



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN  
Y DE LA SALUD ANIMAL

ESTUDIO DEL PROCESO DE MADURACIÓN EN CARNE DE RES MEXICANA

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:  
FRANCISCO ALEJANDRO RUÍZ LÓPEZ

TUTOR:  
MARIA SALUD RUBIO LOZANO, FMVZ-UNAM  
COMITÉ TUTOR:  
EDITH PONCE ALQUICIRA, UAM-IZTAPALAPA  
DIEGO BRAÑA VARELA, ELANCO MÉXICO

CIUDAD DE MÉXICO MAYO, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## ÍNDICE

Índice de cuadros.....	I
Índice de figuras.....	II
Agradecimientos.....	IV
Resumen.....	VII
Abstract.....	VIII
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1. Estructura y composición proteica de la carne.....	2
2.2. Maduración de la carne.....	6
2.2.1. Mecanismos moleculares y bioquímicos que participan en la transformación del músculo en carne.....	6
2.3. Mecanismos de acción de las enzimas proteolíticas.....	8
2.3.1. Calpaínas.....	9
2.3.2. Catepsinas.....	12
2.3.3. Complejo Ubiquitina-Proteosoma.....	13
2.3.4. Sistema de Caspasas.....	15
2.4. Proceso de maduración.....	15
2.4.1. Tipos de maduración.....	16
2.4.2. Factores que afectan la maduración de la carne.....	17
a) Extrínsecos.....	17
b) Intrínsecos.....	19
2.5. Modificadores del metabolismo y su impacto en la calidad de carne.....	20
2.5.1. Mecanismos de acción de los $\beta$ AA en el metabolismo.....	21
2.5.2. Efectos de los $\beta$ AA sobre la calidad de carne.....	23
2.5.3. Efectos adversos de la utilización de $\beta$ AA en la salud publica.....	24
3. Hipótesis.....	24
4. Objetivo general.....	25
4.1. Objetivos específicos.....	25
5. Material y Métodos.....	25
5.1. Tratamiento de animales y canales.....	25

5.2. Evaluación de canales.....	26
5.3. Preparación de muestras.....	28
5.4. Análisis físico-químicos.....	29
5.4.1. pH.....	29
5.4.2. Color (L*a*b*).....	29
5.4.3. Pérdida de Peso por Cocción (PPC).....	29
5.4.4. Fuerza de Corte Warner Bratzler (FCWB).....	30
5.4.5. Análisis Químico Proximal	
5.5. Actividad proteolítica (calpaínas).....	30
5.5.1. Obtención de extracto enzimático para calpaínas.....	29
5.5.2. Concentración y determinación de actividad de calpaínas.....	31
5.6. Determinación de proteínas miofibrilares de alto peso molecular.....	31
5.6.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.....	32
5.7. Análisis ultraestructural por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)...	33
5.8. Análisis estadísticos.....	34
6. Resultados.....	34
6.1. Efecto del clorhidrato de zilpaterol sobre la ganancia de peso durante la finalización.....	34
6.1.1. Efecto del ClZi sobre las canales y la carne a las 24 h post mortem.....	35
6.2. Composición y características de la carne a las 24 h post mortem.....	36
6.3. Efecto de la maduración sobre características físicoquímicas de la carne.....	37
6.3.1. Fuerza de corte (FCWB).....	37
6.3.2. Pérdida por cocción.....	39
6.3.3. pH.....	40
6.3.4. Color de la carne (Lab*).....	41
6.4. Efecto del tratamiento con ClZi, los días y el tipo de maduración sobre la concentración y actividad de calpaínas en la carne. ....	43
6.4.1. Concentración de calpaínas.....	43
6.4.2. Actividad de calpaínas.....	44
6.5. Cambios en la ultraestructura del músculo durante el proceso de la maduración.....	46
6.6. Determinación de proteínas miofibrilares de alto peso molecular.....	50
7. Discusión.....	52

8. Conclusiones.....	58
9. Referencias.....	59

## Índice de cuadros

<b>Cuadro 1.</b>	Receptores adrenérgicos, localización, tipo y función...	21
<b>Cuadro 2.</b>	Características de las canales, medias y error estándar (EE)...	35
<b>Cuadro 3.</b>	Medias aritméticas y EE por tratamiento de las variables de composición química de la carne...	36
<b>Cuadro 4.</b>	Medias aritméticas y EE por tratamiento de FCWB, pérdida por cocinado, pH y color de la carne a las 24 horas post mortem...	37
<b>Cuadro 5.</b>	Medias aritméticas y EE de las mediciones espectrofotocolorimétricas del color de la carne producida con el uso o no de un modificador metabólico y madurada ya sea en un sistema seco o húmedo...	41
<b>Cuadro 6.</b>	Medias aritméticas y EE de la concentración de calpaínas durante la maduración, en carne de animales tratados o no con clorhidrato de zilpaterol y expuesta a maduración seca o húmeda...	43
<b>Cuadro 7.</b>	Medias aritméticas y EE de la actividad de calpaínas durante la maduración de la carne según el modificador metabólico y el tipo de maduración...	45
<b>Cuadro 8.</b>	Medias aritméticas y EE de valores de FCWB en carne utilizada también para determinación de proteínas miofibrilares mediante Electroforesis en Gel de Poliacrilamida...	51

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b>	Estructura del sarcómero.....	3
<b>Figura 2.</b>	Esquema de la estructura miofibrilar.....	4
<b>Figura 3.</b>	Esquema de la localización de la titina y la nebulina en la miofibrilla...	4
<b>Figura 4.</b>	Proteínas estructurales del músculo.....	5
<b>Figura 5.</b>	Esquema de los cambios conformacionales que experimenta la calpaína tras la unión del $Ca^{2+}$ .....	9
<b>Figura 6.</b>	Esquema de la liberación de los filamentos de las miofibrillas previo a su total desintegración.....	11
<b>Figura 7.</b>	Sistema de degradación proteica ubiquitina-proteosoma.....	14
<b>Figura 8.</b>	Posible mecanismo de acción de la hipertrofia muscular inducida por $\beta$ AA22	
<b>Figura 9.</b>	Escala de color subjetivo de la carne.....	26
<b>Figura 10.</b>	Evaluación y escala de la distribución de la grasa en la canal.....	27
<b>Figura 11.</b>	Evaluación de la conformación de la canal.....	28
<b>Figura 12.</b>	Proteínas miofibrilares.....	32
<b>Figura 13.</b>	Fuerza de corte de la carne según el día de maduración.....	37
<b>Figura 14.</b>	Fuerza de corte por día de maduración sin modificador del metabolismo..	38
<b>Figura 15.</b>	Fuerza de corte por día de maduración con modificador del metabolismo..	38
<b>Figura 16.</b>	Fuerza de corte de la carne por día en maduración en seco.....	39
<b>Figura 17.</b>	Fuerza de corte de la carne por día en maduración húmeda.....	39
<b>Figura 18.</b>	Pérdida de peso durante el cocinado en carnes con diferentes días de maduración.....	40
<b>Figura 19.</b>	Comportamiento del pH en carnes con diferentes períodos de maduración.	40
<b>Figura 20.</b>	Valores de $L^*$ a través de los días de maduración.....	42
<b>Figura 21.</b>	Valores de $a^*$ a través de los días de maduración.....	42
<b>Figura 22.</b>	Valores de $b^*$ a través de los días de maduración.....	43
<b>Figura 23.</b>	Medias y EE de la concentración de calpaínas según días de maduración.....	44

<b>Figura 24.</b>	Medias y EE de la actividad de calpaínas según días de maduración.....	45
<b>Figuras 25 y 26.</b>	Muestra día 0 (3 h post mortem) con administración de ClZi.....	46
<b>Figuras 27 y 28.</b>	Muestra día 0 (3 h post mortem) sin administración de ClZi.....	47
<b>Figuras 29 y 30.</b>	Muestra día 3 con administración de ClZi .....	47
<b>Figuras 31 y 32.</b>	Muestra día 3 sin administración de ClZi .....	47
<b>Figuras 33 y 34.</b>	Muestra día 7 con administración de ClZi .....	48
<b>Figuras 35 y 36.</b>	Muestra día 7 sin administración de ClZi .....	48
<b>Figuras 37 y 38.</b>	Muestra día 14 con administración de ClZi .....	49
<b>Figuras 39 y 40.</b>	Muestra día 14 sin administración de ClZi .....	49
<b>Figuras 41 y 42.</b>	Muestra día 21 con administración de ClZi .....	49
<b>Figuras 43 y 44.</b>	Muestra día 21 sin administración de ClZi .....	50
<b>Figura 45.</b>	SDS-PAGE de carne con ClZi a distintos días de maduración.....	50
<b>Figura 46.</b>	SDS-PAGE de carne sin ClZi a distintos días de maduración.....	51



## **Agradecimientos**

A mis Papas que ahora ya estan los dos en el mismo sitio, gracias por darme todo para salir adelante y mas aun por prepararme ahora que ya no estan, con todos y cada uno de sus alientos, regaños, bendiciones, alegrías, descontentos y demas esfuerzos por educarme y guiarme para llegar a ser lo que ahora soy, por mi parte, siempre seguire esforzandome por mejorar como persona, para poder desarrollarme como es debido en mi vida profesional y personal. Pero nunca olvidando que soy lo que soy, gracias a Ustedes y espero ademas que este logro sirva para recordarles que nunca dejare de luchar por lo que creo y siento, pues es la unica manera que se hacer las cosas, como siempre me lo enseñaron, con el ejemplo.

A mi Familia: Angelica, León, Margarita, Francisco, Francisco, Anabel, Raúl y David por estar siempre conmigo en todo momento, fue sinuoso el camino para llegar a esto, pero con el apoyo de todos ustedes nunca nada sera imposible. Gracias por su amor, comprensión y apoyo incondicional. Gracias Angelica, que con el ejemplo me has enseñado que siempre se puede salir adelante sin importar la dimensión del problema o la cantidad de adversidades, te quiero y te amo hermanita.

A la Dra. María Salud Rubio Lozano por ser mi mentora, tutora, maestra, psicologa, colega, etc. Además de alguien muy especial para mi, que gracias a ella comprendi lo maravilloso del mundo de la ciencia de la carne. Gracias Dra. María por confiar en mi, como pocas personas en la vida, gracias por dejarme conocer mejor a un ser tan peculiar como especial, que es su esposo, de quien he aprendido a esforzarme siempre mas para no rezagarme en este medio tan demandante. Gracias por dejarme conocer a la persona detrás de la bata y el titulo, esa gran mujer que se abre paso en un medio desigual para las mujeres y que aun asi sigue siempre hacia delante. En verdad Gracias...

Al Dr. Roberto Gustavo Martinez Gamba, quien siempre me ha apoyado desde hace mas de 13 años que tuve la dicha de conocerlo y en su momento poder llamarle profesor, pero mas aun al considerarlo y poder llamarlo amigo. Quien me ha motivado en momentos cruciales en mi vida para no tirar la toalla y que al contrario siga con mas fuerza mis ideales y

deseos. Y por si fuera poco lo anterior, me hizo saber de la existencia de la Dra. María Salud. Así que este logro es también gracias a usted.

A los miembros de mi comité tutor:

Al Dr. Diego Braña por todos sus consejos, comentarios y aportaciones en este trabajo, en mi vida profesional y personal, gracias también por dejarme claro que debía esforzarme al doble para no pensar como un ganadero o carnicero más, sino como todo un experto en ciencia de la carne integrando toda la experiencia adquirida anteriormente, en este proyecto de vida que comienza con la culminación de este trabajo.

A la Dra. Edith por darme un lugar en su laboratorio y apoyarme siempre, quien a pesar de sus ocupaciones siempre estuvo pendiente de mi desarrollo en su laboratorio y el desarrollo de mi trabajo.

A los miembros del Jurado por todas las revisiones, comentarios, aportaciones y correcciones a este trabajo.

En especial al Dr. Jorge Lopez por su apoyo y consejos durante la revisión de la tesis.

A la Dra. Adriana Llorente quien siempre es un punto de referencia para mí, como profesional.

Al Dr. Nelson Huerta con quien he tenido el privilegio de trabajar y compartir el gusto por la ciencia de la carne, quien aun antes de comenzar la maestría, siempre enriquecía mi formación con comentarios y palabras de apoyo hacia mi persona.

Y por último pero no menos importante, a la Maestra Francisca Iturbe quien fue de gran ayuda con sus comentarios y aportes para poder terminar este trabajo.

A la Dra. Isadora Martínez por su apoyo, comprensión y tutela durante el trabajo de laboratorio en la UAM-Iztapalapa, ya que sin ella no habría logrado iniciar las pruebas que después complete solo con sus enseñanzas. Pero más allá por su invaluable amistad.

Al Dr. Israel García por su apoyo y tolerancia durante la fase experimental en UAM, quien al final me enseñó más cosas de las que comprendía mi estancia en el laboratorio.

A todos los habitantes del laboratorio 132 del edificio S, quienes me permitieron cohabitar y compartieron siempre más allá de lo estrictamente laboral, la Dra. Yenizey, los futuros Dres. Edson, particularmente a Mariel y Carmen; También a Isabel quien después de la

maestría seguro ira por el doctorado. Gracias por su voluntaria e involuntaria ayuda para realizar este trabajo.

A la Dra. Adriana Méndez del departamento de Microscopia Electronica de la FMVZ por su invaluable cooperación y asesoría en el manejo y procesamiento de las muestras. Además de su siempre amena y agradable compañía en el laboratorio. También al Sr. Lorenzo por su invaluable cooperación y compañía durante el procesamiento de las muestras, atesorare siempre esos desayunos improvisados en el laboratorio.

A todos mis profesores quienes durante las cátedras dieron lo mejor de si, para mi formación, especialmente a la Dra. Sara Chacon y el Dr. Pedro Garcés por su incansable actitud para enseñar.

A mi querida Dotora, Tania Palos, por el apoyo incondicional en la realización del proyecto en campo, además de su inigualable amistad y su añorable compañía durante mis visitas al estado de Queretaro.

A todos mis compañeros de generación quienes tuvieron que ver para poder terminar esto de la mejor manera. Especialmente a las M. en C. Magali Palomares y Ana Laura Solis, También al también M. en C. Jorge de la Garza por su apoyo y su invaluable amistad!

También agradezco el apoyo incondicional del Ing. Agustin Gallegos, quien es parte esencial en mi vida y que gracias a el he podido desarrollar aun mas mis capacidades como MVZ y como persona, gracias mi querido amigo.

También agradezco a la memoria de Bronco y a Cocky, Pugsina, Blacky y todos aquellos animalitos que forjaron en mi, el gusto por los animales, esos seres fantasticos de quienes he aprendido tanto, entre ello el gusto por la vida y la verdadera amistad.

Agradezco también el apoyo brindado para la realización de este trabajo al Conacyt por la beca otorgada durante mis estudios y al Macroproyecto “Indicadores de calidad en la cadena de producción de carne fresca en México”, con registro y fondos de SAGARPA-CONACYT no. 109127 y administrado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, por el apoyo económico para la realización de este trabajo.

Dedico esta tesis a mi querido hermano mas que cuñado, León Méndez por enseñarme el gusto por el mundo de la carne y por confiar en mí como nadie lo habia hecho.

## Resumen

Diversas publicaciones muestran que la carne de res comercializada en México tiene elevados valores de fuerza de corte (FCWB). Un estudio realizado madurando la carne en húmedo (envasada al vacío en refrigeración durante 7, 14 o 21 días) mostró que la carne no se hizo más suave después del día 7 de maduración. Por lo que se diseñó la presente investigación para evaluar desde un punto de vista morfológico y bioquímico lo que ocurre en la carne durante el proceso de maduración. El estudio se realizó con 12 bovinos jóvenes machos, sin castrar, cruza de *Bos indicus* y a los que a la mitad se les administró Clorhidrato de Zilpaterol (ClZi) los últimos 30 días de la engorda y a la otra mitad no. Después de la matanza, la carne de cada grupo fue sometida a maduración húmeda y seca durante 21 días. A los 0, 1, 3, 7, 14 y 21 días se realizó el análisis de FCWB, actividad y concentración de calpaínas con un kit comercial, determinación de titina, nebulina y miosina. Los resultados obtenidos indican que el uso de ClZi no fue un factor determinante que afectara las características físicas de la carne. El método de maduración seco o húmedo tampoco afectó significativamente las variables medidas. Sin embargo, los días de maduración sí afectaron ( $P < 0.05$ ) el color, pH, FCWB y la concentración y actividad de calpaínas. En conclusión, la carne del ganado comercial en México madura a lo largo del tiempo debido a la destrucción de las proteínas que integran el sarcómero, como son la nebulina, titina y miosina.

Palabras Clave: Maduración, Zilpaterol, Calpaínas, WBSF, Carne Mexicana

## **Abstract**

Published research showed beef in Mexico has high values of shear force (SF).. A study carried out aging meat under we conditions aging (vacuum packed meat under refrigeration for 7, 14 or 21 days) showed that meat did not age after 7 days. Therefore, this study was designed to evaluate the process of meat aging from a morphological and biochemical point of view. The study was conducted using 12 young bulls crosses (*Bos indicus*) under two treatments during the last 30 days of life, half received zilpaterol hydrochloride (ClZi) and the other half did not receive it. After slaughter, meat was wet and dry aged for 21 days. At 0, 1, 3, 7, 14 and 21 days WBSF, activity and concentration of calpains and determination of titin, myosin and nebulin was measured. Results showed that ClZi did not affect meat quality. Aging method (wet and dry) did not affect significantly the measured variables. However, aging days affected color, pH, FCWB and calpain concentration and activity. In conclusion, meat produced from commercial cattle in Mexico aged through time due to the damaged done to the proteins that make up the sarcomere, such as nebulin, titin and myosin.

Key Words: Aging, Zilpaterol, Calpains, WBSF, Mexican beef

## 1. INTRODUCCION

El concepto de calidad de carne engloba entre otros al color, la suavidad, la jugosidad y el sabor (Troy *et al.*, 2010; Pérez-Juan *et al.*, 2011). En México y gran parte de América Latina, la frescura de la carne es otro de los factores determinantes en el momento de la compra ya que el consumidor considera que la carne de animales recién faenados es de mejor calidad (Vilaboa-Arroniz *et al.*, 2009; SNIIM-SE, 2013), costumbre arraigada a las tradicionales condiciones de la cadena de comercialización de la carne en estos países, donde la falta de cadena fría desde el sitio de matanza al de comercialización (Guarín, 2008), ha hecho que el consumidor prefiera la carne recién obtenida, antes de exponerse a la descomposición de la misma. Sin embargo, hoy en día, las condiciones han mejorado significativamente, debido a que en una gran parte de la industria cárnica la cadena de frío es una prioridad para la calidad de su producto, manteniéndose a lo largo de todo el proceso; con el beneficio de poder consumir carne madurada durante 7, 15 ó 21 días, con la misma confianza que la carne fresca. Se ha demostrado que en condiciones sanitarias y controladas de temperatura y humedad que procuren la inocuidad del producto, la maduración en periodos de hasta 30 días mejora significativamente las propiedades sensoriales de suavidad, aroma y sabor (Oliete *et al.*, 2006; Troy *et al.*, 2010). Un estudio previo de maduración en México, reveló que la carne de res producida en el país no muestra cambios significativos en la suavidad después del día 7 de madurado (Rubio *et al.*, 2014) en contraste con los resultados de estudios en otros países, donde han encontrado cambios desde los 7 hasta los 35 días de maduración (Laster *et al.*, 2008; Polati, 2012). La utilización de modificadores del metabolismo tales como el ClZi, además de aumentar el rendimiento de la canal, afectan principalmente la suavidad de la carne, lo cual podría ser una causa de la diferencia en la suavidad que tiene la carne producida en México proveniente principalmente de ganado cebú cruzado con europeo, en comparación con la de otros países, por lo que se considera importante desde el punto de vista científico, evaluar los procesos que ocurren durante la maduración en seco o en húmedo, de carne de res producida en México, tales como la actividad de las principales enzimas endógenas proteolíticas y el posible efecto que ejerce sobre la maduración el uso o no de ClZi.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Estructura y composición proteica de la carne**

El tejido muscular tiene diversas funciones mecánicas, encargándose del movimiento del cuerpo, del mantenimiento del equilibrio y la coordinación, pero además el metabolismo de las células musculares está implicado en el mantenimiento del calor corporal y la movilización de sangre y linfa. Pocas células han de generar tanta fuerza y están sometidas a cambios tan dramáticos en su metabolismo como las células musculares. Por todo esto, la organización, estructura y metabolismo del músculo es clave para mantener su función e integridad.

El músculo esquelético está compuesto por múltiples fascículos, estando a su vez cada fascículo formado por un conjunto de fibras musculares (células musculares) que son mantenidas cohesionadas por tejido conjuntivo. El tejido conjuntivo rodea tanto a las fibras individuales (endomisio), como a los fascículos (perimisio) y a los conjuntos de fascículos que forman el músculo (epimisio) y es indispensable para la transducción de fuerzas.

Así pues, cada músculo esquelético se integra por largas células multinucleadas rodeadas de tejido conectivo que las separa y envuelve. La complejidad de esta estructura se relaciona con el grado de suavidad que tendrá la carne (Price y Schweigert, 1976).

El músculo contiene tres grupos de proteínas, las cuales se pueden clasificar en función de su solubilidad y locación en el tejido muscular:

- a. Proteínas sarcoplásmicas constituyen el 30-35% del total del tejido muscular; son parte del citoplasma, solubles en agua y comprenden todas las enzimas involucradas en el metabolismo.
- b. Proteínas miofibrilares constituyen el 55 a 60% del tejido muscular, son insolubles en agua y solubles en solución salina. La miosina y actina son las dos principales proteínas que forman la estructura contráctil del músculo.
- c. Proteínas del estroma o Conectinas, son el 10 a 15% del tejido muscular, son insolubles en agua y soluciones salinas, son extracelulares y el colágeno es una de las principales (Goll *et al.*, 2008).

El aspecto estriado de la fibra muscular lo determina la disposición estructural y la alternancia de los miofilamentos delgados y gruesos, en la figura 1 se observan microscópicamente como bandas oscuras, que son zonas proteicas densas (bandas A) y bandas más claras que son zonas menos densas (bandas I) en las miofibrillas. Tanto las bandas A como las I están divididas en dos mitades por regiones estrechas de densidad diferente. Las bandas I están divididas por una línea oscura conocida como línea o disco Z y las bandas A por una menos densa o clara llamada banda o zona H. Además, a mitad de la zona H hay una fina línea densa llamada línea M. El sarcómero es la unidad estructural y funcional de la miofibrilla, es la estructura comprendida entre 2 líneas Z.

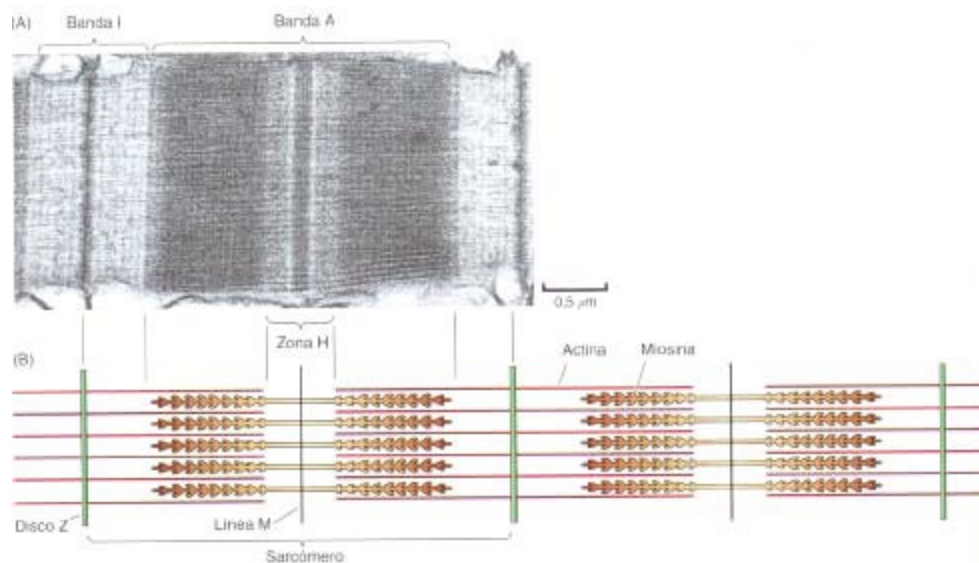


Figura 1. Estructura del sarcómero. (A) Micrografía electrónica de un sarcómero. (B) Diagrama mostrando la organización de un filamento de actina (delgados) y miosina (gruesos) en las regiones indicadas (Tomado de A. Frank y A. Pepe/ Biological Photo Service).

El principal componente proteico de los filamentos delgados es la actina, principalmente alfa-actina, la cual se halla asociada con la nebulina y con complejos formados por tropomiosina y las tres subunidades de troponina (T, I y C). Los filamentos gruesos están formados principalmente por miosina (Figura 2).



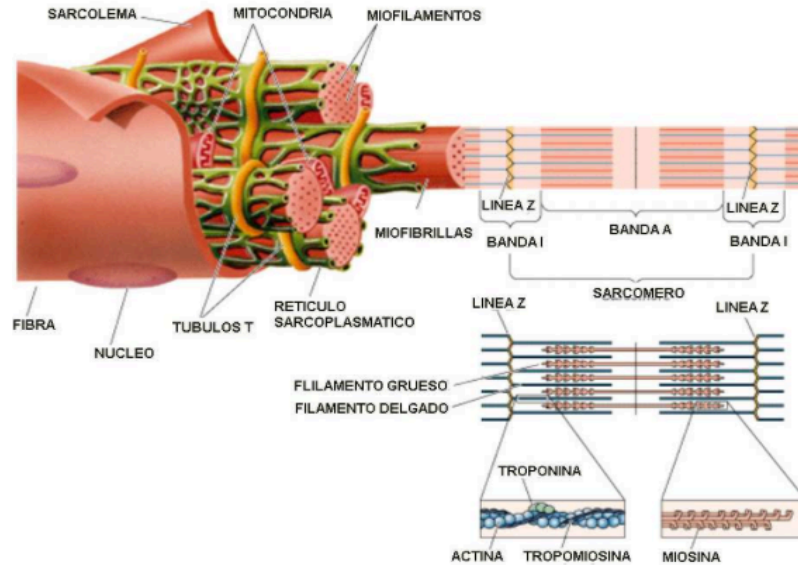


Figura 2. Esquema de la estructura miofibrilar (Tomado de Wordpress, 2007).

Además de la nebulina, cuyos filamentos están asociados con la actina, los cuales se cree, regulan el ensamblaje de los filamentos de actina actuando como reglas que determinan su longitud, otra proteína que contribuye a la estructura y estabilidad del sarcómero, es la titina, una proteína extremadamente grande (3.000kDa), que conecta a la miosina desde la línea M con el disco Z en la banda I, estas moléculas actúan como muelles que mantienen los filamentos de miosina centrados en el sarcómero y mantienen la tensión de reposo que permite al músculo retraerse si se extiende en exceso (Figura 3). La titina es una proteína importante del citoesqueleto y posee varios sitios de unión para proteínas musculares ( $\alpha$ -actinina, actina, miosina, proteína M, miomesina y otras).

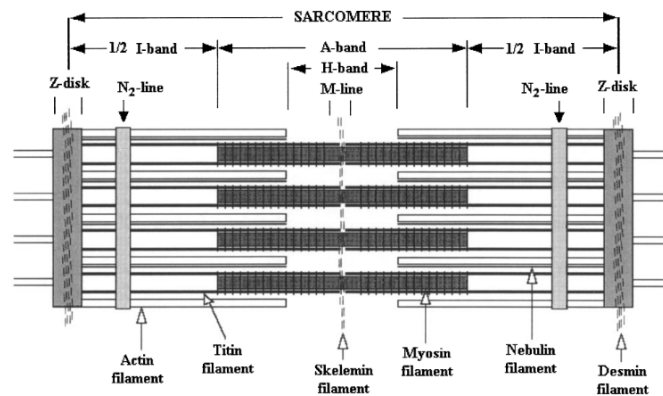


Figura 3. Localización de la titina y la nebulina en la miofibrilla (Tomado de Mestre, 2002).

La línea  $N_2$  es una zona entre Z e I, que corresponde con una zona de la molécula de titina que es rica en prolina, glutamina, lisina y valina (región PEVK) la cual le confiere elasticidad a la misma. Otra proteína relevante es la desmina, que forma los filamentos intermediarios que unen miofibrillas adyacentes a nivel del disco Z y las liga con el sarcolema, esto a través de los costámeros (ankyrina, desmina, dystropina,  $\beta$ -espectrina,  $\gamma$ -actina, talina, vinculina) los cuales son proteínas del subsarcolema alineados en la circunferencia de los discos Z de las miofibrillas de la periferia, manteniéndolos alineados, estas proteínas mantienen unidos los sarcómeros al sarcolema (Figura 4). La miomesina se entrecruza con los filamentos gruesos en la parte central de los mismos a nivel de la línea M, donde se extienden filamentos que unen miofibrillas adyacentes entre ellas y a éstas con el sarcolema (Bennett *et al.*, 1997; Clark *et al.*, 2002).

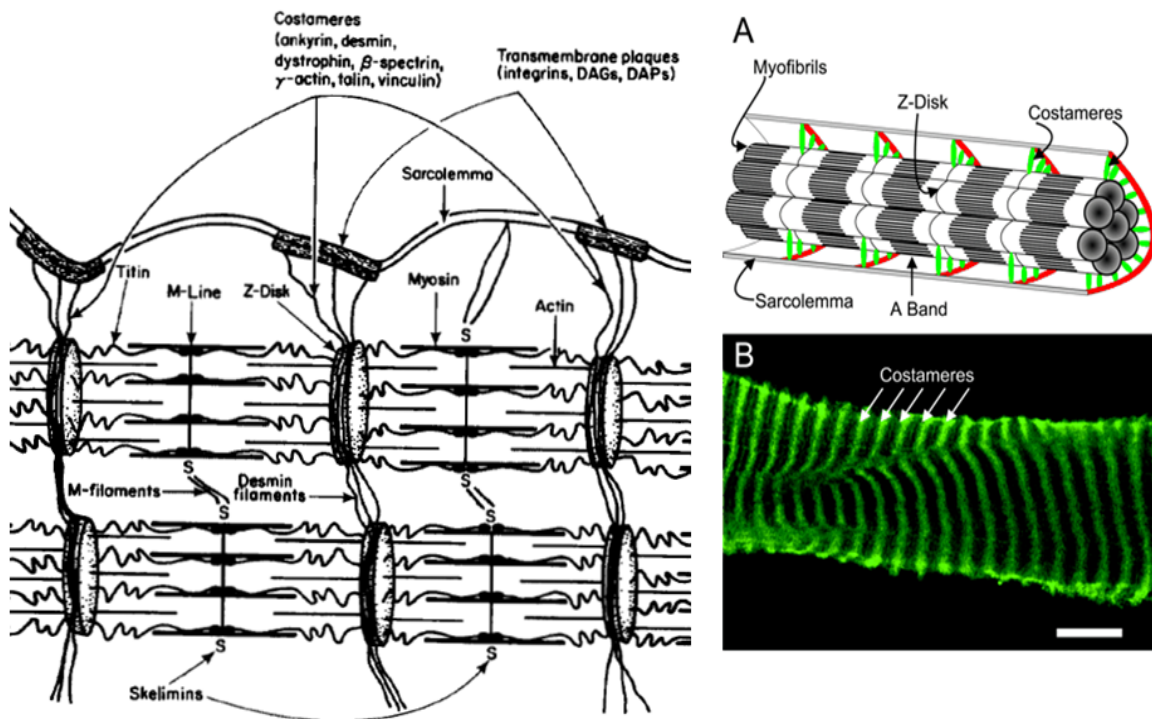


Figura 4. Proteínas estructurales del músculo. Esquema de las principales proteínas estructurales del músculo (izquierda). A) Esquema de la unión de la miofibrilla con el sarcolema, a través de los costámeros. B) Miofibrilla con detalle en costámeros con técnica de inmunofluorescencia (Tomado de Goll *et al.*, 2014).

## **2.2. Maduración de la carne**

El músculo se define como el tejido muscular del animal in vivo, mientras que la carne es el resultado de una serie de transformaciones estructurales y de reacciones bioquímicas que tienen lugar en el músculo tras la muerte del animal, que produce cambios que afectan a su calidad tecnológica y sensorial. Los cambios post mortem inician con el descenso de pH y la presentación del rigor hasta la resolución del mismo, dando inicio a la maduración de la carne. Posteriormente, los cambios están ligados principalmente a la acción de las enzimas endógenas proteolíticas, que provocan la destrucción y solubilización de la estructura miofibrilar, dando como resultado el ablandamiento de la carne (Bergh *et al.*, 2008). La principal causa del aumento de la suavidad de la carne está dado por la fragmentación de las miofibrillas, como resultado de los cambios post mortem que ocurren a nivel de línea Z (línea N<sub>2</sub>), línea M y de los filamentos intermedios (Mestre, 2002).

### **2.2.1. Mecanismos moleculares y bioquímicos que participan en la transformación del músculo en carne**

El proceso de conversión del músculo en carne está compuesto por tres fases: la fase pre-rigor durante la cual el músculo permanece excitable; el rigor, en la que los componentes energéticos (adenosín trifosfato (ATP), fosfocreatinina, glucosa) se agotan; y por último la fase post rigor de maduración. En la que se produce una pérdida de la arquitectura muscular (Sentandreu, 2002).

Una vez realizada la faena y derivado del desangrado del animal, se interrumpe el aporte de oxígeno y nutrientes al músculo, lo que produce un descenso gradual y progresivo de la energía disponible. En estas circunstancias, el músculo se ve obligado a utilizar las reservas de glucógeno para sintetizar ATP a partir de glucosa, con el fin de mantener su temperatura e integridad estructural, produciéndose gradualmente un cambio del metabolismo aerobio al anaerobio. A medida que se van reduciendo los niveles de ATP, se genera fosfato inorgánico que estimula la degradación de glucosa a piruvato. Esta ruta en ausencia de oxígeno continúa hasta la formación de ácido láctico, cuyo incremento provoca un

descenso gradual del pH muscular, que continuará hasta que se agoten las reservas de glucógeno o se inactiven los enzimas que rigen el metabolismo muscular.

Cuando se agotan las reservas musculares de energía, se provoca una lenta despolarización de las membranas. Se produce entonces un incremento en la fuerza iónica, en parte debido a la incapacidad de funcionamiento de las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{2+}$  y  $\text{K}^{2+}$  ATP-dependientes, lo que ocasiona la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico al espacio miofibrilar, además de disminuir la capacidad celular de mantener las condiciones reductoras.

El aumento en la concentración intracelular de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , va a provocar una reacción con la troponina que, como respuesta, modifica su configuración, desbloqueando los sitios activos de la actina a los que se unía. Al quedar éstos libres, las cabezas de miosina se unen a la actina, dando lugar a una unión irreversible entre ambas, justo en los puntos ocupados antes por la troponina (Paniagua, 1996). Sobreponiendo los filamentos finos sobre los gruesos, produciéndose un acortamiento muscular (acortamiento del sarcómero), sin que haya acortamiento de los filamentos finos sino sólo desplazamiento. La formación de actimiosina da lugar a una tensión y rigidez muscular que conduce a la instauración del rigor mortis o rigidez cadavérica. Tras el rigor comienza la etapa de ablandamiento, que produce la mejora gradual de la terneza de la carne. Este ablandamiento, es consecuencia fundamentalmente de la ruptura de la estructura miofibrilar por parte de sistemas proteolíticos enzimáticos endógenos (Huff Lonergan *et al.*, 2010; Ouali, 1992; Sentandreu, 2002; Weaver *et al.*, 2009).

Sin embargo, a pesar del conocimiento acumulado a lo largo de los años sobre los procesos que conducen a la instauración del rigor mortis y los que ocurren durante el período de maduración post rigor, no se ha conseguido explicar claramente la variabilidad en el ablandamiento de la carne, razón por la que recientemente continúan surgiendo hipótesis que abren la puerta a nuevos campos de investigación, a través de una reconsideración del proceso de conversión de músculo en carne, ya que todo parece apuntar a que los cambios en la estructura celular y proteica que se observan en el músculo tras la muerte del animal y que aún no han sido explicados, podrían serlo por procesos de muerte celular programada (MCP) (Ouali *et al.*, 2006). Estos procesos se observan en tejidos sujetos por ejemplo, a condiciones de isquemia o a diferentes señalizaciones intercelulares, que desembocan en

procesos metabólicos intracelulares que inducen el “suicidio” o muerte programada de algunas células, con el objetivo último de asegurar la supervivencia del tejido y evitar daños mayores.

Se han descrito diferentes tipos de MCP (MCP tipo I y MCP tipo II) o no programada (necrosis) (Goll *et al.*, 2014; Kemp *et al.*, 2014). Su prevalencia en el tejido muscular dependerá de las condiciones pre y post sacrificio y puede afectar en gran medida al proceso de conversión del músculo en carne y por tanto, a la adquisición final de un grado de suavidad y calidad óptimo. Este paso es de crucial importancia, puesto que las modificaciones posteriores que contribuyen a la transformación de músculo en carne dependen de estos eventos tempranos. Se estima que tras la muerte del animal y hasta que ocurren los primeros cambios mitocondriales que conducirán a la activación del sistema enzimático de las caspasas (principal sistema proteolítico efector de apoptosis) sólo transcurren 10 minutos, aunque el proceso completo hasta la total destrucción celular puede durar horas o incluso días, pero una vez que ésta ha comenzado, la muerte celular es inevitable (Green, 2005).

### **2.3. Mecanismos de acción de las enzimas proteolíticas**

Como parte del proceso de maduración, el debilitamiento estructural de las fibras musculares post mortem no depende únicamente de un sistema enzimático, sino de la acción coordinada de varios. Hasta el momento, la mayor parte de los estudios se han centrado en analizar la contribución relativa de cuatro sistemas proteolíticos celulares:

- 1) Las calpaínas (dependientes de calcio) y sus inhibidores endógenos las calpastatins, consideradas por muchos como el sistema proteolítico de mayor influencia en el proceso, especialmente en el post mortem temprano, ya que su actividad declina con la acidificación sucesiva del pH del músculo (Koochmaraie y Geesink, 2006).
- 2) Las catepsinas (enzimas lisosomales) activas a pH's más ácidos que las anteriores y por tanto más importantes en fases más tardías de la maduración post mortem, así como sus inhibidores endógenos, las cistatinas (Sentandreu *et al.*, 2002; Goll *et al.*, 2008).

- 3) El sistema ubiquitina-proteosoma (dependiente de ATP). Donde el proteosoma necesita de la unión previa de la ubiquitina con la proteína a degradar (ubiquitinación) proceso en el cual se necesita energía (Goll *et al.*, 2014).
- 4) Caspasas y metaloproteinasas tanto por su capacidad proteolítica sobre el músculo esquelético, como por sus implicaciones en los procesos de muerte celular (Sentandreu, 2002; Goll *et al.*, 2014; Kemp *et al.*, 2014).

### 2.3.1. Calpaínas

La familia de las calpaínas (Figura 5) está compuesta por 14 miembros de cisteín- proteasas no lisosomales activadas por calcio (Goll *et al.*, 2003), además de por los inhibidores endógenos de las mismas, las calpastatinas. Las dos isoformas mejor caracterizadas de las calpaínas son  $\mu$ - y m- calpaínas, cuyos nombres hacen referencia a los niveles de calcio que las modulan.

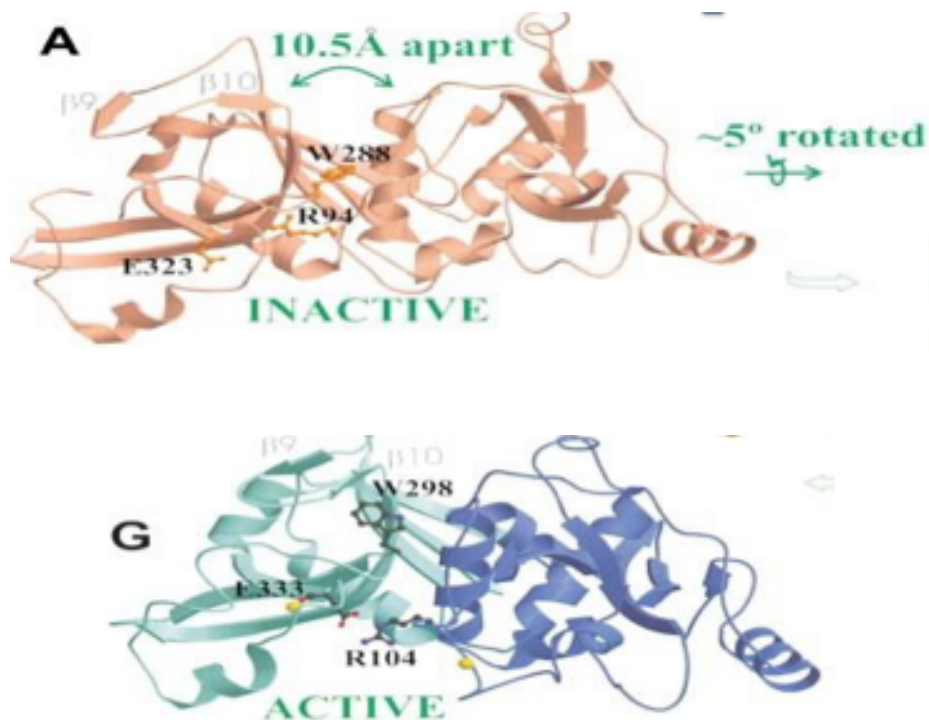


Figura 5. Esquema de la calpaína inactiva y después de la unión con  $\text{Ca}^{2+}$  (Tomado de Moldoveanu, 2002).

En la célula, el sistema de calpaínas cubre un amplio rango de funciones fisiológicas, que incluyen proteólisis de proteínas involucradas en el ciclo celular (diferenciación y muerte celular), apoptosis, organización del citoesqueleto y señales de transducción (Goll *et al.*, 2003). Así, las calpaínas están activas en todos los estadios que se suceden como respuesta al estrés celular, conduciendo a resultados diferentes dependiendo del momento específico, del compartimento donde la enzima es activada y las funciones específicas de las células.

En condiciones *in vitro*, los niveles de calcio necesarios para que la  $\mu$ -calpaína se active son de entre  $5 \cdot 10^{-3}$  y  $6.5 \cdot 10^{-2}$  mM, mientras que para la m-calpaína se necesitan entre 0.25 y 1 mM de calcio (Goll *et al.*, 1992). Estas calpaínas son hetero-dímeros formados por dos subunidades, una subunidad catalítica de 80 kDa, responsable de su actividad proteolítica, y una subunidad reguladora de 28 kDa. La subunidad pequeña es idéntica en ambas, mientras que la catalítica es similar pero está codificada por distintos genes (Suzuki *et al.*, 1981). Las calpaínas están estrechamente reguladas y se suponen inactivas la mayor parte del tiempo (Goll *et al.*, 2003). En ausencia de calcio, los residuos que forman la unidad catalítica están muy apartados entre sí para evitar la formación del sitio activo, debido a la presencia de puentes salinos con otras partes de la molécula. Cuando el calcio se une, estos puentes salinos se rompen permitiendo la unión de los residuos que forman el centro activo. Posteriores uniones de calcio a ambos lados de la hendidura catalítica, completan el proceso, apareciendo un centro activo completo (Moldoveanu *et al.*, 2002). Aunque requieren calcio para activarse, las calpaínas se auto regulan en presencia de éste, ya que en determinado momento sufren autólisis (Goll *et al.*, 2003).

En el tejido muscular se expresan fundamentalmente tres tipos distintos de calpaínas: las ubicuas ( $\mu$ - y m- calpaína) y la calpaína 3/p94 que está activamente expresada en este tejido. Con respecto a la suavidad de la carne, durante décadas, las calpaínas han sido del interés de la mayoría de las investigaciones, debido a que estas enzimas citosólicas tienen acceso a las miofibrillas, no requieren ATP para su activación y reproducen *in vitro* los cambios observados en las miofibrillas, siendo capaces de alterar la densidad de la línea-Z, proceso que se observa normalmente durante la desestructuración post mortem del músculo (Koohmaraie *et al.*, 1987); (Huff-Lonergan, 1996; Koohmaraie, 1988). Además, el hecho de que en músculo bovino y ovino se produzca un descenso significativo de la actividad de

$\mu$ -calpaína post mortem, permaneciendo la m-calpaína más o menos estable, llevó a Koohmaraie *et al.* (1987) a concluir que es la  $\mu$ -calpaína y no la m-calpaína la principal responsable de la tenderización. Dicha asunción ha sido apoyada por estudios posteriores (Geesink *et al.*, 2006) realizados con ratones knock-out para  $\mu$ -calpaína, donde apenas se encontró proteólisis post mortem.

Debido a su especificidad, las calpaínas no degradan proteínas hasta sus aminoácidos constituyentes y tampoco degradan las proteínas miofibrilares mayoritarias (actina y miosina). Sin embargo, se ha hipotetizado que su papel en el músculo es iniciar la proteólisis específica de determinadas proteínas miofibrilares como titina y nebulina y también de los filamentos intermedios de desmina durante las primeras 24 h post-mortem (Koohmaraie, 1992). Incluso algunos autores apuntan que éstas contribuyen al 95% de la tenderización post mortem inducida por proteasas (Delgado *et al.*, 2001). Uno de los modelos propuestos (Neti *et al.*, 2009; Goll *et al.*, 2014) sugiere que las calpaínas catalizan la liberación de los miofilamentos de las miofibrillas y los hacen disponibles al proteosoma y a los enzimas lisosomales para la completa degradación hasta sus aminoácidos constituyentes (figura 6) De hecho, existen algunos trabajos que muestran evidencias de que, en el tejido muscular vivo, las calpaínas actúan en colaboración con el proteosoma y las proteasas lisosomales en la degradación de proteínas miofibrilares y del citoesqueleto (Purintrapiban *et al.*, 2003).

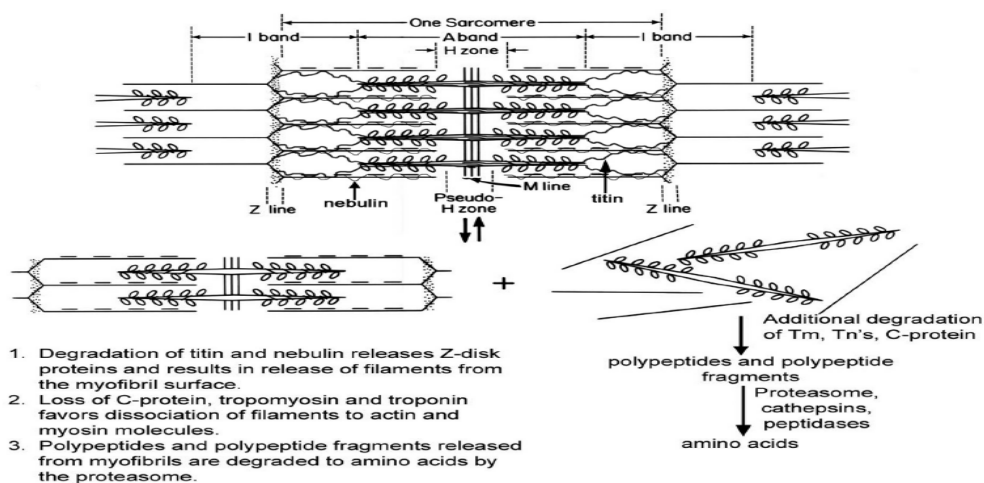


Figura 6. Esquema de la liberación de los miofilamentos previo a su total degradación (Tomado de Goll *et al.* 2008).



La calpastatina es una proteína inhibidora que regula la actividad de las calpaínas, tiene un peso molecular de aproximadamente 66 kDa (Kendall *et al.*, 1993) y aunque su actividad desciende hasta un 70% durante el rigor mortis, es responsable del 44 % de la variación en suavidad de la carne madurada (Kendall *et al.*, 1993; Veiseth-Kent *et al.*, 2010). Se continua evaluando la posibilidad de medir este inhibidor en el animal vivo para seleccionar animales de carne suave antes de la faena (Casas *et al.*, 2006).

### **2.3.2. Catepsinas**

Las catepsinas son una familia de endo y exo-peptidasas localizadas en los lisosomas y activas a pH ácidos (desde 3,5 hasta 6,5) que comprenden cisteín- (catepsinas B, H, L, X, etc.), aspartil- (catepsina D y E) y serin- (catepsina G) peptidasas. Éstas son sintetizadas como pro-enzimas que mediante una serie de cortes específicos en sus extremos amino, bien por autoproteólisis o bien por la acción de otras proteasas, son transformadas en enzimas activas (Turk *et al.*, 2000). Su actividad es controlada principalmente por su localización, además de otros factores tales como el pH, el potencial redox, la activación de determinados precursores o la concentración de sus inhibidores endógenos, las cistatinas. Durante mucho tiempo se pensó que eran responsables únicamente de la degradación inespecífica intra-lisosomal, debido a su bajo pH óptimo y a que están confinadas en dicho compartimento. Sin embargo, a diferencia de las lisozimas, su capacidad para actuar fuera de los lisosomas, las implican en numerosas funciones celulares en la mayoría de tejidos y tipos celulares, tales como la iniciación de procesos de MCP, activación y procesamiento de hormonas, como la prorenina a renina por la catepsina b (Tamargo *et al.*, 2009), las tiroideas por acción de la catepsina d (Dun, 2001), además de ser un marcador en la detección de cáncer mamario (Poblete, 2001) y otras enzimas como el tripsinógeno a tripsina, también por la catepsina b (Tamargo *et al.*, 2009), la catepsina k como marcador en la remodelación del hueso e indicador de la actividad osteoclástica (Seibel, 2006). Su desregulación bajo condiciones anormales para la célula, conduce a la aparición de muchas enfermedades como cáncer, aterosclerosis, Alzheimer, esclerosis múltiple o desórdenes musculares (Kirschke *et al.*, 1995) de un modo directo, por la degradación de la matriz extracelular, o de un modo indirecto, activando a otras proteasas (Kos y Lah, 1998).

También están implicadas en miopatías inflamatorias donde, junto con la acción de otras peptidasas, constituyen un importante mecanismo de degeneración de fibras musculares (Kumamoto *et al.*, 1997).

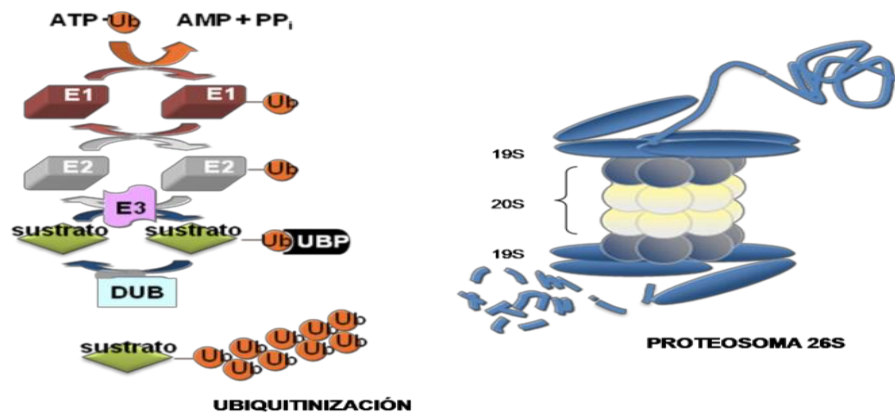
En el músculo, se expresan distintas catepsinas: seis cisteín peptidasas (catepsina B, L, H, S, F y K) y una aspartil proteasa (catepsina D). Existe una gran controversia sobre la posible implicación de ellas en los procesos de ablandamiento post mortem. Debido a las teorías de que son enzimas confinadas en los lisosomas, y por tanto, no tienen acceso a las miofibrillas (Hopkins y Thompson, 2002); otra, que durante la maduración post mortem no se observa degradación de actina y miosina, sus principales sustratos (Koohmaraie *et al.*, 1991) y por último (Whipple *et al.*, 1990) no observó relación entre la actividad de catepsinas y la variabilidad en la suavidad de la carne. Sin embargo, diversos estudios las han implicado en el proceso de tenderización post-mortem (Caballero *et al.*, 2007; Goll *et al.*, 2014). Así, se encontró que la actividad de catepsinas, especialmente de B, H, y L se correlaciona con la terneza desde las 24 horas post mortem hasta el final del período de maduración de la carne (Johnson *et al.*, 1990; O'Halloran *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 2004). Por otro lado, estudios histoquímicos han demostrado que con la maduración post mortem se produce una ruptura lisosomal, que es casi completa a los 14 días (Zeece, 1992), una posible explicación de esta ruptura lisosomal puede ser el descenso de pH cuando la temperatura de la canal es todavía alta o como consecuencia de la alteración de las bombas iónicas de la membrana lisosomal durante el rigor (Sentandreu, 2002), observándose además, un aumento en la actividad de estas enzimas de la fracción lisosomal a la fracción citosólica (O'Halloran *et al.*, 1997).

### **2.3.3. Complejo Ubiquitina-Proteosoma**

El proteosoma (26S) es un complejo proteico catalítico que se encarga de destruir ciertas proteínas y controlar la concentración de otras. Es dependiente de energía por lo que mientras haya ATP disponible será de gran importancia para la destrucción de las proteínas seleccionadas, las cuales deben ser previamente marcadas con una cadena de ubiquitina que permite al proteosoma identificarlas, (Taillandier *et al.*, 2004). Una vez que una molécula

de ubiquitina se pega a una proteína, gracias a la enzima ubiquitina ligasa, se empiezan a agregar más ubiquitinas, dando como resultado la formación de una cadena poliubiquitínica que permite al proteosoma identificar y degradar dicha proteína.

Estructuralmente, un proteosoma es un complejo que gráficamente se representa con forma de barril; las paredes del barril conforman un "núcleo" compuesto de cuatro anillos apilados alrededor de un poro central que es la estructura catalítica (20S). Cada uno de estos anillos está compuesto por siete proteínas individuales. Los dos anillos internos contienen subunidades proteicas  $\beta$ , conformando los sitios activos de las proteasas (Figura 7). Estos sitios se encuentran en las caras internas de los anillos, de manera que la proteína a degradar tenga que entrar por el poro antes de ser procesada. Los dos anillos exteriores contienen subunidades  $\alpha$ , cuya función es mantener una "puerta" por la cual las proteínas puedan entrar al barril. Las subunidades  $\alpha$  (19S), son proteínas con función reguladora a veces descritas como "pestañas", que reconocen a las cadenas de ubiquitina adheridas a las proteínas e inician el proceso de degradación. El proceso de ubiquitinación más el proceso de degradación proteosómica recibe el nombre de sistema ubiquitin-proteosoma.



A. B.

Figura 7. Sistema de degradación proteica ubiquitina-proteosoma. A) Representación de la estructura básica del proteosoma de 26S. B) La estructura catalítica de 20S se localiza entre dos estructuras reguladoras de 19S (Tomado de Ohsumi, 2001).

El sistema ubiquitina- proteosoma degrada la mayor parte de las proteínas celulares de vida media corta, las cuales tienen funciones celulares clave, así como aquellas disfuncionales por ejemplo a consecuencia de un mal plegamiento, o a una modificación anormal en su estructura o daño de forma. La ubiquitina (Ub) es añadida a las proteínas diana por un mecanismo de tres pasos que implica la acción secuencial de las enzimas E1, E2 y E3 (Goll *et al.*, 2008).

#### **2.3.4. Sistema de Caspasas**

Las caspasas son responsables de la degradación de proteínas durante la apoptosis. Son proteínas pertenecientes a él conjunto de las cisteín-proteasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas. En el caso de las caspasas, el corte se produce al nivel de un residuo de aspartato de lo que deriva su nombre (cisteinil-aspartato proteasas). A pesar de pertenecer al grupo de las cisteín-proteasas, estas no requieren  $\text{Ca}^{2+}$  para su activación.

La caspasa-1 fue la primera en descubrirse, es la enzima convertidora de interleucina 1-b (ICE), responsable de la maduración de la pro-interleucina 1-b a su forma pro-inflamatoria y biológicamente activa. Las caspasas-4, 5, 11 y 13 también pertenecen al grupo del sistema de respuesta inflamatoria de las caspasas. Además existen las caspasas-3, 6, 7, 8, 9, 10 y 12 que tienen que ver con procesos de apoptosis, las cuales se dividen en caspasas iniciadoras, caspasa-8, 9, 10, 12 y caspasas efectoras, caspasa-3, 6, y 7 (Kemp, 2012).

La iniciación de las reacciones provocadas por éstas, están reguladas por inhibidores de caspasas. No se sabe realmente si las caspasas pueden degradar miofibrillas de manera eficiente. Debido a que las caspasas se activan por los eventos que inician la apoptosis, parece poco probable que tengan actividad en las células musculares normales, aunque están activas durante los periodos de pérdida de masa muscular. Du *et al.* (2004, 2005) demostraron que la caspasa-3 puede degradar actina a una fracción de 14 kDa, por lo que han sugerido que esta caspasa-3 actúa junto con el proteosoma en la ruptura de proteínas miofibrilares (Goll *et al.*, 2008).

## **2.4. Proceso de Maduración**

Se conoce como maduración al proceso de degradación que ocurre en la carne almacenada en condiciones de temperatura y humedad controladas, durante varios días con el fin de mejorar su textura y aroma (Hui, 2006; Li *et al.*, 2013).

En el ablandamiento post mortem durante la maduración se distinguen tres grandes eventos principalmente:

- A) El incremento de la rigidez o acortamiento de los sarcómeros.
- B) El rompimiento y separación de conexiones entre los filamentos delgados y la línea Z.
- C) La degradación de costámeros y los eslabones intermiofibrilares, de titina y nebulina (Taylor *et al.*, 1995). Esto se produce principalmente por la actividad de las proteasas endógenas que además del ablandamiento de la carne, forman compuestos nitrogenados solubles en agua, mismos que actúan como precursores en la reacción de Maillard, lo que le confiere durante la maduración, un aroma dulce y ligeramente tostado. Mandell *et al.*, (2001) evaluaron el efecto del tiempo de la maduración en las propiedades de carne de ternera, resultando que al aumentar el tiempo de maduración, se mejoran las propiedades sensoriales de textura, aroma y sabor.

### **2.4.1. Tipos de Maduración**

De manera comercial, se utilizan principalmente tres métodos de maduración. Los cuales dan como resultado una carne suave, aunque con algunas diferencias:

- a) Maduración seca: consiste en poner la carne en condiciones de temperatura entre 2-4°C y a una humedad de 50-60% sin ningún tipo de cubierta, para que de esta forma se obtenga una mayor concentración del sabor y aroma, debido en parte a la deshidratación parcial de la carne, lo cual hace más costoso este método (por la pérdida de peso de la pieza) y por ende, el menos utilizado a nivel comercial (DeGeer *et al.*, 2009). Sin embargo, algunos consumidores la prefieren por que se obtiene un producto de mayor valor organoléptico (Stenstrom *et al.*, 2014)
- b) La maduración seca en bolsa: se realiza bajo las mismas condiciones que la anterior, pero cubierta con una bolsa permeable al oxígeno, lo que además de resaltar las características organolépticas del producto, disminuye el deterioro de la carne y con esto, el costo que implica este tipo de maduración (Ahnström *et al.*, 2006).

- c) **Maduración húmeda (al vacío):** consiste en envasar la carne al vacío y mantenerla en condiciones de temperatura entre 2-4°C. Lo que permite un control del desarrollo de microorganismos, principalmente aerobios, además de que facilita su manejo y evita el contacto con el oxígeno, limitando las reacciones de oxidación, lo que lo hace el procedimiento más utilizado en la industria por su menor merma (Laster *et al.*, 2008).

#### 2.4.2. Factores que afectan la maduración de la carne

El grado de suavidad que se logre con la maduración, estará influenciado tanto por factores propios de la carne como por otros externos de los propios animales o que afectan a éstos de alguna forma (Soria y Corva, 2004). La consideración y grado de control de estos factores, explica en parte la calidad del producto final.

Los factores que afectan la maduración son:

- a) **Extrínsecos:** todos aquellos ajenos a la carne, que afectan de manera directa o indirecta a la suavidad de la misma resultado de la maduración de esta. Algunos determinantes son:
- **Especie.** Esta afecta el tiempo de maduración, debido en parte a las diferencias en el metabolismo de cada especie, así como al grado de tolerancia al estrés al que se someten antes de la matanza (Oddy *et al.*, 2001), el tamaño (volumen de la fibra muscular) es otro factor que influye por especie, por ejemplo, el bovino necesita mayor tiempo para madurar su carne en comparación con el cerdo o las aves. Los bovinos necesitan mínimo 10 días para alcanzar un 80 % de la suavidad máxima esperada, mientras que los cerdos cinco y las aves uno (Koochmaraie, 1996).
  - **Raza.** La carne procedente de bovinos de razas índicas es menos suave que la de razas europeas, debido a que contiene una mayor concentración de calpastatinas, las cuales inhiben la acción de las calpaínas, disminuyendo así la suavidad obtenida durante la maduración, además de que genéticamente, la carne de ganado *Bos indicus* contiene menos grasa intramuscular, lo que da como resultado cortes más magros en comparación con los obtenidos de *Bos Taurus* (Plascencia *et al.*, 1999).

- Edad. En animales jóvenes hay una menor proteólisis post mortem debido a una mayor concentración de calpastatinas, las cuales disminuyen la actividad de las calpaínas; esta relación se debe a la concentración inicial de proteínas inhibitorias en el músculo durante el desarrollo muscular, por lo que variará conforme mejore la eficiencia en el crecimiento de la masa muscular (Goll *et al.*, 2007).
- Sexo. Aquí, la suavidad de la carne está determinada principalmente por la relación de tejido magro y graso de ésta, siendo menos suave la proveniente de toros que de machos castrados y menos aún en comparación con la de hembras; lo anterior por la relación de tejido magro y graso, presente en cada una de las condiciones. Mientras que la suavidad provocada durante la maduración, por la degradación proteolítica del músculo, corresponde a que mientras más desarrollo muscular haya, habrá mayor degradación y por ende suavidad, motivo por el cual obtienen mejores resultados de la maduración en carne proveniente de toros que en machos castrados y más aún en comparación con hembras (Huff-Lonergan *et al.*, 1995).
- Dieta. El tipo de alimentación influye en la composición de la carne y los niveles de glucógeno en músculo, alterando la fermentación anaeróbica del mismo, aumentando o disminuyendo la producción de ácido láctico que afecta la caída normal de pH, provocando cambios en la suavidad de la carne, debido a que mientras más rápida sea la caída de pH, disminuye la acción de las calpaínas durante la maduración, así, con un pH de 6.5 hay mayor actividad de éstas durante la maduración (Wu *et al.*, 2014). También influye en el nivel de calcio muscular post-mortem, con la administración de vitamina D a los animales durante el período de engorda (Montgomery *et al.*, 2002), aumenta la disponibilidad de calcio y favorece la proteólisis post mortem presente en la maduración. (Koohmaraie *et al.*, 2002; Muir *et al.*, 1998).
- Ambientales (manejo ante y post mortem). Todos aquellos procedimientos realizados en los animales, incluidos los métodos físicos y químicos que se realizan tanto en los animales como en la canal, para favorecer la suavidad de la carne, tales como:

- Factores ante mortem. Manejo, transporte y tiempo de espera de los animales antes de la faena influyen en las reservas de glucógeno del músculo, relacionado con el descenso del pH del mismo, afectando la suavidad de la carne (Koohmaraie *et al.*, 2002).
- Factores post mortem. La estimulación eléctrica se utiliza para provocar una exanguinación más efectiva y para evitar o disminuir el acortamiento de los sarcómeros durante la refrigeración de la canal posterior a la faena, lo que se conoce como acortamiento por frío que afecta directamente la suavidad de la carne (Koohmaraie *et al.*, 1998) y la inyección de  $Cl_2Ca$  (Warris, 2000) se utilizan para promover y acelerar la proteólisis post-mortem al aumentar la disponibilidad de calcio durante la maduración. La temperatura y velocidad de enfriamiento de la canal influyen en la integridad y estiramiento del sarcómero, lo cual está relacionado con la suavidad final (Weaver *et al.*, 2009). El método de colgado de las reses durante las primeras horas de refrigeración influye en la tensión que se ejerce sobre diferentes músculos y en el grado final de suavidad que tendrán los mismos una vez efectuada la maduración (Weaver *et al.*, 2009; Ferguson *et al.*, 2001).

b) ***Intrínsecos***: aquellos propios de la carne, que afectan de manera directa o indirecta la suavidad de la misma resultado de la maduración de ésta, los cuales son afectados o beneficiados por los factores extrínsecos, entre los cuales resaltan:

- La actividad de los principales sistemas proteolíticos celulares descritos anteriormente.
- La longitud de sarcómero, determinada principalmente por 2 factores de manejo de la canal después de la faena, el acortamiento por frío principalmente por excesos en la temperatura de pre-enfriamiento de la canal y la técnica de colgado de la canal durante su refrigeración. Dicho acortamiento será influenciado por el grado de estrés del animal en el momento de la faena, debido a la concentración de glucógeno disponible al momento de la muerte, siendo un estrés agudo el causante de una mayor liberación de glucógeno, lo que favorecerá una fuerte contracción del sarcómero que afectará de manera importante el grado de ablandamiento durante la maduración (Weaver *et al.*, 2008, 2009).



- Tipo de fibra muscular, esto relacionado con la velocidad de degradación ocurrida durante la maduración, que es más rápida en las fibras blancas ya que poseen discos Z más estrechos al tener un sarcómero de menor tamaño, que las fibras rojas que poseen un tamaño de sarcómero mayor, lo que influye en la textura y la suavidad; también se relaciona con la proporción de tejido conectivo y sus diferentes tipos (McCormick, 1999), además del pH, niveles de calcio y glucógeno musculares de los que se habló anteriormente.
- Niveles de calcio, la fuerza iónica y la presión osmótica, no involucra procesos enzimáticos, sino por efecto del incremento en la concentración de iones de calcio sarcoplásmico durante el proceso de maduración post mortem, se va degradando la estructura de los discos Z, específicamente, debilitando los enlaces actina-miosina, además de dividir los filamentos de titina y romper los filamentos de nebulina (Mestre, 2002; Goll *et al.*, 2008).

## **2.5. Modificadores del metabolismo y su impacto en la calidad de carne**

En la búsqueda de nuevas y mejores formas de producción, en el caso particular de producción de carne, se hace uso de algunos fármacos de uso veterinario como aditivos en la dieta de los animales, tales como los compuestos adrenérgicos  $\beta$ -agonistas ( $\beta$ AA). Estos son agentes químicos reparticionadores o modificadores del metabolismo (NRC 1994), que actúan a nivel de los receptores adrenérgicos, que mejoran la retención de nitrógeno, derivando la energía de los alimentos y de la lipólisis hacia la síntesis proteica muscular (Mersmann, 2002).

Al ser la carne de res un producto para un grupo de consumidores muy diverso en sus gustos y costumbres, el uso de algunos de estos compuestos mejora la productividad aunque también pueden afectar la calidad, dependiendo el nicho de mercado al que se dirija la producción, debido a que la carne de animales tratados con  $\beta$ AA tiene mayor tejido magro y menor proporción de grasa intramuscular. Existen varios productos pertenecientes a este grupo de químicos, los cuales son:

- Clorhidrato de Ractopamina: compuesto  $\beta$ -agonista tipo 1. Utilizado en la actualidad porque aumenta la ganancia diaria de peso, la eficiencia alimenticia y el

rendimiento de cortes magros sin afectar la calidad de la carne y sin presentar riesgo para la salud pública (Sumano *et al.*, 2002; Dunshea, 2014).

- Clorhidrato de Zilpaterol: compuesto  $\beta$ -agonista tipo 2. Con acciones similares al producto anterior pero con mayor magnitud sobre el comportamiento productivo, afectando la textura de la carne, principalmente al aumentar la fuerza de corte. Si bien este producto requiere 3 días de retiro previo al sacrificio, no constituye riesgo para la salud pública (Sumano *et al.*, 2002; Dunshea, 2014).

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

Los  $\beta$ AA actúan sobre receptores específicos, pertenecientes a la familia de receptores GPCR (receptores de unión de Guanina a proteína G); existen varios subtipos  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3. Éstos últimos relacionados con los adipocitos y con el efecto lipolítico de los  $\beta$ AA. Dependiendo en que órgano estén ubicados y el subtipo de receptor, será su función (Cuadro 1). En los bovinos los  $\beta$ 1 y 2 son los involucrados en el metabolismo proteico, que a pesar de que están presentes en mayor concentración en músculos de movimiento lento, la mayor respuesta anabólica se presenta en músculos de rápido movimiento.

Cuadro 1. Receptores adrenérgicos, localización, tipo y función (Tomado de Botana, L. Farmacología y Terapéutica Veterinaria, 2002)

ÓRGANO	RECEPTOR ALFA	RECEPTOR BETA
Endotelio (vasos sanguíneos)	Vasoconstricción	
Músculo cardíaco	-	Inotropismo positivo ( $\beta$ 1) Cronotropismo positivo ( $\beta$ 1) Dromotropismo positivo ( $\beta$ 1) Batmotropismo positivo ( $\beta$ 1)
Músculo del iris	Midriasis( $\alpha$ 1)	-
Bronquios	-	Broncodilatación ( $\beta$ 2)
Esfínter del Píloro	Contracción ( $\alpha$ 1)	-
Esfínter de la Vejiga	Contracción ( $\alpha$ 1)	-
Músculo liso intestinal	-	Relajación ( $\beta$ 2)
Músculo liso uterino	-	Relajación ( $\beta$ 2)
Hígado	Glucogenólisis ( $\alpha$ 1)	-
Músculo estriado	-	Glucogenólisis ( $\beta$ 2)
Plaquetas	Agregación ( $\alpha$ 2)	-

En hígado y tejido adiposo, los  $\beta$ AA favorecen la concentración de AMPc inhibiendo la síntesis de ácidos grasos y el aumento de la lipólisis (Figura 8).

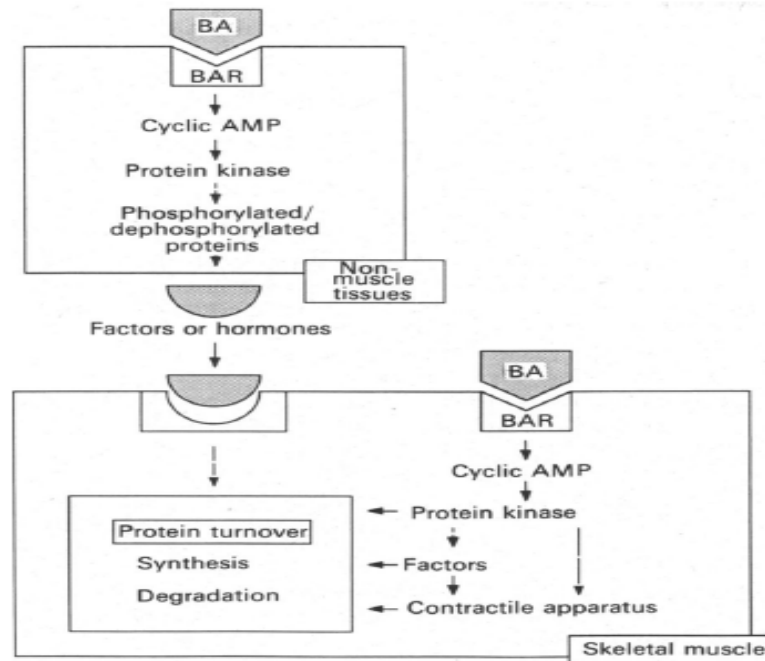


Figura 8. Posible mecanismo de acción de la hipertrofia muscular inducida por  $\beta$ AA (Tomado de Yang y McElligott, 1989).

Los  $\beta$ AA influyen activamente en el anabolismo y catabolismo de las proteínas, aumentando la disponibilidad de sustrato (aa) y energía, favoreciendo el anabolismo y disminuyendo la tasa de degradación, retardando el catabolismo proteico. En el tejido adiposo, los  $\beta$ AA aumentan la lipólisis y disminuyen la lipogénesis, lo que resulta en un menor depósito de grasa en la canal (Mersmann, 2002). La activación de los receptores  $\beta$ AA, causa un aumento en el AMPc, que activa a la proteinkinasa 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). En el tejido muscular, los  $\beta$ AA aumentan la irrigación sanguínea del músculo, incrementando la disponibilidad de energía y aminoácidos, lo cual favorece la síntesis y retención de proteína que deriva en una hipertrofia muscular, principalmente del cuarto trasero del animal (Ricks *et al.*, 1984). En ganado bovino se ha observado que con la administración de ClZi se aumenta el área del ojo de la chuleta (Ricks, 1984; Avendaño *et al.*, 2006; Castellanos *et al.*, 2006).

La investigación realizada del efecto de estas sustancias sobre el rendimiento en canal de ganado bovino, se ha llevado a cabo primordialmente con ganado de tipo *Bos taurus* o sus

cruzas, esto por tener una mayor deposición de tejido graso respecto al *Bos indicus* haciendo más notorio su efecto en el rendimiento en canal (Plascencia *et al.*, 1999).

En el músculo, además de la hipertrofia, ocurren cambios en el tipo de fibra muscular, como los del ARN de transcripción que modifican la proporción de miosina y actina (Miller *et al.*, 1988). 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).

El efecto negativo que produce el ClZi sobre la suavidad de la carne se ha logrado conocer más a detalle, gracias a su similitud con el efecto inhibitorio de las calpastatinas sobre la actividad de las calpaínas durante la maduración, que responde a que cuanto mayor sea la concentración de las primeras, tienen menor actividad las segundas (Garces *et al.*, 1998).

### **2.5.2. Efectos de los $\beta$ AA sobre la calidad de la carne**

En la actualidad, estos efectos han tenido un impacto importante, debido a la creciente demanda de carne magra por parte del consumidor (Kemp *et al.*, 2009). Las características deseables o indeseables en cuanto a calidad de carne se refieren, dependerán del destino y nicho de mercado al que se dirija el producto. Esto derivado del efecto de los  $\beta$ AA de aumentar la retención de nitrógeno proteico favoreciendo la hipertrofia muscular, teniendo un impacto importante en la actualidad, debido a la creciente demanda de carne magra, con especial interés en obtener canales con menos grasa, tanto de cobertura e intramuscular a la vez de una mayor masa muscular (Vilaboa-Arroniz *et al.*, 2009).

En varios países, el uso de  $\beta$ -adrenérgicos es común en animales productores de carne, principalmente por la mejora de rendimiento cárnico de la canal (Moron-Fuenmayor *et al.*, 2002; Mondragón *et al.*, 2010). Como resultado de varios estudios, se ha relacionado la disminución de suavidad en la carne con la administración de ClZi como modificador del metabolismo de crecimiento, al tener un efecto similar al de las calpastatinas inhibiendo a las calpaínas durante la maduración (Koohmaraie *et al.*, 1995, 1996, 2002; Avendaño *et al.*, 2006), afectando esto la textura y jugosidad de la carne (Koohmaraie y Geesink, 2006); en bovinos tratados sin y con ClZi (Avendaño *et al.*, 2006), indicaron valores mayores de fuerza de corte 4.39 vs. 5.11 kg por  $\text{cm}^2$ . En ovinos con y sin ClZi obtuvieron una FCWB

de 10.9 vs 8.2 kg por cm<sup>2</sup> (Koohmaraie *et al.*, 1996) obteniendo en los dos estudios diferencia significativa entre tratamientos, lo que refuerza la teoría de la disminución de suavidad por el uso de ClZi.

### **2.5.3. Efectos adversos de la utilización de $\beta$ AA en la salud pública**

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 representar un problema, al no rebasar los límites permitidos que afecten la inocuidad del producto. Sin embargo, los resultados obtenidos pueden diferir de acuerdo con el  $\beta$ AA empleado, dosis, unidad de producción y características de los animales empleados. Según el Comité para Productos Medicinales Veterinarios de la Agencia Europea de Evaluación del Medicamento, los límites máximos de residuos recomendados de clorhidrato de zilpaterol, para los diferentes tejidos comestibles son (ppb): hígado y riñón 30, tejido adiposo 20 y músculo 1 (Sagarpa, 2012; Intervet, 2014). Por lo que los  $\beta$ AA, ClZi y el clorhidrato de ractopamina, siempre y cuando se utilicen adecuadamente en la producción animal y se respeten sus tiempos de retiro, no representaran riesgo a la población que consume productos de dichos animales. Queda claro que el uso de estos modificadores del metabolismo, tiene efectos sobre la producción de carne, que dependiendo del enfoque comercial que tenga el producto puede o no, ir en detrimento del valor del producto.

## **3. HIPOTESIS**

Las características físicas medidas en la carne y la actividad y concentración de proteínas estructurales del sarcómero relacionadas con la maduración (titina, nebulina y miosina) se pueden modificar en función tanto del uso de compuestos  $\beta$ -agonistas tipo 2, como por el tiempo y método de maduración empleado, en seco o húmedo.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los procesos que ocurren durante la maduración en seco o en húmedo, de carne de res producida en México, tales como la actividad de las principales enzimas endógenas proteolíticas y la relación del posible efecto que ejerce sobre la maduración, el uso o no de compuestos  $\beta$ -2 Adrenérgicos.

##### **4.1. Objetivos Específicos**

- Comparar el efecto del uso o no de ClZi sobre las características físicas de la carne de res.
- Evaluar la interacción del uso o no del ClZi con los días y el método de maduración empleado en esta misma carne sobre las mediciones de calidad establecidas.
- Relacionar los cambios en actividad enzimática y degradación de proteínas durante la maduración con las características físicas de la misma.

#### **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

##### **5.1. Tratamiento de animales y canales**

Se trabajó con 24 canales de bovino procedentes de 12 machos enteros jóvenes (20-22 meses de edad), cruza comerciales de cebú con pardo suizo y de características fenotípicas similares. El músculo utilizado para evaluar el experimento fue el *Longissimus dorsi lumborum*. Los animales, pertenecientes a un rancho en el municipio de Ezequiel Montes, fueron sometidos a un periodo de engorda de 120 días, durante los cuales se les aplicaron implantes de acetato de trembolona con estradiol en dos ocasiones, uno al inicio de la engorda y otro al día 80 de la misma, los últimos 30 días previos a la matanza, las características del ganado, el manejo y actividades descritas anteriormente son las comunes en una producción de engorda de bovinos en México, para el experimento, los animales (n=12) fueron separados en dos corrales, donde a 6 de ellos se les administro ClZi y los otros 6 se trataron como control sin adición de ClZi en la dieta. Los animales se trasladaron del rancho al rastro TIF-338 “Distribuidora de Carnes del Bajío S.A. de C.V.” donde se realizó la matanza. Una vez en el rastro previo a la matanza, se identificaron los animales en pie para darle seguimiento hasta la obtención de la canal.

Las canales se identificaron con cinchos plásticos anclados en la región costal y se realizó el primer muestreo, que consistió cortar un trozo de chuleta de 100 g obtenido del onceavo espacio intercostal correspondiente al *M. Longissimus dorsi*, de éste se obtuvieron muestras para análisis de ultraestructura, consistentes en 6 pequeños fragmentos cuboides de tejido de no más de 1 mm de grosor, obtenidos con hoja de bisturí limpia y nueva, inmersos en buffer de fosfatos y glutaraldehído al 2.5% para fijar la muestra hasta su procesamiento en el laboratorio; lo restante se envasó al vacío y se transportó en contenedores isotérmicos con geles refrigerantes, manteniendo la cadena fría durante todo el trayecto hasta el laboratorio donde primero se midió el color y pH, después se reservó un trozo de 15 g para obtener el extracto enzimático para determinación y concentración de proteína por el método de biuret, electroforesis y actividad de calpaínas, el resto de la muestra se identificó, envasó al vacío y se guardó como reserva en congelación a -80°C.

El resto de la canal se mantuvo en refrigeración entre 2 y 4°C durante 24 h, después de lo cual, se evaluaron las características de las mismas y se extrajeron los lomos (de la doceava vertebra torácica a la séptima lumbar) de ambas mitades de la canal. Posteriormente, se envasaron al vacío, identificaron y se transportaron en contenedores isotérmicos con geles refrigerantes, manteniendo la cadena fría durante todo el trayecto hasta el laboratorio de calidad de carne de la FMVZ-UNAM.

## 5.2. Evaluación de canales

Para la evaluación de las canales se procedió conforme a la NMX-FF-078-SCFI-2002 (conformación, distribución grasa, color subjetivo, textura, firmeza). El color de la carne se determinó de manera subjetiva por apreciación visual y se calificó con la escala 1: Rojo oscuro – 3: Rojo pálido (Figura 9).



Figura 9. Escala de color subjetivo de la carne.

La firmeza se determinó por presión digital en el músculo Longissimus dorsi y se apreció por la marca de la penetración al ejercer la presión sobre las fibras musculares de acuerdo con lo estipulado en la NMX-FF-078-SCFI-2002, utilizando la escala allí descrita (1: Firme +, 6: Suave +). La determinación de textura se realizó por fricción digital sobre el músculo *Longissimus dorsi* en el área de la chuleta de acuerdo con lo estipulado en la NMX-FF-078-SCFI-2002 utilizando la escala allí descrita (1: Tosca +, 6: Fina +). La distribución grasa se llevó a cabo observando la vista lateral de la media canal derecha determinando la uniformidad de la capa de grasa subcutánea que la cubre usando la escala 1: No uniforme – 3: Uniforme (Figura 10).

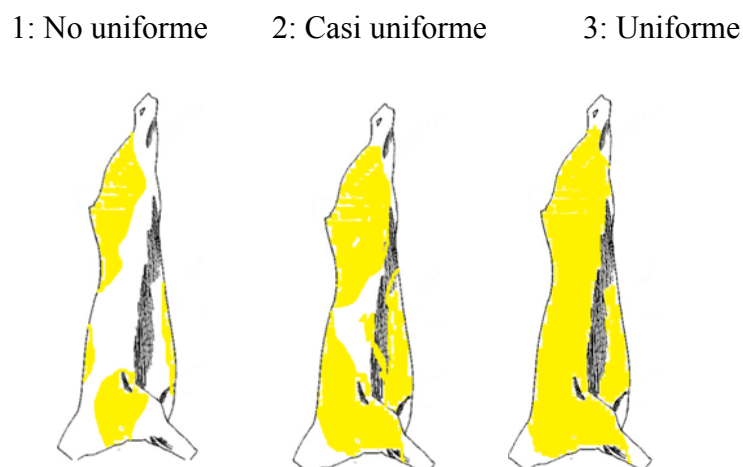


Figura 10. Evaluación y escala de la distribución de la grasa en la canal.

La evaluación de la conformación se realizó observando la vista lateral de la media canal derecha y en donde se identificó la curvatura del perfil de la pierna haciendo referencia al desarrollo de las masas musculares de acuerdo a lo estipulado en la NMX-FF-078-SCFI-2002 (Figura 11) utilizando la escala allí descrita (1: Perfil cóncavo – 3: Perfil convexo).





Figura 11. Evaluación de la conformación de la canal

Utilizando el sistema de clasificación del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) se obtuvo grado de marmoleo, porcentaje de grasa de riñonada, madurez fisiológica, grosor de la grasa y área del ojo de la chuleta. Se utilizó la ecuación de USDA (2005) para determinar el % cortes deshuesados, sin grasa =  $49.15 - 2.11 (\text{grasa ajustada, cm}) - 0.98 (\% \text{ grasa riñonada}) - 0.005 (\text{peso canal, kg}) + 0.19 (\text{área 12 costilla, cm}^2)$ .

### 5.3. Preparación de muestras

Una vez en el laboratorio, los lomos de la media canal izquierda de cada tratamiento (con y sin ClZi) se maduraron en seco y los de la media canal derecha en maduración húmeda.

El tratamiento de maduración en seco consistió en colocar la carne sin envasar sobre rejillas dentro de un madurador con un 50-55% de humedad y una temperatura de entre 2 y 4°C durante 21 días. Para el madurado húmedo, cada uno de los lomos se envasó al vacío y se mantuvo sobre rejillas dentro del mismo madurador bajo las mismas condiciones, modificando solo la humedad dentro del envase al 100%; En este tipo de maduración, cada día de muestreo, se retiró el envase del lomo para obtener la muestra correspondiente, envasando posteriormente el lomo sobrante.

Los lomos fueron identificados por tipo de maduración y tratamiento, se pesaron, identificaron y marcaron con los cortes (chuletas de 2.5 cm grosor) a realizar en cada día de maduración para la obtención de la muestra. Se realizaron 6 muestreos de cada tratamiento, en los días 0 (este en rastro a las 3 h post mortem), 1, 3, 7, 14 y 21 de maduración. Las muestras se sometieron a un análisis fisicoquímico el mismo día de cada muestreo además para determinar la actividad proteolítica y el perfil electroforético de las proteínas de alto

peso molecular, se obtuvo el día de cada muestreo, el extracto enzimático para proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas, los cuales se conservaron a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización, lo mismo con las muestras para microscopia electrónica de transmisión, todo esto en conjunto para evaluar los cambios en la carne durante la maduración.

## **5.4. Análisis Físicoquímicos**

### **5.4.1. pH**

Se realizó la medición de cada muestra por duplicado conforme a la técnica recomendada por la Asociación Oficial de Química Analítica (AOAC) (2007), utilizando un potenciómetro (HANNA) con electrodo de penetración directamente en la carne, ajustando el potenciómetro cada 10 mediciones con amortiguadores pH 4.0 y pH 7.0 (Guerrero et al., 2000).

### **5.4.2. Color ( $L^*a^*b^*$ )**

El color se midió acorde con la técnica recomendada por la Asociación Americana de Ciencia de la Carne (AMSA) (2012), empleando un colorímetro Hunter-Lab MiniScan (HunterLab Associates, Reston, VA, USA, con una apertura de 2.54cm, iluminante A, ángulo de  $10^{\circ}$ ). Cada determinación se reportó como el promedio de tres lecturas tomadas en la superficie de las muestras, mismas que permanecieron durante 20 minutos a temperatura ambiente, hasta alcanzar un temperatura de entre 8 a  $10^{\circ}\text{C}$  en su centro geométrico, permitiendo a su vez que se oxigenara la muestra lo suficiente para después obtener los valores  $L^*$  (luminosidad)  $a^*$  (componente rojo) y  $b^*$  (componente amarillo).

### **5.4.3. Pérdida de Peso por Cocción (PPC)**

Se realizó por diferencia del peso de la muestra antes y después de cocinarla y una vez que esta se enfrió. El cocinado se hizo según las recomendaciones del AMSA (2012), colocando la carne en una parrilla precalentada a una temperatura de  $200^{\circ}\text{C}$ , se monitoreó la temperatura de la muestra hasta alcanzar los  $35^{\circ}\text{C}$  con un termómetro con sonda de penetración (HANNA) y una vez alcanzada esta temperatura, se volteó la muestra para

llevarla hasta 70°C; después de lo cual, se retiró de la parrilla dejándola enfriar durante 20 minutos a temperatura ambiente y registrando el peso.

#### **5.4.4. Fuerza de Corte Warner Bratzler (FCWB)**

El procedimiento para evaluar la FCWB se realizó con el aparato de Warner-Bratzler, el cual indica la fuerza requerida para cortar un pedazo de carne expresado en kg. Después del cocinado (explicado anteriormente) se usó un sacabocados con el que se obtuvieron de 6 a 8 cilindros de 1.7 cm de diámetro, cortados en forma paralela a la dirección de las fibras musculares, según indica AMSA (2012). Se colocaron los cilindros en el aparato de Warner-Bratzler y se registraron las mediciones resultantes de cada corte de los cilindros; el resultado indica el grado de suavidad o dureza de la carne.

#### **5.4.5. Análisis Químico Proximal**

Se obtuvieron los porcentajes de humedad, grasa intramuscular, cenizas y Kcal de las muestras. Para la determinación de humedad en carne, se utilizó el método de la AOAC (950.46). Para determinar grasa se aplicó la técnica de extracción tipo Soxhlet (AOAC 991.36) y para la determinación de cenizas se utilizó la metodología AOAC (900.02).

### **5.5. Actividad proteolítica (calpaínas)**

#### **5.5.1. Obtención de extracto enzimático para calpaínas**

Primero, se tomó una muestra de 3g de carne y se homogenizó con un homogeneizador Biospec M1281-0 (Bartlesville, EUA) durante 1 min con 6 mL de la solución de extracción (sacarosa 0.25M, Tris 0.01M pH 7), se centrifugó durante 30 min a 2000 x g a 4°C en una centrifuga Beckman modelo J2-MI (Palo Alto, California) con un rotor JA-20, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a 4 °C para la posterior determinación de su actividad proteolítica.

### **5.5.2. Concentración y determinación de actividad de calpaínas**

Se utilizó un kit comercial (Calbiochem, EMD Millipore Corp., San Diego, CA 92121 USA) con el que se determinó concentración y actividad de calpaínas, a partir de extracto enzimático obtenido previamente de las muestras en fresco.

### **5.6. Determinación de proteínas miofibrilares de alto peso molecular**

Para la determinación de las proteínas miofibrilares en primer lugar se obtuvo el extracto enzimático, para ello se pesaron 5 g de carne y se homogeneizó durante un minuto con 6 ml de la solución de extracción (sacarosa 0.25M, Tris 0.01M pH 7), se centrifugó durante 30 min a 2000 x g a 4°C en una centrifuga Beckman modelo J2-MI (Palo Alto, California) con un rotor JA-20, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a 4 °C para la posterior determinación de su actividad proteolítica.

Las proteínas miofibrilares se extrajeron de acuerdo con la metodología reportada por Ngapo modificada por García-Barrientos (2007) en la cual, las muestras se homogeneizaron durante 2 minutos con hielo y agua desionizada en proporciones 1:1:1 (p/p/v). La mezcla anterior se mantuvo en agitación constante en baño con hielo durante 10 minutos, posteriormente se filtró dos veces utilizando gasa para eliminar el tejido conectivo insoluble. Al filtrado obtenido se le adicionó agua desionizada en proporción 1:1.5 (v/v), previamente enfriada a 4 °C. Posteriormente se sometió a agitación durante 15 minutos, las muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 15 minutos en una centrifuga Eppendorf (22331, Hamburgo, Alemania) a 4°C. El sobrenadante que corresponde a la fracción de proteínas sarcoplásmicas se desechó y el precipitado se re-suspendió en un buffer de fosfatos de sodio 50 mM pH 7, NaCl 0.6 M para la extracción de proteínas miofibrilares y posterior análisis por electroforesis.

### 5.6.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes

El perfil de proteínas miofibrilares de alto peso molecular se obtuvo mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) por el método de Watanabe & Devine (1995) modificado para electroforesis en gel de poliacrilamida, utilizando solo gel de separación al 5% acorde con Huff-lonergan et al. (1995). Cargando 24  $\mu\text{g}$  de proteína total por línea, se utilizó como estándar un Kit de calibración para proteínas de alto peso molecular para electroforesis, GE Healthcare UK Limited. Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, HP7 9NA, UK.

Se empleó una cámara de electroforesis Mini Protean III (Bio Rad, Richmond, California, EUA) con un voltaje constante de 150 V y una temperatura de 18°C. Los geles se fijaron y se tiñeron durante 1 h en una solución de azul de Coomasie al 0.2%, metanol al 40 % y ácido acético glacial al 10%. Posteriormente, los geles se destiñeron durante toda la noche con una solución de metanol al 40% de y ácido acético glacial al 10%. Finalmente, los geles se lavaron con agua desionizada hasta retirar la mezcla anterior y se capturaron en un foto-documentador Gel-Doc RT Biorad, (California, EUA), como se observa en la Figura 12.

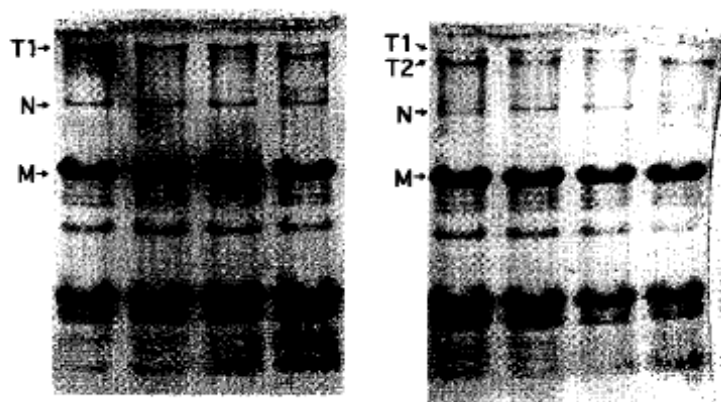


Figura 12. Proteínas miofibrilares. T1y T2: Titina; N: Nebulina

M: Miosina (Tomado de Huff-lonergan et al. 1995).

### **5.7. Análisis ultraestructural por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)**

Para observar el efecto de la maduración sobre la ultraestructura del músculo de bovino, se utilizó la técnica de microscopía electrónica de transmisión. Las muestras fijadas en solución de glutaraldehído al 2.5% y buffer de cacodilatos pH 7.4, se procesaron de acuerdo con la metodología descrita por Vázquez y Echeverría (2000). Para la preparación de las muestras se cortaron trozos pequeños de músculo, los cortes se realizaron longitudinalmente a las fibras musculares, con el fin de poder observarlas mejor, tratando que el corte fuera firme y de un solo paso, usando navajas de afeitar nuevas. A continuación se prepararon las muestras para observación y evaluación en microscopio electrónico de transmisión de la siguiente manera:

- Fijación primaria. Los cortes se sumergieron en glutaraldehído disuelto al 2.5% en buffer de cacodilatos pH 7.4, en viales de 2.5 ml que contenían la disolución de glutaraldehído durante 24 h. a 4 °C. Después se realizaron lavados de los cortes con un amortiguador de fosfatos 25 mM pH 7.4, hasta eliminar el olor a glutaraldehído.
- Fijación secundaria. Después de los lavados, los cortes se colocaron en una disolución de tetraóxido de osmio ( $OsO_4$ ) durante 2 h; y posteriormente se realizaron lavados utilizando etanol a las siguientes concentraciones 30, 40, 50, 70, 80, 90% y etanol absoluto, durante 20 min cada vez.
- Desecación. Terminados los lavados, las muestras se colocaron en microcápsulas de tipo poroso, se etiquetaron y se pusieron en contacto con etanol absoluto. Las muestras secas se almacenaron en un desecador para evitar su rehidratación por la humedad del medio ambiente.
- Inclusión. Los cortes se pre-incluyeron en resina epóxica/etanol al 50/50 durante una semana a temperatura ambiente, para después ponerlos en viales de 1 mL con resina al 100% y mantenerlos 24 h a 60°C en un horno hasta tener las muestras solidificadas.

- Cortes semifinos y finos. Una vez sólida la resina con la muestra, se realizaron los cortes semifinos para su visto bueno al microscopio óptico y posteriormente obtener los cortes finos.
- Contraste final. Se realizó el contraste con acetato de uranilo, sobre las microrejillas previo a la observación en el microscopio electrónico de transmisión.

### **5.8. Análisis estadísticos**

Se calcularon los estadísticos descriptivos (medias, desviaciones estándar y coeficientes de variación generales) para cada variable de respuesta. Los datos de pH, color, FCWB, PCC y concentración y actividad de calpaínas se procesaron mediante análisis de varianza múltiple, teniendo en el modelo los efectos principales del modificador metabólico, el tipo y periodo de maduración y sus respectivas interacciones. Cuando se detectaron efectos significativos, las medias se separaron usando la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher (Lentner y Bishop, 1986).

## **6. Resultados**

### **6.1. Efecto del Clorhidrato de Zilpaterol (ClZi) sobre la ganancia de peso durante la finalización**

Los datos siguientes se obtuvieron solo para confirmar el uso y adecuada administración del ClZi durante la etapa de finalización en los dos grupos de animales del estudio, por lo cual no se hace ninguna otra evaluación respecto a la ganancia de peso, el uso o no de ClZi u otro parámetro productivo. Como resultado de la administración de ClZi durante los últimos 30 días (NOM-EM-015-ZOO-2002), en la alimentación de los animales, se obtuvo una ganancia diaria de peso de 300 gramos, diferencia no significativa ( $P < 0.05$ ) con 2.41 kg ( $\pm 0.59$ ) vs 2.11 kg ( $\pm 0.59$ ), en los grupos con y sin ClZi respectivamente, coincidente con los estudios realizados por Garces (1988), Claus (2010) e Intervet (2014).

### 6.1.1. Efecto del ClZi sobre las canales y la carne a las 24 h post mortem

En el Cuadro 2 se muestran las medias y errores estándar de las características medidas en las canales a las 24 h después de la matanza, utilizando tanto la evaluación de USDA como la Mexicana. Se encontró que ninguna de las características evaluadas fue diferente entre los animales con y sin ClZi. Utilizando la evaluación de USDA, las canales tuvieron un Grado de calidad Standard, acorde con la calidad observada en la mayoría de las canales producidas en México principalmente por el tipo racial y las condiciones de manejo de los animales; además se obtuvo un Grado de Rendimiento de 1. Es decir, se obtuvieron canales con alto rendimiento cárnico. Además con la evaluación mexicana, se describen las canales con una conformación media, de poca cobertura grasa y un tono oscuro de carne.

Cuadro 2. Características de las canales, medias y error estándar (EE).

Variables	Sin ClZi	Con ClZi	Error Estándar
<b>Alto de giba</b>	15.67	14.70	1.60
<b>Grado Calidad USDA</b>	Standard	Standard	NA
Madurez	A	A	NA
Marmoleo	Nada	Casi Nada	NA
<b>Grado Rendimiento USDA</b>	1	1	NA
Porcentaje real de carne	(59.83%)	(61.17%)	
Peso canal caliente, kg	314.67	314.10	7.69
Grasa riñonada, GC %	1.58	1.75	0.16
Área de la chuleta, cm <sup>2</sup>	77.21	85.59	4.11
Grosor Grasa, cm	0.38	0.37	0.11
Grosor grasa ajustada, cm	0.43	0.42	0.07



Variables	Sin ClZi	Con ClZi	Error Estándar
<b>Evaluación NOM-078</b>			
Perfil de la pierna	2.66	2.16	0.4714
Distribución grasa	2.66	2.33	0.4714
Color carne	1.33	1.50	0.4714
Textura	3.50	3.80	0.5
Firmeza	3.30	3.30	0.9428

No se encontraron diferencias significativas entre medias.

## 6.2. Composición y características de la carne a las 24 h post mortem

La carne obtenida de los animales experimentales fue analizada 24 h post mortem. Los Cuadros 3 y 4 presentan los resultados de los análisis realizados. La composición de la carne no fue alterada por la utilización del ClZi, ni siquiera para el porcentaje de grasa intramuscular. Igualmente, el ClZi no tuvo efecto en la fuerza de corte de la carne, ni en la pérdida por cocción, pH o parámetros de color de la misma, razón por la cual no se le realizó ningún otro análisis estadístico a dichos datos.

Cuadro 3. Medias aritméticas y EE por tratamiento de las variables de composición química de la carne.

	Proteínas %	Humedad %	Grasa Intramuscular %	Cenizas %	Energía (Mcal)
Con ClZi	21.46±0.59	67.96±1.02	2.50±0.46	1.01±0.04	6.96±0.19
Sin ClZi	22.67±0.59	67.45±1.0	2.67±0.46	1.05±0.04	6.51±0.19

No se encontraron diferencias significativas entre medias.

Cuadro 4. Medias aritméticas y EE por tratamiento de FCWB, pérdida por cocinado, pH y color de la carne a las 24 horas post mortem.

	Fuerza de corte, kg	Pérdida por cocción, %	pH	Color		
				L*	a*	b*
Con ClZi	7.00±0.22	31.93±1.36	5.49±0.02	42.57±0.93	17.84±0.59	16.56±0.38
Sin ClZi	7.29±0.22	28.26±1.36	5.52±0.02	41.20±1.36	17.32±0.59	16.17±0.38

No se encontraron diferencias significativas entre medias.

### 6.3. Efecto de la maduración sobre características fisicoquímicas de la carne

Al no presentar ninguna diferencia significativa entre las variables uso o no de ClZi y tipo de maduración, solo se tomaron en cuenta los días de maduración para compararlos con los anteriores, debido a que presentaron interacción entre ellos; así mismo, no hubo diferencia entre tratamientos por tipo de maduración y uso o no de ClZi.

#### 6.3.1. Fuerza de corte (FCWB)

La carne tuvo un descenso de la FCWB de 2.94 kg a lo largo de la maduración (Figura 13). Se observó que del día 1 al 3 hay un descenso significativo, que luego se mantiene hasta el día 21 donde se aprecia otra disminución significativa.

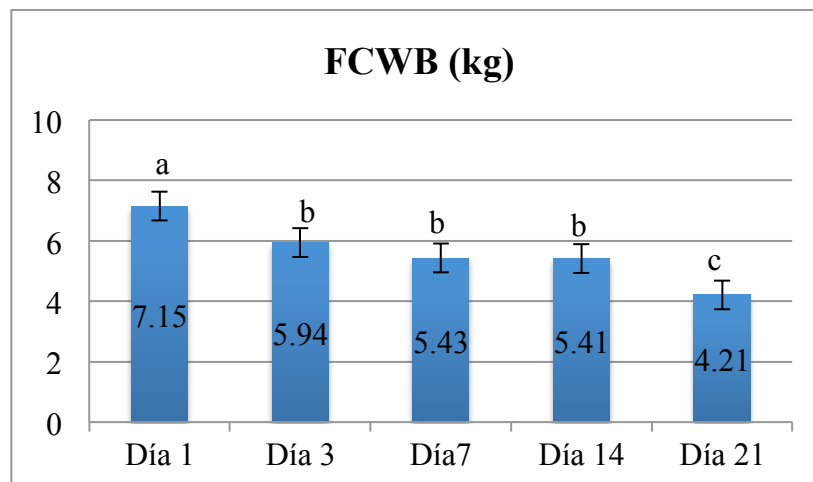
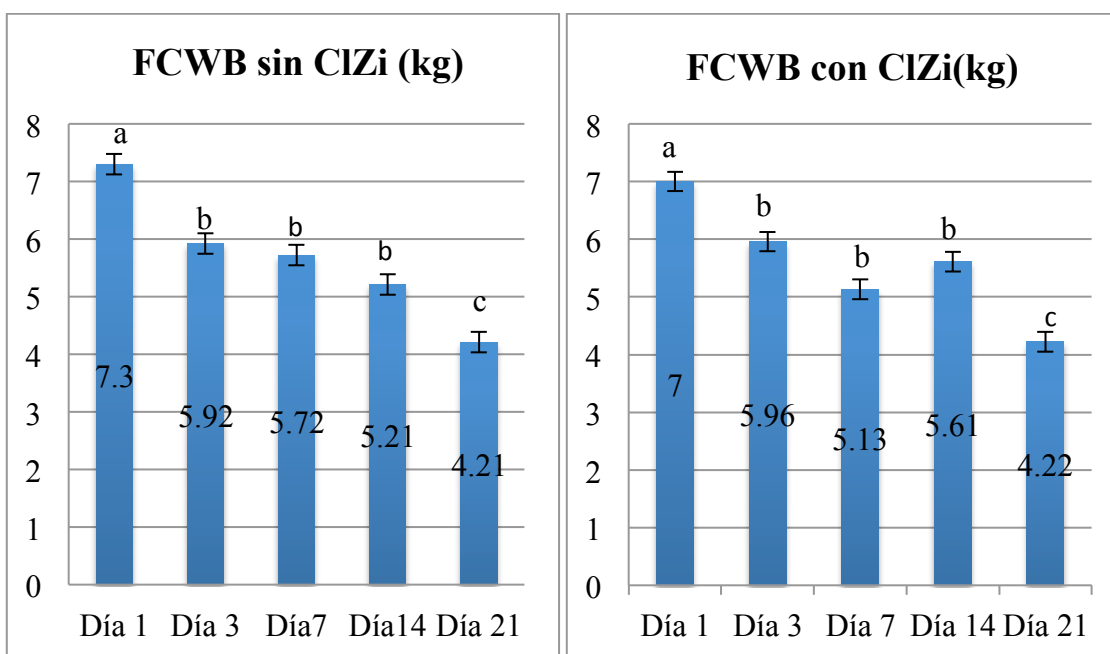


Figura 13. Fuerza de corte de la carne según el día de maduración.

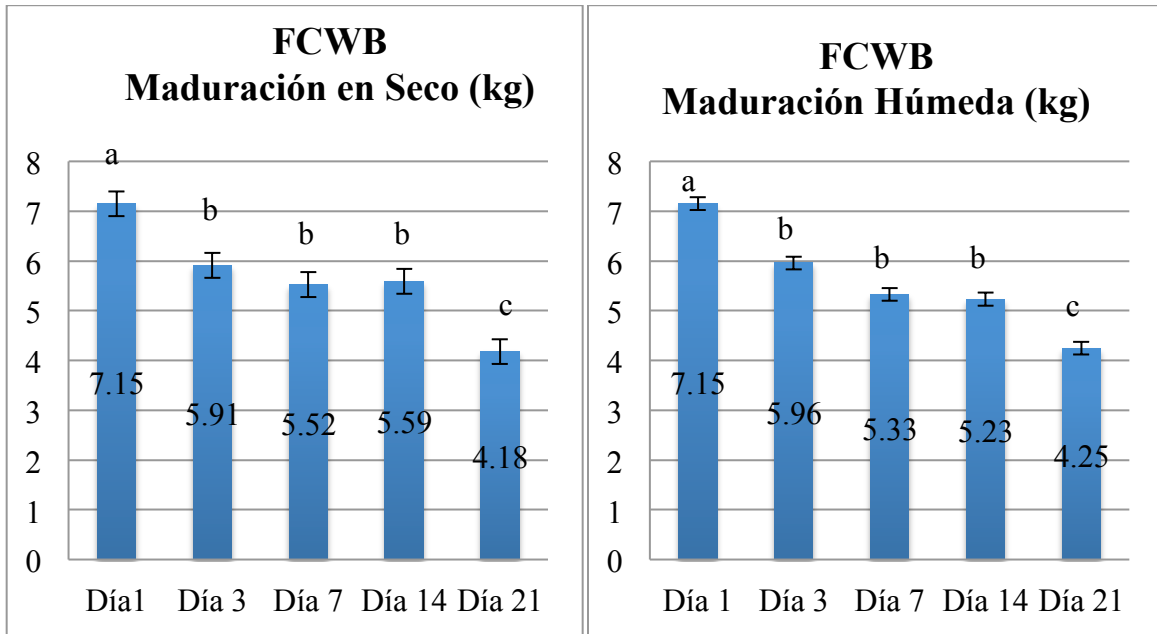
<sup>a,b,c</sup> Literales distintos denotan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).

La Figura 13 muestra que del día 1 al 3 la FCWB disminuyó 1.21 kg, lo que representa un 41.2 % de la suavidad resultante de la maduración; del día 3 al 14 solo 18 % (0.53 kg) y del día 14 al 21 otro descenso de 41 % (1.2 kg), teniendo la carne madurada una fuerza de corte final de 4.21 kg. La diferencia significativa obtenida corresponde al aumento en la suavidad del día 1 al 3 y del 14 al 21, mostrando la misma tendencia y diferencia indistintamente en tratamiento sin y con ClZi (Figuras 14 y 15) y en maduración seca y húmeda (Figuras 16 y 17).



Figuras 14 y 15. Fuerza de corte por día de maduración sin y con modificador del metabolismo respectivamente. <sup>a,b,c</sup>Literales distintos denotan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).

Analizando las muestras sin y con ClZi y su comportamiento a lo largo de la maduración (Figuras 14 y 15) se puede observar que las muestras sin ClZi tienen el mismo comportamiento al mostrado en la Figura 13, sin embargo, con ClZi mostró la FCWB del día 1 al 3, un descenso de 40.6 % pero después del día 7 la FCWB aumenta significativamente hasta estar en el mismo nivel que el día 3, para después presentar otra disminución significativa al día 21.



Figuras 16 y 17. Fuerza de corte de la carne por día y tipo de maduración. <sup>a,b,c</sup> Literales distintos denotan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).

El análisis de la FCWB según el día y el tipo de maduración se presenta en las Figuras 16 y 17, respectivamente. Las maduraciones en seco y en húmedo provocaron similares comportamientos en la bajada de la fuerza de corte, con disminuciones de alrededor del 40 % del día 1 al 3, para luego tener pequeñas disminuciones hasta el día 21, dejando la fuerza de corte al final alrededor de 4.2 kg (Figuras 15 y 16). Lo que representa una disminución de más del 40% en la FCWB, una vez finalizada la maduración por 21 días, independientemente del sistema de madurado y del uso o no de un modificador metabólico.

### 6.3.2. Pérdida por cocción

La pérdida por cocción de las muestras de carne con diferente tiempo de la maduración experimentó pocos cambios (Figura 18) a excepción de la disminución observada entre el día 1 y 3 que fue del 68%, siendo este cambio el único significativo, ya que a pesar de que el día 7 disminuyó un 32% más, al día 21 presentó un aumento de 14.3%, por lo que no tiene significancia.

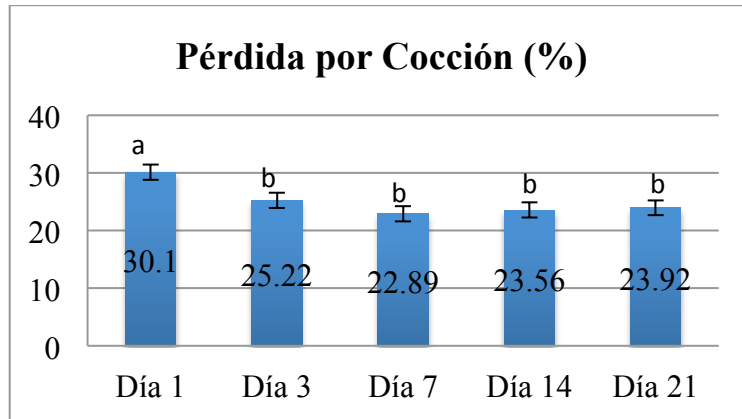


Figura 18. Pérdida de peso durante el cocinado en carne con diferentes días de maduración. <sup>a,b</sup> Literales distintos denotan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).

La única diferencia significativa se presentó entre el día 1 y el 3, manteniendo una dinámica normal durante toda la maduración.

### 6.3.3. pH

Se observa un descenso normal dentro de los primeros tres días post mortem, para mantener una dinámica estable con tendencia a disminuir hasta llegado el día 21 de maduración (Figura 19).

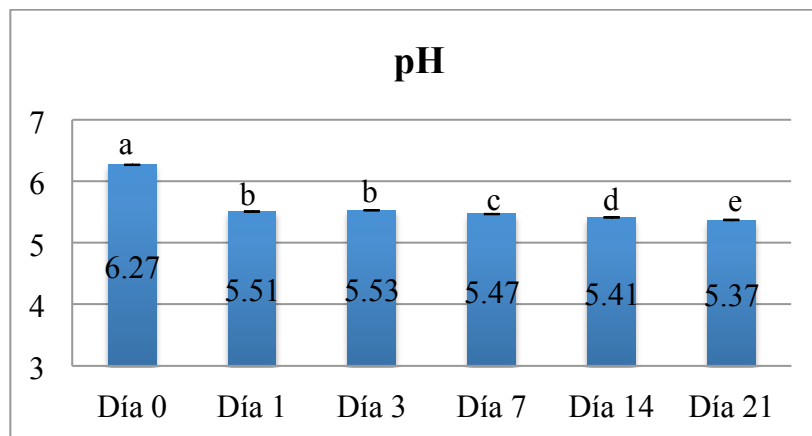


Figura 19. Comportamiento del pH en carne con diferentes períodos de maduración. <sup>a,b,c,d,e</sup> Literales distintos denotan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).

La diferencia estadística resultante esta dentro de lo esperado, al mantener una tendencia a la baja durante todo el proceso de madurado de la carne, sin exceder los parámetros normales para el tipo de carne y el tiempo de conservación.

#### 6.3.4. Color de la carne (Lab\*)

En el Cuadro 5 se presentan los datos de color de la carne, agrupados según el uso o no del modificador metabólico, el tipo y tiempo de maduración. Se observa que la carne con ClZi es más luminosa y tiene valores de amarillo más altos que la carne sin ClZi. Por otro lado, el tipo de maduración sólo afecto al valor b\*, siendo más alto en las muestras sometidas a maduración húmeda.

Cuadro 5. Medias aritméticas y EE de las mediciones espectrofotocolorimétricas del color de la carne producida con el uso o no de un modificador metabólico y madurada en un sistema seco o húmedo.

	Valores de	L*	a*	b*
<b>Modificador metabólico</b>	Con ClZi	44.28±0.47 <sup>a</sup>	18.40±0.21 <sup>a</sup>	17.47±0.18 <sup>a</sup>
	Sin ClZi	42.10±0.47 <sup>b</sup>	18.05±0.21 <sup>a</sup>	16.67±0.18 <sup>b</sup>
<b>Tipo Maduración</b>	Seca	43.51±0.48 <sup>a</sup>	18.18±0.23 <sup>a</sup>	17.10±0.16 <sup>a</sup>
	Húmeda	44.02±0.48 <sup>a</sup>	18.58±0.23 <sup>a</sup>	17.64±0.16 <sup>b</sup>

Los valores que se presentan (media y EE) corresponden al promedio de seis mediciones realizadas entre 0 y 21 días. <sup>a,b</sup>Literales dentro cada una de los factores (modificador metabólico y tipo de maduración) denotan diferencia estadística significativa.

En cuanto a la medición del color, se obtuvo una diferencia entre uso y no uso de modificador metabólico para el valor de L\* y b\*, observándose una mayor luminosidad y un tono amarillo más intenso en las muestras con ClZi. Por último, los días de maduración

provocaron que las muestras de carne incrementaran su luminosidad ( $L^*$ ) y el color rojo ( $a^*$ ) (Figuras 19 a 21).

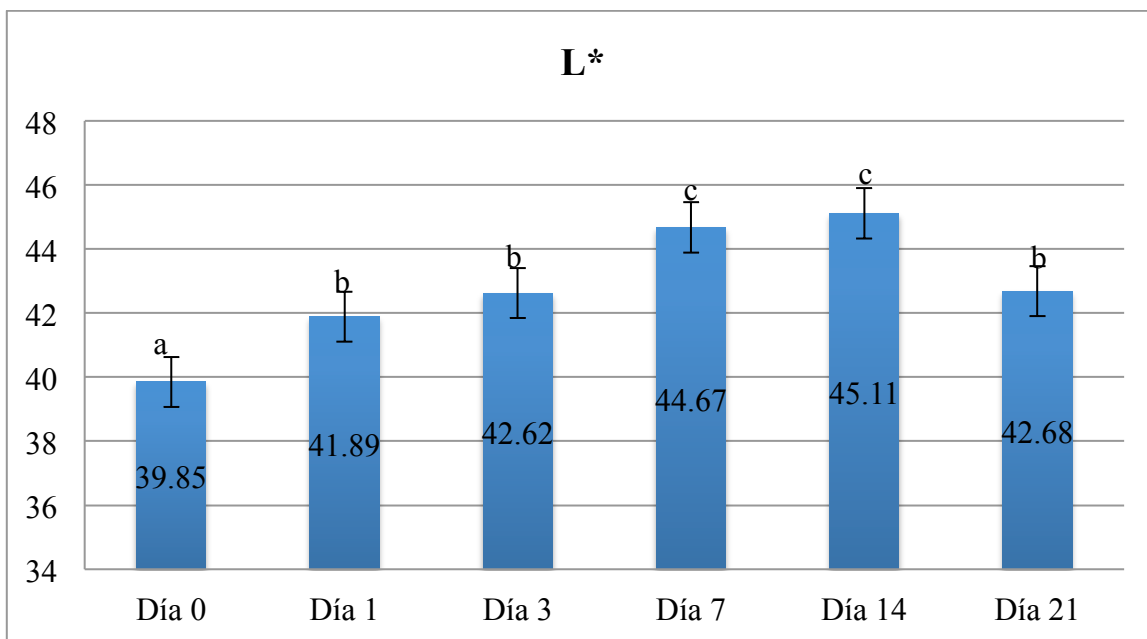


Figura 20. Valores de  $L^*$  a través de los días de maduración. <sup>a,b,c</sup> Literales distintos denotan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).

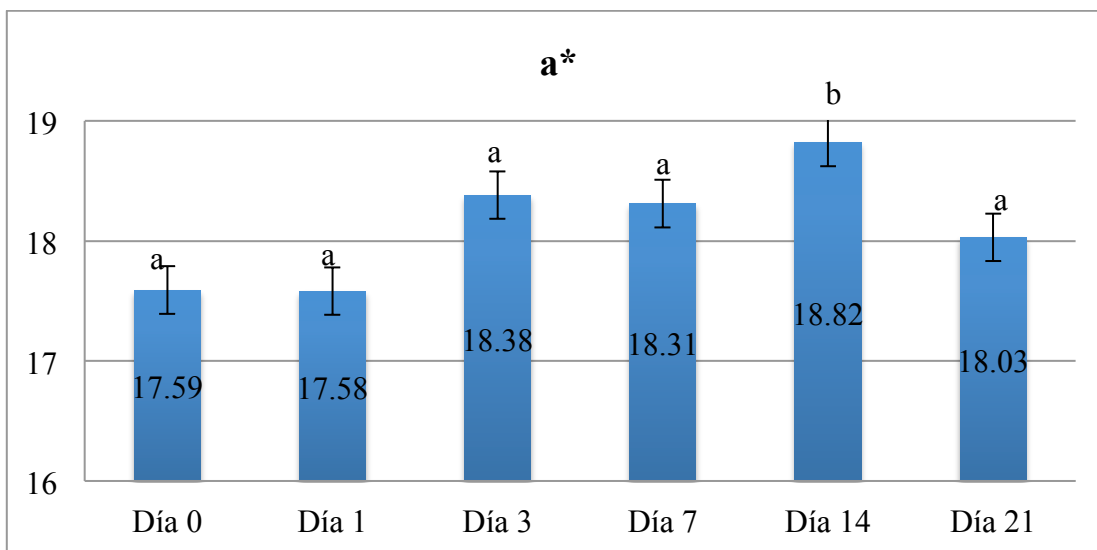


Figura 21. Valores de  $a^*$  a través de los días de maduración. <sup>a,b</sup> Literales distintos denotan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).

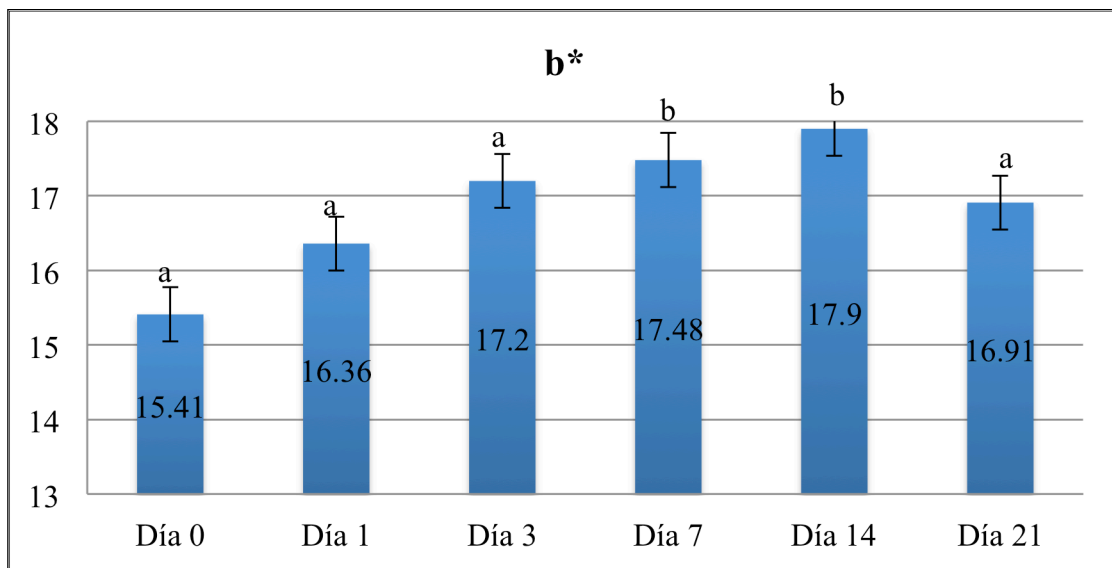


Figura 22. Valores de b\* a través de los días de maduración. <sup>a,b</sup> Literales distintos denotan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).

#### 6.4. Efecto del tratamiento con ClZi, los días y el tipo de maduración sobre la concentración y la actividad de calpaínas en la carne.

##### 6.4.1. Concentración de calpaínas

El Cuadro 6 muestra que la administración de ClZi en los animales experimentales y el tipo de maduración no provocaron cambios en la concentración de calpaínas.

Cuadro 6. Medias aritméticas y EE de la concentración de calpaínas durante la maduración, en carne de animales tratados o no con ClZi y expuesta a maduración seca o húmeda

		Concentración de calpaínas ( $\mu\text{g/ml}$ )
Modificador metabólico	Sin ClZi (30)	1.98 $\pm$ 0.35
	Con ClZi (31)	2.04 $\pm$ 0.35
Tipo Maduración (días 0 y 1 no se evalúan)	Seca (20)	1.48 $\pm$ 0.18
	Húmeda (20)	1.39 $\pm$ 0.18

No se encontraron diferencias significativas entre medias.



Los días de maduración fueron los únicos que influyeron sobre la concentración de calpaínas, registrándose la mayor cantidad de estas y la única diferencia significativa, durante las primeras 48 h post mortem siguiendo sin cambios importantes entre el día 3 y 14 para luego presentar un ligero aumento hacia el día 21 (Figura 23), lo cual coincide con el comportamiento de la suavidad representada por la FCWB observada en la Figura 13.

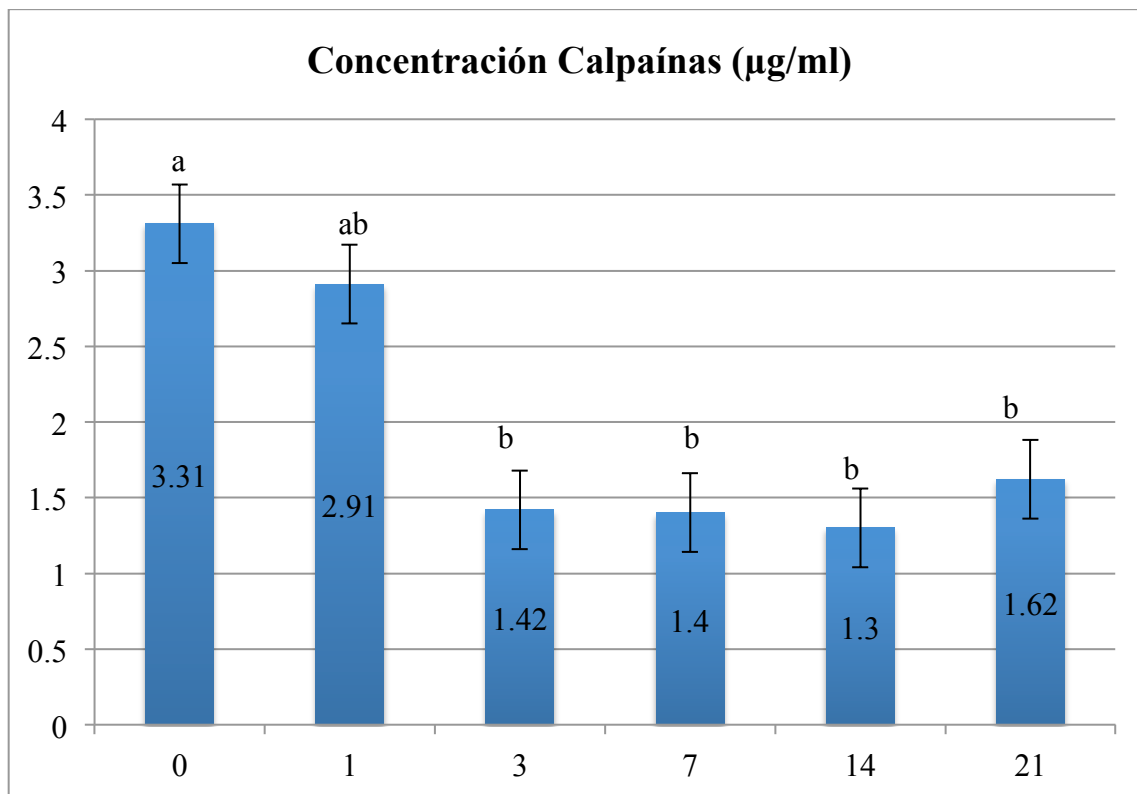


Figura 23. Medias y EE de la concentración de calpaínas según días de maduración.

<sup>a,b</sup>Literales distintos denotan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).

#### 6.4.2. Actividad de calpaínas

Al igual que los datos de concentración presentados anteriormente, en los resultados de actividad de calpaínas no hubo diferencia significativa tanto por la administración de ClZi en los animales experimentales, ni por el método de maduración empleado.

En el Cuadro 7 se presentan los valores de actividad de calpaínas obtenidos en la carne, durante la maduración seca y húmeda y con administración o no de ClZi.

Cuadro 7. Medias aritméticas y EE de la actividad de calpaínas durante la maduración de la carne según el modificador metabólico y el tipo de maduración.

		Actividad de calpaínas RFU/mg/min
Modificador metabólico	Sin ClZi	13.25±2.28
	Con ClZi	13.84±2.25
Tipo Maduración	Seca	10.50±1.2
	Húmeda	9.54±1.27

No se encontraron diferencias significativas entre medias.

La Figura 24 muestra como durante de las primeras 36 h post mortem existe una mayor actividad de calpaínas, para después disminuir y mantenerse estable hasta aumentar ligeramente hacia el día 21 de maduración.

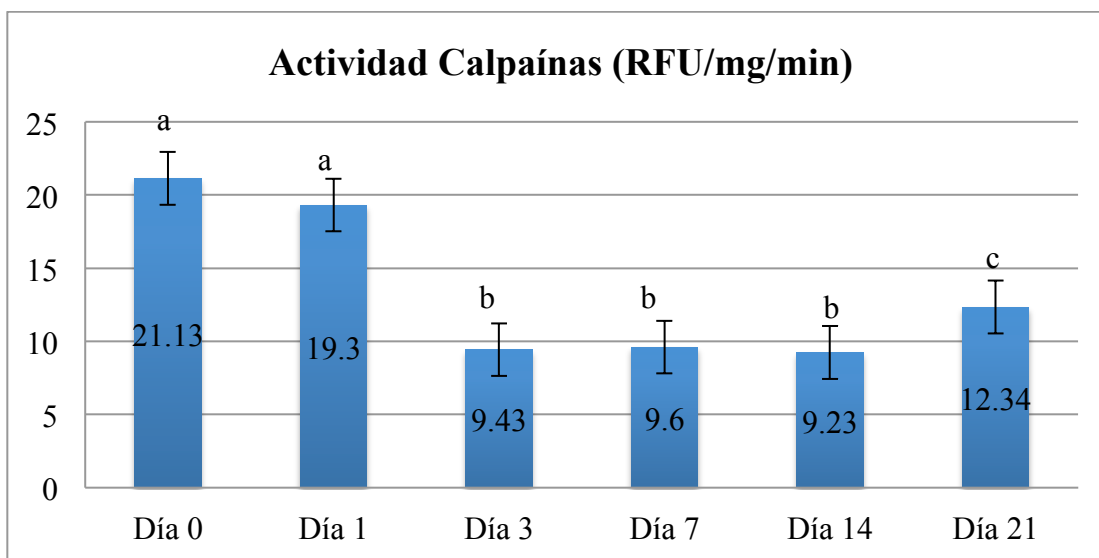


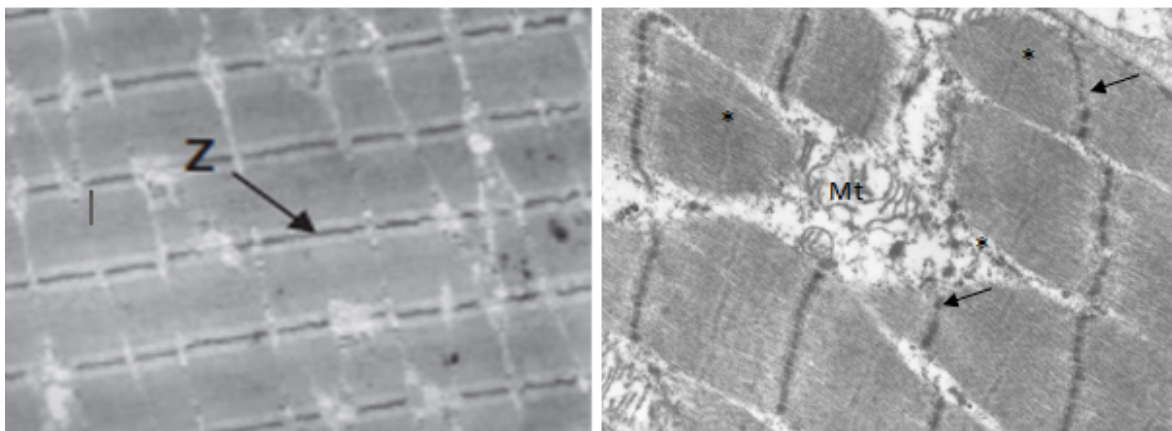
Figura 24. Medias y EE de la actividad de calpaínas según días de maduración.

<sup>a,b,c</sup> Literales distintos denotan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).

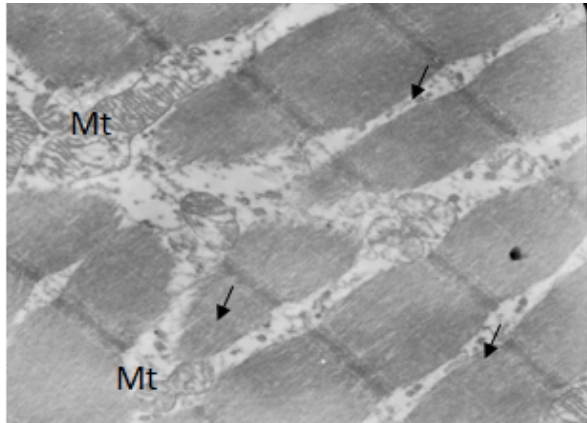
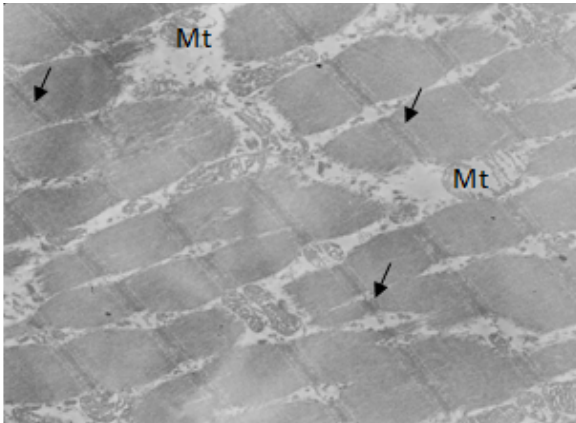
En lo que respecta a los días de maduración, la actividad varía de la misma manera que la concentración y que la FCWB. Se muestra una actividad elevada durante las primeras 48 h post mortem, solo disminuía entre los días 3 a 14, incrementándose una vez más hacia el día 21 de maduración, lo que contribuye a explicar la variación en la suavidad observada durante toda la maduración hasta el día 21.

### **6.5. Cambios en la ultraestructura del músculo durante el proceso de la maduración.**

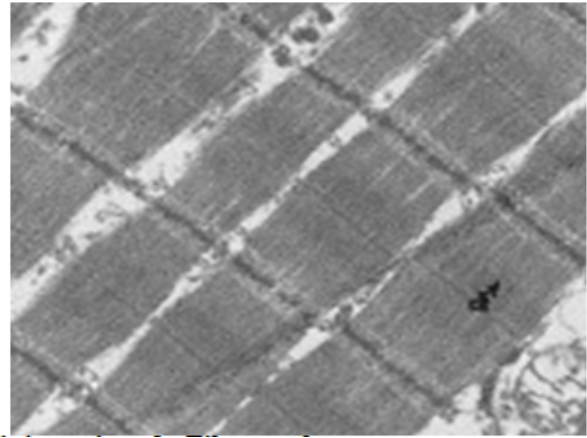
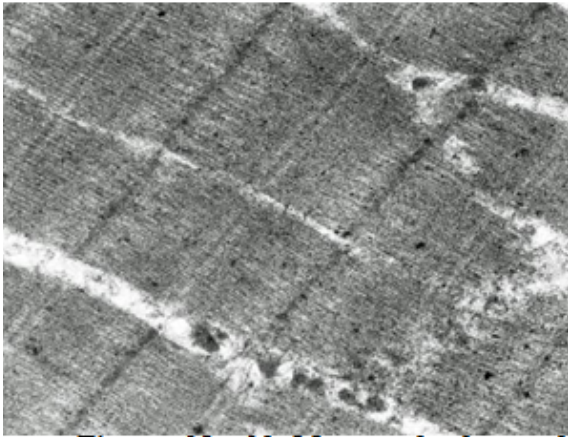
A continuación se presentan microfotografías tomadas a la carne con y sin ClZi durante los diversos tiempos de maduración. Las microfotografías han sido seleccionadas para mostrar el tejido muscular y sus cambios a lo largo de la maduración. Las Figuras 24 a 27 muestran imágenes de carne obtenida a las 3 horas (Día 0) de muerto el animal. En las imágenes se observan los discos Z (flechas) radiopacos íntegros y alineados, se detalla la presencia de una mitocondria intacta (Mt), entre las fibras musculares (derecha), también se observan gránulos electrodensos que corresponden a glucógeno (\*). Hay que destacar, que la carne sin ClZi presenta unos discos Z un tanto más radiolucidos (flechas), siendo la misma tinción para todas las muestras. Para la interpretación de las imágenes de microscopía se utilizó de referencia el trabajo de Taylor *et al.* (1995).



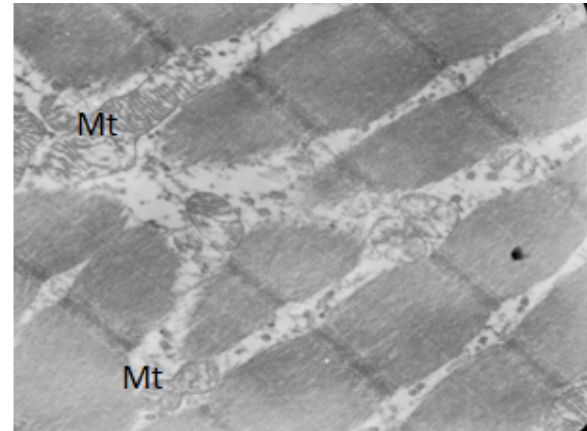
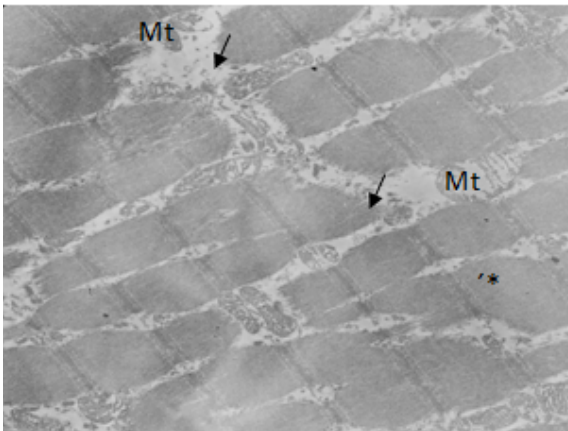
Figuras 25 y 26. Muestra día 0 (3 h post mortem) con administración de ClZi.



Figuras 27 y 28. Muestra día 0 (3 h post mortem) sin administración de CIzi.



Figuras 29 y 30. Muestra día 3 con administración de CIzi.



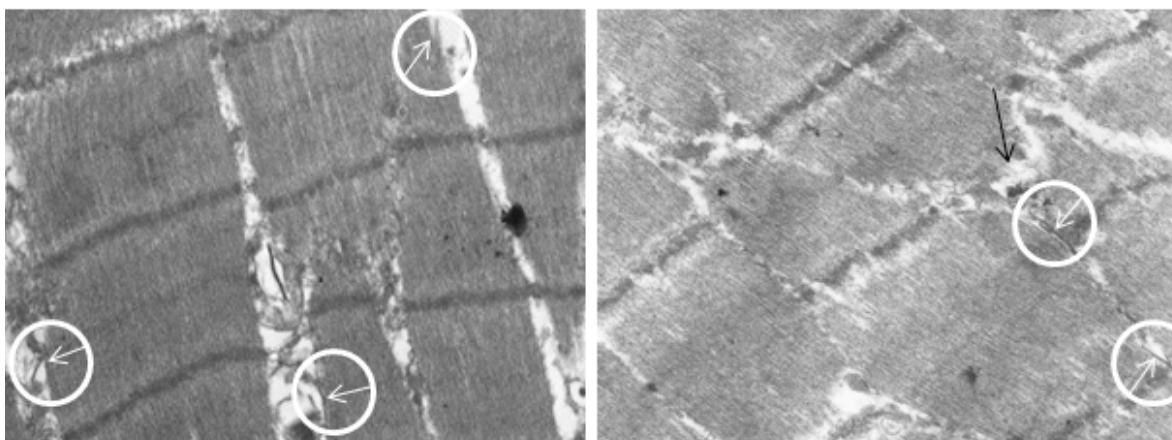
Figuras 31 y 32. Muestra día 3 sin administración de CIzi.

A los tres días de maduración (Figuras 29 a 32) se observan los discos Z aun intactos, pero con una ligera separación lateral de los sarcómeros, lo que podría indicar el inicio de la degradación de costámeros.

A los siete días de maduración (Figuras 33-36), en las muestras con zilpaterol se observan los discos Z radiopacos y aparentemente alineados (Figura 33), con más detalle (Figura 34) se comienza a observar un ligero desarreglo en la alineación de los discos Z (flechas negras), así como también se distinguen remanentes de estructuras radiodensas a los costados de algunos sarcómeros (flecha blanca) correspondientes a los costámeros (Taylor *et al.*, 1995).



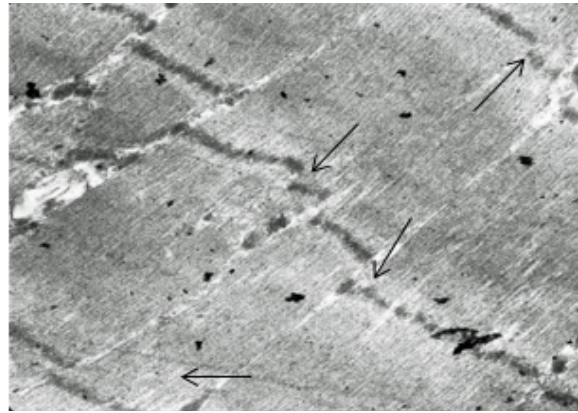
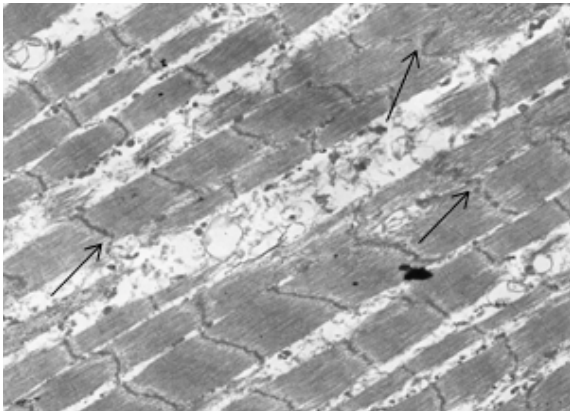
Figuras 33 y 34. Muestra día 7 con administración de ClZi.



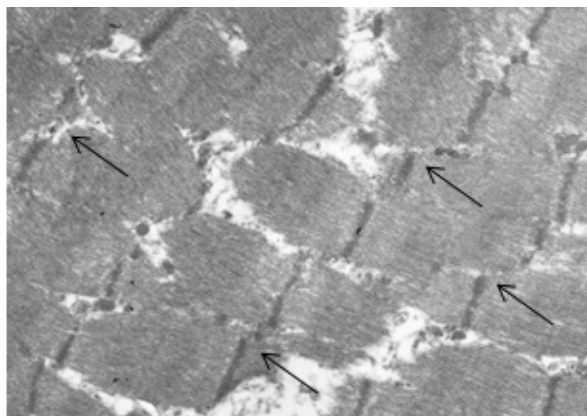
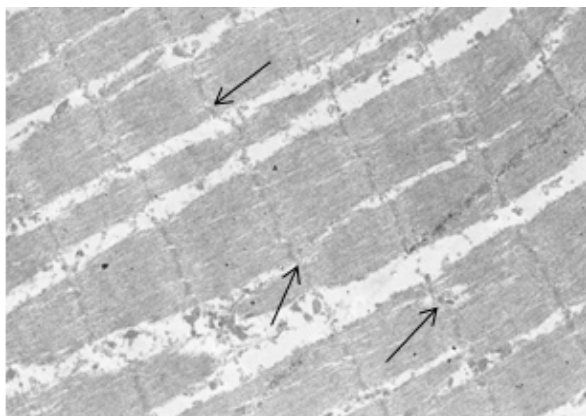
Figuras 35 y 36. Muestra día 7 sin administración de ClZi.

A los siete días de maduración en muestras sin zilpaterol (Figuras 35 y 36) se comienza a notar una ligera alteración en los discos Z (derecha), la flecha (derecha) señala el deslizamiento de los discos Z comenzando con la degradación de la estructura de la fibra muscular, aquí también se observan restos de costámeros (flechas blancas).





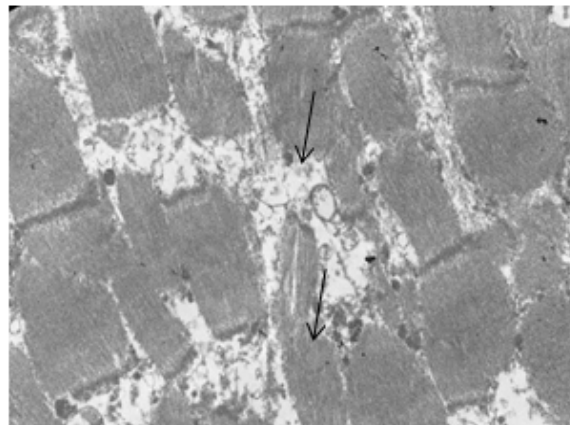
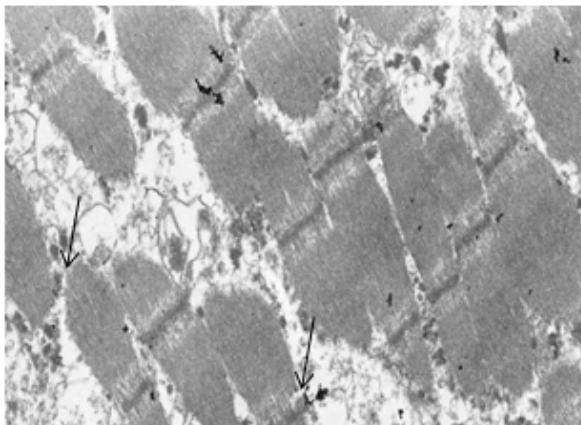
Figuras 37 y 38. Muestra día 14 con administración de ClZi.



Figuras 39 y 40. Muestra día 14 sin administración de ClZi.

A los 14 días de maduración (Figuras 37-40) es notoria la pérdida de la estructura del sarcómero y el desarreglo de los discos Z, con el deslizamiento y ruptura estos (flecha).

Por último, al 21 día se observa la clara pérdida de alineamiento de los discos Z (Figuras 41-44), se observa la ruptura y fragmentación de los sarcómeros (flechas) en la línea  $N_2$ .



Figuras 41 y 42. Muestra día 21 con administración de ClZi.



Al cotejar los datos de FCWB y la intensidad de las bandas en los geles (Cuadro 8), se puede notar una relación entre la disminución de intensidad de las bandas y el aumento de la suavidad representada por los valores de FCWB obtenidos durante el periodo que se maduró la carne, cotejando esto con los resultados obtenidos de concentración y actividad de calpaínas y los cambios en la ultraestructura, sugieren aún mas la relación entre el proceso de maduración y el aumento de la suavidad de la carne.

Cuadro 8. Medias y EE de valores de FCWB en carne utilizada también para determinación de proteínas miofibrilares mediante Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

Número de línea	1	2	3	4	5	6
Valor de FCWB (kg)	7.33±0.22 <sup>a</sup>	7.15±0.22 <sup>a</sup>	5.94±0.22 <sup>b</sup>	5.43±0.22 <sup>b</sup>	5.41±0.22 <sup>b</sup>	4.21±0.22 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> Literales distintos denotan diferencia estadística significativa (P<0.05).

La Figura 46 muestra un gel de poliacrilamida de muestras de carne sin zilpaterol durante los días de maduración. En este caso se observan las bandas de las mismas proteínas de la figura anterior, con un patrón similar de desvanecimiento de éstas conforme aumentan los días de maduración, sin notarse una separación clara de las dos fracciones de la Titina.

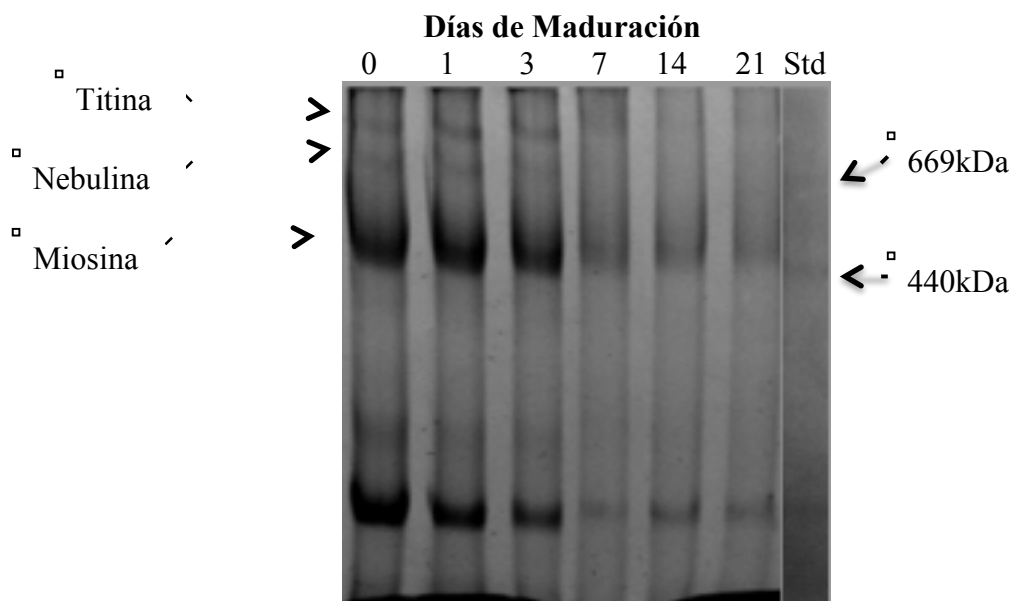


Figura 46. SDS-PAGE de carne sin ClZi a distintos días de maduración.



## 7. DISCUSIÓN

El proceso de maduración de la carne es de los más utilizados e importantes para mejorar la suavidad de la carne de res, además de intensificar ciertas características organolépticas como aroma y sabor. Muchos investigadores como Belew, 2003; Molina, 2005; Rhee, Wheeler, Shackelford, Koohmaraie, 2004; Von Seggern, Calkins, Johnson, Brickler, Gwartney, 2005; Yadata, Werner, Tibbo, Wollny, Wicke, 2009, han estudiado el proceso de aumento de la suavidad en diversos músculos de bovino a diferentes periodos de maduración post-mortem. Sin embargo, la mayoría de los estudios se han hecho sobre animales *Bos Taurus*, ya sean machos castrados o hembras mientras muy pocos estudios se han hecho en México con cruza *Bos indicus* en machos jóvenes sin castrar, los cuales son la principal fuente de carne bovina en México (Méndez, 2009). Los estudios realizados sobre cruza comerciales con diferentes porcentajes de *Bos indicus* en machos jóvenes sin castrar (Huerta-Leidenz, 2007; Hildrum *et al.*, 2009; Méndez *et al.*, 2009; Chávez *et al.*, 2012 y Rubio *et al.*, 2014) han mostrado que la carne de estos animales es dura (valores de FCWB > 4.6kg).

Los animales seleccionados para el estudio fueron machos jóvenes sin castrar cruza de *B. taurus* y *B. indicus*, típicos animales de abasto comercial en México, tal como los describieron Méndez *et al.* (2009). Ellos encontraron que el 87.2% de las canales mexicanas tienen alturas de giba superiores a 7 cm, lo cual significa un alto porcentaje de *B. indicus* en la cruce. Boleman *et al.* (1998) categorizan a los animales con genotipo *Bos indicus* a aquellos que tienen una giba igual o mayor a 10 cm. Jiménez (2014) mostró que alturas de gibas > 14 cm permiten considerar que los animales son cebuínos puros. Un estudio previo con este tipo de carne (Rubio *et al.*, 2014) mostró que la carne mexicana no se suaviza después de los 7 días de maduración.

Una causa de esto, podría ser que en México, los animales destinados para abasto de carne son principalmente machos enteros, aunado a la muy difundida utilización de modificadores metabólicos  $\beta$  adrenérgicos tipo 2 en la dieta de los animales, de hecho, la mayoría del ganado en corral que se destina para rastro TIF, es finalizado con ClZi, debido en gran parte a la demanda de carne magra y a la búsqueda de un mayor rendimiento cárnico, aunque esto vaya en detrimento muchas veces de la calidad, en este caso principalmente de la suavidad, debido al efecto análogo de estos modificadores con las

calpastinas sobre el músculo (Koohmaraie *et al.*, 1991). Por lo anterior, se decidió investigar si dicho modificador metabólico podría ser el causante de la dificultad que la carne mexicana tiene para suavizarse durante la maduración, razón por la cual se trabajó carne con y sin ClZi. Para comenzar, además de la GDP, no se midió ninguna otra variable de comportamiento productivo de los animales durante la engorda y no se encontraron diferencias significativas entre alguna de las características evaluadas en la canal de los animales con y sin ClZi. La evaluación de las canales indicó que tienen alto rendimiento cárnico, clasificándolos como los típicos animales de abasto comercial en México (Méndez *et al.*, 2009). Rubio *et al.* (2007) reportaron la madurez de las canales mexicanas al valor equivalente a USDA A<sup>50</sup> que se aproxima a los 24 meses de edad. Este hecho es atribuido a la demanda de carne baja en grasa en la población de las regiones sureste y centro del país principalmente (Núñez *et al.*, 2005) ya que los animales depositan más grasa conforme la edad aumenta y son alimentados con granos (Maltin *et al.*, 1998). Por otro lado, el área de ojo de chuleta, aunque sin diferencia significativa entre tratamientos, de los animales a los que se les suministró el ClZi fue en promedio de casi 10 cm<sup>2</sup> mayor que el de chuleta de los que no tomaron el modificador. Al respecto Méndez *et al.*, (2009) en un muestreo realizado en México, reportaron una media de 74.6±11.0 cm<sup>2</sup> mientras que años después, Jiménez (2013) comprobó cómo el promedio del área de la chuleta había aumentado a 84.99±10.23 cm<sup>2</sup>. El marmoleo de la carne se encontró entre los rangos de trazas a ligero (valores entre 1 y 2), en un estudio Méndez *et al.* (2009) encontraron que el 93.6% de las canales mexicanas poseen valores de marmoleo de ligero y trazas.

Según la clasificación mexicana, el color de la carne en este estudio tiende al rojo oscuro ya que el valor promedio se acerca a 1, correspondiente a esta coloración. La firmeza de la carne cruda en la canal tiende a ser suave a la presión digital, mientras que la textura tiende a ser fina. La distribución de la grasa fue casi uniforme, con un valor promedio de 2.1 por lo que el 82.71% de las canales tuvieron distribución de la grasa clasificada como uniforme y casi uniforme, mientras que el 17.3 % mostraron distribución no uniforme de la grasa en contraste con Méndez *et al.* (2009) quienes reportaron que el 43.2% de las canales de bovino en México tuvieron una distribución uniforme de la grasa y 55.9 % de las canales tuvieron una distribución no uniforme. El perfil de la pierna mostro una tendencia a ser recto y tuvo un valor de 2.66±0.47 para la conformación de la canal sin ClZi y de

2.16±0.47 para la que se administro ClZi, al respecto Méndez *et al.* (2009) encontraron que el 82.4% de las canales mexicanas tuvieron valores menores a 3 para la clasificación europea (entre pobre y bueno) y sólo el 0.8% tuvieron categoría de excelente. Comparando los resultados encontrados en este trabajo con la clasificación europea, el 100% de las canales serían calificadas con valores por debajo de la categoría 3.

En lo que se refiere a los análisis realizados a la carne a las 24 h, se observa que el pH promedio 24 h post-mortem fue de 5.51. González *et al.* (2010) encontraron un pH 24 h post-mortem de 5.6 en el músculo *Longissimus dorsi* de las canales mexicanas lo que se asemeja con lo encontrado en este trabajo. Por otro lado, el valor de la fuerza de corte fue de 7.15±0.22kg, siendo clasificada como carne dura de acuerdo con los criterios de Shackelford *et al.* (1995), cuya escala es: <3.2 kg, muy suave; de 3.2 a 3.89 kg, suave; de 3.89 a 4.59 kg, intermedio y >4.59 kg, dura. Al respecto, Torrescano *et al.* (2003) encontraron valores de fuerza de corte de 2.29±0.91 kg en el músculo *Longissimus dorsi* y *lumborum* y 2.24±0.90 kg/cm<sup>2</sup> en el *Longissimus dorsi thoracis* de canales provenientes del norte del país, estos valores son más bajos a los encontrados en este trabajo; esta diferencia se explica por el efecto del tipo racial ya que en el estudio de Torrescano *et al.* (2003) la carne provenía de animales 100% *Bos taurus*; no obstante González *et al.* (2010) encontraron valores de fuerza de corte de 5.62 kg para el *Longissimus dorsi thoracis* en la carne mexicana que de acuerdo con la clasificación de Shackelford (1995) también cae sobre la categoría de carne dura. Cabe mencionar que no debe existir punto de confusión cuando en el texto se refiere la firmeza de la carne ya que esta variable es medida sobre la canal en la carne cruda y la fuerza de corte determina la suavidad o dureza de la carne cocinada. Los valores altos de fuerza de corte encontrados en este trabajo, pese a los cambios inherentes del proceso de maduración de la carne, pueden deberse al uso del  $\beta$ -adrenérgico (Claus *et al.*, 2010; Hope-Jones *et al.*, 2010), el tipo racial acebuado (Bidner *et al.*, 2002; Barendse *et al.*, 2008; Café *et al.*, 2010) y la edad > 18 meses (Goll *et al.*, 2007). No se encontraron efectos ni por el ClZi, ni por el tipo de maduración en la mayoría de las variables medidas a lo largo de la maduración. Sin embargo, los días de maduración, si ejercieron un efecto significativo sobre las variables. Al respecto, Koohmaraie y Geesink (2006) encontraron que con el uso de  $\beta$ AA tipo 2, no solo disminuye la suavidad, sino también se afecta negativamente la textura y jugosidad de la carne. En estudios similares

donde evalúan carne sin y con ClZi, se presentan valores de FCWB 4.39 vs 5.11 kg respectivamente (Avendaño *et al.*, 2006). Otros autores han observado un aumento de hasta 40% en el peso de los músculos en ovinos y bovinos tratados con ClZi, dependiendo la respuesta, al  $\beta$ AA suministrado (Mersmann, 1998); incluso este último autor y Miller *et al.*, (1998) han reportado además de la hipertrofia, cambios en los tipos de fibras y en la proporción de ARN de transcripción para proteínas como actina y miosina. Por otro lado, Claus *et al.* (2010) han observado que al administrar ClZi durante menos de 20 días en la dieta, se obtienen considerables diferencias favorables en fuerza de corte durante la maduración, obteniendo valores menores de 4 kg, mientras que al administrarse durante 30 días o más, no se observan cambios significativos en lo que a suavidad de la carne respecta, con resultados muy similares a los de este trabajo.

Garmyn (2015) reporta que a pesar de encontrar diferencias en la palatabilidad, principalmente en la sensación de suavidad de los consumidores en carne con y sin ClZi, durante los primeros días de maduración, no hay diferencia significativa entre tratamientos a los 21 días de maduración. Strydom *et al.* (2009) reporta cambios derivados de la maduración dependiendo solamente del  $\beta$ AA administrado en el alimento.

En este trabajo no se observaron cambios significativos por el tipo de maduración utilizada, a diferencia de Stenstrom *et al.* (2014), quienes encontraron que con la maduración seca (cubierta con una bolsa) se obtiene un producto de mejores características organolépticas, sin la merma que implica la pérdida de peso por desecación con este tipo de maduración. Sin embargo, Laster *et al.* (2008) demostraron cambios en color y sabor, no así en suavidad entre un tipo de maduración y otro, ya que dichos cambios son atribuidos, más al grado de marmoleo y cobertura grasa de la carne, que al tipo de maduración utilizada.

En cuanto al pH de la carne durante este proceso, mostro una tendencia a descender correspondiente con los parámetros normales, donde la disminución de este parámetro en el músculo se da en forma gradual desde valores aproximados a 7 que corresponde al que se presenta en el animal vivo, hasta un intervalo de 5.4 a 5.8 (Warriss, 2000), todo esto en un lapso de 15 a 36 h post mortem. Este pH final coincide con el punto isoeléctrico de algunas proteínas, incluidas las miofibrilares (Alarcón, 1992). Al respecto, Wheeler (2000) menciona que con un pH alrededor de 6, las calpainas tienen actividad suficiente para

producir un mejoramiento en la suavidad de la carne, especialmente, si se permite un período de maduración apropiado.

La degradación de las proteínas miofibrilares que comienza a las 12 h post mortem, es la principal responsable de la suavidad, dicho proceso es dependiente de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, el cual induce a la autólisis de la  $\mu$ -calpaina, suficiente para activar la m-calpaina (Veiseth *et al.*, 2001). Al respecto, del efecto de los días de maduración sobre la suavidad de la carne, Mandell *et al.* (2001) evaluaron el efecto del tiempo de la maduración en las propiedades de carne de res y encontraron que al aumentar el tiempo de maduración, se mejoran las propiedades sensoriales de textura, aroma y sabor. Rubio *et al.* (2014) determinó que la suavidad atribuida a la maduración en carne de res mexicana, no da resultados significativos después de los primeros 7 días post mortem, haciendo mención que en su trabajo se utilizó solo el cuarto delantero del animal, lo que podría marcar la diferencia, con el presente trabajo, que muestra como la carne de res producida en México puede mejorar sus características físicas, principalmente la suavidad, después de 21 días de maduración.

Así, la dinámica presentada en los valores de FCWB de este trabajo, se explica mejor con la elevada concentración y actividad inicial de calpaínas durante los primeros tres días post mortem, en que la FCWB tuvo una disminución importante (41%), siendo este periodo el de mayor actividad antes de presentar una disminución del 50% en la concentración y actividad de éstas, posteriormente las calpaínas se mantienen sin cambios tanto en la concentración como en la actividad hasta pasado el día 14, observándose un aumento ( $P < 0.05$ ) del 33% en la actividad de calpaínas al día 21, acorde con la ligera disminución de FCWB al día 21 de maduración. Cabe señalar que estos porcentajes corresponden al efecto total de la maduración sobre la disminución de FCWB presentada, que fue de 3.12 kg lo que corresponde a 100%. Esto coincide con el estudio de Strydom *et al.* (2011) quienes observaron la mayor actividad de calpaínas durante los primeros 2 días. Por otro lado, Lindahl (2010) muestra similares resultados a los obtenidos, pues reporta la mayor actividad durante las primeras 48 hrs, seguido de una disminución considerable y constante durante los siguientes días hasta el día 21 de maduración en el que vuelve a aumentar la actividad de éstas, disminuyendo a su vez la FCWB. Bratcher *et al.* (2005) afirman que la fuerza de corte decrece con el tiempo, dando como resultado una reducción del 46% en la

fuerza de corte del día uno (4.8 kg) al día doce (2.58 kg). Respecto al ligero aumento en la FCWB del día 14 de maduración en este estudio, concuerda con el estudio de Rubio *et al.* (2014), en la que la FCWB también aumentaba ligeramente para este periodo de tiempo, en algunos músculos del cuarto delantero de carne producida en México y para el día 21, presentaban un descenso mayor cuando se obtenía la máxima suavidad resultante de la maduración.

Los cambios observados a nivel de la ultraestructura de las miofibrillas durante el almacenamiento de la carne corresponden a la degradación de costámeras, que comienza a las 24 h y se completa a las 72 h post mortem, a la vez que se da la separación de miofibrillas adyacentes por la degradación de los miofilamentos intermediarios de desmina. En el estudio de Taylor *et al.* (1995) se observó que a nivel del disco Z no hubo alteración estructural antes de los 16 días post mortem, en tanto que aparecen áreas de degradación en la banda I, cerca del disco Z en una zona próxima a la línea N2; sin embargo, en este trabajo se observó un patrón similar a partir del día 7 de maduración. La fragmentación de las miofibrillas tiene lugar a nivel de la línea N2 o al menos su debilitamiento en la maduración, lo que determina una disminución de su resistencia (Ouali, 1990). Como consecuencia de las pérdidas de la alineación transversal de los discos Z, líneas M y otros elementos contráctiles, se denota una desaparición de la densidad de la línea M (Li *et al.*, 2012). Así pues, se produce la proteólisis de ciertas proteínas miofibrilares de elevado peso molecular con una función citoesquelética, como son la titina (llamada también conectina) y la nebulina (Huff-Lonergan *et al.*, 1995). Anderson y Parrish (1989) observaron en carne de bovino que el ablandamiento puede deberse en parte a la degradación de estas dos proteínas. Los resultados de la determinación de proteínas miofibrilares de este estudio y su gradual degradación, corresponden con la proteólisis de titina y nebulina que se produce durante las primeras 72 h post mortem (Taylor *et al.*, 1995). En el estudio de Taylor *et al.*, (1995) en los músculos *Biceps femoris* y *Semitendinosus* se reporta proteólisis del 25% del contenido de nebulina en las primeras 24 h post mortem, en tanto que de titina a partir de las 24 h y hasta las 72 h; lo que explicaría el incremento de fragilidad de la banda I, próximo a la línea N2, donde el efecto de las calpaínas es mayor. Todo ello es responsable del incremento de la fragilidad de las miofibrillas durante el almacenamiento (Koohmaraie, 1992).

## 8. CONCLUSIONES

La adición o no del  $\beta$ AA como modificador del metabolismo no es un factor determinante sobre la calidad de carne, así como tampoco lo es el tipo de maduración, debido a que no se presentaron diferencias significativas entre los distintos grupos. Sin embargo, el tiempo de maduración afecta significativamente la suavidad, dejando claro que mientras más tiempo se deje madurar una carne, mayor suavidad tendrá esta. Respaldando esto último con los datos que corresponden a la concentración y actividad de calpaínas obtenidos durante todo el periodo de maduración, con evidencia gráfica del deterioro de las miofibrillas conforme transcurre la maduración y la degradación progresiva de las proteínas estructurales conforme transcurren los días de maduración, observados en el perfil electroforético. Es necesario mencionar que el tiempo máximo de maduración estará determinado por la higiene e inocuidad con la que se obtenga y se procese tanto la canal como los cortes primarios hasta la obtención del corte destinado al consumidor.

Con base a los resultados obtenidos del incremento de la suavidad atribuida a la maduración, la elección del método de madurado empleado lo determinará el tipo de mercado o consumidor al que se destine el producto por las diferencias organolépticas y económicas de cada método, mencionadas en este estudio.

Estos resultados son importantes como referencia, al momento de asesorar a un productor o empresario, sobre el manejo a seguir para la obtención de su producto final, que será carne con propiedades organolépticas mejoradas, indistintamente de la calidad de su ganado, también representan una razón para decidir sobre el uso de modificadores del metabolismo tipo  $\beta$  adrenérgico.

Después de conocer con más detalle el proceso de la maduración, se puede proponer esta como una magnífica opción para obtener un producto de valor agregado que cubra la inversión que este proceso representa y genere ganancia adicional al vendedor.

## 9. REFERENCIAS

1. Ahnström ML, Seyfert M, Hunt MC, Johnson DE. Dry aging of beef in a bag highly permeable to water vapour. *Meat Science* 2006;73:674–679.
2. AMSA. Guidelines, Instrumental Meat Color Measurement. *Meat Color Measurement Guidelines* 2012;8:45-52. Illinois EUA.
3. AOAC. Official methods of analysis. 18<sup>th</sup> ed. Maryland, USA: Association of Official Analytical Chemist. 2007.
4. Avendaño RL, Torres RV, Meraz MFJ, Pérez LC, Figueroa SF, Robinson PH. “Effects of Two  $\beta$ -adrenergic Agonists on Finishing Performance, Carcass Characteristics and Meat Quality of Feedlot Steers” *Journal Animal Science* 2006;84.
5. Belew JB, Brooks JC, McKenna DR, Savell JW. Warner–Bratzler shear evaluations of 40 bovine muscles. *Meat Science* 2003;64(4):507-512.
6. Bennett PM, Hodkin TE, Hawkins C. Evidence that the tandem Ig domain near the end of the muscle thick filament form an inelastic part of the I-Band Titin. *Journal Structure Biology* 1997;129:93.
7. Bergh HM, Ertbjerg P, Therkildsen M. In vitro study to evaluate the degradation of bovine muscle proteins post-mortem by proteasome and  $\mu$ -calpain. *Meat Science* 2008;79:77-85.
8. Bohorov O, Buttery PJ, Correia JH, Soar JB. The effect of the  $\beta$ -adrenergic agonist clenbuterol or implantation with oestradiol plus trenbolone acetate on protein metabolism in wether lambs. *Br. J. Nutr.* 1987;57:99-107.
9. Bratcher CL, Johnson DD, Litell RC, Gwartney BL. The effects of quality grade, aging, and location within muscle on Warner-Bratzler shear force in beef muscles of locomotion. *Meat Science* 2005;70:279-284.
10. Campbell RE, Hunt MC, Levis P, Chambers E. Dry-aging effects on palatability of beef longissimus muscle. *Journal of Food Science* 2001;66:196–199.
11. 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.



12. Castellanos, R. A. F.; Rosado, R. J.; Chel G. L.; Betancur, A. (2006) Empleo del zilpaterol en novillos con alimentación intensiva en Yucatán, México. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal. Vol. 14, Núm. 2.
13. Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2002;18:637.
14. Claus HL, Dikeman ME, Murray L, Brooks JC, Shook J, Hilton GG, *et al.* Effects of supplementing feedlot steers and heifers with zilpaterol hydrochloride on Warner–Bratzler shear force interrelationships of steer and heifer longissimus lumborum and heifer triceps brachii and gluteus medius muscles aged for 7, 14 and 21 d. *Meat Science* 2010;85:347–355.
15. Crouse JD, Koohmaraie M. Effect of freezing of beef on subsequent postmortem aging and shear force. *Journal of Food Science* 1990;55(2):573-574.
16. Chávez A, Pérez E, Rubio MS, Méndez RD, Delgado EJ, Díaz D. Chemical composition and cooking properties of beef forequarter muscles of Mexican cattle from different genotypes. *Meat Science* 2012;91(2):160-164.
17. Delgado EF, Geesink GH, Marchello JA, Goll DE, Koohmaraie M. The calpain system in three muscles of normal and callipyge sheep. *Journal of animal science* 2001;79:398-412.
18. DeGeer SL, Hunt MC, Bratcher CL, Crozier-Dodson BA, Johnson DE, Stika JF. Effects of dry aging of bone-in and boneless strip loins using two aging processes for two aging times *Meat Science* 2009;83:768–774.
19. Du J, Wang X, Miereles C, Bailey JL, Debigare R, Zhang B, Price SR, Mitch W. E. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J. Clin. Invest.* 2004;113:115-123.
20. Du J, Hu Z, Mitch WE. Cellular signals activating muscle proteolysis in chronic kidney disease: A two-stage process, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005;37:2147-2155.
21. Ferguson D, Bruce H, Thompson J, Egan A, Perry D, Shorthose W. Factors affecting beef palatability; from farmgate to chilled carcass. *Aust. J. Exp. Agr.* 2001;41:879.

22. Garcés YP, MR Zinn, Rebolledo AM, Abreu CC. “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. 1998 Querétaro, México.
23. Goll DE, Neti G, Mares SW, Thompson VF. Myofibrillar protein turnover: The proteasome and the calpains J. Anim. Sci. 2008;86:E19–E35. doi:10.2527/jas.2007-0395.
24. Guarín A. Carne de cuarta para consumidores de cuarta Rev. Estud. Soc. 2008;196:104-119.
25. Hildrum KI, Rodbotten R, Hoy M, Berg J, Narum B, Wold JP. Classification of different bovine muscles according to sensory characteristics and Warner Bratzler shear force. Meat Science 2009;83(2):302-307.
26. Hui YH. Ciencia Y Tecnología de Carnes. Ed. Limusa, México, 2006.
27. Huff-Lonergan E, Parrish FC, Robson RM. Effects of Postmortem Aging Time, Animal Age, and Sex on Degradation of Titin and Nebulin in Bovine Longissimus Muscle. J. Anim. Sci. 1995;73(4):1064-1073.
28. Intervet. Efecto de Zilmax sobre la productividad. 2014 En: Zilmax Guía Técnica. México. [www.msd-salud-animal.mx](http://www.msd-salud-animal.mx).
29. Kemp CM, King DA, Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M. The caspase proteolytic system in callipyge and normal lambs in longissimus, semimembranosus and infraspinatus muscles during postmortem storage. J. Anim. Sci. 2009;87:2943-2951.
30. Kemp CM, Parr T. Advances in apoptotic mediated proteolysis in meat tenderization. Meat Science 2012;92:252-259.
31. Koohmaraie M, Babiker AS, Schroeder AL, Merkel RA, Dutson TR. Acceleration of postmortem tenderization in ovine carcasses through activation of Ca<sup>2+</sup> dependent proteases. J. Food Sci. 1988;53:1838.
32. Koohmaraie M. Quantification of Ca<sup>2+</sup> dependent protease activities by hydrophobic and ion-exchange chromatography. Journal of Animal Science 1990;68:659-665.
33. Koohmaraie M, Shackelford SD, Muggli-Cockett NE, Stone RT. Effect of the b-adrenergic agonist, L644, 969, on muscle growth, endogenous proteinase activities

- and postmortem proteolysis in wether lambs. *Journal of Animal Science* 1991;69:4823–4835.
34. Koohmaraie M, Killefer J, Bishop MD, Shackelford SD, Wheeler TL, Arbona JR. Calpastatin-based methods for predicting meat tenderness. In A. Ouali, D. Demeyer, & F. Smulders (Eds.), *Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality 1995*; 395–412. Utrecht, The Netherlands: EECEAMST.
  35. Koohmaraie M, Shackelford SD, Wheeler TL, Lonergan SM, Doumit ME. A muscle hypertrophy condition in lamb (callipyge): characterization of effects on muscle growth and meat quality traits. *Journal of Animal Science* 1995;73:3596–3607.
  36. Koohmaraie M. Biochemical Factors Regulating the Toughening and Tenderization Processes of meat. *Meat Science* 1996;43S:193-S201.
  37. Koohmaraie M, Shackelford SD, Wheeler TL. Effects of a b-adrenergic agonist (L-644,969) and male sex condition on muscle growth and meat quality of callipyge lambs. *Journal of Animal Science* 1996;74:70–79.
  38. Koohmaraie M, Kent M, Shackelford S, Veiseth Eva, Wheeler T. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? *Meat Science* 2002;62:345–352.
  39. Koohmaraie M, Geesink GH. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Science* 2006;74:34-43.
  40. Laster MA, Smith RD, Nicholson KL, Nicholson JDW, Miller RK, Griffin DB, Harris KB, Savell JW. Dry versus wet aging of beef: Retail cutting yields and consumer sensory attribute evaluations of steaks from ribeyes, strip loins, and top sirloins from two quality grade groups. *Meat Science* 2008;80:795–804.
  41. Li K, Zhang Y, Mao Y, Cornforth D, Dong P, Wang R, Zhu H, Luo X. Effect of very fast chilling and aging time on ultra-structure and meat quality characteristics of chinese yellow cattle M. Longissimus lumborum. *Meat Sci.* 2012;92(4): 795-804.
  42. Li X, Babol J, Wallby A, Lundström K. Meat quality, microbiological status and consumer preference of beef gluteus medius aged in a dry ageing bag or vacuum. *Meat Science* 2013;95(2):229-234.

43. López P, Rubio MS, Valdés M, SE. Efecto del cruzamiento, sexo y dieta en la composición química de la carne de ovinos Pelibuey con Rambouillet y Sulffolk. *Veterinaria México* 2000;31(1).
44. Maltin CA, Sinclai KD, Warris PD, Grant CM, Porter AD, Delday MI. The effects of age at slaughter, genotype and finishing system on the biochemical properties, muscle fibre type characteristics and eating quality of bull beef from suckled calves. *Anim. Sci.* 1998;66:341-348.
45. McCormick RJ. Extracellular Modifications to Muscle Collagen: Implications for Meat Quality. *Poultry Science* 1999;78:785–791.
46. Mendez RD, Meza CO, Berruecos JM, Garces P, Delgado EJ, Rubio MS. A survey of beef quality and quantity attributes in México. *J. Anim. Sci.* 2009;87:3782-3790.
47. Mersmann HJ. “Overview of the Effects of  $\beta$ -Adrenergic Receptor Agonists on Animal Growth Including Mechanisms of Action”, *Journal Animal Science.* 2002;76.
48. Mestre PJ. Factors and mechanisms responsible for meat ageing. *Revue Méd. Vét.* 2002;153(7):499-506.
49. Miller MF, Carr MF, Ramsey CB, Crockett KL, Hoover LC. Consumer thresholds for establishing the value of beef tenderness. *Journal of Animal Science* 2001;79:3062–3068.
50. Moldoveanu T, CM Hosfield, Lim D, Elce JS, Jia Z, Davies PL. A  $Ca^{2+}$  switch aligns the active site of calpain. *Cell* 2002;108:649-660.
51. Mondragón J, Domínguez-Vara IA, Pino-Rodríguez JM, González M, Bórquez JL, Domínguez A, Mejía ML. Effects of feed supplementation of zilpaterol hydrochloride on growth performance and carcass traits of finishing lambs. *Acta Agric. Scand. A-AN.* 2010;60:47–52.
52. Montgomery J, Carr M, Kerth C, Hilton G, Price B, Galyean M, Horst R, Miller M. Effect of vitamin D<sub>3</sub> supplementation level on the postmortem tenderization of beef from steers. *J. Anim. Sci.* 2002;80:971.
53. Morgan JB, Wheeler TL, Koohmaraie M, Savell JW, Crouset JD. Meat Tenderness and the Calpain Proteolytic System in Longissimus Muscle of Young Bulls and Steers. *J. Anim. Sci.* 1993;71:1471-1476.

54. Morón-Fuenmayor, O., Zamorano, L., Ysunza, F., González, N. Efecto del clorhidrato de zilpaterol y la vitamina D3 sobre la calidad de la carne en novillas comerciales. *Revista Científica, FCV-LUZ* 2002;XII(6):725-729.
55. Muir PD, JM Deaker, MD Brown. Effects of forage and grain based feeding system on beef quality: A review. *New Zealand J. Of Agric. Res.* 1998;41:623.
56. Neti G, Novak SM, Thompson VF, Goll DE. Properties of easily releasable myofilaments: are they the first step in myofibrillar protein turnover? *American journal of physiology. Cell physiology* 2009;296:1383-1390.
57. Norma Oficial Mexicana-NOM-EM-015-ZOO-2002. «Especificaciones técnicas para el Testigo del uso de beta-agonistas en los animales». SAGARPA. México, D.F.
58. Norma Oficial Mexicana-NMX-FF-078-SCFI-2002. «Productos pecuarios-Carne de Bovino en canal-Clasificación». SAGARPA. México, D.F.
59. Oddy VH, Harper GS, Greenwood PL, McDonagh MB. Nutritional and developmental effects on the intrinsic properties of muscles as they relate to the eating quality of beef. *Aust. J. Exp. Agr.* 2001;41:921.
60. Ouali A, Talmant A. Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal-muscles. *Meat Science* 1990;28(4):331-348.
61. Oliete B, Moreno T, Carballo JA, Monserrat L, Sánchez L. Estudio de la Calidad de la Carne de Ternera de Raza Rubia Gallega a lo Largo de la Maduración al Vacío. *Arch. Zootec.* 2006;55(209):3-14.
62. Pérez-Juan M, Vitale M, Lloret E, Arnau J, Realini CE. Efecto de la maduración en la vida útil de la carne de vacuno envasada en atmósfera modificada. *Eurocarne*, 2011;198:74-78.
63. Plascencia A, Torrentera N, Zinn R. Influence of the b-agonist, zilpaterol, on growth performance and carcass characteristics of feedlot steers. *Amer. Soc. of Anim. Sci.* 1999;50:331.
64. Poblete SMT. Marcadores de utilidad en cáncer mamario. *Cuad. Cir.* 2001;15:74-79.

65. Polati R, Menini M, Robotti E, Millioni R, Marengo E, Novelli E, Balzan S, Cecconi D. Proteomic changes involved in tenderization of bovine Longissimus dorsi muscle during prolonged ageing. *Food Chemistry* 2012;135:2052–2069.
66. Pomponio L, Lametsch R, Anders HK, Nanni L, Grossi A, Ertbjerg P. Evidence for post-mortem m-calpain autolysis in porcine muscle. *Meat Science* 2008;80:761-764.
67. Price JF y BS Schweigert. *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. 1976. Editorial Acribia. Capítulo 1 y 2, p 1.
68. Purintrapiban J, Wang MC, Forsberg NE. Degradation of sarcomeric and cytoskeletal proteins in cultured skeletal muscle cells. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 2001;136:393-401.
69. Ricks CA, Baker PK, Dalrymple RH. “Use of Repartitioning Agents to Improve Performance and Body Composition of Meat Animals”, *Proceedings Annual Reciprocal Meat Conference*. 1984;37.
70. Ross, M.H., Pawlina, W. *Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. 5a ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana, 2007. ISBN 978-950-06-0435-2.
71. Rubio MS, Pérez EV, Méndez RD, Chávez A, Delgado EJ. La estrategia de congelación y maduración mejora la suavidad de los músculos del cuarto delantero de toretes sin castrar de diferentes fenotipos. *Veterinaria México* 2014;1(1):1-9.
72. Ruiz de Huidobro F, Miguel E, Onega E, Blazquez B. Changes in meat quality characteristics of bovine meat during the first 6 days post mortem. *Meat Science* 2003;65: 439–1446.
73. Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M. Relationship between shear force and trained sensory panel tenderness ratings of 10 major muscles from *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *Journal of Animal Science* 1995;73:3333-3340.
74. Sentandreu MAC, Ouali A. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science and Technology*. 2002;400-421.
75. Serrano CJ, Ponferrada AC, Carceles RC, Escudero P.E. *Fármacos antitusígenos y broncodilatadores en Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. 2002 McGraw-Hill. Interamericana. España.

76. Simões JA, Mendes MI, Lemos JPC. Selection of muscles as indicators of tenderness after seven days of ageing. *Meat Science* 2005;69(4):617-620.
77. Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados SNIIM-SE. Enero 2013.
78. Smith DJ. 1998. The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of beta-adrenergic agonists in livestock. *J. Anim. Sci.* 1998;76:173-194.
79. Smith RD, Nicholson KL, Nicholson JDW, Harris KB, Miller RK, Griffin DB, *et al.* Dry versus wet aging of beef: Retail cutting yields and consumer palatability evaluations of steaks from US choice and US select short loins. *Meat Science*. 2008 doi:10.1016/j.meatsci.2007.10.028.
80. Stenstrom H. "Consumer preference and effect of correct or misleading information after ageing beef longissimus muscle using vacuum, dry ageing, or a dry ageing bag." *Meat Sci.* 2014;96(2 Pt A): 661-666.
81. Strydom PE, Frylinck L, Montgomery JL, Smith MF. The comparison of three  $\beta$ -agonists for growth performance, carcass characteristics and meat quality of feedlot cattle. *Meat Sci.* 2009;81(3):557-564.
82. Soria LA, Corva PM. Factores genéticos y ambientales que determinan la terneza de la carne bovina. *Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal* 2004;12 (2):73-88.
83. Sumano LH, Ocampo CL, Gutiérrez OL. Clenbuterol y otros  $\beta$ -agonistas ¿Una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública? *Vet. Méx.* 2002;33(2):137-159.
84. Troy DJ, Kerry JP. Consumer perception and the role of science in the meat industry. *Meat Science* 2010;86:214–226.
85. United States Department of Agriculture (USDA). 2005. <http://www.fas.usda.gov/> USDA. 2001. United States standards for grades of carcass beef. Disponible para su consulta en: <http://www.ams.usda.gov/lsg/stand/standards/beef-car.pdf> Último acceso: Junio 10, 2012.
86. Vieira C, Diaz MT, Martinez B, Garcia-Cachan MD. Effect of frozen storage conditions (temperature and length of storage) on microbiological and sensory quality of rustic crossbred beef at different states of ageing. *Meat Sci.* 2009;83(3): 398-404.

87. Vilaboa-Arroniz J, Díaz P, Ruíz O, Platas D. Patrones de consumo de carne bovina en la región del Papaloapan, Veracruz, México. *Agricultura, sociedad y desarrollo* 2009;6(2):145-159.
88. Warriss PD. *Meat Science: An Introductory Text*. 2000. CABI Publishing. New York. Chapter 3 and 5, p 37 and p 93.
89. Weaver AD, Bowker BC, Gerrard DE. Sarcomere length influences postmortem proteolysis of excised bovine semitendinosus muscle. *J. Anim. Sci.* 2008;86:1925-1932.
90. Weaver A D, Bowker BC, Gerrard DE. Sarcomere length influences  $\mu$ -calpain-mediated proteolysis of bovine myofibrils. *J. Anim. Sci.* 2009;87:2096-2103.
91. Wordpress, *Fisiología muscular, Componentes del músculo*. 2007.
92. Wu G, Farouk MM, Clerens S, Rosenvold K. Effect of beef ultimate pH and large structural protein changes with aging on meat tenderness. *Meat Science* 2014;98:637:645.
93. Yadata MA, Werner C, Tibbo M, Wollny CBA, Wicke M. Assessment of the sensory quality and shelf stability of selected Horro beef muscles in Ethiopia. *Meat Science* 2009;83(1): 113-119.
94. Yang YT y McElligott MA. Multiple actions of  $\beta$ -adrenergic agonist on skeletal muscle and adipose tissue. *Biochem J* 1989;261:1-10.