
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

**OXIDACIÓN LIPÍDICA Y PROTEICA, CAPACIDAD
ANTIOXIDATIVA Y ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS
CATALASA, SUPERÓXIDO DISMUTASA Y GLUTATIÓN
PEROXIDASA EN LA CARNE FRESCA Y MADURADA
DE NOVILLOS HEREFORD Y BRAFORD**

por

Lic. María Alejandra TEREVINTO HERRERA

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magister en Ciencias Agrarias
opción Ciencia Animal.

MONTEVIDEO
URUGUAY
2010

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis aprobada por el tribunal integrado por: la Dra. Laura Astigarraga, el Dr. José Luis Repetto y el Dr. Gustavo Brito, el 4 de octubre del 2010. Autor: María Alejandra Terevinto Herrera. Director: Dr. Ali Saadoun.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todas las personas que me han ayudado en la elaboración de esta Tesis de Maestría:

A mi orientador de tesis el Dr. Ali Saadoun.

A la Dra. Cristina Cabrera.

Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) por la beca otorgada.

A mis compañeras del Laboratorio de Fisiología & Nutrición de la Facultad de Ciencias: Ana Ramos y Gabriela Castromán.

A los docentes de la Facultad de Agronomía por la calidad de los cursos dictados.

A mi familia y a mi esposo por apoyarme siempre en mis estudios.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
SUMMARY.....	X
1. <u>INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES</u>	1
1.1. LA OXIDACIÓN LIPÍDICA.....	4
1.2. LA OXIDACIÓN LIPÍDICA EN LA CARNE.....	6
1.3. LA OXIDACIÓN PROTEICA.....	8
1.3.1. <u>Oxidación de AA de cadenas laterales</u>	8
1.3.2. <u>Formación de uniones cruzadas proteína-proteína</u>	8
1.3.3. <u>Oxidación del esqueleto de la proteína</u>	9
1.3.4. <u>Fragmentación de proteínas</u>	11
1.4. LA OXIDACIÓN PROTEICA EN LA CARNE.....	11
1.5. AGENTES ANTIOXIDANTES EN EL MÚSCULO.....	12
1.5.1. <u>Enzimas antioxidantes</u>	12
1.5.1.1. Superóxido dismutasa.....	13
1.5.1.2. Catalasa.....	13
1.5.1.3. Glutación peroxidasa.....	14
1.6. PROCESO DE MADURACIÓN DE LA CARNE.....	16
1.7. OBJETIVO E HIPÓTESIS.....	17

2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	19
2.1. MÚSCULOS Y ANIMALES.....	20
2.2. DETERMINACIÓN DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA	21
2.3. DETERMINACIÓN DE LA OXIDACIÓN PROTEICA.....	21
2.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA.....	22
2.5. EXTRACCIÓN DE LOS LÍPIDOS.....	22
2.6. METILACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS Y CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	23
2.7. PROCEDIMIENTO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CATALASA.....	24
2.8. PROCEDIMIENTO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA.....	24
2.9. PROCEDIMIENTO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN PEROXIDASA.....	25
2.10. PROCEDIMIENTO PARA MEDIR LA CAPACIDAD ANTIOXIDATIVA.....	26
2.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	27
3. <u>RESULTADOS</u>	28
3.1. OXIDACIÓN LIPÍDICA.....	29
3.2. OXIDACIÓN PROTEICA.....	31
3.3. CONTENIDO TOTAL DE LÍPIDOS Y COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.....	33
3.4. ACTIVIDAD DE LA CATALASA.....	37
3.5. ACTIVIDAD DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA.....	39
3.6. ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA.....	41
3.7. CAPACIDAD ANTIOXIDATIVA.....	43

4. <u>DISCUSIÓN</u>	45
5. <u>CONCLUSIONES</u>	50
6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	52
7. ANEXO: ARTÍCULO CIENTÍFICO PARA FOOD CHEMISTRY.....	60

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Cuadro 1: Contenido total de lípidos y composición de ácidos grasos.....	35
Cuadro 2: Composición de ácidos grasos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados, n-6 y n-3 y relación PUFA/SAT.....	36
Figura 1: Ejemplar de la raza Hereford y de la raza Braford.....	2
Figura 2: Representación esquemática de la oxidación mediada por radicales libres.....	10
Figura 3: Fotografía y ubicación anatómica de los músculos utilizados.....	20
Figura 4: Gráficos de los resultados de TBARS	30
Figura 5: Gráficos de los resultados del contenido en carbonilos proteicos.....	32
Figura 6: Gráficos de los resultados de la actividad de la catalasa.....	38
Figura 7: Gráficos de los resultados de la actividad de la SOD	40
Figura 8: Gráficos de los resultados de la GPx	42
Figura 9: Gráficos de los resultados de la oxidación inducida.....	44

ABREVIATURAS

AA – aminoácidos	mM - milimolar
ADP – adenosín difosfato	Mn – manganeso
ANOVA – análisis normal de varianza	MUFA – ácidos grasos monoinsaturados
ATP – adenosín trifosfato	nmoles – nanomoles
BSA – seroalbúmina bovina	NS – no significativo
Ca – calcio	OH [°] – radical hidroxilo
CLA – ácido linoleico conjugado	O ₂ – oxígeno
Cu – cobre	O ₂ [°] - radical anión superóxido
DHA – ácido docosahexaenoico	°C – grados Celsius
DNPH – dinitrofenilhidrazina	PL - fosfolípidos
DPA – ácido docosapentaenoico	PM – <i>Psoas major</i>
EDTA – ácido etilendiaminotetracético	pmoles – picomoles
EEM – error estándar de la media	PUFA – ácidos grasos poliinsaturados
EPA – ácido eicosapentaenoico	R [°] - radical con carbono central
FAMES – ésteres metílicos de ácidos grasos	RH – ácido graso
Fe – hierro	RO [°] - radical alcoxilo
g – gramo	ROO [°] - radical peroxilo
GLM – modelo general lineal	ROOH – hidroperóxidos
GM – <i>Gluteus medius</i>	ROS – especies reactivas al oxígeno
GPx – glutatión peroxidasa	rpm – revoluciones por minuto
GSH – glutatión reducido	SAT – ácidos grasos saturados
GSSG – glutatión oxidado	Se – selenio
HCl – ácido clorhídrico	SM - <i>Semimembranosus</i>
H ₂ O – agua	SOD – superóxido dismutasa
H ₂ O ₂ – peróxido de hidrógeno	ST - <i>Semitendinosus</i>
IN - <i>Infraspinatus</i>	TBARS – especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
kg – kilogramo	TCA – ácido tricloroacético
LD – <i>Longissimus dorsi</i>	ton - toneladas
LL – <i>Longissimus lumborum</i>	U – unidades de inhibición
MDA – malondialdehído	Zn – zinc
Mg – magnesio	µg – microgramo
mg – miligramos	µl – microlitro
min – minutos	µmoles – micromoles
ml – mililitros	

RESUMEN

En este estudio se evaluaron tres músculos (el *Psoas major*, el *Gluteus medius* y el *Longissimus dorsi*) frescos y madurados, de novillos Hereford y Braford alimentados con pasturas, desde el punto de vista de sus estatus oxidativo y antioxidativo. Los objetivos fueron determinar si estos tres músculos de estas dos razas serían diferentes entre sí, y si la maduración (14 días a 4 °C) ejercería algún efecto sobre esos estatus oxidativos y antioxidativos. El resultado fue un menor nivel de oxidación lipídica en el músculo *Longissimus dorsi* y un mayor nivel de oxidación proteica en el *Gluteus medius*, comparado con los otros dos músculos estudiados. Además, se encontraron diferencias significativas entre músculos con respecto a las actividades de las enzimas antioxidantes. El *Longissimus dorsi* presentó una mayor actividad de la enzima catalasa y una menor actividad de la glutatión peroxidasa que el *Gluteus medius*. También presentó una menor actividad de la enzima superóxido dismutasa que el *Psoas major*. La maduración no afectó significativamente los niveles de oxidación lipídica en los músculos de ambas razas, pero en algunos de los músculos provocó un aumento en la oxidación proteica y en la actividad de la catalasa, y una disminución en la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. Las razas estudiadas no presentaron diferencias en cuanto a sus niveles de oxidación lipídica y proteica, ni en sus actividades de enzimas antioxidantes. Sin embargo, los músculos de la raza Braford fueron menos susceptibles a la oxidación lipídica inducida con hierro que los de la raza Hereford, a pesar de contener una mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados que son más susceptibles a la oxidación lipídica. Por lo tanto, se concluye que la carne derivada del músculo *Longissimus dorsi* presentaría ventajas de conservación y procesado, que el proceso de maduración no estaría afectando de forma negativa la calidad de la carne derivada de estos músculos, y que la carne de la raza Braford resultaría menos susceptible a los procesos oxidativos que la de la raza Hereford.

Palabras clave: carne vacuna, oxidación, catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, maduración.

SUMMARY

In this study, three fresh and aged muscles (the *Psoas major*, the *Gluteus medius* and the *Longissimus dorsi*) from Hereford and Braford steers fed pasture, were evaluated from their oxidative and antioxidative status point of view. The aim of this work was to determine if these three muscles from these two breeds would be different, and if the ageing process (14 days at 4 °C) would have an effect on those oxidative and antioxidative status. The *Longissimus dorsi* muscle showed a lower level of lipid oxidation and the *Gluteus medius* showed a higher level of protein oxidation than the other two muscles studied. Significant differences were also found between muscles in relation to the antioxidant enzymes activities. The *Longissimus dorsi* showed a higher catalase activity and a lower glutathione peroxidase activity than the *Gluteus medius*. Also, this muscle showed a lower superoxide dismutase activity than the *Psoas major*. The ageing process did not affect significantly the lipid oxidation of the muscles, but in some muscles caused an increase in the protein oxidation and in the catalase activity, and a decrease in the superoxide dismutase and the glutathione peroxidase activities. The two breeds studied were not different in their lipid and protein oxidation level, nor in their antioxidant enzymes activities. Although, Braford breed was less susceptible to iron-induced lipid oxidation than Hereford breed, despite its major polyunsaturated fatty acids content which are more susceptible to lipid oxidation. In conclusion, meat from the *Longissimus dorsi* muscle could have some conservation and processing advantages compared to the other two muscles studied, the ageing process might not be affecting the meat quality from these muscles, and Braford meat could have the advantage to be less susceptible to oxidation processes than Hereford meat.

Keywords: meat, oxidation, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, ageing.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Uruguay se ubica entre los principales exportadores del mundo de carne vacuna y tiene uno de los índices más altos de consumo doméstico (INAC, 2008). Aproximadamente el 70% de la superficie del territorio se dedica a la ganadería, posee un stock bovino de casi 12 millones de cabezas donde se faenan aproximadamente 2 millones de vacunos y se exportan casi 250.000 ton de carne vacuna por año, lo que representa aproximadamente un millón de dólares (MGAP, 2009).

La producción de carne vacuna en el Uruguay se realiza principalmente en condiciones de pastoreo a cielo abierto durante todo el año, sobre campo natural, donde la principal raza producida con estos fines es la Hereford (INAC, 2008). Pero durante los últimos años ha ganado popularidad la raza Braford, que es una raza sintética formada por el cruzamiento de animales de razas cebuinas (Nelore, Brahman o Tabapua) con la raza Hereford, interviniendo estas razas, en las siguientes proporciones: 3/8 Cebú y 5/8 Hereford (Orellana *et al.* 2009, Cabrera *et al.* 2010).



Figura 1. Ejemplar de la raza Hereford (izquierda) y de la raza Braford (derecha).

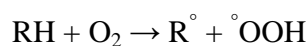
Uruguay exporta cortes cárnicos de alta calidad como el lomo, el bife angosto, el cuadril, la bola de lomo, la nalga y el bife ancho (INAC, 2009). Previo a su exportación, como exigencia de algunos países importadores, deben sufrir un proceso de maduración, donde se envasan al vacío por un período máximo de 15 días a una temperatura aproximada de 4 °C. Este proceso permite mejorar la terneza de la carne (Lamare *et al.* 2002, Braghieri *et al.* 2005). La terneza, junto con el color, la jugosidad, el sabor y el aroma conforman las propiedades organolépticas o sensoriales de la carne y determinan su calidad (Gray *et al.*, 1996). Ésta puede verse afectada por factores referidos a aspectos propios del animal como son la genética, el sexo y la edad, y por factores de manejo como son la alimentación (Raes *et al.*, 2003), las condiciones de transporte y de faena de los animales (Grandin, 1998). También puede verse afectada por la contaminación microbiológica (Gray *et al.*, 1996), la refrigeración y la maduración de la carne (Franco *et al.*, 2009) y por procesos oxidativos. El daño oxidativo es el mayor factor no microbiano responsable del deterioro en la calidad de los alimentos cárnicos (Descalzo *et al.*, 2005). En carnes rojas, los cambios bioquímicos *postmortem*, el procesado y el almacenamiento comprometen las defensas antioxidativas naturales del músculo, y es cuando se ven favorecidos los procesos oxidativos (Luciano *et al.*, 2009). Estos procesos oxidativos inducen modificaciones en los lípidos y proteínas del músculo, afectando las propiedades organolépticas y nutricionales de la carne y sus subproductos (Insani *et al.*, 2008).

Debido a que la oxidación puede causar efectos negativos importantes en la calidad de la carne y a que no hay muchos estudios al respecto realizados en carne vacuna uruguaya, es que nos propusimos estudiar los niveles de oxidación lipídica y proteica, las actividades de las enzimas antioxidantes y la capacidad antioxidativa de ésta. Para comprender mejor estos procesos, a continuación se detallan los mecanismos bioquímicos involucrados durante la oxidación lipídica y proteica, así como sus efectos en la carne, los sistemas de defensa con que cuenta el músculo para hacer frente a la oxidación, y el proceso de maduración que se realiza a nivel industrial.

1.1. LA OXIDACIÓN LIPÍDICA

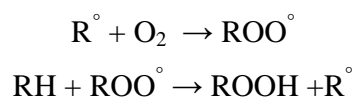
Los potenciadores más importantes de la oxidación son las especies reactivas al oxígeno (ROS), que son productos metabólicos secundarios normales generados continuamente en la mitocondria de la mayoría de las células. Incluyen radicales libres como el radical hidroxilo (OH°), el radical anión superóxido (O_2°), los radicales peroxilo (ROO°) y el alcoxilo (RO°), y los peróxidos como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los hidroperóxidos (ROOH) (Morrisey *et al.*, 1998). Cada una de estas ROS es altamente reactiva e inestable debido al hecho de que contienen un electrón no apareado en su cubierta externa de electrones. Esta conformación le proporciona la habilidad de rápidamente interactuar con macromoléculas celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Cecarini *et al.*, 2007). Los procesos oxidativos mediados por radicales libres, afectan predominantemente a los ácidos grasos insaturados de los lípidos, los grupos hemo de los pigmentos, los aminoácidos de las proteínas y los dobles enlaces conjugados de las vitaminas (Insani *et al.*, 2008).

La oxidación lipídica ocurre mediante un mecanismo autocatalítico de radicales libres llamado autooxidación, que consiste de tres fases: iniciación, propagación y terminación (Fernández *et al.*, 1997). Se inicia con la quita de un átomo de hidrógeno del grupo metileno localizado entre dos dobles enlaces de un ácido graso (RH) y se forma un radical con carbono central (R°) (Stahl, 2000) como se indica a continuación:

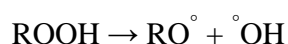


Esta fase de iniciación se ve favorecida si aumenta el número de dobles enlaces del ácido graso, por ello los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son más susceptibles a la oxidación, y puede ser catalizada por OH° o por ciertos complejos Fe- O_2 como los radicales ferrilos o perferrilos (Morrisey *et al.*, 1998). Estos últimos se originan por la reacción de proteínas hemo con el H_2O_2 (Montero, 2000).

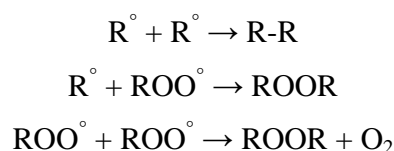
Durante la propagación, el radical reacciona luego de un rearrreglo con el oxígeno, para dar un radical peroxilo (ROO°). Éste es lo suficientemente reactivo como para propagar una reacción en cadena, quitando otro átomo de hidrógeno de un PUFA contiguo (Fernández *et al.*, 1997). Esta reacción en cadena es favorecida por la luz y el oxígeno (Insani *et al.*, 2008). De esta última reacción se forman los hidroperóxidos lipídicos (ROOH) y un nuevo radical lipídico con carbono central (R°) (Fernández *et al.*, 1997) como se muestra a continuación:



Los hidroperóxidos son considerados los productos principales obtenidos a partir de la oxidación lipídica, son lábiles, de naturaleza transitoria y sufren cambios y deterioro por los radicales libres. Su ruptura genera productos secundarios. Además de ser productos de oxidación, son también sustrato para posterior reacción con Fe^{+2} y Cu^{+2} para dar ROO° y radicales RO° (Fernández *et al.*, 1997) como lo indica la siguiente reacción:



Durante la terminación, los radicales libres en ausencia de oxígeno, reaccionan entre sí para dar diferentes productos más estables (Fernández *et al.*, 1997) como se indica a continuación:



Dentro de estos productos secundarios se incluyen: alcanos, cetonas, hidrocarburos, alcoholes, ácidos y aldehídos como el MDA que es un iniciador

carcinogénico y mutagénico que puede afectar a las proteínas y al ADN. Todos estos productos tienen algún grado de toxicidad (Cifuni *et al.*, 2004) y pueden afectar negativamente el olor, sabor, valor nutricional y por ende la calidad de los alimentos (Botsoglou *et al.*, 1997).

1.2. LA OXIDACIÓN LIPÍDICA EN LA CARNE

El proceso autocatalítico de peroxidación probablemente comienza inmediatamente después de la faena (Buckley *et al.*, 1995). Los cambios bioquímicos que ocurren durante la conversión del músculo en carne, como el descenso del pH y la ruptura de la estructura de las miofibrillas por la acción de peptidasas endógenas, favorecen las condiciones de oxidación (Morrissey *et al.* 1998, Ouali *et al.* 2006). La tasa y el grado de oxidación en alimentos formados por músculos están influenciados por eventos prefaena como el estrés del animal, y postfaena como la caída rápida del pH postmortem, temperatura de la carcasa, acortamiento por frío y técnicas para aumentar la terneza como la estimulación eléctrica. Además, cualquier disrupción de la integridad de la membrana como deshuesado mecánico, picado o cocinado altera la compartimentalización celular, lo que facilita la interacción de agentes pro-oxidantes (hierro hemo, luz, oxígeno, alta temperatura) con ácidos grasos insaturados resultando en la generación de radicales libres y la propagación de la reacción oxidativa (Buckley *et al.* 1995, Cascone 2005).

La oxidación lipídica en alimentos formados por músculos se inicia en la porción altamente insaturada de los fosfolípidos de las membranas subcelulares, en mitocondrias y microsomas (Buckley *et al.*, 1995), y es una de las mayores causas del deterioro en la calidad de los productos cárnicos tanto cocidos como crudos, durante el almacenamiento refrigerado o congelado (de Azevedo Gomes *et al.*, 2003).

Durante el manejo, el procesamiento y el almacenamiento de la carne fresca, la liberación de hierro endógeno es parcialmente responsable de la catálisis de la oxidación lipídica (Descalzo *et al.*, 2005), ya que en el músculo hay pequeñas cantidades de hierro no proteico (no hemo) unido a moléculas como adenosina difosfato (ADP), pirofosfato o AA libres, y también hay hemoglobina y mioglobina como fuente de hierro (Buckley *et al.*, 1995). Ese hierro se une a los AA, nucleótidos y fosfatos formando quelatos que son responsables de la catálisis de la oxidación de lípidos en los tejidos (Morrisey *et al.*, 1998). La propagación de esa peroxidación lipídica en las membranas promueve la oxidación de la mioglobina (formación de metmioglobina) resultando en el deterioro del color (marrón oscuro), formación de olores rancios y otros sabores no deseados en la carne fresca (Dewhurst *et al.* 2003, Descalzo *et al.* 2005).

Los niveles de oxidación lipídica en la carne pueden verse influenciados por el tipo de alimentación del ganado (Lynch *et al.* 1999, Mercier *et al.* 2004, Realini *et al.* 2004a, Descalzo *et al.* 2005, Gatellier *et al.* 2005, Insani *et al.* 2008, Larraín *et al.* 2008) ya que la carne de animales alimentados con concentrado, por lo general muestra niveles más altos de oxidación lipídica que la de animales alimentados con pasturas. Esto puede explicarse porque la carne de pastura tiene un mayor contenido de vitaminas, flavonoides y/o carotenoides que la de concentrado, lo que puede proteger frente a la oxidación lipídica (Mercier *et al.*, 2004). Los niveles de oxidación lipídica también pueden variar según el genotipo del animal (Braghieri *et al.*, 2005), el tipo de músculo (Renerre *et al.*, 1996) y el tiempo de maduración (Cifuni *et al.* 2004, Braghieri *et al.* 2005, Descalzo *et al.* 2008).

1.3. LA OXIDACIÓN PROTEICA

La oxidación proteica es iniciada principalmente por reacciones con OH° , sin embargo el curso del proceso de oxidación está determinado por la disponibilidad de O_2 y $\text{O}_2^{\circ-}$ o su forma protonada (HO_2°). Conjuntamente, estos ROS pueden desencadenar la oxidación de residuos de AA de cadenas laterales, la formación de uniones cruzadas proteína-proteína y la oxidación del esqueleto de la proteína resultando en la fragmentación de proteínas (Berlett y Stadtman, 1997).

1.3.1. Oxidación de AA de cadenas laterales

Todos los residuos de AA de las proteínas son susceptibles a la oxidación por OH° . Los residuos de metionina y cisteína son particularmente susceptibles a la oxidación por casi todas las formas de ROS. Los residuos aromáticos son los preferidos para el ataque por ROS (Berlett y Stadtman, 1997).

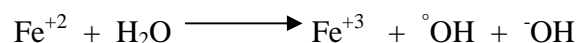
1.3.2. Formación de uniones cruzadas proteína-proteína

La presencia de grupos carbonilos en las proteínas ha sido utilizada como marcador de la oxidación proteica mediada por ROS. Los derivados carbonilos pueden ser generados por la oxidación de residuos de lisina, arginina, prolina y treonina. Además pueden ser introducidos en las proteínas mediante reacciones con aldehídos (MDA) producidos durante la peroxidación de lípidos o mediante derivados carbonilos reactivos (cetoaminas, cetoaldehídos) generados como consecuencia de la reacción de reducir azúcares o sus productos de oxidación con residuos de lisina de las proteínas (Berlett y Stadtman, 1997). Esto lleva a la formación de uniones cruzadas intra e intermoleculares que pueden favorecer la formación de agregados proteicos (Cecarini *et al.*, 2007).

1.3.3. Oxidación del esqueleto de la proteína

Como se muestra en la Figura 2, el ataque oxidativo del esqueleto polipeptídico es iniciado por la abstracción de un $\cdot\text{OH}$ del átomo α -hidrogeno de un residuo AA para formar un radical con carbono central (reacción *c*). El $\cdot\text{OH}$ necesario para esta reacción puede ser obtenido por la radiólisis del agua o mediante la ruptura catalizada por metal del H_2O_2 (reacciones *a* y *b*) (Berlett y Stadtman, 1997). La oxidación catalizada por metales es una de las más comunes e introduce los grupos carbonilos. Requiere la generación de H_2O_2 y la presencia de Fe^{+3} o Cu^{+2} (Cecarini *et al.*, 2007). El radical con carbono central así formado reacciona rápidamente con el O_2 para formar un radical alquilperoxilo intermediario (reacción *d*), el que puede aumentar el alquil peróxido (reacción *f*) seguido de la formación de un radical alcoxilo (reacción *h*), que puede ser convertido a un derivado proteico hidroxilo (reacción *j*). Muchos de estos pasos son mediados por interacciones con HO°_2 pero también pueden ser catalizados por Fe^{+2} (reacciones *e*, *g*, e *i*) o por Cu^+ (no mostradas en la figura). Otros cationes divalentes (Mg^{+2} , Mn^{+2} , y Zn^{+2}) pueden competir con el Fe^{+2} o Cu^+ por los sitios de unión a metales en proteínas y así prevenir la generación de OH° sitio específico, que es el mecanismo más importante del daño proteico. Además, el Mn^{+2} puede inhibir la reducción de Fe^{+3} a Fe^{+2} y así prevenir su habilidad para promover la formación de OH° por la reacción de Fenton así como la generación de otras formas de ROS (Berlett y Stadtman, 1997).

Reacción de Fenton:



(Matés *et al.*, 1999)

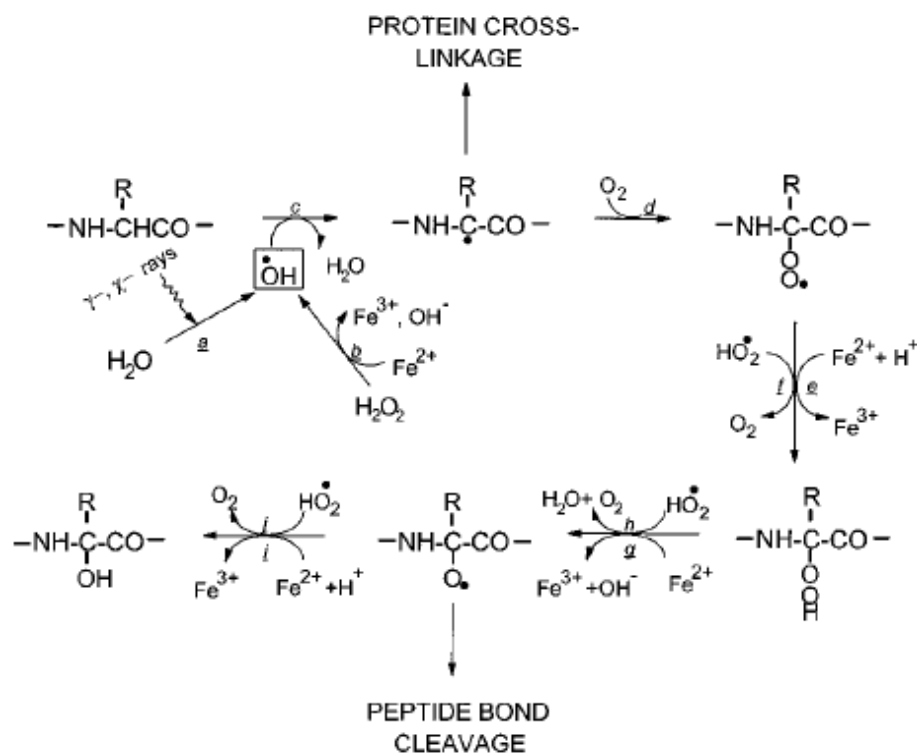
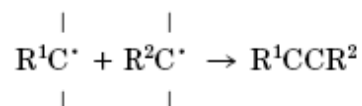


Figura 2: Representación esquemática de la oxidación de proteínas mediada por radicales libres (Extraído de Berlett y Stadtman, 1997).

En ausencia de oxígeno, cuando la reacción *d* en la Figura 2 es prevenida, el radical con carbono central puede reaccionar con otro radical con carbono central para formar un derivado de la unión cruzada proteína-proteína (Berlett y Stadtman, 1997) como se muestra a continuación:



1.3.4. Fragmentación de proteínas

La generación de radicales alcoxilos (Figura 2, *h* y *g*) fija la etapa de ruptura del enlace peptídico, que puede ocurrir por medio de dos vías (diamida y α -amidación) o como resultado del ataque de ROS a cadenas laterales con ácido glutámico, aspártico y prolina (Berlett y Stadtman, 1997).

La oxidación de proteínas sufre procesos similares a los de la oxidación lipídica, como las etapas de iniciación, propagación y terminación (Ventanas *et al.*, 2006), y puede causar cambios en la estructura de los AA, aumentos en la hidrofobicidad de las proteínas y pérdida en las actividades enzimáticas. Las proteínas oxidadas son comúnmente reconocidas y degradadas por proteasas intracelulares como el complejo proteasoma. Lamentablemente, hay evidencia de que los radicales libres pueden reaccionar con estos complejos proteolíticos induciendo un descenso en su funcionalidad. Si las proteínas oxidadas no son eficientemente removidas, pueden acumularse y alterar la función celular y promover la toxicidad (Cecarini *et al.*, 2007).

1.4. LA OXIDACIÓN PROTEICA EN LA CARNE

La oxidación proteica en alimentos cárnicos puede estar asociada a cualquiera de los factores pro-oxidativos involucrados en la formación de ROS (Ventanas *et al.*, 2006). Es responsable de muchas modificaciones biológicas como la fragmentación, la agregación y el descenso 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. Estas modificaciones pueden afectar negativamente la calidad sensorial de la carne fresca y de los productos cárnicos en términos de su textura, ternura y color (Ventanas *et al.*, 2006).

El nivel de oxidación proteica en la carne puede variar con el tipo de alimentación del ganado, ya que se han observado mayores niveles de carbonilos proteicos en un músculo de novillos (Insani *et al.*, 2008) y en las miofibrillas de corderos (Santé-Lhoutellier *et al.*, 2008) alimentados con concentrado que con pastura.

1.5. AGENTES ANTIOXIDANTES EN EL MÚSCULO

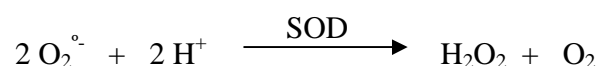
La función de las sustancias antioxidantes es interrumpir las reacciones de los radicales libres in vivo, mediante la donación de electrones (Seifried, 2003). Dentro de las defensas antioxidantes presentes en el músculo encontramos las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GPx); las proteínas de transporte y almacenamiento como la transferrina, lactoferrina y ceruloplasmina que secuestran metales de transición no permitiendo la catálisis de conversión del $O_2^{\circ-}$ y H_2O_2 a $^{\circ}OOH$; el retinol que limita la liberación de hierro altamente catalítico; la vitamina E, la vitamina C, el β -caroteno, la luteína, los carotenoides, los tioles y el ácido úrico que rompen la cadena de radicales libres (Morrisey *et al.*, 1998). Además se encuentran pequeños péptidos como el glutatión, la carnosina y la anserina que forman parte de estos sistemas de protección endógenos (Gatellier *et al.*, 2004). Las concentraciones de los antioxidantes endógenos dependen de la especie animal, del tipo de músculo y de la dieta (Insani *et al.*, 2008).

1.5.1. Enzimas antioxidantes

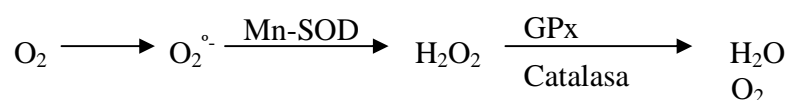
Las enzimas SOD, catalasa y GPx constituyen el principal mecanismo de defensa celular frente al daño oxidativo in vivo.

1.5.1.1. Superóxido dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa cataliza la dismutación del anión superóxido, que se forma como producto secundario de la cadena respiratoria en las mitocondrias, en oxígeno y peróxido de hidrógeno (Matés *et al.*, 1999) según la siguiente reacción:

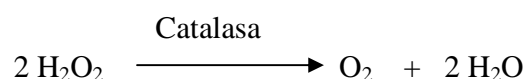


La familia de la SOD incluye tres enzimas diferentes: (1) la Cu-Zn-SOD expresada en todas las células de mamíferos localizada en el citosol y el núcleo, (2) la Mn-SOD generada en las mitocondrias, y (3) la SOD extracelular. El producto final de cualquiera de las tres enzimas es el H₂O₂, que es extremadamente peligroso para las células y es removido inmediatamente por la catalasa y la GPx (Cecarini *et al.*, 2007), según las siguientes reacciones:

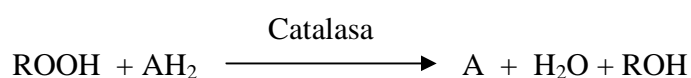


1.5.1.2. Catalasa

La catalasa es una enzima tetramérica que contiene un grupo ferriprotoporfirina en cada subunidad (Matés *et al.*, 1999) y está presente en los peroxisomas (Cecarini *et al.*, 2007). Cataliza la reacción de dos moléculas de peróxido de hidrógeno a oxígeno y dos moléculas de agua (actividad catalítica) como se muestra a continuación:

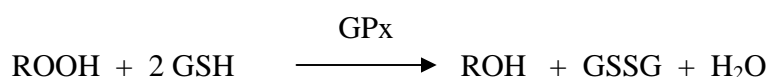


También posee actividad peroxidativa, donde alcoholes como el metanol, etanol, ácido fórmico y fenoles pueden servir como dadores de electrones (Matés *et al.*, 1999):



1.5.1.3. Glutación peroxidasa (GPx)

Las glutación peroxidasas son importantes selenoproteínas específicas (Daun y Åkesson, 2004a) que catalizan la reducción de los hidroperóxidos utilizando glutatión reducido (GSH) (Matés *et al.*, 1999):



La familia de las GPx consiste de 4 selenoproteínas (citosólica, plasmática, gastrointestinal, hidroperóxido fosfolipídica) caracterizadas por diferencias en localización y estructura molecular. Funcionan en el citosol y en la mitocondria. (Cecarini *et al.*, 2007). A pesar de que la GPx comparte el sustrato (H_2O_2) con la catalasa, ella sola puede reaccionar efectivamente con los hidroperóxidos lipídicos y otros hidroperóxidos orgánicos, siendo la principal vía de protección contra bajos niveles de estrés oxidativo (Matés *et al.*, 1999).

Estas enzimas antioxidantes son relativamente estables en la carne durante el almacenamiento refrigerado, por lo tanto pueden ofrecer protección contra los radicales libres durante un breve tiempo post-mortem (Gatellier *et al.*, 2004).

La actividad de estas enzimas puede diferir entre especies y tipos musculares. También puede variar entre animales de una misma especie. Por lo tanto, las variaciones en las actividades de estas enzimas entre distintos tipos genéticos pueden causar diferencias en la estabilidad oxidativa de la carne (Hernández *et al.*, 2004).

Algunos investigadores (Renerre *et al.* 1996 en vacunos, Alessio y Goldfarb 1988, Laughlin *et al.* 1990, Tiidus y Houston 1994 en ratas) han propuesto que los músculos oxidativos y oxidativos-glicolíticos, o sea los que sufren más estrés oxidativo, presentan una mayor actividad de las enzimas antioxidantes para contrarrestar este proceso.

La actividad de estas enzimas puede estar influenciada mediante la dieta por la ingestión de minerales como Cu, Zn, Mn, Fe o Se, ya que los utilizan como cofactores (Mercier *et al.*, 2004). El suplemento de selenio en la alimentación es un factor preponderante en el control de la actividad de GPx (Daun y Åkesson, 2004b, Gatellier *et al.* 2004). Esto se explica porque la principal forma de la GPx es una proteína dependiente del selenio, por lo que se ha propuesto que el selenio de la dieta es la mayor fuente de variación en la actividad de GPx (Descalzo y Sancho, 2008). Algunos estudios han señalado una relación significativa entre la actividad de GPx y el contenido de selenio soluble en los músculos *Psoas major* y *Longissimus dorsi* de bovinos (Daun *et al.*, 2001) y el contenido total de Se en distintos músculos de varias especies (Daun y Åkesson, 2004a).

Se ha demostrado en varios trabajos (Gatellier *et al.* 2004, Mercier *et al.* 2004, Descalzo *et al.* 2007, Insani *et al.* 2008, Larraín *et al.* 2008) que la actividad de las enzimas antioxidantes varía con el tipo de alimentación (pastura o concentrado) en los animales vacunos. Por ejemplo, Gatellier *et al.* (2004), encontraron menores niveles de actividad de la GPx y mayores de la SOD en el músculo *Longissimus dorsi* de vacunos alimentados con pastura que con concentrado, lo que concuerda con los resultados de Mercier *et al.* (2004). En cuanto a la catalasa, Gatellier *et al.* (2004) encontraron un menor nivel en vaquillonas alimentadas a pastura que con concentrado, pero no hallaron diferencias significativas en novillos ni en vacas, al igual que Mercier *et al.* (2004) en vacas. Otro grupo de investigadores (Descalzo *et al.*, 2007) encontró mayores niveles de actividad de la SOD en el músculo *Psoas major* de novillos crucea alimentados con pastura que con concentrado, y no obtuvieron diferencias significativas para la actividad de la catalasa y de la GPx en cuanto al tipo de dieta.

En el trabajo de Gatellier *et al.* (2004) también se estudió el efecto del sexo (novillos, vaquillonas y vacas) y de la edad (vacas con aproximadamente 8 años de edad), observando una menor actividad de la SOD y de la catalasa en novillos que en vacas y vaquillonas, no observaron un efecto del sexo en la actividad de la GPx. No pudieron observar un efecto de la edad en la actividad de ninguna de las tres enzimas antioxidantes.

En el trabajo de Insani *et al.* (2008) se observó una menor actividad de GPx en el músculo *Psoas major* de novillos cruce alimentados con pasturas que con concentrado, y las actividades de las enzimas SOD y catalasa permanecían estables y la de la GPx disminuía durante 9 días de almacenamiento refrigerado a 4 °C con iluminación.

1.6. PROCESO DE MADURACIÓN DE LA CARNE

Este proceso consiste en la conservación de la carne por encima del punto de congelamiento, asociada a un aumento de la terneza (Daun *et al.*, 2001). Esto ocurre mediante la acción sinérgica de varios sistemas enzimáticos endógenos con acción proteolítica, como el de las catepsinas, calpaínas y proteasomas (Ouali *et al.*, 2006) y a cambios estructurales en el músculo debido a mecanismos fisicoquímicos complejos que involucran pH y fuerza iónica (Lamare *et al.*, 2002). Durante la maduración, la carne muestra una alteración significativa en el nivel de numerosos componentes químicos (glúcidos, ácidos orgánicos, péptidos y AA libres) y metabolitos como el ATP (Monsón *et al.*, 2005). Como consecuencia de ello, las enzimas antioxidantes, que también son proteínas, pueden perder actividad o ser redistribuidas entre compartimentos celulares (Daun *et al.*, 2001). Además, el tiempo de maduración es un componente fundamental en el desarrollo de los precursores del flavor, a partir de los compuestos de base (lípidos y proteínas) (Bianchi *et al.*, 2006). Un mayor tiempo de maduración puede causar un aumento en los niveles de oxidación lipídica en la carne, tal como fue observado por Renerre *et al.* (1996) y por Cifuni *et al.* (2004) en varios

músculos de toros luego de 8 y 15 días a 2-4 °C, respectivamente, por Braghieri *et al.* (2005) en el músculo *Longissimus dorsi* de toros entre 2 y 7 días a 4 °C y por Yancey *et al.* (2006) en tres músculos de vacuno entre 7 y 35 días a 2-4 °C. También fue observado este aumento en el músculo *Longissimus dorsi* de búfalos alimentados a pastura luego de 15 días de maduración a 2 °C por Descalzo *et al.* (2008). Respecto a la actividad de las enzimas antioxidantes durante la maduración, Renerre *et al.* (1996) encontraron una disminución en la actividad de la SOD y estabilidad en la actividad de la catalasa y de la GPx en cuatro músculos, luego de 8 días de maduración a 2 °C. Además, Daun *et al.* (2001) observaron que la actividad de la GPx permanecía estable en los músculos *Longissimus dorsi* y *Psoas major* de vacunos durante 14 días a 4 °C, al igual que Pradhan *et al.* (2000) en la actividad de la catalasa durante 6 días a 4 °C en los músculos *Semimembranosus* y *Longissimus dorsi* de vacunos.

Sólo existe un antecedente sobre carne vacuna uruguaya, donde estudian un solo aspecto de la oxidación (oxidación lipídica) (Realini *et al.*, 2004a), y hay pocos estudios realizados en carne vacuna que evalúen los parámetros oxidativos y antioxidativos en músculos distintos, razas distintas y el efecto de la maduración. Por eso es que nos propusimos el objetivo y las hipótesis que se describen a continuación.

1.7. OBJETIVO E HIPÓTESIS

El objetivo de este trabajo fue evaluar el estatus oxidativo y antioxidativo de los músculos *Psoas major*, *Gluteus medius* y *Longissimus dorsi*, frescos y madurados, de animales de las razas Hereford y Braford producidos sobre pradera en el Uruguay.

Las hipótesis de trabajo planteadas fueron:

- (1) los tres músculos estudiados presentarían distintos estatus oxidativos y antioxidativos.

- (2) la maduración de la carne a 4 °C durante 14 días modificaría esos estatus oxidativos y antioxidativos.
- (3) las dos razas estudiadas presentarían diferencias en cuanto a sus estatus oxidativos y antioxidativos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MÚSCULOS Y ANIMALES

Se trabajó con tres músculos de alto valor comercial: el *Psoas major* (perteneciente al corte lomo), el *Gluteus medius* (perteneciente al corte cuadril) y el *Longissimus dorsi* (perteneciente al corte bife angosto) de 6 novillos de la raza Hereford y de 6 novillos de la raza Braford con una edad de entre 26 a 30 meses. Previo a la faena los animales se alimentaron a pasturas naturales y los últimos 150 días recibieron una dieta basada en pasturas mejoradas compuestas de trébol rojo (*Trifolium pratense*), trébol blanco (*Trifolium repens*), lotus (*Lotus corniculatus*) y *Dactylis glomerata*, hasta alcanzar un peso promedio de 460 kg.

Cada músculo fue dividido en dos porciones aproximadamente iguales donde una se congeló en fresco a -20 °C y la otra se envasó al vacío y maduró durante 14 días a 4 °C para luego ser congelada también a -20 °C.

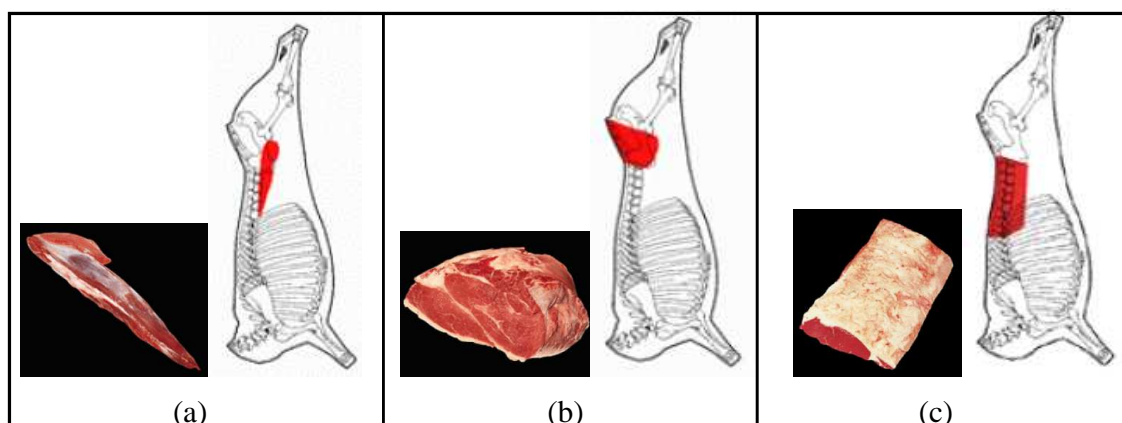


Figura 3. Fotografía y ubicación anatómica de los músculos de vacuno utilizados: (a) *Psoas major*, (b) *Gluteus medius*, y (c) *Longissimus dorsi*. (extraídas de INAC, 2008).

2.2. DETERMINACIÓN DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA

Se siguió el método de Lynch y Frei (1993) descrito por Gatellier *et al.* (2004). Se homogeneizaron 5 g aproximadamente de cada muestra de músculo con 100 ml de un buffer de extracción (KCl 0.15 M, EDTA 0.02 M, BHT 0.30 M) durante 1 min a 12.000 rpm en un Virtis 45. Se extrajeron 8 ml del homogeneizado de cada muestra que se congelaron, para la determinación, al día siguiente, del nivel de oxidación proteica. Para el test de TBARS (de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico) de medición de la oxidación lipídica, se extrajeron 5 ml de cada homogeneizado, se centrifugaron a 2000 g durante 10 min y luego se extrajo 1 ml del sobrenadante al cual se le agregó 1 ml de la mezcla TBA-TCA (TBA 35 mM, TCA 10 % en HCl 125 mM). Se preparó un blanco con el buffer de extracción y se sometió al mismo procedimiento que las muestras. Las muestras y el blanco se colocaron en ebullición durante 30 min, luego en hielo durante 5 min para frenar la reacción y a temperatura ambiente durante 45 min. Se agregaron 2 ml de n-butanol, se centrifugaron a 3000 g durante 10 min y se midió la absorbancia del sobrenadante en un espectrofotómetro (Genesys-6) a 535 nm de longitud de onda. Se calculó la concentración del MDA de las muestras utilizando su coeficiente de extinción molar ($156.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y los resultados se expresaron en mg de MDA/ kg músculo.

2.3. DETERMINACIÓN DE LA OXIDACIÓN PROTEICA

Se siguió el método descrito por Mercier *et al.* (2004). Primero se descongelaron las muestras homogeneizadas el día anterior y se extrajeron 2 ml para el blanco y 2 ml de cada muestra. Se centrifugaron a 2000 g por 10 min, se agregaron 2 ml de HCl 2 M al blanco y 2 ml de DNPH 20 mM disuelto en HCl 2 M a las muestras. Se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora vortexeando cada 10 min. Se agregaron 2 ml de TCA 20 %, y se dejaron reposar durante 15 min vortexeando cada 5 min. Luego se

centrifugaron a 2000 g por 10 min y se eliminó el sobrenadante. Se lavó el pellet 3 veces con 4 ml de etanol:acetato de etilo (1:1) centrifugando luego de cada lavado para eliminar trazas de DNPH. Luego se disolvió el pellet con 6 ml de guanidina en KH_2PO_4 20 mM y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min vortexeando cada 5 min. Luego se centrifugaron a 2400 g por 10 min y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Genesys-6) a 370 nm de longitud de onda. La concentración de DNPH de las muestras se calculó utilizando su coeficiente de extinción molar ($22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y los resultados se expresaron en nmoles de DNPH/mg proteína.

2.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA

Se midió la concentración de proteínas de cada uno de los homogeneizados de las muestras siguiendo el método descrito por Stoscheck (1990). Se realizó una curva estándar a partir de una solución madre de 10 mg/ml de BSA (Sigma). Cada punto de la curva se realizó por triplicado midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm en cubas de cuarzo. Se graficó la absorbancia (densidad óptica) en función de la concentración de proteínas (en mg/ml). Las mediciones de absorbancias de las muestras se realizaron por duplicado y se extrapolaron sus concentraciones proteicas utilizando la curva estándar.

2.5. EXTRACCIÓN DE LOS LÍPIDOS

Para extraer los lípidos se siguió la técnica de Folch *et al.* (1957). Se pesaron aproximadamente 4 g de cada muestra que se homogeneizaron en un Virtis 45 durante 1 min junto con 80 ml de una mezcla de cloroformo:metanol (2:1). Se filtró el homogeneizado a un kitasato y se volcó su contenido en una ampolla de decantación. Se agregaron 25 ml de una solución de 9 g/l de NaCl y se agitó la ampolla durante 1

min. Se dejaron reposar una noche para que se separen las fases y se recogió la fase inferior (conteniendo los lípidos en cloroformo) en un balón de vidrio previamente pesado. Luego se evaporó el cloroformo en un rotavapor, se colocaron los balones en estufa a 35 °C durante 30 min y luego 2 horas en un desecador al vacío. A continuación se pesaron los balones con los lípidos y se calcularon los porcentajes de lípidos que contenía cada muestra.

2.6. METILACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS Y CROMATOGRAFÍA DE GASES

Se disolvieron los lípidos contenidos en el balón con cloroformo y se extrajeron (en triplicados) aproximadamente 40 mg. Para la metilación se siguió el método descrito por Ichihara *et al.* (1996). Se evaporó el cloroformo y se colocaron 2 ml de hexano. Se agregaron 4 ml de una solución de KOH 2 M en metanol, se agitó con un vortex durante 2 min y se centrifugó a 1000 g durante 10 min a 12 °C aproximadamente. Se extrajo la fase superior y se colocó en un tubo para luego medir la composición en ácidos grasos en un cromatógrafo de gases Clarus 500 (Perkin Elmer Instruments) con un detector de llama (FID) alimentado por 40 ml de hidrógeno por generador por electrólisis y 400 ml de aire. Se utilizó un Split fijo de 55 ml/min abierto 30 segundos después de la inyección automática de la muestra de 1 microlitro en hexano. Se utilizó una columna CPSIL-88 de 100 m y una temperatura inicial de 90 °C durante 1 minuto. Luego se aumentó la temperatura hasta 180 °C y se mantuvo durante 10 minutos. Una última rampa se utilizó con una temperatura de 225 °C que se mantuvo durante 15 minutos. La fase móvil fue el hidrógeno de pureza 99.9995 a 41 psi. La temperatura del inyector y del detector se mantuvo fija a 250 °C.

2.7. PROCEDIMIENTO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CATALASA

Se siguió el método de Aebi (1984). Se pesaron aproximadamente 2.3 g de cada muestra de músculo (en duplicado) y se homogeneizaron con 26 ml de buffer (KCl 0.15 M, EDTA 0.79 M, pH 7.4) en un Ultra Turrax (IKA T18 basic) durante 1 min a 12000 rpm en un recipiente enfriado con hielo. El homogeneizado se centrifugó a 9000 g durante 10 min a 4 °C.

En una cuba de cuarzo de 3 ml del espectrofotómetro se colocaron: 2820 µl del buffer de extracción, 90 µl del sobrenadante de la muestra y 90 µl de H₂O₂ 6.56 mM. Se midió la descomposición del H₂O₂ a 240 nm durante 3 min, registrando el valor de absorbancia cada 30 segundos. Se realizó un blanco con 2910 µl del buffer de extracción y 90 µl del sobrenadante. Se realizó un contrablanco con 2910 µl del buffer de extracción y 90 µl de H₂O₂. Se calculó la actividad de la catalasa utilizando el coeficiente de extinción molar del H₂O₂ (39.4 M⁻¹ cm⁻¹) y los resultados se expresaron en nmoles/min/mg proteína y µmoles/min/g músculo.

2.8. PROCEDIMIENTO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA

Se utilizó otra fracción del mismo homogeneizado utilizado para medir catalasa y se siguió el procedimiento de Marklund y Marklund (1974) basado en la inhibición de la autooxidación del pirogalol. La reacción se llevó a cabo en una cuba de cuarzo de 3 ml. Primero se midió el blanco, luego el contrablanco y por último la muestra con el pirogalol, para cada una de las muestras. Para medir el blanco se colocaron 2925 µl de buffer KH₂PO₄ 50 mM (pH 8.2) y 75 µl del sobrenadante del homogeneizado. Para medir el contrablanco se colocaron 2925 µl del buffer KH₂PO₄ 50 mM (pH 8.2) y 75 µl del pirogalol 10 mM. Para medir las muestras se colocaron 2850 µl del buffer KH₂PO₄

50 mM (pH 8.2), 75 μ l del sobrenadante del homogeneizado y 75 μ l del pirogalol 10 mM. En cada uno de los casos se midió el aumento en la absorbancia a 340 nm de longitud de onda en el espectrofotómetro durante 2 min registrando el valor cada 10 segundos. Sabiendo que una unidad de actividad enzimática de la SOD se define como la actividad necesaria para inhibir en un 50 % la autooxidación del pirogalol, se calculó la actividad en cada una de las muestras y se expresó el resultado en U y en U/g músculo, siendo U las unidades de inhibición.

2.9. PROCEDIMIENTO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN PEROXIDASA

La actividad de la GPx puede ser medida mediante una reducción del GSH acoplada a una oxidación de NADPH por la glutatión reductasa (Renerre *et al*, 1996). Para medir la actividad de la GPx se siguió el procedimiento descrito por De Vore y Greene (1982) y Günzler y Flohé (1985). Se pesaron 5 g de cada muestra de músculo y se homogeneizaron en un Ultra Turrax (IKA T18 basic) a 18.000 rpm durante 1 minuto con 25 ml del buffer de extracción (KH₂PO₄ 50 mM, EDTA 0.5 mM, pH 7.0). Se centrifugaron a 2000 g durante 2 minutos a 4 °C y se filtraron con vacío y papel de filtro de tipo Whatman N°1 a un kitasato. Se recogió el filtrado en un tubo y se puso en hielo hasta medir la actividad de la GPx. Se guardó una alícuota de 4 ml del filtrado en el freezer a -20 °C para determinar la concentración de proteínas por el método de Stoscheck (1990) descrito anteriormente. Inmediatamente antes de medir la actividad de esta enzima se preparó el medio de reacción ya que tiene una duración de tan solo 2 horas. El medio de reacción consistía en: KH₂PO₄ 50 mM, EDTA 0.5 mM, glutatión reducido 1 mM (Sigma-Aldrich G4251), NADPH 0.15 mM (Sigma N1630 o Fluka 93220), H₂O₂ 0.15 mM, NaN₃ 1 mM (Sigma S-2002) y glutatión reductasa 1.5 U (sigma G3664). Para medir el blanco se colocaron 1980 μ l de este medio a 22 °C junto con 20 μ l del buffer de extracción en una cuba de cuarzo de 3 ml y se midió la

absorbancia a 340 nm de longitud de onda. Para medir la actividad de las muestras se colocaron 1980 μ l del medio de reacción a 22 °C y 20 μ l del filtrado y se determinó la oxidación del NADPH midiendo el descenso en la absorbancia a 340 nm durante 3 min registrando los valores cada 30 segundos. Sabiendo que una unidad de GPx se define como la cantidad de extracto requerido para oxidar 1 mmol de NADPH/minuto, se calculó la concentración de NADPH utilizando su coeficiente de extinción molar a 22 °C ($6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y se expresó el resultado en μ moles de NADPH/min/g músculo y en nmoles de NADPH/min/mg proteína.

2.10. PROCEDIMIENTO PARA MEDIR LA CAPACIDAD ANTIOXIDATIVA

Para medir la capacidad antioxidativa de las muestras de músculo se siguió el método descrito por Mercier *et al.* (2004). Se homogeneizaron 2 g de cada muestra de músculo con 20 ml de KCl 0.15 M (pH 7.2) en un Ultra-Turrax (IKA T18 basic) a 12.000 rpm durante 1 min sobre un recipiente enfriado con hielo y se centrifugaron a 2000 g por 10 min a 4 °C. Para el tiempo 0 de incubación se extrajeron 0.5 ml del sobrenadante en un tubo al cual se agregaron 0.5 ml de KCl 0.15 M y 30 μ l de BHT 3 mM. Luego, en el mismo tubo, se agregó 1 ml de la mezcla TBA-TCA (TBA 35 mM, TCA 10% en 125 mM HCl) y se prosiguió con el test de TBARS descrito anteriormente. Paralelamente se incubaron otros 5 ml del mismo sobrenadante inicial con 5 ml de una mezcla de FeSO₄ (0.5 mM) y H₂O₂ (1 mM) a 37 °C en un baño con agitación suave (45 rpm). A los 30, 120 y 300 minutos se extrajo una alícuota de 1 ml y se agregaron 30 μ l de BHT 3 mM para bloquear la reacción. Se siguieron los pasos para el test de TBARS descritos anteriormente.

2.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo a través del programa NCSS (2007). Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media (EEM) y el nivel de significancia fue establecido en $p < 0.05$. Para evaluar el efecto músculo, el efecto maduración, el efecto raza y el efecto tiempo (en el caso de la oxidación inducida) se siguió un análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM. Para comparar los tres músculos frescos y los tres músculos madurados se siguió una ANOVA de una vía, seguida del test de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Para comparar los datos de los estados fresco y madurado del mismo músculo se utilizó el test-t de Student pareado. En los resultados de TBARS al inducir oxidación además se utilizó una ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple de Tukey-Kramer para comparar los tres músculos en el mismo tiempo de incubación, y para comparar cada músculo en estado fresco y en estado madurado en los distintos tiempos de incubación.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. OXIDACIÓN LIPÍDICA

Los valores promedio de TBARS hallados en los tres músculos de la raza Hereford variaron desde 0.51-0.75 mg MDA/kg en estado fresco y entre 0.49-0.73 mg MDA/kg en estado madurado. En la raza Braford variaron desde 0.57-0.80 mg MDA/kg en estado fresco y desde 0.57-0.75 mg MDA/kg en estado madurado.

Los resultados de TBARS muestran un efecto músculo ($p < 0.01$), donde el LD presenta un menor nivel de oxidación lipídica que los otros dos músculos estudiados, pero no muestran un efecto de la maduración ni de la raza.

Dentro de cada raza, no se encontraron diferencias significativas entre el estado fresco y el madurado en cada músculo, ni entre músculos en estado fresco, ni entre músculos en estado madurado (Fig. 4).

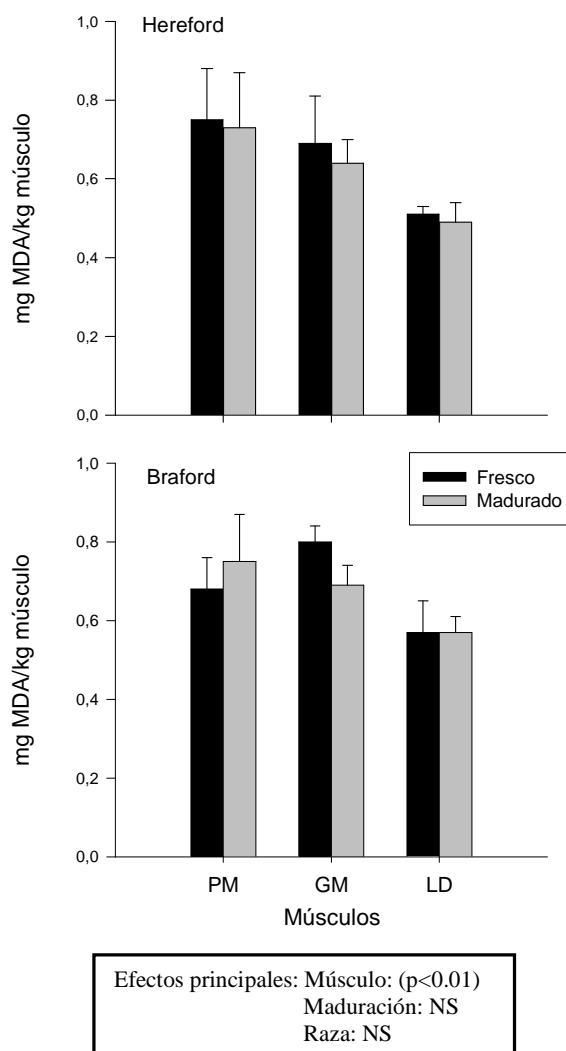


Fig. 4. TBARS en los músculos *Psoas major* (PM), *Gluteus medius* (GM) y *Longissimus dorsi* (LD) frescos y madurados. Los valores son medias \pm EEM ($n=6$). NS: no significativo.

3.2. OXIDACIÓN PROTEICA

El contenido promedio de carbonilos proteicos hallado en los tres músculos de la raza Hereford varió desde 0.89-1.42 nmoles DNPH/mg proteína en estado fresco y desde 1.20-1.41 nmoles DNPH/mg proteína en estado madurado. En la raza Braford varió desde 1.08-1.43 nmoles DNPH/mg proteína en estado fresco y desde 1.29-1.75 nmoles DNPH/mg proteína en estado madurado.

Los contenidos de carbonilos proteicos presentaron un efecto músculo significativo ($p < 0.05$), donde el GM presentó niveles significativamente más altos de oxidación proteica que el LD y el PM. No se encontró un efecto de la maduración ni de la raza (Fig. 5).

En la raza Hereford, se observaron diferencias significativas al comparar los tres músculos en estado fresco ($p < 0.05$), y el PM fresco presentó menores niveles de oxidación proteica que el madurado ($p < 0.05$). En la raza Braford, el GM fresco presentó menores niveles de oxidación proteica que el madurado ($p < 0.05$), y no se observaron diferencias significativas entre músculos en estado fresco. No se encontraron diferencias significativas entre músculos madurados para ninguna de las dos razas (Fig. 5).

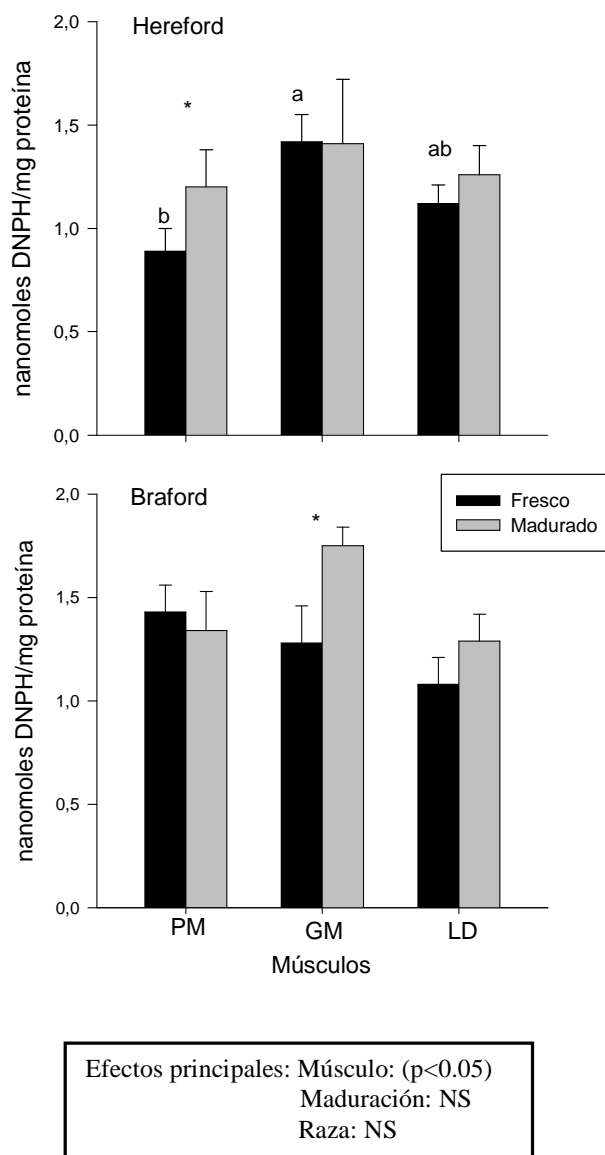


Fig. 5. Contenido en carbonilos proteicos de los músculos *Psoas major* (PM), *Gluteus medius* (GM) y *Longissimus dorsi* (LD) frescos y madurados. Los valores son medias \pm EEM ($n=6$). Los * indican diferencias significativas entre el estado fresco y madurado del mismo músculo ($p < 0.05$). Letras distintas en minúsculas indican diferencias significativas entre músculos frescos ($p < 0.05$). NS: no significativo.

3.3. CONTENIDO TOTAL DE LÍPIDOS Y COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Los resultados del contenido total de lípidos (expresados como %) de los músculos estudiados (Cuadro 1), muestran un efecto del músculo ($p < 0.01$), donde el músculo LD presenta un menor contenido total de lípidos comparado con el PM y el GM, y un efecto de la raza ($p < 0.05$), donde la raza Hereford muestra un mayor contenido de lípidos que la Braford. No hubo un efecto de la maduración.

Con respecto a la composición de ácidos grasos (Cuadro 1), hubo un efecto del músculo en el contenido de: C16:0 ($p < 0.001$), C16:1 ($p < 0.05$), C18:0 ($p < 0.001$), C18:3 n-3 ($p < 0.01$), C20:4 n-6 ($p < 0.05$), EPA ($p < 0.01$), DPA ($p < 0.05$) y DHA ($p < 0.05$), donde el GM presentó un menor contenido de C16:0 que el PM y el LD, el LD un mayor contenido de C16:1 que el PM y el GM, el PM un mayor contenido de C18:0 y uno menor de C18:3 (n-3) que el LD y el GM, el GM un mayor contenido de C20:4, EPA, DPA y DHA que el PM, y en estos casos el LD no fue distinto significativamente a ninguno de los otros dos músculos. También se observó un efecto de la raza en el contenido de: C16:1 ($p < 0.05$), C18:2 n-6 ($p < 0.01$), C18:3 n-3 ($p < 0.05$) y C20:4 n-6 ($p < 0.05$), donde la raza Hereford presentó un mayor contenido de C16:1 y un menor contenido de C18:2 (n-6), C18:3 (n-3) y C20:4 (n-6) que la raza Braford. No se observó un efecto significativo de la maduración en el contenido de ninguno de los ácidos grasos detectados.

En el Cuadro 2 se presentan los resultados que muestran un efecto del músculo en el contenido de ácidos grasos SAT ($p < 0.01$), PUFA ($p < 0.05$), n-3 ($p < 0.01$) y en la relación PUFA/SAT ($p < 0.05$), donde el GM presentó un mayor contenido de PUFA, un menor contenido de SAT y una mayor relación PUFA/SAT que el PM. En estos tres casos el LD no fue significativamente distinto a ninguno de los otros dos músculos estudiados. Además el PM presentó un menor contenido de ácidos grasos n-3 que los otros dos músculos. También se observó un efecto de la raza en el contenido de MUFA

($p < 0.01$), PUFA ($p < 0.05$) y ácidos grasos n-6 ($p < 0.01$), donde la raza Hereford presentó un mayor contenido de MUFA y un menor contenido de PUFA y de n-6 que la raza Braford. No se observó un efecto de la maduración para ninguna de las familias de ácidos grasos.

Cuadro 1. Contenido total de lípidos (%) y composición de ácidos grasos de los músculos *Psoas major* (PM), *Gluteus medius* (GM) y *Longissimus dorsi* (LD) frescos y madurados.

	HEREFORD						BRAFord						Mo	Ma	R
	PM		GM		LD		PM		GM		LD				
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M			
% lípidos	3.03 ± 0.39	3.78 ± 0.73	3.87 ± 0.64	3.82 ± 0.33	2.75 ± 0.70	2.52 ± 0.44	3.65 ± 0.69	3.06 ± 0.81	3.14 ± 0.34	2.33 ± 0.23	1.63 ± 0.54	1.99 ± 0.14	**	NS	*
C14:0	2.32 ± 0.15	2.40 ± 0.23	1.81 ± 0.09	1.75 ± 0.05	2.40 ± 0.03	2.17 ± 0.06	2.06 ± 0.31	2.10 ± 0.46	1.59 ± 0.09	2.04 ± 0.32	1.98 ± 0.25	1.86 ± 0.44	NS	NS	NS
C14:1	0.377 ± 0.009	0.32 ± 0.02	0.33 ± 0.06	0.31 ± 0.07	0.39 ± 0.12	0.41 ± 0.05	0.22 ± 0.06	0.30 ± 0.08	0.32 ± 0.03	0.30 ± 0.04	0.29 ± 0.06	0.46 ± 0.15	NS	NS	NS
C16:0	25.62 ± 0.61	26.40 ± 0.76	22.13 ± 1.55	22.48 ± 0.76	27.23 ± 0.60	25.78 ± 1.38	25.29 ± 1.00	25.08 ± 1.16	22.07 ± 0.69	23.90 ± 0.86	26.04 ± 0.67	24.41 ± 2.17	***	NS	NS
C16:1	2.94 ± 0.15	2.70 ± 0.22	3.06 ± 0.49	2.74 ± 0.38	3.83 ± 0.38	3.34 ± 0.59	2.39 ± 0.22	2.67 ± 0.30	2.04 ± 0.36	2.55 ± 0.27	2.49 ± 0.21	3.61 ± 0.35	*	NS	*
C18:0	16.64 ± 0.62	17.59 ± 1.26	15.08 ± 0.40	15.56 ± 1.17	15.34 ± 1.08	15.65 ± 1.39	20.29 ± 0.04	18.22 ± 0.61	14.23 ± 0.36	16.60 ± 1.49	14.91 ± 0.92	12.49 ± 1.24	***	NS	NS
C18:1	38.20 ± 1.03	37.24 ± 1.15	39.39 ± 3.16	39.86 ± 2.22	39.21 ± 1.46	37.83 ± 1.94	38.36 ± 0.78	37.02 ± 1.12	35.86 ± 3.33	34.19 ± 2.16	35.90 ± 1.51	36.82 ± 1.35	NS	NS	NS
C18:2	3.04 ± 0.30	2.70 ± 0.22	3.79 ± 0.66	3.60 ± 0.44	2.81 ± 0.18	3.43 ± 0.38	3.24 ± 0.16	3.93 ± 0.82	4.56 ± 0.52	4.61 ± 0.29	4.82 ± 0.81	4.94 ± 1.25	NS	NS	**
C20:0	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.18 ± 0.11	0.15 ± 0.04	0.11 ± 0.04	0.18 ± 0.10	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.080 ± 0.008	0.14 ± 0.05	NS	NS	NS
C20:1	0.137 ± 0.007	0.16 ± 0.06	0.20 ± 0.15	0.12 ± 0.06	0.07 ± 0.03	0.17 ± 0.09	0.14 ± 0.006	0.13 ± 0.01	0.21 ± 0.06	0.15 ± 0.03	0.30 ± 0.14	0.25 ± 0.02	NS	NS	NS
C18:3	0.81 ± 0.14	0.88 ± 0.07	1.81 ± 0.26	1.77 ± 0.10	1.15 ± 0.15	1.40 ± 0.26	1.12 ± 0.08	1.35 ± 0.26	2.14 ± 0.09	2.01 ± 0.19	1.61 ± 0.41	2.28 ± 0.71	**	NS	*
CLA	0.55 ± 0.10	0.55 ± 0.05	0.62 ± 0.17	0.66 ± 0.07	0.56 ± 0.18	0.46 ± 0.16	0.26 ± 0.04	0.33 ± 0.03	0.98 ± 0.63	0.62 ± 0.27	0.32 ± 0.12	0.31 ± 0.08	NS	NS	NS
C20:4	0.41 ± 0.06	0.43 ± 0.04	0.86 ± 0.13	0.91 ± 0.22	0.63 ± 0.16	0.73 ± 0.20	0.49 ± 0.07	0.87 ± 0.24	1.25 ± 0.25	1.43 ± 0.19	1.30 ± 0.60	1.04 ± 0.21	*	NS	*
EPA	0.12 ± 0.03	0.17 ± 0.01	0.50 ± 0.10	0.59 ± 0.16	0.27 ± 0.09	0.30 ± 0.06	0.17 ± 0.04	0.26 ± 0.12	0.77 ± 0.13	0.78 ± 0.21	0.68 ± 0.41	0.51 ± 0.14	**	NS	NS
DPA	0.23 ± 0.04	0.48 ± 0.15	0.74 ± 0.10	0.85 ± 0.19	0.58 ± 0.19	0.68 ± 0.08	0.28 ± 0.06	0.50 ± 0.17	1.02 ± 0.07	1.12 ± 0.27	0.91 ± 0.51	0.80 ± 0.18	*	NS	NS
DHA	0.016 ± 0.007	0.046 ± 0.009	0.083 ± 0.009	0.13 ± 0.05	0.04 ± 0.01	0.036 ± 0.007	0.01 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.05	0.11 ± 0.08	0.06 ± 0.01	*	NS	NS
No ident.	8.50 ± 0.60	7.85 ± 0.41	9.40 ± 3.55	8.50 ± 1.01	5.39 ± 0.31	7.43 ± 1.86	5.59 ± 0.72	7.08 ± 1.32	12.72 ± 4.26	9.43 ± 1.64	8.28 ± 0.17	10.03 ± 1.70			

F: frescos; M: madurados; Mo: efecto músculo; Ma: efecto maduración; R: efecto raza; CLA: ácido linoleico conjugado; EPA: ácido eicosapentaenoico; DPA: ácido docosapentaenoico; DHA: ácido docosaheptaenoico; No ident.: no identificados. Los valores son medias ± EEM (n=3). NS: no significativo; * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

Cuadro 2. Composición de ácidos grasos saturados (SAT), monoinsaturados (MUFA), poliinsaturados (PUFA), n-6 y n-3, y relación PUFA/SAT de los músculos *Psoas major* (PM), *Gluteus medius* (GM) y *Longissimus dorsi* (LD) frescos y madurados.

	HEREFORD						BRAFDOR						Mo	Ma	R
	PM		GM		LD		PM		GM		LD				
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M			
SAT	44.66 ± 1.13	46.48 ± 0.67	38.67 ± 1.24	39.95 ± 0.48	45.08 ± 1.65	43.79 ± 1.37	47.75 ± 1.30	45.51 ± 1.71	38.00 ± 1.08	42.67 ± 2.56	43.01 ± 1.29	38.89 ± 2.89	**	NS	NS
MUFA	41.65 ± 1.02	40.42 ± 0.94	42.98 ± 3.48	43.03 ± 2.49	43.49 ± 1.93	41.75 ± 2.50	41.11 ± 0.51	40.11 ± 0.77	38.43 ± 3.63	37.19 ± 1.97	38.98 ± 1.58	41.13 ± 1.84	NS	NS	**
PUFA	5.18 ± 0.29	5.26 ± 0.72	8.40 ± 1.44	8.51 ± 1.16	6.03 ± 0.56	7.04 ± 0.93	5.57 ± 0.37	7.30 ± 1.57	10.84 ± 0.76	10.70 ± 1.34	10.73 ± 3.55	9.94 ± 2.45	*	NS	*
PUFA/ SAT	0.12	0.11	0.22	0.21	0.13	0.16	0.12	0.16	0.28	0.25	0.25	0.25	*	NS	NS
n-6	3.45 ± 0.35	3.13 ± 0.25	4.65 ± 0.79	4.51 ± 0.66	3.43 ± 0.34	4.15 ± 0.94	3.73 ± 0.23	4.80 ± 1.06	5.81 ± 0.69	6.03 ± 0.44	6.73 ± 1.75	5.97 ± 1.46	NS	NS	**
n-3	1.18 ± 0.19	1.58 ± 0.14	3.13 ± 0.48	3.34 ± 0.50	2.04 ± 0.72	2.42 ± 0.35	1.57 ± 0.17	2.17 ± 0.95	4.06 ± 0.16	4.05 ± 0.70	3.81 ± 1.84	3.65 ± 1.03	**	NS	NS

F: frescos; M: madurados; Mo: efecto músculo; Ma: efecto maduración; R: efecto raza; SAT: ácidos grasos saturados (C14:0+C16:0+C18:0+C20:0); MUFA: ácidos grasos monoinsaturados (C14:1+C16:1+C18:1+C20:1); PUFA: ácidos grasos poliinsaturados (C18:2+C18:3+CLA+C20:4+EPA+DPA+DHA); n-6: (C18:2+C20:4); n-3: (C18:3+EPA+DPA+DHA). Los valores son medias ± EEM (n=3). NS: no significativo; * p<0.05; ** p<0.01.

3.4. ACTIVIDAD DE LA CATALASA

Cuando la actividad de la catalasa se expresó en $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{g}$, se observa un efecto músculo ($p < 0.01$), donde el GM muestra una menor actividad que el LD y el PM, y un efecto maduración ($p < 0.001$) donde el estado madurado presenta una mayor actividad que el estado fresco. Al expresar los resultados en $\text{nmoles}/\text{min}/\text{mg}$ proteína se observan los mismos efectos significativos ($p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente), donde el GM presenta una actividad de la catalasa significativamente menor que el LD, y el estado madurado también muestra una mayor actividad que el estado fresco. No se observa un efecto de la raza en ninguna de las dos formas de expresión (Fig. 6).

En la Figura 6 se puede ver que dentro de cada raza no se encontraron diferencias significativas entre músculos frescos y entre músculos madurados. Cuando se expresó la actividad de la catalasa en $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{g}$, los músculos PM y GM madurados presentaron una mayor actividad enzimática comparado con los mismos en estado fresco para ambas razas ($p < 0.05$). Cuando se expresó la actividad de la catalasa en $\text{nmoles}/\text{min}/\text{mg}$ proteína, ocurrió lo mismo en el músculo GM de Hereford y en el PM de Braford ($p < 0.05$).

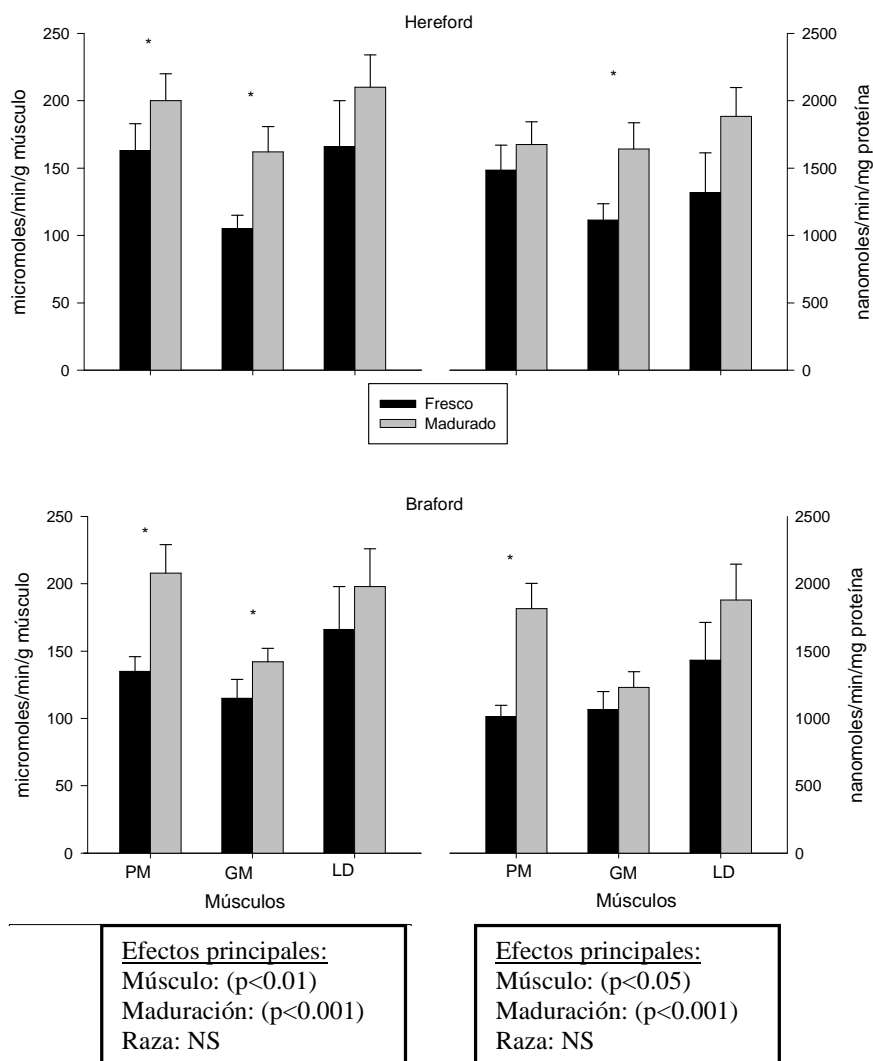


Fig. 6. Actividad de la catalasa en los músculos *Psoas major* (PM), *Gluteus medius* (GM) y *Longissimus dorsi* (LD) frescos y madurados. Los valores son medias \pm EEM (n=6). Los * indican diferencias significativas entre el estado fresco y el madurado del mismo músculo (p<0.05). NS: no significativo.

3.5. ACTIVIDAD DE LA SOD

Al expresar los resultados en U no se observó un efecto del músculo, pero al expresarlos en U/g músculo sí se encontró un efecto músculo ($p < 0.05$), donde el PM presentó una actividad de SOD significativamente mayor que el LD, y el GM no fue significativamente distinto a estos dos. En ambas formas de expresión, se observó un efecto de la maduración, donde los músculos frescos mostraron una mayor actividad de la SOD que los músculos madurados ($p < 0.01$ en U y $p < 0.05$ en U/g músculo), y no se observó un efecto de la raza (Fig. 7).

Dentro de la raza Hereford el LD fresco mostró una mayor actividad de la SOD que el LD madurado en ambas formas de expresión ($p < 0.05$ en U y $p < 0.01$ en U/g músculo), al igual que el GM expresado en U ($p < 0.05$). Para la raza Braford no se encontraron diferencias significativas entre músculos frescos y madurados. Dentro de cada raza no se encontraron diferencias significativas entre músculos frescos y entre músculos madurados (Fig. 7).

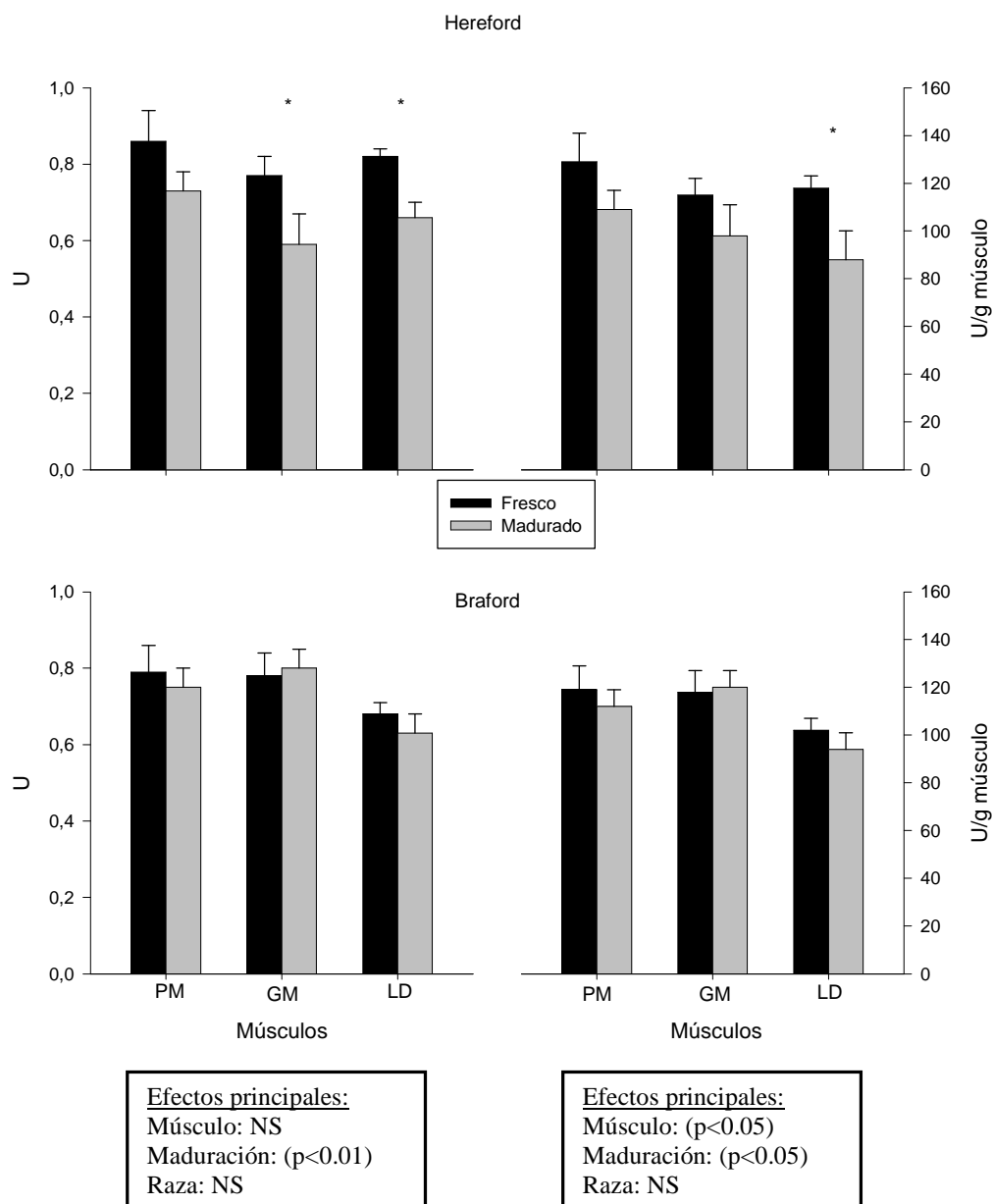


Fig. 7. Actividad de la SOD, de los músculos *Psoas major* (PM), *Gluteus medius* (GM) y *Longissimus dorsi* (LD) frescos y madurados. Los valores son medias \pm EEM (n=6). Los * indican diferencias significativas entre el estado fresco y el madurado del mismo músculo (p<0.05). NS: no significativo.

3.6. ACTIVIDAD DE LA GPx

Al expresar los resultados en $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{g}$ músculo se encontró un efecto del músculo ($p<0.01$), donde el GM mostró una mayor actividad de GPx que el LD y el PM, y al expresarlos en $\text{nmoles}/\text{min}/\text{mg}$ proteína se observó una mayor actividad en el músculo GM que en el LD ($p<0.05$), y el PM no fue significativamente distinto. No se observaron efectos de la raza ni de la maduración en ninguna de las dos formas de expresión. (Fig. 8).

Dentro de la raza Hereford, al expresar los resultados por g de músculo el GM fresco muestra una mayor actividad de GPx que el PM y LD frescos ($p<0.01$), y los músculos PM y GM frescos presentaron una mayor actividad que sus respectivos madurados ($p<0.01$). Al expresar los resultados por mg de proteína, el LD fresco presenta una menor actividad que el PM y el GM frescos ($p<0.01$). Además se encontraron diferencias significativas entre músculos madurados ($p<0.05$ en $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{g}$ músculo y $p<0.01$ en $\text{nmoles}/\text{min}/\text{mg}$ proteína), como se puede ver en la Figura 8. Dentro de la raza Braford, al expresar los resultados por g de músculo, la única diferencia significativa encontrada fue entre el PM fresco y madurado ($p<0.05$) donde el músculo fresco presenta una mayor actividad de GPx que el músculo madurado. No se encontraron diferencias significativas entre músculos frescos, ni tampoco entre músculos madurados.

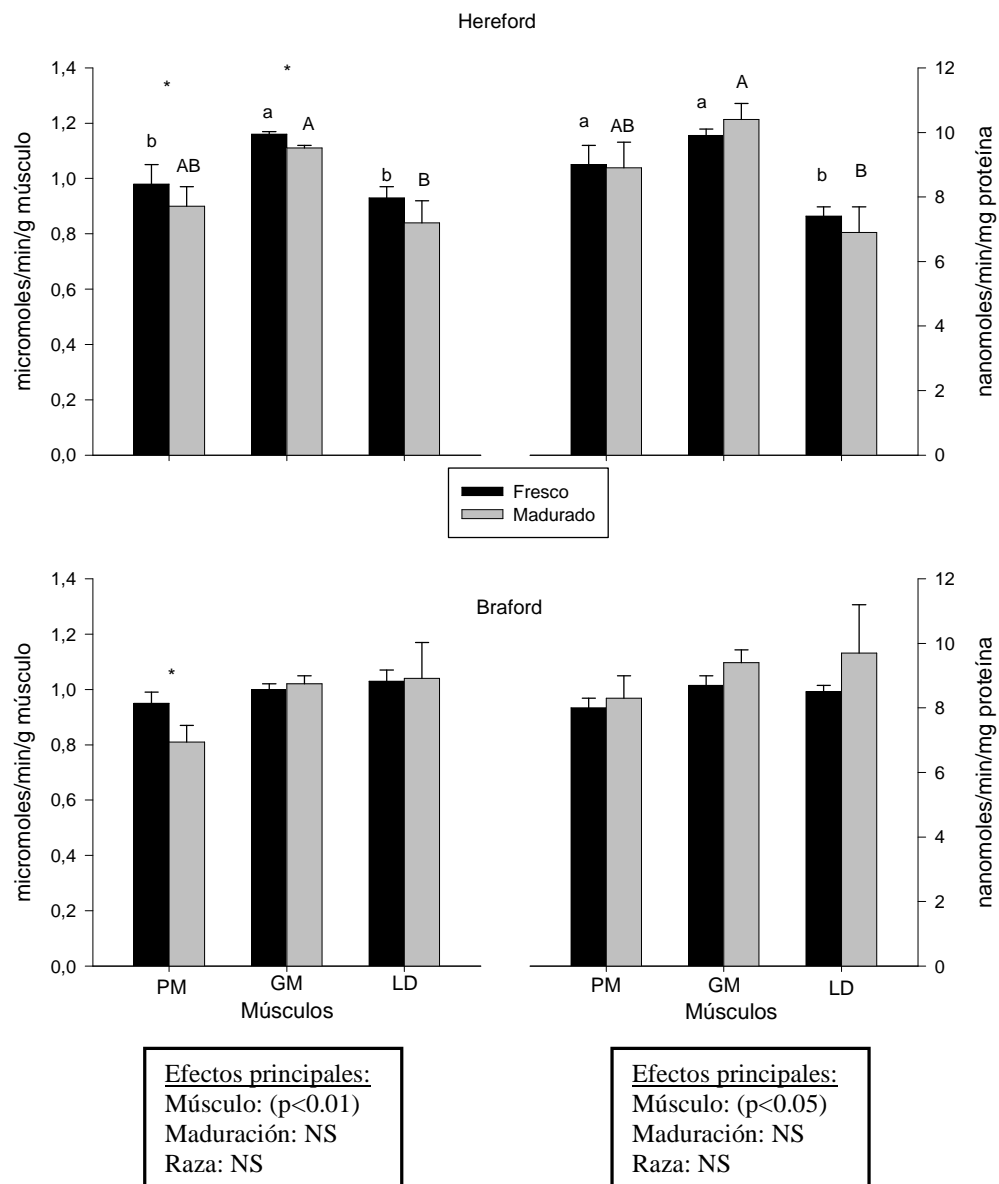
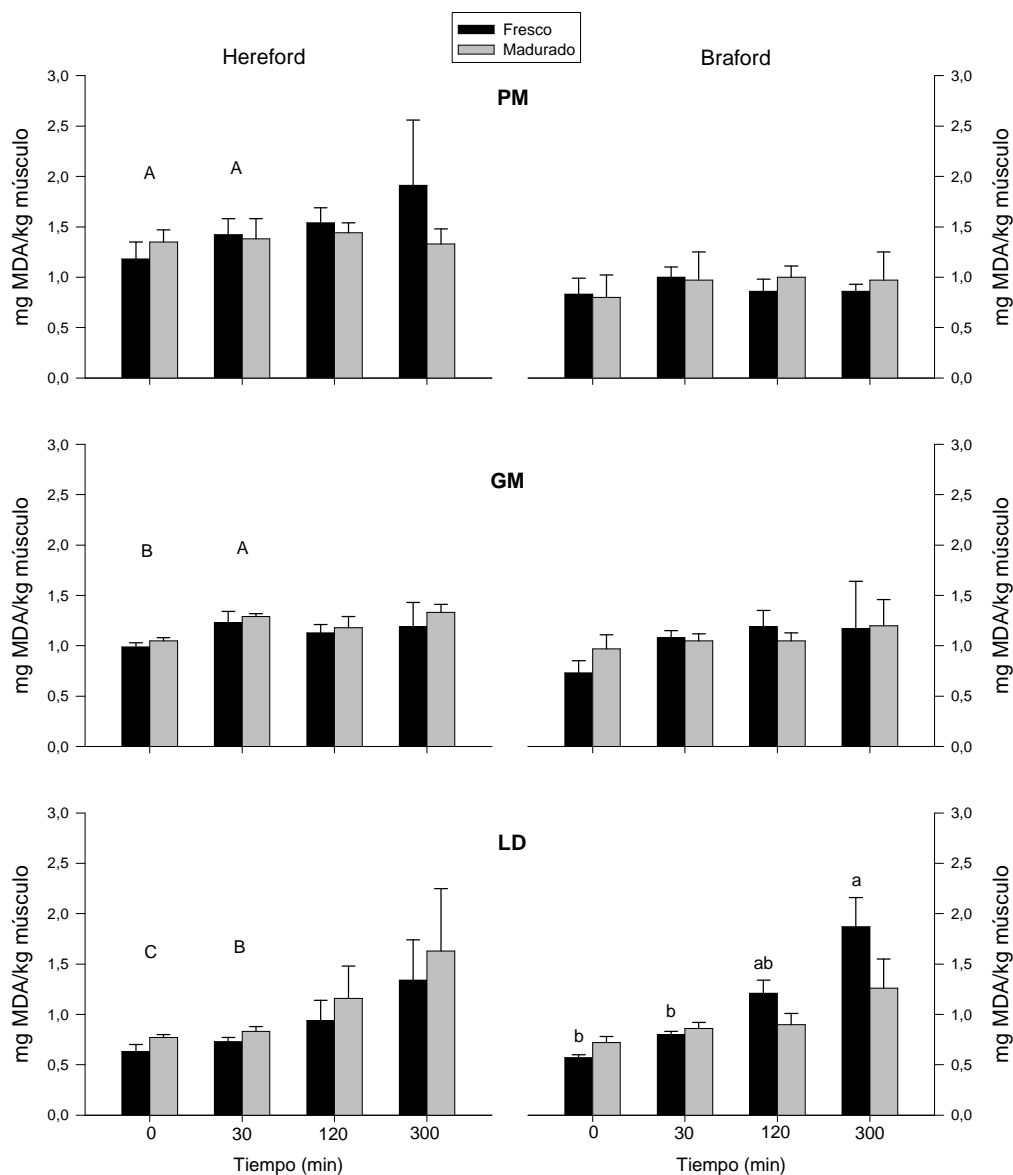


Fig. 8. Actividad de la GPx en los músculos *Psoas major* (PM), *Gluteus medius* (GM) y *Longissimus dorsi* (LD) frescos y madurados. Los valores son medias \pm EEM (n=6). Los * indican diferencias significativas entre estado fresco y madurado del mismo músculo (p<0.05). Letras distintas en minúsculas indican diferencias significativas entre músculos frescos (p<0.05). Letras distintas en mayúsculas indican diferencias significativas entre músculos madurados (p<0.05). NS: no significativo.

3.7. CAPACIDAD ANTIOXIDATIVA

En la Figura 9 se muestran los resultados de la oxidación inducida con hierro donde se puede ver un efecto de la raza, donde la Hereford presentó valores más altos de TBARS que la Braford ($p < 0.01$), y un efecto del tiempo de incubación ($p < 0.0001$) observando un aumento en los niveles de oxidación con el tiempo. No se observaron efectos del músculo ni de la maduración.

Al considerar los resultados de la raza Hereford, vemos que hay diferencias significativas entre músculos al tiempo 0 y 30 min de incubación ($p < 0.001$), donde el LD presentó menores niveles de TBARS que los otros dos músculos, y no se observaron diferencias significativas entre tiempos en los músculos frescos y en los músculos madurados. Para la raza Braford, la única diferencia significativa encontrada fue entre tiempos para el LD fresco ($p < 0.01$).



Efectos principales: Músculo: NS; Maduración: NS; Raza: ($p < 0.01$); Tiempo: ($p < 0.0001$)

Fig. 9. Oxidación inducida en los músculos *Psoas major* (PM), *Gluteus medius* (GM) y *Longissimus dorsi* (LD) frescos y madurados. Los valores son medias \pm EEM ($n=3$). Letras distintas en minúscula indican diferencias significativas entre tiempos de incubación dentro del mismo músculo fresco ($p < 0.05$). Letras distintas en mayúscula indican diferencias significativas entre músculos dentro del mismo tiempo de incubación y raza ($p < 0.05$). NS: no significativo.

4. DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

Para la oxidación lipídica, determinada por vía de la medición de TBARS, se observó un efecto músculo, donde el LD presentó menores niveles de oxidación que los otros dos músculos estudiados. No se observó ni un efecto de la maduración ni un efecto de la raza. Dentro de cada raza, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de oxidación lipídica entre el estado fresco y luego de la maduración en cada músculo, ni entre músculos en estado fresco, ni entre músculos en estado madurado.

Uno de los principales blancos de la oxidación lipídica son los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la carne. Sin embargo, la proporción de ácidos grasos poliinsaturados de los músculos de la raza Braford, fue significativamente mayor que la proporción detectada en la raza Hereford. Este resultado podría indicar que una mayor presencia de ácidos grasos poliinsaturados en la raza Braford estaría asociada con mayores defensas antioxidativas en esta raza, lo que explicaría la similitud en los niveles de oxidación lipídica observada en los músculos de ambas razas. Estas defensas antioxidativas no parecen estar representadas solamente por las enzimas antioxidantes catalasa, SOD y GPx (estudiadas en este trabajo), ya que no se detectó un efecto de la raza para ninguna de ellas. Por el contrario, se detectó un efecto de la raza cuando se evaluó la capacidad antioxidativa basada en el ensayo de inducción de la oxidación con hierro. Este resultado podría significar que no sólo las enzimas son responsables de una posible defensa antioxidativa contra la oxidación lipídica, sino que también pueden estar actuando otros factores presentes en la carne. Uno de estos factores que podría estar influyendo sobre el estado oxidativo de los músculos de las dos razas es la vitamina E (Mercier *et al.*, 1998), ya que investigaciones previas hallaron una correlación negativa entre el contenido de α -tocoferol y el nivel de TBARS en la carne bovina (Lynch *et al.* 1999, Mercier *et al.* 2004, Descalzo *et al.* 2005). La importancia de las vitaminas como factores de protección antioxidante de la carne es un tema importante para profundizar en estudios futuros. De hecho, los niveles de vitamina E del músculo LD de novillos de 2 y 3 años producidos sobre pasturas en el Uruguay

mostraron un nivel mucho más alto que en novillos producidos en otros sistemas que incluyeron suplementación con granos, realizados en España, Gran Bretaña y Alemania (De la Fuente *et al.*, 2009).

Aquí también se debe nombrar al hierro contenido en la carne como potencial pro-oxidante de los lípidos, que se determinó en otro trabajo en estos mismos músculos, mostrando valores elevados de este mineral, así como también una mayor riqueza de éste en la carne Hereford que en la carne Braford, en aproximadamente 20-25 % (Cabrera *et al.*, 2010). Sin embargo, estos valores elevados de hierro, y en especial su forma hemo, de mayor potencial oxidante (material no publicado), no han causado un aumento en los niveles de oxidación lipídica, ya que, comparativamente, los valores de TBARS hallados en nuestro trabajo fueron cercanos a los observados por otros investigadores que trabajaron con carne de vacunos alimentados a pastura (Mercier *et al.* 2004, Realini *et al.* 2004a, Realini *et al.* 2004b, Insani *et al.* 2008). Uno de estos trabajos fue realizado con animales Hereford producidos sobre pastura en el Uruguay (Realini *et al.*, 2004a).

Esta característica pro-oxidante del hierro ha sido utilizada en nuestro trabajo para evaluar la resistencia de los músculos, frente a la oxidación, una vez transformados en carne. Este ensayo de inducción *in vitro* de la oxidación con hierro añadido, tiene el interés de determinar el grado de las defensas antioxidativas globales de un tejido (Mercier *et al.*, 2004). Dicho ensayo permitió ver que existe un efecto de la raza significativo, pero ningún efecto del músculo ni de la maduración. También se pudo ver un efecto del tiempo de incubación mostrando que la oxidación lipídica aumenta con el tiempo de exposición *in vitro* de los tejidos al hierro. En un trabajo anterior realizado en Francia, por Mercier *et al.* (2004) en vacas de cría de la raza Charolais, se observó una mayor estabilidad del músculo LD (único músculo estudiado) expuesto al hierro, cuando los animales eran alimentados con pasto en comparación con animales alimentados con mezcla de granos y pasto. Si bien no hemos comparado en nuestro trabajo el sistema de alimentación, esta estabilidad que podemos catalogar también

como resistencia a la oxidación inducida, se observa en nuestros resultados y en especial en la raza Braford.

Para la oxidación proteica se observó un efecto músculo, donde el GM presentó un contenido de carbonilos proteicos significativamente más alto que el LD y el PM, pero no un efecto de la maduración ni de la raza. Dentro de cada raza, la maduración causó una mayor oxidación proteica en el músculo PM de Hereford y en el músculo GM de Braford. Este resultado parece indicar que la maduración afectaría más a la oxidación proteica que a la oxidación lipídica en las dos razas estudiadas y de forma específica en algunos músculos. Por otra parte, valores bajos de la enzima catalasa parecen corresponder con valores altos de oxidación proteica en los mismos músculos. Hay que tomar en cuenta que el aumento en la actividad de la catalasa después de la maduración no se transformó en una mayor defensa antioxidativa en los músculos, considerando tanto la oxidación lipídica como la oxidación proteica. Este particular patrón de aumento de la actividad de la catalasa después de la maduración, por el cual no tenemos una explicación aun, no se observó ni para la SOD ni para la GPx. Al contrario, la maduración causó una disminución significativa en la actividad de ambas enzimas en algunos músculos.

Aquí también, otros factores tales como la vitamina E, podrían ser complementarios a la acción de las enzimas, ya que se demostró en trabajos anteriores que podría existir una correlación negativa entre el contenido de vitamina E y los niveles de oxidación proteica en distintos músculos (Insani *et al.* 2008, Santé-Lhoutellier *et al.* 2008). En los procesos de oxidación proteica también hay que tener en cuenta que intervienen otros factores ligados a la contribución de las enzimas proteasas, tales como la integrina, la desmina y las enzimas calpaínas, que modifican la estructura de las fibras musculares y favorecen la exposición de las proteínas musculares a la oxidación (Berlett y Stadtman 1997, Rowe *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2006). La mayoría de estos últimos factores también intervienen en los procesos de mejora de la terneza de la carne y de la pérdida de agua de la carne cocida (Zhang *et al.*, 2006).

En relación a la posible acción del hierro, y en especial el hierro hemo, como factor pro-oxidante de las proteínas, Mercier *et al.* (2004) evaluaron el grado de oxidación proteica en el músculo LD de vacas Charolais (alimentadas con pasto) durante un ensayo *in vitro* de inducción de oxidación con hierro. Los resultados muestran una elevada oxidación en este músculo desde la media hora de exposición manteniéndose todavía alta hasta 5 horas después del inicio del ensayo. Este efecto pro-oxidativo del hierro sobre la proteína del LD también se observó cuando los animales fueron alimentados con granos (Mercier *et al.*, 2004). En este trabajo, no se observó un efecto significativo de la dieta, por lo que podría, tal vez, significar que la oxidación proteica dependería más del tipo y estructura de los músculos (incluyendo el componente “enzimas proteasas” que se describió previamente en el texto) que de la dieta recibida por los animales. Nuestros resultados parecen también expresar lo mismo, ya que encontramos un efecto músculo significativo en la oxidación proteica, sin ningún efecto de la raza ni de la maduración. Esta observación se fortalece con resultados recientes de nuestro grupo de investigación (Cabrera *et al.* 2010; resultados no publicados) que muestran un efecto músculo significativo para el contenido en hierro hemo en los mismos tres músculos estudiados aquí. Sin embargo, se observa que existe también un efecto raza, donde la raza Hereford tiene aparentemente más hierro hemo que la raza Braford, (ya mencionado antes en la discusión) y un efecto maduración significativo. El conjunto de los resultados muestran que el hierro hemo solo no es suficiente como para producir oxidación proteica persistente.

Los estudios que asocian oxidación proteica de la carne con su composición mineral y la maduración son muy escasos. Sin embargo, es un tema de importancia especialmente en la carne que sufre procesos industriales de conservación y modificación culinaria donde la oxidación puede reducir la aptitud de la carne a ser adecuadamente tratada y transformada, por ejemplo en alimentos cárnicos precocidos.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta el conjunto de los resultados obtenidos en la investigación se puede concluir que:

(1) la carne derivada del músculo *Longissimus dorsi* podría presentar ciertas ventajas de conservación y procesado comparado con los otros dos músculos estudiados.

(2) el proceso de maduración tuvo poco efecto negativo sobre los músculos estudiados, por lo que no estaría afectando de forma importante la calidad de la carne derivada de éstos.

(3) la carne de la raza Braford tendría ciertas ventajas de conservación y procesado frente a la carne de la raza Hereford, debido a que es menos susceptible a los procesos oxidativos, a pesar de contener una mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. In L. Packer (Ed), Oxygen radicals in biological systems. Method. Enzymol. 105: 121-126.
- Alessio, H.M.; Goldfarb, A.H. 1988. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. J. Appl. Physiol. 64: 1333-1336.
- Berlett, B.S.; Stadtman, E.R. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J. Biol. Chem. 272: 20313-20316.
- Bianchi, G.; Bentancur, O.; Sañudo, C. 2006. La maduración de la carne de cordero como una herramienta para mejorar su terneza y calidad sensorial. Rev. argent. Prod. Anim. 26: 39-55.
- Botsoglou, N.A.; Yannakopoulos, A.L.; Fletouris, D.J.; Tserveni-Goussi, A.S.; Fortomaris, P.D. 1997. Effect of dietary thyme on the oxidative stability of egg yolk. J. Agric. Food Chem. 45: 3711-3716.
- Braghieri, A.; Cifuni, G.F.; Girolami, A.; Riviezzi, A.M.; Marsico, I.; Napolitano, F. 2005. Chemical, physical and sensory properties of meat from pure and crossbred Podolian bulls at different ageing times. Meat Sci. 69: 681-689.
- Buckley, D.J.; Morrissey, P.A.; Gray, J.I. 1995. Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat. J. Anim. Sci. 73: 3122-3130.
- Cabrera, M.C.; Ramos, A.; Saadoun, A.; Brito, G. 2010. Selenium, copper, zinc, iron and manganese content of seven meat cuts from Hereford and Braford steers fed pasture in Uruguay. Meat Sci. 84: 518-528.
- Cascone, A. 2005. Study and prevention of lipid oxidation in meat. Tesis Doctoral. Nápoles, Italia. Universidad de Nápoles. 11 p.

-
- Cecarini, V.; Gee, J.; Fioretti, E.; Amici, M.; Angeletti, M.; Eleuteri, A.M.; Keller, J.N. 2007. Protein oxidation and cellular homeostasis: emphasis on metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1773: 93-104.
- Cifuni, G.F.; Napolitano, F.; Riviezzi, A.M.; Braghieri, A.; Girolami, A. 2004. Fatty acid profile, cholesterol content and tenderness of meat from Podolian young bulls. *Meat Sci.* 67: 289-29
- Daun, C.; Åkesson, B. 2004a. Comparison of glutathione peroxidase activity, and of total and soluble selenium content in two muscles from chicken, turkey, duck, ostrich and lamb. *Food Chem.* 85: 295-303.
- Daun, C.; Åkesson, B. 2004b. Glutathione peroxidase activity, and content of total and soluble selenium in five bovine and porcine organs used in meat production. *Meat Sci.* 66: 801-807.
- Daun, C.; Johansson, M.; Önning, G.; Åkesson, B. 2001. Glutathione peroxidase activity, tissue and soluble selenium content in beef and pork in relation to meat ageing and pig RN phenotype. *Food Chem.* 73: 313-319.
- 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.
- De la Fuente, J.; Díaz, M.T.; Álvarez, I.; Oliver, M.A.; Font i Furnols, M.; Sañudo, C.; Campo, M.M.; Montossi, F.; Nute, G.R.; Cañeque, V. 2009. Fatty acid and vitamin E composition of intramuscular fat in cattle reared in different production systems. *Meat Sci.* 82: 331-337.
- 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 Sci.* 79: 423-436.

-
- Descalzo, A.M.; Rossetti, L.; Sancho, A.M.; García, P.T.; Biolatto, A.; Carduza, F.; Grigioni, G.M. 2008. Antioxidant consumption and development of oxidation during ageing of buffalo meat produced in Argentina. *Meat Sci.* 79: 582-588.
- Descalzo, A.M.; Rossetti, L.; Grigioni, G.; Irurueta, M.; Sancho, A.M.; Carrete, J.; Pensel, N.A. 2007. Antioxidant status and odour profile in fresh beef from pasture or grain-fed cattle. *Meat Sci.* 75: 299-307.
- Descalzo, A.M.; Insani, E.M.; Biolatto, A.; Sancho, A.M.; García, P.T.; Pensel, N.A.; Josifovich, J.A. 2005. Influence of pasture or grain-based diets supplemented with vitamin E on antioxidant/oxidative balance of Argentine beef. *Meat Sci.* 70: 35-44.
- De Vore, V.R.; Greene, B.E. 1982. Glutathione peroxidase in post-rigor bovine semitendinosus muscle. *J. Food Sci.* 47: 1406-1409.
- Dewhurst, R.J.; Scollan, N.D.; Lee, M.R.F.; Ougham, H.J.; Humphreys, M.O. 2003. Forage breeding and management to increase the beneficial fatty acid content of ruminant products. *Proc. Nutr. Soc.* 62: 329-336.
- Fernández, J.; Pérez-Álvarez, J.A.; Fernández-López, J.A. 1997. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chem.* 59: 345-353.
- Folch, J.; Lees, M.; Sloane-Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.
- Franco, J.; Bianchi, G.; Feed, O.; Garibotto, G.; Ballesteros, F.; Carrere, M.; Chiruchi, J. 2009. ¿Cuál es el beneficio de utilizar la estimulación eléctrica en canales, sobre la calidad de la carne vacuna?. *Revista C&A carnes y alimentos.* 30: 4-10.
- Gatellier, P.; Mercier, Y.; Juin, H.; Renerre, M. 2005. Effect of finishing mode (pasture- or mixed diet) on lipid composition, colour stability and lipid oxidation in meat from Charolais cattle. *Meat Sci.* 69: 175-186.
- Gatellier, P.; Mercier, Y.; Renerre, M. 2004. Effect of diet finishing mode (pasture or mixed diet) on antioxidant status of Charolais bovine meat. *Meat Sci.* 67: 385-394.

-
- Grandin, T. 1998. Review: Reducing handling stress improves both productivity and welfare. *PAS*, 14: 1-10.
- Gray, J.I.; Goma, E.A.; Buckley, D.J. 1996. Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Sci.* 43: 111-123.
- Günzler, A.; Flohé, L. 1985. Glutathione peroxidase. In R. A. Greenwald (Ed), *CRC handbook of methods for oxygen radical research*. 1: 285-290.
- Hernández, P.; Zomeño, L.; Ariño, B.; Blasco, A. 2004. Antioxidant, lipolytic and proteolytic enzyme activities in pork meat from different genotypes. *Meat Sci.* 66: 525-529.
- Ichihara, K.; Shibahara, A.; Yamamoto, K.; Nakayama, T. 1996. An improved method for rapid analysis of the fatty acids of glycerolipids. *Lipids*. 31(5): 535-539.
- Insani, E.M.; Eyherabide, A.; Grigioni, G.; Sancho, A.M.; Pensel, N.A.; Descalzo, A.M. 2008. Oxidative stability and its relationship with natural antioxidants during refrigerated display of beef produced in Argentina. *Meat Sci.* 79: 444-452.
- Lamare, M.; Taylor, R.G.; Farout, L.; Briand, Y.; Briand, M. 2002. Changes in proteasome activity during postmortem aging of bovine muscle. *Meat Sci.* 61: 199-204.
- Larraín, R.E.; Schaefer, D.M.; Richards, M.P.; Reed, J.D. 2008. Finishing steers with diets based on corn, high-tannin sorghum or a mix of both: color and lipid oxidation in beef. *Meat Sci.* 79: 656-665.
- Laughlin, M.H.; Simpson, T.; Sexton, W.L.; Brown, O.R.; Smith, J.K.; Korthuis, J. 1990. Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training. *J. Appl. Physiol.* 68: 2337-2343.
- Luciano, G.; Monahan, F.J.; Vasta, V.; Pennisi, P.; Bella, M.; Priolo, A. 2009. Lipid and colour stability of meat from lambs fed fresh herbage or concentrate. *Meat Sci.* 82: 193-199.

-
- Lynch, M.P.; Kerry, J.P.; Buckley, D.J.; Faustman, C.; Morrissey, P.A. 1999. Effect of dietary vitamin E supplementation on the colour and lipid stability of fresh, frozen and vacuum-packaged beef. *Meat Sci.* 52: 95-99.
- Lynch, S.M.; Frei, B. 1993. Mechanisms of copper- and iron-dependent oxidative modification of human low-density lipoprotein. *J. Lipid Res.* 34: 1745-1751.
- Marklund, S.; Marklund, G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47: 469-474.
- Matés, J.M.; Pérez-Gómez, C.; Núñez de Castro, I. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 32: 595-603.
- 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 Sci.* 66: 467-473.
- Mercier, Y.; Gatellier, P.; Viau, M.; Remignon, H. ; Renerre, M. 1998. Effect of dietary fat and vitamin E on colour stability and on lipid and protein oxidation in turkey meat during storage. *Meat Sci.* 48: 301-318.
- Monsón, F.; Sañudo, C.; Sierra, I. 2005. Influence of breed and ageing time on the sensory meat quality and consumer acceptability in intensively reared beef. *Meat Sci.* 71: 471-479.
- Montero, M. 2000. Análisis de la composición bioquímica y de posibles biomarcadores de contaminación en el erizo de mar, *Paracentrotus lividus*, Lmk. Tesis Doctoral. Santiago de Compostela, Argentina. Universidad de Santiago de Compostela. 59p.
- Morrissey, P.A.; Sheehy, P.J.A.; Galvin, K.; Kerry, J.P.; Buckley, D.J. 1998. Lipid stability in meat and meat products. *Meat Sci.* 49: 73-86.
- NCSS. 2007. 329 North 1000 East, Kaysville, UT 84037, USA.

-
- Orellana, C.; Peña, F.; García, A.; Perea, J.; Martos, J.; Domenech, V.; Acero, R. 2009. Carcass characteristics, fatty acid composition, and meat quality of criollo Argentino and Braford steers raised on forage in a semi-tropical region of Argentina. *Meat Sci.* 81: 57-64.
- Ouali, A.; Herrera-Mendez, C.H.; Coulis, G.; Becila, S.; Boudjellal, A.; Aubry, L.; Sentandreu, M.A. 2006. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Sci.* 74: 44-58.
- Pradhan, A.A.; Rhee, K.S.; Hernández, P. 2000. Stability of catalase and its potential role in lipid oxidation in meat. *Meat Sci.* 54: 385-390.
- Raes, K.; Balcaen, A.; Dirinck, P.; De Winne, A.; Claeys, E.; Demeyer, D.; De Smet, S. 2003. Meat quality, fatty acid composition and flavour analysis in Belgian retail beef. *Meat Sci.* 65: 1237-1246.
- Realini, C.E.; Duckett, S.K.; Brito, G.W.; Dalla Rizza, M.; De Mattos, D. 2004a. Effect of pasture vs concentrate feeding with or without antioxidants on carcass characteristics, fatty acid composition, and quality of Uruguayan beef. *Meat Sci.* 66: 567-577.
- Realini, C.E.; Duckett, S.K.; Windham, W.R. 2004b. Effect of vitamin C addition to ground beef from grass-fed or grain-fed sources on color and lipid stability, and prediction of fatty acid composition by near-infrared reflectance analysis. *Meat Sci.* 68: 35-43.
- Renerre, M.; Dumont, F.; Gatellier, P. 1996. Antioxidant enzyme activities in beef in relation to oxidation of lipid and myoglobin. *Meat Sci.* 43: 111-121.
- Rowe, L.J.; Maddock, K.R.; Lonergan, S.M.; Huff-Lonergan, E. (2004). Influence of early postmortem protein oxidation on beef quality. *J. Anim. Sci.* 82: 785-793.

-
- Santé-Lhoutellier, V.; Engel, E.; Aubry, L.; Gatellier, P. 2008. Effect of animal (lamb) diet and meat storage on myofibrillar protein oxidation and in vitro digestibility. *Meat Sci.* 79: 777-783.
- Seifried, H.E. 2003. The antioxidant conundrum in cancer. *Cancer Res.* 63: 4295-4298.
- Stahl, W. 2000. Lipid oxidation and antioxidants. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 3: 121-126.
- Stoscheck, C.M. 1990. Quantitation of Protein. *Method. Enzymol.* 182: 50-68.
- Tiidus, P.M.; Houston, M.E. 1994. Antioxidant and oxidative enzyme adaptations to vitamin E deprivation and training. *Med. Sci. Sports Exer.* 26: 354-359.
- Uruguay. Instituto Nacional de Carnes (INAC). Consultado diciembre 2008. Manual de Carnes Bovina y Ovina. 6-10p. Disponible en <http://www.inac.gub.uy>
- Uruguay. Instituto Nacional de Carnes (INAC). Consultado octubre 2009. Anuario estadístico 2008. 94-103p. Disponible en <http://www.inac.gub.uy>
- Uruguay. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). 2009. Consultado octubre 2009. Anuario estadístico agropecuario 2009. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy>
- Ventanas, S.; Estevez, M.; Tejada, 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 Sci.* 72: 647-655.
- Yancey, E.J.; Grobbel, J.P.; Dikeman, M.E.; Smith, J.S.; Hachmeister, K.A.; Chambers IV, E.C.; Gadgil, P.; Milliken, G.A.; Dressler, E.A. 2006. Effects of total iron, myoglobin, hemoglobin, and lipid oxidation of uncooked muscles on livery flavor development and volatiles of cooked beef steaks. *Meat Sci.* 73: 680-686.
- Zhang, W.G.; Lonergan, S.M.; Gardner, M.A.; Huff-Lonergan, E. 2006. Contribution of postmortem changes of integrin, desmin and μ -calpain to variation in water holding capacity of pork. *Meat Sci.* 74: 578-585.