



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE
LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**“EFECTO DE LA FUENTE DE MINERALES EN LA
PROTECCIÓN ANTIOXIDANTE DE LA CARNE Y LA
REGULACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A ESTRÉS
DURANTE EL SACRIFICIO Y LA TRANSFORMACIÓN DE
MÚSCULO A CARNE EN CERDOS”**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL**

PRESENTA

GONZÁLEZ MENDOZA MAYRA ESTHELA

DIRIGIDA POR

**CUARÓN IBARGÜENGOYTIA JOSÉ ANTONIO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES, CUAUTITLÁN - UNAM**

COMITÉ TUTOR

**MARISCAL LANDÍN GERARDO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES, CUAUTITLÁN - UNAM
PETTIGREW JAMES EUGENE
UNIVERSIDAD DE ILLINOIS, EUA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., FEBRERO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

- ☯ Al Dr. José Antonio Cuarón Ibargüengoytia, por aceptarme en su grupo multidisciplinario de trabajo, por su apoyo, paciencia, por compartirme gran parte de sus conocimientos y por motivarme cada día a ser mejor.
- ☯ Al Dr. James Eugene Pettigrew y Dr. Gerardo Mariscal Landín por su apoyo, sus valiosas contribuciones y comentarios para el comienzo, desarrollo y mejora de este trabajo.
- ☯ Al M. en B. Luis Humberto López Hernández investigador titular del programa de Carne de Cerdo en el CENID-Fisiología, por darme la oportunidad de entrar al mundo de la ciencia en un ámbito que jamás me imagine incursionar, por dejarme crecer profesionalmente, por sus ganas de enseñar y aprender, pero sobre todo por apoyarme en todo aspecto.
- ☯ A la Dra. Elba Rodríguez Hernández, investigador titular en el laboratorio de biología molecular CENID-Fisiología, por enseñarme un área nueva en la investigación, por confiar en mí y siempre escucharme.
- ☯ A mis compañeras de laboratorio, Ana Esparza, Guadalupe Estrella e Isabel Hernández y a mis compañeros en el CENID-Fisiología, Diego Guerrero y Alejandra Pérez, que son mis amigos y quienes siempre me apoyaron, por los buenos momentos que pasamos en estos años y porque siempre estaremos en el camino para ayudarnos.
- ☯ A la Universidad Nacional Autónoma de México, por generar posgrados de calidad.
- ☯ Al Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal (CENID-Fisiología, INIFAP), por su apoyo en el uso de su infraestructura que fue esencial para la conducción del trabajo experimental.
- ☯ Al CONACYT, por el apoyo económico brindado.
- ☯ A Alltech®, por el financiamiento del proyecto de investigación del cual derivó mi tesis de maestría.

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño.

A ti DIOS que me diste la oportunidad de vivir y de regalarme una familia maravillosa, y por permitirme haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mis padres, con toda mi admiración, amor y respeto. Gracias por siempre apoyarme en mis aventuras, creer en mí y por ser los pilares más importantes de mi vida. Los quiero con todo mi corazón.

A César Felipe, por siempre estar dispuesto a escucharme y ayudarme en cualquier momento, por motivarme a ser mejor para lograr mis metas y seguir mis sueños.

“Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la ciencia, no podrá comprender su tiranía.”

Mary Shelley

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Producción de carne de cerdo	3
2.1.1. Impacto ambiental	3
2.2. Uso de minerales traza en cerdos	4
2.2.1. Absorción	5
2.2.1.1. Interacción entre minerales	11
2.2.2. Fuentes de minerales	12
2.2.3. Requerimientos	13
2.2.4. Uso de vitamina E como antioxidante	14
2.3. Transformación de músculo a carne	15
2.4. Calidad de la carne	16
2.5. Enzimas asociadas a calidad	16
2.6. Proteínas asociadas a calidad	17
2.7. Parámetros de calidad	19
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	24

5.1. General	24
5.2. Específicos	24
6. METODOLOGÍA	25
6.1. Sitio experimental	25
6.2. Animales	25
6.3. Tratamientos	25
6.4. Diseño experimental	30
6.5. Alimentación	30
6.6. Manejo	31
6.7. Toma de muestras	32
6.7.1. Dietas	32
6.7.2. Sangre	32
6.7.3. Heces	33
6.7.4. Hígado	33
6.7.5. Músculo para la determinación de potencial glucolítico e identificación de proteínas	33
6.7.6. Músculo para la determinación de parámetros de calidad y concentración de minerales	35
6.8. Análisis de muestras	36
6.8.1. Hemoglobina, hematocrito y eritrocitos	36
6.8.2. Creatina quinasa (CK) y lactato deshidrogenasa (LDH)	36
6.8.3. Potencial glucolítico y glucógeno	36
6.8.4. Concentración de minerales	38
6.8.5. Parámetros de calidad de la carne	39
6.8.5.1. pH y temperatura	39
6.8.5.2. Color	39
6.8.5.3. Contenido de mioglobina	39
6.8.5.4. Capacidad de retención de agua	40
6.8.5.5. Pérdida de agua por goteo	40

6.8.5.6.	Capacidad antioxidante por el método FRAP	40
6.8.5.7.	Capacidad antioxidante por el método ABTS	41
6.8.5.8.	Catalasa	42
6.8.5.9.	Glutación peroxidasa	43
6.8.5.10.	Superóxido dismutasa	43
6.8.5.11.	Oxidación lipídica	44
6.8.5.12.	Oxidación proteica	44
6.8.5.13.	Fuerza de corte (Warner-Bratzler) y pérdida de agua por cocción	45
6.8.5.14.	Análisis sensorial	45
6.8.6.	Identificación y cuantificación de proteínas mediante 2DE/Western Blot y ELISA	45
6.9.	Análisis estadístico	48
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
7.1.	Comportamiento productivo	49
7.2.	Calidad de la carne	55
7.3.	Identificación de proteínas	67
7.4.	Concentración de minerales	77
8.	CONCLUSIONES	84
9.	IMPLICACIONES	85
10.	REFERENCIAS	86
11.	ANEXO 1	98
12.	ANEXO 2	101
13.	ANEXO 3	102
14.	ANEXO 4	105

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Dietas basales, por fase de alimentación	26
2	Descripción de los Tratamientos, por la densidad y fuente de minerales traza (premezcla de minerales adicionada a 0.3% de la dieta)	27
3	Composición de la premezcla de minerales traza	28
4	Análisis calculado de algunos nutrientes en las dietas basales, por fase de alimentación	29
5	Concentración analizada de los minerales traza en las dietas experimentales	29
6	Fases de alimentación y tiempo de duración	31
7	Comportamiento productivo por Sexo	50
8	Comportamiento productivo por Tratamiento	51
9	Interacción sexo por Tratamiento en ganancia diaria de peso	52
10	Análisis en sangre por Tratamiento	54
11	Análisis de la sangre en función del tiempo	55
12	Características de la canal y parámetros de calidad	61
13	Retención de agua de la carne	62
14	Vida de anaquel por Tratamiento en calidad de carne	63
15	Vida de anaquel en función del tiempo, calidad de carne	64
16	Vida de anaquel por Tratamiento, parámetros de oxidación y dureza	65
17	Vida de anaquel en función del tiempo, parámetros de oxidación y dureza	66
18	Análisis sensorial	67
19	Resultados de Intensidad*Área (Western Blot) de	

	proteínas sarcoplásmicas por Tratamiento	73
20	Resultados de Intensidad*Área (Western Blot) de $\alpha\beta$ -Cristalina, HSP70 y Caspasa 7 por Tratamiento y tiempo	74
21	Resultados de Intensidad*Área (Western Blot) de proteínas sarcoplásmicas en función del tiempo	75
22	Concentración de $\alpha\beta$ -Cristalina y Caspasa 7 en muestras de lomo de cerdo (proteínas sarcoplásmicas) por Tratamiento	76
23	Concentración de $\alpha\beta$ -Cristalina y Caspasa 7 en muestras de lomo de cerdo (proteínas sarcoplásmicas) en función del tiempo	76
24	Concentración de minerales en plasma	80
25	Concentración de minerales en lomo e hígado	81
26	Concentración de minerales en heces por Tratamiento	82
27	Concentración de minerales en heces en función del tiempo	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Absorción del cobre	7
2	Absorción del hierro	8
3	Absorción del manganeso	9
4	Absorción del Zinc	10
5	Absorción del selenio	11
6	Interacción entre minerales	12
7	Relación dosis-respuesta entre el suministro de minerales y la producción animal; A representa una fuente más absorbible que B	14
8	Vista lateral con identificación anatómica del músculo <i>Longissimus dorsi</i>	34
9	Toma de muestras utilizando un cilindro de acero inoxidable	35
10	Esquema de acción de las proteínas de choque térmico en el proceso de muerte celular	70
11	Esquema de acción de las proteínas de choque térmico en el proceso de maduración de la carne	71

RESUMEN

Reducir los minerales traza en la dieta es una estrategia para prevenir su acumulación en suelos, pero hay poca información que permita concluir sobre la satisfacción de los requerimientos en cerdos y la estabilidad oxidativa de la carne. Para evaluar esto, se establecieron 8 Tratamientos, los primeros 4 fueron niveles de minerales traza añadidos a una dieta basal: Cu (2, 7, 12 y 17 mg/kg), Fe (20, 60, 100 y 140 mg/kg), Mn (1, 16, 31 y 46 mg/kg) y Zn (25, 60, 95 y 130 mg/kg), a partir de quelatos (OR1 a OR4). El Tratamiento 5 fue un control con los niveles como OR4, a partir de sulfatos (IN5). En los Tratamientos OR1 a IN5 el contenido de Vitamina E fue de 60 mg/kg, mientras que los Tratamientos 6 (OR6), 7 (OR7) y 8 (IN8) fueron como OR1, OR4 e IN5, pero la concentración de Vitamina E se incrementó a 280 mg/kg durante los últimos 42 días del experimento. El Selenio se mantuvo constante a 0.2 ppm a partir de levadura enriquecida. Los resultados muestran que la productividad fue la misma ($P>0.37$) y los parámetros hemáticos o de actividad antioxidante estuvieron siempre dentro de rangos normales ($P>0.66$); las características de la canal y calidad de la carne fueron similares ($P>0.17$), pero la capacidad de hidratación del lomo tuvo diferencias, siendo mejor a menor concentración de los quelatos ($P<0.03$). La expresión de las proteínas HSP40, HSP70 y Caspasa 9 en el músculo largo dorsal en las primeras 24h post-mortem fue menor ($P<0.02$) a dosis altas con los quelatos que con las fuentes inorgánicas a la misma dosis. En la vida de anaquel de la carne (21d), se observaron diferencias en el tiempo ($P<0.01$), sin efecto de los Tratamientos ($P>0.34$). Independientemente de la fuente, la concentración de minerales en plasma, hígado, músculo y heces respondió a la densidad dietética de los elementos ($P<0.01$). Con los quelatos de Cu y Fe en dosis altas, la concentración de estos en heces fue menor ($P<0.01$) que con las fuentes inorgánicas. En resumen, bajos niveles suplementarios de minerales traza, en este caso a partir de quelatos, fueron suficientes para sostener el crecimiento y reducir la excreción fecal entre 39% (Zn) y 72% (Fe), sin que se afectaran los parámetros de calidad de la carne.

ABSTRACT

Reduce the density of trace minerals in the diet is a strategy to prevent their accumulation in soils, but limited information is available to conclude about the satisfaction of the requirements in pigs and the oxidative stability of pork. To assess this, 8 Treatments were established, the first 4 were levels of trace minerals added to a basal diet: Cu (2, 7, 12 and 17 mg/kg), Fe (20, 60, 100 and 140 mg/kg), Mn (1, 16, 31 and 46 mg/kg) and Zn (25, 60, 95 and 130 mg/kg), from chelates (OR1 to OR4). Treatment 5 was a control with levels as OR4, from sulfates (IN5). In Treatments OR1 to IN5 the vitamin E content was 60 mg/kg, while Treatments 6 (OR6), 7 (OR7) and 8 (IN8) were such as OR1, OR4 and IN5, but the concentration of vitamin E was raised to 280 mg/kg during the last 42 days of the experiment. Selenium remained constant at 0.2 ppm from enriched yeast. The results show that productivity was the same ($P>0.37$) and hematic parameters or antioxidant activity were always within normal ranges ($P>0.66$); carcasses and meat quality traits were similar ($P>0.17$), but the loin hydration capacity, being better at lower chelated minerals concentration ($P<0.03$). The expression of the proteins HSP40, HSP70 and Caspase 9 in the long dorsal muscle in the first 24h post-mortem was lower ($P<0.02$) at high doses with chelates than with inorganic sources at the same dose. In the pork shelf life (21d), differences were observed over time ($P<0.01$), without effect of the Treatments ($P>0.34$). Regardless of source, the concentration of trace minerals in plasma, liver, muscle and feces responded to the dietary density ($P<0.01$). With Cu and Fe chelates at high doses, the concentration of these elements in feces was lower ($P<0.01$) than with inorganic sources at the same dosage. In summary, low supplementary levels of trace minerals, in this case from chelates, were sufficient to sustain growth and reduce fecal excretion between 39% (Zn) and 72% (Fe), without affecting the quality parameters of the meat.

I. INTRODUCCIÓN

Los minerales traza en dietas comerciales para cerdos están frecuentemente en concentraciones mayores (Flohr *et al.*, 2015) a los requerimientos establecidos por el Consejo Nacional de Investigación (NRC, 2012). Sin embargo, considerando la disponibilidad de los ingredientes, Se y Zn, pueden estar en deficiencia (Suttle, 2010). Por otro lado, las formas queladas (minerales de fuente orgánica) de estos elementos, por su mayor biodisponibilidad pueden ser suficientes al 50% de las recomendaciones nutricionales (Gowanlock *et al.*, 2013, 2015). En consecuencia, el uso de minerales con mayor biodisponibilidad puede ser de utilidad para reducir significativamente la excreción y por lo tanto los riesgos ambientales de contaminación, al tiempo de proteger la capacidad antioxidante en el metabolismo de los animales; por ejemplo: el selenio actúa como cofactor de la enzima glutatión peroxidasa; el cobre, manganeso y zinc son cofactores para el correcto funcionamiento de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa (Suttle, 2010; Richards *et al.*, 2010). En contraste, niveles excesivos de minerales traza pueden desequilibrar el sistema antioxidante, particularmente Cu que puede ser usado hasta 36 veces el requerimiento y por el carácter pro-oxidante del elemento (Linder, 2001; Gaetke y Chow, 2003), aunado a esto, se sabe que las consecuencias de un desequilibrio en el sistema antioxidante inducen problemas en la producción, calidad y vida útil de la carne (Descalzo y Sancho, 2008).

Por otro lado, es necesario distinguir los efectos antioxidantes y pro-oxidantes en función del resto de los componentes en la dieta, por ejemplo, la vitamina E como elemento esencial en el sistema antioxidante debe ser considerada cuando se midan los efectos de los minerales traza (Lauridsen *et al.*, 1999).

Durante la matanza, el estrés oxidativo se ve agravado por las condiciones de hipoxia e isquemia, que causan cambios fisiológicos que alteran el potencial redox, desencadenando la generación de radicales libres altamente pro-oxidantes

(Kemp y Parr, 2012; Eskin *et al.*, 2013). Además, previo al *rigor mortis*, se lleva a cabo una cascada de señalización (muerte celular) que progresará irreversiblemente siempre y cuando las enzimas proteolíticas permanezcan activas (Sentandreu *et al.*, 2002; Ouali *et al.*, 2006; Kemp *et al.*, 2010; Kemp y Parr, 2012). Condiciones oxidativas pueden inducir cambios en las proteínas y activación de otras moléculas, como proteínas de choque térmico (Mohanty *et al.*, 2010; Lomiwes *et al.*, 2014), modificando la proteólisis (actividad de caspasas, calpaínas, catepsinas y proteosomas) y la textura final de la carne (Astruc *et al.*, 2007; Lomiwes *et al.*, 2014).

El agotamiento de los minerales traza en los tejidos, por ejemplo, como consecuencia de su retiro durante finalización, afectan la calidad de la carne (valor de a^* y pérdida de agua), con efectos nulos en el rendimiento y características de la canal (Edmonds y Arentson, 2001; Ma *et al.*, 2012). Por lo tanto, el uso de la concentración adecuada de minerales traza en la dieta es para asegurar la correcta función antioxidante. En este sentido el uso y aplicación de fuentes queladas de los minerales traza debe ser medido en función de la actividad de las enzimas antioxidantes, como se hizo con Se (Mahan y Parrett, 1996; Mahan *et al.*, 1999) y en particular su connotación relativa a la calidad de la carne, especialmente durante la transformación del músculo a carne.

Por lo que evaluar el efecto del uso de minerales traza de diferentes fuentes sobre aspectos de producción, rendimiento y calidad de la carne de cerdos es de interés debido a que no existe suficiente información al respecto.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Producción de carne de cerdo

La carne de cerdo es importante en la nutrición humana, ya que es una fuente rica en nutrientes, como proteínas y aminoácidos esenciales; respecto a micronutrientes, el cerdo representa una fuente de minerales como fósforo, selenio, sodio, zinc, potasio, cobre, hierro y magnesio, además de que proporciona vitaminas B6, B12, tiamina, niacina, riboflavina y ácido pantoténico, que son beneficiosas para el crecimiento y desarrollo (FAO, 2017).

En México, la carne de cerdo constituye uno de los elementos principales en la dieta; además de que el consumo de productos cárnicos porcinos ha aumentado en los últimos años y todas las proyecciones aseguran que la demanda de carne de cerdo se incrementará en los próximos años (SAGARPA, 2015; USDA, 2016).

2.1.1. Impacto ambiental

El incremento en la producción de cerdos tiene como consecuencia un aumento en la contaminación ambiental si las excretas y el agua residual no son manejadas apropiadamente.

La cantidad de excreta producida en México puede estimarse en términos de 17 millones de cabezas de ganado porcino (datos del SIAP al 2016), que producen 25 millones de kg de excretas diariamente (1.5 kg/día por animal, promedio en engorda, Brumm *et al.*, 1980), que representa una producción anual de 9.1 millones de toneladas, lo que coloca a las excretas entre los subproductos orgánicos de mayor volumen e interés ambiental. Los estados con mayor riesgo en contaminación podrían ser aquellos en los que se concentra la mayor producción de animales como Jalisco, Sonora y Veracruz.

Por otro lado, la composición de las excretas es variada y depende de la alimentación del animal. Tienen una gran cantidad de compuestos como nitratos, fosfatos y minerales (aproximadamente el 12% son cenizas o materia inorgánica) que pueden conducir a concentraciones excesivas en los suelos, esto puede exceder la capacidad de captación de nutrientes por los cultivos. Además de que la sobrecarga de nutrientes en el suelo ocasiona su infiltración por escurrimiento y lixiviado en aguas superficiales y subterráneas, disminuye el oxígeno disuelto y modifica el pH, afectando así la calidad del agua (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2012).

El manejo que se haga de los recursos en la alimentación de los cerdos tiene un gran efecto sobre la composición de las excretas y su carácter contaminante. Por lo que se han buscado estrategias para reducir algunos compuestos en la dieta, por ejemplo, minerales traza, disminuyendo así la contaminación ambiental.

2.2. Uso de minerales traza en cerdos

Los minerales se encuentran en las células y tejidos del cuerpo, en una variedad de uniones químicas y en concentraciones características que varían con el elemento y el tejido. Estos elementos esenciales deben mantenerse dentro de límites muy estrechos si se quiere salvaguardar la integridad funcional y estructural de los tejidos, la salud y la productividad del animal (Underwood y Suttle, 1999).

Los minerales traza (Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Se, I y Zn) son necesarios para una producción animal eficiente, pero las necesidades varían en función del estadio del animal y los objetivos de producción. Hasta hace pocos años los microminerales se añadían a las dietas para controlar deficiencias nutricionales tales como la anemia (Fe), la paraqueratosis (Zn) y el bocio (I). Sin embargo, trabajos publicados en los últimos años, han demostrado de forma fehaciente que cantidades adicionales de ciertos elementos traza mejoran aspectos productivos

distintos de los clásicos síntomas de deficiencia. Además, se sabe que participan en el sistema antioxidante endógeno, por ejemplo, selenio a través de glutatión peroxidasa; cobre, manganeso y zinc, involucrados en superóxido dismutasa y catalasa (Suttle, 2010; Richards *et al.*, 2010).

Los ingredientes convencionales utilizados en granjas comerciales contienen a menudo grandes cantidades de estos minerales, a excepción de Zn, I y Se, aunque su concentración y biodisponibilidad es muy variable. Tradicionalmente, la suplementación mineral se realiza mediante la inclusión de sales inorgánicas tales como cloruros, sulfatos, carbonatos y óxidos (NRC, 2012). Sin embargo, en las últimas décadas, se han evaluado diversas fuentes y niveles de minerales traza, con el objetivo de optimizar la absorción y utilización de dichos elementos (Cohen, 2014).

La ingestión de dietas deficientes, desequilibradas o excesivamente altas en minerales induce cambios en la forma o concentración de esos minerales en los tejidos y fluidos corporales, de modo que caen por debajo o se elevan por encima de los límites tolerables, en tales circunstancias, lesiones bioquímicas se desarrollan y las funciones fisiológicas se ven afectadas (Underwood y Suttle, 1999; Suttle, 2010). Por ejemplo, en las células, en condiciones normales, el cobre libre es inexistente, sin embargo, bajo condiciones de sobrecarga, los iones de cobre libres pueden acumularse y reaccionar generando radicales libres (hidroxilo), afectando negativamente (oxidando) a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Rae *et al.*, 1999; Linder, 2001; Gaetke y Chow, 2003).

2.2.1. Absorción

Los minerales que son absorbidos están cuidadosamente regulados, y algunos comparten la misma vía de absorción, un transportador de metal divalente que se denomina DMT1, también conocido como DCT1 o Nramp2 (Garrick *et al.*, 2003;

Bai *et al.*, 2008). Los minerales se transportan generalmente de la mucosa al hígado unidos a proteínas (vía torrente sanguíneo). Desde el hígado, son transportados por el torrente sanguíneo periférico para ser absorbidos por diferentes órganos y tejidos, a velocidades determinadas por los mecanismos transportadores locales en las membranas celulares y organelos para satisfacer las necesidades intracelulares.

La absorción de los minerales varía dependiendo del elemento y su forma química, a continuación, se describe el proceso para algunos minerales:

- Cobre (Figura 1): En la membrana apical del intestino el metal es reducido a Cu^{1+} y la absorción es facilitada tanto por proteínas específicas (CRT1) como por proteínas de transporte de metales divalentes (DMT) en la mucosa intestinal (Rucker *et al.*, 2008). El transporte de Cu a través del citoplasma está mediado por las metalotioneínas (MTs, la incorporación de átomos de Cu en MTs es un paso esencial para proteger la estructura celular de la toxicidad del Cu y para prevenir el daño oxidativo). El cobre es transportado en la sangre mediante la unión a dos principales proteínas transportadoras: albúmina y ceruloplasmina (Linder, 2001; Crisponi *et al.*, 2010; Ellingsen *et al.*, 2015).

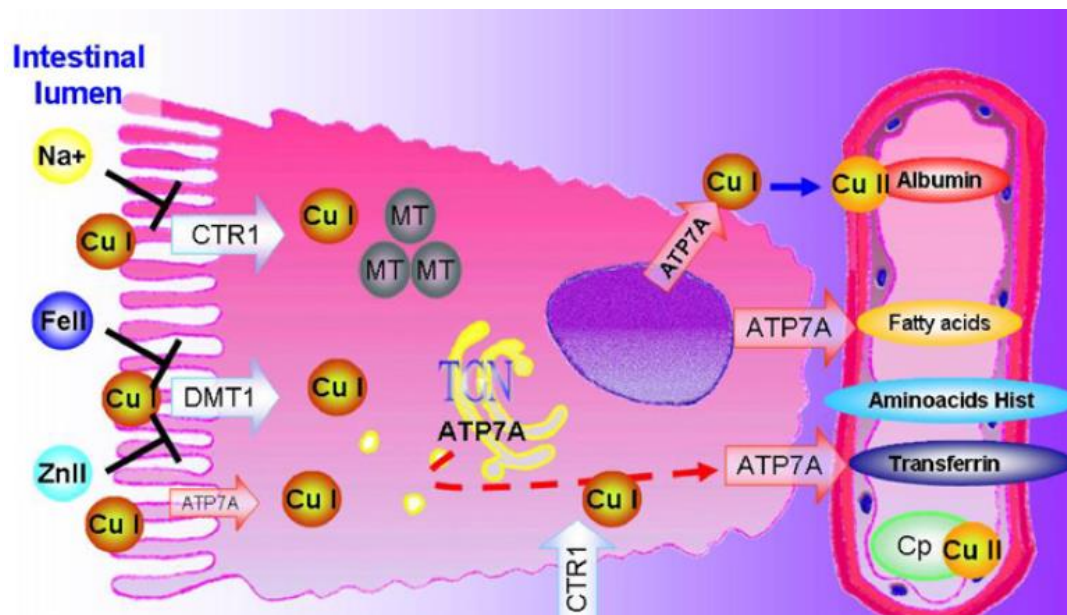


Figura 1. Absorción del cobre (Reproducción de la imagen Figura 1 presentada por Crisponi *et al.*, 2010).

- Hierro (Figura 2): Es absorbido principalmente en un proceso de dos etapas que implica la absorción de la mucosa y la transferencia serosa. En la etapa de la mucosa intestinal, el hierro hemo y no-hemo se procesan y regulan de manera diferente. El hierro hemo es probablemente absorbido por una proteína portadora, HCP1 y el no-hemo en el estado Fe^{3+} se reduce (Fe^{2+}) en la membrana apical y es absorbido por el transportador de metal divalente (DMT1; Garrick *et al.*, 2003). La transferencia serosa se realiza mediante hefaestina (un homólogo de la ceruloplasmina, dependiente del cobre) y una proteína de transporte, la ferroportina (FPT), en la membrana basolateral, que controla su absorción. El hierro es transportado en la sangre mediante la unión a transferrina. Una importante proteína reguladora es la hepcidina, la cual se sintetiza principalmente en el hígado, se libera en el plasma y controla tanto la absorción de hierro (inhibiendo la ferroportina) como el reciclado sistémico (Rucker *et al.*, 2008; Beard y Han, 2009; Farina *et al.*, 2013).

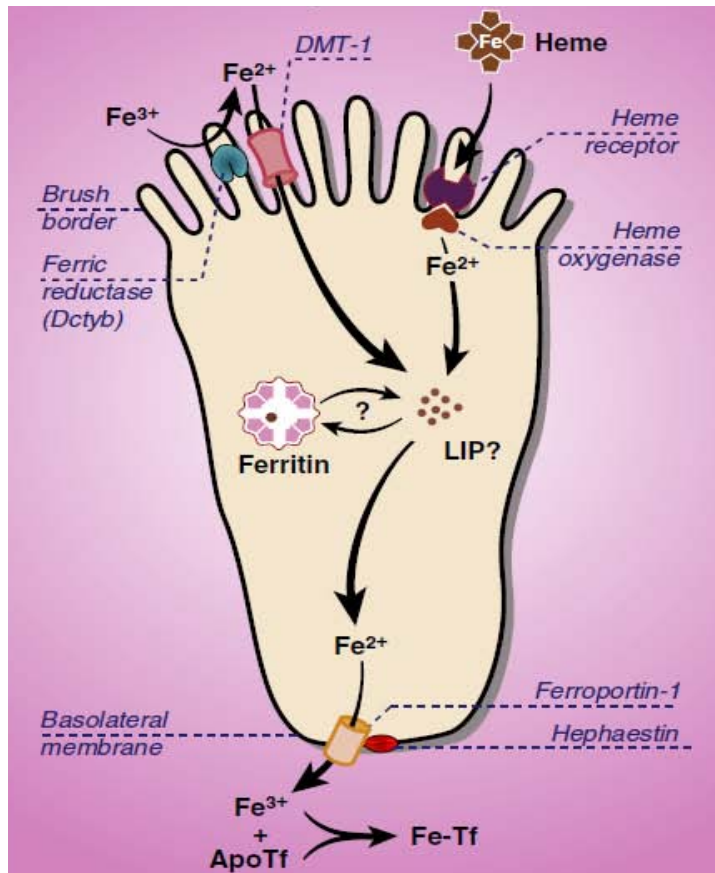


Figura 2. Absorción del hierro (Reproducción de la imagen Figura 3 presentada por Ponka *et al.*, 2015).

- Manganeseo (Figura 3): En la membrana apical del intestino es reducido a Mn^{2+} y los mecanismos de absorción del manganeseo involucran a una amplia gama de proteínas (Bowman *et al.*, 2011), por ejemplo, se comparten con el hierro, a través del DMT1 y ferroportina (Farina *et al.*, 2013), y con los del zinc a través de ZIP-8 y ZIP-14. El manganeseo es absorbido y transportado en plasma por transferrina y es absorbido al igual que Fe por receptores de transferrina en el hígado (Avila *et al.*, 2016).

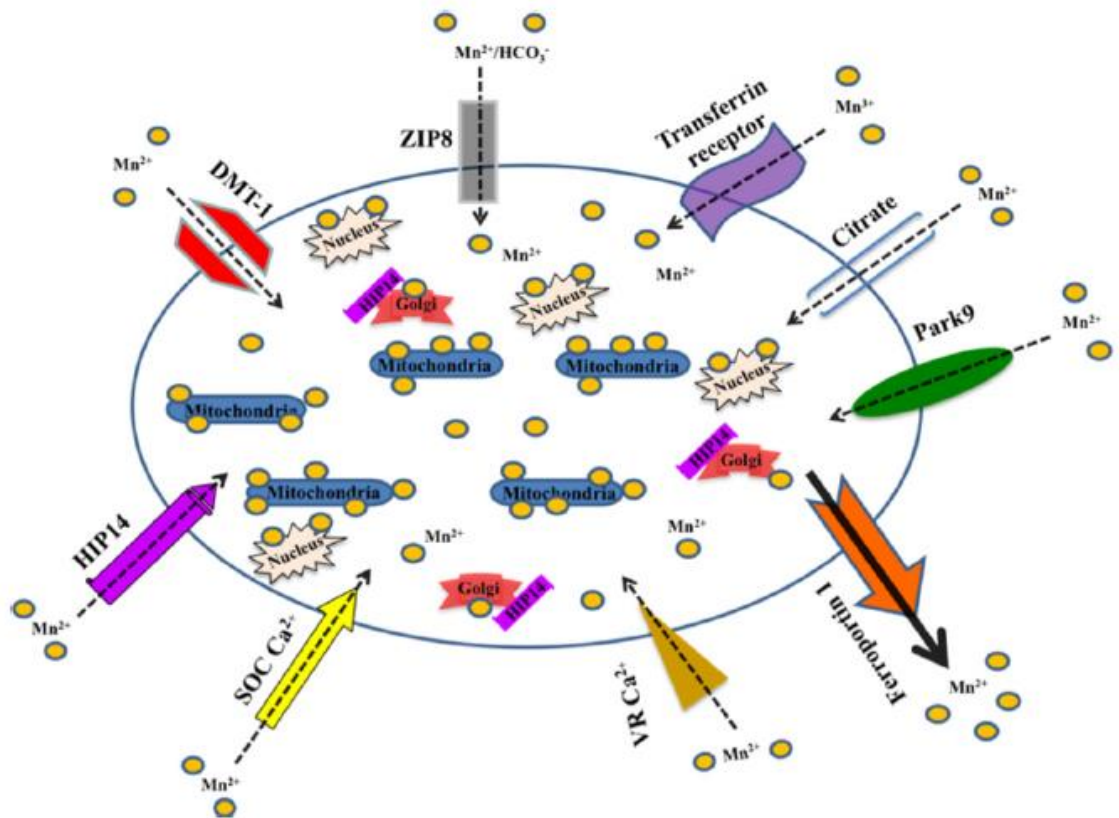


Figura 3. Absorción del manganeso (Reproducción de la imagen Figura 1 presentada por Bowman *et al.*, 2011).

- Zinc (Figura 4): La absorción de Zn está regulada por dos grandes familias de transportadores específicos: ZnT y ZIP. Los transportadores ZnT reducen la disponibilidad intracelular de zinc promoviendo el eflujo de zinc de las células o en las vesículas intracelulares, mientras que los transportadores ZIP incrementan el zinc intracelular y promueven la absorción de zinc extracelular. Existen 14 miembros de la familia ZIP que tienen 8 dominios transmembranales y son las proteínas que regulan la absorción del metal. Los transportadores DMT1 desempeñan un papel menor en el transporte de Zn. Después de la absorción, el Zn en el plasma está principalmente ligado a la albúmina (Rucker *et al.*, 2008; Hojyo y Fukada, 2016).

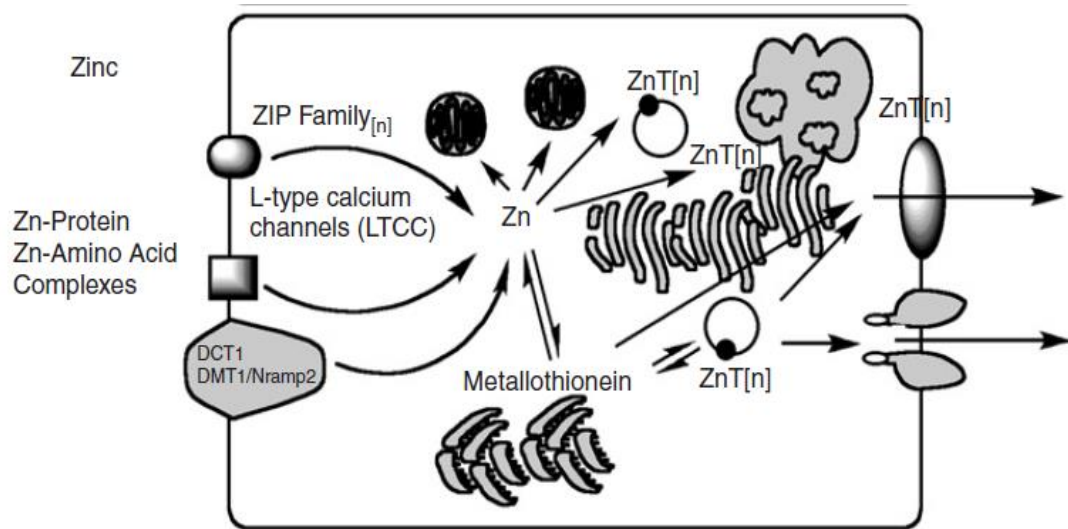


Figura 4. Absorción del Zinc (Reproducción de la imagen Figura 22-4 presentada por Rucker *et al.*, 2008).

- Selenio (Figura 5): Las formas de selenito y selenato deben reducirse primero a través de un sistema de reducción de glutatión hasta HSe^- antes de que se pueda utilizar como cofactor. Por el contrario, selenometionina (SeMet) y selenocisteína (SeCys) siguen las rutas de los aminoácidos (metionina y cisteína) a través de la mucosa del intestino delgado y se absorben como moléculas intactas. El Se absorbido se transporta en el plasma asociado a una selenoproteína denominada selenoproteína P, hasta que entra en los tejidos (Rucker *et al.*, 2008; Suttle, 2010).

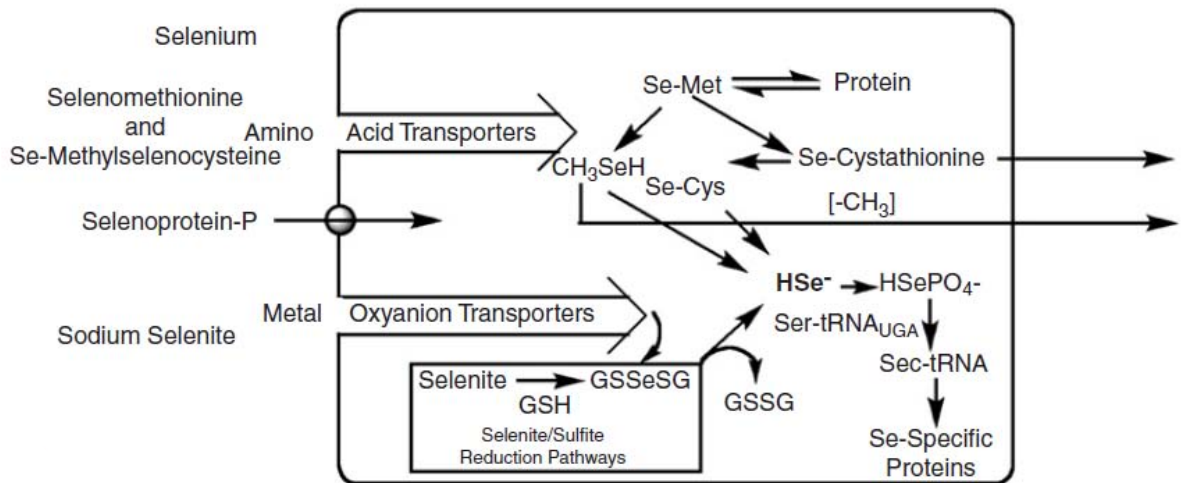


Figura 5. Absorción del selenio (Reproducción de la imagen Figura 22-4 presentada por Rucker *et al.*, 2008).

Los minerales son almacenados en los tejidos unidos a proteínas por su alta capacidad reactiva, por ejemplo, Cu unido a metalotioneínas y Fe a ferritina. En contraste con Cu y Fe, Zn no es almacenado por el cuerpo en gran medida, y por lo tanto exhibe un mayor recambio (Rucker *et al.*, 2008; Hojyo y Fukada, 2016). La tasa de recambio de los minerales varía de tejido a tejido, pero generalmente son altas en la mucosa intestinal y el hígado, intermedios en otros tejidos blandos y lentos en hueso, aunque están influenciadas por el estado fisiológico (por ejemplo, lactancia) y nutricional (deficiente o sobrecargado). Además, los minerales secretados por el hígado (bilis) en el intestino pueden ser reabsorbidos, y el reciclaje resultante retrasa el inicio de la deficiencia (Underwood y Suttle, 1999).

2.2.1.1. Interacción entre minerales

Las interacciones entre los minerales son una causa importante de variación en la disponibilidad (Figura 6). Los mecanismos principales por los cuales causan problemas son: formación de complejos inabsorbibles en el intestino (por ejemplo, fitato metálico); competencia entre cationes por el transportador divalente metálico

(Fe y Mn) y competencia entre aniones similares para una vía metabólica (por ejemplo, SO_4^{2-} y MoO_4^{2-}). Por ejemplo, en la absorción de Cu, altos niveles de Ca, S, Zn, Cd o Mo reducen su absorción y en el caso de Fe, los minerales Zn, Mn, Cu o Co interferirán (Suttle, 2010).

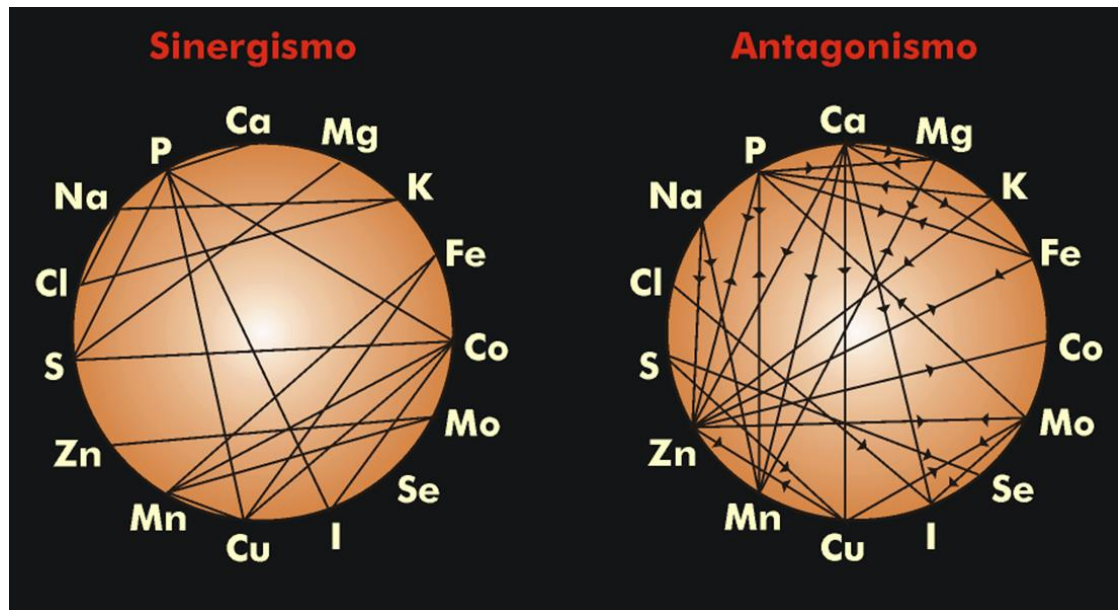


Figura 6. Interacción entre minerales (Reproducción de la imagen Figura 1 presentada por Georgievskii *et al.*, 1982).

2.2.2. Fuentes de minerales

La elección de los componentes para un alimento se determina por lo siguiente:

- La pureza y costo por unidad del elemento o elementos requeridos;
- La forma química, que puede determinar la estabilidad y disponibilidad del elemento requerido;
- Tamaño de partícula, que puede afectar la facilidad y seguridad de la mezcla y disponibilidad para el animal;
- La ausencia de impurezas nocivas, como el cadmio y flúor; y
- Compatibilidad con otros ingredientes.

La fuente de mineral en forma inorgánica (sulfatos) es la más utilizada en la industria y se sabe que tiene una disponibilidad relativa del 100% (NRC, 2012); sin embargo, las formas queladas (orgánicas) se consideran ampliamente más biodisponibles que las fuentes inorgánicas, pero las respuestas en producción generalmente han sido pequeñas e inconsistentes (Suttle, 2010).

2.2.3. Requerimientos

Los requerimientos de minerales traza son difíciles de estimar debido a que la medición efectiva de su absorción y utilización es difícil, además de que se encuentran fuertemente regulados. Los animales pueden ajustarse a una ingesta mineral subóptima reduciendo la concentración del mineral en tejidos o productos. Las concentraciones utilizadas para la producción animal deben ser suficientes para optimizar la cantidad de producto, así como la calidad.

Un requisito básico o mínimo para cualquier mineral puede ser concebido como la concentración a la cual todos los procesos que involucran a ese mineral se llevan a cabo de manera óptima, así mismo debe haber una serie de niveles máximos seguros en la dieta; dosis altas pueden desequilibrar el metabolismo, por ejemplo, el Fe libre es citotóxico debido a su alto potencial de óxido-reducción y a la capacidad de generar radicales libres de oxígeno a través de reacciones de Haber-Weiss y Fenton (Kehrer, 2000) o el Cu como se mencionó anteriormente. También es importante destacar que las diferentes formas químicas y físicas en que un mineral está presente afectan el requerimiento, las tolerancias y pueden determinar la eficiencia con la que se absorbe (Figura 7; Suttle, 2010).

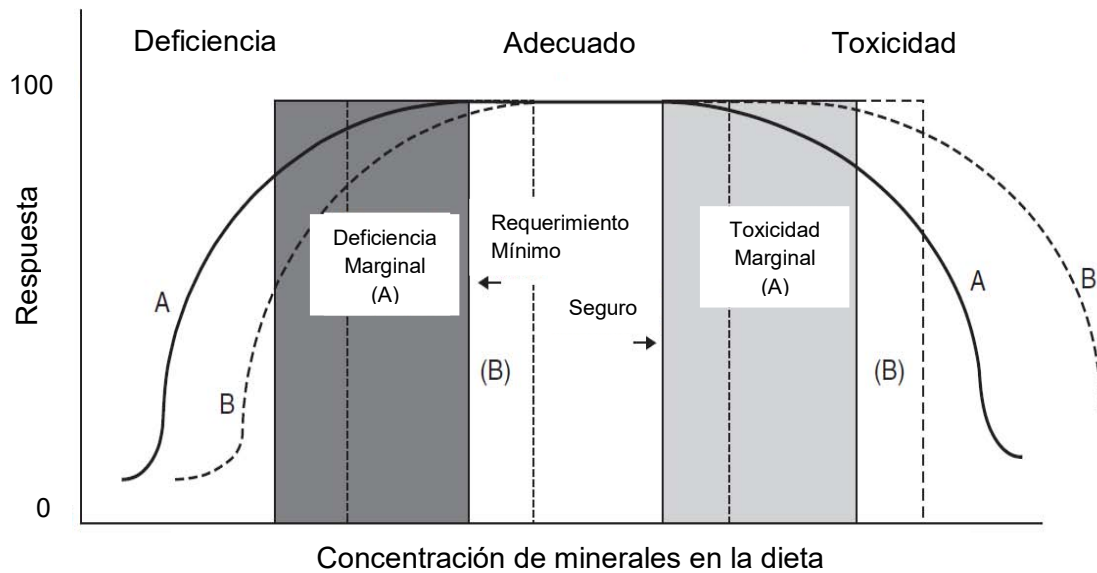


Figura 7. Relación dosis-respuesta entre el suministro de minerales y la producción animal; A representa una fuente más absorbible que B (Modificación de la imagen Figura 1.3 presentada por Suttle, 2010).

El NRC (2012) estimó los requerimientos para cerdos en crecimiento y finalización (25-125 kg) a partir de fuentes inorgánicas o sulfatos (disponibilidad relativa del 100%) en: Cu, 3.4 ppm, Fe, 47 ppm, Mn, 2 ppm y Zn, 53 ppm.

2.2.4. Uso de vitamina E como antioxidante

Cuando se evalúan los efectos antioxidantes y pro-oxidantes de los minerales traza, debe ser medida la función del resto de los componentes en la dieta, por ejemplo, la vitamina E (Lauridsen *et al.*, 1999).

La vitamina E es un antioxidante asociado a la membrana que puede proteger eficazmente los ácidos grasos insaturados en las membranas celulares y las lipoproteínas del plasma de agentes oxidantes, reduciendo así los daños oxidativos (Sales y Koukolová, 2011; Trefan *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2015).

El nivel recomendado por el NRC (2012) es de 34 UI/kg, mientras que en USA se usan 39 UI/kg (Flohr *et al.*, 2015) y en México las concentraciones promedio son ≤ 70 UI/kg (Celis, 2016). Sin embargo, utilizar concentraciones ≥ 250 UI/kg puede mejorar y proteger la calidad de la carne (Sales y Koukolová, 2011).

2.3. Transformación de músculo a carne

La obtención de carne comienza cuando el animal muere con el degüello, momento en el que se interrumpe el suministro de nutrientes y oxígeno; el primer proceso que se lleva a cabo es la muerte celular programada antes de llegar al *rigor mortis* (Ouali *et al.*, 2006; Kemp y Parr, 2012; Sentandreu *et al.*, 2002), después la conversión de músculo a carne resulta en la detención progresiva del metabolismo (Eskin *et al.*, 2013; D'Alessandro y Zolla, 2013; Warner, 2016), cuando el ATP se agota, los músculos quedan en estado de contracción y se instaura el *rigor mortis* (Honikel, 2004, 2014; Ouali *et al.*, 2006). El metabolismo cambia de aeróbico a anaeróbico favoreciendo la producción de ácido láctico y por lo tanto la disminución del pH, y hay un aumento de la fuerza iónica, en parte, debido a la disfunción de las bombas de iones. Todos estos cambios fisiológicos tienen efecto en la expresión/inhibición de numerosas proteínas, especialmente en los sistemas de enzimas proteolíticas, además de que el metabolismo oxidativo se acelera (Kemp y Parr, 2012; Eskin *et al.*, 2013) generándose radicales libres (RL).

La vida media biológica de los RL es de microsegundos, pero tienen la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando daño a moléculas, membranas celulares y tejidos. Algunos de los daños que ocasionan en las células son: sobre los lípidos poliinsaturados de las membranas, producen pérdida de fluidez y lisis celular como consecuencia de la peroxidación lipídica y sobre los glucósidos actúan alterando las funciones celulares tales como las asociadas a la actividad de las interleucinas y la formación de prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores. Además, la oxidación que causan estos RL afecta a proteínas,

modificando la actividad proteolítica (Astruc *et al.*, 2007; Kemp y Parr, 2012; Eskin *et al.*, 2013; Lomiwes *et al.*, 2014).

2.4. Calidad de la carne

La calidad de la carne está influenciada por múltiples factores, que incluyen raza, genotipo, alimentación, manejo ante y post-mortem, así como interacciones complejas entre los rasgos biológicos y los procesos bioquímicos durante la conversión del músculo a carne y durante su almacenamiento. Generalmente, la calidad se encuentra definida en su composición (% de proteína y % de grasa) y factores de palatabilidad como los aspectos organolépticos: apariencia, olor, color, jugosidad, suavidad y sabor.

El manejo ante y post-mortem influye directamente en la calidad, y si no se realizan de la manera correcta ésta se puede alterar. Dos de los principales defectos en carne de cerdo relacionados con el manejo son carne “Pálida, Suave y Exudativa (PSE) y carne “Oscura, Firme y Seca” (DFD). La rápida glucólisis post-mortem generalmente es causada por estrés agudo antes de la matanza, y resultará en carne PSE, debido a una caída drástica del pH. Por el contrario, la carne DFD se expresa por un estrés crónico antes de la matanza lo que reduce el glucógeno y por lo tanto el pH se mantiene después de la faena. Estos defectos reducen la aceptabilidad del consumidor, la vida útil y el rendimiento, impactando en la economía, tanto del productor como del consumidor (Eskin *et al.*, 2013).

2.5. Enzimas asociadas a calidad

Las enzimas relacionadas con la calidad de la carne forman parte del sistema de defensa antioxidante. Los antioxidantes se clasifican en endógenos, sintetizados por la propia célula, como glutatión peroxidasa; y exógenos, que ingresan en el

organismo a través de la dieta, como la vitamina E, vitamina C, carotenos o flavonoides.

En el sistema enzimático o endógeno se encuentran las enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). La SOD es la responsable de la reacción de dismutación del O_2^{\bullet} a H_2O_2 , que, en reacciones posteriores, catalizadas por la catalasa o por la GPx, se convierte en H_2O y O_2 . La catalasa se encuentra principalmente en los peroxisomas, y su función principal consiste en eliminar el H_2O_2 generado de la oxidación de los ácidos grasos, mientras que la GPx degrada el H_2O_2 citoplasmático (Bekhit *et al.*, 2013). Cabe destacar que estas enzimas requieren de minerales traza como cofactores, tales como Cu, Mn, Se o Zn, para llevar a cabo su acción.

En el sistema no enzimático o exógeno, las células utilizan una serie de compuestos antioxidantes o captadores de radicales libres como son: vitamina E, vitamina C, caroteno, selenio, glutatión reducido (GSH), manganeso, zinc, flavonoides, coenzima Q, entre otros. Cuando dos o más antioxidantes se encuentran en un mismo sistema se produce sinergismo entre ellos, mostrando un efecto total superior al que se puede estimar por una simple adición de sus acciones individuales (Bekhit *et al.*, 2013). Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado RL o hacia varios. La vitamina E, el betacaroteno y el licopeno actúan en el medio liposoluble de la célula y su absorción y transporte se hallan muy vinculados con el de los lípidos (Rodríguez, 2001).

2.6. Proteínas asociadas a calidad

En la actualidad predecir el resultado final de un atributo de calidad es una ventaja para la industria cárnica y la mayoría de los atributos son mediados por proteínas (Lomiwes *et al.*, 2014). El proteoma contiene la información de qué genes se expresaron, los cuales estarán relacionados con la calidad final de la carne; por lo

tanto, la aplicación de la proteómica es esencial para entender cómo se regula el sistema proteico en los organismos. Consecuentemente, ésta puede dar información invaluable de los mecanismos que influyen en los diferentes parámetros de calidad, la cual puede usarse para optimizar la producción y mejorar la calidad de la carne (Torres y Botero, 2012).

Durante la matanza del animal, el estrés se agrava por las condiciones de hipoxia e isquemia impactando en el potencial redox (Kemp y Parr, 2012; Eskin *et al.*, 2013). La oxidación puede inducir la desnaturalización de proteínas o inhibición de enzimas modificando la proteólisis (Astruc *et al.*, 2007; Kemp y Parr, 2012; Eskin *et al.*, 2013; Lomiwes *et al.*, 2014). Además, antes del *rigor mortis* se lleva a cabo la cascada de señalización para el proceso de muerte celular programada, la cual estará activa mientras las caspasas no sean inactivadas (Ouali *et al.*, 2006; Kemp y Parr, 2012; Sentandreu *et al.*, 2002). Si las enzimas proteolíticas y caspasas permanecen activas y ejercen su acción, ayudarían en el ablandamiento de la carne. Por ello se sugiere que las condiciones inmediatas a la matanza (antes y después) podrían inducir las proteínas necesarias para modificar la proteólisis post-mortem (Kemp *et al.*, 2010) que lleven a una mejor (si son expresadas y llevan a cabo su acción) calidad de carne.

Existen endoproteínas que se sintetizan en respuesta a estrés físico, químico o biológico conocidas como heat shock proteins o proteínas de choque térmico (HSP), que mantienen la homeostasis celular (Östling *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2009). Algunas como las HSP27, HSP70, HSP90 y $\alpha\beta$ -Cristalina mantienen la integridad de la célula y tienen actividad anti-apoptótica (Lomiwes *et al.*, 2013; Lomiwes *et al.*, 2014; Östling *et al.*, 2007; Mohanty *et al.*, 2010). Van Laack *et al.* (1993) no encontraron una relación contundente en la expresión de HSP70 con parámetros de calidad de la carne, posiblemente por la variación inherente asociada al tamaño de muestra. Di Luca *et al.* (2011) encontraron que muestras con baja pérdida de agua por goteo y desnaturalización proteica sobre-expresaron la proteína HSP70

en cerdo. Yu *et al.* (2009), Hwang *et al.* (2005), Bernard *et al.* (2007) y Kim *et al.* (2008) sugieren que la disminución de HSP27 en *longissimus dorsi*, *longissimus thoracis* favorece la degradación de actina y miosina, mejorando la suavidad de la carne de cerdo y res respectivamente. Sin embargo, los mecanismos de acción de las HSP sobre los atributos de calidad de carne son parcialmente conocidos (Lomiwes *et al.*, 2014).

2.7. Parámetros de calidad

Algunos de los parámetros que usualmente se determinan para evaluar la calidad de la carne son:

- pH: la velocidad con que disminuye el pH después de la muerte del animal es determinante en la calidad de la carne, debido a que puede disminuir hasta el punto isoeléctrico (pH 5.3-5.6) de las proteínas miofibrilares y por lo tanto afectar su estructura (Bendall *et al.*, 1988) modificando por consiguiente la retención de agua, color y textura.
- Temperatura: determinante en calidad de carne puesto que acelera o retarda los procesos bioquímicos que se están llevando a cabo en la transformación de músculo a carne.
- Color: que se define por el grado de oxigenación de la mioglobina y el estado oxidativo del hierro hemo. La mioglobina oxigenada da una apariencia de carne roja, un color atractivo para el consumidor y un color rojo oscuro en ausencia de oxígeno. La oxidación del hierro hemo de un estado ferroso (Fe^{2+}) a un férrico (Fe^{3+}) da lugar al color marrón y con frecuencia se asocia a la liberación de radicales de oxígeno. La concentración de oxígeno residual y la formación de radicales se cree que

son la principal causa del deterioro del color de la carne almacenada, pero los mecanismos subyacentes aún no son claros (Ouali *et al.*, 2006).

- Capacidad de retención de agua (hidratación): muchas de las propiedades sensoriales de la carne como son el color y la suavidad están relacionadas con la cantidad de agua que se tiene contenida o retenida en la carne; el agua es una molécula dipolar y, como tal, se ve atraída por especies cargadas, como las proteínas; y debido a estas características la carne puede retener el agua. Nutricionalmente, una baja retención resulta en pérdidas importantes de agua, que acarrearán, proteínas, minerales y vitaminas hidrosolubles. Desde el punto de vista industrial, la capacidad de una carne para retener el agua originalmente contenida, así como el agua que se añade durante los procesos industriales, por ejemplo, durante el marinado o la inyección, influye en la eficiencia del sistema y dicta en parte el rendimiento final del producto.
- Pérdida de agua por goteo: definida como la cantidad de líquido exudado de la carne, sin la aplicación de una fuerza mecánica externa, utilizando únicamente la gravedad. El exudado es básicamente agua y proteínas que se liberan del músculo (Braña *et al.*, 2011).

En laboratorios especializados también se realizan otras técnicas de evaluación como:

- Actividad antioxidante: medir la capacidad antioxidante en productos alimenticios puede proveer una variedad de información, tal como la resistencia a la oxidación, contribución cuantitativa de sustancias antioxidante o la actividad antioxidante que ellos pueden presentar dentro del organismo cuando es consumido (Frankel y Meyer, 2000). Algunos de los métodos utilizados son: estabilización del radical 2,2-difenil-1-

picrilhidracilo (DPPH), estabilización del radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS) y poder antioxidante reductor del hierro (FRAP).

- Actividad enzimática (GPx, SOD y CAT); ver apartado 2.5.
- Oxidación lipídica y proteica: la oxidación lipídica en la carne ocurre mediante un mecanismo autocatalítico de radicales libres llamado autooxidación en el que se generan productos más estables, alcoholes, ácidos y aldehídos (siendo el MDA uno de los aldehídos utilizados en la medición de la oxidación; Fernández *et al.*, 1997). Todos estos productos pueden afectar negativamente el olor, sabor, valor nutricional y por ende la calidad de los alimentos, siendo en productos cárnicos una de las mayores causas de deterioro (de Azevedo *et al.*, 2003). La oxidación proteica puede estar asociada a cualquiera de los factores pro-oxidativos involucrados en la formación de radicales libres y es responsable de muchas modificaciones biológicas como la fragmentación, agregación y el cambio en la solubilidad de las proteínas (Mercier *et al.*, 2004), las cuales se relacionan con un descenso en la funcionalidad de las proteínas musculares causando un aumento en la pérdida de agua, geles proteicos más débiles o emulsiones menos estables (Ventanas *et al.*, 2006).
- Fuerza de corte (Warner-Bratzler): uno de los cambios más importantes durante la maduración en la vida de anaquel es el ablandamiento de la carne y el establecimiento del perfil sensorial, que se lleva a cabo debido a la acción de enzimas proteolíticas (Ouali *et al.*, 2006; Lomiwes *et al.* 2013). Evaluando la fuerza de corte se pueden hacer inferencias del proceso de maduración y la calidad de la carne.

III. JUSTIFICACIÓN

La demanda creciente de carne a nivel mundial requiere estrategias más amigables con el ambiente; el crecimiento de las explotaciones pecuarias exige la aplicación de rutinas de producción que compensen los efectos del tamaño, entre otras prácticas, se ha desarrollado el uso de minerales de fuente orgánica que, por su biodisponibilidad, pueden además favorecer aspectos asociados a parámetros de calidad de la carne. Sin embargo, es necesario información que permita el uso adecuado de estos minerales en dietas para cerdos.

IV. HIPÓTESIS

Por la susceptibilidad al estrés oxidativo que origina la actividad proteolítica, la concentración y disponibilidad de los minerales en los tejidos puede alterar el rendimiento y la calidad de la carne, particularmente durante el proceso post-mortem de transformación del músculo. Los excesos pueden ser pro-oxidantes y las deficiencias reducir la resistencia a la oxidación. Entonces, por su mayor biodisponibilidad menores densidades de minerales traza en la dieta pueden ser efectivos para proteger la calidad de la carne.

V. OBJETIVOS

5.1. General

Evaluar el uso de los minerales traza quelados en la producción de cerdos y su efecto sobre la estabilidad oxidativa, y la expresión y actividad de las proteínas involucradas en el proceso de transformación de músculo a carne.

5.2. Específicos

- Determinar el rendimiento productivo en cerdos alimentados con minerales de origen quelado (Bioplex-®, Alltech de México, S.A. de C.V.) o inorgánico (Sulfatos).
- Medir la calidad de carne de cerdos suplementados con minerales de origen quelado (Bioplex-®, Alltech de México, S.A. de C.V.) o inorgánico (Sulfatos) en el músculo *Longissimus dorsi*.
- Determinar la expresión de proteínas ($\alpha\beta$ -Cristalina, HSP20, HSP27, HSP40, HSP70, Caspasa 3, Caspasa 7 y Caspasa 9) durante la obtención de carne de cerdos suplementados con minerales de origen quelado (Bioplex-®, Alltech de México, S.A. de C.V.) o inorgánico (Sulfatos) en el músculo *Longissimus dorsi*.

VI. METODOLOGÍA

6.1. Sitio experimental

Se realizó el ensayo de comportamiento productivo en la granja experimental del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal (CENID-Fisiología, INIFAP), localizada en la comunidad de Ajuchitlán, municipio de Colón, Querétaro, México, a 20°41'33.23" N y 100°00'43.11" O y 1961 m sobre el nivel del mar. El área de engorda cuenta con jaulas individuales delimitadas con estructura de acero, el piso frontal es de concreto (70%) y en la parte posterior de malla trenzada de acero inoxidable (30%) con declive hacia la parte posterior, cuenta con chupón y comedero de metal en los extremos opuestos de la jaula. La superficie efectiva de cada jaula es de 2.16 m² (largo 2.34 m, ancho 0.92 m y 0.90 m de altura). Las determinaciones de laboratorio se llevaron a cabo en el Laboratorio de Nutrición, Carnes y Biología Molecular del CENID-Fisiología.

6.2. Animales

Se utilizó un total de 145 cerdos [PIC337 × (Large White × Landrace)] de un solo grupo de partos, iniciando el manejo de los animales a 54 ± 0.7 d de edad.

6.3. Tratamientos

Los tratamientos fueron establecidos mediante la adición de 8 diferentes premezclas de minerales traza a una sola dieta basal por fase de alimentación, cuyos detalles se muestran en el Cuadro 1. Todas las premezclas se añadieron al 0.3%, utilizando sorgo (grano) molido como vehículo.

Cuadro 1. Dietas basales, por fase de alimentación.

Ingrediente (kg/ton)	Fase 4	Fase 5	Fase 6	Fase 7
Sorgo, grano (8.5%)	761.10	775.20	796.70	813.50
Soya, pasta (47%)	147.00	114.00	87.00	77.00
Canola, pasta (36%)	45.00	70.00	80.00	80.00
Sebo	20.00	16.00	12.00	6.00
Carbonato de calcio	7.20	7.10	7.30	6.70
L-Lisina	4.60	4.40	4.34	3.40
Fosfato (mono-di Ca)	4.20	2.90	2.70	4.20
Sal, NaCl	3.60	3.60	3.60	3.60
Premezcla de minerales traza ^a	3.00	3.00	3.00	3.00
L-Treonina	1.60	1.55	1.55	1.10
Colina HCl (60%)	0.80	0.80	0.85	0.90
DL-Metionina	0.63	0.40	0.29	--
Tilosina	0.50	0.30	--	--
Premezcla de vitaminas ^b	0.50	0.50	0.40	0.40
6-Fitasa	0.20	0.20	0.20	0.20
L-Triptófano	0.07	0.05	0.07	--
Σ	1,000.00	1,000.00	1,000.00	1,000.00

^a La composición de las premezclas de minerales se muestra en el Cuadro 3.

^b La premezcla de vitaminas aporta por kg las siguientes concentraciones de cada nutriente: Vitamina A, 20,000 UI; Vitamina D₃, 4,000 UI; Vitamina E, 120 mg; Vitamina K, 16 mg; Tiamina (B₁), 7 mg; Riboflavina (B₂), 20 mg; Piridoxina (B₆), 12 mg; Cianocobalamina (B₁₂) 0.10 mg; Niacina (B₃) 120 mg; Ácido pantoténico (B₅), 70 mg; Ácido fólico (B₉), 3 mg; Biotina (B₇), 0.60 mg.

Los primeros cuatro Tratamientos fueron la adición de Cu, Fe, Mn y Zn a partir de fuentes orgánicas (Bioplex-®, Alltech de México, SA de CV), en niveles graduados, de un nivel equivalente a ≈50% del requerimiento NRC (2012; Gowanlock *et al.*, 2013, 2015) a concentraciones como se pueden encontrar en formulaciones industriales, para fijar el nivel más alto se tomaron en cuenta los promedios encontrados en publicaciones estadounidenses (Flohr *et al.*, 2015; National Swine Nutrition Guide PIG 07-02-06), además de ser consultados con nutriólogos expertos en el ámbito en México; los niveles fueron añadidos independientemente del aporte de minerales de los ingredientes: OR1 a OR4. El tratamiento 5 (IN5) fue un control con altos niveles de minerales traza (como OR4), pero a partir de sulfatos. Los tratamientos OR1 a OR4 e IN5 tuvieron una dosis de vitamina E de 60 mg/kg. Considerando que niveles altos de minerales podrían tener efectos pro-oxidantes se incluyeron los siguientes tratamientos: 6 (OR6), 7 (OR7) y 8 (IN8) que fueron respectivamente OR1, OR4 e IN5, pero la dosis de vitamina E se incrementó a 280 mg/kg durante los últimos 42 días para enriquecer la capacidad antioxidante endógena (Cuadros 2 y 3). Los niveles de selenio fueron los mismos para todos los tratamientos (0.2 ppm), a partir de selenio de fuente orgánica (Selplex®).

Cuadro 2. Descripción de los Tratamientos, por la densidad y fuente de minerales traza (premezcla de minerales adicionada a 0.3% de la dieta).

mg/kg	Tratamiento ^a							
	OR1	OR2	OR3	OR4	IN5	OR6 ^b	OR7 ^b	IN8 ^b
Cu	2	7	12	17	17	2	17	17
Fe	20	60	100	140	140	20	140	140
Mn	1	16	31	46	46	1	46	46
Zn	25	60	95	130	130	25	130	130

^a Tratamiento, por fuente, orgánica (OR; Bioplex-®, Alltech de México, S. A. de C. V.) e inorgánica (IN; Sulfatos).

^b Incremento de vitamina E a 280 mg/kg.

Cuadro 3. Composición de la premezcla de minerales traza.

Ingrediente (kg/ton)	Tratamiento ^a							
	OR1	OR2	OR3	OR4	IN5	OR6	OR7	IN8
Sorgo, grano	2.473	1.823	1.173	0.523	1.774	2.383	0.433	1.654
Cu	0.020	0.070	0.120	0.170	0.067	0.020	0.170	0.067
Fe	0.133	0.400	0.667	0.933	0.467	0.133	0.933	0.467
Mn	0.007	0.107	0.207	0.307	0.156	0.007	0.307	0.156
Zn	0.167	0.400	0.633	0.867	0.366	0.167	0.867	0.366
Se ^b	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
Vitamina E ^c	-	-	-	-	-	0.090	0.090	0.090
Σ	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000

^a Tratamiento, por fuente, orgánica (OR; Bioplex-®, Alltech de México, S. A. de C. V.) e inorgánica (IN; Sulfatos).

^b Sel-Plex®, levadura de selenio.

^c α-tocopherol (ROVIMIX E50).

Las composiciones calculadas de las dietas basales se muestran en el Cuadro 4, donde las concentraciones de los minerales traza se estimaron a partir de los ingredientes; Fe y Mn fueron relativamente altos, mientras que Se y Zn totales fueron menores que los requerimientos. En el Cuadro 5 se muestran las concentraciones de los minerales traza en las dietas experimentales (método ICP-AES; Kingston *et al.*, 1988; AOAC, 1990 y 2000), y el estudio combinado de estos dos Cuadros (4 y 5) permite la verificación de los niveles agregados de minerales traza por las premezclas preparadas, de acuerdo con el diseño del experimento.

Cuadro 4. Análisis calculado de algunos nutrientes en las dietas basales, por fase de alimentación.

Variable	Fase 4	Fase 5	Fase 6	Fase 7
EM, Mcal/kg	3.25	3.23	3.20	3.18
Proteína cruda ^a , %	15.50	14.92	14.18	13.73
Lisina digestible ^b , %	0.90	0.85	0.80	0.71
Cu ^c , ppm	6.85	6.43	6.08	5.97
Fe ^c , ppm	110.72	107.09	103.17	101.81
Mn ^c , ppm	18.10	18.39	18.21	18.07
Zn ^c , ppm	25.57	25.84	25.54	25.35
Se ^c , ppm	0.17	0.18	0.18	0.18

^a Por cada fase de alimentación todos los alimentos se analizaron con fines de constatación. Los resultados promedio fueron los siguientes en g/kg: Fase 4, 156.1±8.28; Fase 5, 138.8±8.51; Fase 6, 147.4±6.13 y Fase 7, 135.3±5.42.

^b Digestibilidad ileal estandarizada.

^c Corresponden al aporte total por los ingredientes.

Cuadro 5. Concentración analizada de los minerales traza en las dietas experimentales (medias de mínimos cuadrados del contenido total y del promedio de las fases de alimentación).

Variable (ppm)	Tratamiento ^a								EEM ^b
	OR1	OR2	OR3	OR4	IN5	OR6	OR7	IN8	
Cu	7.77	12.76	17.78	21.49	21.62	10.00	21.39	25.76	1.148
Fe	157.05	204.24	220.66	259.85	264.19	161.55	308.66	311.27	7.100
Mn	23.58	37.07	47.09	60.09	60.65	27.75	73.39	74.52	1.360
Zn	57.91	87.80	114.16	147.30	146.91	60.78	160.76	160.77	2.282

^a Tratamiento, por fuente, orgánica (OR; Bioplex-®, Alltech de México, S. A. de C. V.) e inorgánica (IN; Sulfatos).

^b EEM, Error estándar de la media.

6.4. Diseño experimental

La aleatorización fue realizada para un Diseño de Bloques Completos al azar, siendo el bloque la fecha de inicio a los Tratamientos, tomando en cuenta la cosecha programada a un peso corporal similar, después de un período experimental de 84 días.

6.5. Alimentación

Los cerdos fueron alimentados y manejados de forma idéntica con el fin de explotar su potencial productivo. La alimentación fue por etapas de 21 días a partir del destete, las dietas fueron ofrecidas en forma de harina. Cada etapa de alimentación fue ajustada a los requerimientos de EN y lisina siguiendo las recomendaciones del NRC (2012) de acuerdo al peso vivo corporal. A partir del día 63 y después del proceso de aleatorización los cerdos recibieron una de ocho dietas experimentales hasta el momento de la cosecha. Los cerdos fueron alimentados de cuatro a dos comidas al día, dependiendo de la fase de crecimiento en la que se encontraban, se verificó el adecuado uso y servicios de las instalaciones. El experimento fue conducido bajo las rutinas de manejo de la granja. La alimentación fue *ad libitum*, y se registró el alimento ofrecido y el remanente, el cual se contabilizó al final de cada semana. Las fases de alimentación se detallan en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Fases de alimentación y tiempo de duración.

Fase	Duración (días)		Tipo de dieta
	Inicio	Fin	
1	21	28	Convencional
2	28	42	Convencional
3	42	63	Convencional
4	63	84	Experimental
5	84	105	Experimental
6	105	126	Experimental
7	126	>147	Experimental

6.6. Manejo

Los cerdos fueron pesados al nacimiento con el fin de homogeneizar camadas, teniendo como criterios de aleatorización la camada de origen, sexo y peso del lechón. La homogenización de camadas tuvo como objetivo proporcionar a los lechones las mejores condiciones para una óptima sobrevivencia y desarrollo. Posteriormente, se destetaron camadas completas (a los 21 días de vida) con el fin de mantener la integridad y disminuir el estrés asociado, se utilizaron corraletas colectivas con capacidad de 6-8 lechones, alojados en una nave con condiciones de temperatura, humedad y ventilación controladas, durante 21 días. Finalizado el tiempo en destete (42 días de edad) los cerdos fueron movilizados a corrales colectivos de piso de concreto, manteniendo la integridad de las camadas durante 21 días (hasta los 63 días de edad). A los 63 días de edad los cerdos se movilizaron al área de engorda (jaulas individuales) donde permanecieron hasta la matanza.

Cabe señalar, que la unidad experimental desde el destete hasta los 63 días de edad fueron los corrales colectivos; posteriormente la unidad experimental fue el

cerdo alojado individualmente. Con el fin de dar seguimiento al potencial de crecimiento de las diferentes unidades experimentales, se realizaron pesajes individuales de los cerdos cada 21 días de alojamiento. Los criterios de respuesta que se midieron fueron: ganancia diaria de peso, consumo de alimento y eficiencia alimenticia.

6.7. Toma de muestras

6.7.1. Dietas

Los ingredientes usados en la elaboración de las dietas fueron previamente analizados, además se tomaron muestras de las dietas ofrecidas para su análisis en el laboratorio: Materia seca (MS), Energía bruta (EB), Nitrógeno (N), Cenizas (Ce) y Minerales (MIN).

6.7.2. Sangre

A los 63 días de edad (6 animales) y en cada cambio de fase de alimentación se tomaron muestras de sangre de 10 animales por tratamiento, con 12 horas de ayuno antes de recibir la siguiente fase. Las muestras fueron colectadas en tubos vacutainer (uno sin heparina y dos con heparina) de la vena cava e inmediatamente se colocaron en una hielera a 4 °C. La determinación de hemoglobina, hematocrito y eritrocitos se realizó inmediatamente. Para el análisis de estrés (Creatina quinasa y lactato deshidrogenasa) y concentración de minerales se obtuvo el plasma sanguíneo; para la actividad enzimática (GPX, SOD y CAT) y actividad antioxidante (FRAP y ABTS) se obtuvo suero sanguíneo. Para el plasma, la sangre fue centrifugada a 1,500 rpm durante 15 min a 4 °C, y se separó la capa líquida. Para la obtención de suero, las muestras fueron centrifugadas a 3,500 rpm durante 5 min a 4°C, todas las muestras fueron almacenadas a -20 °C para su posterior análisis.

6.7.3. Heces

A los 63 días de edad, se colectaron heces de 6 animales y en cada cambio de fase de alimentación (21 días), se colectaron las primeras heces de la mañana de 10 animales por tratamiento. Las muestras de heces fueron secadas en una estufa de aire forzado a 60 °C durante 72 horas y se almacenaron a temperatura ambiente.

Después de 84 días de tratamiento, los animales fueron sometidos a ayuno durante 16 horas y se transportaron al rastro cumpliendo con la norma de bienestar animal (NOM-051-ZOO-1995, Trato humanitario en la movilización de animales). Los animales fueron aturdidos eléctricamente y posteriormente degollados hasta su muerte en un rastro TIF (NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres). Posteriormente se tomaron muestras de hígado y músculo.

6.7.4. Hígado

A los 63 días de edad, se obtuvieron muestras de hígado de 6 animales faenados según la NOM-033-SAG/ZOO-2014. Después de 84 días de tratamiento, en rastro se tomaron muestras de 8 animales por tratamiento. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C para su posterior análisis.

6.7.5. Músculo para la determinación de potencial glucolítico e identificación de proteínas

Al iniciar el proceso de matanza se identificó el músculo *Longissimus dorsi* (LD) de acuerdo a la Figura 8.

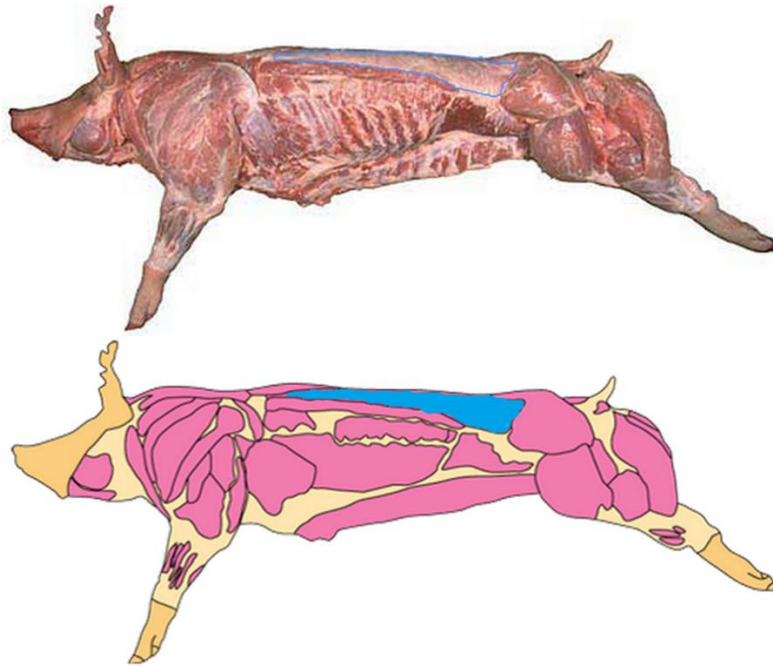


Figura 8. Vista lateral con identificación anatómica del músculo *Longissimus dorsi* (Porcine Myology: <http://porcine.unl.edu/porcine2005/pages/index.jsp>. Consulta: 18 de septiembre de 2015).

Se inició la toma de muestras inmediatamente después del desangrado, a los 45 minutos y 24 horas post-mortem. Las muestras fueron de aproximadamente 3 g para cada tiempo de muestreo de LD (entre la décima y última costillas). La temperatura y pH fueron medidos a los 45 min y 24 horas post-mortem directamente en la canal.

Las muestras del tejido muscular (LD) se tomaron con un cilindro de acero inoxidable de 1 cm de diámetro del lado derecho de la canal (Figura 9), separadas al menos 2.0 cm entre cada muestreo y fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a -80 °C para su posterior análisis.



Figura 9. Toma de muestras utilizando un cilindro de acero inoxidable.

6.7.6. Músculo para la determinación de parámetros de calidad y concentración de minerales

Las canales se mantuvieron a 4 °C, y a las 24 horas el LD del lado izquierdo se extrajo de la canal. La porción correspondiente entre la novena y última costillas (LD) se cortó en chuletas de 2.5 cm de grosor (para fuerza de corte) y de 1 cm (para las demás técnicas: pH, temperatura, color, capacidad de retención de agua, pérdida de agua por goteo, fuerza de corte, análisis sensorial, contenido de mioglobina, oxidación proteica, oxidación lipídica, actividad enzimática, actividad antioxidante y minerales).

Las demás chuletas fueron empacadas al vacío, y se mantuvieron en una cámara de refrigeración a 4 °C. Se llevaron a cabo muestreos a diferentes tiempos (1, 7, 14 y 21 días) para el análisis de vida de anaquel.

A los 63 días de edad, de 6 animales faenados según la NOM-033-SAG/ZOO-2014, se tomaron muestras de carne (LD) para determinar la concentración de minerales. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C para su posterior análisis.

6.8. Análisis de muestras

6.8.1. Hemoglobina, hematocrito y eritrocitos

La concentración de hemoglobina, hematocrito y eritrocitos fue determinada mediante un analizador ADVIA 1800 Chemistry System (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.) con reactivos y calibradores de Siemens®.

6.8.2. Creatina quinasa (CK) y Lactato deshidrogenasa (LDH)

Las actividades en plasma se determinaron mediante un kit comercial (CK-NAC 1271360 y LDH-P 1009267, Wiener lab.) usando un espectrofotómetro.

6.8.3. Potencial glucolítico y glucógeno

Las concentraciones de glucosa, glucosa 6-fosfato, glucógeno y lactato se determinaron utilizando métodos enzimáticos (Bergmeyer, 1974; Dalrymple y Hamm, 1973) descritos por Hammelman *et al.* (2003). Las muestras de músculo congelado (0.1 a 0.3 g) se molieron usando un mortero y se homogeneizaron en 10.0 mL de ácido perclórico (APC) 0.5 M. Una alícuota del extracto de 500 µl se

centrifugó a 40,000 g durante 20 min. Los sobrenadantes de este extracto se utilizaron para la determinación de glucosa, glucosa 6-fosfato y lactato.

Tres alícuotas de los extractos (250 μ l) se sometieron a hidrólisis utilizando 25 μ l de KOH (30%) y 500 μ l de amiloglucosidasa (13.0 mg/mL), se incubaron en un baño de agua a 37 °C durante tres horas. Después de la incubación, se añadieron 50 μ l de APC 0.3 M para detener la hidrólisis. Las muestras se centrifugaron a 40,000 g durante 15 min. Los sobrenadantes se recuperaron y se utilizaron para la determinación de glucógeno.

Para la determinación de glucosa y glucosa 6-fosfato en el músculo se añadieron 400 μ l del extracto a 1,700 μ l de buffer de trietanolamina (TEA) 0.47 M en un tubo de ensayo de 5 mL. Se tomó una alícuota de 210 μ l y se midió la absorbancia inicial (OD1) a 340 nm. Se añadió a cada tubo 35 μ l de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (3.5 UI/muestra) y se incubó durante 5 min. Se midió la absorbancia (OD2) a 340 nm. Para la determinación de glucosa, se añadieron a cada tubo 20.4 μ l hexoquinasa (2.04 UI/muestra) y 40.7 μ l ATP (11 mg/mL). Los tubos se incubaron durante 5 min y se midió la absorbancia (OD3) a 340 nm. Los valores de absorbancia asociados con la glucosa 6-fosfato se calcularon restando OD1 de OD2. Del mismo modo, los valores de absorbancia asociados con la glucosa en el músculo se determinaron restando OD2 de OD3. Las cantidades de glucosa en el músculo y la glucosa 6-fosfato se determinaron a partir de curvas estándar de 0, 50, 100 y 200 mM NADPH. Las concentraciones de glucosa 6-fosfato y glucosa se expresaron en mmoles/g de músculo.

La concentración de glucógeno muscular se determinó mediante la adición de 100 μ l del extracto hidrolizado a 2,000 μ l de buffer de TEA 0.1 M. Alícuotas de 210 μ l se midieron por triplicado (OD1) a 340 nm. Se añadieron al tubo 35 μ l de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa (35 μ l) y ATP (70 μ l). La reacción se dejó incubar durante 10 min, se tomaron alícuotas por triplicado y se midió la

absorbancia a 340 nm (OD2). Los valores de absorbancia asociados con el glucógeno muscular se determinaron restando OD1 de OD2. Las concentraciones de glucógeno muscular se determinaron a partir de una curva patrón de 0, 50, 100 y 150 mM NADPH. Estos valores incluyen glucosa y glucosa 6-fosfato intermedios que no formaban parte del análisis de glucógeno muscular. Por lo tanto, las concentraciones de glucosa y glucosa 6-fosfato del ensayo anterior se restaron para determinar solamente glucógeno muscular. La concentración de glucógeno se reportó como mmoles/g de músculo.

Para la determinación de la concentración de lactato en el músculo, se añadieron 100 µl de extracto a 3,000 µl de buffer de reacción 0.1 M (Tris-hidrazina 200 mM, NADPH 0.4 mM, pH 9.0) por triplicado. Alícuotas (210 µl) de cada tubo se midieron a 340 nm (OD1). Después se añadió lactato deshidrogenasa (40 µl; 4 UI/muestra), la reacción se incubó durante 2 h a 25 °C y se midió la absorbancia a 340 nm (OD2). Los valores de absorbancia asociados con lactato muscular se determinaron restando OD1 de OD2. Las cantidades de lactato en el músculo fueron determinadas a partir de una curva patrón de 0, 75, 150 y 300 mM NADH. La concentración de lactato se reportó como mmoles/g de músculo. El cálculo de PG se calculó de acuerdo a la fórmula de Monin y Sellier (1985).

$$GP = [2 \times (\text{glucosa} + \text{glucosa-6-fosfato} + \text{glucógeno})] + \text{lactato}.$$

6.8.4. Concentración de minerales

Las muestras fueron digeridas por microondas; se pesaron 0.5 g en tubos de teflón, se añadieron 10 mL de HNO₃ concentrado, y en el equipo se seleccionó el método de digestión (Anexo 1). Terminado el protocolo, se filtró con papel filtro Whatman #44 y se aforó a 100 mL. Las muestras fueron almacenadas en contenedores de plástico a temperatura ambiente. Se preparó una curva patrón (estándar multi-elemental para ICP) en agua grado HPLC acidificada al 2% con

HNO₃. La concentración de minerales fue determinada mediante el método ICP-AES (iCAP 6000, Thermo scientific). Se optimizó el equipo durante 24 h con gas argón, y se corrió el análisis seleccionando los metales a evaluar con las respectivas longitudes de onda (Kingston *et al.*, 1988; AOAC, 1990 y 2000). La concentración de cada mineral fue determinada mediante la siguiente formula.

$$\text{ppm final} = (\text{ppm calculadas por ICP}) \times \frac{(10 \text{ mL de HNO}_3)}{(\text{peso de mtra, g})} \times \frac{(\text{mL de aforo})}{(\text{mL de mta digerida})}$$

6.8.5. Parámetros de calidad de la carne

6.8.5.1. pH y temperatura

Se midió directamente en el músculo a los tiempos definidos anteriormente usando un electrodo de vidrio conectado a un medidor de pH HI 99163 (HANNA instruments Inc). El medidor de pH se calibró a dos puntos, 4 y 7 (Honikel, 1998).

6.8.5.2. Color

Los parámetros de luminosidad (L*), índice rojo-verde (a*) e índice amarillo-azul (b*) se midieron con un espectrocolorímetro MiniScan HunterLab (con Iluminante D65 a 10° del observador). Los músculos se expusieron al oxígeno del aire durante al menos 30 min a 5 °C antes de la medición (AMSA, 2012).

6.8.5.3. Contenido de mioglobina

El contenido relativo de deoximioglobina (Mb), oximioglobina (MbO₂) y metamioglobina (MetMb) se calculó a partir de la curva de reflectancia de acuerdo a lo descrito por Krzywicki (1979) usando 700 nm (mayor longitud de onda del instrumento) en lugar de 730 nm. El instrumento midió la reflectancia entre 400 nm

y 700 nm a intervalos de 10 nm. Los valores de reflectancia en las longitudes de onda no dadas por el instrumento (473, 525 y 572 nm) se calcularon utilizando interpolación lineal. Los valores de reflectancia se convirtieron en valores de absorbancia de acuerdo con la fórmula: $A = 2 - \log_{10} R$, donde A es la absorbancia y R es la reflectancia.

6.8.5.4. Capacidad de retención de agua

Determinado por el método de centrifugación: Se pesaron 5 g de carne molida, a la cual se le añadieron 8 mL de NaCl 0.6 M, se agitó durante 1 min y se dejó reposar 30 min en un baño de agua fría, posteriormente se volvió a agitar 1 min y se centrifugó (centrifuga 5810R Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a 10 000 rpm durante 15 min. El sobrenadante fue medido en una probeta de 10 mL, para posteriormente calcular el % de solución salina retenida (Hamm, R., 1975).

6.8.5.5. Pérdida de agua por goteo

Se cortó una chuleta de 100 g, removiendo grasa periférica y se pesó. Posteriormente, la muestra fue suspendida en un gancho de acero dentro de una bolsa de plástico de polietileno con cierre. Las muestras se almacenaron a 4°C y fueron retiradas de acuerdo al tiempo de maduración establecido (24 y 48 h). Después del tiempo de almacenamiento correspondiente las muestras se volvieron a pesar, y la pérdida por goteo se calculó como: $(\text{peso inicial} - \text{peso final de la muestra}) / \text{peso inicial de la muestra} \times 100$ (Honikel, 1998).

6.8.5.6. Capacidad antioxidante por el método FRAP

Se homogenizaron 5 g de carne en 25 mL de buffer de fosfatos (50 mM, pH 7) con un homogeneizador IKA T25 (ULTRA TURRAX, Alemania) durante 1 min. El homogenizado se centrifugó durante 30 min a 10,000 rpm, 4 °C (centrifuga 5810R

Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y posteriormente se filtró con papel filtro Whatman No. 4, el filtrado se colectó en tubos Eppendorf y almacenó a -20 °C, para su posterior análisis. La determinación se realizó de acuerdo a Descalzo *et al.* (2007), se tomó una alícuota de 33 µl del extracto o suero a la cual se le adicionaron 1000 µl de una solución de FRAP [2.5 mL de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina 10 mM) en HCl (40 mM), 2.5 mL de FeCl₃ (20 mM) y 25 mL de buffer de acetatos (300 mM, pH 3.6)]. Se utilizó un blanco espectro el cual contiene TPTZ y un blanco reacción el cual está compuesto por la solución de FRAP y el buffer con el que se homogenizó la muestra. La absorbancia se determinó a 593 nm y las lecturas se tomaron al tiempo 0 y 6 min de iniciada la reacción (espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis Thermo scientific). La curva estándar se realizó con Trolox, y los resultados se expresaron como µM equivalentes de Trolox/g de carne. Se calculó el porcentaje de reducción de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de reducción} = \frac{[(\text{absorbancia de la reacción } t=6) - (\text{absorbancia del blanco reacción})]}{[(\text{absorbancia de la reacción } t=6)]} * 100$$

6.8.5.7. Capacidad antioxidante por el método ABTS

Se homogenizaron 5 g de carne en 25 mL de buffer de fosfatos (50 mM, pH 7) con un homogeneizador IKA T25 (ULTRA TURRAX, Alemania) durante 1 min. El homogenizado se centrifugó durante 30 min a 10,000 rpm, 4 °C (centrifuga 5810R Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y posteriormente se filtró con papel filtro Whatman No. 4, el filtrado se colectó en tubos Eppendorf y almacenó a -20 °C, para su posterior análisis. La actividad antioxidante se determinó mediante la metodología desarrollada por Re *et al.* (1999). La formación del radical ABTS•+ se realizó mediante la reacción de persulfato de potasio (2.45 mM) con ABTS (2,2'azinobis(-3 etilbensotiazolin-6-ácido sulfónico)) (7 mM). Se colocaron 0.0033 g de persulfato de potasio y 0.0194 g del ABTS y se añadió agua destilada (5 mL). La mezcla se agitó y se dejó reposar 16 horas en oscuridad a temperatura

ambiente. Una vez formado el radical ABTS•+ se diluyó con etanol hasta obtener un valor de absorbancia de 0.70 (± 0.1) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción). Se colocaron 980 μ l de del radical ABTS y se mezclaron con 20 μ l del extracto o suero. La mezcla se dejó reaccionar 7 min a temperatura ambiente y protegido de la luz. Se tomó la lectura correspondiente a 754 nm en el espectrofotómetro al tiempo 0 y 7 min. Se realizó una curva de calibración con Trolox, y el resultado se expresó como mg equivalentes de Trolox/100g de carne. El porcentaje de inhibición del radical ABTS se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición del radical ABTS} = (A_{t=0} - A_{t=7}) / (A_{t=0} * 100)$$

6.8.5.8. Catalasa

Se homogenizaron 5 g de carne en 25 mL de buffer de fosfatos (50 mM, pH 7) con un homogeneizador IKA T25 (ULTRA TURRAX, Alemania) durante 1 min. El homogenizado se centrifugó durante 30 min a 10,000 rpm, 4 °C (centrifuga 5810R Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y posteriormente se filtró con papel filtro Whatman No. 4, el filtrado se colectó en tubos Eppendorf y almacenó a -20 °C, para su posterior análisis. La actividad de la catalasa se midió de acuerdo al método descrito por Hernández *et al.* (2004). Se tomó un volumen de 0.1 mL del extracto o 0.1 mL de suero, el cual se hizo reaccionar con 2.9 mL de H₂O₂ (11 mM), la absorbancia se leyó al inicio y durante los 30 segundos siguientes hasta completar 2 min, utilizando un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis (Thermo scientific). Como blanco se usó buffer de fosfatos (50 mM, pH=7). Los resultados se expresaron como U/g de carne. La unidad de catalasa es definida por Aebi (1983) como la cantidad necesaria para descomponer 1 μ mol de H₂O₂ por min, para determinar dicha actividad se utilizó el coeficiente de extinción molar del peróxido de hidrógeno que es de 0.0436 mM⁻¹ cm⁻¹.

6.8.5.9. Glutación peroxidasa

Se homogenizaron 5 g de carne en 25 mL de buffer de fosfatos (50 mM, pH 7) con un homogeneizador IKA T25 (ULTRA TURRAX, Alemania) durante 1 min. El homogenizado se centrifugó durante 30 min a 10,000 rpm, 4 °C (centrifuga 5810R Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y posteriormente se filtró con papel filtro Whatman No. 4, el filtrado se colectó en tubos Eppendorf y almacenó a -20 °C, para su posterior análisis. La actividad de la enzima se determinó de acuerdo al método propuesto por Hernández *et al.* (2004). El método se basa en la disminución de la absorbancia del NADPH por acción de dicha enzima en presencia del peróxido de hidrógeno. La mezcla de reacción se preparó con 880 µl de buffer de fosfato de potasio [40 mM, pH= 7, EDTA (0.5 Mm) y azida de sodio (1 mM)], posteriormente se añadieron 16.6 µl de GSH (glutación reducido, 1 mM), 16.6 µl de glutación reductasa (1.5 U/mL) y 50 µl de extracto o plasma. Los tubos se incubaron durante 5 min a 35 °C, pasado ese tiempo se adicionaron 16.6 µl de NADPH (0.15 mM) y se inició la reacción adicionando peróxido de hidrógeno (0.15 mM) a las muestras o al blanco. Se leyó la absorbancia después de 15 s de iniciada la reacción y se vigiló cada 10 s hasta completar un min. Se usó el coeficiente de extinción molar ($6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para calcular la concentración de NADPH. Los resultados se expresaron como U/100g de carne, una unidad de GPX es definida como la cantidad de extracto requerido para oxidar 1 µmol de NADPH por min.

6.8.5.10 Superóxido dismutasa

Se homogenizaron 5 g de carne en 25 mL de buffer de fosfatos (50 mM, pH 7) con un homogeneizador IKA T25 (ULTRA TURRAX, Alemania) durante 1 min. El homogenizado se centrifugó durante 30 min a 10,000 rpm, 4 °C (centrifuga 5810R Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y posteriormente se filtró con papel filtro Whatman No. 4, el filtrado se colectó en tubos Eppendorf y almacenó a -20 °C,

para su posterior análisis. La actividad de la enzima en el extracto o suero se determinó con un kit comercial (SOD Assay Kit 19160, SIGMA).

6.8.5.11. Oxidación lipídica

Se pesaron 5 g de carne, los cuales se homogenizaron en un baño de hielo mediante un homogeneizador IKA T25 Ultra Turrax (Alemania) con 20 mL de una solución de ácido tricloroacético (TCA), al 5% w/v durante 1 min. El homogenizado se centrifugó durante 20 min a 10,000 rpm, 4 °C. Posteriormente, el sobrenadante se filtró con papel filtro Whatman No. 4, el filtrado se colectó en tubos protegidos de la luz y se almacenó a -20 °C, para su posterior análisis. La determinación de las especies reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) se realizó tomando 1 mL del extracto y se le adicionó 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 80 mM, se agitó y se sometió a un tratamiento térmico a 95 °C durante 30 min, se dejó enfriar y posteriormente se leyó su absorbancia a 530nm (Raharjo *et al.*, 1992). Los resultados se expresaron como mg de malondialdehído (mg MDA) /kg de carne, calculados a partir de una curva de calibración utilizando como estándar malondialdehído.

6.8.5.12. Oxidación proteica

Este método se realizó de acuerdo a Armenteros *et al.* (2009). Se pesaron 3 g de carne y se homogenizaron con 30 mL de buffer de pirofosfato (pH 7.4, 2 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 10 mM trismaleato, 100 mM KCl, 2 mL MgCl_2 y 2 mM EGTA) durante 30 s. De este homogenizado se tomaron dos alícuotas de 0.1 mL, posteriormente se les adicionó 1 mL de TCA al 10%, se centrifugaron por 5 min a 5 000 rpm, se eliminó el sobrenadante; del precipitado se tomaron 2 pellets a uno (A) se le adicionó 1 mL de HCl (2 N) y al otro (B) 1 mL de DNPH al 2% en HCl (2 N), los tubos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente agitando cada 15 min, una vez transcurrido este tiempo se adicionó a cada tubo 1 mL de TCA al 10%, se

centrifugaron durante 5 min a 5 000 rpm y se lavó el precipitado con 1 mL de etanol/acetato de etilo (1:1), se agitó y se re suspendió el precipitado en 1.5 mL de buffer de fosfatos (pH 6.5, 20 mM) con hidrocloreuro de guanidina (6 M). Se calculó la concentración de proteína a 280 nm del pellet A usando como estándar albúmina de huevo, para calcular el contenido de carbonilos en el pellet B a 370 nm se usó el coeficiente de extinción molar para las hidrazonas que es de $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y los resultados se expresaron en nmol de carbonilos por mg de proteína.

6.8.5.13. Fuerza de corte (Warner-Bratzler) y pérdida de agua por cocción

La metodología fue realizada de acuerdo a lo descrito por AMSA (1995), en chuletas de 2.54 cm de espesor. Se utilizó un textuómetro TA.XT-Plus Texture Analyser.

6.8.5.14. Análisis sensorial

Se realizó el análisis sensorial de los siguientes seis tratamientos: OR1, OR4, OR6, OR7, IN5 e IN8 al día 1 y 7. Las muestras se cocinaron de acuerdo a la metodología descrita para la determinación de fuerza de corte (Warner-Bratzler) y se cortaron cubos de 1 cm en dirección a las fibras musculares. Para el análisis sensorial (Severiano *et al.* 2017) se utilizaron panelistas entrenados a los cuales se les dio un grupo de muestras codificadas y aleatorizadas, las cuales ordenaron de acuerdo a la intensidad del atributo. Se evaluó el color, textura, jugosidad y sabor metálico (Formato, Anexo 2).

6.8.6. Identificación y cuantificación de proteínas mediante 2DE/Western Blot y ELISA

Extracción de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares. Las proteínas sarcoplásmicas se extrajeron de 2 g de músculo homogenizado en 6 mL de buffer

de extracción (pH 7.6) que contiene Tris 20 mM, EDTA 2 mM, MgCl₂ 4 mM y una mezcla de inhibidores de proteasas 10 µl/mL. La solución se homogenizó y se centrifugó a 25,460 g durante 20 min a 4 °C (Velocity 14r, Dinamica), el sobrenadante que contiene las proteínas sarcoplásmicas fue almacenado a -80 °C para su posterior análisis. La pastilla se lavó tres veces con agua grado proteómica y se re-suspendió en solución desnaturante (urea 7 M, tiourea 2 M, DTT 1% (w/v), CHAPS 2%, Tris 40 mM, inhibidor de proteasas 5 mM (w/v) y 0.8% (v/v) de anfolitos pH 4-7 y 3-10). Las muestras homogenizadas fueron centrifugadas a 7,000 rpm durante 45 min a 20 °C; los sobrenadantes que contenían las proteínas miofibrilares se colectaron y almacenaron a -80 °C (Marcos y Mullen, 2014). Las concentraciones de proteína fueron determinadas mediante un NanoDrop por triplicado se expresaron en µg/µl.

Electroforesis bidimensional (2DE): Las proteínas sarcoplásmicas del LD fueron separadas por electroforesis 2D; 90 µg de cada fracción proteica se mezclaron con buffer que contenía urea 7 M, tiourea 2 M, DTT 0.3% (w/v), CHAPS 2%, Tris 40 mM, inhibidor de proteasas 5 mM (w/v), 0.8% (v/v) de anfolitos pH 3-10 y bromofenol al 0.1%. Las tiras IPG de 7 cm con rango de pH de 3-10 fueron hidratadas durante 16 horas. El protocolo de isoelectroenfoque (Protean i12 IEF cell, BIO-RAD) que se realizó fue el siguiente: un paso inicial de 20 min a 250 V lineal, e incremento gradual del voltaje hasta 4000 V manteniendo el voltaje hasta un estado continuo o un máximo de 4000 V/h. La corriente y carga se limitó a 0.05 mA y 0.2 W por tira. Las tiras se equilibraron con 10 mL de buffer (Tris HCl pH 8.8 50 mM, urea 6 M, glicerol 30%, SDS 2% y azul de bromofenol 0.1%; con DTT 1% (w/v) adicionado al momento de usarse), se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente en agitación. En seguida se eliminó el buffer y se equilibraron las tiras con el mismo buffer sin DTT y se adicionó iodacetamida al 2.5% durante 15 min a temperatura ambiente. Las proteínas se separaron en una segunda dimensión mediante una SDS-PAGE al 12% (Modificado de Morzel *et al.*, 2008).

Western Blot: La metodología se realizó modificando el protocolo de Pulford *et al.* (2008) y Lomiwes *et al.* (2013). Los geles se sometieron a electrotransferencia sobre membranas de nitrocelulosa en un sistema semi-seco (Transblot SD, BIO-RAD) y fueron bloqueadas por incubación con leche desnatada en polvo al 5% en PBS-Tween (Na_2HPO_4 0.08 M, NaH_2PO_4 0.02 M, NaCl 0.1 M y Tween 1%) durante 16 h a 4 °C. Las membranas se lavaron tres veces con PBS-Tween y después se incubaron con los anticuerpos durante 1 h a 37 °C. Los anticuerpos que se utilizaron fueron los siguientes: Anti- $\alpha\beta$ -Cristalina (Abcam ab13497, dilución 1:1000), Anti-Hsp20 (Abcam ab13491, dilución 1:2000), Anti-Hsp27 (Abcam ab190314, dilución 1:1000), Anti-Hsp40 (Abcam ab69402, dilución 1:1000), Anti-Hsp70 (Abcam ab5439, dilución 1:10000), Anti-Caspase-3 (Abcam ab90437, dilución 1:1000), Anti-Caspase-7 (Abcam ab69540), Anti-Caspase-9 (Abcam ab2013, dilución 1:1000). Los anticuerpos primarios se diluyeron en PBS-Tween. Después de lavar las membranas a temperatura ambiente todos los blots de ratón se incubaron con IgG de cabra anti-ratón (H + L) conjugada HRP (Abcam ab97023) y los blots de conejo con IgG de cabra anti-conejo (H + L) conjugada HRP (Abcam ab97051) a una dilución 1:5000 en PBS-Tween durante 1 h a 37 °C. Las membranas se lavaron y los anticuerpos unidos se detectaron usando sustrato ECL (Clarity™ Western ECL Substrate, BIO-RAD Cat. 170-5060). Las imágenes fueron capturadas utilizando un ChemiDoc™ MP Imaging System y fueron analizadas mediante el software PDQuest™ 2-D Analysis (Version 8.0.1).

ELISA: Las concentraciones de $\alpha\beta$ -Cristalina y Caspase-7 en el músculo LD se determinaron usando los siguientes Kits comerciales ELISA: $\alpha\beta$ -Cristalina (MBS048411) y Caspase-7 (MBS739879).

6.9. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados con forme a las restricciones del diseño utilizado con un modelo que consideró los efectos del grupo (bloque), Tratamiento, sexo del animal (hembras o machos castrados) y la interacción entre estos últimos como factores. Las rutinas de cálculo fueron las del paquete estadístico SAS (v. 9.3) mediante los procedimientos FREQ, GLM, MEANS, REG y UNIVARIATE. Se realizaron comparaciones planeadas que fueron: dentro de los niveles orgánicos (OR1 a OR4), se examinaron tendencias lineales a cúbicas; fuentes orgánicas (OR4, OR7) vs. inorgánicas (IN5, IN8) y nivel de vitamina E (OR1, OR4 e IN5 vs. OR6, OR7 e IN8). Con el objeto de evaluar los cambios en las concentraciones de los minerales de fuente orgánica (sin la adición de vitamina E), una vez analizadas las tendencias de comportamiento se usaron procedimientos de regresión. En el caso de medidas repetidas en el tiempo, se usaron los Modelos mixtos (Gill y Hafs, 1971; Littell *et al.*, 1998), mientras que para el análisis sensorial se utilizaron aproximaciones no paramétricas (Severiano *et al.*, 2017, Friedman, FREQ CMH2).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la población de 145 animales, once cerdos fueron descartados debido a la mala adaptación a las condiciones de alojamiento individual y para balancear la proporción de géneros (por número y peso corporal). Seis cerdos fueron faenados (3 hembras y 3 machos), elegidos al azar, para evaluar las concentraciones minerales iniciales en los tejidos. Por lo tanto, el experimento se llevó a cabo con un total de 128 cerdos (64 hembras y 64 machos castrados), que es un total de 16 repeticiones por tratamiento (8 hembras y 8 machos castrados), con un peso a la aleatorización de 19.48 ± 3.423 kg.

La aleatorización fue realizada para un Diseño de Bloques Completos al azar, siendo el bloque la fecha de inicio a los Tratamientos. El primer bloque de 32 cerdos (16 hembras y 16 machos castrados) se inició en el experimento a los 62d de edad con un peso promedio de 27.42 ± 1.859 kg; el segundo bloque, 64 cerdos (32 hembras y 32 machos castrados) tenían un peso promedio de 28.45 ± 2.014 kg a los 69d de edad, y el tercer bloque fue de 32 cerdos (16 hembras y 16 machos castrados) a 83d, con un peso inicial de 32.96 ± 4.160 kg.

7.1. Comportamiento productivo

El crecimiento de los cerdos se presenta como las respuestas acumuladas hasta el final de los 84d del período experimental. En el Cuadro 7 se presentan los resultados para el efecto de género en donde podemos observar que el comportamiento que se tuvo fue como lo esperado, los machos consumen más alimento (machos, 2.87 vs. hembras, 2.63, EEM= 0.036, $P<0.01$) y son menos eficientes (machos, 0.35 vs. hembras, 0.37, EEM= 0.003, $P<0.01$). El Cuadro 8 resume los efectos principales de Tratamiento, donde todos los criterios de respuesta fueron similares ($P>0.35$), pero en ganancia diaria de peso, sexo y Tratamiento interactuaron ($P<0.06$), como se muestra en la Cuadro 9. Al comparar

las medias de los Tratamientos OR1 a OR4 (que incluyen minerales de fuente orgánica sin la adición de vitamina E) los machos respondieron de manera diferente que las hembras a la densidad de minerales orgánicos en la dieta, éstos tuvieron una tendencia lineal negativa para OR1 a OR4 ($P < 0.002$). Aunque el mayor consumo de alimento de los machos puede estar implicado por lo tanto esta respuesta es de difícil interpretación.

Cuadro 7. Comportamiento productivo por Sexo (medias de mínimos cuadrados).

Variable	Sexo		EEM ^a	P<
	Machos castrados	Hembras		
Observaciones ^b , n	64	64		
Peso inicial ^b , kg	30.21	29.01	0.363	0.029
Peso final ^b , kg	114.21	110.06	1.061	0.006
Consumo de alimento ^b , kg/d	2.87	2.63	0.036	0.001
Ganancia de peso ^b , kg/d	1.00	0.96	0.011	0.025
Eficiencia ^b , kg	0.35	0.37	0.003	0.001
Grosor de la grasa ^c , cm	1.45	1.23	0.030	0.001
Profundidad de músculo ^c , cm	5.41	5.43	0.051	0.680

^a EEM, Error estándar de la media.

^b Cerdos alojados en corrales individuales.

^c Ultrasonido en tiempo real, media de la 10^a y última costillas.

Cuadro 8. Comportamiento productivo por Tratamiento (medias de mínimos cuadrados).

Variable	Tratamiento ^a								EEM ^b	P<
	OR1	OR2	OR3	OR4	IN5	OR6	OR7	IN8		
Peso inicial ^c , kg	30.33	30.40	29.42	29.02	29.90	29.20	29.36	29.23	0.721	0.79
Peso final ^c , kg	115.11	114.04	113.70	108.99	112.26	110.83	110.47	111.63	2.101	0.46
Consumo de alimento ^c , kg/d	2.82	2.78	2.81	2.68	2.72	2.68	2.72	2.77	0.075	0.78
Ganancia de peso ^{c, d} , kg/d	1.01	0.99	1.00	0.95	0.98	0.97	0.97	0.98	0.021	0.60
Eficiencia ^c , g	360	359	359	357	363	365	356	355	5.971	0.94
Grosor de la grasa ^e , cm	1.41	1.40	1.32	1.31	1.27	1.26	1.35	1.42	0.060	0.35
Prof. de músculo ^e , cm	5.31	5.36	5.50	5.47	5.55	5.41	5.39	5.39	0.101	0.75

^a Tratamiento, por fuente, orgánica (OR; Bioplex-®, Alltech de México, S. A. de C. V.) e inorgánica (IN; Sulfatos), n= 16 por Tratamiento.

^b EEM, Error estándar de la media.

^c Cerdos alojados en corrales individuales.

^d Interacción de Sexo y Tratamiento (EEM= 0.031; P<0.06).

^e Ultrasonido en tiempo real, media de la 10^a y última costillas.

Cuadro 9. Interacción sexo por Tratamiento en ganancia diaria de peso (medias de mínimos cuadrados).

Ganancia de peso, kg/d	Tratamiento ^a							
	OR1	OR2	OR3	OR4	IN5	OR6	OR7	IN8
Hembras	0.95	0.96	1.02	0.97	0.98	0.92	0.99	0.96
Machos ^b	1.06	1.03	0.99	0.93	0.98	1.02	0.95	1.00

^a Tratamiento, por fuente, orgánica (OR; Bioplex-®, Alltech de México, S. A. de C. V.) e inorgánica (IN; Sulfatos), n= 8. Error estándar de la media = 0.031 ($P < 0.06$).

^b Tendencia lineal para OR1 a OR4 ($P < 0.002$).

El Cuadro 10 resume los resultados de los análisis en sangre (hemoglobina, eritrocitos, hematocrito, actividad antioxidante, actividad enzimática, creatina quinasa, lactato deshidrogenasa y concentración de minerales). Los valores de células rojas se utilizaron clínicamente para evaluar la salud y el estado nutricional, particularmente en referencia a Fe. Los datos son las medias de mínimos cuadrados para los efectos principales de los Tratamientos, que son el promedio de los 84 días del período experimental (se tomaron muestras a los 21, 42, 63 y 84 días en prueba). En cuanto a las constantes en sangre todas las variables estuvieron siempre dentro de rangos normales, sin diferencias significativas ($P > 0.15$). Estos parámetros están estrechamente relacionados con la provisión dietética de Fe y Cu; incluso con el nivel más bajo de minerales (OR1, \approx 50% por debajo de los estándares del NRC), los valores obtenidos fueron normales. Por lo tanto, se presume que la disponibilidad de los elementos contribuyó en prevenir una deficiencia. En cuanto a la actividad antioxidante y enzimática, no se observaron diferencias para el efecto principal de Tratamiento ($P > 0.66$), lo que sugiere que el organismo del animal no fue sometido a un estrés oxidativo mayor por el incremento de los minerales traza en la dieta. La respuesta de los parámetros en sangre respecto al tiempo se muestra en el Cuadro 11, en donde se observa que hay diferencias para todas las variables ($P < 0.001$), esto es

probablemente indicativo del agua en el cuerpo la cual cambia debido al envejecimiento: eritrocitos, hemoglobina y hematocrito se incrementaron ligeramente. Con respecto a las enzimas antioxidantes (CAT, GPx y SOD) no hubo efectos de Tratamiento ($P>0.66$). La actividad de las enzimas del sistema antioxidante fue la misma independientemente de la concentración de minerales en la dieta, por lo que, en las condiciones de este experimento, es posible inferir que niveles bajos de minerales traza son suficientes para alcanzar las actividades enzimáticas que se logran con los niveles usados en la industria actualmente. Sin embargo, la actividad de CAT disminuyó en el tiempo, así como GPx y SOD aumentaron; estas dos últimas enzimas son más activas en condiciones de bajos niveles de estrés oxidativo, mientras que la actividad de CAT incrementa de manera directa a la intensidad del estrés, así que juega un papel importante en la adquisición de tolerancia y en la respuesta adaptativa de las células (Matés *et al.*, 1999); al disminuir la actividad de CAT en el tiempo, se puede inferir que el animal no tuvo un reto oxidativo, aunque las demás enzimas incrementaron su actividad en el tiempo éstas enzimas siempre están activas en la sangre para proteger contra los radicales que se generan por el metabolismo. Otro de los parámetros que se evaluaron en sangre fueron la actividad de creatina quinasa (CK) y lactato deshidrogenasa (LDH) en plasma, éstas enzimas se incrementan por el aumento de la secreción de hormonas adrenales en respuesta a estrés, daño muscular y daño a los tejidos en general, son utilizadas para evaluar las condiciones de estrés en los animales. La actividad obtenida fue mayor que lo encontrado por Kim *et al.*, (2004), pero los valores no son considerados tan altos como los que se presentan en cerdos bajo estrés agudo o crónico. En el Cuadro 10 se presentan los resultados donde se puede observar que no hubo diferencias significativas por Tratamiento ($P>0.24$). En el tiempo (Cuadro 11), CK no mostró efectos ($P>0.13$), mientras que LDH tuvo un ligero incremento ($P>0.01$). Con base en los resultados de las actividades enzimáticas discutidas (CAT, GPx, SOD, CK y LDH) se infiere que, durante el crecimiento y por la naturaleza de las dietas, el estrés oxidativo fue mínimo.

Cuadro 10. Análisis en sangre por Tratamiento (medias de mínimos cuadrados por Tratamiento; los datos son los promedios en el tiempo).

Variable ^a	Tratamiento ^b								EEM ^c	P<
	OR1	OR2	OR3	OR4	IN5	OR6	OR7	IN8		
Eritrocitos ^d , 10 ⁶ /mm ³	7.15	7.07	7.05	7.33	7.11	7.18	6.96	7.16	0.138	0.72
Hemoglobina ^d , g/dL	13.49	12.98	13.32	13.60	13.01	13.42	12.86	13.36	0.216	0.15
Hematocrito ^d , %	43.95	42.05	42.86	44.00	42.03	43.55	41.95	43.16	0.788	0.31
FRAP ^d , mg eq. Trolox/L	39.43	38.06	36.66	38.18	38.24	38.32	38.28	40.32	1.261	0.69
CAT ^d , U/mL	10.84	9.84	9.66	10.59	9.79	10.40	10.25	9.10	1.405	0.99
GPx ^d , U/mL	8.71	9.33	9.16	8.48	8.83	8.40	8.86	8.99	0.448	0.66
SOD ^d , U/mL	4.37	5.02	4.29	4.84	4.55	4.52	4.61	4.64	0.354	0.87
CK ^e , U/L	659.20	524.09	524.29	651.16	617.79	657.86	654.48	698.87	54.876	0.24
LDH ^e , U/L	590.47	609.91	602.46	655.36	602.80	655.01	572.97	626.86	36.194	0.69

^a Niveles iniciales (n= 6): Eritrocitos, 6.70 10⁶/mm³ ± 0.691; Hemoglobina, 12.38 g/dL ± 1.154; Hematocrito, 42.38 % ± 4.528; FRAP, 23.27 mg eq. Trolox/L ± 2.550; CAT, 6.67 U/mL ± 2.08; GPx, 2.79 U/mL ± 0.746; SOD, 4.96 U/mL ± 0.544; CK, 441.38 U/L ± 184.444; LDH, 699.41 U/L ± 159.801.

^b Tratamiento, por fuente, orgánica (OR; Bioplex-®, Alltech de México, S. A. de C. V.) e inorgánica (IN; Sulfatos).

^c EEM, Error estándar de la media.

^d Muestras, n=40 por Tratamiento.

^e Muestras, n=20 por Tratamiento.

Cuadro 11. Análisis de la sangre en función del tiempo (medias de mínimos cuadrados por tiempo; los datos son los promedios de los Tratamientos).

Variable	Tiempo (Días)				EEM ^a	P<
	21	42	63	84		
Eritrocitos ^b , 10 ⁶ /mm ³	6.91	7.01	7.47	7.12	0.077	0.001
Hemoglobina ^b , g/dL	12.85	13.23	13.56	13.38	0.126	0.001
Hematocrito ^b , %	41.24	41.92	45.44	43.17	0.501	0.001
FRAP ^b , mg eq. Trolox/L	33.61	38.31	39.42	42.44	0.828	0.001
CAT ^b , U/mL	11.17	10.19	10.35	8.57	0.597	0.001
GPx ^b , U/mL	3.12	11.59	10.24	10.33	0.545	0.001
SOD ^b , U/mL	4.10	3.99	5.05	5.28	0.186	0.001
CK ^c , U/L	564.41	638.38	676.12	614.96	35.390	0.125
LDH ^c , U/L	608.33	556.22	687.92	605.45	24.598	0.010

^a EEM, Error estándar de la media.

^b Muestras, n=80 por tiempo.

^c Muestras, n=40 por tiempo.

7.2. Calidad de la carne

Los efectos principales de Tratamiento para las características de la canal se presentan en el Cuadro 12. Una de las variables más importantes en cuanto a calidad de carne es el potencial glucolítico en el músculo, ya que el nivel de los hidratos de carbono es un fuerte determinante de la magnitud de cambio del pH post-mortem y, por lo tanto, de la calidad final de la carne (Monin y Sellier, 1985; Dreiling *et al.*, 1987; Hamilton *et al.*, 2002). No hubo diferencias significativas para el efecto principal de Tratamiento en esta variable ($P>0.67$), lo que estuvo dentro

de lo esperado ya que las dietas fueron esencialmente las mismas y los Tratamientos no modifican el potencial glucolítico; adicionalmente los procedimientos de manejo, desde el ayuno y hasta el sacrificio, fueron los mismos. Al respecto es importante destacar que los valores del potencial glucolítico se encontraron por debajo de los niveles publicados por autores (Bertol *et al.* 2011 y Hammelman *et al.* 2003). Sin embargo, Bertol *et al.* (2005) y Hambrecht *et al.* (2005) obtuvieron una concentración de $\approx 130 \mu\text{mol/g}$ de tejido húmedo cuando los animales fueron ayunados por 24 h y sometidos a un manejo intensivo. Por lo tanto, presumimos que los valores que se encontraron en este trabajo, bajos dentro de la normalidad, bien pudieron deberse al manejo que se tuvo para el traslado de los animales a rastro (16 h de ayuno, 3 h de transporte y 2 h en corrales de descanso).

Hubo un fuerte efecto del día de matanza, que se notó principalmente en la temperatura final de la canal ($P < 0.02$), parámetro que altera entre otros la expresión de muchos de los criterios de calidad de carne; esto indudablemente no está ligado a los efectos de Tratamiento por lo que se decidió incluir la temperatura a las 24 h como covariable en el modelo. En general no hubo efectos significativos de los Tratamientos ($P > 0.08$, Cuadro 12). Gowanlock *et al.* (2013), no encontraron diferencias por tratamiento en parámetros de calidad de la canal (profundidad de grasa, área de la chuleta) y carne (pH, color y pérdida de agua por goteo) usando diferentes niveles de minerales quelados. Pero al usar comparaciones planeadas, se observó que hubo una respuesta lineal positiva al incremento de los minerales quelados (OR1 a OR4) en L^* ($P < 0.06$), la luminosidad aumentó conforme la densidad de minerales orgánicos incrementó. Mientras que la pérdida de agua por compresión y por goteo fueron similares en todos los Tratamientos, la capacidad de retención de agua mostró una clara reducción cuando la densidad de minerales se incrementó, la respuesta fue lineal (OR1 a OR4; $P < 0.03$, Cuadro 13).

El efecto del incremento de vitamina E se pudo observar en la tasa de saturación del color o Croma ($P < 0.06$, Cuadro 12), donde la carne de cerdos que se alimentaron con alta concentración de vitamina E durante finalización (últimos 42d del experimento) tuvo un tono rojo más fuerte, y observando los resultados de las fracciones de mioglobina se puede ver que existe mayor proporción de la forma oxigenada (oximioglobina). Las demás variables que nos permiten calificar el efecto antioxidante de vitamina E en carne fresca (pérdida de agua, capacidad de retención de agua y TBARS) tuvieron un bajo nivel de probabilidad ($P > 0.29$), quizá porque la variación inherente a cada variable fue mayor (Croma, $CV = 7\%$ vs. $CV > 26\%$), sin embargo, las tendencias de comportamiento de las medias fueron en la misma dirección, siempre a favor del efecto antioxidante de vitamina E. Sales y Koukolová (2011) mencionan que con un consumo de 280 mg de vitamina E por día, se reduce la oxidación lipídica en carne fresca de cerdo, similar a lo observado en las medias de este trabajo. Por lo tanto, los efectos de vitamina E se mostraron, pero la medición de las variables en respuesta al efecto antioxidante, no tuvieron el grado de sensibilidad que con Croma.

Los resultados de vida de anaquel de las chuletas de LD se muestran en el Cuadro 14. En general, los efectos de Tratamiento no fueron claros ($P > 0.10$), pero en oximioglobina se encontró una tendencia lineal positiva entre OR1 y OR4 ($P < 0.03$), aumentando la proporción de ésta forma de la mioglobina, que imparte el tono rojo cereza característico a la carne, pero el incremento en la concentración de minerales no resultó en carne fresca con mejor color (L , a^* y b^* , $P > 0.34$). Por otro lado, los efectos en tiempo en el proceso de maduración de la carne fueron claros y los esperados (Cuadro 15): el pH incrementó, debido al nitrógeno liberado por la actividad proteolítica (liberación de los aminoácidos), además disminuyó el ángulo Hue y la intensidad de saturación Croma incrementó como consecuencia de una mayor pérdida de agua, mientras que el agua de la superficie realzó el valor de L^* , similar a lo descrito por Holmer *et al.* (2009). La concentración relativa de oximioglobina en el tiempo (7, 14 y 21 días) se mantuvo

constante. Lanari *et al.* (1994) observaron que la suplementación dietética de vitamina E en ganado estabilizó oximioglobina en el tiempo, aumentando la velocidad de oxigenación de la deoximioglobina y disminuyendo la tasa de auto-oxidación de la oximioglobina, similar a lo observado en este trabajo. Cabe mencionar que las condiciones de humedad y temperatura de almacenamiento fueron relativamente altas: 72.6 ± 2.48 % y 5.24 ± 0.167 °C. Además, debe destacarse que fueron empacadas al vacío en membranas permeables al O₂, lo que explica los resultados anteriores.

El Cuadro 16 muestra los resultados de oxidación lipídica y proteica, así como actividad antioxidante y enzimática en carne. No hubo diferencias significativas respecto a los Tratamientos ($P > 0.17$). Sin embargo, se observan efectos en el tiempo ($P < 0.001$, Cuadro 17). Con respecto a la oxidación lipídica se sabe que es un proceso complejo y dinámico que degrada y produce numerosos compuestos a lo largo del tiempo; el proceso de oxidación lipídica se ha descrito clásicamente en tres fases: la primera denominada fase de iniciación implica la formación de radicales libres de lípidos e hidroperóxidos como productos de reacción primarios, la segunda o fase de propagación donde los hidroperóxidos formados se descomponen en productos de peroxidación secundarios, la mayoría de ellos aldehídos (principalmente MDA), y la tercera que es la fase de terminación que implica la formación de productos terciarios como epóxidos o peróxidos cíclicos (Kerr *et al.*, 2015); la mayor concentración de TBARS se produjo al día 7 debido a la formación de productos secundarios de oxidación y luego disminuyó por la consecuente formación de productos terciarios (Raharjo y Sofos, 1993; Kerr *et al.*, 2015). En la oxidación de proteínas, se observó un aumento claro en el tiempo ($P < 0.001$), debido a que las proteínas miofibrilares son particularmente susceptibles a los procesos oxidativos debido a que numerosos RL son capaces de iniciar el daño oxidativo, además se sabe que los metales de transición y los lípidos oxidados son influyentes; la oxidación proteica es un proceso progresivo durante el almacenamiento de la carne que causa modificaciones químicas que

pueden conducir a cambios en las propiedades físicas de las proteínas, incluyendo fragmentación, agregación, pérdida de solubilidad y funcionalidad (Xiong y Decker, 1995; Estévez, 2011). El potencial antioxidante que tiene la carne debido a compuestos antioxidantes exógenos (vitamina E, vitamina C, polifenoles, etc.) y endógenos (CAT, GPx, SOD, etc.) permite la estabilización de radicales libres, aumentando la vida de anaquel; a temperaturas inferiores a 4 °C, se reduce la oxidación y así relativamente se disminuye la dependencia de las enzimas (por ejemplo, CAT, GPx y SOD). En este trabajo GPx y SOD tenían una mayor actividad en el tiempo, mientras que CAT se redujo; como se mencionó anteriormente GPx y SOD son más activas en menor estrés oxidativo, mientras que la actividad de CAT se incrementa de manera directa a la intensidad del estrés (Matés *et al.*, 1999), con base en los resultados se puede inferir que la tasa de oxidación no fue un gran desafío en el proceso de maduración de la carne.

Uno de los cambios más importantes durante la maduración en la vida de anaquel es el ablandamiento de la carne y el establecimiento del perfil sensorial, que se lleva a cabo debido a la acción de enzimas proteolíticas (Ouali *et al.*, 2006; Lomiwes *et al.*, 2013); la dureza representada como la fuerza al corte se muestra en los Cuadros 16 y 17, sin diferencias por Tratamiento ($P>0.93$), pero en el tiempo hubo una reducción significativa ($P<0.001$) de 3.34 (tiempo 0) a 1.77 kg (tiempo 21 d), este efecto depende del grado de alteración-degradación de las proteínas (Ouali *et al.*, 2006).

Para evaluar el impacto de la maduración sobre los atributos de la carne se realizó un análisis sensorial con jueces entrenados. Los resultados de la evaluación sensorial ayudan a estudiar las propiedades de los alimentos a través de los sentidos como la vista, olfato, gusto entre otros; uno de los objetivos principales es entender la importancia de las características del alimento y el papel que juegan en la aceptabilidad del consumidor (Meilgaard *et al.*, 1999; Severiano *et al.*, 2017). Los atributos que se evaluaron en las muestras de lomo (entre la 10ª y última

costillas) fueron: color, jugosidad, textura y sabor metálico y los resultados se muestran en el Cuadro 18. En ninguno de los atributos se encontraron diferencias entre Tratamiento (OR1, OR4, OR6, OR7, IN5 e IN8, $P>0.33$), pero al analizar los datos respecto al tiempo de maduración (1 vs. 7 días) se encontraron las diferencias esperadas de acuerdo a los resultados obtenidos objetivamente (Cuadros 15 a 17): color ($P<0.07$), jugosidad ($P<0.08$), textura ($P<0.05$) y sabor metálico ($P>0.56$), en donde las muestras al día 7 de maduración tuvieron una mayor calificación de color y jugosidad además de que fueron más suaves respecto al día 1; y no se encontraron diferencias en cuanto al sabor metálico ($P>0.56$, Cuadro 18).

Cuadro 12. Características de la canal y parámetros de calidad de carne (medias de mínimos cuadrados).

Variable	Tratamiento ^a								EEM ^b	P<
	OR1	OR2	OR3	OR4	IN5	OR6	OR7	IN8		
Canal fría ^c , kg	88.80	88.18	88.89	84.75	85.97	85.44	84.56	87.66	1.634	0.27
Temperatura final (24h), °C	6.32	7.42	6.37	6.82	5.98	6.37	7.26	6.64	0.295	0.02
pH final (24h) ^d	5.62	5.64	5.61	5.57	5.57	5.59	5.59	5.56	0.019	0.08
Potencial glucolítico ^e	110.21	111.89	129.66	124.18	111.53	104.58	105.76	107.93	11.465	0.67
L* d, f, g	56.27	57.05	57.41	58.02	58.04	56.59	57.65	58.43	0.656	0.24
a* d, f	8.16	7.89	7.78	7.93	7.34	8.50	8.33	7.98	0.342	0.44
b* d, f	15.90	15.71	15.71	16.24	15.87	16.07	16.47	16.37	0.237	0.17
Ángulo Hue ^d	62.97	63.43	63.62	64.05	65.21	62.24	63.42	64.06	0.916	0.51
Croma ^{d, h}	17.92	17.60	17.57	18.10	17.51	18.21	18.49	18.24	0.307	0.24
Color subjetivo ^{d, i}	2.84	2.91	2.84	2.92	2.92	2.92	2.91	2.92	0.085	0.99
Marmoleo subjetivo ^{d, i}	2.27	2.12	1.99	1.93	1.89	2.24	2.03	2.25	0.209	0.81

^a Tratamiento, por fuente, orgánica (OR; Bioplex-®, Alltech de México, S. A. de C. V.) e inorgánica (IN; Sulfatos), n=12 por Tratamiento; ^b EEM, Error estándar de la media; ^c Peso de la canal con cabeza y patas. Interacción Tratamiento y Sexo (EEM= 2.389; $P<0.06$); ^d Datos analizados con Temperatura final como covarianza; ^e $\mu\text{mol/g}$ de tejido húmedo; ^f HunterLab MiniScan EZ (Hunter Associates Laboratory, Inc.) iluminante D65/10°; ^g Tendencia lineal para OR1 a OR4 ($P<0.06$); ^h Efecto de vitamina E ($P<0.06$); ⁱ Estándar de color NPPC (National Pork Producers Council, 1999).

Cuadro 13. Retención de agua de la carne (medias de mínimos cuadrados) en respuesta a los Tratamientos.

Variable	Tratamiento ^a								EEM ^b	P<
	OR1	OR2	OR3	OR4	IN5	OR6	OR7	IN8		
Por compresión ^c , %	24.67	24.34	23.13	25.63	24.04	25.58	26.73	25.46	0.997	0.28
Pérdida de agua por goteo 24h ^c , %	4.78	3.71	4.32	4.70	4.70	4.40	4.63	4.72	0.456	0.77
Capacidad de retención de agua ^{c, d} , %	19.19	13.75	15.97	12.55	11.20	14.30	14.07	12.23	1.796	0.06

^a Tratamiento, por fuente, orgánica (OR; Bioplex-®, Alltech de México, S. A. de C. V.) e inorgánica (IN; Sulfatos), n=12 por Tratamiento.

^b EEM, Error estándar de la media.

^c Datos analizados con temperatura final como covarianza.

^d Tendencia lineal para OR1 a OR4 ($P<0.03$).

Cuadro 14. Vida de anaquel por Tratamiento de algunos parámetros de calidad de carne (medias de mínimos cuadrados por Tratamiento; los datos son los promedios en el tiempo).

Variable	Tratamiento ^a								EEM ^b	P<
	OR1	OR2	OR3	OR4	IN5	OR6	OR7	IN8		
pH	5.64	5.65	5.63	5.61	5.62	5.61	5.61	5.59	0.014	0.10
L* ^c	56.97	57.25	56.90	57.74	57.90	57.47	57.06	57.88	0.509	0.70
a* ^c	9.00	8.79	8.83	8.71	8.42	9.07	9.16	8.72	0.272	0.62
b* ^c	16.04	16.11	16.05	16.45	16.28	16.34	16.62	16.43	0.197	0.34
Ángulo Hue	60.96	61.52	61.07	62.29	62.72	61.39	61.30	62.15	0.715	0.59
Croma	18.44	18.37	18.34	18.65	18.34	18.73	19.00	18.67	0.239	0.41
Metamioglobina (contenido relativo)	0.24	0.21	0.23	0.22	0.24	0.22	0.24	0.23	0.014	0.67
Deoximioglobina (contenido relativo)	0.23	0.24	0.22	0.19	0.18	0.20	0.19	0.21	0.019	0.38
Oximioglobina (contenido relativo) ^d	0.51	0.55	0.56	0.59	0.57	0.58	0.56	0.56	0.024	0.49

^a Tratamiento, por fuente, orgánica (OR; Bioplex-®, Alltech de México, S. A. de C. V.) e inorgánica (IN; Sulfatos), n= 48 por Tratamiento.

^b EEM, Error estándar de la media.

^c HunterLab MiniScan EZ (Hunter Associates Laboratory, Inc., Reston, Virginia) iluminante D65/10°.

^d Tendencia lineal para OR1 a OR4 (P<0.03).

Cuadro 15. Vida de anaquel, en función del tiempo de algunos parámetros de calidad de carne (medias de mínimos cuadrados por tiempo; los datos son los promedios de los Tratamientos).

Variable	Tiempo (Días) ^a				EEM ^b	P<
	1	7	14	21		
pH	5.59	5.59	5.64	5.66	0.007	0.001
L* ^c	57.43	56.83	57.44	57.88	0.243	0.001
a* ^c	8.00	9.13	8.98	9.24	0.145	0.001
b* ^c	16.03	16.25	16.23	16.64	0.105	0.001
Ángulo Hue	63.57	60.88	61.12	61.12	0.337	0.001
Croma	17.95	18.69	18.58	19.06	0.143	0.001
Metamioglobina (contenido relativo)	0.15	0.22	0.27	0.28	0.008	0.001
Deoximioglobina (contenido relativo)	0.23	0.24	0.19	0.17	0.011	0.001
Oximioglobina (contenido relativo)	0.62	0.53	0.54	0.55	0.014	0.001

^a Muestras, n= 96 por tiempo.

^b EEM, Error estándar de la media.

^c HunterLab MiniScan EZ (Hunter Associates Laboratory, Inc., Reston, Virginia) iluminante D65/10°.

Cuadro 16. Vida de anaquel por Tratamiento, parámetros de oxidación y dureza (medias de mínimos cuadrados por Tratamiento; los datos son los promedios en el tiempo).

Variable ^a	Tratamiento ^b								EEM ^c	P<
	OR1	OR2	OR3	OR4	IN5	OR6	OR7	IN8		
TBARS, mg MDA/kg carne	0.36	0.36	0.35	0.36	0.35	0.36	0.35	0.35	0.012	0.96
Carbonilos, nmol/mg proteína	1.74	1.98	1.73	1.81	1.60	1.92	1.42	1.94	0.242	0.73
FRAP, mg eq. Trolox/kg carne	105.11	104.98	103.12	104.54	106.09	107.16	103.05	103.12	1.888	0.72
ABTS, g eq. Trolox/kg carne	1.59	1.60	1.59	1.56	1.55	1.57	1.57	1.56	0.023	0.72
CAT, U/mL	91.77	99.79	88.29	97.17	89.60	87.41	92.96	95.93	3.619	0.17
GPx, U/g carne	19.13	19.51	18.66	19.63	18.99	19.39	18.97	18.75	0.538	0.62
SOD, U/g carne	36.38	36.57	35.89	36.76	36.90	36.78	36.10	36.56	0.408	0.41
Pérdida de peso por cocción, %	21.24	20.51	21.22	20.99	20.41	21.00	22.58	21.72	0.640	0.30
Fuerza de corte, kg	2.30	2.37	2.28	2.27	2.35	2.41	2.39	2.29	0.090	0.93

^a TBARS, especies reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico; FRAP, poder antioxidante reductor del hierro; ABTS, estabilización del radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico; CAT, catalasa; GPx, glutatión peroxidasa; SOD, superóxido dismutasa.

^b Tratamiento, por fuente, orgánica (OR; Bioplex-®, Alltech de México, S. A. de C. V.) e inorgánica (IN; Sulfatos), n= 48 por Tratamiento.

^c EEM, Error estándar de la media.

Cuadro 17. Vida de anaquel, en función del tiempo de parámetros de oxidación y dureza (medias de mínimos cuadrados por tiempo; los datos son los promedios de los Tratamientos).

Variable ^a	Tiempo (Días) ^b				EEM ^c	P<
	1	7	14	21		
TBARS, mg MDA/kg carne	0.21	0.52	0.36	0.34	0.009	0.001
Carbonilos, nmol/mg proteína	0.35	1.12	2.16	3.43	0.133	0.001
FRAP, mg eq. Trolox/kg carne	127.48	110.29	95.66	85.15	1.139	0.001
ABTS, g eq. Trolox/kg carne	1.46	1.57	1.63	1.63	0.013	0.001
CAT, U/mL	90.63	84.47	94.69	101.67	1.715	0.001
GPx, U/g carne	4.02	22.66	25.56	24.27	0.591	0.001
SOD, U/g carne	35.34	34.63	36.46	39.55	0.345	0.001
Pérdida de peso por cocción, %	21.18	20.15	20.45	23.04	0.321	0.001
Fuerza de corte, kg	3.34	2.21	2.01	1.77	0.052	0.001

^a TBARS, especies reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico; FRAP, poder antioxidante reductor del hierro; ABTS, estabilización del radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico; CAT, catalasa; GPx, glutatión peroxidasa; SOD, superóxido dismutasa.

^b Muestras, n= 96 por tiempo.

^c EEM, Error estándar de la media.

Cuadro 18. Análisis sensorial.

Variable	Tratamiento ^a	Tiempo ^b
	<i>P</i> >	<i>P</i> <
Color	0.33	0.07
Textura	0.38	0.05
Jugosidad	0.59	0.08
Sabor metálico	0.47	0.56

^a OR1, OR4, OR6, OR7, IN5 e IN8.

^b 0 y 7 días.

7.3 Identificación de proteínas

Se realizó la identificación mediante inmunoblot de cinco proteínas de choque térmico (HSP20, $\alpha\beta$ -Cristalina, HSP27, HSP40 y HSP70) relacionadas con la calidad de la carne y tres con la muerte celular programada (Caspasa 3, 7 y 9). Los resultados de las medias por Tratamiento expresadas en intensidad*área (I*A) en los diferentes tiempos se presentan en el Anexo 3. Es importante discutir que existe variación inherente a la muestra (no a la técnica), debido a que la activación de las diferentes rutas de señalización para la expresión y/o inhibición de proteínas es muy variada (estrés físico, químico o biológico; Ouali *et al.*, 2006). El manejo de los animales y la matanza tiene varios puntos críticos que influirán sobre estas rutas, por ejemplo, el transporte (estrés pre matanza; Yu *et al.*, 2009), el aturdimiento con choque eléctrico, la temperatura de cada uno de los procesos relacionados con la matanza, manejo y procesamiento de la canal, y el grado de disminución del pH (Pulford *et al.*, 2008); además, existirá variación propia del animal, por ejemplo, la genética y el género (Kwasiborski *et al.*, 2008).

Los datos de I*A no tuvieron una distribución normal, por lo tanto, se utilizó una transformación logarítmica (logaritmo base e) para su normalización. Los

resultados para los Tratamientos en la expresión de las proteínas se presentan en el Cuadro 19; en general los resultados no muestran efectos claros ($P>0.07$). Sin embargo, utilizando las comparaciones planeadas se encontraron diferencias entre fuentes de minerales a dosis alta (OR4 y OR7 vs. IN5 e IN8) en las siguientes proteínas HSP40, HSP70 y Caspasa 9 ($P<0.02$), la mayor I*A se obtuvo cuando se usaron minerales traza de fuente inorgánica (sulfatos). Las HSPs pueden tener diferentes mecanismos de acción; algunos autores sugieren que estas moléculas actúan inhibiendo el proceso de muerte celular. La Figura 10 es una representación esquemática que resume las acciones de las proteínas en el proceso de muerte celular, en donde se muestra la formación de complejos con las caspasas activas (iniciadoras o efectoras) que dificultan la hidrólisis proteica. La HSP27 y 70 inhiben directamente tanto la vía intrínseca como extrínseca de la apoptosis. Las HSPs también actúan protegiendo a las proteínas diana (sustratos) como por ejemplo las proteínas miofibrilares como se esquematiza en la Figura 11, y que se refiere fundamentalmente a la protección de actina y miosina (Lomiwes *et al.*, 2014; D'Alessandro y Zolla, 2013; Eskin *et al.*, 2013; Kemp y Parr, 2012; Kemp *et al.*, 2010; Ouali *et al.*, 2006). Lomiwes *et al.* (2014, 2013), Mohanty *et al.* (2010) y Östling *et al.* (2007) han reportado que algunas proteínas como HSP27, HSP70, HSP90 y $\alpha\beta$ -Cristalina mantienen la integridad de la célula y tienen actividad anti-apoptótica. Diferentes autores como Hwang *et al.* (2005), Bernard *et al.* (2007), Kim *et al.* (2008), Yu *et al.* (2009) y Di Luca *et al.* (2011), mencionan que la disminución de las HSPs tiene un efecto positivo sobre la calidad de la carne, mejorando la textura, disminuyendo la pérdida de agua por goteo y desnaturalización proteica. Estos datos sugieren que la baja expresión de las proteínas de choque térmico podría facilitar la muerte celular y maduración de la carne durante el período post-mortem y, posteriormente, mejorar la calidad de la carne, sin embargo, en este trabajo no se encontraron diferencias en cuanto a calidad de carne, no obstante, existió un claro incremento de las HSPs (HSP40 y HSP70) cuando se usaron minerales traza de fuente inorgánica. Este hallazgo es relevante porque no se pudo encontrar información de la modificación de la

actividad de estas proteínas en función de la densidad de minerales traza en la dieta y que en gran medida justifica la hipótesis del trabajo.

Por otro lado, $\alpha\beta$ -Cristalina, HSP70 y Caspasa 7 mostraron una interacción entre el Tratamiento y el tiempo ($P<0.01$), los resultados se presentan en el Cuadro 20. Similar en las tres proteínas con el Tratamiento IN8, las intensidades*área disminuyeron en los primeros 45 min y se mantuvieron o aumentaron a las 24 h, lo que es un patrón de comportamiento opuesto al resto, excepto para OR3 con $\alpha\beta$ -Cristalina y OR4 con HSP70. Estos resultados son difíciles de explicar, porque la respuesta a IN5, OR4 y OR7 debió haber sido similar a IN8 en las tres proteínas, descansando en la simplicidad del argumento de la mayor densidad de minerales traza en la dieta, pero es necesario recordar que la variación inherente a la expresión de estas proteínas, puede estar influenciada por una gran cantidad de variables, incluyendo el muestreo. Por lo que es necesario plantear un esquema más intensivo de muestreo para deslindar la posibilidad de que concentraciones altas de minerales, independientemente de la fuente, puedan alterar la expresión de estas proteínas en los primeros minutos post mortem modificando su respuesta en consecuencia.

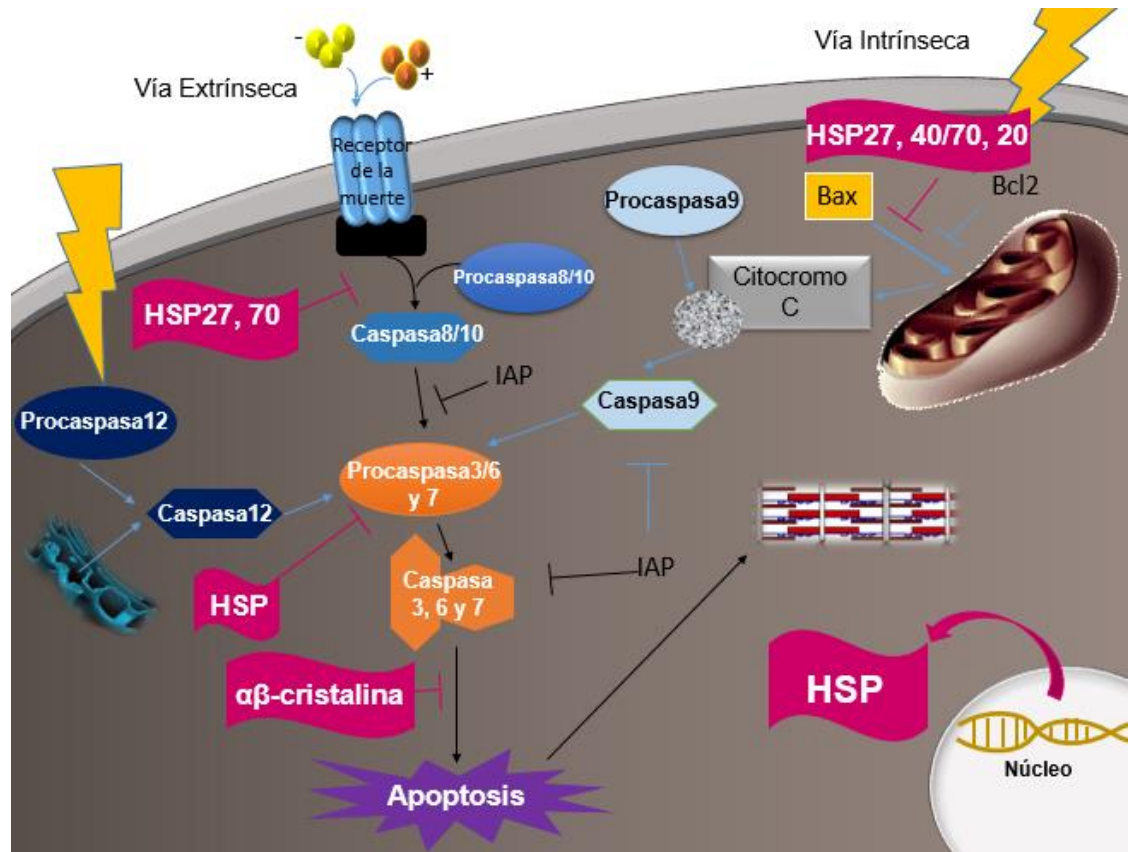


Figura 10. Esquema de acción de las proteínas de choque térmico en el proceso de muerte celular (Elaborado a partir de la información de Ouali *et al.*, 2006; Kemp *et al.*, 2010; Kemp y Parr, 2012).

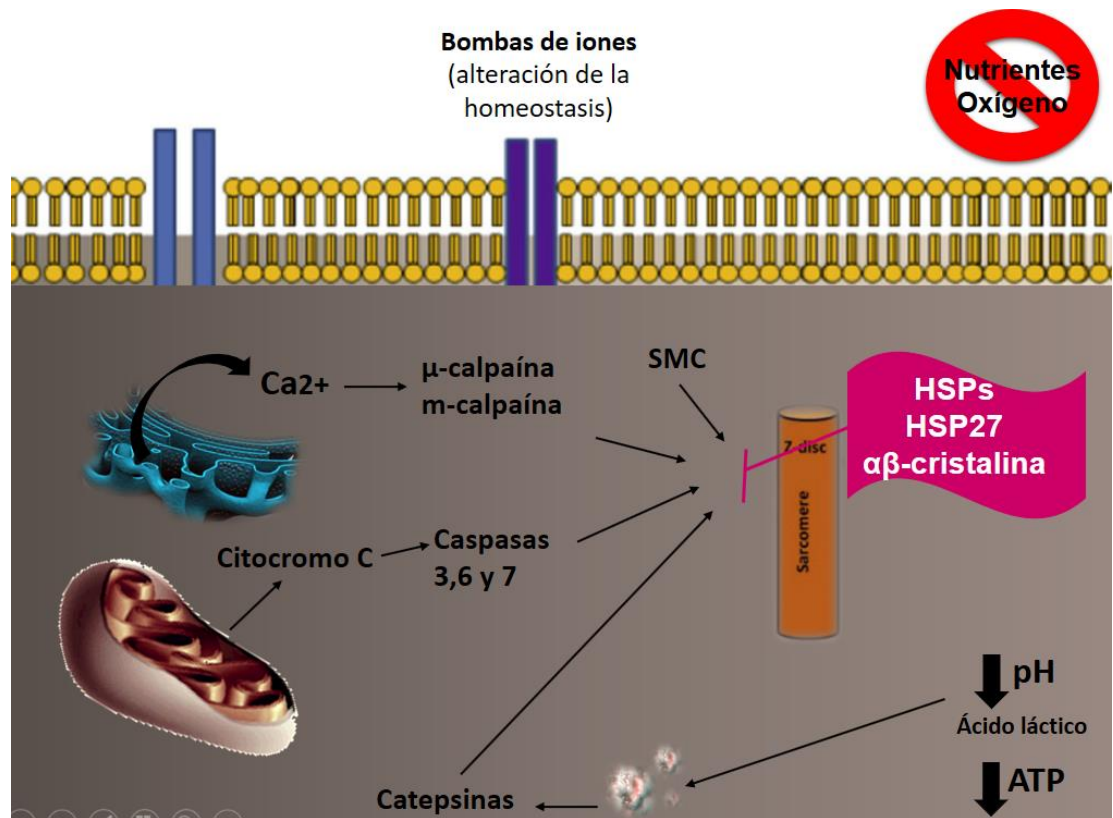


Figura 11. Esquema de acción de las proteínas de choque térmico en el proceso de maduración de la carne (Elaborado a partir de la información de Kemp *et al.*, 2010; D'Alessandro y Zolla, 2013; Eskin *et al.*, 2013; Lomiwes *et al.*, 2014).

En el tiempo (Cuadro 21) hubo diferencias significativas en las proteínas $\alpha\beta$ -Cristalina, HSP27, HSP70 y Caspasa 7 ($P < 0.01$); y de esas proteínas solo HSP70 y Caspasa 7 tuvieron interacción Tratamiento por tiempo (resultados discutidos anteriormente). Se puede observar que todas las proteínas evaluadas se encuentran expresadas incluso al tiempo 0 min, por lo que se puede decir que el proceso de matanza desencadena las rutas de señalización para la expresión de proteínas que actuarán protegiendo a la célula y/o comenzar con la muerte celular programada (apoptosis), además las proteínas que tuvieron diferencias significativas se expresaron mayormente al tiempo 45 min, y su proporción fue

menor a las 24 h, similar a lo observado por Lomiwes *et al.* (2013); esto es debido a que también se desencadenan rutas de señalización para la expresión de enzimas, por lo que las proteínas son susceptibles a la acción proteolítica (calpaínas y catepsinas entre otras).

Además se realizó la cuantificación de dos proteínas de interés las cuales se eligieron de acuerdo a los resultados previos (intensidad*área) y a la literatura, éstas fueron $\alpha\beta$ -Cristalina y Caspasa 7; los datos tuvieron una distribución normal y los resultados se presentan en los Cuadros 22 y 23. En donde podemos observar que no hay diferencias significativas por Tratamiento ($P>0.55$) y respecto al tiempo se tuvo el mismo comportamiento que en los resultados de inmunoblots, en donde existen diferencias significativas ($P<0.041$), y la mayor concentración se encontró al tiempo 45 min, 179.63 pg/mL de $\alpha\beta$ -Cristalina y 2.37 ng/mL de Caspasa 7.

Cuadro 19. Resultados de Intensidad*Área (Western Blot) de proteínas sarcoplásmicas por Tratamiento (medias de mínimos cuadrados por Tratamiento; los datos son los promedios en el tiempo).

Variable	Tratamiento ^a								EEM ^b	P<
	OR1	OR2	OR3	OR4	IN5	OR6	OR7	IN8		
HSP20	4.53	5.10	5.23	3.63	4.11	4.82	5.40	4.53	0.673	0.61
αβ-Cristalina ^c	7.22	6.90	6.78	6.40	6.27	6.73	5.09	6.63	0.662	0.50
HSP27	3.71	3.83	5.99	4.58	4.74	4.63	5.85	2.94	0.881	0.26
HSP40 ^d	4.53	5.45	4.67	4.06	6.61	5.16	4.68	5.22	0.601	0.17
HSP70 ^{c, e}	6.93	5.07	7.30	4.08	7.30	7.45	6.40	8.08	0.759	0.07
Caspasa 3	6.06	3.88	4.51	5.24	6.16	5.04	3.83	3.15	0.767	0.13
Caspasa 7 ^c	8.52	6.72	9.99	7.74	9.14	7.74	8.63	8.03	0.722	0.11
Caspasa 9 ^f	4.14	4.32	5.05	3.69	6.62	4.83	3.08	5.30	0.758	0.11

^a Tratamiento, por fuente, orgánica (OR; Bioplex-®, Alltech de México, S. A. de C. V.) e inorgánica (IN; Sulfatos), datos transformados con logaritmo base e, n= 9 por Tratamiento.

^b EEM, Error estándar de la media.

^c Interacción Tratamiento por tiempo (αβ-Cristalina, EEM= 1.048; HSP70, EEM= 1.115; Caspasa 7, EEM= 1.314, P<0.01).

^d Diferencias entre OR vs. IN a niveles altos, OR4 y OR7= 4.37 vs. IN5 e IN8= 5.92 (P<0.02).

^e Diferencias entre OR vs. IN a niveles altos, OR4 y OR7= 5.24 vs. IN5 e IN8= 7.69 (P<0.02).

^f Diferencias entre OR vs. IN a niveles altos, OR4 y OR7= 3.39 vs. IN5 e IN8= 5.96 (P<0.01).

Cuadro 20. Resultados de Intensidad*Área (Western Blot) de $\alpha\beta$ -Cristalina, HSP70 y Caspasa 7 por Tratamiento y tiempo (medias de mínimos cuadrados).

Tratamiento ^a	Tiempo ^b	$\alpha\beta$ -Cristalina ^c	HSP70 ^c	Caspasa 7 ^c
OR1	0 min	7.74	8.34	9.73
OR1	45 min	7.50	7.28	9.68
OR1	24 h	6.41	5.16	6.14
OR2	0 min	6.88	5.70	8.25
OR2	45 min	7.60	7.89	10.09
OR2	24 h	6.21	1.60	1.82
OR3	0 min	8.71	6.66	8.02
OR3	45 min	6.07	6.96	10.66
OR3	24 h	5.57	8.29	11.30
OR4	0 min	6.36	5.17	6.76
OR4	45 min	7.18	6.95	10.08
OR4	24 h	5.65	2.28	6.36
IN5	0 min	6.03	6.95	7.62
IN5	45 min	8.70	9.69	10.30
IN5	24 h	4.07	5.26	9.48
OR6	0 min	5.90	8.15	8.22
OR6	45 min	6.77	8.82	9.78
OR6	24 h	7.52	5.37	5.22
OR7	0 min	2.36	6.31	6.08
OR7	45 min	7.68	8.86	10.09
OR7	24 h	5.21	4.04	9.72
IN8	0 min	8.63	9.62	9.63
IN8	45 min	6.91	7.55	5.31
IN8	24 h	4.35	7.06	9.17

^a Tratamiento, por fuente, orgánica (OR; Bioplex-®, Alltech de México, S. A. de C. V.) e inorgánica (IN; Sulfatos).

^b n= 3 por tiempo.

^c Datos transformados con logaritmo base e. $\alpha\beta$ -Cristalina, EEM= 1.048; HSP70, EEM= 1.115; Caspasa 7, EEM= 1.314.

Cuadro 21. Resultados de Intensidad*Área (Western Blot) de proteínas sarcoplásmicas en función del tiempo (medias de mínimos cuadrados por tiempo; los datos son los promedios de los Tratamientos).

Variable	Tiempo ^a			EEM ^b	P<
	0 min	45 min	24 h		
HSP20	5.06	4.94	4.01	0.401	0.18
$\alpha\beta$ -Cristalina ^c	6.58	7.30	5.63	0.370	0.01
HSP27	3.13	6.96	3.51	0.512	0.01
HSP40	5.55	4.51	5.09	0.422	0.22
HSP70 ^c	7.11	8.00	4.88	0.394	0.01
Caspasa 3	4.63	5.05	4.53	0.531	0.77
Caspasa 7 ^c	8.04	9.50	7.40	0.465	0.01
Caspasa 9	4.24	4.47	5.18	0.461	0.33

^a Datos transformados con logaritmo base e, n= 24 por tiempo.

^b EEM= Error estándar de la media.

^c Interacción Tratamiento por tiempo ($\alpha\beta$ -Cristalina, EEM= 1.048; HSP70, EEM= 1.115; Caspasa 7, EEM= 1.314, P<0.01).

Cuadro 22. Concentración de $\alpha\beta$ -Cristalina y Caspasa 7 en muestras de lomo de cerdo (proteínas sarcoplásmicas) por Tratamiento (medias de mínimos cuadrados por Tratamiento; los datos son los promedios en el tiempo).

Variable	Tratamiento ^a								EEM ^b	P<
	OR1	OR2	OR3	OR4	IN5	OR6	OR7	IN8		
$\alpha\beta$ -Cristalina (pg/mL)	176.2	160.9	181.6	152.3	164.9	159.5	179.5	177.1	13.08	0.67
Caspasa 7 (ng/mL)	1.7	1.6	1.6	2.0	2.1	1.8	1.7	2.1	0.24	0.55

^a Tratamiento, por fuente, orgánica (OR; Bioplex-®, Alltech de México, S. A. de C. V.) e inorgánica (IN; Sulfatos), n=9 por Tratamiento.

^b EEM, Error estándar de la media.

Cuadro 23. Concentración de $\alpha\beta$ -Cristalina y Caspasa 7 en muestras de lomo de cerdo (proteínas sarcoplásmicas) en función del tiempo (medias de mínimos cuadrados por tiempo; los datos son los promedios de los Tratamientos).

Variable	Tiempo ^a			EEM ^b	P<
	0 min	45 min	24 h		
$\alpha\beta$ -Cristalina (pg/mL)	172.62	179.63	154.78	6.738	0.041
Caspasa 7 (ng/mL)	1.63	2.37	1.45	0.148	0.001

^a Muestras, n= 24 por tiempo.

^b EEM, Error estándar de la media.

7.4. Concentración de minerales

La concentración promedio de minerales en sangre (Cuadro 24), lomo e hígado (Cuadro 25) y heces (Cuadro 26) se incrementó conforme la densidad de minerales en la dieta (Tratamiento, $P<0.07$), sin embargo, los niveles en sangre y tejidos se encuentran dentro de los rangos fisiológicos normales. Cabe señalar que los valores iniciales de los tejidos (Nota al pie, Cuadro 25) eran numéricamente mayores que la mayoría de los analizados durante el experimento, pero los Tratamientos con la mayor dosis de minerales (OR4, IN5, OR7 e IN8) tuvieron valores promedio similares a los iniciales; esto es una respuesta directa a la dosis. Desde el destete al inicio del Experimento, los cerdos fueron alimentados con una premezcla (minerales en forma de sulfatos) que ofrece: Cu, 12 ppm; Fe, 100 ppm; Mn, 30 ppm y Zn, 120 ppm. Correlativamente, en heces, los niveles de minerales iniciales (Nota al pie, Cuadro 26) fueron mayores que en cualquiera de los valores analizados durante el Experimento. Además, se presenta la concentración de minerales en heces a través del tiempo en el Cuadro 27, existen diferencias significativas ($P<0.001$), siendo el primer periodo (21d) donde se presenta la mayor concentración.

Al utilizar comparaciones planeadas se encontraron tendencias para los niveles OR1 a OR4 en cada uno de los minerales traza analizados, las ecuaciones de regresión a partir del aporte total (ver Cuadro 5) se presentan en el Anexo 4. Para Cu, en carne e hígado hubo un incremento lineal (Carne Cu, ppm= $0.37+0.007x$, $R^2= 0.60$; Hígado Cu, ppm= $4.12+0.191x$, $R^2= 0.65$, $P<0.001$); la concentración en plasma se mantuvo constante, similar a lo publicado por Creech *et al.* (2004) y en heces hubo una tendencia lineal (Cu, ppm= $3.68+5.129x$, $R^2= 0.91$, $P<0.001$). Suttle y Mills (1966) mencionan que puede existir un mecanismo de adaptación que permite mantener los niveles de Cu plasmático relativamente constantes frente a la ingestión excesiva o tóxica de este elemento. Este mecanismo funcionaría movilizándolo Cu desde la sangre hacia los tejidos y también por control

de su absorción y excreción. Además, en heces, se encontraron diferencias por fuente al nivel alto del mineral, OR4 y OR7= 111.17 vs. IN5 e IN8= 113.19 (EEM= 0.474, $P < 0.001$); Creech *et al.* (2004) encontraron que hubo menor excreción usando minerales quelados respecto a sulfatos a una concentración baja del elemento y Veum *et al.* (2004) observaron lo mismo a concentraciones mayores (100 ppm de Cu añadido); por lo que se puede inferir que la fuente inorgánica (sulfato de cobre) tiene un mayor potencial contaminante. En Fe, la concentración en carne, plasma y heces tuvo un comportamiento lineal (Carne Fe, ppm= $4.45 + 0.003x$, $R^2 = 0.16$; Plasma Fe, ppm= $0.92 + 0.037x$, $R^2 = 0.52$; Heces Fe, ppm= $284.42 + 3.016x$, $R^2 = 0.49$, $P < 0.001$), sin embargo, en hígado fue cuadrático (Fe, ppm= $12.05 + 1.825x - 0.002x^2$, $R^2 = 0.97$, $P < 0.001$). Al ser el hígado el primer órgano que filtra los compuestos que son absorbidos por el organismo, este puede llegar a saturarse, por lo tanto, para mantener la homeostasis y las concentraciones fisiológicas normales en los tejidos se incrementa el recambio y la excreción, los datos sugieren que el hígado pudo haber llegado a una concentración máxima como reservorio de Fe (concentración normal ≈ 280 ppm), incrementándose la movilización del elemento, por lo tanto, la concentración en los tejidos, plasma y su excreción se aumentó. Al igual que en Cu, en heces, se encontraron diferencias por fuente al nivel alto del mineral, OR4 y OR7= 1064.13 vs. IN5 e IN8= 1072.93 (EEM= 1.817, $P < 0.001$). El Cu y Fe son los minerales que causan el mayor potencial contaminante debido a su naturaleza oxidante, si bien la diferencia en excreción entre las fuentes es mínima, es importante resaltar que los niveles que se utilizaron no son tan altos como los que se pueden encontrar en la industria, un ejemplo claro es el sulfato de cobre utilizado como promotor de crecimiento (hasta 250 ppm), el cual es añadido en exceso $\approx 36\times$ de acuerdo a los requerimientos del NRC (2012) y $\approx 15\times$ del nivel máximo utilizado en este trabajo, por lo que si lo vemos desde ese punto de vista, el impacto en la reducción del potencial contaminante al utilizar minerales traza de fuente orgánica (quelatos) puede ser de gran consideración. Para el caso de Mn, los tejidos, plasma y heces tuvieron una tendencia lineal (Carne Mn, ppm= $0.22 + 0.002x$, $R^2 = 0.32$; Hígado Mn, ppm=

$2.70+0.016x$, $R^2= 0.17$; Plasma Mn, ppm= $0.41+0.011x$, $R^2= 0.27$; Heces Mn, ppm= $67.93+3.688x$, $R^2= 0.91$, $P<0.001$), cualquier incremento en la adición de Mn resultó en una mayor concentración del elemento, dentro de los niveles fisiológicos normales, si bien el requerimiento es bajo (2 ppm, NRC) y el nivel total añadido en el TRT más alto fue de 67 ppm, se pudo observar que el organismo tiene un extraordinario mecanismo de respuesta para lograr mantener la homeostasis, cabe destacar que Mn es uno de los elementos traza con menos potencial oxidante. Y finalmente para Zn se observó un comportamiento lineal en carne, plasma y heces (Carne Zn, ppm= $9.30+0.018x$, $R^2= 0.87$; Plasma Zn, ppm= $0.57+0.037x$, $R^2= 0.67$; Heces Zn, ppm= $9.09+5.187x$, $R^2= 0.96$, $P<0.001$); y en hígado, tendencia cuadrática (Zn, ppm= $53.03+0.457x-0.002x^2$, $R^2= 0.83$, $P<0.001$); Gowanlock *et al.* (2015) encontraron que la concentración de Zn en hígado se incrementó en respuesta a cualquier adición del elemento en la dieta, y los valores fueron muy similares a los encontrados en este trabajo. Además, se encontraron diferencias por fuente al nivel alto del mineral en plasma, OR4 y OR7= 6.67 vs. IN5 e IN8= 7.12 (EEM= 0.065, $P<0.001$). Al igual que el caso de Fe, el hígado tuvo una respuesta negativa (termino cuadrático negativo) y se incrementó la excreción, un hecho interesante es que se encontraron diferencias por fuente en la concentración plasmática de Zn, estos datos podrían sugerir que la fuente inorgánica (sulfato de zinc) se absorbe en mayor proporción que la orgánica por lo que se estimulará el recambio tempranamente y se incrementarán los niveles en plasma y heces.

Esto ilustra la capacidad de respuesta de los animales para acumular dosis de minerales traza que exceden los requerimientos, lo que es un hecho interesante en la homeostasis, ya que como elementos esenciales se mantendrán hasta el punto de prevenir la toxicidad incrementando el recambio, como se ha demostrado claramente para el Cu (Dove y Ewan, 1990). Por lo tanto, las estimaciones de balance mineral tienden a confundirse, si los datos de retención respecto a los

requerimientos, no son juzgados por la función en el organismo, como se ha hecho para Se (Mahan y Parrett, 1996; Mahan *et al.* 1999).

Cuadro 24. Concentración de minerales en plasma por Tratamiento (medias de mínimos cuadrados).

Variable (ppm)	Tratamiento ^a								EEM ^b	P<
	OR1	OR2	OR3	OR4	IN5	OR6	OR7	IN8		
Cu ^c	1.67	1.71	1.69	1.72	1.75	1.70	1.58	1.75	0.036	0.07
Fe ^{c, d}	6.90	7.69	10.00	10.49	10.82	7.45	11.13	10.90	0.113	0.01
Mn ^{c, d}	0.68	0.82	0.88	1.13	1.26	0.93	1.55	1.47	0.033	0.01
Zn ^{c, d, e}	3.13	3.46	4.14	6.58	7.51	3.43	6.75	6.73	0.065	0.01

^a Tratamiento, por fuente, orgánica (OR; Bioplex-®, Alltech de México, S. A. de C. V.) e inorgánica (IN; Sulfatos).

^b EEM, Error estándar de la media.

^c Muestras, n=20 por Tratamiento.

^d Tendencia lineal para OR1 a OR4 ($P<0.001$).

^e Diferencia entre OR vs. IN a niveles altos, OR4 y OR7= 6.67 vs. IN5 e IN8= 7.12 (EEM= 0.065, $P<0.001$).

Cuadro 25. Concentración de minerales en lomo e hígado por Tratamiento (medias de mínimos cuadrados; resultados expresados en materia húmeda).

Variable ^a (ppm)	Tratamiento ^b								EEM ^c	P<
	OR1	OR2	OR3	OR4	IN5	OR6	OR7	IN8		
Lomo Cu ^d	0.42	0.48	0.51	0.53	0.52	0.41	0.52	0.54	0.012	0.001
Lomo Fe ^d	4.91	5.01	5.23	5.19	5.29	4.93	5.21	5.19	0.073	0.001
Lomo Mn ^d	0.26	0.28	0.29	0.32	0.32	0.26	0.31	0.31	0.008	0.001
Lomo Zn ^d	10.36	10.81	11.43	11.92	11.89	10.43	11.88	11.83	0.066	0.001
Hígado Cu ^e	6.25	6.89	8.04	8.73	8.72	7.44	8.70	8.56	0.447	0.001
Hígado Fe ^f	239.19	275.61	302.91	320.84	321.22	221.38	333.60	334.74	1.012	0.001
Hígado Mn ^e	3.08	3.28	3.43	3.66	3.71	3.07	3.86	3.86	0.245	0.001
Hígado Zn ^f	72.47	79.11	81.06	81.12	81.41	72.13	81.72	81.83	0.920	0.001

^a Niveles iniciales en mg/kg (n= 6): Lomo Cu, 0.83 ± 0.078 ; Lomo Fe, 4.75 ± 0.247 ; Lomo Mn, 0.26 ± 0.031 ; Lomo Zn, 11.82 ± 0.202 ; Hígado Cu, 5.39 ± 0.773 ; Hígado Fe, 193.33 ± 2.722 ; Hígado Mn, 4.61 ± 0.469 ; Hígado Zn, 61.92 ± 1.282 .

^b Tratamiento, por fuente, orgánica (OR; Bioplex-®, Alltech de México, S. A. de C. V.) e inorgánica (IN; Sulfatos).

^c EEM, Error estándar de la media.

^d Tendencia lineal de OR1 a OR4 ($P < 0.001$), n= 12.

^e Tendencia lineal para OR1 a OR4 ($P < 0.001$), n= 8.

^f Tendencia cuadrática para OR1 a OR4 ($P < 0.001$), n= 8.

Cuadro 26. Concentración de minerales en heces por Tratamiento (medias de mínimos cuadrados por Tratamiento; los datos son los promedios en el tiempo; resultados expresados en materia seca).

Variable ^a (ppm)	Tratamiento ^b								EEM ^c	P<
	OR1	OR2	OR3	OR4	IN5	OR6	OR7	IN8		
Cu ^{d, e}	48.34	63.33	89.53	120.53	121.54	44.09	101.80	104.83	0.474	0.001
Fe ^{d, f}	800.13	839.40	953.80	1116.58	1119.51	763.12	1011.68	1026.34	1.817	0.001
Mn ^d	163.00	191.06	241.37	295.23	294.68	136.24	267.50	269.28	0.764	0.001
Zn ^d	303.51	470.72	606.37	766.25	766.40	267.20	722.34	724.28	1.150	0.001

^a Niveles iniciales en mg/kg (n= 6): Cu, 154.06 ± 1.396; Fe, 1886.57 ± 5.429; Mn, 346.50 ± 3.850; Zn, 945.12 ± 3.696; resultados expresados como materia seca.

^b Tratamiento, por fuente, orgánica (OR; Bioplex-®, Alltech de México, S. A. de C. V.) e inorgánica (IN; Sulfatos), n=40 por Tratamiento.

^c EEM, Error estándar de la media.

^d Tendencia lineal para OR1 a OR4 (P<0.001).

^e Diferencia entre OR vs. IN a niveles altos, OR4 y OR7= 111.17 vs. IN5 e IN8= 113.19 (EEM= 0.474, P<0.001).

^f Diferencia entre OR vs. IN a niveles altos, OR4 y OR7= 1,064.13 vs. IN5 e IN8= 1,072.93 (EEM= 1.817, P<0.001).

Cuadro 27. Concentración de minerales en heces en función del tiempo (medias de mínimos cuadrados por tiempo; los datos son los promedios de los Tratamientos).

Variable	Tiempo (Días) ^a				EEM ^b	P<
	21	42	63	84		
Cu, mg/kg materia seca	94.15	82.17	83.96	86.72	0.299	0.001
Fe, mg/kg materia seca	954.82	826.02	930.70	1103.75	0.953	0.001
Mn, mg/kg materia seca	248.40	225.10	220.05	235.62	0.480	0.001
Zn, mg/kg materia seca	616.88	558.80	552.47	585.38	0.621	0.001

^a Muestras, n= 80 por tiempo.

^b EEM, Error estándar de la media.

VIII. CONCLUSIONES

No se encontraron diferencias en el comportamiento productivo de los animales; en todos los casos los tejidos estudiados mostraron concentraciones de minerales dentro de los niveles fisiológicos normales, y los índices de calidad y de la oxidación de carne no se alteraron. Sin embargo, con los minerales quelados en altas concentraciones en la dieta se redujo la expresión de proteínas de choque térmico (HSP40 y HSP70) y Caspasa 9, lo que sugiere que la disponibilidad aparente de los elementos puede influir en cómo se usan a nivel celular. Ahora bien, cualquier aumento en la densidad de los minerales traza en la dieta, independientemente de la fuente, incrementará la excreción fecal y por lo tanto el potencial contaminante del ambiente; la conveniencia de las fuentes queladas se encontró a dosis altas de Cu y Fe.

Es probable que la provisión de los minerales traza por los ingredientes sea suficiente para cubrir los requerimientos de los cerdos, pero esta inferencia debe limitarse a la disponibilidad que se encuentre en los alimentos, de lo que hay muy poca información.

La adición de minerales traza (Cu, Fe, Mn y Zn), al 50% de las recomendaciones actuales del NRC (2012), fue suficiente en cerdos para la mejor expresión del crecimiento sin modificación de los parámetros de calidad de carne.

Al reducir la concentración de minerales en la dieta se logra una reducción de la excreción fecal de 72 mg/kg de Cu, 316 mg/kg de Fe, 132 mg/kg de Mn y 463 mg/kg de Zn.

IX. IMPLICACIONES

Con los resultados de este trabajo, al adicionar los minerales traza al 50% del requerimiento se pueden reducir los márgenes de seguridad que inducen los excesos en la formulación de raciones para cerdos. Una reducción mayor en la suplementación tendrá un impacto menor en la reducción de la excreción en las heces y tendrá que proyectarse para la industria la incertidumbre en la satisfacción de los requerimientos.

X. REFERENCIAS

- Aebi, H. E. 1983. Catalase, Methods of enzymatic analysis. Vol. 3: 273–286.
- AMSA. 2012. Meat Color Measurement Guidelines. Champaign, Illinois. American Meat Science Association.
- AMSA. 1995. Research guidelines for cookery, sensory evaluation and instrumental tenderness measurements of fresh meat. Savoy. American Meat Association.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (930.15) 15th Ed.
- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (999.10). 17th Ed.
- Armenteros, M., Heinunen M., Ollilainen V., Toldrá F., Estévez M. 2009. Analysis of protein carbonyls in meat products by using the DNPH-method, fluorescence spectroscopy and liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry (LC–ESI–MS). Meat Science. 83: 104-112.
- Astruc, T., Marinova, P., Labas, R., Gatellier, P., Santé-lhoutellier, V. 2007. Detection and Localization of Oxidized Proteins in Muscle Cells by Fluorescence Microscopy. J. Agric. Food Chem. 55: 9554-9558.
- Avila, D. S., Gubert, P., Roos, D. H., Puntel, R., Aschnner, M. 2016. Manganese. Encyclopedia of Food and Health. Elsevier. 637.
- Bai, S.P., Lu, L., Luo, X.G., Liu, B. 2008. Cloning, sequencing, characterization and expressions of divalent metal transporter one in the small intestine of broilers. Poultry Science. 87: 768–776.
- Beard, J., Han, O. 2009. Systemic iron status. Biochimica et Biophysica Acta. 1790: 584–588.
- Bekhit, A., Hopkins, D., Fahri, F., Ponnampalam, E. 2013. Oxidative Processes in Muscle Systems and Fresh Meat: Sources, Markers, and

Remedies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 12: 565-597.

- Bendall, J. R., Swatland H. J. 1988. A review of the relationships of pH with physical aspects of pork quality. *Meat Science*. 24: 85-126.
- Bergmeyer, H. U. 1974. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press. 243-309.
- Bertol, T. M., Ellis, M., Ritter, M. J., McKeith, F. K. 2005. Effect of feed withdrawal and handling intensity on longissimus muscle glycolytic potential and blood measurements in slaughter weight pigs. *J. Anim. Sci.* 83: 1536–1542.
- Bertol, T. M., Braña, D. V., Ellis, M., Ritter, M. J., Peterson, B. A., Mendoza, O. F., McKeith, F. K. 2011. Effect of feed withdrawal and dietary energy source on muscle glycolytic potential and blood acid-base responses to handling in slaughter-weight pigs. *J. Anim. Sci.* 89: 1561–1573.
- Bernard, C., Cassar-Malek, I., L. Cunff, M., Dubroeuq, H., Renand, G. Hocquette, J. F. 2007. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(13): 5229–5237.
- Bowman, A., Kwakyea, G., Hernández E., Aschner, M. 2011. Role of manganese in neurodegenerative diseases. *J. of Trace Elements in Medicine and Biology*. 25: 191–203.
- Braña, D., Ramírez, E., Rubio, M., Sánchez, A., Torrescano, G., Arenas, M, Partida, J., Ponce, E., Ríos, F. 2011. *Manual de Análisis de Calidad en Muestras de Carne*. Folleto técnico No. 11. ISBN: 978-607-425-612-3.
- Brumm, M. C., Sutton, A. L., Jones, D. D. 1980. Effect of season and pigs size on swine waste production. *Trans. ASAE* 23: 165-168.
- Celis, A. 2016. Sondeo de niveles de vitaminas para aves y cerdos. VII Congreso CLANA.

- Cohen, J. 2014. Trace mineral nutrition symposium: Exploring recent developments in swine and ruminants. *J. Anim. Sci.* 92:414–415.
- Creech, B. L., Spears, J. W., Flowers, W. L., Hill, G. M., Lloyd, K. E., Armstrong, T. A., Engle, T. E. 2004. Effect of dietary trace mineral concentration and source (inorganic vs. chelated) on performance, mineral status, and fecal mineral excretion in pigs from weaning through finishing. *J. Anim. Sci.* 82: 2140–2147.
- Crisponi, G., Nurchia, V. M., Fanni, D., Gerosa, C., Nemolato, S., Faa, G. 2010. Copper-related diseases: From chemistry to molecular pathology. *Coordination Chemistry Reviews.* 254: 876–889.
- Dalrymple, R., Hamm, R. 1973. A method for the extraction of glycogen and metabolites from a single muscle sample. *Journal of Food Technology.* 8: 439–444.
- D'Alessandro, A., Zolla, L. 2013. Meat science: From proteomics to integrated omics towards system biology. *J. Proteomics.* 78: 558-577.
- De Azevedo Gomes, H., da Silva, E.N., Lopes do Nascimento, M.R., Fukuma, H.T. 2003. Evaluation of the 2-thiobarbituric acid method for the measurement of lipid oxidation in mechanically deboned gamma irradiated chicken meat. *Food Chem.* 80: 433-437.
- Descalzo, A. M., Insani, E. M., Biolatto, A., Sancho, A. M. 2007. Influence of pasture or grain-based diets supplemented with vitamin E on antioxidant/oxidative balance of argentine beef. *Meat Science.* 70: 35-44.
- Descalzo, A. M., Sancho, A. M. 2008. A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina. *Meat Science.* 79: 423-436.
- Di Luca, A., Mullen, A., Elia, G., Davey, G., Hamill, R. 2011. Centrifugal drip is an accessible source for protein indicators of pork ageing and water-holding capacity. *Meat Science.* 88: 261-270.

- Dove, C. R., Ewan, R. C. 1990. Effect of excess dietary copper, iron or zinc on the tocopherol and selenium status of growing pigs. *J. Anim. Sci.* 68: 2407-2413.
- Dreiling, C. E., Brown, D. E., Casale, L., Kelly, L. 1987. Muscle glycogen: Comparison of iodine binding and enzyme digestion assays and application to meat samples. *Meat Science.* 20: 167–177.
- Edmonds, M. S., Arentson, B. E. 2001. Effect of supplemental vitamins and trace minerals on performance and carcass quality in finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 79: 141–147.
- Ellingsen, D. G., Møller, L. B., Aaseth, J. 2015. Copper. Chapter 5. *Handbook on the Toxicology of Metals.* 4 Ed. Elsevier. 765-786.
- Estévez, M. 2011. Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Science.* 89: 259–279.
- Eskin, M., Aliani, M., Shahidi, F. 2013. *Biochemistry of Foods.* Chapter 3: Meat and Fish. Elsevier. 127-185.
- Farina, M., Avila, D. S., Teixeira da Rocha, J. B., Aschner, M. 2013. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: A focus on iron, manganese and mercury. *Neurochemistry International.* 62: 575–594.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. www.fao.org/ag/againfo/themes/es/pigs/human_health.html.
- Fernández, J., Álvarez, J.A., López, J.A. 1997. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chem.* 59: 345-353.
- Flohr, J. R., Tokach, M. D., Woodworth, J. C., DeRouchey, J. M., Dritz, S. S., Goodband, R. D. 2015. "Vitamin and Trace Minerals: A Survey of Current Feeding Regimens" *Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports: Vol. 1: Iss. 7.*
- Frankel, E.N., Meyer, A.S. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 80: 1925-41.

- Gaetke, L. M., Chow, C. K. 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*. 189: 147-163.
- Garrick, M. D., Dolan, K.G., Horbinski, C., Ghoio, A.J., Higgins, D., Porcubin, M., Moore, E.G., Hainsworth, L.N., Umbreit, J.N., Conrad, M.E., Feng, L., Lis, A., Roth, J.A., Singleton, S., Garrick, L.M. 2003. DMT 1: a mammalian transporter for multiple metals. *Biometals*. 16: 41–54.
- Georgievskii, V. I., Annenkov, B. N., Samokhin, V. T. 1982. *Mineral Nutrition of Animals*, 1st Edition. Studies in the Agricultural and Food Sciences. 171.
- Gill, J. L., Hafs, H. D. 1971. Analysis of Repeated Measurements of Animals. *J. Anim. Sci.* 33: 331–336.
- Gowanlock, D. W., Mahan, D. C., Jolliff, J. S., Moeller, S. J., Hill, G. M. 2013. Evaluating the NRC levels of Cu, Fe, Mn, and Zn using organic minerals for grower-finisher swine. *J. Anim. Sci.* 91: 5680–5686.
- Gowanlock, D. W., Mahan, D. C., Jolliff, J. S., Hill, G. M. 2015. Evaluating the influence of National Research Council levels of copper, iron, manganese, and zinc using organic (Bioplex) minerals on resulting tissue mineral concentrations, metallothionein, and liver antioxidant enzymes in grower–finisher swine diets. *J. Anim. Sci.* 93: 1149–1156.
- Hamm, R., 1975. “Water-holding Capacity of Meat”, en *Meat*. D. J. Cole y R. A. Lawrie (compiladores), The Avi Publishing Co., Westport.
- Hammelman, J.E., Bowker, B.C, Grant, A.L., Forrest, J.C., Schinckel, A.P., Gerrard, D.E. 2003. Early postmortem electrical stimulation simulates PSE pork development. *Meat Science*. 63: 69–77.
- Hambrecht, E., Eissen, J. J., Newman, D. J., Smits, C. H. M., Verstegen, M. W. A., den Hartog, L. A. 2005. Preslaughter handling effects on pork quality and glycolytic potential in two muscles differing in fiber type composition. *J. Anim. Sci.* 83: 900–907.
- Hamilton, D. N., Ellis, M., Hemann, M. D., McKeith, F. K., Miller, K. D., Purser, K. W. 2002. The impact of longissimus glycolytic potential and short-

term feeding of magnesium sulfate heptahydrate prior to slaughter on carcass characteristics and pork quality. *J. Anim. Sci.* 80: 1586–1592.

- Hernández, P., Zomeño, L., Ariño, B., Blasco, A., 2004. Antioxidant, lipolytic and proteolytic enzyme activities in pork meat from different genotypes. *Meat Science.* 66: 525-529.
- Hojyo, S., Fukada, T. 2016. Zinc transporters and signaling in physiology and pathogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 611: 43-50.
- Holmer, S.F., McKeith, R.O., Boler, D.D., Dilger, A.C., Eggert, J.M., Petry, D.B., McKeith, F.K., Jones, K.L. and Killefer, J. 2009. The effect of pH on shelf-life of pork during aging and simulated retail display. *Meat Science.* 82:1, 86–93.
- Honikel, K. O. 1998. Reference methods for the assessment or physical characteristic of meat. *Meat science.* 49: 447-457.
- Honikel, K. O. 2004. Cold and Heat Shortening. *Conversion of Muscle to Meat.* Elsevier. 318-323.
- Honikel, K. O. 2014. Rigor Mortis, Cold, and Rigor Shortening. *Encyclopedia of Meat Sciences.* Elsevier. 358-365.
- Huff-Lonergan, E., Zhang, W, Lonergan, S. 2010. Biochemistry of postmortem muscle - Lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Science.* 86: 184–195.
- Hwang, I.H., Park, B.Y., Kim, J.H., Cho, S.H., Lee J.M. 2005. Assessment of postmortem proteolysis by gel-based proteome analysis and its relationship to meat quality traits in pig longissimus. *Meat Science.* 69: 79–91.
- Kehrer, J. P. 2000. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology.* 149: 43–50.
- Kemp, C.M., Parr, T. 2012. Advances in apoptotic mediated proteolysis in meat tenderization. *Meat Science.* 92: 252–259.
- Kemp, C., Sensky, P., Bardsley, R., Buttery, R., Parr, T. 2010. Tenderness – An enzymatic view. *Meat Science.* 84: 248–256.

- Kerr, B. J., Kellner, T. A., Shurson, G. C. 2015. Characteristics of lipids and their feeding value in swine diets. *J. Anim. Sci. Biotech.* 6:30.
- Kim, Y. Y., Mahan, D. C. 2001. Comparative effects of high dietary levels of organic and inorganic selenium on selenium toxicity of growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 79: 942-948.
- Kim, D., Woo, J. and Lee, C. 2004. Effects of Stocking Density and Transportation Time of Market Pigs on Their Behavior, Plasma Concentrations of Glucose and Stress-associated Enzymes and Carcass Quality. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 17, 1: 116-121.
- Kim, N. K., Cho, S., Lee, S. H., Park, H. R., Lee, C. S., Cho, Y. M., Choy, Y. H., Yoon, D., Im, S. K., Park, E. W. 2008. Proteins in longissimus muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality. *Meat Science.* 80: 1068-1073.
- Kim, J. C., Jose, C. G., Trezona, M., Moore, K. L., Pluske, J. R., Mullan B. P. 2015. Supra-nutritional vitamin E supplementation for 28 days before slaughter maximises muscle vitamin E concentration in finisher pigs. *Meat Science.* 110: 270-277.
- Kingston, H. M., Jassie, L. B. 1988. Introduction to Microwave Sample Preparation. American Chemical Society, Washington DC. 155- 166.
- Krzywicki, K. 1979. Assessment of relative content of myoglobin, oxymyoglobin and metmyoglobin at the surface of beef. *Meat Science.* 3: 1–10.
- Kwasiborski, A. Sayd, T., Chambon, C., Santé-Lhoutellier, V., Rocha, D., Terlouw, C. 2008. Pig Longissimus lumborum proteome: Part I. Effects of genetic background, rearing environment and gender. *Meat Science.* 80: 968–981.
- Lanari, M. C., Cassens, R. G., Schaefer, D. M., Scheller, K. K. 1994. Effect of dietary vitamin E on pigment and lipid stability of frozen beef: A kinetic analysis. *Meat Science.* 38: 3-15.

- Lauridsen, C., Højsgaard, S., Sørensen, M.T. 1999. Influence of Dietary Rapeseed Oil, Vitamin E, and Copper on the Performance and the Antioxidative and Oxidative Status of Pigs. *J. Anim. Sci.* 77: 906–916.
- Linder, M. 2001. Copper and genomic stability in mammals. *Mutation Research.* 475: 141–152.
- Littell, R. C., Henry, P. R., Ammerman, C. B. 1998. Statistical Analysis of Repeated Measures Data Using SAS Procedures. *J. Anim. Sci.* 76: 1216-1231.
- Lomiwes, D., Farouk, M.M, Frost, D.A., Dobbie, P.M., Young, O.A. 2013. Small heat shock proteins and toughness in intermediate pHu beef. *Meat Science.* 95: 472–479.
- Lomiwes, D., Farouk, M. M., Wiklund, E. and Young, O. A. 2014. Small heat shock proteins and their role in meat tenderness: A review. *Meat Science.* 96: 26-40.
- Ma, Y. L., Lindemann, M. D., Cromwell, G. L., Cox, R. B., Rentfrow, G., Pierce, J. L. 2012. Evaluation of trace mineral source and preharvest deletion of trace minerals from finishing diets for pigs on growth performance, carcass characteristics, and pork quality. *J. Anim. Sci.* 3833–3841.
- Mahan, D. C. and Parrett, N. A. 1996. Evaluating the Efficacy of Selenium-Enriched Yeast and Sodium Selenite on Tissue Selenium Retention and Serum Glutathione Peroxidase Activity in Grower and Finisher Swine. *J. Anim. Sci.* 74: 2967–2974.
- Mahan, D. C., Cline, T. R., Richert, B. 1999. Effects of Dietary Levels of Selenium-Enriched Yeast and Sodium Selenite as Selenium Sources Fed to Growing-Finishing Pigs on Performance, Tissue Selenium, Serum Glutathione Peroxidase Activity, Carcass Characteristics, and Loin Quality. *J. Anim. Sci.* 77: 2172–2179.
- Marcos, B., Mullen, A. 2014. High pressure induced changes in beef muscle proteome: Correlation with quality parameters. *Meat Science.* 97; 11-20.

- Matés, J. Pérez-Gómez, C., Núñez, I. 1999. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry*. 32, 8: 595–603.
- Meilgaard M., Civille G. V., Carr T. 1999. *Sensory Evaluation Techniques*, Chapter 1. 3 Ed. USA. 66-146.
- Mercier, Y., Gatellier, P., Renerre, M. 2004. Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet. *Meat Science*. 66: 467–473.
- Mohanty, T. R., Park, K.M., Pramod, A.B., Kim, J.H., Choe, H.S., Hwang, I.H. 2010. Molecular and biological factors affecting skeletal muscle cells after slaughtering and their impact on meat quality: A mini-review. *Journal of Muscle Foods*. 21: 51–78.
- Monin, G., P. Sellier. 1985. Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the post-mortem period: the case of the Hampshire breed. *Meat Science*. 13: 49-63.
- Morzel, M., Terlouw, C., Chambon, C., Micol, D., Picard, B. 2008. Muscle proteome and meat eating qualities of Longissimus thoracis of “Blonde d’Aquitaine” young bulls: A central role of HSP27 isoforms. *Meat Science*. 78: 297–304.
- NRC, 2012. *Nutrient Requirements of Swine*. National Academy Press, Washington, DC.
- NOM-033-SAG/ZOO. 2014. *Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres*.
- NOM-051-ZOO. 1995. *Trato humanitario en la movilización de animales*.
- Ouali, A., Herrera-Mendez, C., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L., Sentandreu, M. 2006. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*. 74: 44–58.
- Östling, P., Björk, J., Roos-Mattjus, P., Mezger, V., Sistonen, L. 2007. Heat Shock Factor 2 (HSF2) Contributes to Inducible Expression of hsp Genes through Interplay with HSF1. *J. of Biological Chemistry*. 282: 7077–7086.

- Paredi, G., Raboni, S., Bendixen, E., Almeida, A., Mozzarelli, A. 2012. "Muscle to meat" molecular events and technological transformations: The proteomics insight. *Journal of Proteomics*. 75: 4275-4289.
- Pinos-Rodríguez, J., García-López, J., Peña-Avelino, L., Rendón-Huerta, J., González-González, C., Tristán-Patiño, F. 2012. Environmental regulations and impact of manure generated by livestock operations in some American countries. *Agrociencia* 46: 359-370.
- Ponka, P., Tenenbein, M., Eaton, J. W. 2015. Iron. Chapter 41. *Handbook on the Toxicology of Metals*. 4 Ed. Elsevier. 879-902.
- Pulford, D.J., Fraga Vazquez, S., Frost, D.F., Fraser-Smith, E., Dobbie, P., Rosenvold, K. 2008. The intracellular distribution of small heat shock proteins in post-mortem beef is determined by ultimate pH. *Meat Science*. 79: 623–630.
- Rae, T.D., Schmidt, P.J., Pufahl, R.A., Culotta, V.C., O'Halloran, T.V. 1999. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*. 284: 805–808.
- Raharjo, S., Sofos, J. N., Schmidt, G. R. 1992. Improved Speed, Specificity and Limit of Determination of an Aqueous Acid Extraction Thiobarbituric Acid C18 Method for Measuring Lipid Peroxidation in Beef. *J. Agric. Food Chem.* 40(11): 2182-2185.
- Raharjo, S., Sofos, J. N. 1993. Methodology for Measuring Malonaldehyde as a Product of Lipid Peroxidation in Muscle Tissues: A Review. *Meat science*. 35: 145-169.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggene, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237.
- Richards, J., Zhao, J., Harrell, R., Atwell, C., Dibner, J. 2010. Trace Mineral Nutrition in Poultry and Swine. *J. Anim. Sci.* 11: 1527-1534.

- Rodríguez, P., Menendez, J., Trujillo, Y. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cub Med Mil.* 30: 36-44.
- Rucker. R. B., Fascetti, A. J., Keen, C. L. 2008. Trace minerals. Chapter 22. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6th Ed. Elsevier. 663-693.
- SAGARPA, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Estadisticas/Paginas/default.aspx>.
- Sales, J. Koukolová, V. 2011. Dietary vitamin E and lipid and color stability of beef and pork: Modeling of relationships. *J. Anim. Sci.* 89: 2836-2848.
- Sentandreu, M. A., Coulis, G., Ouali, A. 2002. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science and Technology.* 13: 400–421.
- Severiano, P., Gómez, D., Méndez, C., Pedrero, D., Gómez, C., Ríos, S., Escamilla, A., Utrera, M. 2017. Manual de evaluación sensorial. UNAM. PAPIIME PE201210.
- Suttle, N., Mills, C. 1966. Studies of the toxicity of copper to pigs. 1. Effects of oral supplements of zinc and iron salts on the development of copper toxicosis. *Br. F. Nutr.* 20: 135.
- Suttle, N. 2010. *Mineral Nutrition of Livestock*. 4th Ed. FSC Mixed Sources. SA-COC-1565.
- Torres, J., Botero, M. 2012. El mecanismo de muerte celular programada y su importancia en el proceso de maduración de la carne bovina. *Rev. Med. Vet.* ISSN 0122-9354: 23: 83-96.
- Trefan, L., Bünger, L., Bloom-Hansen, J., Rooke, J. A., Salmi, B., Larzul, C., Terlouw, C., Doeschl-Wilson, A. 2011. Meta-analysis of the effects of dietary vitamin E supplementation on α -tocopherol concentration and lipid oxidation in pork. *Meat Science.* 87: 305-314.
- Underwood, E. J., Suttle, N. F. 1999. *The mineral nutrition of livestock* 3rd Edition. CABI Publishing, CAB International, UK. 255-436.

- USDA, México. 2016. Livestock and Products Annual. Mexico's Cattle and Pork Sectors to Recover in 2017. Report: MX6032: 2-8.
- Van Laack, R., Faustman, C., Sebranek, J. 1993. Pork Quality and the Expression of Stress Protein Hsp 70 in Swine. *J. Anim. Sci.* 71: 2958-2964.
- Ventanas, S., Estevez, M., Tejeda, J.F., Ruiz, J. 2006. Protein and lipid oxidation in *Longissimus dorsi* and dry cured loin from Iberian pigs as affected by crossbreeding and diet. *Meat Science.* 72: 647-655.
- Veum, T. L., Carlson, M. S., Wu, C. W., Bollinger, D. W., Ellersieck, M. R. 2004. Copper proteinate in weanling pig diets for enhancing growth performance and reducing fecal copper excretion compared with copper sulfate. *J. Anim. Sci.* 82: 1062–1070.
- Warner, R. 2016. Meat: Conversion of Muscle into Meat. *Encyclopedia of Food and Health.* Elsevier. 677-684.
- Xiong, Y. L., Decker, E. A. 1995. Alterations of muscle proteins functionality by oxidative and antioxidative processes. *Journal of Muscle Foods.* 6: 139–160.
- Yu, J., Tang, S., Bao, E., Zhang, M., Hao, Q., Yue, Z. 2009. The effect of transportation on the expression of heat shock proteins and meat quality of *M. longissimus dorsi* in pigs. *Meat Science.* 83: 474–478.

XI. ANEXO 1

Cuadro 1. Condiciones de proceso para dietas.

	Dietas				
Etapa	1	2	3	4	5
Voltaje (watts)	1,200	1,200	1,200	1,200	1,200
% Energía	50	50	50	50	0
Tiempo (min)	5	5	5	5	5
Presión (psi)	40	80	120	160	0
Temperatura (°C)	210	210	210	210	210
Mantenimiento (min)	6	6	6	10	0

Cuadro 2. Condiciones de proceso para heces.

	Heces				
Etapa	1	2	3	4	5
Voltaje (watts)	1,200	1,200	1,200	1,200	1,200
% Energía	100	100	100	100	0
Tiempo (min)	10	6	6	6	6
Presión (psi)	40	60	80	105	0
Temperatura (°C)	200	200	200	200	200
Mantenimiento (min)	5	5	5	10	0

Cuadro 3. Condiciones de proceso para carne.

Carne					
Etapa	1	2	3	4	5
Voltaje (watts)	1,200	1,200	1,200	1,200	1,200
% Energía	100	100	100	100	100
Tiempo (min)	5	5	5	5	5
Presión (psi)	20	40	85	135	0
Temperatura (°C)	200	200	200	200	200
Mantenimiento (min)	5	5	5	10	0

Cuadro 4. Condiciones de proceso para hígado.

Hígado					
Etapa	1	2	3	4	5
Voltaje (watts)	1,200	1,200	1,200	1,200	1,200
% Energía	100	100	100	100	100
Tiempo (min)	5	5	5	5	5
Presión (psi)	20	40	85	135	0
Temperatura (°C)	200	200	200	200	200
Mantenimiento (min)	5	5	5	10	0

Cuadro 5. Condiciones de proceso para plasma.

Plasma			
Etapa	1	2	3
Voltaje (watts)	1,200	1,200	1,200
% Energía	45	45	0
Tiempo (min)	5	5	5
Presión (psi)	40	80	0
Temperatura (°C)	210	210	210
Mantenimiento (min)	10	10	0

XII. ANEXO 2



Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, agrícolas y Pecuarias

No. Juez:

Fecha:



Nombre:

1. Frente a usted tiene 12 muestras ordénelas de menor a mayor intensidad en color. No se permiten empates.

menor

mayor

2. Frente a usted tiene 12 muestras ordénelas de menor a mayor intensidad en dureza. No se permiten empates.

menor

mayor

3. Frente a usted tiene 12 muestras ordénelas de menor a mayor intensidad en jugosidad. No se permiten empates.

menor

mayor

4. Frente a usted tiene 12 muestras ordénelas de menor a mayor intensidad en sabor metálico. No se permiten empates.

menor

mayor

XIII. ANEXO 3

Cuadro 1. Intensidad*Área (Western Blot) de proteínas sarcoplásmicas por Tratamiento, al tiempo 0 min (medias).

Variable	Tratamiento ^a							
	OR1	DE ^b	OR2	DE ^b	OR3	DE ^b	OR4	DE ^b
HSP20	394.1	182.95	438.3	641.82	1,466.3	2,009.43	82.9	72.47
αβ-Cristalina	4,493.1	5596.3	1,257.0	1,013.90	6,098.8	4,390.60	1,207.1	1,165.72
HSP27	125.9	218.01	21.2	33.77	159.5	140.75	29.7	20.89
HSP40	952.2	1,173.77	385.4	551.13	366.3	240.29	124.9	137.66
HSP70	4,700.8	2,556.13	498.9	391.41	2,999.5	4,789.49	177.6	35.08
Caspasa 3	2,080.5	3,501.90	579.7	610.65	147.1	140.14	94.1	47.82
Caspasa 7	17,602.2	6,044.36	4,091.8	1,728.60	5,065.5	4,330.15	1,086.97	692.63
Caspasa 9	522.7	878.95	573.6	638.90	2,837.1	3,566.20	120.0	136.56
Variable	IN5	DE ^b	OR6	DE ^b	OR7	DE ^b	IN8	DE ^b
HSP20	89.9	81.40	740.4	976.30	2,348.8	3,917.67	84.9	12.86
αβ-Cristalina	531.3	365.79	432.2	304.60	82.4	139.36	5,751.4	1,544.72
HSP27	49.9	64.51	200.6	113.94	151.5	190.81	698.8	1,210.30
HSP40	338.3	78.75	381.9	423.88	132.0	40.95	5,098.8	3,744.95
HSP70	2,401.7	3,420.43	6,205.4	5,235.77	1,202.9	1,686.50	15,858.2	6,002.19
Caspasa 3	271.4	143.29	8,952.4	15,253.99	53.4	67.78	40.4	39.09
Caspasa 7	3,050.8	2,366.63	6,995.7	8,224.37	596.0	538.54	39,978.8	38,695.92
Caspasa 9	101.1	50.45	55.7	75.15	128.3	117.03	423.4	405.26

^a Tratamiento, por fuente, orgánica (OR; Bioplex-®, Alltech de México, S. A. de C. V.) e inorgánica (IN; Sulfatos), n= 3 por Tratamiento. ^b DE= Desviación estándar.

Cuadro 2. Intensidad*Área (Western Blot) de proteínas sarcoplásmicas por Tratamiento, al tiempo 45 min (medias).

Variable	Tratamiento ^a							
	OR1	DE ^b	OR2	DE ^b	OR3	DE ^b	OR4	DE ^b
HSP20	555.2	807.20	3,345.7	5,402.83	364.3	130.10	146.9	132.75
αβ-Cristalina	1,820.4	202.89	14,852.6	23,615.95	1,670.0	2,646.92	2,346.0	1,903.03
HSP27	1,176.6	1,914.98	2,238.1	1,410.86	4,120.7	4,160.72	5,526.8	4,989.66
HSP40	93.1	90.29	1,340.5	2,094.06	176.3	225.44	148.9	116.15
HSP70	2,556.6	3,214.22	4,081.9	4,120.45	2,054.6	2,308.81	5,246.6	8,611.69
Caspasa 3	9,653.6	2,760.88	286.7	496.58	150.6	69.24	3,716.3	6,259.50
Caspasa 7	33,444.3	39,143.69	34,427.6	29,227.59	52,264.6	37,273.96	37,401.6	33,522.82
Caspasa 9	68.7	64.99	57.7	34.31	73.3	123.08	290.5	186.70
Variable	IN5	DE ^b	OR6	DE ^b	OR7	DE ^b	IN8	DE ^b
HSP20	81.9	73.67	228.3	245.64	131.3	125.66	577.8	950.55
αβ-Cristalina	6,422.6	2,939.09	1,229.8	872.05	3,589.7	4,137.12	2,648.9	3,943.88
HSP27	1,916.2	692.98	2,247.6	1,654.09	1,848.8	1,116.63	307.7	419.08
HSP40	16,877.8	14,608.46	1,224.1	1,979.99	136.5	176.84	25.9	44.80
HSP70	20,338.3	17,320.18	9,451.7	9,173.54	7,057.4	909.24	2,581.8	2,150.66
Caspasa 3	6,071.6	10,339.11	224.4	269.35	813.0	1,303.65	21.4	37.12
Caspasa 7	36,094.5	24,524.73	31,284.4	35,846.94	24,406.8	4,099.77	2,498.3	3,227.67
Caspasa 9	739.7	555.29	1,152.7	1,486.19	19.1	16.64	2,329.4	3,815.60

^a Tratamiento, por fuente, orgánica (OR; Bioplex-®, Alltech de México, S. A. de C. V.) e inorgánica (IN; Sulfatos), n= 3 por Tratamiento. ^b DE= Desviación estándar.

Cuadro 3. Intensidad*Área (Western Blot) de proteínas sarcoplásmicas por Tratamiento, al tiempo 24 h (medias).

Variable	Tratamiento ^a							
	OR1	DE ^b	OR2	DE ^b	OR3	DE ^b	OR4	DE ^b
HSP20	187.6	262.77	257.3	375.38	76.0	66.25	59.5	96.04
αβ-Cristalina	657.5	804.49	708.2	581.32	444.7	543.60	787.5	679.47
HSP27	190.6	234.75	35.7	61.83	729.8	569.98	314.9	545.37
HSP40	73.8	55.86	1,978.7	2,746.16	159.9	138.93	57.8	46.29
HSP70	1,890.3	2,348.68	40.7	40.43	6,908.6	6,135.76	314.9	545.37
Caspasa 3	103.5	60.61	126.5	150.88	1,956.8	3,369.55	7,231.6	12,355.37
Caspasa 7	3,369.5	3,018.24	77.4	134.06	96,863.4	73,161.60	8,782.3	8,278.96
Caspasa 9	965.1	1,487.18	148.0	120.13	1097.6	1737.71	28.3	41.93
Variable	IN5	DE ^b	OR6	DE ^b	OR7	DE ^b	IN8	DE ^b
HSP20	195.0	260.07	42.9	37.83	787.4	1,050.28	83.9	20.85
αβ-Cristalina	230.6	199.10	3,187.0	2,507.66	211.3	148.86	1,064.7	1,712.45
HSP27	267.0	233.00	9.9	17.09	887.2	198.74	453.3	785.08
HSP40	1,219.9	1,442.88	95.4	47.98	459.6	470.79	784.6	1,111.81
HSP70	2,436.7	3,253.91	293.3	230.46	86.4	92.93	4,529.2	5,164.07
Caspasa 3	3,263.8	3,939.54	77.1	42.53	119.5	110.44	139.5	63.74
Caspasa 7	16,193.1	10,583.02	3,507.0	5,526.53	19,816.2	14,193.56	10,124.8	3,834.10
Caspasa 9	11,386.7	9,443.35	202.2	53.62	141.9	165.74	319.0	298.83

^a Tratamiento, por fuente, orgánica (OR; Bioplex-®, Alltech de México, S. A. de C. V.) e inorgánica (IN; Sulfatos), n= 3 por Tratamiento. ^b DE= Desviación estándar.

XIV. ANEXO 4

Cuadro 1. Ecuaciones de predicción a partir del aporte total de la dieta.

Variable	Intercepto	DE ^a	Aporte [ppm]	DE ^a	Aporte [ppm] ²	DE ^a	R ²
Lomo [ppm Cu] ^b	0.37	0.014	0.007	0.0009	--	--	0.60
Lomo [ppm Fe] ^b	4.45	0.221	0.003	0.0010	--	--	0.16
Lomo [ppm Mn] ^b	0.22	0.015	0.002	0.0003	--	--	0.32
Lomo [ppm Zn] ^b	9.30	0.112	0.018	0.0011	--	--	0.87
Hígado [ppm Cu] ^b	4.12	0.412	0.191	0.0259	--	--	0.65
Hígado [ppm Fe] ^b	12.05	34.19	1.825	0.3368	-0.002	0.0008	0.97
Hígado [ppm Mn] ^b	2.70	0.291	0.016	0.0066	--	--	0.17
Hígado [ppm Zn] ^b	53.03	3.294	0.457	0.0691	-0.002	0.0003	0.83
Plasma [ppm Fe]	0.92	0.991	0.037	0.0047	--	--	0.52
Plasma [ppm Mn]	0.41	0.104	0.011	0.0024	--	--	0.27
Plasma [ppm Zn]	0.57	0.351	0.037	0.0033	--	--	0.67
Heces [ppm Cu] ^c	3.68	2.112	5.129	0.1336	--	--	0.91
Heces [ppm Fe] ^c	284.42	54.573	3.016	0.2557	--	--	0.49
Heces [ppm Mn] ^c	67.93	4.292	3.688	0.0976	--	--	0.91
Heces [ppm Zn] ^c	9.09	7.174	5.187	0.0672	--	--	0.96

^a DE= Desviación estándar.

^b Materia húmeda.

^c Materia seca.