras de bovinos que fueron tratadas con zilpaterol al tener una mayor cantidad de proteínas miofibrilares en el músculo, son las muestras que presentan mayor actividad de las proteasas neutras.

De acuerdo al análisis estadístico de varianza (*Tabla IX*), para los valores de actividad de proteasas neutras se obtuvo una  $r^2$  de 0.899 lo que indican que existe una cierta tendencia lineal ya que prácticamente la actividad descendió conforme pasaron los días. En el análisis de Duncan (*Tabla X*) que si hay diferencia estadística entre tratamientos y tipo de maduración a excepción de dos interacciones la primera de ellas son las muestras con zilpaterol contra las dos diferentes condiciones de maduración y la segunda, en las muestras con zilpaterol en maduración en seco contra las muestras sin zilpaterol en maduración en húmedo esto debido a las condiciones de maduración por lo que no existe diferencia estadística.

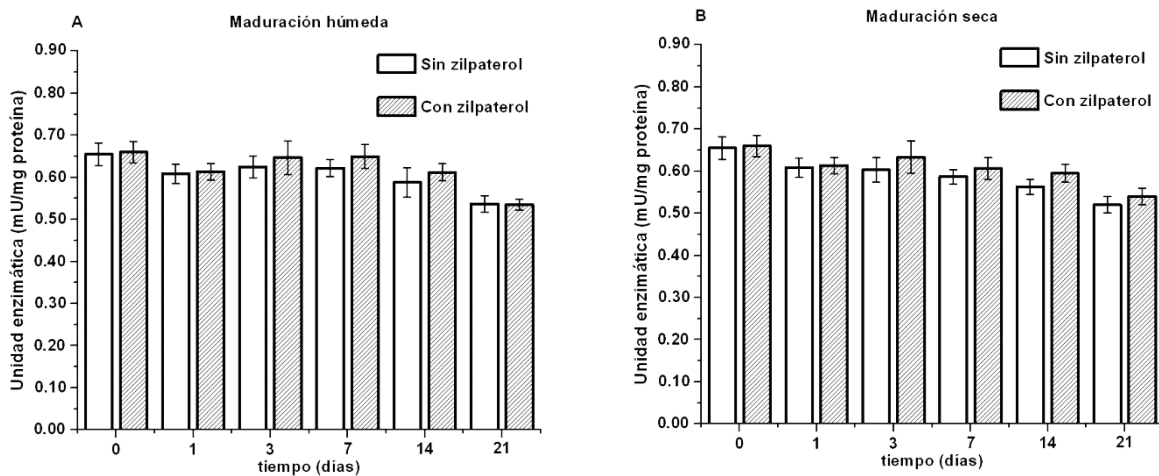


## 6.5.4 Reacción de Anson

La reacción de Anson se efectuó para determinar la actividad de las proteasas ácidas (catepsinas B, D, H y L) y para poder cuantificar la actividad enzimática endógena (*Tabla V*) y relacionarlos con pH, tiempo de maduración y los dos tipos de tratamientos.

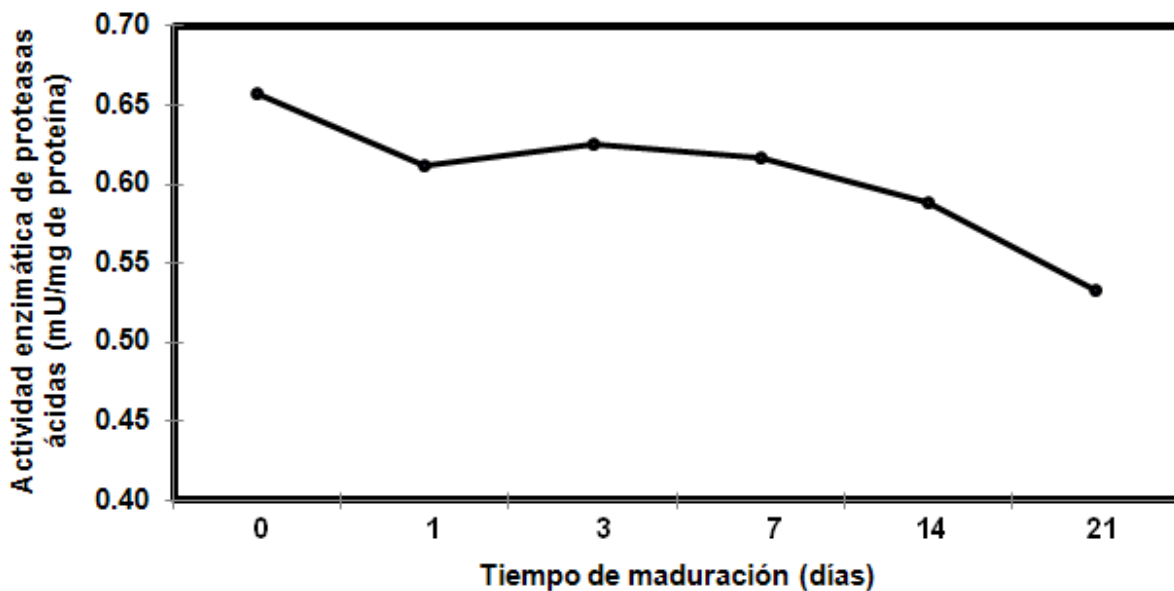
Podemos observar en la *Figura 31* que la mayor actividad se presenta en el día 0 de ambos tratamientos. Para el día 3 de maduración ocurre un ligero aumento, después la tendencia hasta el día 21 es una disminución de la actividad de las proteasas.

También nos detalla que las muestras con zilpaterol tienen una mayor actividad que las muestras sin zilpaterol y se observa la tendencia que se ha mencionado anteriormente.



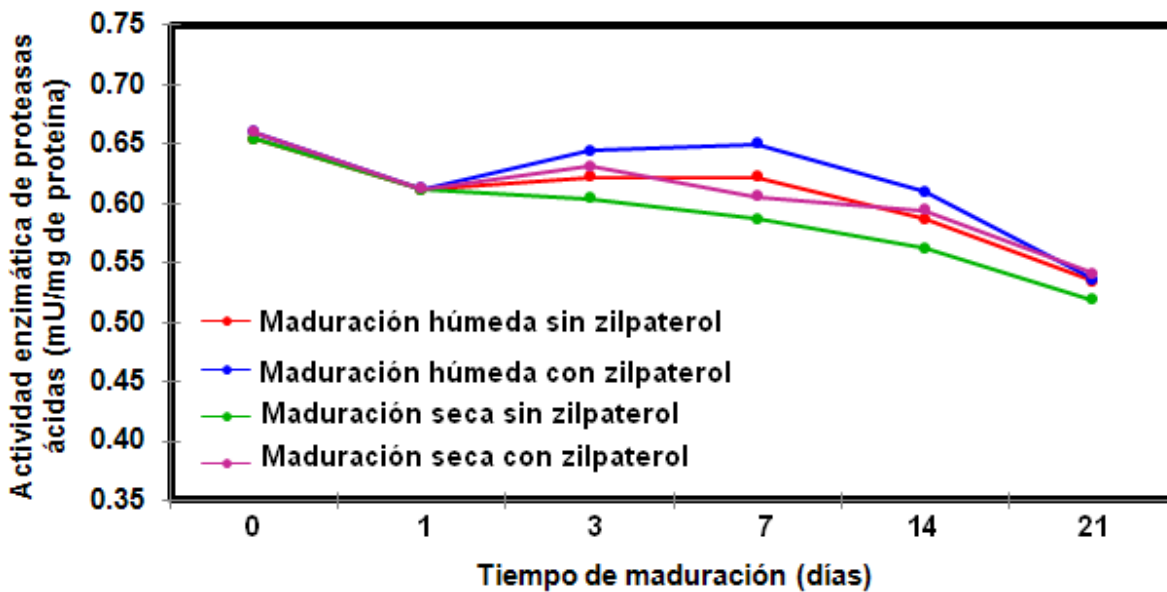
**Figura 31** Promedio ( $\bar{x}$ ) de **actividad proteolítica de proteasas ácidas** (U/mg de proteína) contra tiempos de muestreo. **(A)** Actividad enzimática en sustrato hemoglobina para las muestras en maduración húmeda, **(B)** actividad enzimática en sustrato hemoglobina para las muestras en maduración seca.

De manera general podemos ver en la *Figura 32* que los valores promedio tanto de la maduración húmeda y seca existe un comportamiento de disminución de la actividad con un ligero aumento en el día 3.



**Figura 32** Promedio general de **actividad proteolítica de proteasas ácidas** (U/mg de proteína) contra tiempo de maduración. \* Para los días 0 y 1 promedio de 12 muestras de carne y para los días 3, 7, 14 y 21 promedio de 24 muestras de carne (con zilpaterol y sin zilpaterol).

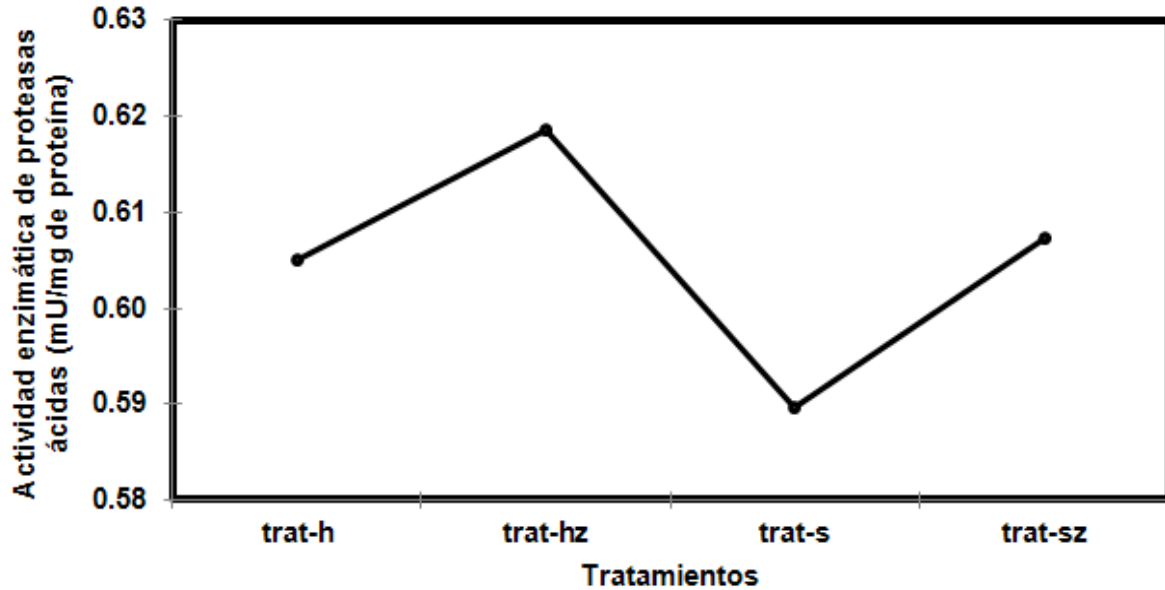
Conforme a los tratamientos la *Figura 33* nos muestra que la maduración húmeda tiene mayor actividad a diferencia de las muestras en seco y que las muestras con zilpaterol presentan más actividad que la que no contiene este  $\beta$ AA.



**Figura 33** Promedio ( $\bar{x}$ ) de **actividad proteolítica de proteasas ácidas** (U/mg de proteína) contra tiempo de maduración para cada tratamientos.

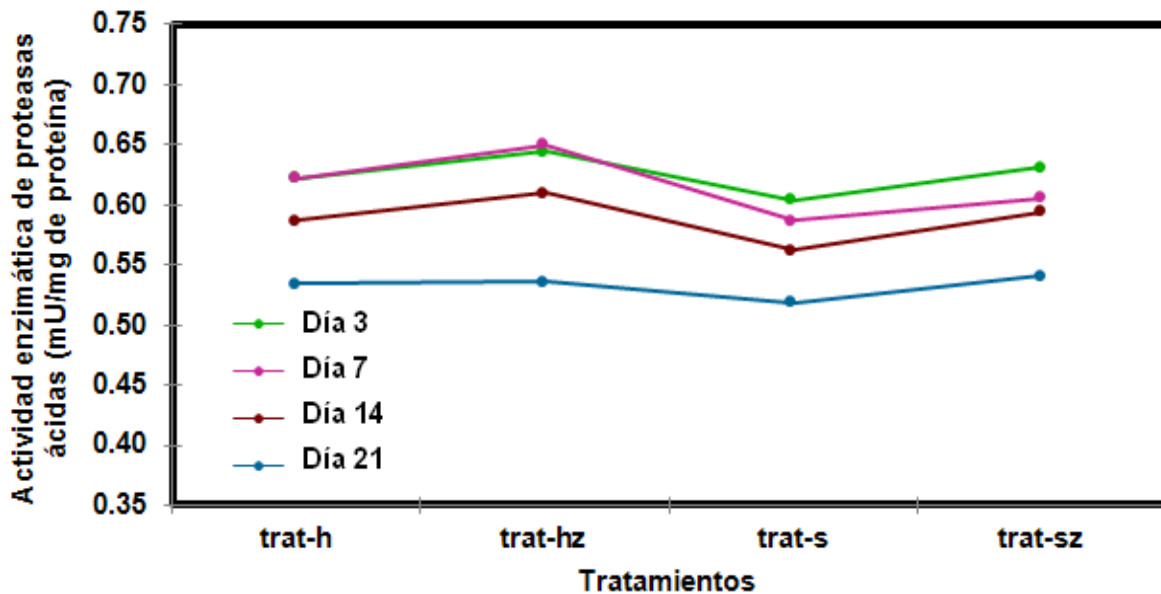
En la *Figura 34* nos muestra los promedios de la actividad de las proteasas ácidas con respecto a los tratamientos y en ella se corrobora que las muestras en húmedo presentan más actividad

endógena que las muestras en seco y que las muestras que contienen zilpaterol tienen mayor actividad que las que no contienen zilpaterol.



**Figura 34** Promedio total de la suma de promedios de **actividad proteolítica de proteasas ácidas** ( $x$ ) de los días 3, 7, 14 y 21 contra tratamientos. \* trat-h: maduración húmeda sin zilpaterol; trat-hz: maduración húmeda con zilpaterol; trat-s: maduración seca sin zilpaterol; trat-sz: maduración seca con zilpaterol.

Por último, la *Figura 35* nos precisa conforme a los días pasan cómo se comporta la actividad en los diferentes tratamientos y maduración. Se observa que en el día 0 hay mayor actividad y la de menor se presenta en el día 21.



**Figura 35** Valores promedio de **actividad proteolítica de proteasas ácidas** (U/mg de proteína) de 6 muestras de carne contra tratamientos para los diferentes tiempos de maduración. \* trat-h: maduración húmeda sin zilpaterol; trat-hz: maduración húmeda con zilpaterol; trat-s: maduración seca sin zilpaterol; trat-sz: maduración seca con zilpaterol.

El método de hidrólisis de hemoglobina para la determinación de proteasas se fundamenta en la desnaturalización de la hemoglobina que se digiere en condiciones estándar, la hemoglobina no digerida se precipita con el ácido tricloroacético y los productos de degradación que no sedimentan son una medida de la cantidad de proteasas presente. Se realizó una modificación la cual se usó hemoglobina al 1%, pH 5 y ácido tricloroacético al 50% p/v (Rodríguez, 2012).

En el día 0 donde no hay efecto de la maduración y el pH oscila entre 6.28-6.33 en los dos tratamientos con y sin zilpaterol, las muestras presentan la mayor actividad por tener mayor concentración de proteasas que se encuentran libres en el líquido sarcoplásmico.

Para el día 1 el pH disminuye en los dos tratamientos debido a que las catepsinas apenas se comienzan a liberar y las que ya están presentes disminuyen su actividad.

Los valores de la proteólisis aumentan para el día 3 en la maduración en húmedo, ya que bajo las condiciones de pH 5 la membrana citoplasmática se degrada liberando más catepsinas por lo que se refleja ese aumento. Caso contrario en la maduración en seco para este mismo día, que prácticamente los valores de pH son más ácidos pero está limitado por que hay pérdida de agua disponible para su catálisis.

Para el día 7 y de acuerdo a la literatura (Parrish, 2008) todavía hay actividad para las muestras en maduración en húmedo y se establece que dentro de 7 a 10 días de maduración la carne obtiene su blandura ideal para consumo humano. En caso de la maduración en seco disminuye su actividad por la condición de que pierde agua y es fundamental para su catálisis.

Para los días 14 y 21 en los dos tipos de maduración y los dos tipos de tratamiento, la actividad disminuye. Para la maduración en seco el proceso de maduración termina de 21 a 28 días pero prácticamente la catálisis de las proteasas es más lenta.

En general la actividad es mayor en la muestras con zilpaterol y en maduración en húmedo ya que al haber más músculo hay más espacio para contener proteína sarcoplásmica en el músculo y la condición de humedad favorece la proteólisis.

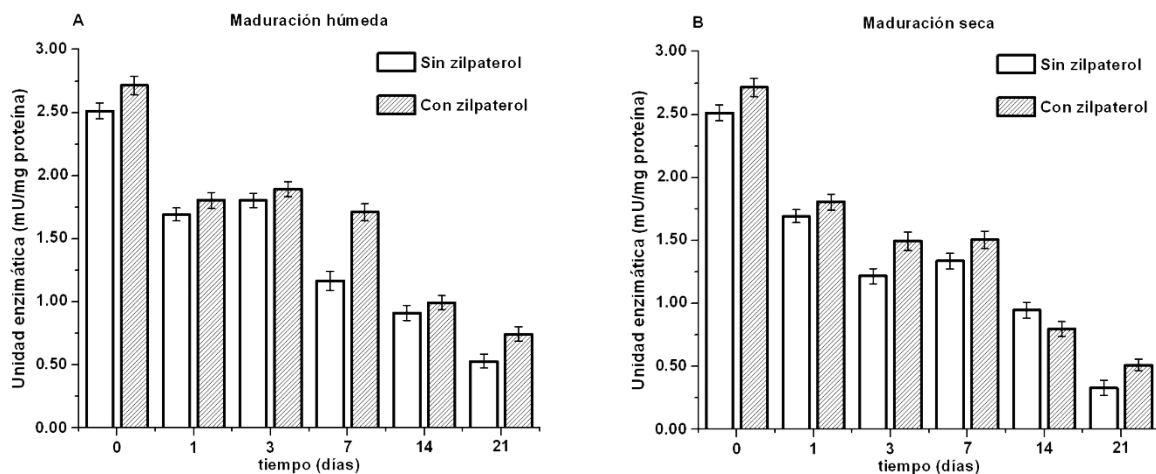
El análisis de varianza (*Tabla XI*) para estos valores de actividad enzimática de proteasas ácidas se obtuvo una  $r^2$  de 0.740 debido a esos aumentos de actividad provocados por la liberación de las proteasas ácidas de la membrana lisosomal por lo que no hay una linealidad.

De acuerdo al análisis de Duncan (*Tabla XII*) si hay diferencias entre tratamientos y maduración a excepción de una sola interacción y que también se presentó en el análisis de pH, la interacción entre las muestras en maduración seca con zilpaterol contra la maduración húmeda sin zilpaterol, ya que estos valores son parecido o difieren por una centésima, lo que indica que existe una compensación, es decir, mientras que en las muestras secas se ve alterado su actividad por el agua disponible para su actividad esta se compensa con un exceso en la cantidad de proteasas ácidas, en cambio en la maduración húmeda hay condiciones favorables para actividad enzimática aun si tener una gran concentración de proteasas ácidas.

### 6.5.5 Actividad gelanólica

La actividad gelanólica se realizó con la finalidad de obtener la actividad enzimática total, es decir cuantificar la actividad de las proteasas neutras y ácidas a un pH 8.5. Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla VI*.

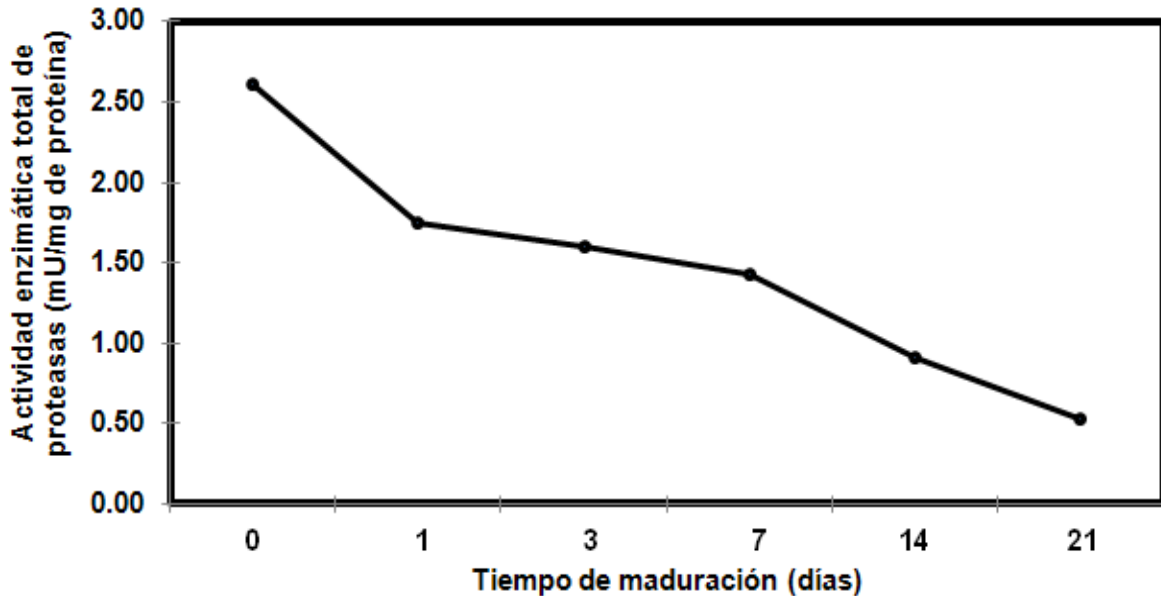
De acuerdo a lo mostrado en la *Figura 36* se muestra la tendencia de la disminución de la actividad total de las proteasas como ya se había visto de manera particular, en el día 3 se observa ese ligero aumento de actividad y en el día 7 maduración seca ocurre el aumento, aunque es similar a la del día 3.



**Figura 36** Promedio ( $\bar{x}$ ) de **actividad proteolítica total de proteasas** (U/mg de proteína) contra tiempos de muestreo. **(A)** Actividad enzimática en sustrato gelatina succinilada para las muestras en maduración húmeda, **(B)** actividad enzimática en sustrato gelatina succinilada para las muestras en maduración seca.

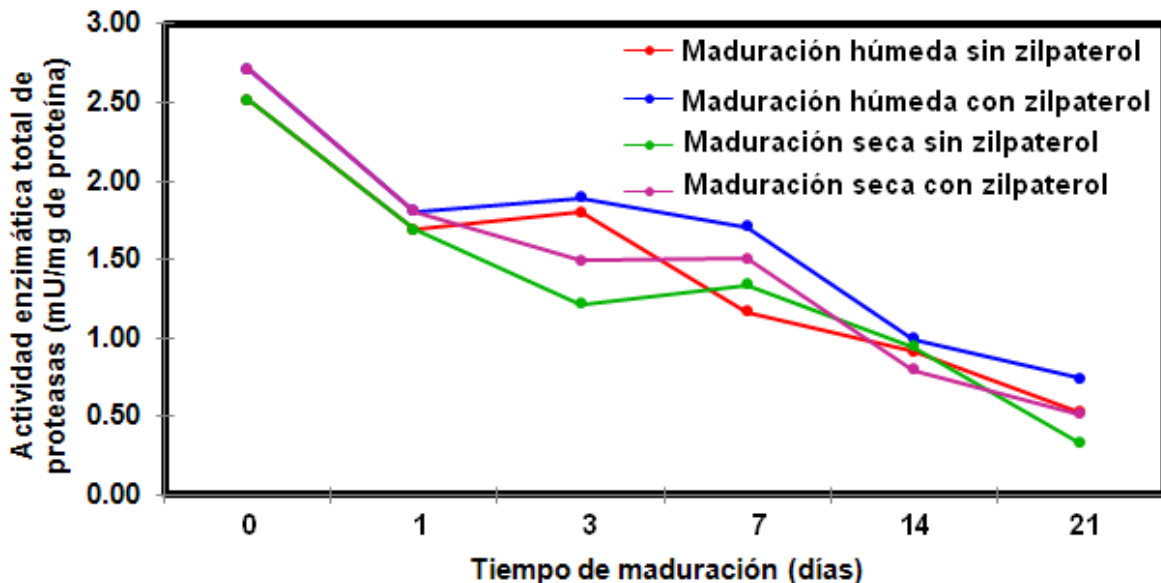
Como se ha estado presentado en las anteriores actividades enzimáticas, para el día 0 en los dos tratamientos (sin y con zilpaterol) es el día donde se presenta mayor actividad enzimática y posteriormente para los consecuentes días de maduración ocurre una disminución.

Tomando los valores promedio de la actividad gelanolítica en la *Figura 37* se muestra la tendencia de una disminución de la actividad enzimática conforme pasa el tiempo de maduración.



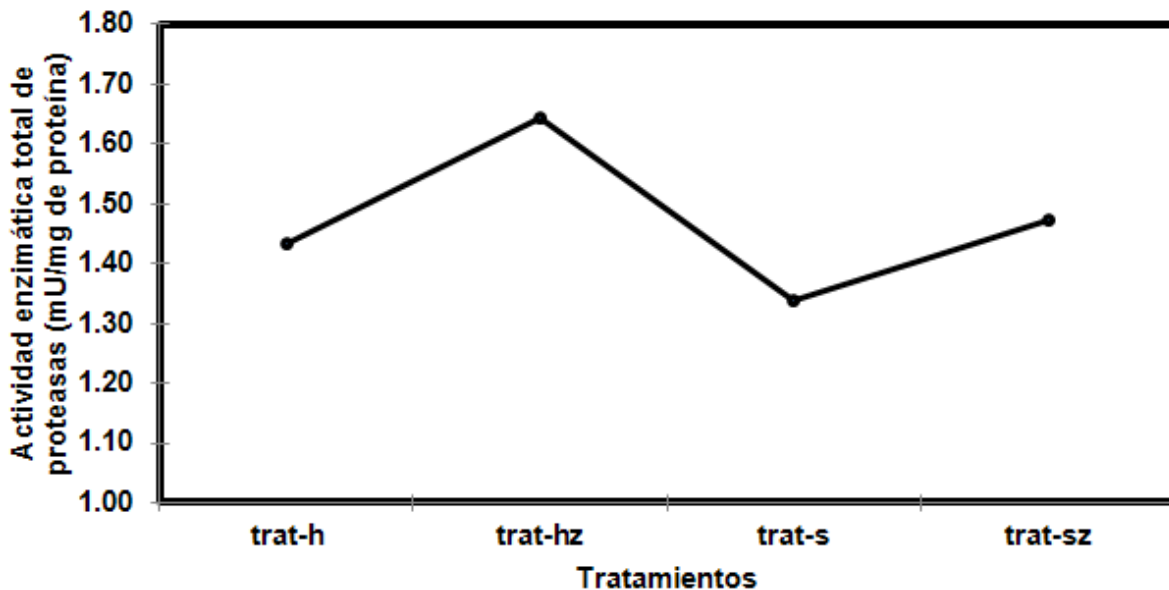
**Figura 37** Promedio general de **actividad proteolítica total de proteasas** (U/mg de proteína) contra tiempo de maduración. \* Para los días 0 y 1 promedio de 12 muestras de carne y para los días 3, 7, 14 y 21 promedio de 24 muestras de carne (con zilpaterol y sin zilpaterol).

En la *Figura 38* ocurre la misma tendencia de mayor actividad en las muestras en maduración húmeda y a su vez en las muestras que contiene el clorhidrato de zilpaterol.



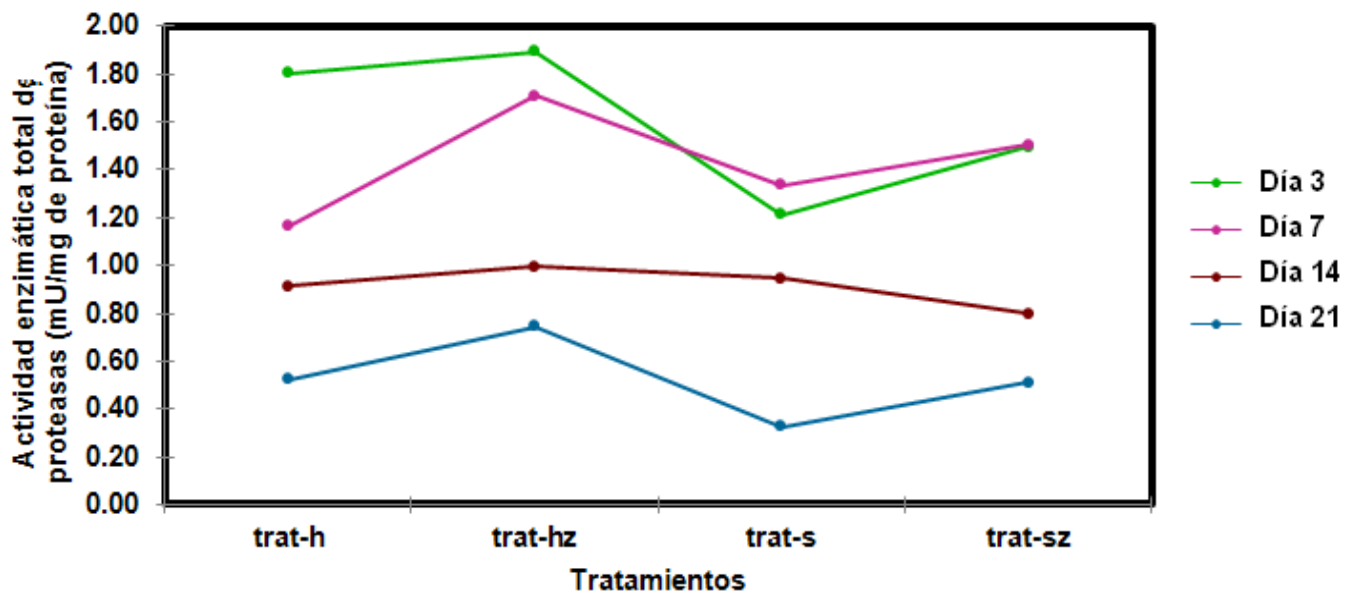
**Figura 38** Promedio ( $\bar{x}$ ) de **actividad proteolítica total de proteasas** (U/mg de proteína) contra tiempo de maduración para cada tratamientos.

Relacionado a lo anterior, en la *Figura 39* nos presenta de manera más sencilla que los valores de actividad son mayores en la maduración húmeda en comparación de la maduración seca y confirma que las muestras con zilpaterol presentan mayor actividad endógena.



**Figura 39** Promedio total de la suma de promedios de **actividad proteolítica total de proteasas** ( $x$ ) de los días 3, 7, 14 y 21 contra tratamientos. \* trat-h: maduración húmeda sin zilpaterol; trat-hz: maduración húmeda con zilpaterol; trat-s: maduración seca sin zilpaterol; trat-sz: maduración seca con zilpaterol.

En la *Figura 40* muestra que la actividad total de las proteasas disminuye conforme pasa el tiempo en los tratamientos y en los día 3 y 7 se nota el aumento de esta actividad catalítica.



**Figura 40** Valores promedio de **actividad proteolítica total de proteasas** (U/mg de proteína) de 6 muestras de carne contra tratamientos para los diferentes tiempos de maduración. \* trat-h: maduración húmeda sin zilpaterol; trat-hz: maduración húmeda con zilpaterol; trat-s: maduración seca sin zilpaterol; trat-sz: maduración seca con zilpaterol.

El método de cuantificación de actividad enzimática mediante el uso de gelatina succinilada se realizó con la finalidad de evaluar la actividad endógena total es decir tanto calpaínas y catepsinas. La gelatina succinilada bloquea a los grupos amino libres en la gelatina que de otro modo han reaccionado con el TNBS para dar una mayor lectura en la medición (Baragi *et al.*, 2000).

La metodología anteriormente descrita utiliza una solución de borato de sodio a un pH de 8.5, en este caso tenemos que contemplar que esta medida esta por encima de las condiciones anteriormente ensayadas

Se vuelve a presentar que para el día 0 la actividad es mucho mayor debido a que actúan las proteasas neutras, mientras que en el día 1 ocurre un descenso de actividad total y como ya se mencionó la actividad de las calpaínas es un poco más rápida y por ende la degradación es más rápida por lo que esto se ve reflejado en las mediciones. Para el día 3 y 7 se muestra ese comportamiento que se observó en las actividades de proteasas neutras y ácidas, en las cuales hubo un aumento de la actividad, para las muestras en húmedo del día 3 y para las muestras en seco se efectúa en el día 7.

Finalmente para los días 14 y 21 ocurre la disminución de la actividad de las proteasas total, y en todos los días de maduración las muestras con zilpaterol presentaron más actividad que las muestras sin el clorhidrato de zilpaterol debido a ese aumento de volumen en la masa muscular y mayor espacio para las proteínas sarcoplásmicas en general.

Con un valor de  $r^2$  de 0.959 en el análisis de varianza (*Tabla XIII*) para los valores de actividad gelatinolítica, indican una linealidad debido a la evaluación de las proteasas neutras y ácidas en el mismo ensayo. De igual manera que en la reacción de Anson, el análisis de Duncan (*Tabla XIV*) indica que si hay diferencia entre los tratamientos y tipo de maduración a excepción de esa misma interacción entre muestras con zilpaterol en maduración seca contra muestras sin zilpaterol en maduración húmeda.

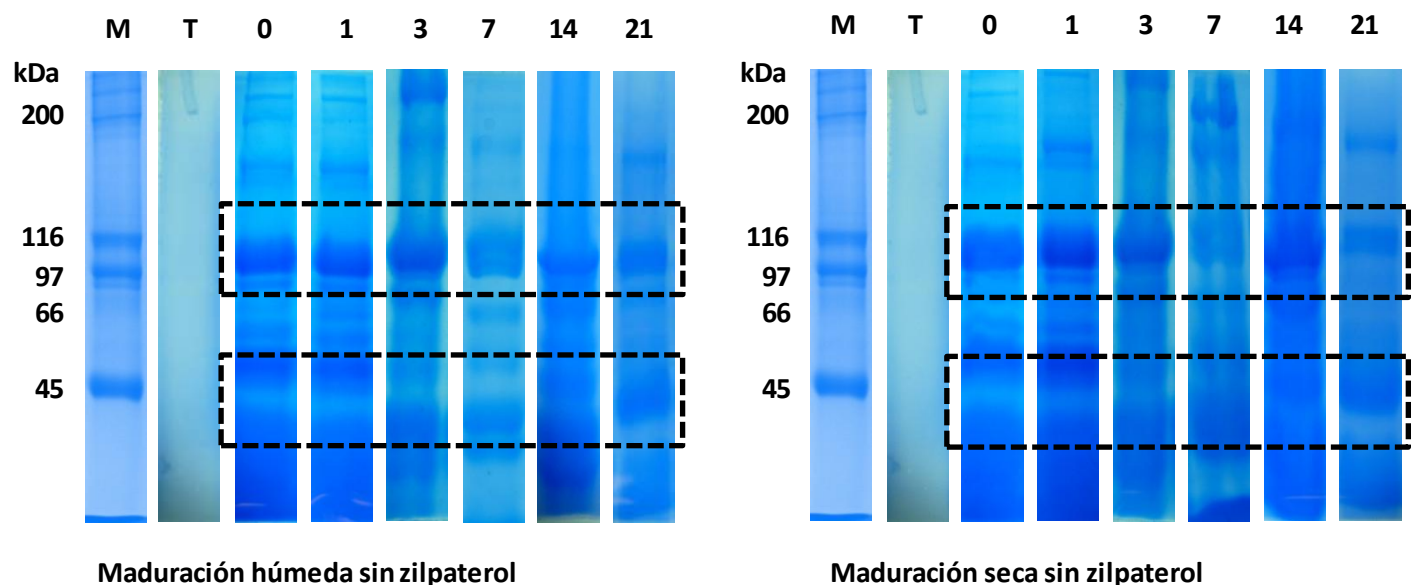


## 6.5.6 Zimogramas

Se utilizó una técnica de zimografía para obtener resultados visibles y como un método cualitativo para complementar las otras técnicas cuantitativas. Esta técnica nos permite mediante una electroforesis en geles de acrilamida copolimerizada (PAGE), con un sustrato embebido (caseína y gelatina) y posterior a una tinción, observar zonas claras en gel donde se llevó la proteólisis.

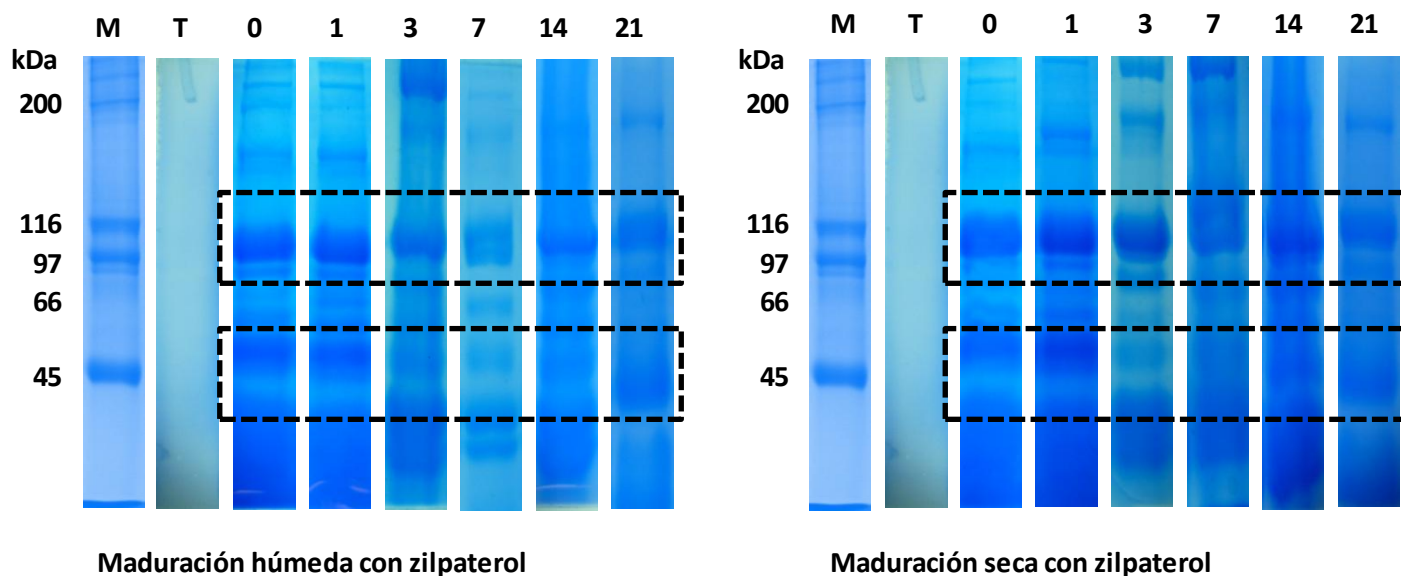
Todos los zimogramas mostrados más adelante contienen diferentes muestras corridas en diferentes días y con el objetivo facilitar la visibilidad de las bandas donde ocurrió la proteólisis, en los siguientes zimogramas se muestran las bandas de actividad indicadas con líneas punteadas.

En la *Figura 41* nos muestra zimogramas en sustrato gelatina para las muestras sin zilpaterol para la maduración húmeda (derecha) y maduración seca (izquierda). Se observan dos zonas de proteólisis, una cerca de los 97 kDa provocada por las proteasas neutras y la segunda cerca de los 43 kDa por las proteasas ácidas.



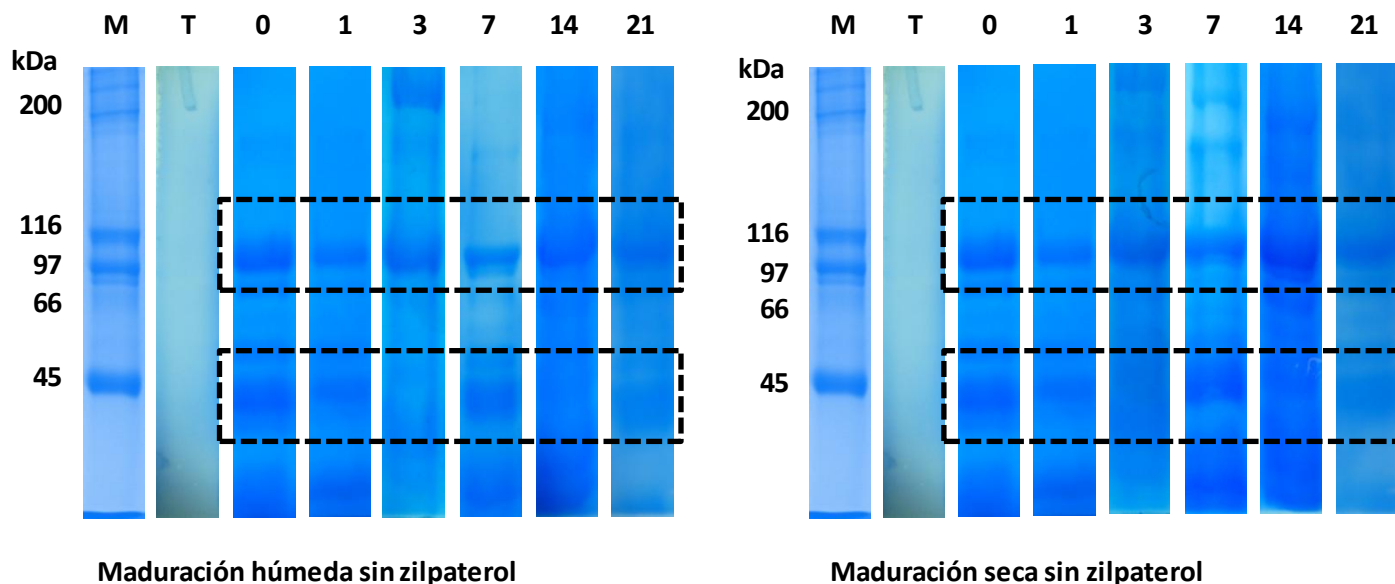
**Figura 41** Zimogramas al 10 % con **gelatina** como sustrato. Los números en la parte superior indican los diferentes días de maduración para muestras de carne **sin zilpaterol**, (izquierda) maduración seca, (derecha) maduración húmeda. SDS-PAGE al 10 %. T; Control positivo de tripsina.

La *Figura 42* nos muestra los zimogramas de las muestras de carne que fueron tratadas con zilpaterol en sustrato gelatina para la maduración húmeda (derecha) y maduración seca (izquierda), en ellas se puede observar el mismo perfil de bandas, con una ligero incremento en la intensidad en la proteólisis con respecto a los zimogramas que contienen muestras sin zilpaterol.



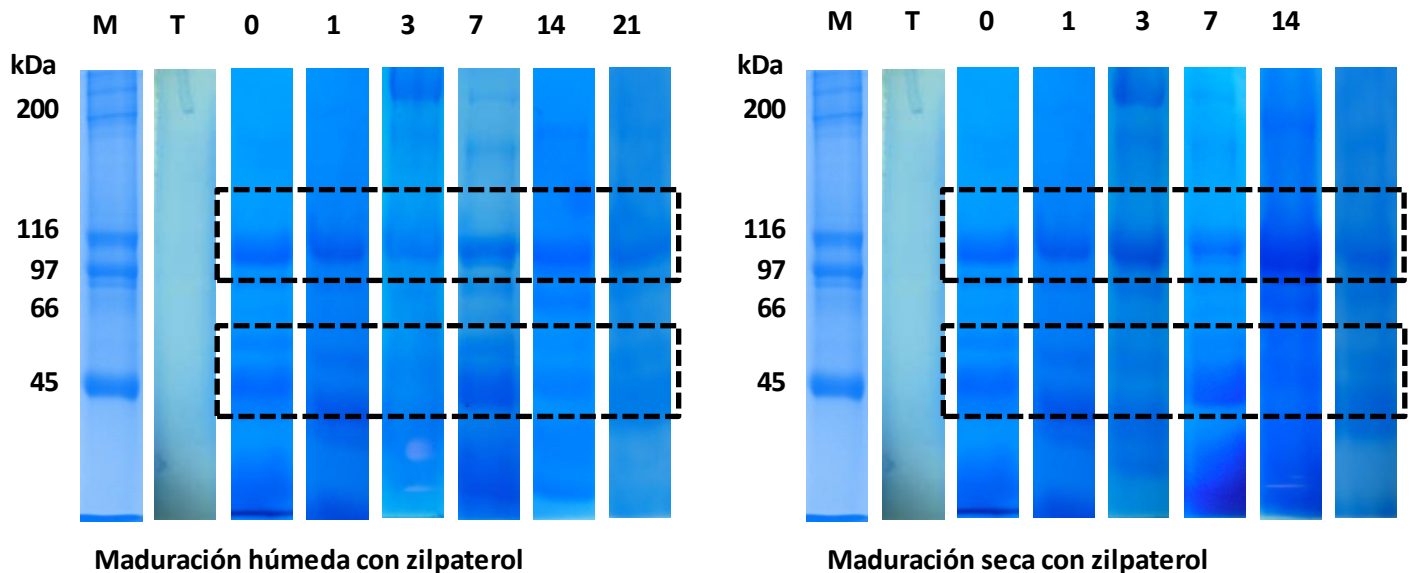
**Figura 42** Zimogramas al 10 % con **gelatina** como sustrato. Los números en la parte superior indican los diferentes días de maduración para muestras de carne **con zilpaterol**, (izquierda) maduración seca, (derecha) maduración húmeda. SDS-PAGE al 10 %. T; Control positivo de tripsina.

Se realizó otras corridas de zimogramas con las muestras sin y con zilpaterol, utilizando caseína como sustrato. En la *Figura 43* se observa las muestras de carne tratadas sin zilpaterol para cada uno de los diferentes días de maduración.



**Figura 43** Zimogramas al 10 % con **caseína** como sustrato. Los números en la parte superior indican los diferentes días de maduración para muestras de carne **sin zilpaterol**, (izquierda) maduración seca, (derecha) maduración húmeda. SDS-PAGE al 10 %. T; Control positivo de tripsina.

Por último, en la *Figura 44* se muestra los zimogramas en sustrato de caseína para las muestras de carne tratadas con zilpaterol para los diferentes días de maduración.



**Figura 44** Zimogramas al 10 % con **caseína** como sustrato. Los números en la parte superior indican los diferentes días de maduración para muestras de carne **con zilpaterol**, (izquierda) maduración seca, (derecha) maduración húmeda. SDS-PAGE al 10 %. T; Control positivo de tripsina.

Los sustratos utilizados en los zimogramas en este trabajo son proteínas que contienen, principalmente, residuos de aminoácidos lisina y arginina lo que los hace más susceptible a la hidrólisis por proteasas y además son sustratos muy económicos y se encuentran en la naturaleza. Además los zimogramas en sustrato gelatina se observa mayor intensidad en las bandas de actividad, debido a que la gelatina presentan mayor cantidad de arginina y lisina (9.0 g/100 g y 4.4 g/ 100 g gelatina) que en comparación en los zimogramas en sustrato caseína el cual contiene respectivamente 3.16 y 6.04/ 100 g caseína, lo cual al haber mayor cantidad de sustrato permite un mayor actividad y una banda de mayor intensidad (Kupai, 2010).

Sólo se utilizaron 2 muestras de carne para cada tipo de tratamiento, es decir para las muestras sin zilpaterol se ocuparon la muestra 1 y 4 y para las muestras con zilpaterol se ocuparon la muestra 7 y 10. Esto con la finalidad de observar las bandas de actividad de dos muestras aleatorias ya que es un método cualitativo y en los anteriores métodos de cuantificación de actividad de proteasas revelaron que hay actividad en las 6 muestras sin zilpaterol y 6 con zilpaterol.

La condición de pH 7.6 se hizo para aproximarse al pH cuando el animal está vivo, las calpaínas son las que presentan mayor actividad (banda visible) y en el caso de las catepsinas las cuales no están en su pH óptimo, la actividad es baja, la catepsina D se inactiva por altas concentraciones de sal y las catepsinas se liberan cuando se degrada la membrana de los lisosomas durante el descenso de pH (Chambers *et al*, 1994).

Las zonas de las bandas de actividad son muy parecidas visualmente y hasta llegan a confundirse debido al contraste de la luz, pero las zonas más visibles aparentemente son de acuerdo a lo reportado en la literatura (*Figura 23*) son las de la calpaína I, II y el complejo debido a que estas proteasas están en sus condiciones adecuadas para realizar su actividad. Por debajo de los 48 kDa se aprecia una banda de menor intensidad debido al efecto de las catepsinas H y L. En el caso de la catepsina B que son proteasas con un valor de actividad de pH 5.5, estas presentarían un actividad muy baja y como ya se ha mencionado la catepsina D se inactiva por la presencia de NaCl y no hay bandas de proteólisis.

Las bandas presente aproximadamente a 80 kDa son intensos en el día 0, 1 y 3 debido a que el pH desciende de 6.8 hasta 5.5 y las proteasas neutras entran a un proceso de autólisis, por lo que del día 7 al 21 son poco visibles. Por debajo de los 45 kDa para los días 0 y 1 se observan ligeras bandas de actividad provocadas por catepsinas H, que al pasar los días 3, 7, 14 y 21 entran las demás proteasas ácidas que tiene una cinética más lenta que las calpaínas y además no se degradan al actuar por lo que las bandas de actividad prevalecen en los zimogramas con los dos sustratos.

## **VII. Conclusiones**

La hipótesis planteada se cumplió, además de los criterios contemplados que permiten mayor actividad. Además se observó que el agua y el empaque al vacío son fundamentales para obtener una mayor actividad de proteasas neutras y ácidas.

La actividad de proteasas neutras y ácidas disminuye con el tiempo al que son expuestas en maduración y como se tenía previsto en la hipótesis las muestras de carne con mayor actividad son las que se maduran en condiciones en húmedas y con zilpaterol.

El análisis estadístico de Duncan establece que no hay diferencia entre los valores de actividad en ambos tipos de maduración (húmeda y seca) y tratamientos (con y sin zilpaterol), solo existe una excepción en la interacción de la maduración seca con zilpaterol y húmeda sin zilpaterol en la que si hay diferencia estadística.

El perfil de bandas de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas son similares a los pesos moleculares reportados en el trabajo de González en el 2003, la identidad de las bandas tendrán que corroborarse por secuenciación de péptidos.

Se encontró las condiciones necesarias para llevar acabo la actividad enzimática de proteasas neutras y ácidas en zimogramas en sustrato caseína y gelatina, en el cual el cloruro de calcio juega un papel importante para la activación de las proteasas.

## **VIII. Perspectivas futuras**

A partir de este trabajo de tesis de licenciatura las perspectivas se orientan a las siguientes direcciones.

Lo primero que se tendrá que trabajar es con la repetibilidad y reproducibilidad de los resultados y metodologías empleadas (pH, extracción de proteínas, cuantificación de proteínas, actividad proteolítica, perfil de proteínas y zimogramas) para hacer futuras comparaciones. También se podría disminuir la cantidad de muestras de carne de 12 a 6 (3 con zilpaterol y 3 sin zilpaterol) para optimizar tiempos, costos y tener más replicas en las mediciones, ya que la parte crítica del

ensayo es el descongelamiento de las muestras de carne así como las extracciones de proteína por lo que tener muchas muestras se pueden tener descuidos en este proceso.

Este trabajo abrió y concluyó un proyecto de tesis de licenciatura en la cual colaboró la Q.A. Jessica Josefina Hurtado R. cuyo título de tesis fue “Evaluación de la actividad de calpaína, calpastatina, elastina, colágeno y bases volátiles en maduración de carne de bovino, durante el consumo de  $\beta$ -adrenérgicos”, en el cual se encontró que el zilpaterol tiene un efecto significativo en comparación de la carne sin zilpaterol en la proteólisis de elastina, colágeno, catepsinas, calpaínas y calpastatinas.

Lo más importante y que no se realizó en este trabajo es observar cómo repercute estas condiciones de maduración y tratamientos con y sin zilpaterol en la calidad de la carne hablando en cuestiones de sus propiedades organolépticas que deben ser adecuadas para su consumo humano como el color, aroma, sabor, terneza, características sensoriales y estructura de fibras musculares.

En el caso del color se realizaría prueba colorimétricas por espectrofotómetro y se mediría la mioglobina, oximioglobina y metmioglobina. También se ocuparía una escala Pantone® para observar color de la muestra directamente. En el aroma se tendría que usar espectrometría de masas para obtener un perfil de los compuestos y para el sabor se tendría que contemplar los lípidos presentes en la carne separarlos y obtener un perfil por cromatografía líquida. Para medir la terneza se usaría un texturómetro que nos indicaría la fuerza que se requiere en las muestras para su deformación. Se conformaría un panel para la evaluación de diversas características como color, forma, marmoleado, textura, etc. tanto para carne cruda como cocida o asada. Y para el estudio de las estructuras fibrilares del músculo se usaría un microscopio electrónico u óptico para observar las estructuras fibrilares.

## IX Referencias

- Aberle, E.D., Forrest J.C., Gerrard D.E., Mills E.W., Hedrick H.B., Judge M.D. y Merkel R.A. (2001). **Principles of meat science**. Fourth Edition. Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque, Iowa.
- Anaya, A. D. L.; G. M. Guevara y S. O. Argudin (2005). **Comportamiento productivo de ovinos engordados en corral utilizando clorhidrato de zilpaterol en el alimento**. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. Vol. 3, Núm. 1.
- Andújar G., Pérez D. y Venegas O. (2003). **Química y Bioquímica de la Carne y los Productos Cárnicos**. Editorial Universitaria. Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia.
- Aranda, M.V., N. Brave y R. Casagrande. (2002). **Colesterol en bovinos**. *INTA*.
- Arp T.S., Howars S.T., Woerner D.R., Scanga J.A., Mckenna D.R., Kolath W.H., Chapman P.L., Tatum J.D. y Belk K.E. (2014). **Effects of dietary ractopamine hydrochloride and zilpaterol hydrochloride supplementation on performance, carcass traits, and carcass cutability in beef steers**. *Journal of Animal Science*. Vol. 92. Issue 2. Pages: 836-843.
- Avendaño-Reyes L., Torres-Rodríguez V., Meraz-Murillo F.J., Pérez-Linares C., Figueroa-Saavedra F. y Robinson P.H. (2006). **Effects of two  $\beta$ -adrenergic agonists on finishing performance, carcass characteristics, and meat quality of feedlot steers**. *Journal Animal Science*. Vol. 84 Issue 12. Pages: 3259-3625.
- Baragi, V.M., Shaw, B.J., Renkiewicz R.R., Kuipers, P.J., Welgus, H.G., Mathrubutham, M., Cohen, J.R., Rao, S.K. (2000). **A versatile assay for gelatinases using succinylated gelatin**. *Matrix Biology*. 19:267-273.
- Bianchi, G.; O. Bentancur y C. Sañudo (2004). **Efecto del tipo genético y del tiempo de maduración sobre la terneza de la carne de corderos pesados**. *Agrociencia*, Vol. 8, Núm. 1.
- Bickerstaffe, R. (1996). **Proteases and Meat Quality**. *The Proceeding of the New Zealand Society of Animal Production*. 56.
- Boles J.A y Pegg R. (2011). **Mundo lácteo y cárnico. Color de la carne**. Universidad de Montana y Saskatchewan.
- Campbell, K. P. & MacLennan, D. H. (1981). **Purification and characterization of the 53,000 dalton glycoprotein from the sarcoplasmic reticulum**, *J. Biol. Chem.*, 256, 4626.
- Cañeque, V. y C. Sañudo (2000). **Metodología para el estudio de la calidad de la canal y de la carne en rumiantes**. Ministerio de Ciencia y Tecnología-INIA, Madrid.
- Carballo, B. y López de Torre, G. (1991). **Manual de bioquímica y tecnología de la carne**. Editorial Madrid Vicente. Madrid.
- Casales G. X., (2012). **Localización y caracterización de la actividad proteolítica de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042**. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos. México. D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.
- 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**, *Agronomía Mesoamericana*. Vol. 15, Núm. 2.

- Chambers, J.J., Reville, J.W. y Zeece, G.M. (1994). **Lysosomal integrity in postmortem bovine skeletal muscle.** *Sciences des Aliments*. 14:441-457.
- Consumo Animal. Especificaciones Zoonosológicas de los Productos Alimenticios para Consumo Animal. **Norma Oficial Mexicana NOM-061-ZOO-1999.** *Diario Oficial de la Federación*. 11 de octubre de 2000.
- Cottin, P., Poussard, P., Desmazes, D., Gergescauld, H. y Ducastaing, A. (1991). **Free calcium and calpain I activity:** *Biochimica et Biophysica Acta* 1079: 139-140.
- Cruz C. A. (2011). **Caracterización parcial de una proteasas alcalina a partir de hongos filamentosos implicados en el deterioro de documentos históricos.** Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.
- Dirección General de Epidemiología. **Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Intoxicación Alimentaria Asociada al Consumo de Carne Contaminada con Clembuterol.** Secretaría de Salud. Disponible en: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig\\_epid\\_manuales/05\\_2012\\_Manual\\_Clembuterol\\_1nov12.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig_epid_manuales/05_2012_Manual_Clembuterol_1nov12.pdf) Consulta: 11 de enero de 2016.
- Directiva 96/22/CE del Consejo. **Por la que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias  $\beta$ -agonistas en la cría de ganado y por la que se derogan las Directivas 81/602/CEE, 88/146/CEE y 88/299/CEE.** Unión Europea. 29 de abril de 1996. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/home.html> [Último acceso 26 de Enero del 2015].
- Domínguez-Vara I. A., Mondragón-Ancelmo J., González M., Salazar-García J., Bórquez-Gastelum J. L. y Aragón-Martínez A. (2010). **Los  $\beta$ -agonistas adrenérgicos como modificadores metabólicos y sus efectos en la producción, calidad e inocuidad de la carne de bovinos y ovinos.** *CIENCIA ergo sum*, Vol. 16-3. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Dransfield, E. (1994). **Optimization of tenderization aging and tenderness.** *Meat Science*, 36:105-121.
- Drennan, W. G. (1994). **Clembuterol not approved for Use in Cattle in Canada,** *Canadian Veterinary Journal*. 35.
- Ekpe, E. D.; J. A. Moibi y R. J. Christopherson (2000). **Beta-Adrenergic Receptors in Skeletal Muscles of Ruminants: Effects of Temperature and Feed Intake,** *Canadian Journal of Animal Science*. Vol. 80, Núm. 20.
- Enciclopedia alfabética del campo. **Bovinos.** Disponible en: [http://www.ediciona.com/portafolio/document/4/6/1/5/bovinos\\_5164.pdf](http://www.ediciona.com/portafolio/document/4/6/1/5/bovinos_5164.pdf)
- FAO Food Agriculture Organization). Animal Production y Health. (2014). **Meat y Meat Products.** [En línea] (Actualizado al 1 de Marzo 2013).
- Fennema, D.R. (1996). **Food chemistry.** 3th Ed. Marcel Dekker Inc. New York.
- Ferguson, S. (2001). **Evolving Concepts in G Protein Coupled Receptor Endocytosis: The Role in Receptor Desensitization and Signaling,** *Pharmacological Reviews*. 53.
- Freedom of Information Summary Original New Animal Drug Application. NADA 140-863. **Ractopamine hydrochloride (PAYLEAN®).** Food and Drug Administration. December 22, 1999.
- Freedom of Information Summary Original New Animal Drug Application. NADA 140-973. **Clenbuterol hydrochloride (Ventipulmin® Syrup).** Food and Drug Administration. May 11, 1998.



- Freedom of Information Summary Original New Animal Drug Application. NADA 141-284. **Zilpaterol hydrochloride (Zilmax®)**. Food and Drug Administration. February 29, 2008.
- Ganong, W. F. (2001). **Fisiología Médica**. 18ª edición en español, *Manual Moderno*. México, D. F.
- Garcés, Y. P.; M. R. Zinn; A. M. Rebolledo y C. C. Abreu (1998). **Efectos del clorhidrato de zilpaterol sobre la ganancia de peso y características de la canal de toretes finalizados en pastoreo**, en Memoria de la Reunión Científica de la XXXIV *Reunión Nacional de Investigación Pecuaria*. Querétaro, México.
- García-Barrientos R. (2007). **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.
- Garriz C. A. (2011). **Calidad organoléptica de la carne vacuna, influencia de factores biológicos y tecnológicos**. *Disertación Jornada Ganadería Vacuna*. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Garza, F. J. D.; C. J. H. Ramírez; T. H. Montgomery y F. J. Garza (1997). **Comportamiento productivo y características de canal en vaquillas de engorda suplementadas con zilpaterol en condiciones comerciales**. *XXXII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria*. Veracruz, México.
- Gigena M. C. (2008). **Animal Welfare y la calidad de carne de novillos en Uruguay con diferentes sistemas de terminación y manejo previo a la faena**. Tesis de Doctorado. Departamento de Ciencia Animal. Universidad Politécnica de Valencia.
- González Tenorio R. (2003). **Propiedades fisicoquímicas y de textura del músculo Brachiocephalicus de bovino marinado con cloruro de calcio**. Tesis para obtener el título de Maestro en Alimentos. Instituto de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tulancingo, Hidalgo.
- Hildrum, K.I., Solvang, M., Nielsen, B.N., Froystein, T. y Berg, J. (1999). **Combined effects of chilling rate, low voltage electrical stimulation and freezing on sensory properties of bovine M. Longissimus dorsi**. *Meat Science* 52 (1):1-7.
- Hilton G.G., Montgomery J.L., Krehbiel C.R., Yates D.A. y Hutcheson J.P. et al. (2009). **Effects of feeding zilpaterol hydrochloride with and without monensin and tylosin on carcass cutability and meat palatability of beef steers**. *J. Anim. Sci.*, 87: 1394-1406. <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Estudios%20de%20situacin%20actual%20y%20perspectiva/Attachments/3/sitbov06.pdf> [Último acceso el 26 de Enero 2016]
- Hyung-Keun K., Hyuk-Min L., Kyong-Hwa O., Hyo-Jin Y., Ji-Seon J. y Sook-Kyung K. (2012). **Interpretation of protein quantitation using the Bradford assay: Comparison with two calculation models**. *ELSEVIER. Analytical Biochemistry* 434 (2013) 178-180.
- Jiménez, F. (2000). **Relevant factors in strategies for fat reduction in meat products**. *Trends in Food Science y Technology* 11:56-66.
- Kinbara, Y.; Sorimachi, H.; Ishiura, S.; Susuki, K. (1998). **Skeletal muscle specific Calpain p94**. *Biochemical Pharmacology* 56(4): 415-420.
- Koohmaraie, M., Whipple, G. y Crouse, J.D. (1990). **Acceleration of postmortem tenderization in lamb and Brahman-cross beef carcasses through infusion of calcium chloride**. *Journal of Animal Science* 68:1278.
- Koohmaraie, M. (1992). **Effect of pH, temperature and inhibitors on autolysis and catalytic on bovine skeletal muscle m-calpain**. *Journal of Animals Science* 70: 3071-3080.

- Koohmaraie, M.; S. D. Shackelford y T. L. Wheeler (1996). **Effects of a  $\beta$ -Adrenergic Agonist (L644, 969) and Male Sex Condition on Muscle Growth and Meat Quality of Callipyge Lambs**, *Journal Animal Science*. 74.
- Kupai, K., Szucs, G., Cseh, S., Hajdu, I., Csonka, C., Csont, T. y Ferdinandy, P. (2010). **Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography**. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* Vol. 61, pp. 205-209.
- LAPISA. LAPI-RACTO®. Disponible en: <http://www.lapisa.com/sa/ft/porcinos/FichaTecLapiRactoPor.pdf> [Último acceso el 26 de Enero 2016].
- Lean I. J., John M. Thompson J. M. y Dunshea F. R. (2014). **A Meta-Analysis of Zilpaterol and Ractopamine Effects on Feedlot Performance, Carcass Traits and Shear Strength of Meat in Cattle**. *Journal PLOS ONE* 9(12): e115904.
- Li, Y. Z.; B. T. Christopherson; Ly y J. A. Moibi (2000). **Effects of a Beta-Adrenergic Agonist (L-644,969) on Performance and Carcass Traits of Growing Lambs in a Cold Environment**, *Canadian Journal of Animal Science*. Vol. 80, Núm. 4.
- López, P. Ma. G.; L. Ma. S. Rubio y M. S. E. Valdés (2000). **Efecto del cruzamiento, sexo y dieta en la composición química de la carne de ovinos Pelibuey con Rambouillet y Sulffolk**. *Veterinaria México*. Vol. 31, Núm 1.
- López, Z. R.; S. O. Argudín y A. D. Anaya (2003). **Efecto de un  $\beta$ -adrenérgico solo y combinado, sobre aumento de peso, grasa dorsal y área de Rib Eye en ovinos Tabasco**. *Memorias XXVII Congreso Nacional de Buiatría*. pp. 240-241.
- López D. M. (2015). **Análisis de la actividad de catepsinas B, B+L y H en carne cerdo en diferentes genéticas**. Tesis de maestría. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia.
- Medical Biochemistry Page. Disponible en: <http://themedicalbiochemistrypage.org/es/fatty-acid-oxidation-sp.php>. Consulta: 11 de enero 2016.
- Mersmann, H. J. (1998). **Beta-Adrenergic Receptor Modulation of Adipocyte Metabolism and Growth**, *Journal Animal Science*. 80: (E. Suppl. 1): E24-E29.
- Mersmann, H. J. (2002). **Overview of the Effects of  $\beta$ -Adrenergic Receptor Agonists on Animal Growth Including Mechanisms of Action**, *Journal Animal Science*. 76.
- Mills, S. y H. J. Mersmann (1995). **Beta- Adrenergic Agonists, their Receptors, and Growth: Special Reference to Peculiarities in Pigs**, en Smith, S. B. y D. R. Smith (eds.). *The Biology of Fat in Meat Animals: Current Advances*. *American Society of Animal Science*. Champaign. USA.
- Mitchell, G. A. y G. Dunnavan (1998). **Illegal Use of  $\beta$ -Adrenergic Agonists in the United States**, *Journal Animal Science*. 76.
- Mohammadi, M.; M. Abazari y M. Nourozi (2006). **Effects of Two Beta-Adrenergic Agonists on Adipose Tissue, Plasma Hormones and Metabolites of Moghani Ewes**, *Small Ruminant Research*. 63.
- Mondragón, A. J. (2008). **Efecto de la concentración de clorhidrato de zilpaterol sobre el crecimiento, características de la canal y calidad de la carne de ovinos en engorda intensiva**. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Montgomery J.L., Krehbiel C.R., Cranston J.J., Yates D.A. y Hutchison J.P *et al.*, (2009a). **Dietary zilpaterol hydrochloride. Feedlot performance and carcass traits of steers and heifers**. *J. Anim. Sci.*, 87: 1374-1383.

- Montgomery J.L., Krehbiel C.R., Cranston J.J., Yates D.A. y Hutchison J.P. *et al.*, (2009b). **Effects of dietary zilpaterol hydrochloride on feedlot performance and carcass characteristics of beef steers fed with and without monensin and tylosin.** *J. Anim. Sci.*, 87: 1013-1023.
- Morales D. y Gallo L. E. (2006). **Plataformas Proteómicas: Métodos físico-químicos en Biotecnología.** *Instituto de Biotecnología.* UNAM.
- Moribo, H., Ertbjerg, P., Anderson, m., Barton, G.P. y Moller, A.J. (1999). **Electrical stimulation of pigs: Effects on pH fall, meat quality and Cathepsin B L activity.** *Meat Science* 52(2): 179-187.
- Morrissey, P.A., P.J.A. Sheehy, K. Galván, J.P. Ferry y D.J. Buckley. (1998). **Lipid stability in meat and meat products.** *Meat Science* 49, Suppl 1: S73-S86.
- Morton, J.D., Bikerstaffe, R., Kent, M.P., Dransfield, E. y Keeley, G.M. (1999). **Calpain-Calpastatin and toughness in M. longissimus from electrically stimulates lamb and beef carcasses.** *Meat Science* 52(1):71-79.
- MSD Animal Health. Disponible en: [http://www.msd-salud-animal.mx/productos/zilmax/020\\_informaci\\_n\\_del\\_producto.aspx](http://www.msd-salud-animal.mx/productos/zilmax/020_informaci_n_del_producto.aspx).
- Nourozi, M.; M. Abazari; M. Mohammadi; M. Raisianzadeh y A. ZareShahne (2005). **Effect of Two Beta-Adrenergic Agonists on Performance and Carcass Composition of an Iranian Native Breed of Sheep,** *Pakistan Journal of Nutrition.* Vol. 4, Núm. 6.
- Onega M. E. (2003). **Evaluación de carnes frescas: aplicación de técnicas analíticas, instrumentales y sensoriales.** Facultad de Veterinaria. Departamento de Nutrición y de Bromatología III. Universidad Complutense de Madrid. ISBN: 84-669-2165-6.
- Parrish F.C. (2008). *Beef Facts: Aging of beef.* *Meat Science. Department of Animal Science,* Iowa State University. FS/MS011. Pp 1-3.
- Pearson, A.M. y Gillet T.A. (1999). **Processed meats.** Third edition. Aspen Publishers Inc. Gaithersburg, Maryland.
- Penny, I.F. (1984). **Enzimología de la maduración en: Avances de la ciencia de la carne.** Ralston Lawrie. Pp. 149-181. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Pérez Espíritu J. I. (2010). **Efecto del zilpaterol y la ractopamina sobre las características contráctiles, metabólicas y morfológicas en fibras musculares esqueléticas del bovino.** Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. México, D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.
- Piironen, V., J. Torvo y A.M. Lampi. (2002). **New data for cholesterol contents in meat, fish, milk, eggs and their products consumed in Finland.** *Journal of Food Composition and Analysis.* 15: 705-713.
- Ponce, A. E. (2006). **Cambios bioquímicos pre y postmortem.** Cap. 4. En: Ciencia y tecnología de carnes. Hui, Y.H., Guerrero, L.I. y Rosmini, R.M. Editorial Limusa, S.A. de C.V., México. 111-131.
- Rodríguez 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. México. D.F. Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Química.
- Ruiz A. (2013). **Estudio de las enzimas fenoloxidasas, proteasas y peroxidasas presentes en Rhizopus oryzae ENHE.** Tesis de maestría. Departamento de biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.

- Salinas, C. J.; R. G. Ramírez; M. M. Domínguez; C. R. Palomo y A. V. H. López (2004). **Influence of Zilpaterol Hydrochloride on Growth and Carcass Characteristics of Pelibuey Lambs**, *Journal of Applied Animal Research*. 26.
- Salinas, C. J.; M. M. Domínguez; M. R. Díaz; B. P. Cruz; G. M. F. Montaña y A. C. Arzola (2006). **Effect of Duration of Zilpaterol Hydrochloride Treatment on Carcass Characteristics and Weight Gain in Grazing Pelibuey Lambs**, *Journal Applied Animal Research*. 29.
- Salinas-Chavira J., Domínguez-Muñoz M., Díaz-Martínez R., Cruz-Bautista P., Montaña-Gómez M.F. y Arzola-Álvarez C. (2006). **Effect of duration of zilpaterol hydrochloride treatment on carcass characteristics and weight gain in grazing Pelibuey lambs**. *Journal of Applied Animal Research*. Vol 29. Issue 1. P.p. 25-28.
- Sancho, R., Jaime, I., Beltrán, A.J. y Roncales P. (1997). **Degradation of actin by cathepsins in beef fibers stored at 20°C**. *Journal of Muscle Foods* 8:137-146.
- Serra, X., M. Gil, M. Gispert, L. Guerrero, M.A. Oliver, C. Sañudo, M.M. Campo, B. Panea, J.L. Olleta, R. Quintanilla y J. Piedrafita. (2004). **Characterization of Young Bulls of the Bruna del Pirineus cattle breed (selected from old Brown Swiss) in relation to carcass, meat quality and biochemical traits**. *Meat Science* 66:425-436.
- Serrano, C. J.; A. C. Ponferrada; R. C. Carceles y P. E. Escudero (2002). **Fármacos antitusígenos y broncodilatadores en Farmacología y Terapéutica Veterinaria**. McGraw-Hill. Interamericana. España.
- Shackelford, S. D.; J. W. Edwards; E. K. Smarr y J. W. Savell (1992). **Retail Cut Yields of Rambouillet Wether Lambs Fed the  $\beta$ -adrenergic Agonist L644,969**, *Journal Animal Science*. 70.
- Smith, D. J. y G. D. Paulson (1998). **Distribution, Elimination and Residues of [14C] Clembuterol HCL in Holstein Calves 1, 2**, *Journal Animal Science*. 75.
- Soria, J. L. B. y M. J. A. Arias (1997). **Señalización celular por segundos mensajeros, en Curso Internacional Precongreso "Actualización en Fisiología. XI Congreso Nacional de Temas Fisiológicos**. Ed. Sociedad Nacional de Temas Fisiológicos.
- Sorimachi, H.; Ishiura, S.; Susuki, K. (1997). **Structure and physiological function of calpains**. *Biochemical Journal* 328: 721-732.
- Sorimachi, H. (1999). **Discusión sobre generalidades de las calpaínas**. *World Wide Web San José*. Comunicación Personal.
- Stoller, G. M.; H. N. Zerby; S. J. Moeller; T. J. Baas; C. Johnson y L. E. Watkins (2003). **The Effect of Feeding Ractopamine (Paylean) on Muscle Quality and Sensory Characteristics in Three Diverse Genetic Lines of Swine**, *Journal of Animal Science*. 81. American Society of Animal Science.
- Strydom P.E., Frylinck L., Montgomery J.L. y Smith M.F. (2009). **The comparison of three  $\beta$ -agonists for growth performance, carcass characteristics and meat quality of feedlot cattle**. *Meat Science*. Vol. 81. Issue 3. Pages: 557-564.
- Sumano, L. H.; C. L. Ocampo y O. L. Gutiérrez (2002). **Clembuterol y otros  $\beta$ -agonistas, ¿una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública?** *Veterinaria México*. Vol. 33, Núm. 2.
- Suzuki, K. (1999). **Discusión sobre generalidades de las calpaínas**. *World Wide Web San José*. Comunicación Personal.
- Swatland, H.J. (1991). **Connective tissue distribution patterns in beef detected by ultraviolet fiber optics**. *Lebensm u.- Technol.*, 29:272-277.

- Takahashi, K. (1996). **Structural weakening of skeletal muscle tissues during post-mortem ageing of meat: The non-enzimatic mechanism of meat tenderization.** *Meat Science* 43:67-80.
- Tehver R. y Thirumalai D. (2010). **Rigor to Post-Rigor Transition in Myosin V: Link between the Dynamics and the Supporting Architecture.** *Cell Press. Structure* 18. 471-481.
- Thompson, J. (2002). **Managing meat tenderness.** *Meat Science* 62: 295-308.
- U.S. Meat. **Vida útil de carnes. Efectos de empaque y conservación por el frío.** En línea. Disponible en: <http://www.usmef.org.mx/USmeat2/PDFs/P7%20vida%20util%20empacado%20preservacion%20por%20frio.pdf>. Consultado en enero de 2015.
- Vallejos, A. P.; J. C. A. Zaragoza y J. A. F. Parres (2007). **Intoxicación por clenbuterol,** *Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica.* Vol. 18, Núm. 24.
- Van Hoof, N.; R. Schilt; E. Van der Vlis; P. Boshuis; M. Van Baak; A. Draaijer; K. De Wasch; M. Van de Wiele; J. Van Hende; D. Courtheyn y H. De Brabander (2005). **Detection of Zilpaterol (Zilmax ®) in Calf Urine and Faeces with Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry.** *Analytical Chemical Acta.* 529.
- Velazco, J. (1999). **Los músculos: Características, funcionalidad y su relación con el rendimiento de corte.** Carnetec Nov-Dic 1999. Pp. 42-44.
- Vigoreaux J.O. (1994). **The muscle Z band: lessons on stress management.** *J. of Muscle Research and Cell Motility* 15:237-255.
- Zeece, M.G., Woods, T.L., Kee, M.A. y Reville, W.J. (1992). **Role of proteinases and inhibitors in postmortem muscle protein degradation.** *Reciprocal Meat Conference proceedings.* 45:51-61.
- Zhang W. (2009). **Involvement of protein degradation, calpain autolysis and protein nitrosylation in fresh meat quality during early postmortem refrigerated storage.** *Animal Sciences Commons.* Iowa State University.
- Zorrilla, R. J.; I. Morales; R. D. Liceaga y V. R. Hernández (1998). **Efecto del clorhidrato de zilpaterol en la cortabilidad de canales de toretes acebuzados finalizados con dietas a base de cebada forrajera,** en *XXXIV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria.* Querétaro, México.

# Apéndice. Valores de pH, concentración de proteína y actividad de proteasas

**Tabla I** Promedios de 3 réplicas de medición de pH a diferentes tiempos de maduración.

| Día         |                | 0         | 1            | 3            |              | 7            |              | 14           |              | 21           |             |      |
|-------------|----------------|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|------|
| Maduración  |                | NA        | NA           | H            | S            | H            | S            | H            | S            | H            | S           |      |
| Tratamiento | Sin zilpaterol | 1         | 6.46         | 5.82         | 5.63         | 5.45         | 5.58         | 5.50         | 5.42         | 5.53         | 5.39        | 5.50 |
|             |                | 2         | 6.36         | 5.55         | 5.49         | 5.45         | 5.50         | 5.77         | 5.52         | 5.54         | 5.52        | 5.46 |
|             |                | 3         | 6.16         | 5.25         | 5.44         | 5.56         | 5.56         | 5.24         | 5.39         | 5.54         | 5.47        | 5.39 |
|             |                | 4         | 6.21         | 5.59         | 5.78         | 5.50         | 5.43         | 5.52         | 5.52         | 5.44         | 5.49        | 5.49 |
|             |                | 5         | 6.33         | 5.94         | 5.91         | 5.52         | 5.58         | 5.60         | 5.51         | 5.53         | 5.44        | 5.45 |
|             |                | 6         | 6.20         | 5.28         | 5.61         | 5.28         | 5.52         | 5.49         | 5.47         | 5.52         | 5.41        | 5.52 |
|             |                | $\bar{X}$ | 6.28         | 5.57         | <b>5.64</b>  | 5.46         | <b>5.53</b>  | 5.52         | <b>5.47</b>  | 5.52         | <b>5.45</b> | 5.47 |
|             | DE             | ±0.12     | ±0.28        | <b>±0.18</b> | ±0.10        | <b>±0.06</b> | ±0.17        | <b>±0.06</b> | ±0.04        | <b>±0.05</b> | ±0.05       |      |
|             | Con zilpaterol | 7         | 6.15         | 5.58         | 5.58         | 5.58         | 5.40         | 5.27         | 5.42         | 5.55         | 5.51        | 5.43 |
|             |                | 8         | 6.48         | 5.70         | 5.84         | 5.27         | 5.61         | 5.61         | 5.54         | 5.53         | 5.47        | 5.39 |
|             |                | 9         | 6.42         | 5.14         | 5.57         | 5.55         | 5.46         | 5.58         | 5.46         | 5.48         | 5.49        | 5.42 |
|             |                | 10        | 6.33         | 5.28         | 5.46         | 5.60         | 5.55         | 5.45         | 5.43         | 5.48         | 5.37        | 5.45 |
|             |                | 11        | 6.41         | 5.86         | 5.49         | 5.37         | 5.52         | 5.42         | 5.39         | 5.49         | 5.47        | 5.38 |
|             |                | 12        | 6.19         | 5.21         | 5.47         | 5.39         | 5.58         | 5.48         | 5.50         | 5.51         | 5.46        | 5.47 |
| $\bar{X}$   |                | 6.33      | 5.46         | <b>5.57</b>  | 5.46         | <b>5.52</b>  | 5.47         | <b>5.46</b>  | 5.51         | <b>5.46</b>  | 5.42        |      |
| DE          | ±0.13          | ±0.29     | <b>±0.14</b> | ±0.14        | <b>±0.08</b> | ±0.12        | <b>±0.06</b> | ±0.03        | <b>±0.05</b> | ±0.03        |             |      |

\* Simbología.  $\bar{x}$ : Promedio; NA: No Aplica; H: Maduración en Húmedo y S: Maduración en Seco

**Tabla II** Promedios de 3 réplicas de la concentración de proteína miofibrilar (mg/mL) a diferentes días de maduración.

| Día         |                | 0         | 1            | 3            |              | 7            |              | 14           |              | 21           |             |      |
|-------------|----------------|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|------|
| Maduración  |                | NA        | NA           | H            | S            | H            | S            | H            | S            | H            | S           |      |
| Tratamiento | Sin zilpaterol | 1         | 0.92         | 1.08         | 1.42         | 1.14         | 1.51         | 1.27         | 1.38         | 1.96         | 2.58        | 2.40 |
|             |                | 2         | 1.85         | 1.52         | 1.13         | 1.25         | 1.41         | 1.01         | 1.48         | 1.49         | 1.48        | 1.41 |
|             |                | 3         | 1.46         | 1.59         | 0.91         | 1.39         | 1.61         | 1.87         | 2.11         | 2.46         | 2.77        | 3.15 |
|             |                | 4         | 1.17         | 1.35         | 1.51         | 1.46         | 1.69         | 1.14         | 2.02         | 2.51         | 2.11        | 1.20 |
|             |                | 5         | 1.74         | 1.42         | 1.74         | 1.24         | 1.53         | 1.22         | 1.39         | 1.86         | 2.13        | 2.18 |
|             |                | 6         | 1.72         | 1.08         | 1.28         | 1.66         | 1.01         | 1.08         | 1.47         | 1.11         | 1.19        | 1.54 |
|             |                | $\bar{X}$ | 1.48         | 1.34         | <b>1.33</b>  | 1.36         | <b>1.46</b>  | 1.27         | <b>1.64</b>  | 1.90         | <b>2.04</b> | 1.98 |
|             | DE             | ±0.37     | ±0.22        | <b>±0.29</b> | ±0.19        | <b>±0.24</b> | ±0.31        | <b>±0.33</b> | ±0.54        | <b>±0.61</b> | ±0.74       |      |
|             | Con zilpaterol | 7         | 0.90         | 1.28         | 1.20         | 1.25         | 1.11         | 1.35         | 1.56         | 1.79         | 1.54        | 1.17 |
|             |                | 8         | 1.52         | 1.38         | 1.81         | 1.04         | 1.15         | 1.04         | 1.97         | 1.84         | 2.35        | 2.24 |
|             |                | 9         | 1.21         | 1.29         | 1.59         | 0.99         | 1.12         | 1.24         | 1.55         | 1.70         | 1.42        | 2.09 |
|             |                | 10        | 1.58         | 1.09         | 1.20         | 1.23         | 1.54         | 1.46         | 1.37         | 1.77         | 1.74        | 2.08 |
|             |                | 11        | 1.96         | 1.45         | 1.33         | 1.32         | 1.04         | 0.84         | 1.24         | 1.52         | 1.34        | 1.48 |
|             |                | 12        | 1.63         | 1.42         | 1.76         | 1.15         | 1.05         | 1.27         | 1.56         | 1.32         | 1.22        | 1.32 |
| $\bar{X}$   |                | 1.47      | 1.32         | <b>1.48</b>  | 1.16         | <b>1.17</b>  | 1.20         | <b>1.54</b>  | 1.66         | <b>1.60</b>  | 1.73        |      |
| DE          | ±0.37          | ±0.13     | <b>±0.28</b> | ±0.13        | <b>±0.19</b> | ±0.22        | <b>±0.25</b> | ±0.20        | <b>±0.41</b> | ±0.46        |             |      |

\* Simbología.  $\bar{x}$ : Promedio; NA: No Aplica; H: Maduración en Húmedo y S: Maduración en Seco

**Tabla III** Promedios de 3 réplicas de la concentración de proteína sarcoplásmica (mg/mL) a diferentes días de maduración.

| Día         |                | 0         | 1            | 3            |              | 7            |              | 14           |              | 21           |             |      |
|-------------|----------------|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|------|
| Maduración  |                | NA        | NA           | H            | S            | H            | S            | H            | S            | H            | S           |      |
| Tratamiento | Sin zilpaterol | 1         | 3.50         | 3.42         | 3.50         | 3.50         | 3.37         | 3.64         | 3.31         | 3.50         | 3.53        | 3.59 |
|             |                | 2         | 3.69         | 3.54         | 3.85         | 3.47         | 3.63         | 3.63         | 3.45         | 3.42         | 3.57        | 3.37 |
|             |                | 3         | 3.55         | 3.64         | 3.63         | 3.39         | 3.47         | 3.54         | 3.28         | 3.47         | 3.37        | 3.55 |
|             |                | 4         | 3.70         | 3.61         | 3.62         | 3.23         | 3.55         | 3.73         | 3.36         | 3.32         | 3.50        | 3.38 |
|             |                | 5         | 3.49         | 3.72         | 3.84         | 3.66         | 3.45         | 3.65         | 4.07         | 3.30         | 3.52        | 3.52 |
|             |                | 6         | 3.83         | 3.66         | 3.79         | 3.86         | 3.40         | 3.68         | 3.40         | 3.40         | 3.60        | 3.50 |
|             |                | $\bar{x}$ | 3.63         | 3.60         | <b>3.71</b>  | 3.52         | <b>3.48</b>  | 3.64         | <b>3.48</b>  | 3.40         | <b>3.52</b> | 3.48 |
|             | DE             | ±0.14     | ±0.11        | <b>±0.14</b> | ±0.22        | <b>±0.10</b> | ±0.06        | <b>±0.30</b> | ±0.08        | <b>±0.08</b> | ±0.09       |      |
|             | Con zilpaterol | 7         | 3.67         | 3.65         | 3.59         | 3.52         | 3.53         | 3.73         | 3.38         | 3.41         | 3.58        | 3.41 |
|             |                | 8         | 3.85         | 3.77         | 3.75         | 3.15         | 3.36         | 3.61         | 3.55         | 3.40         | 3.61        | 3.51 |
|             |                | 9         | 3.71         | 3.75         | 3.25         | 3.63         | 3.41         | 3.73         | 3.50         | 3.49         | 3.53        | 3.35 |
|             |                | 10        | 3.68         | 3.62         | 3.68         | 3.74         | 3.80         | 3.74         | 3.40         | 3.58         | 3.54        | 3.21 |
|             |                | 11        | 3.53         | 3.77         | 3.51         | 3.64         | 3.49         | 3.38         | 3.33         | 3.43         | 3.54        | 3.34 |
|             |                | 12        | 3.76         | 3.77         | 4.28         | 3.03         | 3.47         | 3.62         | 3.44         | 3.60         | 3.58        | 3.39 |
| $\bar{x}$   |                | 3.70      | 3.72         | <b>3.68</b>  | 3.45         | <b>3.51</b>  | 3.63         | <b>3.43</b>  | 3.48         | <b>3.56</b>  | 3.37        |      |
| DE          | ±0.11          | ±0.07     | <b>±0.34</b> | ±0.29        | <b>±0.15</b> | ±0.14        | <b>±0.08</b> | ±0.09        | <b>±0.03</b> | ±0.10        |             |      |

\* Simbología.  $\bar{x}$ : Promedio; DE: Desviación Estándar; NA: No Aplica; H: Maduración en húmedo y S: Maduración en seco

**Tabla IV** Promedio de 3 réplicas de la actividad específica de proteasas neutras (mU/mg de proteína) reacción de Kunitz.

| Día         |                | 0         | 1            | 3            |              | 7            |              | 14           |              | 21           |             |      |
|-------------|----------------|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|------|
| Maduración  |                | NA        | NA           | H            | S            | H            | S            | H            | S            | H            | S           |      |
| Tratamiento | Sin zilpaterol | 1         | 0.77         | 0.73         | 0.74         | 0.69         | 0.71         | 0.69         | 0.65         | 0.58         | 0.52        | 0.47 |
|             |                | 2         | 0.73         | 0.71         | 0.68         | 0.70         | 0.66         | 0.70         | 0.62         | 0.60         | 0.52        | 0.51 |
|             |                | 3         | 0.76         | 0.69         | 0.71         | 0.71         | 0.68         | 0.71         | 0.66         | 0.60         | 0.55        | 0.47 |
|             |                | 4         | 0.72         | 0.69         | 0.72         | 0.74         | 0.67         | 0.68         | 0.64         | 0.62         | 0.53        | 0.50 |
|             |                | 5         | 0.77         | 0.67         | 0.68         | 0.66         | 0.69         | 0.70         | 0.53         | 0.62         | 0.53        | 0.49 |
|             |                | 6         | 0.71         | 0.68         | 0.69         | 0.63         | 0.71         | 0.69         | 0.63         | 0.60         | 0.52        | 0.49 |
|             |                | $\bar{x}$ | 0.74         | 0.70         | <b>0.70</b>  | 0.69         | <b>0.69</b>  | 0.69         | <b>0.62</b>  | 0.60         | <b>0.53</b> | 0.49 |
|             | DE             | ±0.03     | ±0.02        | <b>±0.03</b> | ±0.04        | <b>±0.02</b> | ±0.01        | <b>±0.05</b> | ±0.01        | <b>±0.01</b> | ±0.02       |      |
|             | Con zilpaterol | 7         | 0.77         | 0.72         | 0.74         | 0.70         | 0.68         | 0.68         | 0.65         | 0.62         | 0.53        | 0.52 |
|             |                | 8         | 0.74         | 0.69         | 0.70         | 0.77         | 0.72         | 0.69         | 0.62         | 0.61         | 0.52        | 0.52 |
|             |                | 9         | 0.76         | 0.69         | 0.80         | 0.68         | 0.71         | 0.67         | 0.63         | 0.61         | 0.53        | 0.54 |
|             |                | 10        | 0.77         | 0.72         | 0.73         | 0.66         | 0.64         | 0.68         | 0.64         | 0.60         | 0.54        | 0.56 |
|             |                | 11        | 0.80         | 0.68         | 0.76         | 0.67         | 0.70         | 0.75         | 0.65         | 0.62         | 0.54        | 0.54 |
|             |                | 12        | 0.75         | 0.69         | 0.62         | 0.80         | 0.70         | 0.70         | 0.63         | 0.59         | 0.53        | 0.53 |
| $\bar{x}$   |                | 0.76      | 0.70         | <b>0.73</b>  | 0.72         | <b>0.69</b>  | 0.70         | <b>0.64</b>  | 0.61         | <b>0.53</b>  | 0.53        |      |
| DE          | ±0.02          | ±0.02     | <b>±0.06</b> | ±0.06        | <b>±0.03</b> | ±0.03        | <b>±0.01</b> | ±0.01        | <b>±0.01</b> | ±0.02        |             |      |

\* Simbología.  $\bar{x}$ : Promedio; DE: Desviación Estándar; NA: No Aplica; H: Maduración en húmedo y S: Maduración en seco

**Tabla V.** Promedio de 3 réplicas de la actividad específica de proteasas ácidas (mU/mg de proteína) reacción de Anson.

| Día         |                | 0         | 1            | 3            |              | 7            |              | 14           |              | 21           |             |      |
|-------------|----------------|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|------|
| Maduración  |                | NA        | NA           | H            | S            | H            | S            | H            | S            | H            | S           |      |
| Tratamiento | Sin zilpaterol | 1         | 0.68         | 0.64         | 0.66         | 0.60         | 0.64         | 0.59         | 0.61         | 0.55         | 0.53        | 0.50 |
|             |                | 2         | 0.64         | 0.62         | 0.60         | 0.61         | 0.60         | 0.59         | 0.59         | 0.56         | 0.53        | 0.53 |
|             |                | 3         | 0.67         | 0.60         | 0.64         | 0.62         | 0.62         | 0.60         | 0.62         | 0.55         | 0.56        | 0.51 |
|             |                | 4         | 0.64         | 0.61         | 0.64         | 0.65         | 0.61         | 0.57         | 0.61         | 0.57         | 0.54        | 0.54 |
|             |                | 5         | 0.68         | 0.59         | 0.60         | 0.58         | 0.63         | 0.59         | 0.50         | 0.58         | 0.54        | 0.52 |
|             |                | 6         | 0.62         | 0.59         | 0.61         | 0.56         | 0.63         | 0.58         | 0.60         | 0.57         | 0.52        | 0.52 |
|             |                | $\bar{x}$ | 0.65         | 0.61         | <b>0.62</b>  | 0.60         | <b>0.62</b>  | 0.59         | <b>0.59</b>  | 0.56         | <b>0.54</b> | 0.52 |
|             | DE             | ±0.03     | ±0.02        | <b>±0.02</b> | ±0.03        | <b>±0.02</b> | ±0.01        | <b>±0.04</b> | ±0.01        | <b>±0.01</b> | ±0.02       |      |
|             | Con zilpaterol | 7         | 0.66         | 0.63         | 0.66         | 0.62         | 0.64         | 0.59         | 0.62         | 0.61         | 0.53        | 0.53 |
|             |                | 8         | 0.63         | 0.60         | 0.63         | 0.69         | 0.68         | 0.61         | 0.59         | 0.61         | 0.53        | 0.52 |
|             |                | 9         | 0.65         | 0.61         | 0.73         | 0.60         | 0.67         | 0.59         | 0.60         | 0.60         | 0.54        | 0.55 |
|             |                | 10        | 0.67         | 0.63         | 0.64         | 0.58         | 0.60         | 0.59         | 0.62         | 0.58         | 0.54        | 0.56 |
|             |                | 11        | 0.70         | 0.61         | 0.67         | 0.60         | 0.65         | 0.65         | 0.63         | 0.60         | 0.54        | 0.54 |
|             |                | 12        | 0.65         | 0.60         | 0.55         | 0.71         | 0.66         | 0.61         | 0.61         | 0.57         | 0.53        | 0.54 |
| $\bar{x}$   |                | 0.66      | 0.61         | <b>0.64</b>  | 0.63         | <b>0.65</b>  | 0.61         | <b>0.61</b>  | 0.59         | <b>0.54</b>  | 0.54        |      |
| DE          | ±0.02          | ±0.01     | <b>±0.06</b> | ±0.05        | <b>±0.03</b> | ±0.03        | <b>±0.02</b> | ±0.02        | <b>±0.00</b> | ±0.01        |             |      |

\* Simbología.  $\bar{x}$ : Promedio; DE: Desviación Estándar; NA: No Aplica; H: Maduración en húmedo y S: Maduración en seco

**Tabla VI** Promedio de 3 réplicas de la actividad específica de proteasas ácidas y neutras (mU/mg de proteína) actividad gelanólítica.

| Día         |                | 0         | 1           | 3           |             | 7           |             | 14          |             | 21          |             |      |
|-------------|----------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| Maduración  |                | NA        | NA          | H           | S           | H           | S           | H           | S           | H           | S           |      |
| Tratamiento | Sin zilpaterol | 1         | 2.30        | 1.76        | 1.92        | 1.21        | 0.92        | 1.10        | 0.80        | 0.99        | 0.38        | 0.20 |
|             |                | 2         | 2.43        | 1.68        | 1.85        | 1.38        | 1.14        | 1.44        | 0.88        | 0.81        | 0.71        | 0.30 |
|             |                | 3         | 2.46        | 1.84        | 1.63        | 1.20        | 0.91        | 1.40        | 0.75        | 1.09        | 0.52        | 0.54 |
|             |                | 4         | 2.68        | 1.68        | 1.71        | 1.33        | 1.30        | 1.40        | 1.07        | 0.90        | 0.47        | 0.34 |
|             |                | 5         | 2.63        | 1.56        | 1.78        | 1.15        | 1.43        | 1.40        | 0.92        | 1.12        | 0.52        | 0.20 |
|             |                | 6         | 2.58        | 1.63        | 1.93        | 1.03        | 1.30        | 1.28        | 1.05        | 0.77        | 0.57        | 0.39 |
|             |                | $\bar{x}$ | 2.51        | 1.69        | <b>1.80</b> | 1.22        | <b>1.17</b> | 1.34        | <b>0.91</b> | 0.95        | <b>0.53</b> | 0.33 |
|             | DE             | 0.14      | 0.10        | <b>0.12</b> | 0.13        | <b>0.22</b> | 0.13        | <b>0.13</b> | 0.14        | <b>0.11</b> | 0.13        |      |
|             | Con zilpaterol | 7         | 2.77        | 1.62        | 1.93        | 1.60        | 1.77        | 1.54        | 0.87        | 0.80        | 0.92        | 0.53 |
|             |                | 8         | 3.01        | 1.94        | 2.02        | 1.81        | 1.82        | 1.59        | 1.00        | 0.66        | 0.60        | 0.38 |
|             |                | 9         | 2.67        | 1.63        | 1.69        | 1.39        | 1.59        | 1.34        | 1.13        | 0.80        | 0.73        | 0.62 |
|             |                | 10        | 2.43        | 1.83        | 1.81        | 1.52        | 1.45        | 1.80        | 0.87        | 0.67        | 0.83        | 0.53 |
|             |                | 11        | 2.71        | 1.87        | 1.98        | 1.35        | 1.80        | 1.34        | 1.00        | 0.88        | 0.69        | 0.48 |
|             |                | 12        | 2.70        | 1.94        | 1.93        | 1.30        | 1.84        | 1.42        | 1.09        | 0.97        | 0.69        | 0.53 |
| $\bar{x}$   |                | 2.71      | 1.80        | <b>1.89</b> | 1.49        | <b>1.71</b> | 1.51        | <b>0.99</b> | 0.80        | <b>0.74</b> | 0.51        |      |
| DE          | 0.19           | 0.15      | <b>0.12</b> | 0.19        | <b>0.16</b> | 0.18        | <b>0.11</b> | 0.12        | <b>0.11</b> | 0.08        |             |      |

\* Simbología.  $\bar{x}$ : Promedio; DE: Desviación Estándar; NA: No Aplica; H: Maduración en húmedo y S: Maduración en seco



# Análisis estadísticos

## pH

Tabla VII Análisis de Varianza para valores de pH.

| Fuente               | Grados de Libertad | Suma de los Cuadrados | Media de los Cuadrados | F      | Pr>F    |
|----------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|--------|---------|
| Modelo               | 23                 | 26.736                | 1.162                  | 49.711 | <0.0001 |
| Error                | 264                | 6.173                 | 0.023                  | -      | -       |
| Total Corregido      | 287                | 32.909                | -                      | -      | -       |
| Valor R <sup>2</sup> |                    |                       | 0.812                  |        |         |

Tabla VIII Análisis de las diferencias (Duncan) entre las categorías con un intervalo de confianza de 95% para valores de pH.

| Contraste | Diferencias | Diferencias Estandarizada | Valor Crítico | Pr>Dif | $\alpha$ (Modificado) | Significativo |
|-----------|-------------|---------------------------|---------------|--------|-----------------------|---------------|
| h vs sz   | 0.051       | 1.984                     | 2.133         | 0.194  | 0.143                 | No            |
| h vs hz   | 0.025       | 0.975                     | 2.064         | 0.592  | 0.098                 | No            |
| h vs s    | 0.022       | 0.861                     | 1.960         | 0.389  | 0.050                 | No            |
| s vs hz   | 0.029       | 1.123                     | 2.064         | 0.500  | 0.098                 | No            |
| s vs hz   | 0.003       | 0.114                     | 1.960         | 0.909  | 0.050                 | No            |
| hz vs sz  | 0.026       | 1.008                     | 1.960         | 0.313  | 0.050                 | No            |

\* h: maduración en húmedo sin zilpaterol; hz: maduración en húmedo con zilpaterol; s: maduración en seco sin zilpaterol; sz: maduración en seco con zilpaterol.

## Reacción de Kunitz (Proteasas neutras)

Tabla IX Análisis de Varianza para actividad de proteasas neutras (R. de Kunitz).

| Fuente               | Grados de Libertad | Suma de los Cuadrados | Media de los Cuadrados | F       | Pr>F    |
|----------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|---------|---------|
| Modelo               | 23                 | 1.696                 | 0.074                  | 102.596 | <0.0001 |
| Error                | 264                | 0.190                 | 0.001                  | -       | -       |
| Total Corregido      | 287                | 1.886                 | -                      | -       | -       |
| Valor R <sup>2</sup> |                    |                       | 0.899                  |         |         |

**Tabla X** Análisis de las diferencias (Duncan) entre las categorías con un intervalo de confianza de 95% para valores de actividad de caseína.

| Contraste | Diferencias | Diferencias Estandarizada | Valor Crítico | Pr>Dif  | $\alpha$ (Modificado) | Significativo |
|-----------|-------------|---------------------------|---------------|---------|-----------------------|---------------|
| hz vs s   | 0.023       | 5.070                     | 2.133         | <0.0001 | 0.143                 | Si            |
| hz vs h   | 0.012       | 2.603                     | 2.064         | 0.025   | 0.098                 | Si            |
| hz vs sz  | 0.005       | 1.184                     | 1.960         | 0.236   | 0.050                 | No            |
| sz vs s   | 0.017       | 3.886                     | 2.064         | 0.000   | 0.098                 | Si            |
| sz vs h   | 0.006       | 1.418                     | 1.960         | 0.156   | 0.050                 | No            |
| h vs s    | 0.011       | 2.468                     | 1.960         | 0.014   | 0.050                 | Si            |

\* h: maduración en húmedo sin zilpaterol; hz: maduración en húmedo con zilpaterol; s: maduración en seco sin zilpaterol; sz: maduración en seco con zilpaterol.

## Reacción de Anson (Proteasas ácidas)

**Tabla XI** Análisis de Varianza para actividad de proteasas ácidas (R. de Anson).

| Fuente               | Grados de Libertad | Suma de los Cuadrados | Media de los Cuadrados | F      | Pr>F    |
|----------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|--------|---------|
| Modelo               | 23                 | 0.476                 | 0.021                  | 32.654 | <0.0001 |
| Error                | 264                | 0.167                 | 0.001                  | -      | -       |
| Total Corregido      | 287                | 0.643                 | -                      | -      | -       |
| Valor R <sup>2</sup> |                    |                       | 0.740                  |        |         |

**Tabla XII** Análisis de las diferencias (Duncan) entre las categorías con un intervalo de confianza de 95% para valores de actividad de hemoglobina.

| Contraste | Diferencias | Diferencias Estandarizada | Valor Crítico | Pr>Dif  | $\alpha$ (Modificado) | Significativo |
|-----------|-------------|---------------------------|---------------|---------|-----------------------|---------------|
| hz vs s   | 0.029       | 6.915                     | 2.133         | <0.0001 | 0.143                 | Si            |
| hz vs h   | 0.014       | 3.247                     | 2.064         | 0.003   | 0.098                 | Si            |
| hz vs sz  | 0.011       | 2.718                     | 1.960         | 0.007   | 0.050                 | Si            |
| sz vs s   | 0.018       | 4.197                     | 2.064         | <0.0001 | 0.098                 | Si            |
| sz vs h   | 0.002       | 0.529                     | 1.960         | 0.597   | 0.050                 | No            |
| h vs s    | 0.015       | 3.668                     | 1.960         | 0.000   | 0.050                 | Si            |

\* h: maduración en húmedo sin zilpaterol; hz: maduración en húmedo con zilpaterol; s: maduración en seco sin zilpaterol; sz: maduración en seco con zilpaterol.

## Actividad gelanólica

**Tabla XIII** Análisis de Varianza para actividad gelanólica.

| Fuente                     | Grados de Libertad | Suma de los Cuadrados | Media de los Cuadrados | F       | Pr>F    |
|----------------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|---------|---------|
| <b>Modelo</b>              | 23                 | 132.337               | 5.754                  | 267.447 | <0.0001 |
| <b>Error</b>               | 264                | 5.680                 | 0.022                  | -       | -       |
| <b>Total Corregido</b>     | 287                | 138.016               | -                      | -       | -       |
| <b>Valor R<sup>2</sup></b> |                    |                       | 0.959                  |         |         |

**Tabla XIV** Análisis de las diferencias (Duncan) entre las categorías con un intervalo de confianza de 95% para valores de actividad gelanólica.

| Contraste       | Diferencias | Diferencias Estandarizada | Valor Crítico | Pr>Dif  | α (Modificado) | Significativo |
|-----------------|-------------|---------------------------|---------------|---------|----------------|---------------|
| <b>hz vs s</b>  | 0306        | 12.504                    | 2.133         | <0.0001 | 0.143          | Si            |
| <b>hz vs h</b>  | 0.209       | 8.548                     | 2.064         | <0.0001 | 0.098          | Si            |
| <b>hz vs sz</b> | 0.172       | 7.044                     | 1.960         | <0.0001 | 0.050          | Si            |
| <b>sz vs s</b>  | 0.133       | 5.460                     | 2.064         | <0.0001 | 0.098          | Si            |
| <b>sz vs h</b>  | 0.037       | 1.505                     | 1.960         | 0.132   | 0.050          | No            |
| <b>h vs s</b>   | 0.097       | 3.956                     | 1.960         | <0.0001 | 0.050          | Si            |

\* h: maduración en húmedo sin zilpaterol; hz: maduración en húmedo con zilpaterol; s: maduración en seco sin zilpaterol; sz: maduración en seco con zilpaterol.