



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

**DETERMINACIÓN DE HIDROXIPROLINA POR HPLC
COMO BIOMARCADOR DEL COLÁGENO EN ONCE
MÚSCULOS DEL CUARTO DELANTERO BOVINO
EN TRES GRUPOS GENÉTICOS DE MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

CLAUDIA ELIZABETH CONDE MEDINA



Asesores:

Dra. María Salud Rubio Lozano
MVZ, Ms C. René Rosiles Martínez

MÉXICO, D. F.

2010



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.

DEDICATORIA

A mis padres, mi hermano y amigos que con su apoyo, confianza y amor me fomentaron para llegar a esta meta de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a mi querida Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por abrirme sus puertas para aportarme valiosos conocimientos.

Asesores: Dra. María Salud Rubio Lozano y Dr. René Rosiles Martínez por su apoyo incondicional además de compartirme su tiempo y dedicación.

Laboratorio de Toxicología por brindarme su espacio y ayuda para la realización de esta investigación, así como a su personal Sra. Aurelia Cruz Cruz, y MVZ. Janitzio Ariel Bautista.

Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la FMVZ-UNAM, laboratorio de Bromatología, a su personal MC. Sergio Ángeles Campos, Q.A. Agueda García Pérez, Sra. Fermina Palma Atlisqueño por compartirme su experiencia así como aprender de mis errores.

Taller de carnes de C.E.P.I.P.S.A por haberme apoyado inicialmente en la realización de este trabajo.

A mi madre que está con Dios, siempre tendré presente tu recuerdo, enseñanzas, amor y educación las cuales han sido y serán parte importante en el camino de la vida.

Para mi familia, que siempre me apoyó y estuvo presente a lo largo de este proceso.

A Regina y Elena que sin su ayuda no hubiera sido posible la conclusión de esta investigación, quiero reiterar mi más profundo agradecimiento, cariño y respeto.

Mis amigos: Rosy y Adrián, siempre he contado con ustedes y agradezco de corazón que te me hayan otorgado su valiosa amistad, además de disfrutar momentos estupendos a lo largo del tiempo. Les quiero.

A Dios, por permitirme vivir esta experiencia y conocer personas maravillosas a lo largo de la licenciatura.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 Ganadería de carne en México.....	2
1.2 Principales razas de ganado bovino de carne en México.....	4
1.3 Bioquímica del colágeno.....	7
1.3.1 Biosíntesis del colágeno.....	9
1.3.2 Detección del colágeno.....	10
1.3.3 Efecto del colágeno en la calidad de carne.....	12
2. JUSTIFICACIÓN.....	13
3. HIPÓTESIS.....	13
4. OBJETIVO.....	13
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
5.1 Obtención de muestras.....	14
5.2 Determinación de hidroxiprolina como biomarcador bioquímico del colágeno total mediante HPLC.....	15
5.2.1 Preparación de reactivos y soluciones.....	15
5.2.2 Hidrólisis.....	17
5.2.3 Derivación del bioindicador hidroxiprolina.....	18
5.2.4 Características cromatográficas.....	18
5.2.5 Implementación y validación del método para la medición de la hidroxiprolina como indicador bioquímico del colágeno.....	19
5.2.6 Análisis estadístico.....	20
6. RESULTADOS.....	20
6.1 Cantidad de colágeno total en los once músculos, combinando los tres grupos genéticos bovinos	20

6.2 Cantidad de colágeno total de cada grupo genético bovino.....	22
6.3 Cantidad de colágeno total por la interacción de cada músculo por cada grupo genético bovino.....	22
7. DISCUSIÓN.....	25
8. CONCLUSIONES.....	29
9. REFERENCIAS.....	30
ANEXO 1.....	34
ANEXO 2.....	40

Índice de cuadros

Cuadro 1. Medias de mínimos cuadrados y error estándar para la cantidad de colágeno de los once músculos combinados con los tres grupos genéticos bovinos.....	21
Cuadro 2. Medias de mínimos cuadrados y error estándar para la cantidad de colágeno total de cada grupo bovino.....	22
Cuadro 3. Medias de mínimos cuadrados y error estándar para la cantidad de colágeno para cada músculo y por grupo genético bovino.....	24

Índice de figuras

Figura 1. Estructura helicoidal de la molécula de colágeno.....	9
Figura 2. Biosíntesis de la molécula de colágeno.....	10

RESUMEN

CONDE MEDINA CLAUDIA ELIZABETH. Determinación de Hidroxiprolina por HPLC como biomarcador del colágeno en once músculos del cuarto delantero bovino en tres grupos genéticos de México (bajo la asesoría de: Dra. María Salud Rubio Lozano y MVZ. Ms C. René Rosiles Martínez.

Debido a la necesidad de conocer acerca de la calidad de la carne bovina mexicana, se implementó una metodología científica nueva para medir la cantidad de hidroxiprolina como bioindicador del colágeno intramuscular. Esta se basó en la hidrólisis del músculo en medio ácido y usando energía electromagnética. La medición de la hidroxiprolina se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Para esto se derivó a la hidroxiprolina con el uso del cromógeno NBD-Cl (7-cloro-4-nitrobenzofurazan), facilitando su identificación en el cromatógrafo con un sistema de intercambio de fases, en columna de fase reversa y detector de luz ultravioleta. El colágeno se calculó multiplicando la cantidad de hidroxiprolina por el factor de conversión 7.52. De esta manera se calculó la concentración de colágeno total en once músculos del cuarto delantero bovino en tres grupos genéticos de México, *Bos indicus* (Bi), razas: Brahman, Nelore y Gyr. *Bos taurus* (Bt); Charolais, Limousin y Simmental y cruce comercial (CC) cruzamientos entre *Bos taurus* (Hereford, Angus, Charolais) con ganado cebú; los músculos analizados fueron Bíceps, Braquial, Complejo, Esplenio, Infraespinoso, Redondo mayor, Romboides, Subescapular, Supraespinoso, Tríceps porción larga y Tríceps porción lateral. La cantidad de colágeno fue mayor en *Bos indicus* (64.69 mg/g), seguido de la cruce comercial con valores intermedios y, por último, el grupo *Bos taurus*, con la menor concentración (5.33 mg/g). Además, destacaron los músculos Redondo mayor e Infraespinoso, lo cuales mostraron gran diferencia significativa respecto a los demás músculos analizados, sobre todo entre Bi y Bt.

1. INTRODUCCIÓN

La cantidad de colágeno de la carne es un factor decisivo para definir su calidad¹. El estudio de Chávez *et al.*² investigó la calidad de músculos del cuarto delantero de tres grupos genéticos producidos en México a través de la determinación de grasa, humedad y fuerza de corte. El estudio que aquí se presenta busca completar la información sobre calidad de los once músculos del cuarto delantero determinando la cantidad de colágeno.

Con este estudio se propone la identificación del contenido de colágeno por medio de la cuantificación de hidroxiprolina como biomarcador específico³ lo cual, aunado a la fuerza de corte, apoya la determinación de la suavidad de la carne.

Por lo tanto, en el presente trabajo se implementó la identificación de hidroxiprolina muscular mediante con el uso de HPLC por sus siglas en inglés (High Performance Liquid Chromatography, Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución)⁴, para la determinación de la cantidad de colágeno en muestras de carne mexicana.

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 Ganadería de carne en México

La ganadería bovina para carne en el país se desarrolla en muy distintas condiciones agroecológicas, influida principalmente por factores climáticos, existiendo desde producciones tradicionales hasta las más vanguardistas. En términos generales, las condiciones bajo las que desarrolla la ganadería mexicana son extensivas, aunque existe la finalización en corral de engorda, proviniendo aproximadamente 35% de la producción nacional de este tipo de instalaciones⁵. La mayoría del ganado se finaliza en pastoreo. Aproximadamente 60% de la carne producida en el país se comercializa en forma de canal caliente, lo que afecta la calidad y la inocuidad para el consumidor^{5,6}.

El país se divide en cuatro regiones ganaderas, de acuerdo con sus condiciones climatológicas y por sus sistemas de producción: 1) árida y semiárida, 2) templada, 3) tropical seca y 4) tropical húmeda.

Región árida y semiárida. Se encuentran los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango, Zacatecas y San Luis Potosí, aportando 33.9% de la producción de carne en pie y en canal⁵. Se considera a esta región como la de mayor desarrollo tecnológico para la ganadería de carne. Las razas aprovechadas son principalmente las europeas (*Bos taurus*) y las cruzas entre ellas. La cantidad de precipitación es baja durante el año y su distribución es mínima con la tendencia de concentrarse en los meses de julio a septiembre. El uso de esquilmos agrícolas es bajo y la suplementación con vitaminas y minerales en animales en pastoreo es relativamente común. El uso de promotores de crecimiento y de modificadores de la fermentación ruminal en los corrales de engorda es ordinario⁵.

Región templada. Incluye los estados de Aguascalientes, Distrito Federal, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Puebla, Querétaro y Tlaxcala, con una producción nacional de 29.3% en pie y en canal. Los genotipos existentes en esta región son razas europeas (*Bos taurus*) y sus cruzas; los sistemas de producción predominantes son vaca-becerro, pastoreo extensivo, basado en el uso de potreros con especies nativas de la época lluviosa y el suministro de esquilmos agrícolas en la época seca⁵. Los sistemas de alimentación se basan en el uso de ingredientes de baja calidad nutricional y raciones no muy bien balanceadas lo que se traduce en bajas ganancias de peso diarias⁶.

Región trópico seco. Se encuentran los estados de Colima, Guerrero, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa y Tamaulipas. Desde el punto de vista productivo es la región mas ineficiente junto con la región del trópico húmedo, aportando 36.9% de la producción de carne en pie y en canal. El sistema vaca-becerro con ordeña durante época de lluvias, constituye el sistema de doble propósito. Los genotipos utilizados son cruzas de origen cebú (*Bos indicus*) con razas europeas puras (Suizo pardo, Angus); la adaptación al trópico. Se inseminan natural o artificialmente, por lo que la producción se dedica al abasto regional y nacional⁵.

Región trópico húmedo. Incluye a los estados de Campeche, Chiapas, Quintana Roo, Veracruz, Tabasco y Yucatán. Esta región se caracteriza por tener abundante producción de forraje, aunque de menor calidad nutricional que los forrajes templados. Las razas que se aprovechan en la región son *Bos indicus*, así como cruzas, además, de sementales de raza

Bos taurus. Los becerros producidos en esta región se engordan en corral en la zona templada del país o en pastoreo en la misma región. La engorda en pastoreo se realiza en potreros con abundantes forrajes, aunque con limitaciones de algunos nutrientes (proteína, minerales y energía); como consecuencia, existen prácticas de suplementación alimenticia, especialmente en época de escasez de forraje y hacia el final de la engorda⁵.

1.2 Principales razas de ganado bovino de carne en México

Existen dos grupos raciales en el país, que son: *Bos taurus* o ganado europeo, y *Bos indicus*, o también llamado Indopaquistano, pero se le conoce mejor como cebú⁵. Entre las razas europeas se encuentran:

Aberdeen Angus: entre sus características funcionales destacan el rápido crecimiento, a pesar de que nacen con bajo peso. Son resistentes, dóciles y buenos para el pastoreo. Los productores han aprovechado a esta raza para comercializar su carne de primera calidad teniendo un elevado rendimiento entre el peso de la canal y el peso vivo con un bajo porcentaje de hueso en las piezas⁷.

Belga azul: tiene gran capacidad de engorda, y su carne es extraordinariamente magra. En México, no ha tenido muy buena aceptación debido a su gran volumen de masa muscular, lo que provocaría partos distócicos, además de que en el país se aprovechan razas ligeras a medianas⁷.

Charolais: tiene un excelente crecimiento y ganancia de peso, superior conformación de carne y es una buena opción para llegar a peso alto durante la engorda. Se encuentra distribuido en los estados de Chihuahua, Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas, además de que ya hay criadores en el altiplano⁷.

Hereford: generalmente son de carácter dócil, proporcionando carne de muy buena calidad. Esta raza ha demostrado tener excelente tamaño, crecimiento, notable conversión de pasto a carne y desarrollo de masa muscular, logrando carnes de alta calidad a bajo costo. Los toros son utilizados frecuentemente para obtener mestizos destinados a la industria cárnica. Se encuentra mayormente distribuido en los estados de Sonora, Chihuahua y Durango⁷.

Limousin: son muy musculosos y tienen la cabeza relativamente pequeña. Se pueden obtener altas producciones de carne, incluso se le llega a considerar de primera categoría, sin embargo, pueden ser muy temperamentales. Se desempeñan mejor en clima templado, ya sea en pastoreo o engorda intensiva. Desafortunadamente, no ha sido una raza aprovechada, aunque en los estados de Zacatecas, Jalisco y Durango existen criadores^{7, 8}.

Pardo suizo: se utiliza principalmente para doble propósito en clima tropical, siendo de moderada productividad. En México se realizan cruces con ganado criollo y cebú. Abundan en los estados de Veracruz, Chiapas y Tabasco, e incluso Centroamérica⁷.

Salers: es de reciente introducción, por lo tanto su presencia es mínima, posee cualidades de cebamiento y producción cárnica. Algunos ejemplares se localizan en el estado de Chihuahua^{7, 8}.

Santa Gertrudis: es muy resistente al calor, insectos y plagas, tiene gran rusticidad y engorda con facilidad. Se ubica en la zona del golfo con pocos criadores⁸.

Simmental: es una de las razas más dóciles, manejables, con gran adaptación a climas extremos; tiene una excelente conversión alimenticia y se utiliza tanto para leche como para carne, por lo que es muy atractiva y comercial. También se ha cruzado con ganado Brahman, obteniendo excelente vigor híbrido, para crear la raza Simbrah⁷.

Entre las razas cebuínas más distribuidas en México se encuentran:

Brahman: es la más popular en el trópico mexicano. Su desarrollo es superior comparado con razas europeas en regiones con este tipo de clima. Es de rápido crecimiento y tiende a ser dócil al manejarlo de manera adecuada. Se encuentra distribuida generalmente en las zonas cercanas a los litorales^{8, 9}.

Guzerat: actualmente se utilizan como animales de triple propósito. En México se está reactivando el interés por esta raza, es muy buena como productora de carne, tanto en pureza racial como con cruzamientos con *Bos taurus*, ya sean de origen lechero o cárnico. Tiene buen comportamiento en condiciones adversas; también responde en forma excelente en condiciones de suplementación o alimentación en corrales. Su carne es de excelente calidad con poca grasa. Se localiza en los estados de Jalisco y Yucatán¹⁰.

Beefmaster: tiene una composición de 50% cebú, 25% Hereford y 25% Shorthorn. Es un animal de tamaño mediano, de excelente conformación cárnica, que se aprecia enormemente en corrales de engorda por la excelente calidad de su carne y su ganancia diaria de peso. Entre sus ventajas destacan la adaptación en agostaderos, buen rendimiento de la canal, cierta resistencia a garrapatas; pero tiene la desventaja de no presentar buen marmoleo y la carne no es muy suave⁸.

Braford: raza sintética, resultante de la cruce entre Brahman y Hereford. Tiene desarrollo precoz, excelente comportamiento de engorda, buen rendimiento de canal, gran adaptabilidad ante climas adversos. Su presencia es escasa en México, aunque existen criadores en el estado de Coahuila¹¹.

Brangus: raza sintética, resultante de la cruce entre Brahman americano y Aberdeen Angus. Es altamente resistente al calor y a los ectoparásitos, aumenta rápidamente de peso, posee excelente conformación muscular, aunque tiene temperamento muy nervioso. Existen algunos criadores en Chihuahua⁸.

Indubrasil: creada a partir de cruzamientos entre Gyr, Guzarat y, en menor grado, Nelore; se caracteriza por su rápido crecimiento, posee gran volumen corporal, así como producción cárnica. Abunda cerca del litoral del Golfo, especialmente en Veracruz y Yucatán⁸.

Nelore: tienen grandes cualidades, rusticidad, resistencia, fertilidad, rendimiento, calidad de carne. Se ha probado que ha tenido excelentes aumentos de peso a partir de pastos y engorda en corral, comparables con ganado europeo, incluso llegando a superarlo. Tiene alta eficiencia, por lo que disminuye costos. Esta raza se cría principalmente en Yucatán en menor grado en Tabasco, Chiapas, Veracruz, Tamaulipas, Jalisco y Colima⁸.

Tropicarne: raza sintética, resultado de los cruzamientos entre ganado cebú y europeo, creada en el trópico mexicano. Su presencia es aún escasa, pero se concentra en el estado de Tamaulipas⁸.

1.3 Bioquímica del colágeno

El colágeno es una molécula que forma gran parte del tejido conjuntivo de mamíferos, representando 25% de la proteína total y proporcionando un sistema estructural de sostén extracelular. Existen por lo menos 25 tipos de colágeno, constituidos por casi 30 cadenas polipeptídicas diferentes entre sí¹²⁻¹⁴. Los rasgos más característicos de las moléculas de colágeno son su longitud, rigidez y estructura helicoidal de tres hebras. Tres cadenas polipeptídicas de colágeno, denominadas *cadena alfa* (α), se enrollan sobre sí mismas formando una superhélice. Esto se considera considerándose su unidad fundamental^{12, 13, 15, 16} (Figura 1). Es una proteína larga (300 nm) y fina (1.5 nm diámetro), que consiste de tres subunidades helicoidales: dos cadenas $\alpha 1(I)$ y una $\alpha 2(I)$. Cada cadena contiene exactamente 1050 aminoácidos, algunos rodeando a los otros, formando una triple hélice dextrógira^{12, 16}. El colágeno es muy rico en glicina, que se encuentra en cada tercer residuo de aminoácido a lo largo de la región central de las cadenas α y la prolina e hidroxiprolina pliegan y estabilizan la conformación helicoidal de cada una de las cadenas. La glicina favorece el denso empaquetamiento de las tres cadenas debido a su pequeño tamaño, ya que tiene un solo átomo de hidrógeno como cadena lateral^{12, 13}.

Los principales tipos de colágeno encontrados en tejido conjuntivo son los tipos I, II, III, V y IX, X, XI y XII. Donde el tipo I se encuentra principalmente en piel y huesos, y poseen gran resistencia a la tensión, es decir, que puede ser extendido sin romperse. Estos tipos moleculares se organizan en fibrillas de colágeno delgadas (de 10 y 300 nanómetros de diámetro) y de cientos de micrómetros de longitud en tejidos maduros. Estas fibrillas se van formando en palizada. Los tipos IX y XII son conocidos como *colágenos asociados a fibrillas*, formando parte de la superficie de la fibrillas. Se cree que unen a las fibrillas entre sí como a otros componentes de la matriz extracelular. Los tipos IV y III son las *formadoras de redes*: las primeras se unen en una especie de lámina o red que constituye la mayor parte de la lámina basal madura, mientras que las de tipo VII forman dímeros que se ensamblan formando *fibras de anclaje* por lo que ayudan a unir la lámina basal del epitelio al tejido conjuntivo subyacente¹³. Cabe destacar que el colágeno tipo I purificado a partir de tejidos animales maduros es insoluble en soluciones acuosas, debido en gran parte a los enlaces covalentes que unen entre sí moléculas adyacentes. En animales jóvenes, muchos

de estos enlaces no se han formado aún. La estructura tridimensional de la triple hélice es estabilizada principalmente por muchas interacciones débiles, incluyendo puentes de hidrógeno entre las tres cadenas.

Si una solución de colágeno tipo I de un animal joven se calienta por encima de los 40°C, la hélice en forma de varilla se desnaturaliza y las tres hebras se separan^{12, 15}; la reacción es irreversible debido a que la hélice es una estructura repetitiva, muy regular, donde los polipéptidos pueden comenzar a unirse a distintos lugares en los extremos, formando triples hélices alineadas, con segmentos de cadena única al final de cada cadena terminal^{14,15}.

Durante la biosíntesis, el alineamiento ordenado de los tres polipéptidos se debe a secuencias específicas en cada extremo. Las cadenas de colágeno son sintetizadas como precursores más largos, denominados procolágenos; por ejemplo, en el colágeno tipo I su triple hélice contiene 150 aminoácidos adicionales en el extremo nitrógeno-terminal y 250 en el carbono-terminal de ambos tipos de cadenas. Los aminoácidos adicionales forman parte de los propéptidos, con excepción de una cadena corta en la región helicoidal semejante al colágeno en el propéptido N, los cuales tienen composiciones aminoacídicas que forman dominios globulares¹².

Existen varios puentes disulfuro intracatenarios y cinco importantes puentes disulfuro intercatenarios conectando los propéptidos C- terminales de las tres cadenas de procolágeno. Los puentes disulfuro se forman en el retículo endoplásmico rugoso (RER), de igual forma que las triples hélices, por lo que son importantes para estabilizar la asociación de las tres hebras antes de la formación de la triple hélice¹².

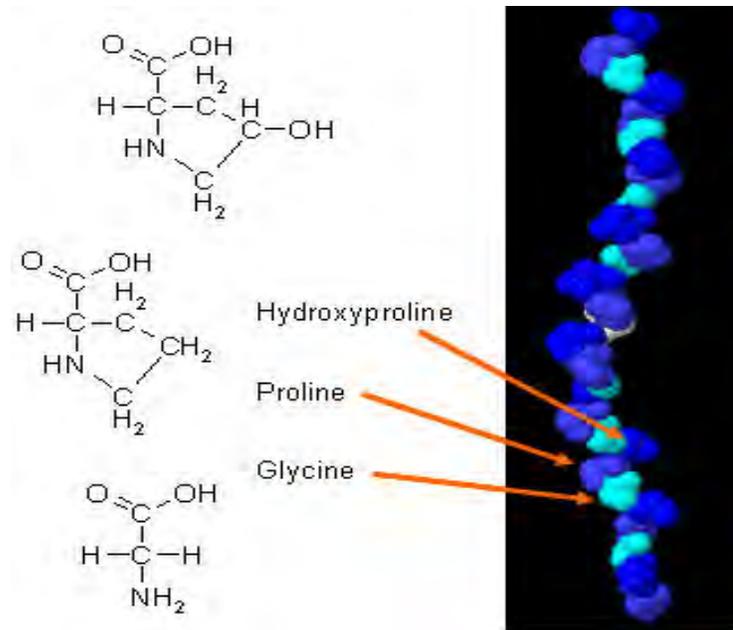


Figura 1. Estructura helicoidal de la molécula de colágeno. Fuente: http://www.steve.gb.com/science/extracellular_matrix.html

1.3.1 Biosíntesis del colágeno

El ensamblaje de las fibras de colágeno comienza en el RER, continúa en el complejo de Golgi y se completa en el espacio extracelular, además de la separación de las cadenas proteolíticas para eliminar los propéptidos N y C terminales, aunque existen modificaciones del colágeno recién formado antes de la formación de la triple hélice en el RER. Residuos específicos de la prolina y lisina son destinados a formar parte de la triple hélice, siendo hidroxilados por enzimas de membrana *prolil 4-hidroxilasa* y *prolil 3-hidroxilasa*, para formar *hidroxilisina* e *hidroxiprolina*; esta última puede ser glucosilada. En el espacio extracelular, las moléculas de colágeno son polimerizadas para formar fibrillas de colágeno mediante la liberación de propéptidos. Los residuos de ambos aminoácidos hidroxilados raramente se encuentran en otras proteínas estructurales¹³.

Los propéptidos ya secretados son degradados mediante enzimas proteolíticas específicas en el espacio extracelular, por lo que las moléculas de procólágeno se asocian formando fibrillas de colágeno mucho mayores. Los propéptidos tienen al menos dos funciones muy importantes: dirigir la formación intracelular de la triple hebra de las moléculas de colágeno y, debido a que sólo son eliminados después de su secreción,

previenen la formación intracelular de la grandes fibrillas de colágeno, lo cual sería catastrófico para la célula. (Figura 2)¹³.

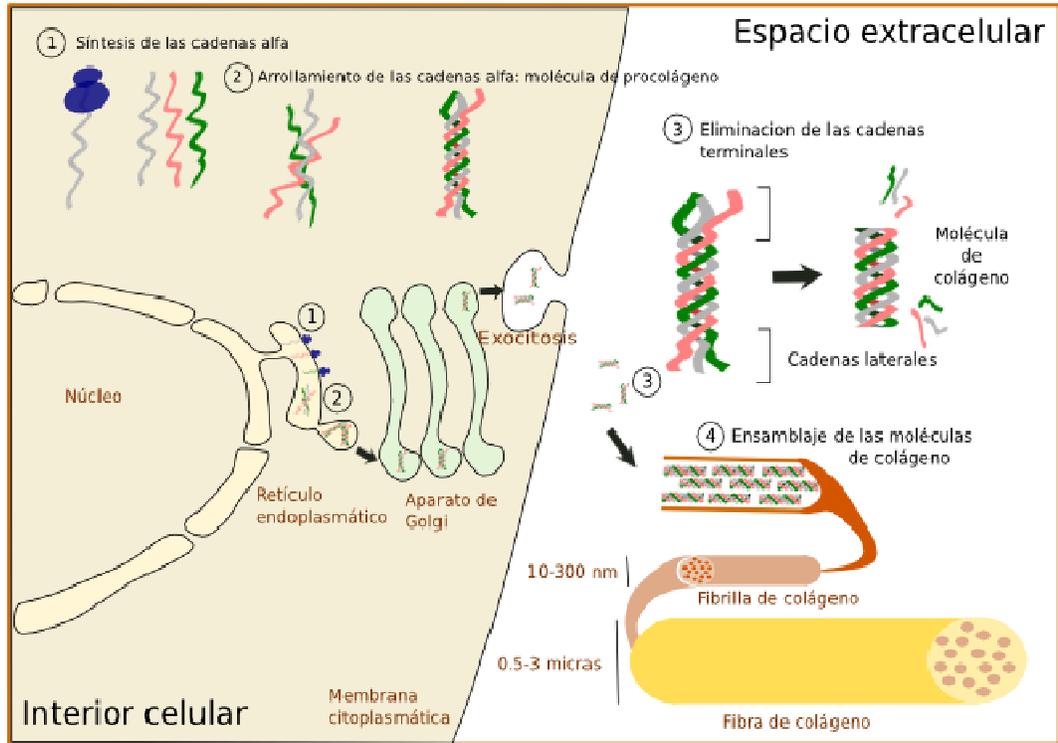


Figura 2. Biosíntesis de la molécula de colágeno. Fuente: http://webs.uvigo.es/mmegias/5-celulas/2-componentes_proteinas.php.

1.3.2 Detección del colágeno

Inicialmente las metodologías utilizadas para detectar la cantidad de colágeno, comenzaron con la identificación de hidroxiprolina, ya que es un aminoácido que se encuentra únicamente en el tejido conjuntivo de los seres vivos; por lo que el fundamento de la técnica utilizado es que la molécula de hidroxiprolina se conjuga con un compuesto fluorescente como el nitrobenzofurazan (NBD-Cl) el cual reacciona y hace visible al iminoácido (cualquier molécula que contenga en su estructura tanto un grupo imino $R-C=NH$ como un carboxilo $R-C(=O)-OH$)¹⁶. Dentro de las ventajas de esta metodología se destaca la rapidez, reproducibilidad, confirmación y alta especificidad^{4, 17}. Es importante destacar el principio que establecieron Neuman y Logan¹⁸, los cuales identificaron a partir de hidrolizados proteínicos a la hidroxiprolina utilizando peróxido de hidrógeno, sulfato de

cobre, dimetilaminobenzaldehído (reactivo Ehrlich's) para eliminar el exceso de oxidante y calor, produciéndose una reacción de oxidación en la que se hidroxila la prolina formando un compuesto pirrólico rojo, que se mide por espectrofotometría y que constituye una medida de la cantidad de hidroxiprolina de la muestra.

Stegemann¹⁹ usó ácido perclórico en lugar de ácido sulfúrico para eliminar el color de la tirosina con la cloramina T y así mantuvo la estabilidad de la hidroxiprolina. Bergman y Loxley²⁰ publicaron dos metodologías mejoradas a partir del trabajo de Stegemann. En estas metodologías en lugar de agregar ácido antes de la oxidación y esperar la disolución de la cloramina, combinaron el ácido con aldehído para reducir el tiempo de reacción, o bien incrementaron el disolvente orgánico para que la oxidación fuera independiente del tiempo; también establecieron el tiempo y la temperatura de calentamiento en 80 min a 60°C.

Goll *et.al* encontraron que hay una asociación entre edades diferentes de animales y el cambio en la estructura del colágeno, en donde confirmó que la actividad de la collagenasa disminuye mientras la edad cronológica aumenta, además de que la cantidad de hidroxiprolina liberada disminuye al someterla a diferentes temperaturas, considerando que existen cambios en la solubilidad intramuscular del colágeno en carne de animales a distintas edades²¹.

Hill realizó un estudio acerca de la solubilidad del colágeno intramuscular en animales de distintas edades, en el que utilizó el músculo *sternomandibularis* entre otros. Deshidrató y molió cantidades conocidas del músculo y fueron colocadas en tubos plásticos con 12 ml de solución Ringer's 1/4²³, la cual tiene la función de debilitar los enlaces intermoleculares del colágeno, posteriormente los tubos fueron colocados en baño maría a 77°C durante 63 min, moviéndolos a intervalos iguales de tiempo. Centrifugó y separó el sobrenadante del residuo, y éste último fue lavado con 8 ml de solución Ringer's y nuevamente fue centrifugado. El sobrenadante y el residuo fueron colectados e hidrolizados con HCl 6 M durante 7 h por separado. La hidroxiprolina fue obtenida mediante la técnica de hidrólisis de Mohler *et. al*²⁴ y con el método de Neuman y Logan¹⁸. En conclusión, este trabajo reportó el grado de solubilidad y la cantidad total, pero hace hincapié en que se consideren las características bioquímicas de la carne; ya que su método está sujeto a la

influencia de la tirosina así como a la inhibición incompleta del color, por lo que sería útil para evaluar canales de distintas razas o cruza entre ellas, esta metodología fue una de las pioneras para la identificación de hidroxiprolina. El método podría ser más sensible y preciso mediante la modificación de Woessner²⁵, que consistió en aumentar la estabilidad e intensidad del color del compuesto pirrólico, incrementando la presencia de otros aminoácidos para medir la hidroxiprolina, en lugar de usar peróxido para destruir el cromógeno final.

Cross *et al.* tuvieron como objetivos en su investigación medir los efectos de la elastina y el colágeno en determinar la suavidad del tejido muscular bovino, además de relacionar los cambios del tejido conjuntivo con la edad y el músculo, determinando las concentraciones relativas de colágeno y elastina. Estas midieron el contenido de hidroxiprolina o colágeno total con tres métodos: a) multiplicando el contenido de hidroxiprolina con el sobrenadante y residuos por 7.25²¹, b) restando el contenido de hidroxiprolina de la elastina, c) multiplicando el contenido de hidroxiprolina del residuo por 7.25 y la del sobrenadante por 7.52, para medir la cantidad de colágeno soluble y de hidroxiprolina de la muestra; donde encontraron que las cantidades de tejido conjuntivo están más asociadas a la edad del animal que a las medidas de suavidad en la fibra muscular. Además, los ajustes en los valores de colágeno total y el porcentaje de colágeno soluble resultaron ligeramente superiores en la correlaciones de suavidad, incluso se observó una pequeña ventaja al ajustar el contenido de elastina en el residuo²⁶.

1.3.3 Efecto del colágeno en la calidad de la carne

Según Boccard *et al.*²⁷, la concentración de colágeno afecta la suavidad del músculo. Esta característica varía de un músculo a otro, dependiendo de la actividad física a la que esté sometido, ya que cuando existe mayor actividad del músculo éste tiene que soportar mayor tensión y demandará más energía, por lo tanto, aumenta la cantidad de las fibras de colágeno. Se puede contrarrestar este efecto con tratamientos como: estimulación eléctrica después del sacrificio, lo que provoca una reducción en el estrechamiento de las fibras de colágeno, favoreciendo la suavidad²⁸. El colágeno está formado por dos fracciones: soluble e insoluble; la primera puede estar afectada por la edad del animal, condiciones de almacenamiento y la diferencia entre músculos¹, lo cual determina la

cantidad de la segunda fracción. Cuando el colágeno insoluble se encuentra en mayor cantidad en la carne, disminuye la suavidad de ésta, lo que se traduce en una característica indeseable para el consumidor.

Ngapo *et al.*, mencionan que la raza es un factor importante que influye en la cantidad de colágeno, lo que indica que dependiendo de la genética, la cantidad de colágeno puede variar en mayor o menor grado²⁹.

Wheeler *et al.*, señalan que la longitud del sarcómero, el contenido de tejido conectivo (colágeno, elastina, proteínas estructurales) y la proteólisis miofibrilar en asociación con las proteínas no explican totalmente la terneza en el almacenamiento post-mortem, pero la degradación de la proteína muscular sí afecta la suavidad de la carne³⁰.

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a la necesidad de conocer la cantidad de hidroxiprolina como parámetro bioquímico del contenido de colágeno total en la carne y para la determinación de su calidad, se implementó, una metodología nueva, específica y sensible. Donde para su identificación y medición se utilizó cromatografía de líquidos de alta resolución, con detector de fluorescencia que ha demostrado ser altamente precisa y confiable.

3. HIPÓTESIS

La cantidad de hidroxiprolina (colágeno total) que se libera por la hidrólisis del músculo en medio ácido con energía electromagnética será mayor en los músculos de *Bos indicus* y menor en *Bos taurus*, y un efecto intermedio en las cruza comerciales, además de diferencias entre los músculos infraespinoso y redondo mayor en la cantidad de colágeno total.

4. OBJETIVO

Determinar la cantidad de hidroxiprolina a partir del músculo hidrolizado, en medio ácido y con energía electromagnética por cromatografía de líquidos, posterior a su derivación, para calcular la cantidad de colágeno total en muestras de carne bovina

provenientes de tres grupos genéticos mexicanos con el objetivo de relacionar dichos resultados con la calidad y su posible comercialización.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Obtención de muestras

Se recolectaron 165 muestras de once músculos, los cuales fueron: *Biceps brachii* (bíceps), *Brachialis* (braquial), *Complexus* (complejo), *Splenius* (esplenio), *Infraespinatus* (infraespinoso), *Teres major* (redondo mayor), *Rhomboideus* (romboides o romboideo), *Subescapularis* (subescapular), *Supraespinatus* (supraespinoso), *Triceps brachii* (triceps braquial: cabeza lateral y cabeza larga). Los músculos provinieron de 15 canales de tres grupos genéticos (5 canales de cada grupo) bovinos en México: Grupo 1: Cruza comercial proveniente del Estado de Querétaro, se consideraron en esta categoría a los animales que no presentaban características indicativas de ganado europeo y/o cebú; para este grupo en particular la mayoría eran cruza con ganado cebú. Grupo 2: *Bos indicus* o Cebú (Brahman, Gyr, Nelore), provenientes del Estado de Veracruz; Grupo 3: *Bos taurus* (Charolais, Simmental y Limousin), provenientes del Estado de Nuevo León. Todos los animales se encontraban entre 18 y 24 meses de edad y habían sido alimentados con dietas similares, adicionadas con clorhidrato de zilpaterol, con un periodo de engorda de 80 a 110 días. Los animales tuvieron un periodo de descanso menor a 12 horas antes del sacrificio; después del degüello *Bos indicus* y *Bos taurus* recibieron estimulación eléctrica de 110 volts durante 10 a 15; segundos, sólo el grupo de crusa comercial no la recibió por razones de costumbre del lugar. Se obtuvieron los músculos mediante la disección de cuartos delanteros, después de 24 horas de refrigeración de las canales. Posteriormente, fueron identificados, empacados al vacío en envases isotérmicos con gel refrigerante y congelados para su transporte aéreo y terrestre a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM, Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, Laboratorio de Toxicología. Se descongelaron en un periodo de 24 a 30 h entre los 2 y 4°C. Se obtuvieron cortes de cada músculo de 2.5 cm de grosor y las muestras fueron adecuadas mediante la metodología descrita por la AOAC para eliminar la humedad y la grasa (extracto etéreo)³¹. Véase en el Anexo 1 las ilustraciones de los músculos del cuarto delantero bovino.

5.2 Determinación de hidroxiprolina como biomarcador bioquímico del colágeno total mediante HPLC (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución)

La metodología utilizada en este trabajo esta basada en la investigación de Vázquez-Ortíz *et al.*¹⁷, a la que se le realizaron modificaciones para adaptarla al Laboratorio de Toxicología de la FMVZ, las cuales se mencionarán más adelante.

Una vez obtenidas las muestras deshidratadas y desengrasadas, se pesaron 3 (\pm 0.4) mg de cada muestra (con su duplicado) y se colocaron dentro de ampollitas de borosilicato de 3 ml de capacidad donde cada una fue identificada.

5.2.1 Preparación de reactivos y soluciones

- Solución de ácido clorhídrico 6 Molar (HCl 6M).

Todas las soluciones se prepararon en moles (M) y normalidad (N). La molaridad es el número en gramos del peso molecular de la substancia disueltos en un litro de agua destilada. La normalidad es el número en gramos del peso molecular disuelto en un litro y dividido entre el número de hidrógenos sustituibles.

Se realiza el cálculo a partir de HCl 12M del fabricante de la siguiente manera:

ml de HCl concentrado a diluir en 1 L = $219 / \{(\rho_{\text{HCl}} * \% \text{ de pureza HCl}) * 100\}$

Donde:

219= masa molar de HCl g/mol

ρ = Densidad 1.18

% de pureza (frasco)= 37

Sustitución:

1 L HCl 6M= $219 / \{1.18 * 37\} * 100 = \mathbf{501.6 \text{ ml HCl a diluir en 1L de agua destilada.}}$

Añadir a cada ampollita 2 ml de esta solución para realizar la hidrólisis.

- Preparación de buffer de citrato de sodio ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$) concentración 0.2 N pH 2.2

Para obtener 1 L del buffer de citrato de sodio se consideraron las siguientes características:

Peso molecular del citrato de sodio: 294.1g/mol o bien 1 N

El citrato de sodio utilizado fue dihidratado por lo que se considera el peso molecular del agua para realizar el cálculo:

$$2H_2O = O_2 = 16 + 2H = 2 = 18(2) = 36$$

$$294.1 + 36 = 330.1g/L / 1N$$

$$330.1/100 = 3.30 g/0.1 N \text{ pero se requiere } 0.2 N \text{ por lo que sólo se multiplica por } 2$$

$$3.30 (2) = \mathbf{6.60g / L / 0.2 N}$$

Se diluye en 1L de agua destilada y por último se ajusta el pH con potenciómetro añadiendo pequeñas cantidades de ácido acético absoluto hasta llegar a pH 2.2

- Solución de borato de sodio ($Na_2B_4O_7$) concentración 0.4M pH10.4

Para preparar 100 ml ³²:

Peso molecular 201.42g/ mol

$$201.42 * 0.1L / 1L = 20.14 / 100 \text{ ml } 1 M$$

$$20.14 * 0.4M / 1M = \mathbf{8.05g / 100ml / 0.4M}$$

- Solución de HCl 1M.

Para preparar 100 ml:

$$12 \text{ M} - 1 \text{ L}$$

$$1 \text{ M} - X$$

$X = 1/12 = 0.083 * 100 = \mathbf{8.33 \text{ ml HCl a diluir en 91.7 ml de agua destilada.}}$

- Fase móvil (A) para HPLC: acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$).

Para 1 L de buffer acetato de sodio 0.1M pH 7.2¹⁷.

Peso molecular de acetato de sodio trihidratado ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) g/mol:

$$\text{P. mol} = 136.08 \text{ g/mol}$$

$$\text{P. mol} = 3\text{H}_2\text{O} (18*3) = 54 \text{ g/mol}$$

$$\text{Donde: } 136.08 + 54 = 190.08 \text{ g/mol o } 1 \text{ M}$$

Se requiere 0.1 M $190.08 / 10 = \mathbf{19.08 \text{ g para 1 L de agua destilada}}$

Ajustar pH con potenciómetro,

Para terminar la preparación de la fase móvil se agregaron 95 ml de metanol grado HPLC y 5 ml de tetrahidrofurano a los 900 ml de buffer.

5.2.2 Hidrólisis

Se define como el desdoblamiento de sustancias orgánicas o inorgánicas complejas a compuestos más sencillos con energía y en medio ácido acuoso.

Para su hidrólisis, la muestra se depositó en ampollitas de borosilicato dentro de una bomba de teflón. La hidrólisis se realizó en un horno de microondas en medio ácido y en sistema cerrado, mediante el uso de energía electromagnética. Las especificaciones para el funcionamiento del horno fueron las usadas para la hidrólisis de aminoácidos durante 25

min en tres etapas: 100% de potencia durante 10 min a 50 psi, 50% de potencia durante 10 min a 75 psi y 30% de potencia durante 5 min a 75 psi.

Las ampollitas se colocaron en vasos de teflón a los cuales se les agregó HCl 6 M para mantener la atmósfera ácida dentro de los vasos y se cerraron para mantener la presión constante.

Después de la hidrólisis se retiraron los tubos del horno y se terminó el enfriamiento en refrigeración para evitar la fuga de los ácidos (de las muestras) y quemaduras por su liberación.

Las muestras hidrolizadas en los tubos se evaporaron a sequedad en baño maría a $65(\pm 1)$ °C, con un flujo constante de gas nitrógeno para mantener ambiente neutro.

5.2.3 Derivación del bioindicador hidroxiprolina

El término derivación es de origen inglés (derivatization); se define como la modificación química de un compuesto para obtener otro con propiedades diferentes, además de que resulta ser una herramienta analítica que puede usarse para confirmar, seleccionar e incrementar la sensibilidad de ciertos compuestos³³.

Las muestras se resuspendieron con 2 ml de citrato de sodio, de ahí se tomaron 250 μ l para aforar a 1 ml en buffer de borato de sodio 0.4 M a pH 10.4 a lo que se añadió 750 μ l de buffer borato; se mezcló y se tomó alícuota de 250 μ l para añadirle el compuesto derivador NBD-Cl (7-cloro-4-nitrobenzofurazan, Sigma-Aldrich 163260-5G) a razón de 2 mg NBD-Cl / ml metanol.

La mezcla se mantuvo a $60 (\pm 1)$ °C en baño maría durante 5 min y en un vial cerrado; por último, se retiró del calor, se detuvo la reacción con 50 μ l de HCl y enseguida la muestra derivada se enfrió a 0°C durante 30 min.

5.2.4 Características cromatográficas

Para la medición de hidroxiprolina se usó el sistema HPLC con bomba binaria (Mod. Perkin-Elmer serie 200), con inyector manual (Rheodyne) y asa de 20 μ l. La

separación del compuesto se realizó con columna C18, con una longitud de 80 mm, conectada a un detector de fluorescencia de longitud de onda variable (Mod.Waters 470) con flujo de 1 ml/s y un gradiente de elución con las siguientes etapas: fase móvil (A) 100 % en 0 min; 80 % A de 0.5 – 6.5 min; 0 % A de 8.0 – 10 min para limpieza del sistema; 100 % A de 12 – 15 min de reacondicionamiento para la siguiente muestra. El detector de fluorescencia se programó a 465 nm de longitud de onda de emisión y 535 nm de excitación.

Los cromatogramas fueron registrados e integrados a un sistema informático PC a través de interfase análogo - digital, para ver las respectivas señales de cada muestra.

Para el cálculo de la concentración de hidroxiprolina en la muestra, se consideró el tamaño de la muestra, los factores de dilución multiplicados por la transformación del porcentaje de área en concertación, una vez estimada la concertación en la curva de regresión de los estándares de hidroxiprolina (*trans-4-Hidroxi-L-prolina* Sigma-Aldrich H54409-10G).

5.2.5 Implementación y validación del método para la medición de la hidroxiprolina como indicador bioquímico del colágeno total.

Con el objetivo de medir la concentración de hidroxiprolina, se realizó la hidrólisis del músculo en medio ácido con el uso de energía electromagnética (microondas) controlada. El hidrozilado del músculo se amortiguó con buffer a pH controlado. El derivado de la hidroxiprolina se obtuvo con el uso de NBD-Cl. La cuantificación del derivado de la hidroxiprolina se obtuvo por análisis de HPLC, en una mezcla de buffer y metanol para la fase móvil en sistema binario de gradiente. La validación del método se obtuvo con la identificación de los coeficientes de:

1. **Reproducibilidad:** se realizó al inyectar varias veces la misma concentración estándar de hidroxiprolina y se obtuvo un coeficiente de variación no mayor de 1.95%.
2. **Linealidad:** los valores de linealidad se obtuvieron al inyectar tres concentraciones del estándar al buscar la curva con un valor mayor de $r^2 = 0.99$.
3. **Especificidad:** se identificó cuando el tiempo de retención se obtuvo igual en todas las inyecciones, con una variabilidad no mayor de 2 centésimas de minuto.

4. **Sensibilidad:** se calculó al conocer la mínima respuesta de la superficie del estándar correspondiente a una concentración de 0.4 ng/g de muestra.

Para el cálculo de colágeno total se midió la hidroxiprolina en la muestra. La concentración de hidroxiprolina se obtuvo al identificar la señal en el cromatógrafo. Esta señal fue convertida a la concentración mediante regresión lineal, usándose cantidades conocidas del estándar. En la regresión lineal, la fórmula matemática fue la siguiente: $y = a + b(x)$ donde $y =$ estimado de la concentración de la hidroxiprolina, $a =$ intersección, $b =$ pendiente y $x =$ tamaño de la respuesta del cromatógrafo de líquidos (superficie de área). Para el cálculo de la concentración final de hidroxiprolina se consideró el tamaño de respuesta en el equipo, la alícuota inyectada (30 μ l), el volumen de aforo (2 ml), el tamaño de muestra (3 mg) y el porcentaje de recuperación (33.7%) del cromatógrafo.

Por último, para obtener la concentración de colágeno total (mg/g) se multiplicó el contenido de hidroxiprolina por el factor de conversión de 7.52, utilizado para la suma de ambas fracciones del colágeno (soluble e insoluble) resultando el total¹⁷.

5.2.6 Análisis estadístico

Los datos fueron evaluados estadísticamente mediante análisis de varianza donde la variable dependiente fue el colágeno y las independientes el grupo genético y el músculo. Para un diseño completamente al azar en arreglo factorial, se utilizó el paquete estadístico SAS³⁴ y la comparación de medias se realizó por el método de Tukey³⁵. El modelo estadístico usado fue: $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$, donde $Y_{ijk} =$ cantidad de hidroxiprolina, $\mu =$ media general, $\alpha_i =$ efecto de la i -ésima raza, $i = 1, \dots, 3$, $\beta_j =$ efecto del j -ésimo músculo, $j = 1, \dots, 11$, $\alpha\beta_{ij} =$ efecto de la interacción raza x músculo y $\varepsilon_{ijk} =$ error aleatorio.

6. RESULTADOS

Los cromatogramas de cada músculo se muestran en el Anexo 2. En cada figura se indica con una flecha el pico de la hidroxiprolina.

6.1 Cantidad de colágeno total en los once músculos, combinando los tres grupos genéticos bovinos.

En el Cuadro 1 se muestran las medias de mínimos cuadrados de la cantidad de colágeno de los once músculos. El músculo con la mayor ($P<0.05$) cantidad de colágeno fue el redondo mayor (29.14 mg/g). Los músculos con una cantidad intermedia de colágeno fueron el tríceps largo e infraespinoso (21.26, 24.83 mg/g). El contenido de colágeno del músculo tríceps lateral fue de 11.27 mg/g semejante al resto de los músculos y muy por debajo del tríceps largo e infraespinoso (Cuadro 1).

Cuadro 1. Medias de mínimos cuadrados y error estándar para la cantidad de colágeno de los once músculos combinados con los tres grupos genéticos de bovinos.

Músculo	Colágeno total mg/g	Error estándar
Bíceps	14.72 ^{a,d}	1.59
Braquial	14.91 ^{a,d}	1.59
Complejo	12.36 ^{a,d}	1.59
Esplenio	16.40 ^{a,d}	1.59
Infraespinoso	24.83 ^b	1.59
Redondo mayor	29.14 ^c	1.59
Romboide	12.88 ^{a,d}	1.59
Subescapular	14.67 ^{a,d}	1.59
Supraespinoso	18.02 ^{a,d}	1.59
Tríceps lateral	11.27 ^d	1.59
Tríceps largo	21.26 ^b	1.59

^{a,b,c} Literales diferentes indican diferencia significativa ($P<0.05$).

6.2 Cantidad de colágeno total de cada grupo genético bovino

La mayor cantidad de colágeno total la tienen los músculos de origen *B. indicus* y la menor los de origen *B. taurus*, quedando en una posición intermedia el grupo de músculos de las cruza comerciales (Cuadro 2).

Cuadro 2. Medias de mínimos cuadrados y error estándar para la cantidad de colágeno total en cada grupo genético de bovino.

Grupo genético	Promedio	Error estándar
<i>Bos indicus</i>	25.62 ^a	0.83
<i>Bos taurus</i>	9.56 ^b	0.83
Cruza comercial	16.76 ^c	0.83

^{a,b,c} Literales diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

6.3 Cantidad de colágeno total por la interacción de cada músculo por cada grupo genético bovino

La cantidad de colágeno del músculo Bíceps fue mayor para el grupo *Bos indicus* (27.43 mg/g), y la menor para el grupo de músculos de origen *Bos taurus* (0.64 mg/g), por otro lado los músculos de la cruce comercial tuvieron una concentración intermedia (16.09 mg/g), aunque los tres grupos fueron diferentes entre si significativamente ($P < 0.05$).

La cantidad de colágeno en el músculo Braquial del grupo cruce comercial mostró significativamente mayor cantidad de colágeno (24.87 mg/g), comparado con los dos grupos genéticos restantes que fueron similares entre sí.

El músculo Complejo fue similar entre los tres orígenes genéticos ($P < 0.05$).

La cantidad de colágeno para el músculo Esplenio fue muy similar entre los grupos *Bos taurus* y cruce comercial por lo que no hay diferencia significativa, pero en *Bos indicus* fue elevada (37.01 mg/g).

El músculo Infraespinoso de *Bos indicus* tuvo la mayor cantidad de colágeno (50.26 mg/g) y diferente significativamente ($P<0.05$). Los grupos restantes fueron similares entre si significativamente.

Para el músculo Redondo mayor la cantidad de colágeno fue menor (6.15 mg/g) en el grupo cruce comercial, mientras que el origen *Bos indicus* tuvo la mayor cantidad de colágeno 64.69mg/g ($P<0.05$).

El músculo Romboide del grupo *Bos indicus* tuvo mayor cantidad de colágeno (19.15 mg/g) y diferente significativamente, aunque los orígenes restantes fueron muy similares en concentración de colágeno (9.65 mg/g, 9.84 mg/g) y no hubo diferencia significativa.

El músculo Subescapular tuvo la mayor cantidad de colágeno (29.68 mg/g) del grupo cruce comercial además de ser diferente significativamente ($P<0.05$) del resto de los grupos genéticos.

El músculo Supraespinoso, fue diferente significativamente entre los tres grupos genéticos ($P<0.05$), donde para *Bos indicus* la cantidad fue de 29.29 mg/g, cruce comercial tuvo concentración intermedia de 18.31 mg/g, y en *Bos taurus* 6.47 mg/g.

En el músculo Tríceps lateral la cantidad de colágeno fue menor en *Bos taurus* (15.18 mg/g) respecto a los orígenes genéticos restantes ($P<0.05$). Por otro lado *Bos indicus* y cruce comercial fueron semejantes cantidades (26.57 mg/g, 22.04 mg/g).

Por último, los músculos Tríceps largo de *B. taurus* y cruce comercial tienen similar cantidad de colágeno 15.01mg/g y 15.94 mg/g respectivamente ($P>0.05$).

Cuadro 3. Medias de mínimos cuadrados y error estándar para la cantidad de colágeno para cada músculo y por grupo genético de bovino.

Músculo	<i>Bos indicus</i>	<i>Bos taurus</i>	Cruza comercial	Error estándar
Bíceps	27.43 ^a	0.64 ^b	16.09 ^c	2.76
Braquial	9.89 ^a	9.98 ^a	24.87 ^b	2.76
Complejo	12.73 ^a	8.48 ^a	15.85 ^a	2.76
Esplenio	37.01 ^a	5.50 ^b	6.70 ^b	2.76
Infraespinoso	50.26 ^a	5.33 ^b	18.92 ^b	2.76
Redondo	64.69 ^a	16.58 ^b	6.15 ^c	2.76
Romboide	19.15 ^a	9.65 ^b	9.84 ^b	2.76
Subescapular	1.95 ^a	12.37 ^a	29.68 ^b	2.76
Supraespinoso	29.29 ^a	6.47 ^b	18.31 ^c	2.76
Tríceps lateral	26.57 ^a	15.18 ^c	22.04 ^{a,c}	2.76
Tríceps largo	2.82 ^a	15.01 ^b	15.94 ^b	2.76

^{abc} Literales diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (P<0.05).

7. DISCUSIÓN

Según Boccard *et al.*²⁷, la cantidad de colágeno afecta la suavidad del músculo. Esta varía de un músculo a otro, dependiendo de la actividad física a la que esté sometido, ya que cuando existe mayor actividad del músculo tiene que soportar mayor tensión y demandará más energía; por lo tanto aumenta la cantidad de las fibras de colágeno. Para comprender mejor los resultados es importante destacar la anatomía de cada uno de los músculos analizados.

El músculo Bíceps braquial (*biceps brachii*) realiza una gran actividad porque flexiona la articulación del codo, fijando al hombro y al codo a la vez cuando el animal está parado, además de tensar la fascia antebraquial^{36, 37}. El grupo (Bi) tuvo la mayor cantidad de colágeno total en este músculo, Dikeman³⁸ y citado por O'Connor³⁹, concluyó que el decremento de la suavidad es un problema cuando el ganado está compuesto por 50% o más de *Bos indicus*.

El músculo Braquial (*brachialis*) también realiza actividad semejante al bíceps braquial aunque este ocupa el surco lateral del húmero³⁶. Tiene gran cantidad de tejido conjuntivo debido a su función. Destacó por tener la mayor cantidad de colágeno en el grupo CC. Stolowski *et al.*⁴⁰, encontró que la suavidad de los músculos de animales provenientes de cruzas entre ganado europeo y cebú era menor que en animales con mayor encaste europeo. En el estudio de Chávez *et al.*², se señaló que el braquial es un músculo duro para CC, ya que tuvo 6.41 ± 0.24 Kg en fuerza de corte. López y Casp⁴¹, mencionan que la estimulación eléctrica (EE) tiene efecto sobre las características sensoriales de la carne, entre ellas la suavidad, lo que está relacionado con la concentración de colágeno. Hay que recordar que el grupo CC no recibió estimulación eléctrica.

El músculo Complejo (*complexus*) tiene la acción de extender la cabeza y el cuello³⁷. Koch *et al.*⁴² y Crouse *et al.*⁴³ observaron que la carne procedente de animales como lo encontrado en este estudio, mostraron que *Bos taurus* era mas suave que la de animales de origen y cruzas de *Bos indicus*, Wheeler *et al.*⁴⁵, en su estudio señalaron que la suavidad de los músculos de animales de raza europea posiblemente se deba a la gran actividad de la proteasa dependiente de calcio I (CDP-I por sus siglas en inglés), mientras

que la actividad inhibidora es baja, lo que indica una etapa temprana de proteólisis. Johnson *et al.*⁴⁶, mencionaron que la actividad inhibitoria de la proteasa calcio dependiente (CDP-i, por sus siglas en inglés) fue muy alta en los animales con encaste Brahman, lo que indica una etapa tardía de proteólisis. Esto puede explicar las diferencias de concentración de colágeno que existen entre cada grupo genético, sobre todo entre Bi y Bt.

El músculo Esplenio (*splenius*) tiene la función de elevar la cabeza y el cuello³⁶; es totalmente carnoso, con cantidades moderadas de tejido conjuntivo³⁷, y el músculo Romboides (*rhomboideus*) se divide en dos porciones, aunque no están anatómicamente definidas. La porción torácica llega a la escápula dorsal y hacia medial contribuye a sostener el miembro cuando está en movimiento; la porción cervical ayuda al movimiento de la escápula dorsal y hacia craneal al cuello cuando está fijo; cuando actúa un solo músculo el cuello se inclina lateralmente; el cuello se eleva cuando actúa con el músculo contralateral⁵². Chávez *et al.*², consideraron que la fuerza de corte para el grupo *Bos indicus* en ambos músculos fue elevada. Ello se puede relacionar a la concentración de colágeno elevada para el músculo Esplenio, pero en el músculo romboides, Chávez *et al.*², encontraron un alto porcentaje de grasa intramuscular (mayor al 8%), lo que influyó en la suavidad del músculo. En este estudio la cantidad de colágeno fue superior respecto a los grupos restantes debido al efecto genético.

El músculo Infraespinoso (*infraespinatus*) es potente y está extraordinariamente infiltrado de tendones ocupando la fosa infraespinosa en su totalidad. Funciona como ligamento colateral lateral del hombro³⁶; puede contribuir a la flexión y extensión, así como abducir el brazo. La cantidad de colágeno fue la más baja en Bt (5.33mg/g). McKeith *et al.*⁴⁷ y Torrescano *et al.*⁴⁸ encontraron bajas cantidades de colágeno total en este músculo; sin embargo Bi fue superior al resto (50.26 mg/g), debido al efecto genético en este estudio.

El músculo Redondo mayor (*teres major*) tiene forma aplanada, extendiéndose desde el borde caudal de la escápula a la tuberosidad mayor del húmero, asentándose sobre la superficie medial del tríceps braquial. Su función es flexionar la articulación del hombro³⁶. Tuvo la mayor cantidad de colágeno de todos los músculos, siguiéndole en orden decreciente el músculo infraespinoso del grupo Bi; hubo gran diferencia por efecto genético respecto a los demás grupos. Belew *et al.*⁴⁹; Von Seggern *et al.*⁵⁰; Calkins y Sullivan⁵¹, lo

clasificaron como uno de los músculos mas suaves no sólo del cuarto delantero bovino sino de toda la canal, aunque hay que señalar que estos investigadores dejaron un periodo de maduración, lo cual influye en la suavidad

El músculo Subescapular (*subscapularis*) tiene como principal función la aducción, aunque puede servir como extensor de la articulación del hombro y en ocasiones como flexor, cuando la articulación está contraída⁵². Las cantidades de colágeno en el grupo Bi fueron muy bajas (1.95 mg/g). Locker *et al.*⁵³, en su estudio considera que al someter el tejido muscular al calor, existe una reducción en la cantidad de fibras de colágeno tanto del perimisio como del endomisio incluso al colágeno intramuscular, lo que puede explicar la baja cantidad de colágeno en el músculo. Nishimura *et al.*⁵⁴, menciona que el tiempo postmortem modifica las propiedades del tejido intramuscular así como del tejido conjuntivo promoviendo cambios en las moléculas, lo cual influye en el colágeno y sus propiedades.

El músculo Supraespinoso (*supraspinatus*), es muy poderoso en los bovinos, su función consiste en extender la articulación del hombro, lo que indica que realiza mucha actividad y la cantidad de tejido conjuntivo es mayor³⁶. Pero en el grupo Bt tuvo las menores cantidades de colágeno y en el Bi tuvo la mayor concentración de colágeno. Stolowsky *et al.*⁴⁰ y O'Connor *et al.*³⁹ reportaron que las cruza con mayor encaste cebuino influyen en la cantidad de colágeno; además, la actividad de la calpastatina es más lenta en animales de origen cebú que en animales de origen europeo, lo que explica las grandes concentraciones de colágeno en Bi, así como en otras características de carne. Sin embargo, en CC la concentración de colágeno fue menor que en Bi.

El músculo Tríceps braquial (*triceps brachii*) tiene la función de flexionar y extender la articulación del codo³⁶. Está dividido en tres porciones: cabeza larga, lateral y medial. Para fines del estudio, sólo se analizaron la cabeza larga y lateral por ser un músculo muy grande, ya que la porción medial es muy pequeña. La porción lateral en Bt tuvo la menor cantidad de colágeno, mientras que los grupos restantes fueron similares entre sí. McKeith *et al.*⁴⁷ y Torrescano *et al.*⁴⁸ encontraron bajas cantidades de colágeno total para el Tríceps.

En cambio, la porción larga de Bi, mostró que la cantidad de colágeno fue muy baja del resto, Locker *et al.*⁵³ y Lepetit⁵⁵, mencionan que la molécula de colágeno al ser sometida al calor modifica su estructura alterando los enlaces moleculares (fracción soluble), por lo que probablemente el colágeno haya disminuido su concentración en este músculo, para efectos de este estudio sólo se midió la concentración total.

8. CONCLUSIONES

Se obtuvieron datos esperados acerca de la cantidad de hidroxiprolina (colágeno total) en músculos del grupo *Bos indicus*, ya que tuvieron la mayor concentración, así como en *Bos taurus* donde sus valores fueron inferiores, el estudio se realizó de la manera más real posible, ya que son las condiciones en las que se encuentra el ganado bovino de carne en nuestro país. Los músculos de las cruas comerciales mostraron algunas diferencias significativas respecto al esplenio, redondo y supraespino, lo que podría sugerir su posible comercialización en el mercado. La metodología utilizada fue modificada, implementada y validada para la determinación de hidroxiprolina, la cual se podrá utilizar para investigaciones posteriores, además de aportar información acerca de músculos que no son comercializados o bien subutilizados en México.

9. REFERENCIAS

1. Bailey A. The role of collagen in the development of muscle and its relationship to eating quality. 1985. *J Anim Sci.* 60: 1580-1587.
2. Chávez GA, Méndez M. RD, Garcés Y. P, Rubio L. MS. Caracterización fisicoquímica de músculos del cuarto delantero de tres grupos genéticos diferentes (*Bos indicus*, *Bos taurus* y Cruzas comerciales) de bovinos mexicanos. Memorias 1er Congreso de la Ciencia de la Carne 2009. Junio 17-19. Distrito federal, México. Asociación Mexicana de Ciencia y Tecnología de la Carne, AC. 2009: 90-97.
3. Hill F. Solubility of intramuscular collagen in meat animals in various ages. 1966. *J Food Sci.* 31: 161-166.
4. Palmerini CA, Vedovelli A, Morelli A, Fini C, Floridi A. Analysis of acid-soluble hydroxyproline free prolin and collagen bound hydroxyproline intraliver by High Liquid Chromatography after Chemical derivatization. *J Liquid Chromatography* 1985; 8: 1853-1866.
5. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación 2006. Disponible en <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Estudios> de situación actual y perspectiva/Attachments/3/sitbov06.pdf
6. Ruiz A, Sagarnaga ML, Salas JM, Aguayo V, Estrella H, González M, Juárez A. Impacto del TLCAN en la cadena de valor de bovinos para carne. Universidad Autónoma Chapingo. 2004.
7. Promotora de Servicios Comerciales del Estado de Campeche. Perfil de la carne de bovino. 2006.
8. Gasque GR, Blanco OM. Sistema de Producción Animal I: Bovinos. Volumen 1. División del Sistema Universidad Abierta y Educación a Distancia. FMVZ UNAM. Ciudad Universitaria. México, D.F. 2001.
9. Helman, MB. Cebutecnia. 2ª ed. Librería “el ateneo” Editorial.1986.
10. Página web: cebumexico.com. México: Asociación Mexicana de Criadores de Cebú. c2010. [actualizado 2010, citado mayo 9, 2010]. Disponible en: <http://www.cebumexico.com>
11. Página web: brafordmexico.com. México: Asociación Mexicana de Criadores de Ganado Braford A.C. c2006-2010 [actualizado Marzo, 2010, citado mayo 2, 2010] Disponible en: <http://www.brafordmexico.com>

12. Darnell J, Lodish H, Baltimore D. *Biología celular y molecular*. 2ª ed. Ediciones Omega.1993.
13. Alberts BC, Bray D, Lewis J, Raff M, Watson JD. *Biología molecular de la célula*. 3ª ed. Editorial Omega.1994.
14. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Bioquímica de Harper*. 17ª ed. El Manual Moderno. 2007. México.
15. Karp G. *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos*. Mc Graw Hill. 1998. México.
16. Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez-Uría M, Fraile B, Anandón R, Sáez FL. *Biología celular*. 2ª ed. Mc Graw Hill – Interamericana. España.
17. Vázquez-Ortiz FA, Morón-Fuenmayor OE, González-Méndez NF. Hydroxyproline measurement by HPLC: Improved method of total collagen determination in meat samples. *J Liq Chromatogr*. 2004; 27(17): 2771-2780.
18. Neuman RE, Logan MA. The determination of hidroxypoline. *J Biol Chem*. 1950; 184: 299-306.
19. Stegemann H, Stalder K. Determination of hydroxyproline. *Clinica Chimica Acta*. 1967; 18 (2): 267-273.
20. Bergman I, Loxley R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal Chem*. 1963; 35 (12): 1961-1965.
21. Goll DE, Bray RW, Hoekstra WG. Age-associated changes in muscle composition. The isolation and properties of a collagenous residue from bovine muscle. *J Food Sci*. 1963; 28: 503.
22. Hill F. The solubility of intramuscular collagen in meat animals of various ages. *J. Food Sci*. 1966; 31: 161-166.
23. Verzar F. Nachweis der zunahme bindung von hydroxyprolin in collagen der haut mit dem alter. *Gerontol*. 1960; 4: 104.
24. Mohler K, Antonacopoulos N. Chemische bestimmung von bindegewebe in fleisch und seinen zubereitungen. *Z. Lebensmittel- untersuch n. Forsh*.1957; 6: 425.
25. Woessner JF. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch. Biochem. Biophys*. 1961; 93: 440.

26. Cross HR, Carpenter ZL, Smith GC. Effects of intramuscular collagen and elastin on bovine muscle tenderness. *J Food Sci.* 1973; 38: 998-1003.
27. Boccard RL, Naudé DE, Smit MC, Venter HJ, Rossouw EJ. The influence of age, sex and breed of cattle on their muscle characteristics. *Meat Science.* 1979; 3(4): 261-280.
28. Judge MD, Reeves ES, Aberle ED. Effect of electrical stimulation on thermal shrinkage temperature of bovine muscle collagen. *J Anim Sci.* 1981; 52 (3): 530-534.
29. Ngapo TM, Berge P, Culioli J, Dransfield E, De Smet S, Claeys E. Perimysial collagen crosslinking and meat tenderness in Belgian Blue double-muscled cattle. *Meat Sci.* 2002; 61 (1): 91-102.
30. Wheeler TL, Shakelford SD, Koohmarie M. Technical note: Sampling methodology for relating sarcomere length, collagen concentration, and the extent of postmortem proteolysis to beef and pork longissimus tenderness. *J Anim Sci.* 2002; 80: 982-987.
31. AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th edition. (K Helrick Ed.) Arlington U.S.A. pp.1230
32. Lynch MJ, Raphael SS, Mellor LD, Spare P, Inwood MJ. Métodos de laboratorio. 2a ed. Editorial interamericana. 1970.
33. Knapp DR. Handbook of analytical derivatization reactions. Published by John Wiley and Sons. 1979.
34. Kuehl R. Diseño de experimentos. Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. 2^a edición. México.
35. SAS Institute. (2002). SAS[®] User's guide, statistic. Version 9.00 edition. SAS Institute Inc., Cary. NC USA.
36. Getty R, Grossman JD, Sisson S. Anatomía de los animales domésticos. Tomo I. 2^a ed. Salvat, 1982.
37. Jones S, Calkins C, Carpenter B, Minary R, Brewster R, Whiting K, Sherrill J. Bovine miology. University of Nebraska, Lincoln. Institute of Agriculture and Natural Resources. Animal Science Department. 2004. Disponible en: <http://bovine.unl.edu/spa/muscd.jsp>
38. Dikeman ME. Carcass composition and quality of finished crossbreed Brahman cattle. Proc. of the King Workshop. Arkansas Agric. Exp. Sta. Special Rep. No. 167. pp 77-88.

39. O'Connor SF, Tatum JD, Wulf DM, Green RD, Smith GC. Genetic effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos taurus* cattle. *J Anim Sci.* 1997; 75: 1822-1830.
40. Stolowsky GD, Baird BE, Miller RK, Savell JW, Sams AR, Taylor JF, Sanders JO, Smith SB. Factors influencing the variation in tenderness of seven major beef muscles from three Angus and Brahman breed crosses. *Meat Sci.* 2006; 73: 475-483.
41. López V y Casp VA. Colección Tecnología de Alimentos. Tecnología de Mataderos. España. Ediciones Mundi Prensa. 2004. pp. 177-179.
42. Koch RM, Dikeman ME, Crouse JD. Characterization of biological types of cattle (Cycle III). III. Carcass composition, quality and palatability. *J Anim Sci.* 1982; 54: 35-45.
43. Crouse JD, Cundiff LV, Koch RM, Koohmaraie, Seideman SC. Comparisons of *Bos indicus* and *Bos taurus* inheritance for carcass beef characteristic and mean palatability. *J Anim Sci.* 1989; 67: 2661-2668.
44. Koohmaraie M. Whipple G, Kretchman DH, Crouse JD, Mersmann HR. Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcass. *J Anim Sci.* 1991; 69 (2): 617-624.
45. Wheeler TL, Savell JW, Cross HR, Lunt DK; Smith SB. Mechanisms associated with the variation in tenderness of meat from Brahman and Hereford cattle. *J Food Sci.* 1990; 68: 4206-4220.
46. Johnson MH, Calkins CR, Huffman RD, Johnson DD, Hargrove DD. Differences in cathepsin B+L and calcium-dependent protease activities among breed type and their relationship to beef tenderness. *J Anim. Sci.* 1990; 68: 2371-2379.
47. McKeith FK, De Vol DL, Miles RS, Bechtel PJ, Carr TR. Chemical and sensory properties of thirteen major beef muscles. *J. Food Sci.* 1985; 50: 869-872.
48. Torrescano G, Sánchez-Escalante A, Giménez B, Roncalés P, Beltrán JA. Shear values of raw samples of 14 bovine muscles and their relation to muscle collagen characteristics. *Meat Sci.* 2003; 64: 85-91.
49. Belew JB, Brooks JC, McKenna DR, Savell JW. Warner Bratzler shear evaluation of 40 bovine muscles. *Meat Sci.* 2003; 64: 507-512.

50. Von Seggern DD, Calkins CR, Johnson DD, Brickler JE, Gwartney BL. Muscle profiling: Characterizing the muscles of the beef chuck and round. *Meat Sci.* 2005; 71: 39-51.
51. Calkins CR, Sullivan G. Ranking of beef muscles for tenderness. 2007. NCBA, <www.beefresearch.org>.
52. Sisson S, Grossman JD, Getty R. *Anatomía de los animales domésticos*. Editorial Salvat. 1982. Barcelona.
53. Locker RH, Daines GJ, Carse WA, Leet NG. Meat tenderness and gap filaments. *Meat Sci.* 1977; 1(2): 97-104.
54. Nishimura T, Liu A, Hattori A, Takahashi K. Changes in technical strength of intramuscular connective tissue during postmortem aging of beef. *J Anim Sci.* 1998; 76: 528-532.
55. Lepetit J. A theoretical approach of the relationships between collagen content, collagen crosslinks and meat tenderness. *Meat Sci.* 2007; 76 (1): 147-159.

ANEXO 1.



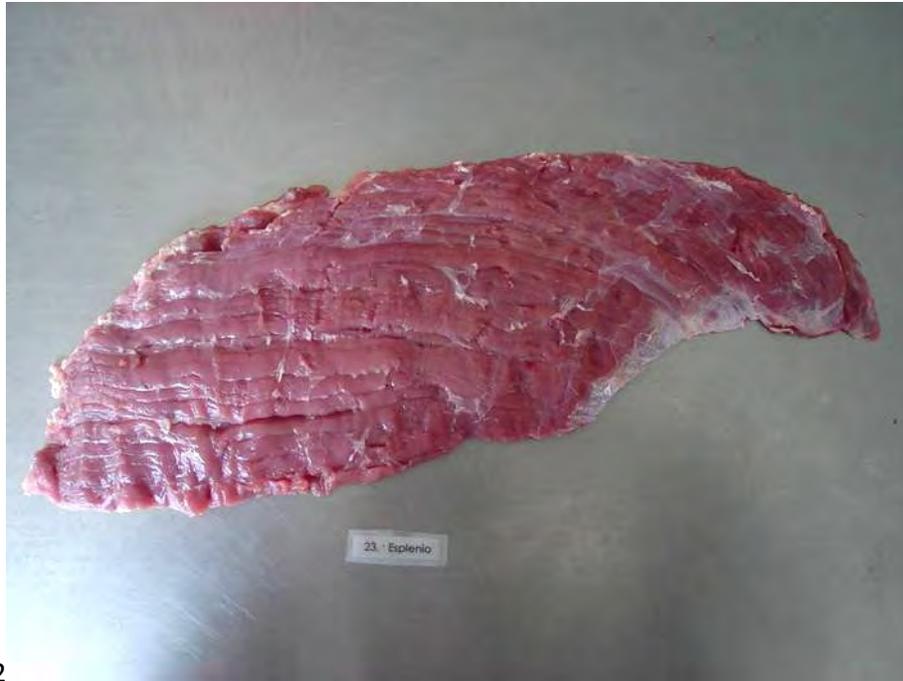
1. Biceps.



2. Braquial.



3. Complexo.

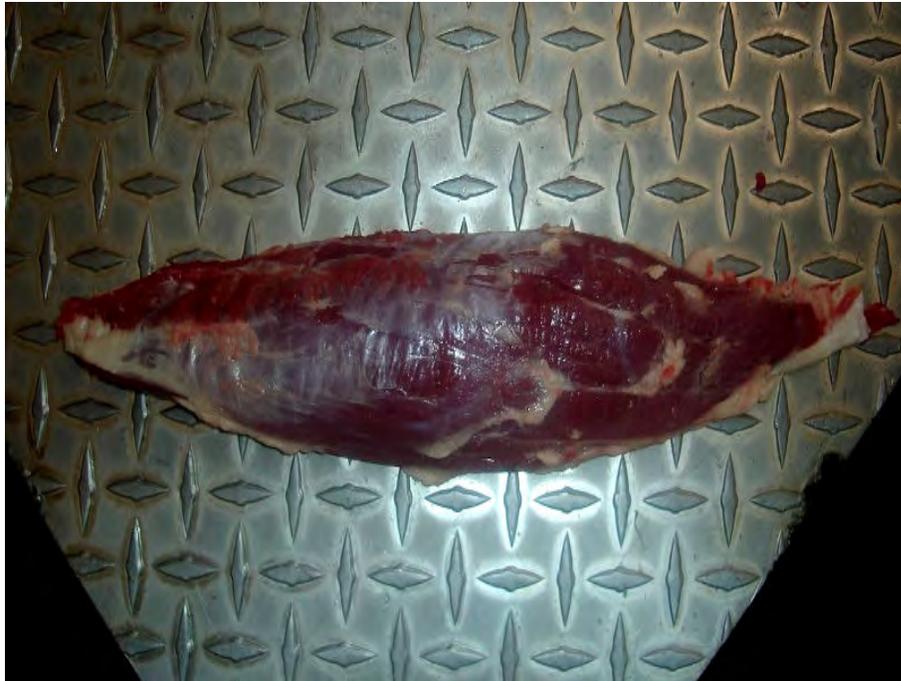


12

4. Esplenio.



5. Infraespino.



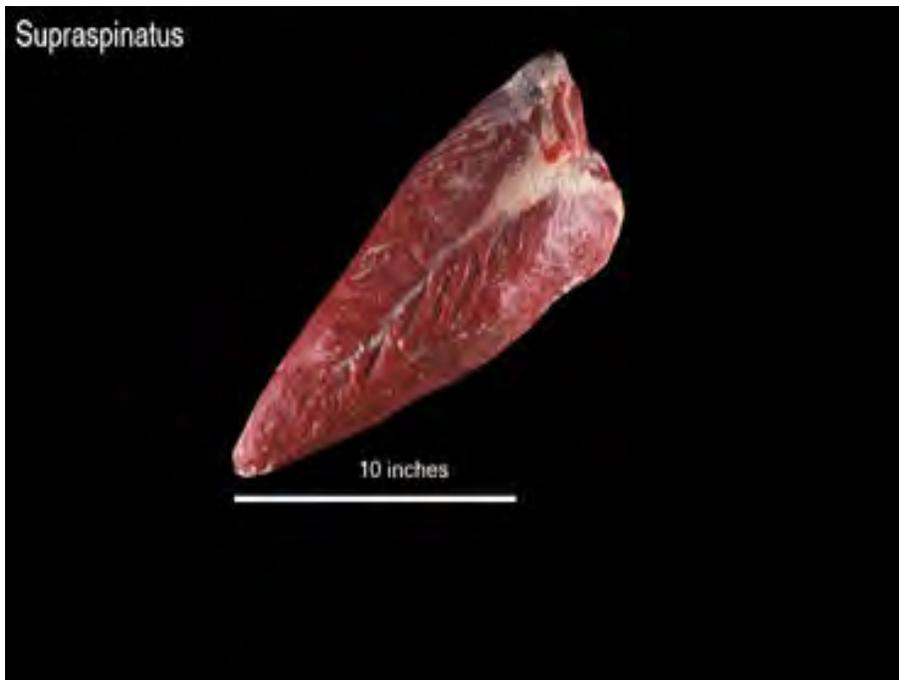
6. Redondo mayor.



7. Romboides.



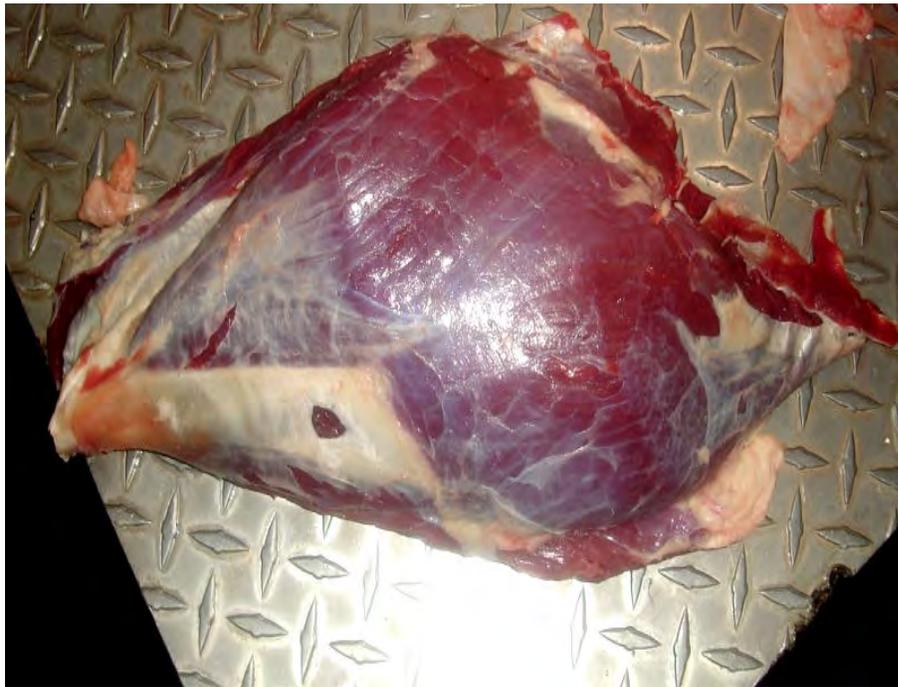
8. Subescapular.



9. Supraespinoso.



10. Triceps lateral.



11. Triceps largo.

ANEXO 2.

El tiempo de retención de la hidroxiprolina fue idéntico en los once músculos de cada grupo genético. Se observó una pequeña variación asociada a la habilidad del manejador, al realizar las actividades idénticas durante el análisis, ya que se realizó en forma manual. Esta señal se expresa en las siguientes once gráficas correspondientes a cada músculo.

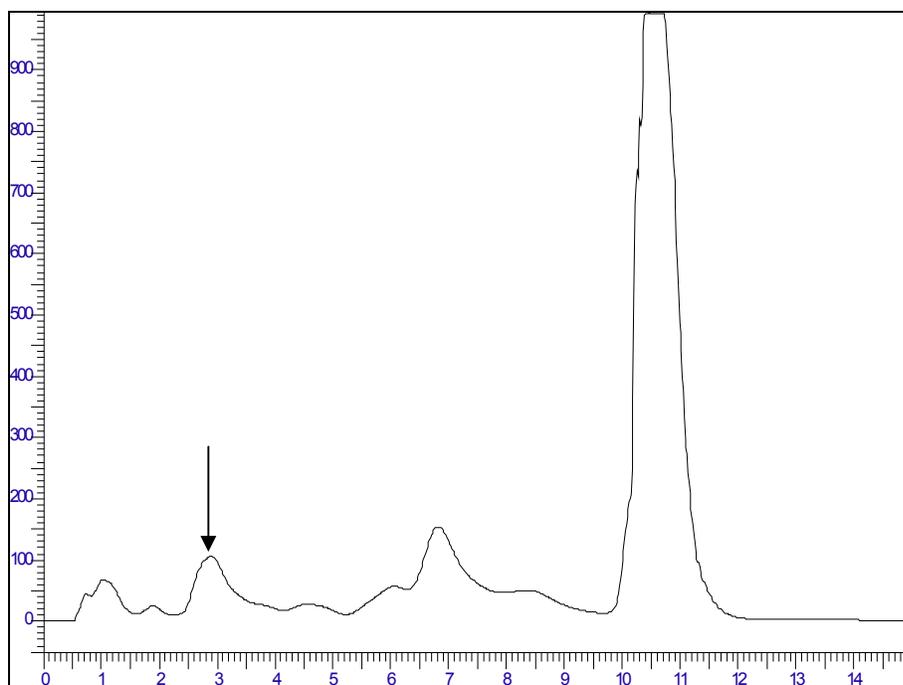


Figura 1. Braquial.

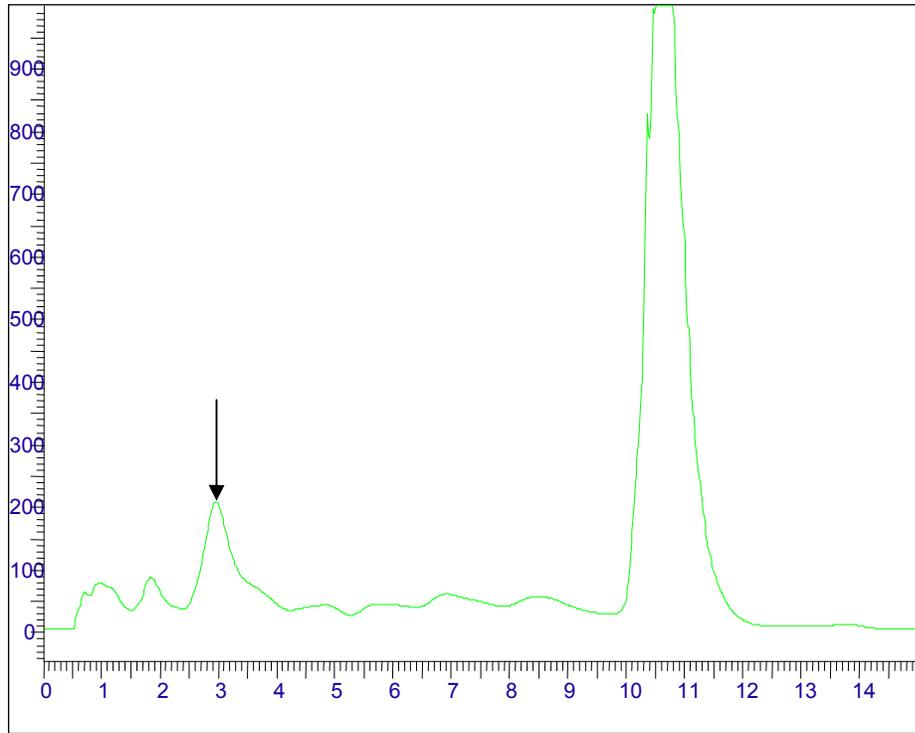


Figura 2. Biceps.

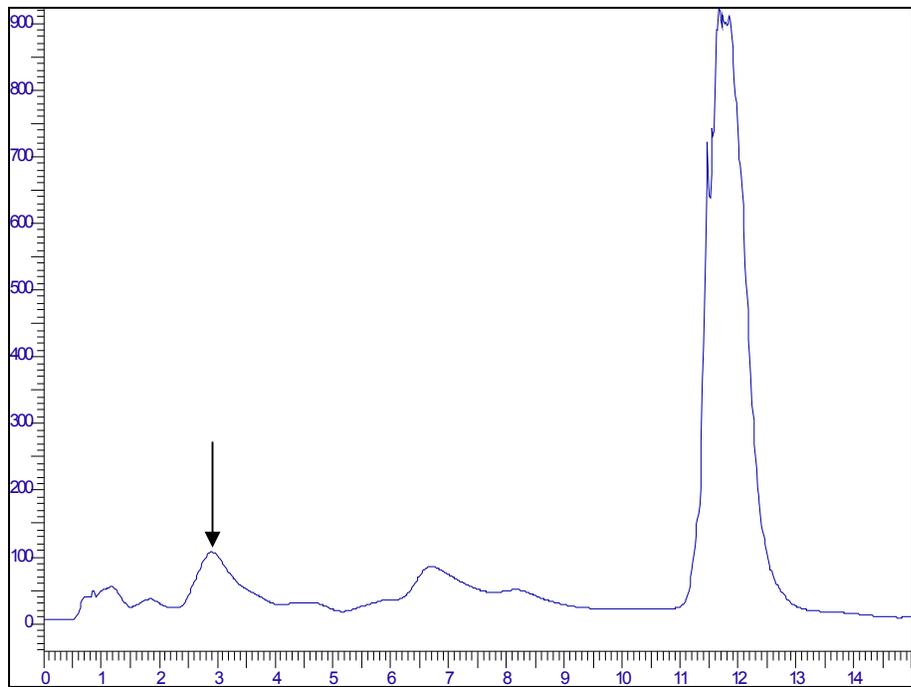


Figura 3. Complexo.

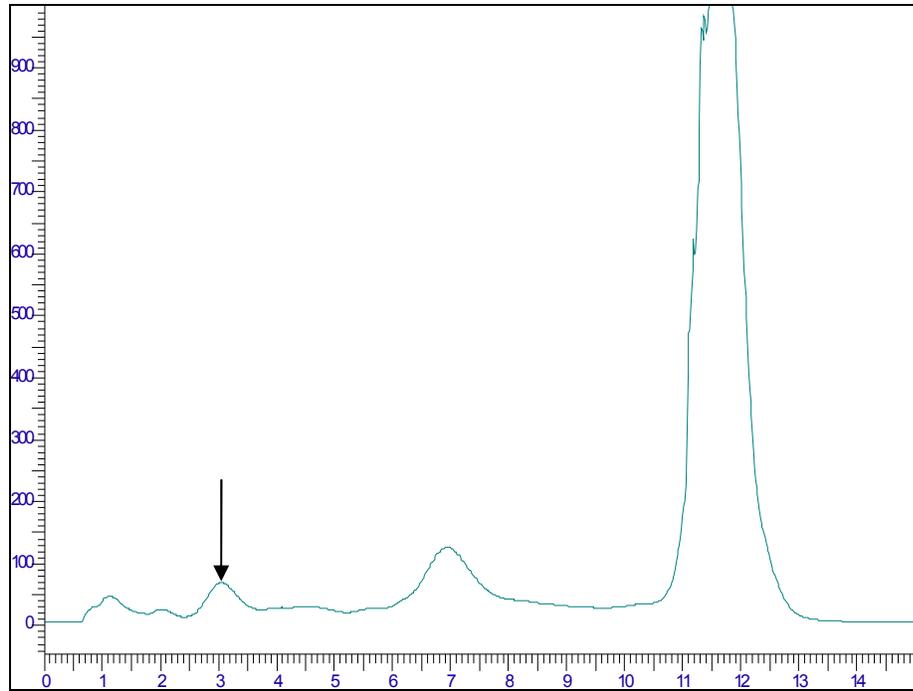


Figura 4. Esplenio.

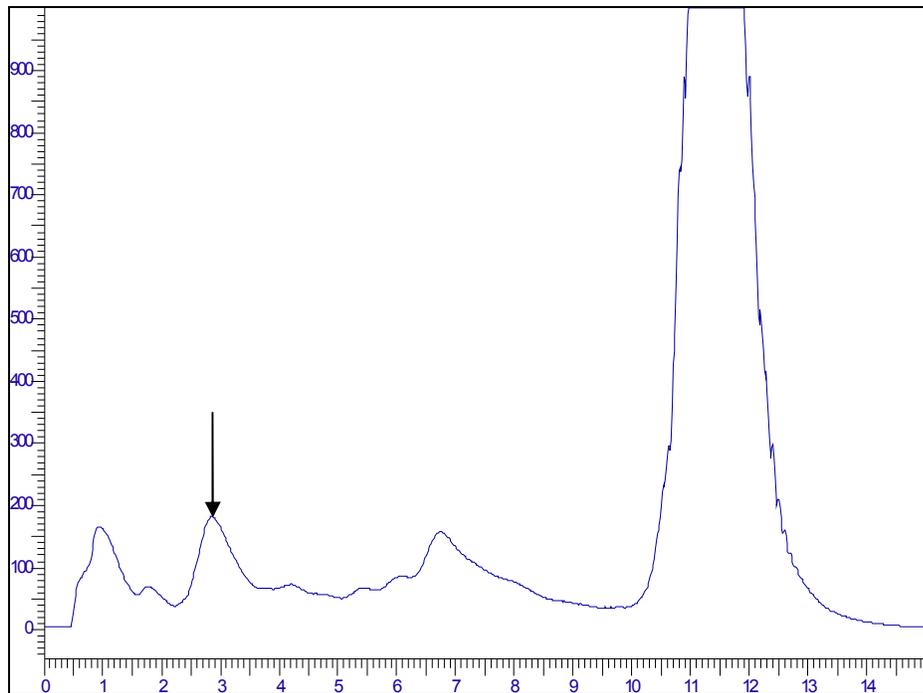


Figura 5. Infraespinoso.

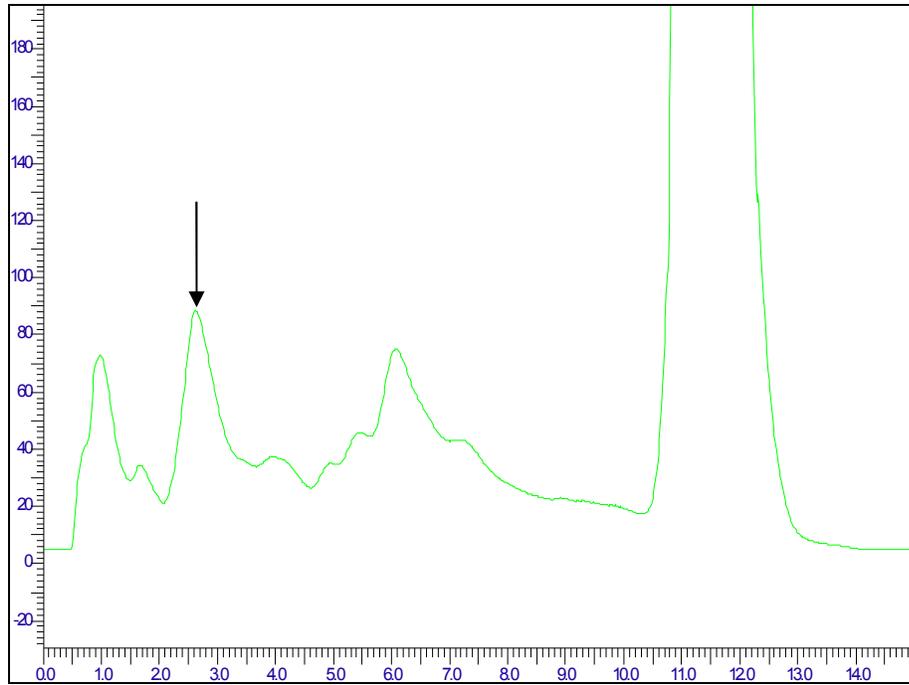


Figura 6. Redondo mayor.

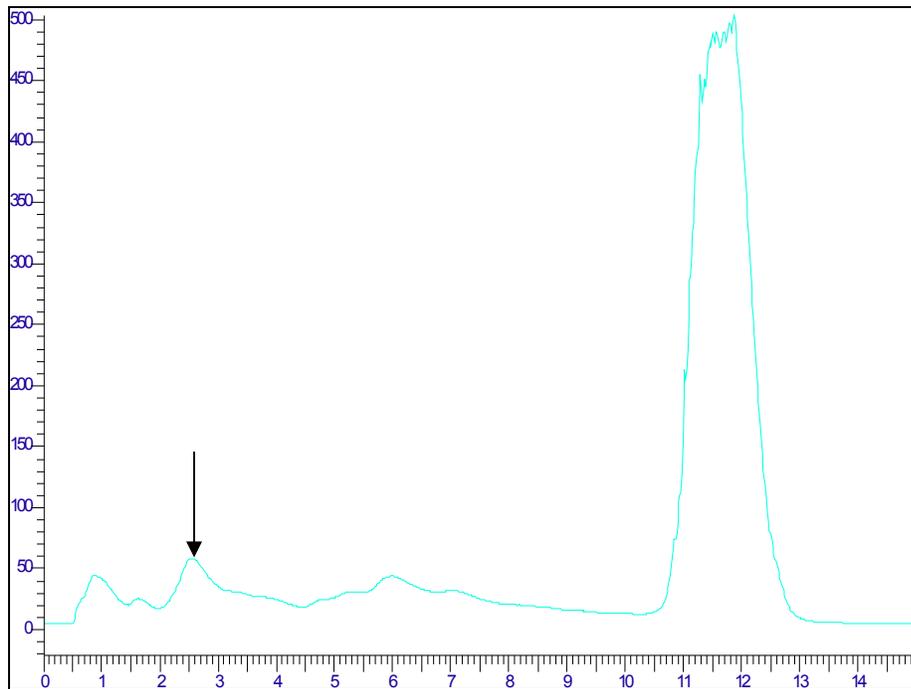


Figura 7. Romboide.

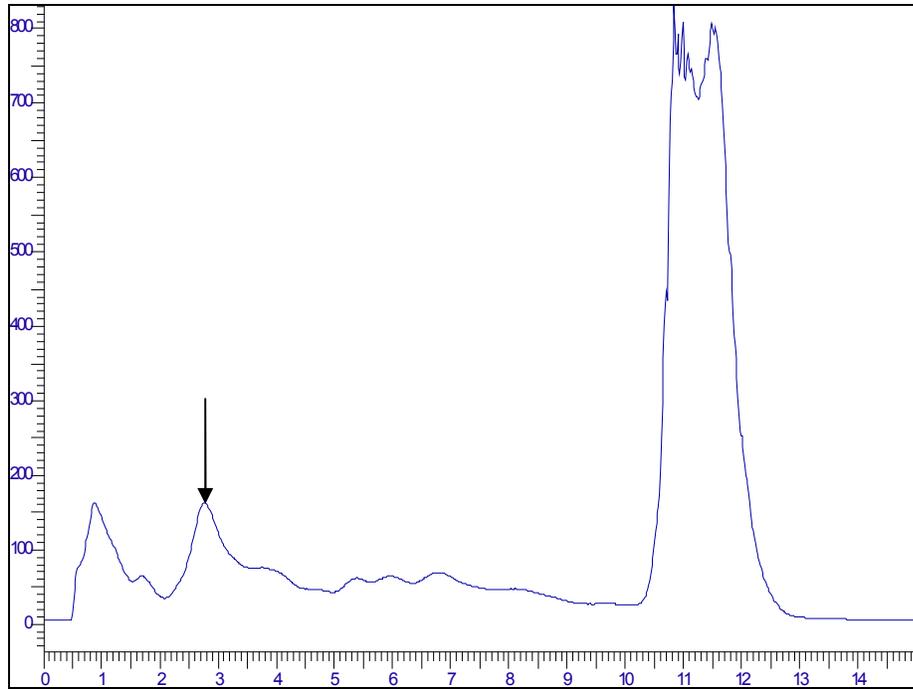


Figura 8. Supraespinozo.

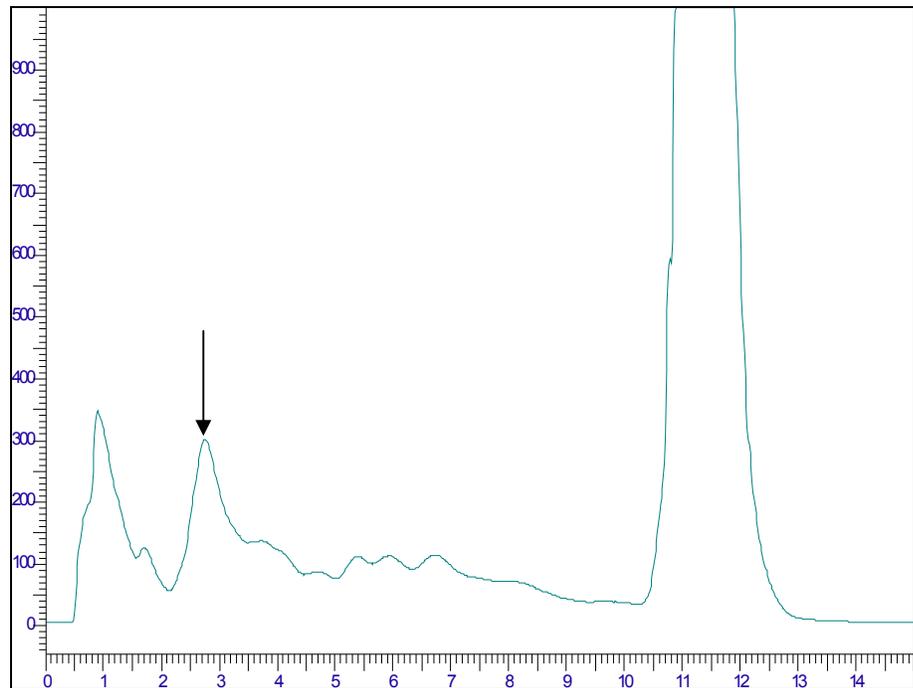


Figura 9. Subescapular.

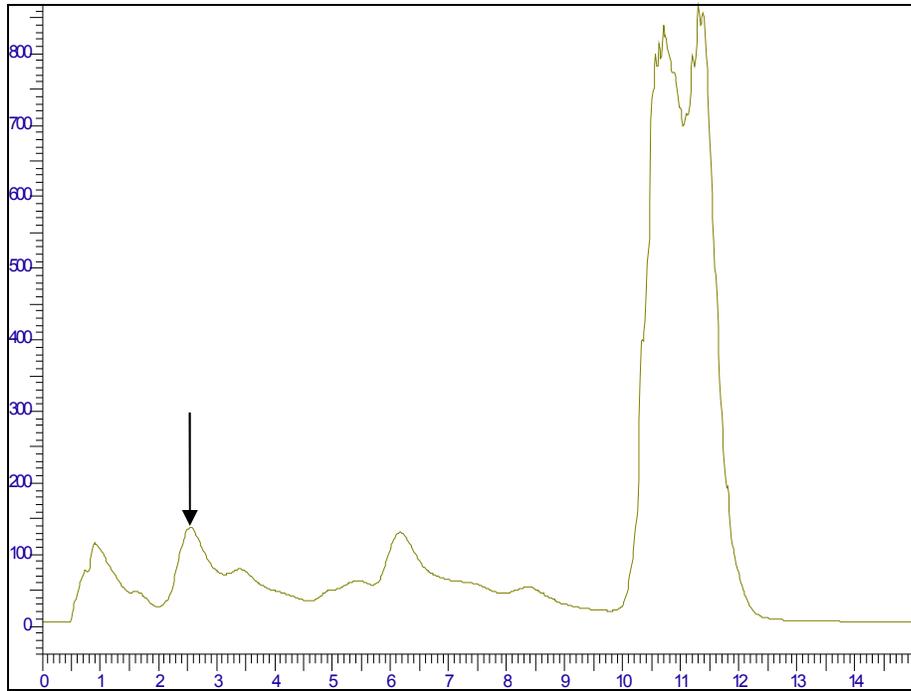


Figura 10. Triceps largo.

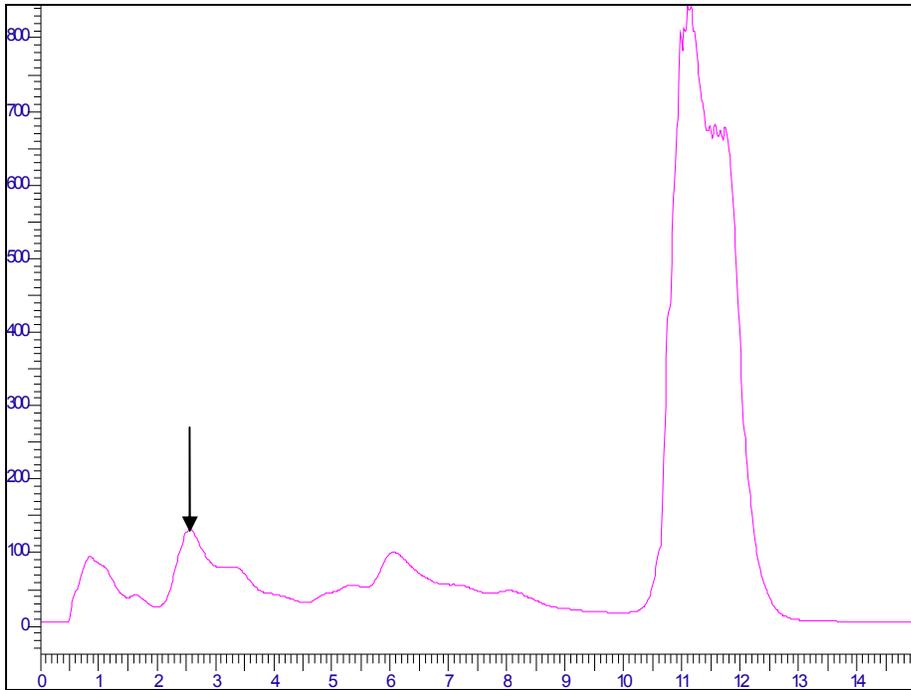


Figura 11. Triceps lateral.