UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Análise da qualidade de carne bovina por Ressonância Magnética Nuclear em baixa resolução

Cátia Crispilho Corrêa

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Química Analítica)

Orientador: Dr. Luiz Alberto Colnago

São Carlos – SP
2007

À minha mãe *Manoela,* ao meu pai *Luiz,* e aos meus irmãos, pelo apoio, carinho e compreensão.

Leandro, você foi um anjo que Deus colocou na minha vida. Muito obrigada pelo seu carinho, seu amor e seu apoio incondicional, mais uma vez obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Deus

Ao meu orientador Dr. Luiz Alberto Colnago, não só por sua contribuição profissional e científica nesta importante fase da minha vida, mas também por sua compreensão, paciência, amizade e por sua orientação sempre muito dedicada que serão lembradas sempre.

À Dr.ª Lucimara Aparecida Forato, que de uma forma ou de outra contribuiu para o meu crescimento profissional.

Aos meus amigos do grupo de RMN: Rosilene, Fabiana, Daniela, Cíntia, Lúcio, Lucinéia, Fayene, Tiago, André, Poliana, Glauber, pela amizade, convivência e ajuda mútua.

Ao pessoal da sala de pós-doutorado, pela amizade, pela ajuda e a convivência no dia-a-dia: Maria Alice, Marta e Douglas.

À Embrapa Instrumentação Agropecuária pela recepção, infra-estrutura e todas as facilidades oferecidas.

Aos pesquisadores da Embrapa Pecuária Sudeste, Dr. Geraldo Maria da Cruz e Dr. Rymer Tullio Ramiz, por fornecerem as amostras de carne bovina.

A todos os meus amigos que conquistei tanto na Embrapa, na USP e na UFSCar, e aos que ficaram na UEM.

À toda minha família e ao Leandro, pela presença, sempre muito importante na minha vida.

E a todos que esqueci de mencionar que de alguma forma estão presentes neste trabalho e na minha vida.

Muitíssimo obrigada!

RESUMO

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em baixo campo tem demonstrado ser um método rápido e confiável para se avaliar a qualidade da carne. A predição desta, especialmente a carne de porco, tem sido avaliada usando o tempo de relaxação transversal (T_2). As medidas foram feitas com a seqüência de pulsos CPMG (Carr-Purcell-Meibom-Gill) que correlaciona os parâmetros da qualidade da carne de suínos, tais como, a capacidade de retenção de água (CRA), o pH e perda de água por cocção (PPC), com tempo de relaxação T_2. Neste trabalho, analisou-se a qualidade da carne bovina pela seqüência de pulsos CPMG, que é dependente do tempo relaxação transversal (T_2), e pela técnica de precessão livre de onda continua (CWFP), que depende de T_2 e da relaxação longitudinal (T_1).

Foram analisadas amostras do contra-filé do tipo músculo– *longissimus lumborum,* retiradas da região da 12ª e da 6ª costela de bovinos, de três grupos genéticos de bovinos; adaptados ou não às condições tropicais, sendo dois deles de 3/4 e um de 9/16 de sangue europeu.

Os dados de CPMG foram analisados utilizando-se os processamentos de análise multiexponencial discreta, análise multiexponencial contínua, baseada na transformada inversa de Laplace (ILT) e com métodos quimiométricos como análises de componentes principais (PCA), análises de agrupamentos hierárquicos (HCA) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). Os dados de CWFP por serem mais complexos do que os do CPMG foram analisados principalmente por métodos quimiométricos. Conclui-se que não há diferença significativa entre o corte realizado na 12ª costela com o da 6ª costela e que a técnica CWFP é mais eficaz na separação entre o sexo e grupo genético dos animais, do que a técnica CPMG.

Abstract

Low resolution Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) is shown to be a fast and accurate method for evaluating meat quality. The prediction of meat quality, especially in pork, has been performed using transverse relaxation time (T_2). The measurements have been made with CPMG (Carr-Purcell-Meibom-Gill) pulse sequence which correlate the pork quality parameters such as water-hold-capacity (WHC), pH, and cooking loss (CL) with T_2. In this work, the beef quality has been analyzed evaluated by transverse relaxation time (T_2) measured by CPMG pulse sequence and by the T_2, and, longitudinal relaxation time (T_1), measured by CWFP (Continuous Wave Free Precession) technique

The samples were collected from *Longissimus lumborium* muscle, from the 12th and 6th ribs region. The animals from three genetic groups, (two were ¾ and one was 9/16 european) were used in the experiments.

The CPMG data were processed by multiexponential fitting, inverse Laplace transformation and chemometrics methods such as principal component analysis, hierarchic cluster analysis and partial least square regression. The CPMG data were not able to distinguish between the genetic group sex and the meat cut. The CWFP data analyzed by chemometrics methods show difference between Canchin males and females and between Canchin and Angus males. The results show almost no difference between the samples collected from the 12th and 6th rib.

Lista de Figuras

Figura 1.1: Representação vetorial da quantização do momento angular de spin.....3

Figura 1.2: Separação dos níveis de energia de um núcleo com spin ½ na presença de B_0.....6

Figura 1.3: Representação vetorial do movimento de precessão do momento magnético no campo magnético estático B_0.....8

Figura 1.4: Representação do cone de precessão.....9

Figura 1.5: Representação vetorial do momento magnético resultante M_0.....10

Figura 1.6: Efeito do pulso de rf na magnetização resultante, em um referencial rotativo.....11

Figura 1.7: Gráfico da taxa de relaxação, $1/T_1$ e $1/T_2$, para um experimento em 400MHz, versus tempo de correlação.....16

Figura 1.8: Seqüência de pulsos da técnica de CPMG, onde τ = tempo de espera entre os pulsos, e D = tempo de repetição da seqüência.....17

Figura 1.9: Representação vetorial do efeito da seqüência de pulsos do método de CPMG sobre o sinal de RMN.....18

Figura 1.10: Espectros de RMN-^{1}H no estado estacionário de óleo vegetal com T_1=138ms, T_2=53ms. Imã com T_2^*=0,5ms; ângulo de precessão $\psi=\omega T_p=(2n+1)\pi$, onde n é um número inteiro. T_r varia de A a H por respectivamente: 500,1; 108,3; 56,1; 29,1; 15,5; 2,7;0,9 e 0,3ms.....23

Figura 1.11: Seqüência de n pulsos com um tempo de espera T_r.....23

Figura 1.12: Representação do sinal do CWFP para amostra de ácido fosfórico (^{1}H) com T_1= 190ms e T_2= 140ms.....25

Figura 1.13: Representação da estrutura muscular macroscópica.....28

Figura 3.1: A) Cortes da carne Bovina . B) Subdivisão da meia carcaça indicando traseiro, dianteiro e ponta-agulha, bem como a 6ª e 12ª costelas do contra-filé.....39

Figura 3.2: Ilustra os cruzamentos analisados.....42

Figura 3.3: Circuito LC de uma sonda de radio-freqüência utilizada em experimentos de RMN.....45

Figura 3.4: Representação da matriz de dados de RMN para análise de PCA e HCA.....48

Figura 3.5: Representa a matriz de dados de RMN e a dos parâmetros físico-químicos para a análise de PLS.....49

Figura 4.1: Curvas do decaimento exponencial obtidas com a técnica CPMG para as amostras 67, 79 e 83.....51

Figura 4.2: Curva do decaimento exponencial com o sinal de CPMG da amostra 67; linha cheia é do sinal CPMG e ajuste linha tracejada com os ajustes monexponencial (A), biexponencial (B) e triexponencial (C);para a amostra 67.....52

Figura 4.3: Espectros dos tempos de relaxação T_2, para as amostras 67, 79 e 83 obtidos com o programa CONTIN $\alpha=0$ (A) e $\alpha= 1.10^{-3}$ (B).....55

Figura 4.4: Gráfico de escores dos dados de CPMG para todas as amostras da região da 12ª costela (△) e 6ª costela (●).....60

Figura 4.5: Gráficos de escores dos dados de CPMG de amostras de animais AXF (●); AXM (○); BXF (▲); BXM (△); CXF (■); CXM (□), para a 12ª (A) e 6ª (B) costela, respectivamente.....61

Figura 4.6: Gráficos de escores dos dados de CPMG de amostras de animais fêmeas (●) e machos (△) para a 12ª (A) e da 6ª (B) costela, respectivamente.....62

Figura 4.7: Gráficos de escores dos dados de CPMG de amostras de animais BX de fêmeas (●) e machos (△) para a 12ª (A) e da 6ª (B) costela, respectivamente.....63

Figura 4.8: Gráficos de escores dos dados de CPMG de amostras de animais machos do AX (●); BX (△) e CX (■) para a 12ª (A) e da 6ª (B) costela, respectivamente.....64

Figura 4.9: Gráficos de escores dos dados de CPMG de amostras de animais fêmeas do AX (●); BX (△) e CX (■) para a 12ª (A) e da 6ª (B) costela, respectivamente.....64

Figura 4.10: Espectro de CWFP de uma amostra de carne bovina.....65

Figura 4.11: Gráfico de escores dos dados de CWFP para todas as amostras da região da 12ª costela (△) e 6ª costela (●).....66

Figura 4.12: Gráficos de escores dos dados de CWFP de amostras de animais AXF (●); AXM (○); BXF (▲); BXM (△); CXF (■); CXM (□), para a 12ª (A) e 6ª (B) costela, respectivamente.....67

Figura 4.13: Gráficos de escores dos dados de CWFP de amostras de animais fêmeas (●) e machos (△) para a 12ª (A) e da 6ª (B) costela, respectivamente.....68

Figura 4.14: Gráficos dos escores dos dados de CWFP de amostras de animais CXF (●) e CXM (△), para a 12ª (A) e 6ª (B) costela, respectivamente.....69

Figura 4.15: Dendrograma dos dados de CWFP das amostras do grupo CXM e CXF para a 12ª costela (A) e 6ª costela (B).....70

Figura 4.16: Gráficos dos escores dos dados de CWFP de amostras de animais AXM (●) e CXM (□), para a 12ª (A) e 6ª (B) costela, respectivamente.....71

Figura 4.17: Análise de Componentes Principais. PC1 versus PC2 de fêmeas (●) e machos (△) das amostras da 12ª costela do grupo genético CX obtidas pelos métodos convencionais, gráfico de escores (A) e pesos (B).....72

Figura 4.18: Dendrograma dos parâmetros físico-químicos para as amostras do grupo CXM e F.....73

Figura 4.19: Gráfico de escores (A) e dendrograma (B) sem o EGAOL das amostras da 12ª costela do CX de fêmeas (●) e machos (△).....74

Figura 4.20: Gráfico de escores (A) e dendrograma (B) sem o CRA das amostras da 12ª costela do CX de fêmeas (●) e machos (△).....75

Figura 4.21: Gráfico de escores (A) e dos pesos (B) sem a gordura intramuscular extraída PC1 versus PC2 das amostras da 12ª costela do CX de fêmeas (●) e machos (△).....76

Figura 4.22: Dendrograma dos parâmetros físico-químicos sem a gordura intramuscular extraída para as amostras do grupo CXM e F.....77

Figura 4.23: Gráfico de escores (A) e dos pesos (B) sem o PPC PC1 versus PC2 das amostras da 12ª costela do CX de fêmeas (●) e machos (△).....78

Figura 4.24: Dendrograma dos parâmetros físico-químicos sem o PPC para as amostras do grupo CXM e F.....79

Figura 4.25: Gráfico de escores (A) e dos pesos (B) sem o pH PC1 versus PC2 das amostras da 12ª costela do CX de fêmeas (●) e machos (△).....80

Figura 4.26: Dendrograma dos parâmetros físico-químicos sem o pH para as amostras do grupo CXM e F.....81

Figura 4.27: Gráficos de colunas com os coeficientes de correlação da PPC, pH, gordura intramuscular extraída, EGAOL e CRA obtidos através do PLS. A) machos e fêmeas; B) machos e C) fêmeas.....85

Figura 4.28: Mostra os valores médios de T_2 de cada grupo genético da 6ª e 12ª costela com os dados de CPMG.....86

Figura 4.29: Mostra a razão entre M_z / M_0 da 6ª e 12ª costelas com os dados de CWFP.....87

Figura 4.30: Gráfico de escores entre as médias das amostras que possuem o mesmo grupo genético da 12ª e da 6ª costela com os dados de CPMG.....88

Figura 4.31: Dendrograma entre as médias das amostras que possuem o mesmo grupo genético da 12ª e da 6ª costela com os dados de CPMG.....89

Figura 4.32: Gráfico de escores entre as médias das amostras que possuem o mesmo grupo genético da 12ª e da 6ª costela com os dados de CWFP.....90

Figura 4.33: Dendrograma entre as médias das amostras que possuem o mesmo grupo genético da 12ª e da 6ª costela com os dados de CWFP.....91

Lista de Tabelas

Tabela 3.1: Relação entre cada grupo genético formado nos cruzamentos com o total de animais abatidos desses grupos.....41

Tabela 4.1: Os valores de T_2 e áreas para os ajustes monoexponencial e biexponencial para as amostras 67, 79 e 83.....53

Tabela 4.2: Valores de T_2 e das áreas encontrados com o ajuste triexponencial, para as amostras 67, 79 e 83.....54

Tabela 4.3:Valores de T_2 e das áreas encontrados para os valores de $\alpha = 0$ e $\alpha = 1.10^{-3}$ das amostras 67, 79 e 83.....56

Tabela 4.4: Análise realizada com a utilização dos parâmetros medidos por métodos convencionais e os resultados obtidos.....82

Tabela 4.5: Valores dos parâmetros físico-químicos para as amostras da 12ª costela do grupo CX, e os valores das médias e desvios padrões de cada parâmetro.....83

Lista de Abreviaturas e Siglas

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

r.f. – radiofreqüência

FID - Free Induction Decay

CP – Carr Purcell

CPMG - Carr-Purcell-Meibom-Gill

CWFP - Continuous Wave Free Precession

SSFP - Steady State Free Precession

NIR - Região do Infravermelho Próximo

CRA – Capacidade de Retenção de Água

PPC – Perda de Água por Cocção

ILT – Transformada Inversa de Laplace

DSC - Calorimetria Diferencial Exploratória

PLS - Regressão por Mínimos Quadrados Parciais

PSE - Carne pálida, flácida e exsudativa

DFD – Carne escura, firme e seca

CLSM - Microscopia de Varredura Confocal por Laser

AX - animais cruzados filhos de touros da raça Angus

BX - animais cruzados filhos de touros da raça Bonsmara

CX - animais cruzados filhos de touros da raça Canchim

TA - animais filhos de vacas cruzadas ½ Angus x ½ Nelore

TS - animais filhos de vacas cruzadas ½ Simental x ½ Nelore

M - animais machos

F - animais fêmeas

EAGOL – Capa de gordura externa

PB – Proteína Bruta

NDT - Nutrientes Digestíveis Totais

PCA – Análises de Componentes Principais

HCA - Análises de Agrupamentos Hierárquicos

Lista de Símbolos

I - número quântico de spin

m_I - número quântico direcional

h - constante de Planck ($6{,}626\times10^{-34}$ J.s)

μ – momento magnético nuclear

γ - constante magnetogírica

p - momento angular de spin

ΔE – diferença de energia

n - números inteiros e positivos

ν - freqüência da radiação aplicada (Hz).

B_0 – campo magnético estático

θ - ângulo entre μ e B_0

$U(\theta)_\alpha$ – estado de menor energia

$U(\theta)_\beta$ – estado de maior energia.

$N\alpha$ - população no nível de menor energia

$N\beta$ - população no nível de maior energia

k - constante de Boltzmann ($1{,}3806\times10^{-23}$J.K^{-1})

T - temperatura (K).

α - estado de menor energia

β – estado de menor energia

M_0 – magnetização resultante

A_0 - momento angular de spin total

B_1 – campo magnético oscilante

ϖ_0 – freqüência angular

Θ= ângulo rotação da magnetização

t_p= tempo de duração do pulso de r.f.

M_{xy} – magnetização projetada no plano xy do sistema de referencial rotativo

M_z – magnetização no estado estacionário

T_1 – constante de tempo de relaxação longitudinal

T_2 – constante de tempo de relaxação transversal

τ – intervalo entre os pulsos

I_0 - intensidade do sinal

T_r – tempo de repetição

ΔB_0 - não homogeneidade do campo magnético

T_2^* - constante de tempo de relaxação sob efeito da não homogeneidade

τ_c – tempo de correlação

D - tempo de repetição da seqüência

S/R – razão sinal/ruído

T_p – tempo do pulso

ψ - ângulo de offset ou defasagem

a.t. – tempo de aquisição

dt – dwell time

Índice

1. INTRODUÇÃO.....1

1.1. Fundamentos da Ressonância Magnética Nuclear.....2
1.1.1. Relaxação Longitudinal.....12
1.1.2. Relaxação Transversal.....14
1.1.3. Ressonância Magnética Nuclear em baixo campo.....19
1.1.4. Precessão livre em onda contínua (CWFP).....21
1.2. Carne Bovina.....25
1.2.1. Conversão de músculo em carne.....27
1.3. Aplicações de RMN em baixa resolução na avaliação de carne.....30

2.OBJETIVOS.....38

3.MATERIAS E MÉTODOS.....39

3.1 Amostras.....39
3.2 Métodos de análises da carne bovina.....42
3.3 Análise por RMN.....45
3.3.1 Determinação de T_2 utilizando o método CPMG.....46
3.3.2.Determinação simultânea de T_1 e T_2 utilizando o método CWFP.....46
3.4 Programas utilizados para os ajustes monexponencial, biexponencial, triexponencial e para a Transformada Inversa de Laplace (ILT).....47
3.5 Análise quimiométrica.....47

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....50

4.1. Análise multiexponencial dos dados de CPMG.....50
4.2. Análises Quimiométricas.....57
4.2.1 Análise dos dados de CPMG por Quimiometria.....59
4.2.2 Analise dos dados de CWFP por Quimiometria.....65
4.2.2.1 Análise dos fatores de separação do grupo CXM e CXF.....71
4.2.2.1.1 PCA dos dados físico-químicos da 12ª costela para CXM e CXF.....71
4.2.2.1.2 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).....82
4.3 Análise dos valores médios dos dados para os grupos genéticos.....86

5. CONCLUSÕES.....92

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....94

1. INTRODUÇÃO

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das mais importantes técnicas analíticas, aplicada a praticamente todos os tipos de amostras desde gases, sólidos amorfos e cristalinos, líquidos, soluções, géis, emulsões e até mesmo *in vivo*. Quando comparada a outras técnicas analíticas, a RMN é certamente a técnica com maior número de aplicações, usada desde a determinação de estrutura tridimensional de proteínas, em solução, com milhares de átomos até, por exemplo, a quantificação do teor de hidrogênio de combustíveis. [1,2]

O fenômeno da RMN foi observado pela primeira vez por volta de 1945 por dois grupos de cientistas: um liderado pelo físico Felix Bloch (1905-1983), na Universidade de Stanford, e outro pelo físico Edward Purcell (1912-1997), na Universidade de Harvard. Eles estavam pesquisando métodos para medir o momento magnético nuclear com maior precisão e observaram os sinais de RMN da água e de parafina, respectivamente. De forma simultânea e independente, eles acabaram propondo dois métodos de RMN, um deles baseado na radiofreqüência contínua e outro na radiofreqüência pulsada, pelos quais receberam o Prêmio Nobel de Física de 1952.[3,4]

Desde a sua introdução a RMN desenvolveu-se de forma rápida e contínua, com aplicações não apenas nas áreas de química e na física, como também na medicina, biologia, agricultura, alimentos, entre outras[4]. Devido a essas novas aplicações outros pesquisadores receberam o Prêmio Nobel, como o químico Richard Ernest, Prêmio Nobel de Química de 1991, pelo desenvolvimento da técnica de pulso e RMN multidimensional; o químico Kurt Wuthrich, Prêmio Nobel de Química de 2002, pelo desenvolvimento da metodologia de determinação de estrutura de proteínas em solução por RMN; e o químico Paul Lauterbur e o físico Peter Mansfield, Prêmio Nobel de Medicina de 2003, pela descoberta da técnica de tomografia por RMN. [4]

1.1. Fundamentos da Ressonância Magnética Nuclear

Alguns núcleos atômicos possuem a propriedade de se comportarem como pequenos dipolos magnéticos, ou seja, pequenos ímãs. O módulo desses dipolos é cerca de mil vezes menores do que os dipolos associados aos elétrons. Por ele ser tão pequeno, o magnetismo do núcleo não contribui de forma mensurável para as propriedades magnéticas dos sólidos, porém sem essa propriedade não se observa o fenômeno RMN. [3]

Esse dipolo origina-se do movimento de rotação dos núcleos carregados, movimento esse conhecido como spin nuclear e expresso em termos de um número quântico chamado de número quântico de spin (I). Esse número quântico pode assumir o valor de zero, semi-inteiro ou inteiro. Porém, a RMN é somente observada em núcleos que contém I total diferente de zero, portanto, em isótopos que apresentam número ímpar de prótons e/ou nêutrons. O momento

angular de spin é uma grandeza vetorial quantizada. Isto quer dizer que o vetor momento não pode assumir qualquer módulo, direção e sentido. A teoria da mecânica quântica diz que, uma vez definida uma direção z, segundo um sistema de coordenadas cartesianas previamente estabelecido, o momento em questão pode assumir as seguintes direções. [3,5]

$$a_Z = \frac{m_I h}{2\pi} \qquad (1)$$

Onde:

m_I = número quântico direcional (-I, -I+1, ..., +I)

h = constante de Planck

A figura 1.1 ilustra vetorialmente a quantização do momento angular de spin para o caso do isótopo ^1H (I=1/2), que de acordo com a equação (1) possui apenas duas direções, uma vez que para o valor de I=1/2 têm-se m_I= -1/2 ou +1/2.

Os possíveis níveis de energia que um núcleo magnético pode assumir são dados pela relação 2I+1.

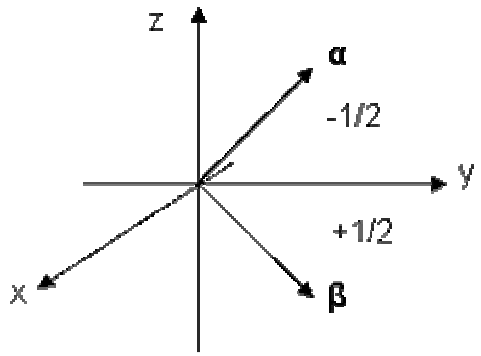

Figura 1.1: Representação vetorial da quantização do momento angular de spin.[3]

O dipolo que surge devido ao movimento de spin nuclear, é denominado momento magnético nuclear μ. Esse momento é proporcional ao momento angular de spin (a) e obedece à seguinte relação:

$$\mu = \gamma p \qquad (2)$$

Onde:

γ.= constante magnetogírica

p = momento angular de spin.

A constante magnetogírica é uma característica de cada isótopo. Quanto maior for o valor de γ maior será μ e assim também maior a interação desse vetor com o campo magnético oscilante aplicado, com isso há um aumento na sensibilidade[3,5].

A espectroscopia por RMN, como toda forma de espectroscopia, baseia-se na interação de radiação eletromagnética com a matéria. A energia da radiação eletromagnética é quantizada (equação 3), ou seja ela não é contínua, mas somente existindo somente em pequenos pacotes discretos, chamados fótons.

$$\Delta E = nh\nu \qquad (3)$$

Onde:

n = 1, 2, 3, ..., n (números inteiros e positivos)

h = constante de Planck ($6{,}626\times10^{-34}$ J.s)

ν = freqüência da radiação aplicada (Hz).

Uma das peculiaridades da RMN é que a absorção de energia só ocorre na presença de um campo magnético externo [3]. Assim, a amostra a ser estudada por RMN deve ser colocada em um campo magnético estático chamado de campo magnético externo ou simplesmente B_0. Esse campo tem a finalidade de separar os estados energéticos dos spins, que são degenerados, ou seja, possuíam a mesma energia na ausência de B_0. Esse efeito de separação dos níveis quando aplicado um campo magnético chama-se efeito Zeeman. O número de possíveis estados obtidos com a aplicação do campo B_0 é 2I+1, e sua energia (U) é dada por:

$$U(\theta) = -\mu \cdot B_0 = -\mu B_0 \cos(\theta) \qquad (4)$$

Onde:

μ = momento magnético nuclear

B_0 = campo magnético estático

θ= ângulo entre μ e B_0.

Combinando-se as equações (1), (2) e (4) e considerando-se a direção z para o campo magnético externo B_0, define-se a energia correspondente a cada nível de energia, da seguinte forma:

$$U(\theta) = -\gamma a_Z B_0 = -\frac{\gamma m_I h B_0}{2\pi} \qquad (5)$$

Então para m_I=-1/2 e +1/2, tem-se:

$$U(\theta)_\alpha = -\frac{\gamma h B_0}{2\pi} \qquad (6)$$

$$U(\theta)_\beta = +\frac{\gamma h B_0}{2\pi} \qquad (7)$$

Onde:

$U(\theta)_\alpha$ = estado de menor energia

$U(\theta)_\beta$ = estado de maior energia.

Pode-se definir a diferença, ou variação de energia entre esses dois níveis, subseqüentes, da seguinte maneira:

$$\Delta E = E_\beta - E_\alpha = \frac{\gamma h B_0}{2\pi} \qquad (8)$$

A figura 1.2 ilustra os dois níveis de energia para o isótopo ^1H, seus valores e respectiva diferença.

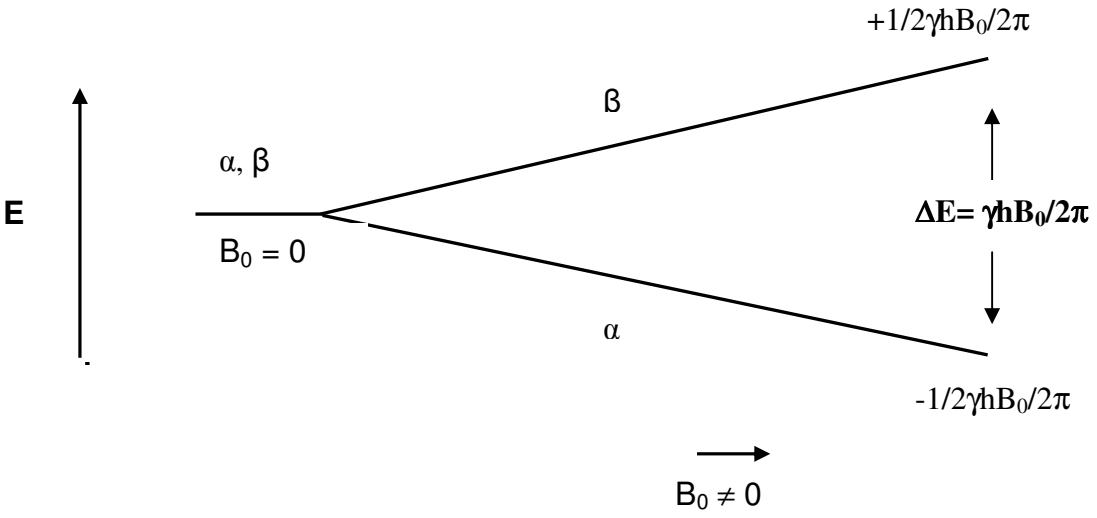

Figura 1.2: Separação dos níveis de energia de um núcleo com spin ½ na presença de B_0[3].

Igualando a equação (8) com a (3), obtém-se a seguinte equação:

$$\nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi} = \varpi_0 = \gamma B_0 \qquad (9)$$

Esta é a equação fundamental da RMN, por definir a freqüência de ressonância do núcleo estudado em relação ao campo magnético externo aplicado.

Analisando a equação (9) pode-se observar que com as constantes magnetogíricas da ordem de 10^7 a 10^8 rad.T^{-1}.s^{-1} e com B_0 da ordem de 0,1 a 12T, a espectroscopia por RMN usa radiação eletromagnética situada na região da rádio-freqüência [3].

O fenômeno de RMN também pode ser explicado classicamente. Neste caso ao se colocar uma amostra em um campo magnético estático o momento magnético nuclear adquire um movimento de precessão em torno de B_0 e esse movimento é análogo ao movimento de um pião ao redor do campo gravitacional da terra. A precessão vem de um torque entre a interação do momento magnético nuclear e B_0 e esse torque é dado por. [3,7]

$$\tau = \mu \times B_0 = \mu B_0 sen(\theta) \qquad (10)$$

Onde:

θ = ângulo entre μ e B_0.

A figura 1.3 ilustra vetorialmente o movimento de precessão adquirido pelo núcleo sob a ação de B_0 A freqüência de precessão é proporcional ao campo magnético B_0 e à razão magnetogírica de acordo com a equação 9.

A condição de ressonância é atingida quando se aplica uma radiação eletromagnética com freqüência igual à freqüência de precessão ou de Larmor, tornando possível a transições dos spins nucleares entre os níveis α e β.

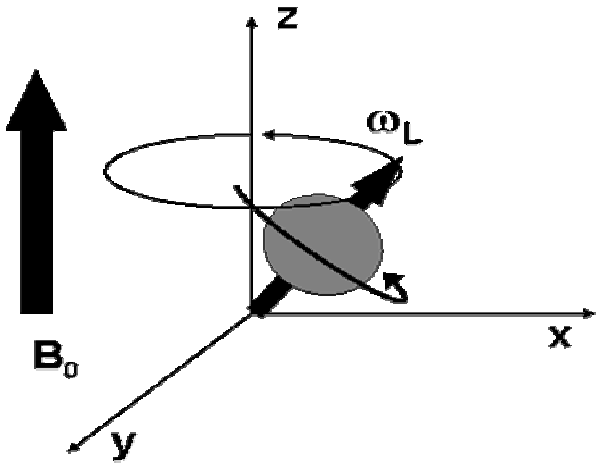

Figura 1.3: Representação vetorial do movimento de precessão do momento magnético no campo magnético estático B_0.

A distribuição da população de spins em cada nível de energia é dada pela equação de Boltzmann:

$$N\alpha/N\beta = \exp(\Delta E/kT) \qquad (11)$$

Onde:

$N\alpha$= população no nível de menor energia

$N\beta$= população no nível de maior energia

k= constante de Boltzmann ($1{,}3806\times10^{-23} J.K^{-1}$)

T= temperatura (K).

Esta equação demonstra que nas condições ambientais haverá sempre um pequeno excesso de população no estado de menor energia α. Dessa diferença de população surge então uma resultante dos momentos magnéticos μ_z na direção de B_0, chamada de magnetização resultante M_0. Vetorialmente, isso significa que todos os vetores dos momentos magnéticos nucleares da amostra estão

agrupados em um único referencial cartesiano, de modo a se obter a referida magnetização resultante. [3,5,7]

Devido ao movimento de precessão, todos os momentos magnéticos individuais estão alinhados com a direção z de B_0 por um ângulo de 54° 44'. Todos estes vetores de momento magnético, precessionando aleatoriamente e com a mesma freqüência em torno do eixo z, formam um cone chamado cone de precessão, ilustrado na figura 1.4.

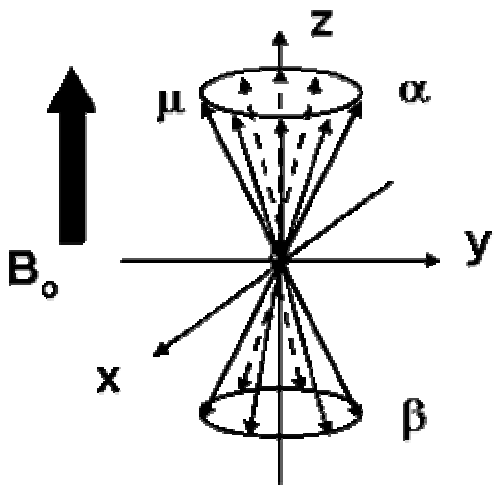

Figura 1.4: Representação do cone de precessão.

No eixo z há uma resultante apontando na direção de α pois este possui menor energia e conseqüentemente maior população de spins nucleares. No plano xy o vetor resultante é nulo devido ao movimento aleatório de precessão dos spins. [3]

A figura 1.5 ilustra vetorialmente o momento magnético resultante M_0, que é a soma de todos os vetores do momento magnético nuclear da amostra (equação 12).

$$M_0 = \sum \mu = \gamma A_0 \qquad (12)$$

Onde:

A_0 = momento angular de spin total.

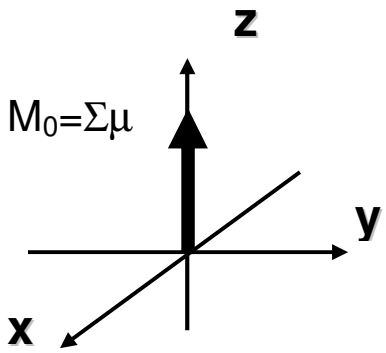

Figura 1.5: Representação vetorial do momento magnético resultante M_0.

Quando se aplica um campo magnético B_1 perpendicularmente a B_0, modulado sob a forma de pulsos e com uma freqüência igual à de Larmor, altera-se a distribuição de população de Boltzman, promovendo simultaneamente transições entre os níveis α e β conseqüentemente modificando o módulo da magnetização resultante.

Uma forma vetorial de se visualizar o efeito do pulso sobre a magnetização é o uso do sistema de coordenadas rotativo.[3,5,7] Nesse modelo, considera-se que o plano xy gira ao redor do eixo z, direção de B_0, com uma freqüência angular ϖ_0, conforme mostra a figura 1.6. As direções x e y neste sistema de coordenadas são denominadas x'y'. Neste modelo, durante o pulso de rf, a precessão dos momentos magnéticos individuais ao redor de B_0 desaparece. Dessa forma, durante o pulso somente existirá precessão da magnetização em torno do campo de rf, B_1.

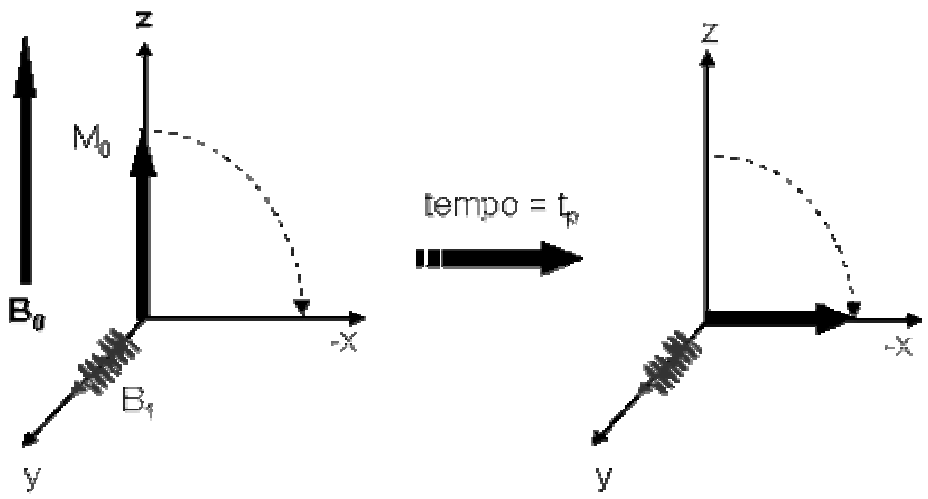

Figura 1.6: Efeito do pulso de rf na magnetização resultante, em um referencial rotativo[3].

Com a escolha da duração do pulso, pode-se deslocar a magnetização M_0 de um ângulo qualquer, tal que:

$$\Theta = \gamma B_1 t_p \qquad (13)$$

Onde:

Θ= ângulo rotação da magnetização

t_p= tempo de duração do pulso de r.f.

Esse pulso aplicado perpendicularmente a B_0, exerce um torque sobre M_0 capaz de rotacioná-la em um ângulo (Θ) qualquer, gerando uma componente transversal no plano xy denominada M_{xy} (figura 1.6).

Após o pulso os spins voltam a precessionar em torno de B_0, e a componente M_{xy} induz uma corrente elétrica na bobina receptora, que é o sinal de RMN. Esse sinal é conhecido como FID (do inglês: ("*free induction decay*"), cuja intensidade, freqüências e tempo de decaimentos podem ser usados nas análises

físico-químicas da amostra. Por exemplo, a intensidade do FID pode ser usada para medir a quantidade de água em um tecido biológico[3,7].

Após o pulso, o fenômeno de relaxação passa a atuar no sistema de forma a promover o retorno à condição inicial de equilíbrio, caracterizada por $M_z = M_0$ e $M_{xy} = 0$. O processo de relaxação envolve dois mecanismos distintos, denominados relaxação longitudinal (T_1) e relaxação transversal (T_2)[8].

1.1.1. Relaxação Longitudinal

O tempo de relaxação longitudinal é caracterizado por um decaimento exponencial, com constante de tempo T_1, que descreve o retorno da magnetização ao eixo z (M_z), ou seja, tornando $M_z = M_0$. Esse processo está relacionado ao restabelecimento do equilíbrio térmico e da distribuição de população dos níveis Zeeman, envolvendo transferência do excesso de energia potencial magnética do estado excitado para a vizinhança ou rede, sob a forma de energia cinética molecular[3,5,6].

Essa transferência não é um fenômeno de emissão espontânea. A energia é dissipada na rede (ambiente local) através dos campos magnéticos, oscilantes com freqüências em torno da freqüência de Larmor. Esse processo de transferência é conhecido como relaxação spin-rede ou relaxação longitudinal e é responsável pela recuperação exponencial do módulo da magnetização ao longo do eixo z, que transcorre no tempo com uma constante de velocidade $1/T_1$, é dada pela equação14 [3]:

$$M_z(t)= M_0[1 - \exp(-t/T_1)] \qquad (14)$$

Onde:

T_1= tempo de relaxação spin-rede.

O tempo de relaxação T_1 tem um efeito prático marcante. Se for longo, o tempo total de uma análise de RMN se estende muito, uma vez que cada seqüência de pulsos deverá ser precedida por um tempo da ordem de $5T_1$ para que a magnetização retorne 99,33% de sua intensidade no equilíbrio térmico, evitando a saturação do sinal[1,7].

A técnica mais empregada para medir T_1 é a seqüência de inversão-recuperação, que consiste de um de 180º, para inverter a magnetização, um tempo τ. para que ocorra a relaxação e um pulso de 90º para medir a intensidade da magnetização, representada pelo esquema, $180^{o}.\tau_ 90^{o}$.

A recuperação da magnetização depende de T_1 e τ, podendo ser explicitada, em função da intensidade do sinal, da seguinte forma:

$$I(\tau) = I_0 [1 - 2\exp(-\tau/T_1)] \qquad (15)$$

Onde:

I_0= intensidade do sinal para $T_r \geq 5T_1$.

As medidas da intensidade do sinal são ajustadas sob a forma de um gráfico semilogarítmico de $\ln[I_0 - I(\tau)]$ versus as variações de τ, definindo uma reta cuja inclinação é $-1/T_1$[3].

1.1.2. Relaxação Transversal

Ao contrário do que ocorre no processo de relaxação longitudinal, o desaparecimento do sinal no plano xy, $M_x=M_y=0$, independe da transferência de energia para a vizinhança. Para que suas componentes no plano xy se anulem basta que percam a coerência de fase, inicialmente criada por B_1. Essa perda de coerência é devido às interações diretas entre os momentos magnéticos individuais, sem haver modificação na energia do sistema. Esse processo é conhecido como relaxação spin-spin ou relaxação transversal[5,8].

A relaxação transversal provoca um decaimento exponencial da magnetização, com uma constante de tempo dada por T_2. (equação16):

$$M_y(t) = M_{xy} \cos \omega_0 t \exp(-t/T_2) \qquad (16)$$

Onde:

T_2= tempo de relaxação spin-spin

M_{xy}= componente da magnetização do plano x'y'.

Em termos práticos, o decaimento da magnetização transversal observado num FID não retrata somente o tempo de relaxação spin-spin T_2. A não-homogeneidade do campo magnético, ΔB_0, também faz com que as componentes transversais da magnetização se dispersem no plano xy. Dessa forma, a constante de tempo com a qual o FID decai é na verdade representada por um tempo de relaxação efetivo T_2^*, tal que:

$$1/T_2^* = 1/T_2 + \gamma \Delta B_0 \qquad (17)$$

Uma vez que a diminuição de T_2* contribui para que o sinal de RMN decaia mais rapidamente, alargando as linhas do espectro no domínio da freqüência, buscam-se campos magnéticos cada vez mais homogêneos, nos quais T_2* se aproxima do valor de T_2.

A figura 1.7 [8] mostra um gráfico em que se observa a influência do tempo de correlação, τ_c, tempo que a molécula leva para dar uma volta completa em torno do seu próprio eixo, nos tempos de relaxação T_1 e T_2. Observa-se nessa figura que a taxa de relaxação longitudinal atinge um máximo quando $\tau_c \approx 1/\omega_0$, ou seja, a freqüência do campo magnético flutuante, provocado pela rotação da molécula, equivale-se a freqüência de Larmor, fazendo o sistema relaxar rapidamente no sentido longitudinal. Fora dessa condição, a relaxação longitudinal tende a ser menos eficiente. A relaxação transversal, ao contrário da longitudinal, não apresenta um valor máximo de relaxação quando $\tau_c \approx 1/\omega_0$. Ela é maior em moléculas com alta mobilidade e decresce com a redução da mobilidade molecular. Isso justifica porque, na maioria das amostras líquidas ou em solução, o T_1 é aproximadamente igual a T_2, enquanto que nos sólidos T_1 é bem superior a T_2.

Como demonstrado pela equação 17 a não-homogeneidade do campo B_0 (ΔB_0) causa uma perda de coerência de fase mais rápida do que a do T_2 natural da amostra. Para anular o efeito da não-homogeneidade do campo B_0, no decaimento do sinal do FID, Hahn[9] propôs o uso de seqüências de pulsos, hoje denominadas, ecos de Hahn.

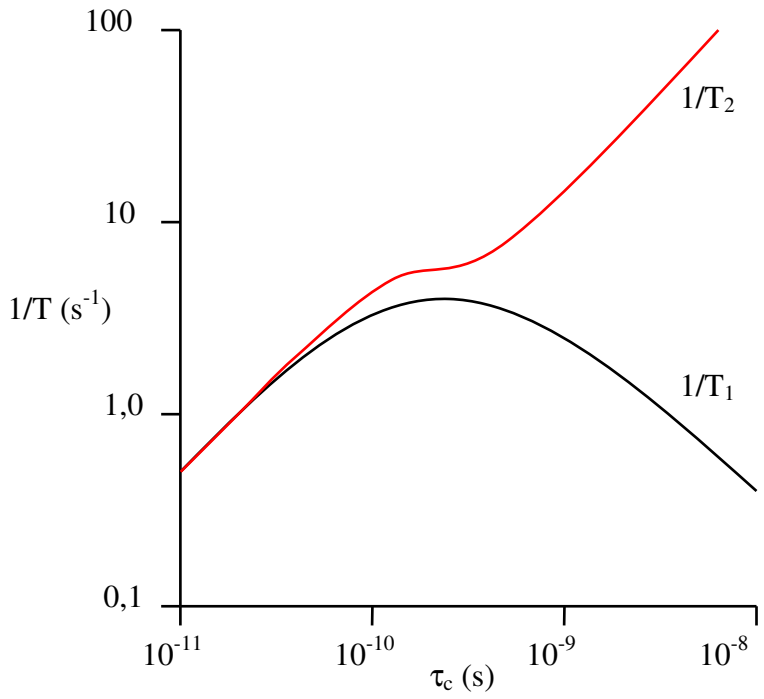

Figura 1.7: Gráfico da taxa de relaxação, $1/T_1$ e $1/T_2$, para um experimento em 400MHz, versus tempo de correlação[8].

A técnica de eco proposta por Hahn consiste de dois pulsos de 90 graus, separados por um tempo τ (90° _.τ_ 90°- eco). Esta técnica praticamente não teve grande aplicação prática, pois logo Carr e Purcell introduziram uma seqüência com o segundo pulso de 180 graus, a qual gera o dobro da intensidade do sinal da seqüência com somente pulsos de 90 graus. Carr e Purcell[3] também propuseram uma seqüência com um trem de pulsos de 180 graus, denominada CP, descrita abaixo: $90°_{x'}$ - τ - [$180°_{x'}$ - τ - (eco) - τ -] n

Essa nova seqüência permitiu que todo o decaimento do sinal de RMN fosse coletado em apenas um experimento, reduzindo o tempo de medida de T_2. Esse método também permitiu o uso de valores pequenos de τ eliminando o efeito de difusão da amostra, durante o tempo 2τ de formação do eco[3].

Posteriormente, Meibom e Gill modificaram a técnica de Carr-Purcell, aplicando pulsos de 180° na direção +y' (coordenada do referencial rotativo), isto é, com uma diferença de fase de π/2 em relação ao pulso de 90° inicial. Esse novo método diminuiu o efeito da imprecisão dos pulsos da seqüência de Carr-Purcell e permitiu focalizar todos os ecos em uma mesma fase, originando o método como o nome dos quatro autores, Carr-Purcell-Meibom-Gill (CPMG) [3], que é o método padrão de medida de T_2.

A seqüência CPMG (figura 1.8) consiste de um pulso de 90 graus em x' seguido de um trem de pulsos de 180 graus em y' separados por um tempo τ. A intensidade do sinal do RMN da seqüência CPMG (eco), em função de τ, decai exponencialmente, com uma constante de tempo T_2.

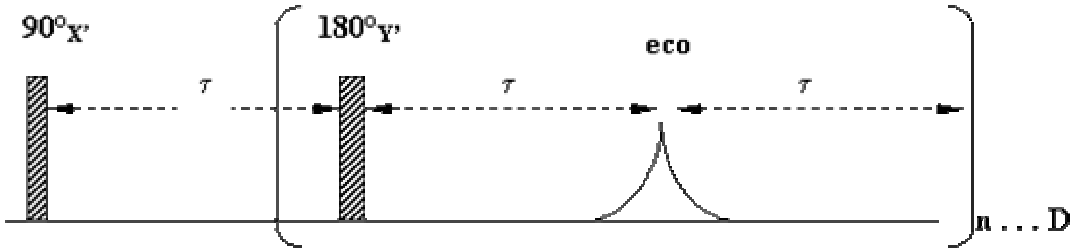

Figura 1.8: Seqüência de pulsos da técnica de CPMG, onde τ = tempo de espera entre os pulsos, e D = tempo de repetição da seqüência.

A Figura1.9 demonstra a técnica de CPMG, onde um pulso de 90° é aplicado em x' no instante zero (A), causando a rotação dos spins para o plano x'y' (B). Ao longo do tempo τ, os spins se separam (C), então pulso de 180° é aplicado em y' (D), ocorrendo a refocagem para o tempo 2τ no eixo y' (E). Após o defasamento seguinte (F), o segundo pulso de 180°, aplicado em y', rotaciona os spins para o plano x'y' (G) onde ocorre a refocagem para t = 4τ (H). Essa

refocalização causada pelos pulsos de 180 graus permite que todo o sinal seja coletado em um único experimento.

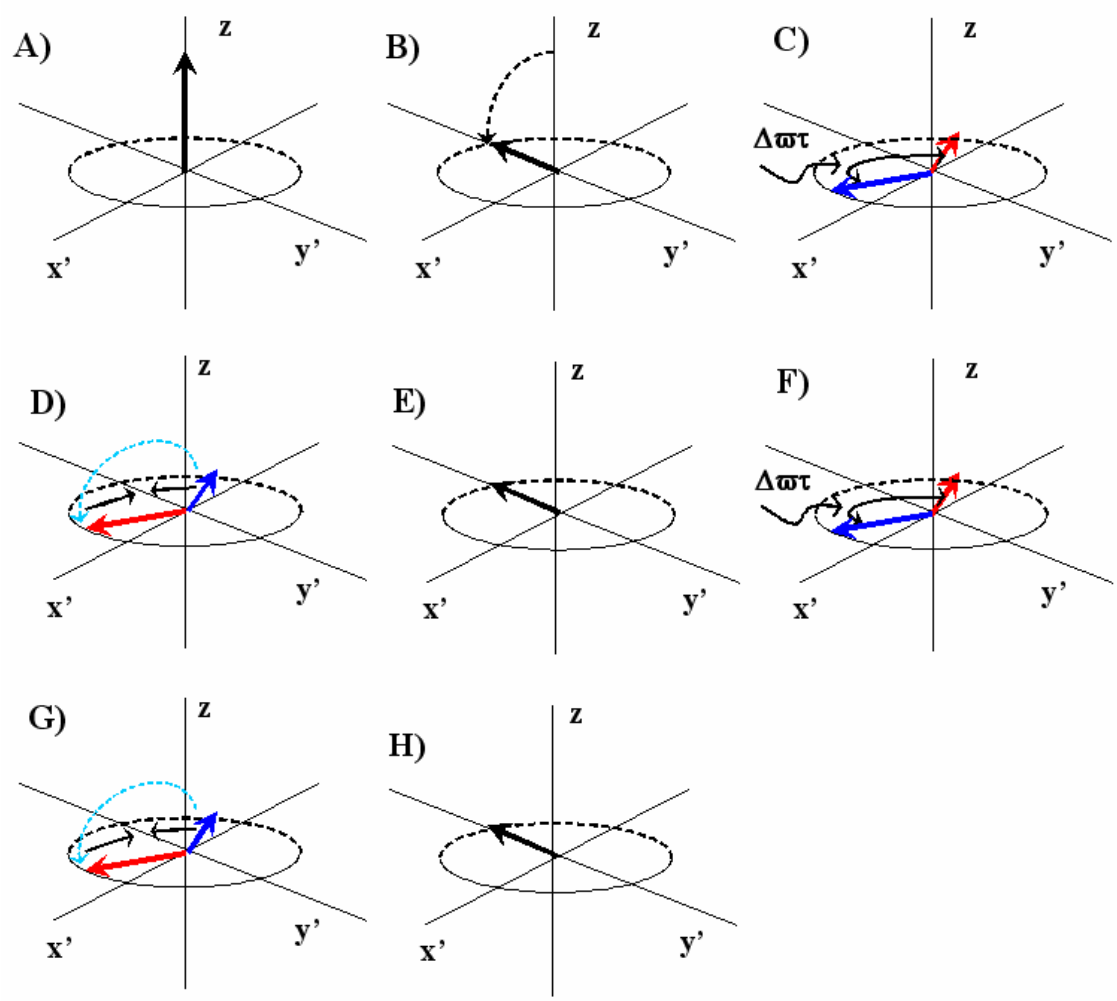

Figura 1.9: Representação vetorial do efeito da seqüência de pulsos do método de CPMG sobre o sinal de RMN

Como a intensidade do eco (I_{eco}) depende de τ e T_2, pode-se medir T_2 a partir do estudo do eco no tempo $t=k\tau$, com k = 1, 2, ..., n, em função de t utilizando a seguinte equação:

$$I_{eco}(k\tau) \propto \exp(-t/T_2) \qquad (18)$$

A partir de um ajuste da curva exponencial dada pela equação acima ou através de um gráfico semilogarítmico da intensidade do eco em função de t, obtém-seT_2.[3]

1.1.3. Ressonância Magnética Nuclear em baixo campo

A maioria dos experimentos de RMN usam espectrômetros de alto campo magnético (B_0) de 5 a 20 Teslas (freqüência de ressonância de 200 a 800 MHZ para ^1H), baseados em ímãs supercondutores. Esses aparelhos apresentam espectros em alta resolução, com grande separação entre os sinais, cujas posições e intensidades são usadas na análise espectral.

Uma outra categoria de aparelhos de RMN, de baixa resolução, está sendo gradualmente inserida nos laboratórios de pesquisa, desenvolvimento e controle de qualidade. Esses equipamentos são de baixo campo (<2.1T (85MHz para ^1H)), são também denominados de espectrômetro de baixo campo, baixa resolução ou espectrômetros de bancada [1,2,10-16].

Nesses aparelhos o deslocamento químico praticamente não é observado e as medidas são baseadas principalmente nas diferenças de tempo de relaxação T_1 e T_2 dos vários componentes das amostras. Por isso a maioria das medidas são realizadas com os sinais no domínio do tempo, na forma de FID ou eco, sem a necessidade da transformada de Fourier

Devido à baixa sensibilidade dos espectrômetros de baixo campo, os mesmos são utilizados na análise de substâncias químicas com isótopos de alta abundância natural e grande constante magnetogírica, tais como o ^1H e o F^{19}.

Apesar das limitações de sensibilidade e resolução, esses equipamentos têm importantes aplicações em diversas áreas da ciência [10-16].

As aplicações da RMN em baixo campo podem ser em: indústria de polímeros (grau de polimerização do poliestireno, densidade de ligações cruzadas em borrachas); indústria alimentícia (capacidade de retenção de água em carnes, avaliação do paladar e textura de alimentos); engenharia de materiais (temperatura de transição vítrea, porosidade em concretos); medicina (análise e diagnóstico de tecidos cancerosos, análise de plasma sanguíneo), indústria de petróleo entre outras aplicações.

A intensidade do sinal de RMN em baixo campo é empregada principalmente em análises quantitativas de um dos componentes de uma amostra heterogênea. Como a análise de RMN não é absoluta, as quantificações se baseiam na correlação linear entre a intensidade do sinal e a variável estudada (que pode ser a concentração de um certo produto ou a variação de algum parâmetro experimental). Logo, é necessário fazer uma calibração[1,2].

Mais recentemente, outras informações de propriedades físico-químicas das amostras puderam ser obtidas dos sinais de RMN em baixo campo, com o uso de métodos quimiométricos e de análise de relaxação multiexponencial[8,17]. Os espectros de RMN no domínio do tempo, como decaimento livre induzido (FID) ou eco de spin, começaram também a serem usados em análises qualitativas e na quantificação de mais de um produto na mesma amostra [18,19]. Essas análises são baseadas principalmente nas diferenças de tempo de relaxação longitudinal (T_1) e/ou transversal (T_2) dos vários componentes das amostras. Um exemplo dessa aplicação é a determinação da quantidade de água

presente nos vários compartimentos de uma amostra heterogênea, como em tecido muscular.

As principais vantagens da RMN em baixa resolução sobre os métodos convencionais de análise químicas são: rapidez da análise, não destruição da amostra, fácil execução e possibilidade de se realizar análises em tecidos vegetais *in vivo*[2]. Apesar dos aspectos positivos, a baixa sensibilidade da espectroscopia de RMN em baixo campo, mesmo restrita à análise de isótopos de grande abundância natural, ainda é uma barreira que pode, em muitos casos, impossibilitar sua utilização.

Recentemente, buscando minimizar o problema de baixa sensibilidade, foi demonstrado por Azeredo e colaboradores [20] que a RMN utilizando a técnica precessão livre em onda contínua (CWFP- do inglês, Continuous Wave Free Precession) pode ser usada em análises quantitativas, em um espectrômetro de baixa resolução, com ganho de razão sinal ruído (S/R) de dezenas de vezes se comparado com a técnica de RMN convencional.

1.1.4. PRECESSÃO LIVRE EM ONDA CONTÍNUA (CWFP)

Como se demonstrou anteriormente, após um pulso de rf de 90 graus é necessário esperar um tempo de cerca de $5T_1$ para que a magnetização volte ao equilíbrio térmico (99,33%). Isso é necessário para que a intensidade do sinal após cada pulso seja proporcional a M_0 de acordo com a equação 14. Assim, quando os pulsos passam a ser repetidos com um intervalo menor do que $5T_1$, os sinais após o segundo pulso têm menor intensidade do que o primeiro pulso (M_0) devido a saturação parcial do sinal. Este sinal continua a decair após um certo número de

pulso até ficar com amplitude constante, denominado de estado estacionário. Na figura 1.10 estão os sinais de RMN adquiridos para uma amostra de óleo vegetal, com T_1= 138 ms e T_2 = 53 ms submetidos a um trem de pulsos de 90 graus com um tempo de repetição (T_r) (figura 1.11) que varia de A a H de 500,1; 108,3; 56,1; 29,1; 15,5; 2,7;0,9 e 0,3ms respectivamente. A não homogeneidade do ímã foi alta gerando um FID com constante de Tempo T_2^* de 0,5ms. Nesta figura obteve-se a aquisição do sinal antes e depois do pulso. No caso da figura 1.10 de A a F, o pulso foi aplicado no centro do espectro.

Assim o estado estacionário é observado em todos esses sinais (A a H). No entanto, quando o tempo de repetição entre os pulsos fica abaixo de $3T_2$ (C a G), observa-se um sinal logo após o pulso, FID, e um sinal de eco, que antecede o próximo pulso. Este tipo de sinal de estado estacionário foi observado pela primeira vez por Carr em 1954 e foi denominado estado estacionário de precessão livre (SSFP - do inglês - Steady State Free precession). Um regime de SSFP especial é observado na figura H, onde se observa um sinal de amplitude constante, com um uso de um trem de pulso com $T_r << T_2^*$. Esse sinal tem propriedades que o diferem da SSFP normal e foi denominado estado estacionário de precessão livre em onda contínua ou simplesmente estado estacionário em onda contínua (CWFP-do inglês – Continuous Wave Free Precession).

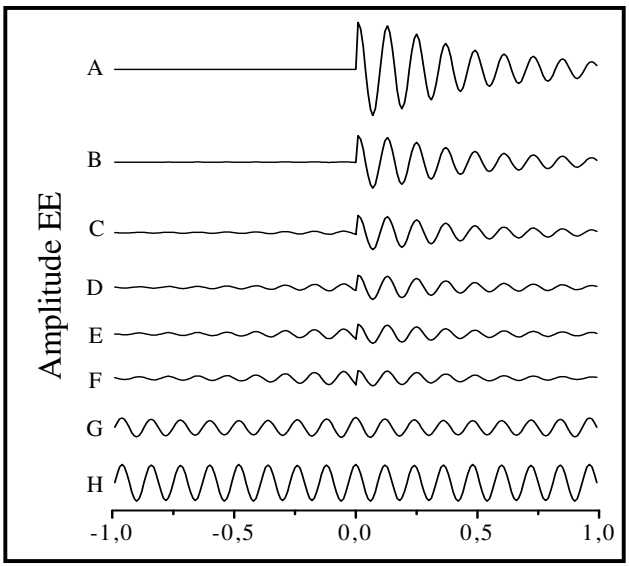

Figura 2.10: Espectros de RMN-^{1}H no estado estacionário de óleo vegetal com T_1=138ms, T_2=53ms. Imã com T_2^*=0,5ms; ângulo de precessão $\psi=\omega T_p=(2n+1)\pi$, onde n é um número inteiro. T_r varia de A a H por respectivamente: 500,1; 108,3; 56,1; 29,1; 15,5; 2,7;0,9 e 0,3ms[21].

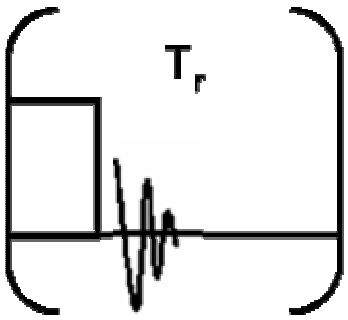

Figura 1.11: Seqüência de n pulsos com um tempo de espera T_r.

Uma grande vantagem do sinal CWFP é que sua amplitude (M_z) não depende do valor absoluto de T_1; mas sim da razão entre T_2 e T_1 de acordo com a equação 19.

$$M_z=M_0T_2/(T_1+T_2) \qquad (19)$$

Assim, a amplitude do sinal CWFP para amostras em solução de baixa viscosidade, como mesmo T_1 e T_2, tem a metade da amplitude de M_0. Independente dos valores absolutos desses tempos de relaxação.

Com essas condições é possível adquirir milhares de espectros por segundo, aumentando sensivelmente à razão sinal/ruído e consequentemente a qualidade dos espectros.

Além de medidas quantitativas em amostras estáticas, a RMN-CWFP tem sido usada para medida de fluxo[22], de difusividade térmica[23] e como um método de alta velocidade para medida do teor de óleo em sementes, com potencial de se analisar mais de 20 mil amostras por hora.

Além disso, desenvolveu-se um método baseado no CWFP, que permite medir ao mesmo tempo os valores de T_1 e T_2. O sinal gerado por um trem de pulsos de 90 graus com um tempo $T_r << T_2^*$ a partir do equilíbrio térmico pode ser divido em três regimes (figura 1.12): Um de alternância de intensidade, um estado quasi-estacionário e o estado verdadeiramente estacionário[23,24,25].

A parte vermelha da figura 1.12 representa o sinal com alternância de amplitude, a partir do equilíbrio térmico até atingir o estado quase-estacionário. A parte verde e azul, que são respectivamente, o estado quasi-estacionário e o estado verdadeiramente-estacionário. O sinal CWFP do estado quase-estacionário até o estacionário decai exponencialmente com uma constante de tempo dada pela equação 20.

$$T^* = 2T_1T_2/(T_1+T_2) \qquad (20)$$

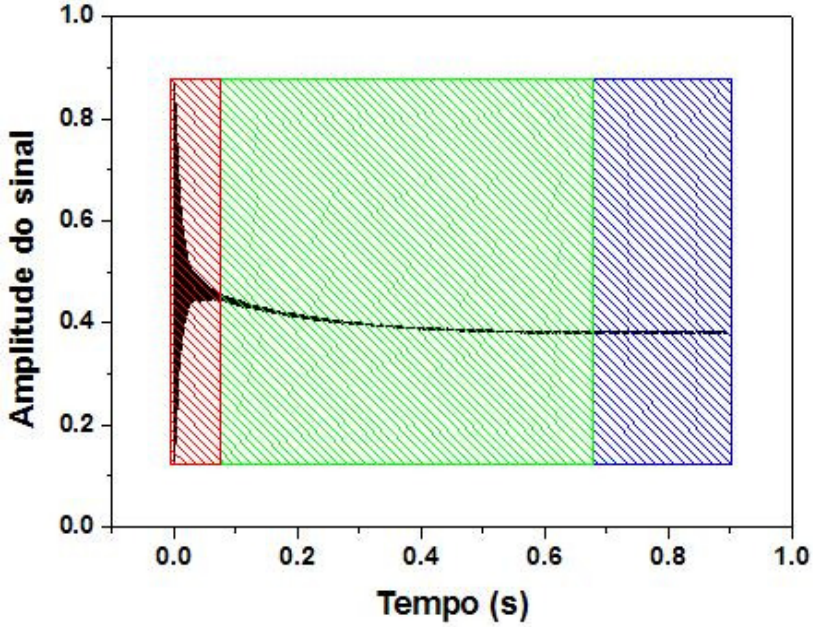

Figura 1.12: Representação do sinal do CWFP para amostra de ácido fosfórico (^1H) com T_1= 190ms e T_2= 140ms.

Rearranjando as equações 19 e 20 obtém-se a dependência de T_1 e T_2 com relação à intensidade do sinal após o primeiro pulso (M_0) e no estado estacionário (M_z) e da constante de tempo T_2* através das equações 21 e 22. [23,24]

$$T_1= (T^*/2)/M_z/M_0 \quad (21)$$

e

$$T_2=(T^*/2)/1-M_z/M_0 \quad (22)$$

1.2. Carne Bovina

O rebanho bovino brasileiro tem cerca de 205 milhões de cabeças e produção de cerca de 9 milhões de toneladas de carcaça. O Brasil atualmente é o maior exportador de carne bovina, com 2,2 milhões de toneladas embarcadas, o que

representa uma participação de 31% do mercado internacional. Em seguida estão a Austrália e a Argentina, com uma participação de 20% e 10% no comércio internacional, respectivamente[26]. Para manter e até aumentar sua participação no mercado externo a pecuária de corte brasileira necessita aumentar sua eficiência produtiva e disponibilizar ao consumidor interno e externo produtos de qualidade.

Essa competição no mercado globalizado da carne tem levado cada vez mais à oferta de produtos de alta qualidade nutricional, sanitária e sensorial e até mesmo rastreáveis com relação às condições ambientais, ao manejo e à forma de abate dos animais[27]. Com isso, existe um maior interesse no desenvolvimento e introdução de novas tecnologias tanto na criação do animal quanto no abate, processamento e distribuição do produto.

Dentre essas tecnologias tem se observado o desenvolvimento e aprimoramento cada vez maior de metodologias não-invasivas e não destrutivas de predição “on-line” da qualidade tecnológica e sensorial da carne. Por exemplo, a medida de pH da carne, usada na avaliação de carcaça desde a década de 80, teve grande progresso recentemente, com a redução do tempo de medida e automação, que tem sido possível medidas em milhares de carcaças por hora[28].

Além do uso de tecnologias simples como de medida de pH, tem-se também avaliado o uso de técnicas sofisticadas para a predição da qualidade da carne, baseadas em ultra-som, reflectância na região do infravermelho próximo (NIR), fluorescência, processamento de imagens e espectroscopia e tomografia por RMN[28].

1.2.1. Conversão de músculo em carne

O músculo esquelético de mamíferos é constituído por 65 a 80% de água, 16 a 22% de proteínas, 1 a 2% de carboidratos, 1 a 13% de gorduras e 1% de outros materiais solúveis[29].

O músculo é constituído por uma unidade estrutural, a fibra, e por uma unidade funcional, o sarcômero. Existem três tipos básicos de músculos, os estriados esqueléticos, os estriados cardíacos e os voluntários viscerais. A estrutura do tecido muscular será definida como do tipo esquelético pela sua representatividade[29].

A figura 1.13 representa um esquema com a constituição de um músculo[29]. O músculo é envolvido por um tecido conjuntivo chamado epimísio; a membrana celular, chamada sarcolema, é envolvida por outro tipo de tecido conectivo chamado endomísio. As fibras são reunidas em feixes de fibra, onde o terceiro tipo de tecido, o perimísio, recobre as fibras musculares individualmente[30].

Dentro da fibra muscular, os menores elementos contráteis (sarcômeros) são arranjados numa longa linha, uma miofibrila de 1 μm de diâmetro. O fluido que envolve esta, o sarcoplasma, contém proteínas, incluindo as enzimas glicolíticas e proteolíticas, além de todos os elementos usualmente encontrados na célula, como mitocôndria, ribossomos etc[19].

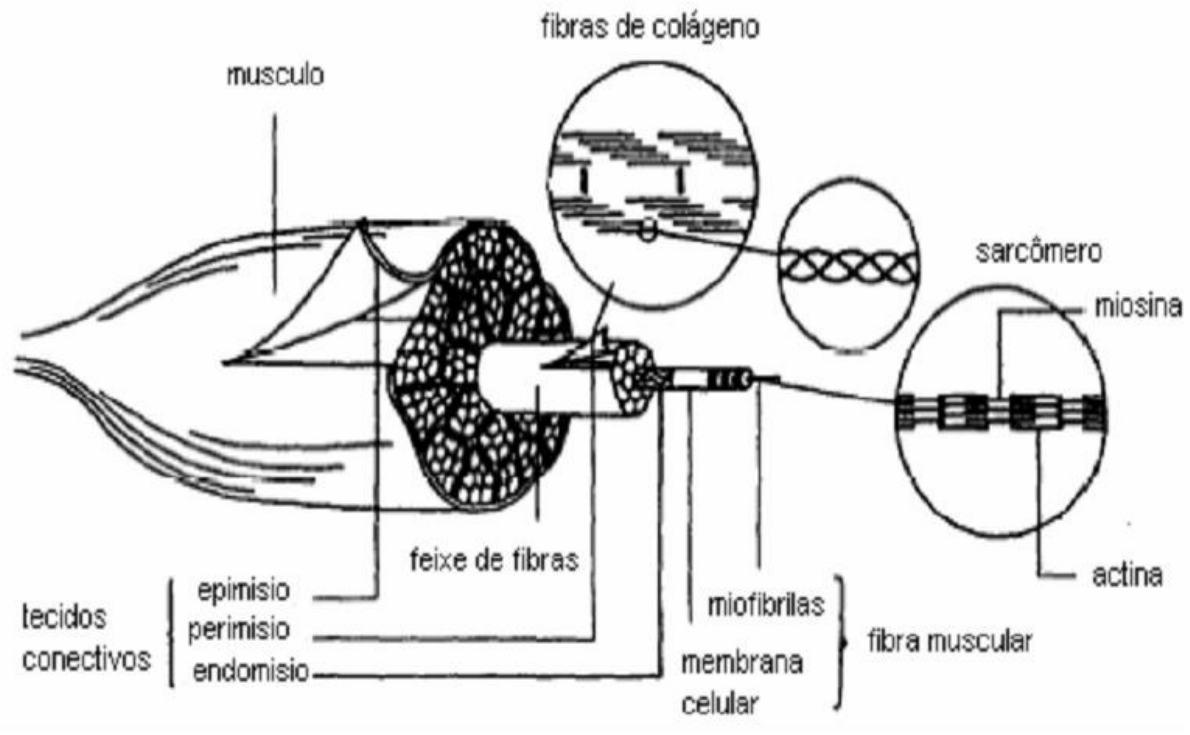

Figura 1.13: Representação da estrutura muscular macroscópica[29].

O músculo, após o abate, passa por vários processos físico-químicos até se transformar em carne. O conhecimento desses processos, da estrutura do músculo e da carne são fundamentais para a compreensão dessa conversão e conseqüentemente da qualidade da carne como alimento[29].

Com a morte e, por conseqüência, com a falência sangüínea, o aporte de oxigênio e o controle nervoso deixam de chegar à musculatura, com isso, o músculo passa a utilizar a via anaeróbica, para obter energia para um processo contrátil desorganizado. Nesse processo ocorre à transformação de glicogênio em glicose, e como a glicólise é anaeróbica, gera-se ácido láctico, o que leva a queda do pH da carne[29].

Com o consumo das fontes energéticas, o processo contrátil tende a cessar formando um complexo irreversível denominado de *acto-miosina*. A formação

desse complexo resulta numa condição de rigidez e essa é a forma como as proteínas miofibrilares são encontradas após a morte. Nesse estado, a musculatura atinge o *rigor mortis*, ou seja, os músculos transformam-se em carne[29]. Um dos aspectos mais marcantes da transformação do músculo em carne é a queda do pH, inclusive, a ponto de determinar a futura qualidade da carne.

O conceito de qualidade de carne é bastante amplo e envolve manejo e genética entre vários outros parâmetros que vão desde à concepção do animal até o seu preparo pelo consumidor[27].

A qualidade de carne bovina está relacionada com as características organolépticas: a cor da carne, gordura, odor e sabor, firmeza e textura, a maciez, suculência. É desejável que o animal possua uma musculatura rígida permitindo que o corte apresente textura fina e homogênea e músculos de coloração vermelho brilhante e a gordura clara.

A firmeza é uma das características percebidas pelo consumidor, ou avaliada tecnicamente. Esta propriedade é determinada em parte pela quantidade e distribuição das fibras de colágeno e da gordura. Assim, carnes refrigeradas ricas em gordura, principalmente intramuscular, e as ricas em colágeno, mesmo à temperatura ambiente, aparentam firmeza/solidez. Outros fatores que influenciam muito a firmeza são a temperatura (quanto mais próximo de –0,5^{o}C melhor) e a capacidade de retenção de água (CRA), ou seja, carnes com baixa CRA são pouco firmes e as de alta CRA (pH>5,8) tendem a ser muito firmes[30].

A capacidade de retenção de água é definida como a habilidade da carne de reter sua água durante a aplicação de forças externas, tais como: corte, exposição ao calor, moagem e prensagem. Assim, é um fator de grande importância, pois determina a qualidade tecnológica e o rendimento da carne e seus derivados.

A perda de água, medida pela CRA pode ser descrita em três passos: (i) perda de água de dentro das miofibrilas devido ao encurtamento pós-morte; (ii) relocalização da água nos compartimentos intra para extracelular e (iii) fluxo subseqüente desse líquido para a superfície[28].

Assim, a CRA depende primeiramente da extensão do encurtamento miofibrilar na carne pós-morte e as mudanças nos compartimentos de água extracelular. Além da CRA, o pH, teor e qualidade da gordura, são fatores que permitem predizer a qualidade da carne, em termos de palatabilidade, suculência e maciez[28,31]. A perda de água por cocção é outro parâmetro de qualidade da carne está relacionada com a perda de água durante o cozimento.

1.3. Aplicações de RMN em baixa resolução na avaliação de carne

Desde o final da década de 60 sabe-se que as medidas de relaxação em RMN de baixa resolução podem dar informação sobre o estado da água em tecido muscular de suínos. Já no inicio da década de 70 foi demonstrado a potencialidade da RMN na avaliação da qualidade de carne suína fresca e processada[32]. Pearson et al, 1974[33] demonstraram o uso de dados de relaxação T_2 para investigar o *rigor mortis.*

Renou et al, em 1985[34] demostraram que havia uma alta correlação entre o T_2 da água e propriedades da carne como pH, rendimento de cozimento e capacidade de retenção de água. Renou et al, 1989[35] também demonstraram a relação entre a dinâmica da água medida por RMN e a redução do pH de músculos de suíno no *rigor post-mortem.*

Lee et al, 1992[32] estudaram o efeito do tratamento térmico no músculo de coração de bovinos, suínos e aves na dinâmica da água, medida por T_2. Utilizando métodos de regressão não-linear das curvas de decaimento de T_2, observaram que os ajustes foram melhores com uso de três componentes exponenciais que correspondiam à água em três diferentes compartimentos nos músculos cardíacos.

Brown et al, 2000[36] demonstraram que os dados de CPMG de carne suína não podem ser interpretados como um somatório de um número discreto de exponenciais, como o usado, por exemplo, por Lee et al, 1992. Eles utilizaram métodos quimiométricos como ANOVA e regressão dos componentes principais (PCR) e demonstraram que um modelo contínuo de ajuste é mais apropriado para analise dos dados de CPMG. Demonstraram a presença de duas populações de água no músculo suínos, com uma faixa larga de T_2 e que há correlação entre os dados de CPMG e parâmetros tecnológicos de carne suína, como pH, teor de água, perda por cozimento etc.

Engelsen et al, 2000[37] analisaram dois músculos (*longissimus dorsi* e *semitendinosous*) de suínos através de quatro técnicas espectroscópicas para a previsão da capacidade de retenção de água e a composição da carne do suíno. Demonstraram que a técnica de maior sucesso foi a RMN em baixo campo para a previsão da capacidade de retenção de água, da gordura intramuscular e do teor total de água.

Renou et al, 2000[38] estudaram as características de músculos de bovinos com a espectroscopia e tomografia por RMN. Demonstraram que a espectroscopia de RMN pode ser usada para obter informações estruturais e metabólicas, já a tomografia fornece a informação da distribuição da água, da

gordura nos tecidos. As medidas dos parâmetros quantitativos da RMN foram correlacionadas com as propriedades da carne como o pH, perda por cocção (PPC) e CRA.

Bertram et al, 2001[39] descreveram que apesar da correlação entre os dados de relaxação e qualidade da carne, ainda há muita confusão sobre a interpretação dos dados de relaxação e a distribuição da água em músculos e carne. Eles demonstraram que o comportamento multiexponecial da água em músculo ou carne não pode ser explicado pelas hipóteses das diferenças de compartimentalização física da água: da água mais ou menos estruturada pelo grau de contração muscular ou pela troca rápida entre água livre e água ligada na parede com diferentes tamanhos de poros. Eles propuseram que o componente de relaxação mais rápido está associado a moléculas de água firmemente ligada à macromoléculas; o componente intermediário a moléculas dentro de estruturas protéicas altamente estruturadas e que o componente de relaxação mais lento está associado a água extra miofibrilar, contendo a fração protéica sarcoplasmática.

Andersen et al, 2002[40] analisaram a distribuição contínua da relaxação T_2 em carne suína medida com técnica de transformada inversa de Laplace (ILT). O estudo mostrou que a análise da distribuição contínua de relaxação tem um melhor desempenho do que a análise tradicional do ajuste bi- exponencial da relaxação Demonstraram que a área da relaxação referente à população lenta (T_{22}) diminui proporcionalmente com a quantidade de água exsudada.

Micklander et al, 2002[41] monitoraram com a RMN em baixa resolução as mudanças sofridas pela carne durante o processo de cozimento. Utilizaram a técnica para identificar as temperaturas onde há maior mudança na estrutura da carne. Identificaram um novo componente de relaxação para a água na carne cozida

e apresentaram duas hipóteses para esse novo tipo de “água”. O novo componente de relaxação poderia ser da água exsudada pela da carne ou água presa no gel de miosina.

Bertram et al, 2003[42] demonstraram a relação entre o pH e o estado físico-químico da água no músculo de coelho durante sua conversão em carne, utilizando as medidas de relaxação T_2 com RMN em alto campo. O estudo demonstrou que o estado físico-químico da água no músculo durante a sua conversão em carne é afetado pela mudança progressiva do pH *post-mortem*.

Bertram et al, 2004[43] estudaram as mudanças na distribuição da água em músculos de coelhos durante as primeiras 24 horas *post-mortem*, utilizando a microtomografia por RMN. Essa técnica permitiu a visualização das mudanças da mobilidade da água no músculo *post-mortem* e subseqüente migração da água para a superfície da amostra de carne.

Bertram, 2004[44] estudou o músculo de suíno *in vitro* durante um período de 15 a 85 minutos e também 24 horas *post-mortem*, utilizando técnicas de gradiente de campo pulsado com a seqüência de CPMG. Utilizou diferentes tratamentos pré-abate (tratamento de adrenalina e exercício pré-abate/estonteante elétrico). Os músculos foram divididos em dois grupos, o primeiro foi caracterizado por uma pequena redução no pH *post-mortem* e uma alta capacidade de retenção de água e o segundo grupo foi caracterizado por um uma maior redução do pH *post-mortem* e uma baixa capacidade de retenção de água. A análise dos dados de CPMG revelou maiores populações para os tempos de relaxação entre 30-40 e 200-500ms.

Bertram et al, 2004[45] demonstraram o funcionamento da proteína miofibrilar retirada de suínos quando afetada pelo pH, força iônica e tratamento de

calor, através da medida de T_2 de RMN em baixo campo. Os autores observaram uma interação entre o pH e a força iônica e que o conteúdo de água da amostra aumenta significativamente com o aumento do pH e a força iônica. Além disso, o tempo de relaxação T_2 aumenta com o aumento do pH e a força iônica, no qual revela que o aumento da retenção de água pode ser atribuído ao inchaço das miofribilas e desse modo aumenta o espaço entre os filamentos. Com isso, o estudo da relaxometria pode ser aplicado para o estudo das propriedades da água de extração miofibrilar e assim melhorar o entendimento das mudanças dos fatores do pH e força iônica. Tais fatores afetam a capacidade de retenção de água e a capacidade de ligação de água em produtos cru e com tratamento de calor.

Sorland et al, 2004[46] demonstraram que a RMN em baixo campo é um método rápido (1 minuto) para a determinação de água e gordura total em carne suína.

Bertram et al, 2005[47] usaram a RMN em baixo campo para estudar a relação entre a temperatura de cozimento, distribuição de água e atributos sensoriais. Eles observaram que as medidas de T_2 estão altamente correlacionadas com atributos sensoriais de carne suína cozida nas temperaturas de 62 e 75°C. O estudo também demonstrou que a maior suculência e a maciez obtida em 75°C do que em 62°C, pode ser explicada pela alteração na distribuição da água, refletindo mudanças no tamanho dos poros na carne em combinação com a água exsudada.

Wu et al, 2006[48] estudaram a mudança da estrutura secundária da mioglobina e miosina e a distribuição de água conseqüente do envelhecimento da carne suína (1 a 14 dias), seguidos da adição de NaCl (3%, 6% e 9%) e cozimento a 65ºC. Utilizaram técnicas de microscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier e medidas de tempo de relaxação transversal (T_2) através

da RMN em baixo campo. O estudo revela mudanças na distribuição da água durante o envelhecimento, salga e cozimento e não somente a degradação proteolítica da estrutura miofibrilar, mudanças na repulsão eletrostática, dissolução e desnaturação da proteína, como também com as mudanças na dinâmica da estrutura secundária da proteína.

Bertram et al, 2006[49] estudaram a relação entre mudanças nas características da água e desnaturação da proteína durante o cozimento da carne. Neste trabalho utilizaram medidas de RMN em baixo campo (T_2) combinada com medidas simultânea de calorimetria diferencial exploratória (DSC). Foram analisadas carnes de suíno pré-aquecida para várias temperaturas nas regiões entre 25 e 75ºC de forma a obter um melhor entendimento da relação entre o aquecimento e a desnaturação das proteínas e a associação com as propriedades da água na carne. Os resultados de T_2 revelaram uma maior mudança na característica da água entre 40 e 50ºC, devido à desnaturação da miosina. Foi utilizado a regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) para a comparação dos dados de RMN com os de DSC. A análise revelou uma correlação entre a desnaturação da miosina ~ 53-58ºC e o aquecimento induzindo mudanças da água miofibrilar entre a desnaturação da actina de ~ 80-82ºC e expulsão da água da carne.

Bertram et al, 2006[50] estudaram a combinação da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e medida de T_2 por RMN em baixo campo para caracterização da mudança das estruturas das proteínas miofibrilares e propriedades físico-químico de amostras de carne suína de duas qualidades (pH normal - 5,4 e pH alto - 6,5) durante o cozimento de 28ºC a 81ºC. Observaram mudanças pronunciadas na propriedade da água e na organização estrutural das proteínas durante o cozimento. Os dados de RMN e infravermelho foram

correlacionados através do PLS, revelando uma correlação dos sinais de infravermelho com as estruturas de α- hélice e folha β e as populações de relaxação na água hidratada (T_{2B}~0-10ms), água miofibrilar (T_{21}~35-50ms), e também a água exsudada (tempo de relaxação T_2>1000ms). Com isso, demonstraram que as mudanças estruturais nas proteínas durante o cozimento da carne são associadas com alterações simultâneas das propriedades físico-químicas da água.

Hall et al, 2006[51] demonstraram que a combinação das medidas dos valores de T_2 da água por espectroscopia e tomografia por RMN podem ser usadas para determinar mudanças nas estruturas com o aquecimento-induzido na mistura de carne de frango fresca na qual pode ser cozida a 200ºC de 3 a 21 minutos. A análise multi-exponencial do decaimento do tempo de relaxação T_2 identificou três populações distintas de água na carne crua; um componente longo T_{22} (82-99ms), um componente intermediário T_{21} (39-43ms) e um componente curto T_{23} (2-3ms). Com a desnaturação das proteínas, ocorrem mudanças nas suas estruturas que são refletidas pela redução do T_{21} (18-31ms) e aumento do T_{22} (61-208ms).

Bertram et al, 2006[52] estudaram o efeito da temperatura de congelamento (-20 versus -80 ºC) em combinação com o longo tempo de estocagem (30 meses) na temperatura de -20 ºC, para o estudo da mobilidade da água e distribuição em duas qualidades de carne suína (pH normal de 5,6 e pH alto de 5,8). Os autores analisaram por T_2 a influência do descongelamento e o processo de dois cozimentos: rápido e lento.

Bertram et al, 2007[53] estudaram mudanças na distribuição da água e mobilidade da qualidade de carne de suíno fresca denominada de pálida, flácida e exsudativa (Pale, Soft, Exudative- PSE) e escura, firme e seca (Dark, Firm, Dry - DFD) com a temperatura de congelamento (-20 ºC versus -80 ºC) e duração de

estocagem de 10 meses. As medidas de T_2 revelaram um aumento significativo na quantidade de água na carne PSE com o aumento do tempo de estocagem, implicando que a carne PSE é mais propícia a mudanças deteriorativas durante a estocagem, causando uma maior mudança na distribuição da água, do que a carne DFD.

Bertram et al, 2007[54] estudaram a distribuição da água e o efeito cozimento da carne suína em um período de envelhecimento de 14 dias, com as técnicas de microscopia de varredura confocal por laser (CLSM) e RMN em baixo campo. O uso da CLSM para a visualização das mudanças da carne durante o envelhecimento e subseqüente tratamento de calor foi útil para evidenciar a distribuição da água, caracterizada por relaxometria. O estudo mostra que a combinação desses métodos é ideal para adquirir informações básicas sobre mudanças microestrutural e distribuição da água na carne.

Como a maioria dos trabalhos do uso de RMN é para carne suína, neste trabalho de mestrado avaliou-se o uso da RMN em baixa resolução para predição da qualidade de carne bovina.

2.OBJETIVOS

O objetivo do projeto de mestrado foi avaliar ou uso da relaxometria em RMN em baixa resolução, com as técnicas CPMG e CWFP, para a predição da qualidade da carne bovina por através das correlações entre os tempos de relaxação longitudinal (T_1) e Transversal (T_2) e parâmetros físico-químicos como pH, CRA, e teor de gordura.

Objetivos específicos:

1. Avaliar a qualidade da carne bovina utilizando a técnica de CPMG
2. Avaliar a qualidade da carne bovina utilizando a técnica de CWFP
3. Analisar os dados obtidos com a técnica CPMG com Métodos multiexponenciais
4. Analisar os dados obtidos com as técnicas CPMG e CWFP com métodos quimiométricos

3.MATERIAS E MÉTODOS

3.1. Amostras

Analisou-se amostras de carne da região do contra-filé do tipo músculo – *longissimus lumborum.* A figura 3.1 ilustra a localização do contra-filé no animal de onde foram retiradas amostras da região da 12ª e da 6ª costela de um mesmo animal. A região da 12ª costela é o padrão americano e da 6ª costela é uma tentativa de se obter um método brasileiro.

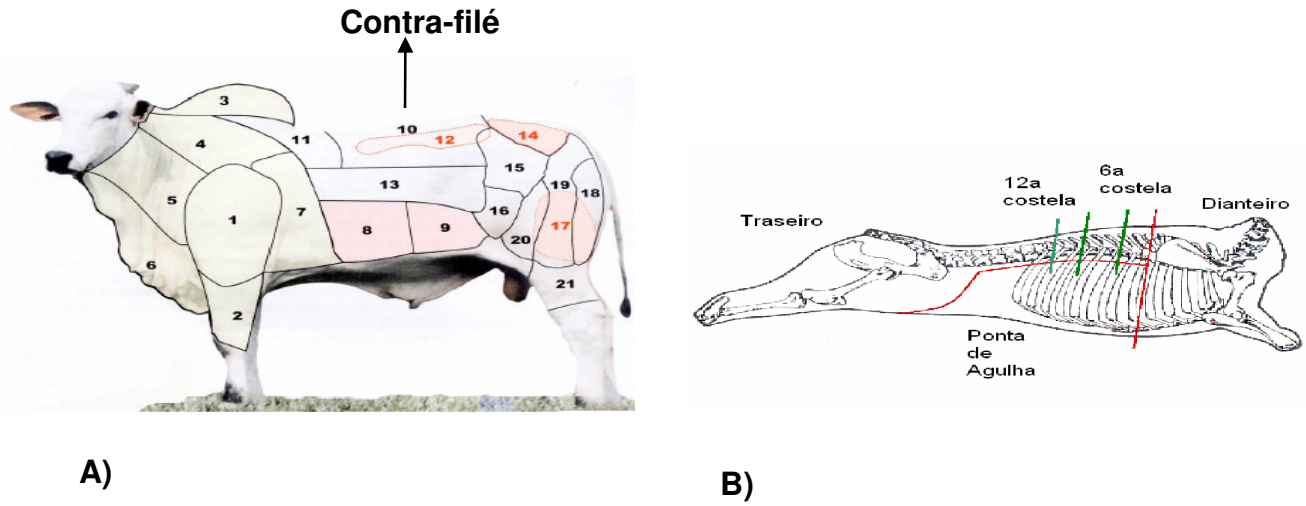

Figura 3.1: A) Cortes da carne Bovina [55]. B) Subdivisão da meia carcaça indicando traseiro, dianteiro e ponta-agulha [55], bem como a 6ª e 12ª costelas do contra-filé.

Os bovinos abatidos foram provenientes de filhos ou filhas de fêmeas cruzadas, Angus X Nelore (TA) e Simental X Nelore (TS), acasaladas com touros das raças Angus (AX), Bonsmara (BX) e Canchim (CX), esses cruzamentos, confinamento e o abate foram conduzidos pela Embrapa pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

O cruzamento de fêmeas TA ou TS com touro da raça Canchim (CX) produz bezerros com cerca de ½ Europeu + ½ Zebu; com touro da raça Angus (AX) produz bezerros com cerca de ¾ Europeu + ¼ Zebu e com touro da raça Bonsmara (BX) produz bezerros ¾ *Bos taurus* e ½ adaptado (o grupo Sanga, *Bos taurus* adaptado).[56]

Para caracterizar as raças dos animais adotaram-se os termos AX, BX e CX para os pais e TA e TS para as mães, M e F para o sexo representando os seguintes grupos genéticos:

- AX → animais cruzados filhos de touros da raça Angus;
- BX → animais cruzados filhos de touros da raça Bonsmara;
- CX → animais cruzados filhos de touros da raça Canchim;
- TA → animais filhos de vacas cruzadas ½ Angus x ½ Nelore;
- TS → animais filhos de vacas cruzadas ½ Simental x ½ Nelore;
- M → animais machos;
- F → animais fêmeas.

Os cruzamentos entre os pais, as mães e o sexo dos animais mencionados acima, resultam nos grupos genéticos: AXTAF, AXTAM, AXTSF, AXTSM, BXTAF, BXTAM, BXTSF, BXTSM, CXTAF, CXTAM, CXTSF e CXTSM.

A tabela 3.1 ilustra quantos animais foram abatidos referentes a cada cruzamento.

Tabela 3.1: Relação entre cada grupo genético formado nos cruzamentos com o total de animais abatidos desses grupos

Grupo genético	Total de animais
AXTAF	10
AXTAM	11
AXTSF	4
AXTSM	10
BXTAF	9
BXTAM	11
BXTSF	8
BXTSM	8
CXTAF	9
CXTAM	6
CXTSF	3
CXTSM	10

Na figura 3.1 mostra os grupos genéticos do pai que são Angus (AX), Bonsmara (BX) e Canchim (CX), e o grupo genético das mães TA e TS.

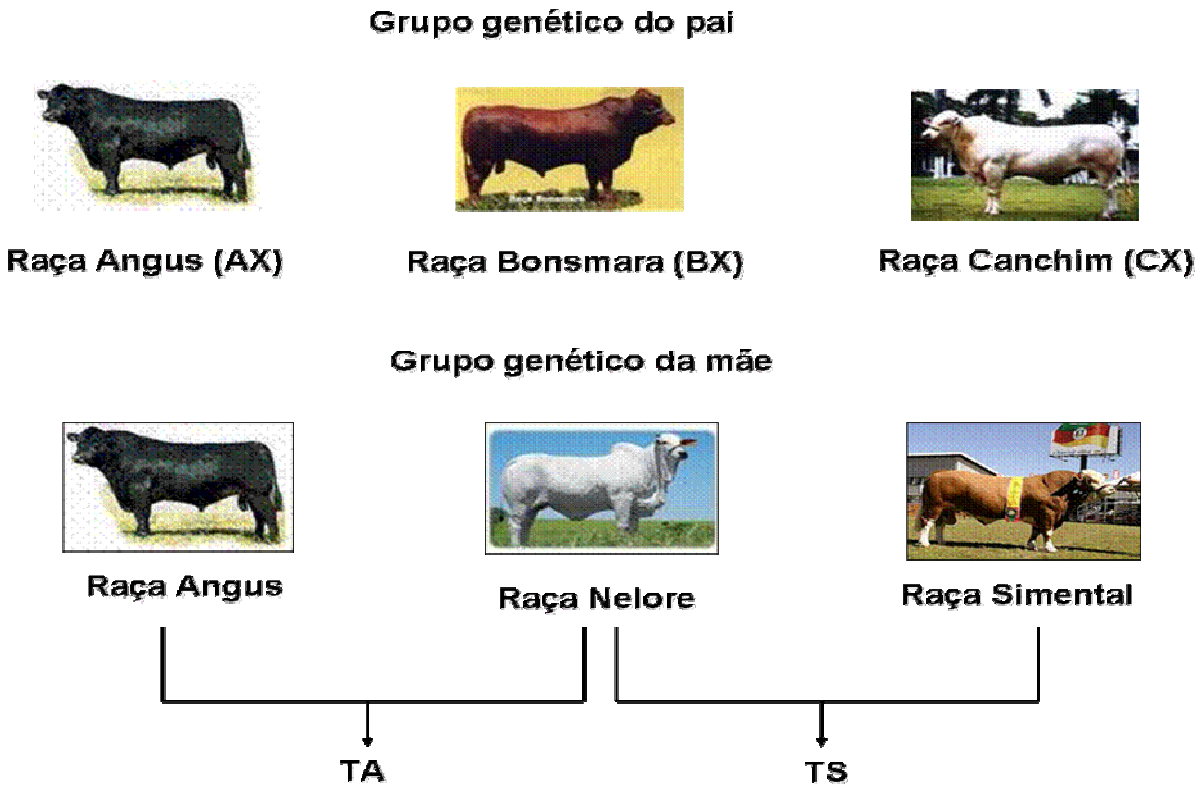

Figura 3.2: Ilustra os cruzamentos analisados.

3.2 Métodos de análises da carne bovina

As amostras de carne bovina foram fornecidas pelos Doutores Geraldo Maria de Cruz e Rymer Ramiz Tullio, pesquisadores da Embrapa Pecuária Sudeste. Com o objetivo de comparar com os dados obtidos por RMN, os pesquisadores supra citados também forneceram os resultados das análises clássicas de capacidade de retenção de água (CRA), pH, EGAOL (capa de gordura externa) e da perda por cocção (PPC).

A fase de cria foi feita sob manejo intensivo (3,3 vacas/ha) em pastagens de capim-marandu adubadas durante as águas, em pastejo rotacionado com três dias de ocupação e 36 dias de descanso. Os bezerros nascidos em 2004 e

2005, logo após a desmama, foram adaptados à dieta experimental e alocados nas baias do confinamento, em grupos de dois, três ou quatro animais, de acordo com o grupo genético do pai e da mãe, sexo e por bloco de época de desmama, dentro dos 28 dias de período pré-experimental.[56]

A dieta possuía 14,0% de proteína bruta (PB) e 69,7% de nutrientes digestíveis totais (NDT) e foi composta por 68,0% de silagem de milho, 12,0% de milho em grão moído, 3,5% de farelo de trigo, 15,0% de farelo de soja, 0,5% de calcário calcítico e 1,0% de mistura mineral, na base seca. Após 56 dias de experimento, a dieta passou gradualmente para 13,0% de PB e 73,4% de NDT, composta por 50,0% de silagem de milho, 32,8% de milho em grão moído, 8,0% de farelo de trigo, 7,0% de farelo de soja, 0,5% de uréia, 0,7% de calcário calcítico e 1,0% de mistura mineral, na base seca. Além disso, foi acrescentado a essas dietas, cerca de 3,0 g de monensina sódica por animal por dia. A dieta foi fornecida duas vezes ao dia e a quantidade oferecida foi ajustada em função das sobras observadas.[56]

Os animais iniciaram o experimento aos 273 dias de idade e peso vivo de 250,0 kg; 238,8 kg e 236,6 kg, para AX, BX e CX, respectivamente. Os animais foram pesados a cada 28 dias, após 16 horas de jejum de água e de alimentos, e no dia anterior aos abates[56].

Os animais foram abatidos quando a espessura de gordura na altura da 12ª costela era de pelo menos, 3mm medido por ultra-sonografia. Os animais foram abatidos por concussão cerebral seguida de secção da jugular.[55]

Foram abatidos 99 animais em cinco dias diferentes todos com idade entre 18 e 24 meses, entre esses animas 43 eram fêmeas e 56 eram machos, onde

no primeiro e no terceiro dia foram abatidas apenas fêmeas e no segundo, quarto e quinto dia apenas machos.

As análises de CRA e PPC foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Produtos de Origem Animal, do Departamento de Tecnologia, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal[55].O pH foi medido na porção muscular do bife com um medidor digital marca Texto R 230[55].

A capacidade de retenção de água (CRA) foi obtida pela diferença entre os pesos de uma amostra de carne, de aproximadamente 2g, antes e depois de ser submetida à pressão de 10Kg, durante 5 minutos[55].

Para a medida da perda por cocção, os bifes foram assados em forno a gás à temperatura de 175ºC, até atingir 75ºC no seu centro geométrico. Os pesos dos bifes antes de depois da cocção foram utilizados no cálculo das perdas totais, enquanto os pesos das bandejas antes e após a cocção foram considerados para a obtenção das perdas por gotejamento. A perda por evaporação obteve-se pela diferença entre a perda total e a perda por gotejamento.[55]

A gordura intramuscular foi extraída utilizando um sistema de extração Soxlet e hexano como solvente. Foi pesada aproximadamente 1g de cada amostra liofilizada em um papel de filtro com peso conhecido, sendo em seguida colocada no extrator onde permaneceu em refluxo por mais de 18 horas. Em seguida, as amostras foram levadas para estufa a uma temperatura em torno de 60ºC para a evaporação do solvente. Depois de secas, as amostras ainda envoltas em papel foram pesadas. Subtraindo-se a massa conhecida do papel, o valor da massa da amostra foi determinado. A percentagem de gordura foi obtida utilizando o valor encontrado em relação a massa de amostra fresca.

3.3 Análise por RMN

As medidas foram realizadas em um ímã supercondutor Oxford de 2,1 Tesla, (85MHz para ^{1}H) e com 30cm de bore. A parte eletrônica consiste de um console de RMN Apollo, um amplificador de potência 2035 AMT e um pré-amplificador AU1448 da Miteq.

As amostras de carne fresca foram colocadas nas sondas desenvolvidas na Embrapa Instrumentação Agropecuária, utilizando-se uma bobina detectora de 1 cm de altura por 1 cm de diâmetro.

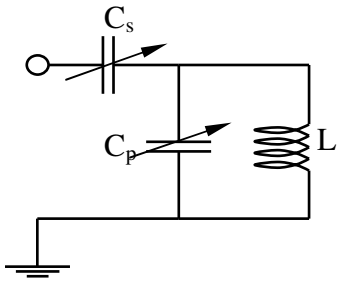

Figura 3.3: Circuito LC de uma sonda de radio-freqüência utilizada em experimentos de RMN[57].

Foram analisadas amostras de contra-filé, de 24 a 48 horas após o abate, das regiões da 12ª e da 6ª costela, no total de 198 amostras. Foram retirados 3 cilindros de 8mm de diâmetro e de aproximadamente 1cm de espessura, com um perfurador metálico.

As amostras foram colocadas em um banho termostatizado a 15ºC por duas horas para estabilizar a temperatura. Na seqüência foram analisadas no espectrômetro de RMN, utilizando as técnicas CPMG e CWFP. Essas análises foram realizadas em triplicatas (três amostras por bife) levando a um total de 594 medidas.

3.3.1 Determinação de T_2 utilizando o método CPMG

Para avaliar a distribuição da água nas amostras de carne foram realizadas medidas de T_2 empregando a seqüência de pulso CPMG. As condições de aquisição foram: largura do pulso de 90º graus de 10µs, tempo de repetição entre cada pulso (τ) de 0,2 ms, número de ecos de 500, o tempo de aquisição (at) de cada eco, foi de 256 µs (dt= 4 µs e 64 dados), o número de aquisições igual a 4, e tempo de espera de 10 s.

Para a aquisição dos sinais foi empregado o software NTNMR da Tecmag. Neste software, os decaimentos CPMG tiveram suas fases ajustadas para o valor máximo no canal real e mínimo no imaginário. Em seguida foram exportados como arquivo txt. No programa Origin, os dados foram importados, sendo excluídas as colunas que apresentavam do sinal imaginário, que continha só ruído. Os dados reais foram expandidos em 64 colunas, sendo realizada a média aritmética de cada coluna. O valor médio foi utilizado para a construção da curva de decaimento, sendo este apresentado no eixo y e o valor do tempo (em segundos) no eixo x.

3.3.2. Determinação simultânea de T_1 e T_2 utilizando o método CWFP

As medidas de CWFP foram realizadas com o intuito de avaliar em conjunto a influência dos tempos de relaxação T_1 e T_2 na distribuição da água. As condições de aquisição foram: largura do pulso de 90º graus de 10µs, tempo de

repetição entre cada pulso T_r = 300μs, número de ecos de 700 e um ângulo de defasagem (offset) ψ de 3π, equivalente a uma frequência de 5 KHz.

O processamento dos sinais dos dados de CWFP foi o mesmo realizado para os dados de CPMG.

3.4 Programas utilizados para os ajustes monexponencial, biexponencial, triexponencial e para a Transformada Inversa de Laplace (ILT)

Para os ajustes: monoexponencial, biexponencial e triexponencial utilizou-se o programa Origin, versão 7.0. Para a Transforma Inversa de Laplace (ILT) utilizou-se um programa baseado no algoritmo do CONTIN, denominado multiexp, desenvolvido pelo Professor Daniel Pusiol da Universidade de Córdoba, Argentina.

3.5 Análise quimiométrica

As análises de Componentes Principais (PCA), Análises de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) e a Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS), foram realizados no programa Piruoette, versão 3.11(Infometrix).

Para a análise quimiométrica dos dados de RMN foram centrados na média. Este tipo de pré-processamento é utilizado, principalmente, para dados espectrais [58], e consiste em calcular a média dos dados de determinada coluna

(variável) e, em seguida, subtraí-la de cada dado da referida coluna. Assim, as médias das variáveis são igualadas a zero.

O pré-processamento utilizado nos dados dos parâmetros físico-quimicos foi o autoescalado[58], que consiste em calcular as médias e os desvios padrões, subtrair cada valor da média, e dividir o resultado pelo desvio padrão. Portanto, a média de cada variável será zero e o desvio padrão será igual a 1.

Os dados utilizados em quimiometria geralmente são organizados em um único arquivo, ou seja, uma única matriz original **X**, como mostrado na figura 3.4. A matriz **X** é construída por n amostras e m variáveis (n x m), onde cada amostra corresponde a uma linha e cujos elementos são os valores das variáveis medidas.

Na matriz de dados de RMN, os valores de a_1, a_2 ... a_n são os números de amostras e os valores de d_1, d_2 ... d_n são os dados de CPMG ou do CWFP, conforme figura abaixo:

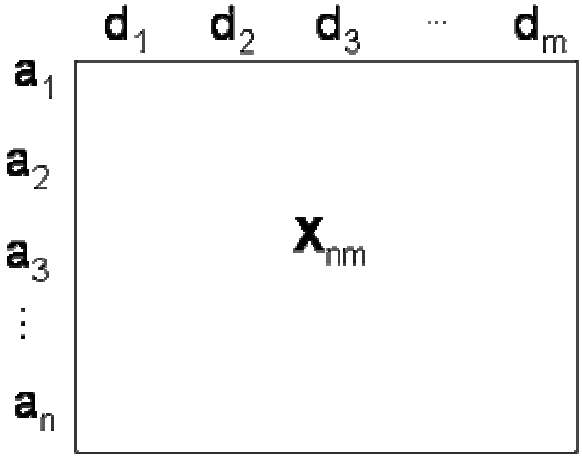

Figura 3.4: Representação da matriz de dados de RMN para análise de PCA e HCA.

A matriz de dados para a análise de regressão por quadrados mínimos parciais (PLS) foi composta dos dados de RMN e das análises físico-químicas. No caso, os dados de RMN constituem as variáveis independentes (X) e os dados

físico-químicos as variáveis dependentes (Y). A figura 3.5 ilustra a matriz de dados utilizada para a análise de PLS.

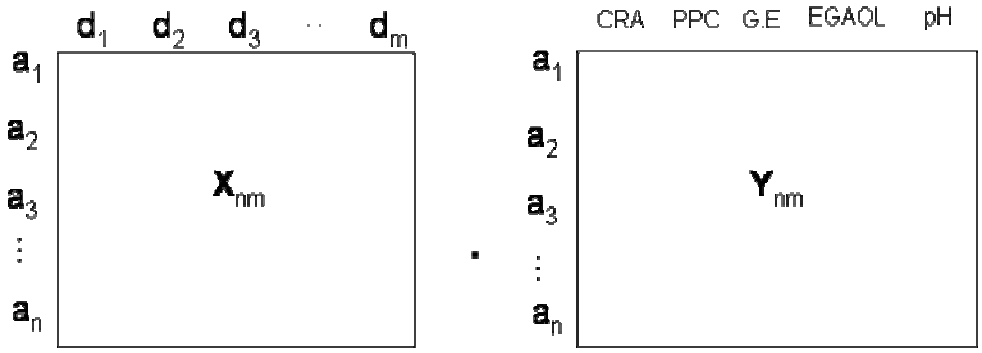

Figura 3.5: Representa a matriz de dados de RMN e a dos parâmetros físico-químicos para a análise de PLS.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de carnes bovinas foram analisadas com as seqüências de pulsos, CPMG, que gera um decaimento exponencial com dependência de T_2 e CWFP, que tem dependência tanto de T_1 quanto de T_2. Com apresentado no item 1.3 da introdução, somente a técnica CPMG foi usada na avaliação da qualidade de carne de suínos, aves e pescado. Assim, iniciou-se o estudo com essa técnica e usando os processamentos do sinal já descritos na literatura, como análise multiexponencial discreta, análise multiexponencial contínua, baseado na transformada inversa de Laplace e métodos quimiométricos como análise de componentes principais (PCA), análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).[50,51]

4.1. Análise multiexponencial dos dados de CPMG

Como a água é a substância em maior concentração na carne o sinal de ^1H domina o decaimento observado com CPMG; além da água, a gordura também pode contribuir para o sinal de RMN, de acordo com sua concentração[50]. Na figura 4.1 estão o sinais CPMG de três amostras de carne, números 67, 79 e 83

obtidas da região da 6ª costela dos cruzamentos CXTSM, BXTAM e BXTSM, respectivamente. Nesta figura pode-se ver que o sinal CPMG da amostra 83 possui um decaimento mais rápido do que os das amostras 79 e 67, indicando que a água presente nesta amostra está "mais presa ou imóvel", ou que tem um alto teor de gordura. A amostra 79 tem decaimento intermediário e a 67 o mais longo.

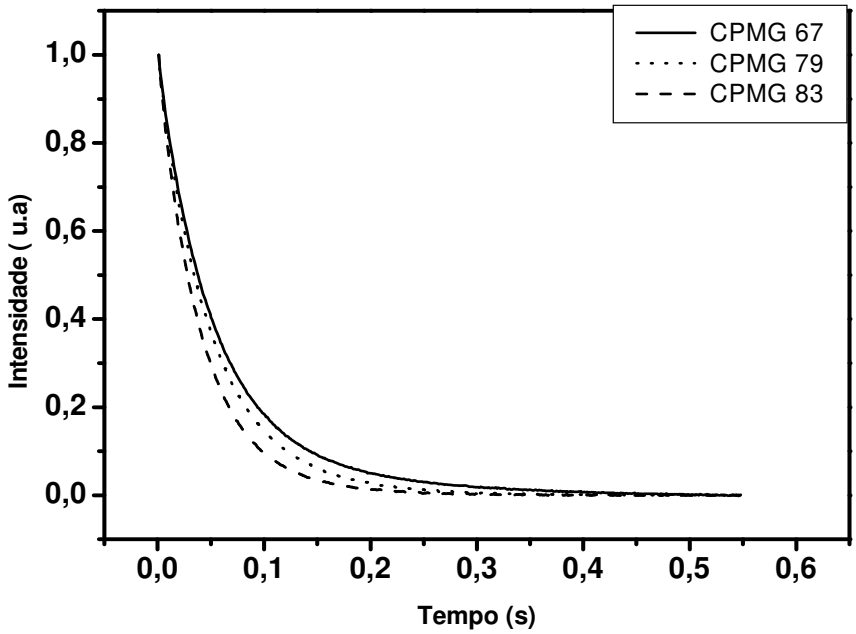

Figura 4.1: Curvas do decaimento exponencial obtidas com a técnica CPMG para as amostras 67, 79 e 83.

Para uma análise quantitativa dessas diferenças, os sinais de CPMG foram analisados com ajustes exponenciais discretos. Foram avaliados ajustes monoexponencial, biexponenciais e triexponenciais, realizados no software Origin®. Na figura 4.2 está o gráfico da amostra 67, com ajuste monoexponencial (A), biexponencial (B) e triexponencial (C). As curvas (B) e (C) do gráfico foram deslocadas da curva (A) para facilitar a visualização.

Como pode-se observar na figura 4.2, o ajuste monoexponencial (A), apesar de um coeficiente de determinação muito alto, R^2=0,998, não ajusta

corretamente a curva de decaimento do sinal T_2 do CPMG, ou seja, é possível ver que o sinal de ajuste não representa fielmente o sinal experimental. Isso ocorre devido à curva do decaimento exponencial observada em amostras de carne normalmente ser composta de dois ou mais tempos de relaxação T_2[50,51]. Com o ajuste de duas exponenciais (B), com R^2=0,999, e com três exponenciais (C), R^2 = 0,999, não é possível observar diferença entre o sinal CPMG e os ajustes biexponencial e triexpoencial.

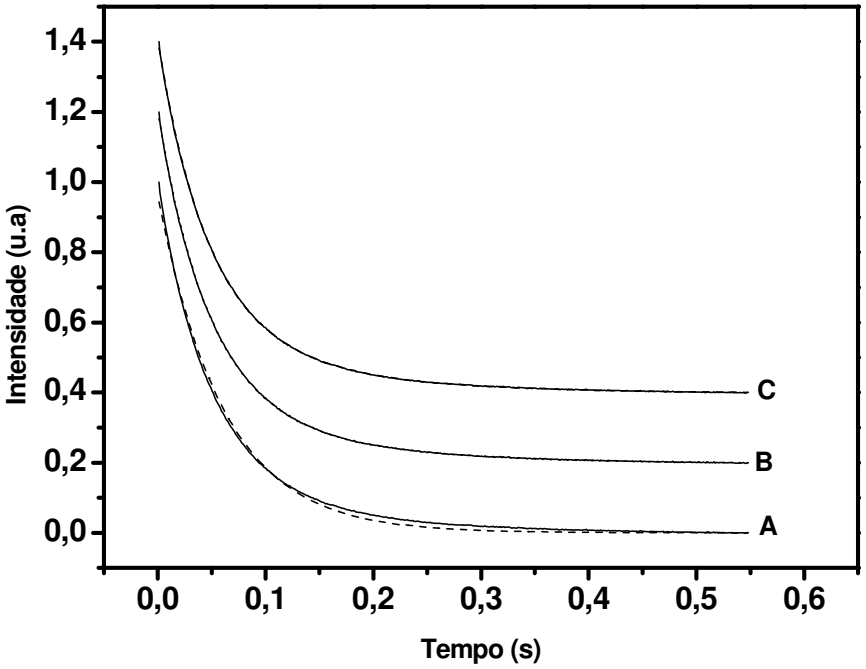

Figura 4.2: Curva do decaimento exponencial com o sinal de CPMG da amostra 67; linha cheia é do sinal CPMG e ajuste linha tracejada com os ajustes monexponencial (A), biexponencial (B) e triexponencial (C);para a amostra 67.

A tabela 4.1 mostra os valores do ajuste monoexponencial (T_2) e biexponencial ($T_{2,1}$ e $T_{2,2}$) e suas respectivas áreas (A_1 e A_2), para as amostras 67, 79 e 83. Como pode-se ver há uma diferença entre os T_2 medidos com cada ajuste, sendo que o valor do ajuste monoexponencial tende a ficar mais próximo do valor do ajuste biexponencial, com maior área. Por exemplo, para a amostra 67, o ajuste

monoexponencial foi de 0,058s e o de maior área (A_1) no ajuste biexponencial foi de 0,045s, ou seja, fica distante do $T_{2,2}$ que é 0,119s. No caso da amostra 83, as duas áreas foram quase iguais (~ 0,5) e o valor do ajuste monoexponencial ficou próximo do valor médio entre os dois tempos do ajuste biexponencial (0,042).

Tabela 4.1: Os valores de T_2 e áreas para os ajustes monoexponencial e biexponencial para as amostras 67, 79 e 83

Amostras	Ajuste monoexponecial	Ajuste biexponencial			
	T_2 (s)	$T_{2,1}$ (s)	$T_{2,2}$ (s)	A_1	A_2
67	0,058	0,045	0,119	0,769	0,235
79	0,051	0,032	0,061	0,320	0,689
83	0,042	0,029	0,052	0,554	0,459

A tabela 4.2 mostra os valores do ajuste triexponencial ($T_{2,1}$; $T_{2,2}$; $T_{2,3}$) e suas respectivas áreas (A_1, A_2, A_3). Isso foi usado, pois muitos trabalhos têm sugerido ajuste triexponenciais para carne de suíno. Os T_2 com maior contribuição (maior área) são: 0,061; 0,042 e 0,036s para as amostras 67, 79 e 83, respectivamente, apresenta a tendência que o ajuste monoexpeonencial com valores de 0,058; 0,051 e 0,042, respectivamente. No entanto, Os valores de T_2, de maior área, do ajuste triexponencial não se correlacionam com o biexponencial. Essas discrepâncias podem ser devido às características de cada sinal e o operador não tem como saber dessa discrepância, baseando-se apenas na qualidade do ajuste. Tanto os ajustes bi quanto o triexponenciais apresentaram R^2=0,999.

Tabela 4.2: Valores de T_2 e das áreas encontrados com o ajuste triexponencial, para as amostras 67, 79 e 83

Amostras	Ajuste triexponencial					
	$T_{2,1}$ (s)	$T_{2,2}$ (s)	$T_{2,3}$ (s)	A_1	A_2	A_3
67	0,029	0,040	0,061	0,222	0,064	0,732
79	0,003	0,042	0,072	0,036	0,643	0,351
83	0,003	0,036	0,065	0,040	0,762	0,237

Uma solução para eliminar a informação do operador quanto ao número de exponenciais a serem ajustadas, foi o desenvolvimento de um programa baseado na transformada inversa de Laplace (ILT) denominado CONTIN[59].

Esse método de análise, diferente dos ajustes multiexponenciais discretos, apresentados acima, fornece um espectro contínuo da distribuição dos tempos de relaxação, sem necessidade de intervenção do operador[59]. A figura 4.3 A ilustra os espectros dos tempos de relaxação das mesmas amostras da figura 4.1, 67,79, 83, obtido com programa Multiexp, baseado no algoritmo do CONTIN. Nesta figura e na tabela 4.3 podem-se ver que os espectros de relaxação (relaxometria) apresentam pelo menos três sinais, sendo o mais intenso, o sinal central, com T_2 de 0,051, 0,044 e 0,037s, para as amostras 67,79 e 83, respectivamente. Esses valores têm a mesma tendência dos valores obtidos pelos ajustes monoexpoenencial (0,058; 0,051 e 0,042s) e triexponencial (0,061; 0,042 e 0,036s) de maior área.

Os três sinais de relaxação (T_{21},T_{22} e T_{23}) da tabela 4.2 e 4.3, tem sido atribuídos, no caso de amostras de carne de suínos[51,52], à água associada à macromoléculas, T_{21}, fração mais rápida (T_2~1-10ms); oT_{22}, a fração intermediária

(T_2~40-60ms),a água aprisionada dentro da rede miofibrilar; e o$T_{23,}$ a água extra-miofibrilar, (T_2~150-400ms). Essa componente T_{23} segundo alguns estudos está relacionada com a capacidade de retenção de água (CRA).[51]

Como a transformada inversa de Laplace é muito sensível ao nível de ruído, fez-se também o espectro de relaxometria de T_2, em função do parâmetro de regularização α. O parâmetro α atua como um filtro passa baixa, reduzindo as incertezas da transformada inversa de Laplace, mas alargando os sinais. Neste programa, o parâmetro α é escolhido pelo operador, o que pode levar a sinais espúrios ou inexistentes, quando igual a zero (0) ou pequenos valores, enquanto que o emprego de valores muito altos, pode sobrepor os sinais de relaxação que são distinguíveis pela técnica de RMN[61]. Na tabela 4.3 estão os valores de T_2 e as respectivas áreas calculadas com $\alpha = 0$ e $\alpha = 1.10^{-3}$, para as amostras 67, 79 e 83.

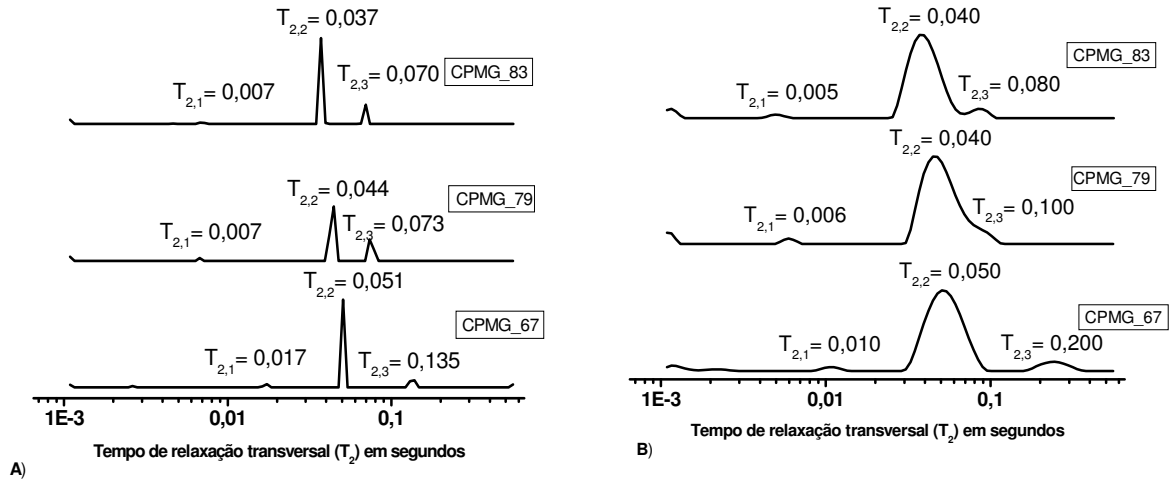

Figura 4.3: Espectros dos tempos de relaxação T_2, para as amostras 67, 79 e 83 obtidos com o programa CONTIN α=0 (A) e α= 1.10^{-3} (B).

Tabela 4.3:Valores de T_2 e das áreas encontrados para os valores de α = 0 e α = 1.10^{-3} das amostras 67, 79 e 83

Amostras	T_2 , α = 0 e α = 1.10^{-3}			área, α = 0, e α = 1.10^{-3}		
	$T_{2,1}$; $T_{2,1}$ (s)	$T_{2,2}$;$T_{2,2}$ (s)	$T_{2,3}$;$T_{2,3}$ (s)	A_1; A_1	A_2; A_2	A_3; A_3
67	0,017;0,010	0,051;0,050	0,132;0,200	0,05; 0,12	0,79;0,88	0,12;0,20
79	0,007;0,006	0,044;0,040	0,073;0,100	0,03; 0,20	0,67;0,95	0,30;0,12
83	0,007;0,005	0,037;0,040	0,070;0,080	0,03; 0,12	0,89;0,89	0,20;0,25

Como pode-se ver nesta tabela tanto os valores de T_2 quanto da área do sinal podem variar em função de α. Assim, os resultados do programa de processamento CONTIN apresentam também limites de confiança, que dependem de vários fatores[59]:

a) Separação dos tempos de relaxação;

b) Relação sinal/ruído dos espectros,

c) Parâmetro de regularização (sub ou sobre regularização);

d) Concentração dos constituintes da amostra.

Como se demonstrou acima, esses métodos de ajustes multiexponenciais, tem muita influência do operador. Além disso, também dependem do assinalamento dos tempos de relaxação as respectivas mudanças nas propriedades da carne. Esses problemas foram parcialmente superados com o uso de métodos de reconhecimento de padrões, denominado na química como métodos quimiométricos, que serão apresentados a seguir.

4.2. Análises Quimiométricas

Como descrevemos anteriormente os métodos multiexponenciais, além da dependência de parâmetros fornecidos pelo operador, necessitam de se correlacionar os tempos de relaxação com as propriedades da carne. Assim, tanto os dados de CPMG quanto os de CWFP foram analisados com métodos quimiometricos, como PCA, HCA e PLS.

Diferentemente dos métodos multiexponenciais, os métodos quimiométricos têm pouca ou nenhuma interferência do operador e podem analisar todas as informações espectrais, não apenas alguns parâmetros espectrais, como por exemplo, o tempo de relaxação transversal e sua área. Eles podem ser usados tanto para uma análise exploratória de um conjunto de dados, como a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA), quanto para medidas quantitativas, baseados, por exemplo, na regressão multivariada pelos métodos dos mínimos quadrados parciais (PLS). Além desses métodos existem vários outros que não serão usados neste trabalho como as análises por redes neurais, decomposição de valores singulares entre outros.

A Análise de Componentes Principais (PCA) é uma ferramenta estatística que pode ser usada tanto para a visualização de similaridades ou diferenças de um conjunto de dados, quanto para reduzir a sua dimensionalidade. É um método que condensa as informações mais relevantes nos primeiros componentes principais (PCs) e as menos importantes ou irrelevantes nos últimos PCs. Assim pode-se reduzir a dimensionalidade dos dados usando se apenas os primeiros PCs e não todos os dados.

Os PCs são apresentados em ordem decrescente de variância e cada novo PC é ortogonal ao anterior (ou seja sem correlação). Assim, a primeira componente principal (PC1) descreve a maior variância dos dados do que as componentes subseqüentes (PC1 > PC2 > PC3... > PCn.). A variância está relacionada com a quantidade de informações dos dados originais que é descrita pelas componentes principais[60].

O PCA decompõe a matriz de dados originais X, com m amostras e n dados por amostras (X = m x n) em duas outras matrizes S e L. A matriz de escores S, é uma matriz ortogonal de autovetores das linhas da matriz X e a matriz de pesos L, é uma matriz ortogonal de coeficientes. Ou Seja, **X (m x n)** = $S.L^T$, onde L^T é a matriz L transposta [60,61]. A matriz S contém as informações das interações entre as amostras e a matriz L indica quais variáveis são as mais importantes e que contribuem para cada componente principal.

Como não é possível visualizar todos os dados da matriz S, utilizam-se apenas os dados que contêm maior variância, ou seja, os primeiros PCs. Assim é possível se gerar gráficos bidimensionais entre os dados do PC1 e PC2, PC1 e PC3 etc. Em um gráfico de escores S, de PC1 versus PC2, por exemplo, todos os espectros são apresentados no gráfico como pontos em suas coordenadas ao longo de PC1 e PC2[61].

Os gráficos de pesos L descrevem a relação entre as variáveis no novo espaço do componente principal e ao espaço espectroscópio original. Estes gráficos fornecem uma ligação entre a interpretação estatística e espectroscópica dos fenômenos no conjunto[61].

A Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) possui como principal objetivo apresentar os dados de maneira que se enfatize o agrupamento natural, ou

seja, interliga as amostras por suas associações, produzindo um dendrograma onde as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si, esse agrupamento é observado de acordo com o grau de similaridade, que varia entre 0,0 e 1,0. O grau de similaridade recomendável para aceitação de uma análise é de até 0,6, pois com o grau de similaridade igual a 1,0 nenhum grupo é formando, ou seja, só a própria amostra é igual a ela mesma. A suposição básica de sua interpretação é que quanto menor a distância entre os pontos, maior a semelhança entre as amostras[60]

4.2.1 Análise dos dados de CPMG por Quimiometria

Os dados de CPMG foram analisados por meio de diversas combinações entre as amostras, levando-se em consideração os grupos genéticos, sexo dos animais e corte na região da 12ª costela da 6ª costela de um mesmo animal.

Primeiramente, analisaram-se as similaridades ou diferenças entre os dados coletados da 12ª e da 6ª costelas de um mesmo animal. Os dados foram centrados na média e utilizou-se 4 componentes principais (98% da variância acumulativa). A matriz X (desses dados) continha os dados de CPMG das 198 amostras de carne bovina e com 500 dados (ecos), (X = 198 x 500). Na figura 4.4 está o gráfico de escores entre PC1 e PC2, que representam 97,1% da variância total dos dados. Nessa figura pode-se observar que não há diferença significativa entre os dados de CPMG obtidos com as amostras dos dois cortes para os mesmos animais (dados da 6ª e da 12ª estão sobreposto). Isso pode ser devido a: os animais eram jovens; tinham idade muito próxima (18 a 24 meses), tiveram mesmo manejo

(alimentação, confinamento, etc) e foram abatidos com uma espessura de gordura de aproximadamente 3mm. Também pode ser que as características das amostras coletadas na região da 6ª e na 12ª costela do mesmo animal sejam muito parecidas.

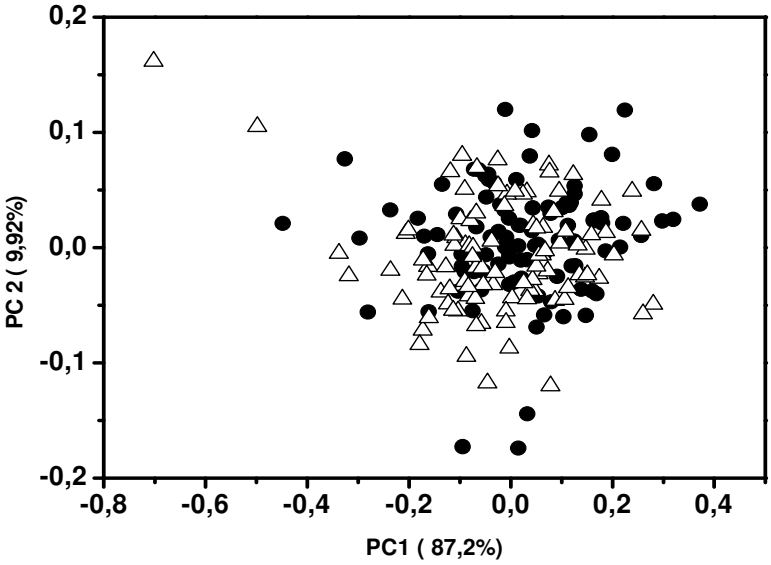

Figura 4.4: Gráfico de escores dos dados de CPMG para todas as amostras da região da 12ª costela (△) e 6ª costela (●).

Os dados de CPMG das amostras dos dois cortes (12ª e 6ª costela) também foram analisados separadamente e considerando o grupo genético e o sexo dos animais.

A figura 4.5 (A) e (B) mostra os gráficos de escores realizados com os dados de CPMG da 12ª costela e da 6ª costela, respectivamente. Ambas as amostras foram separadas em seis classes (AXF, AXM, BXF, BXM, CXF, CXM). Em todos os PCAs realizados o grupo genético da mãe (TA e TS) foi desprezado, pois, observou-se que ele não influenciava nos resultados.

Para a análise dos dados de CPMG da figura 4.5 (A) e (B), os dados foram centrados na média e utilizou-se 3 componentes principais com uma variância

acumulativa de 98,4% e 98,3%, respectivamente. As componentes PC1 e PC2 da figura 4.5 (A) e (B) representam 97,2% e 97,8% da variância total dos dados.

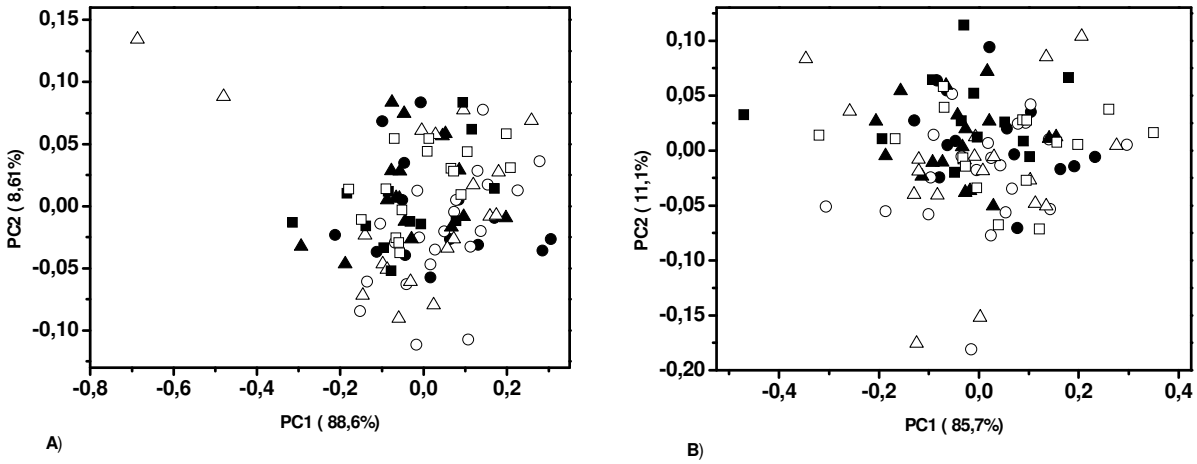

Figura 4.5: Gráficos de escores dos dados de CPMG de amostras de animais AXF (●); AXM (○); BXF (▲); BXM (△); CXF (■); CXM (□), para a 12ª (A) e 6ª (B) costela, respectivamente.

Como observa-se na figura 4.5 (A) e (B) os dados de CPMG das amostras da 12ª e da 6ª costela também não apresentaram grande separação para o grupo genético do pai e sexo dos animais. Na figura 4.5 (A) observa-se que dois dados referente ao grupo BXM distinguem-se dos demais e na figura 4.5 (B) também observa-se dois dados do grupo BXM e um dado do grupo AXM fora do agrupamento central (outliers). Isso pode estar ocorrendo devido ao teor de gordura ser maior e/ou menor do que as outras amostras, ou que essas amostras apresentaram algum problema de manipulação, etc.

Realizou-se a mesma análise, mas com a separação em duas classes (M e F) dos dados de CPMG referente aos dois cortes (12ª e 6ª costela), como mostra a figura 4.6 (A) e (B). Com os dados centrados na média e 3 componentes principais foram utilizados com uma variância acumulativa de 98,4% e 97,3%,

respectivamente. As componentes PC1 e PC2 da figura 4.6 (A) e (B) representam 96,4% e 96,2% da variância total dos dados.

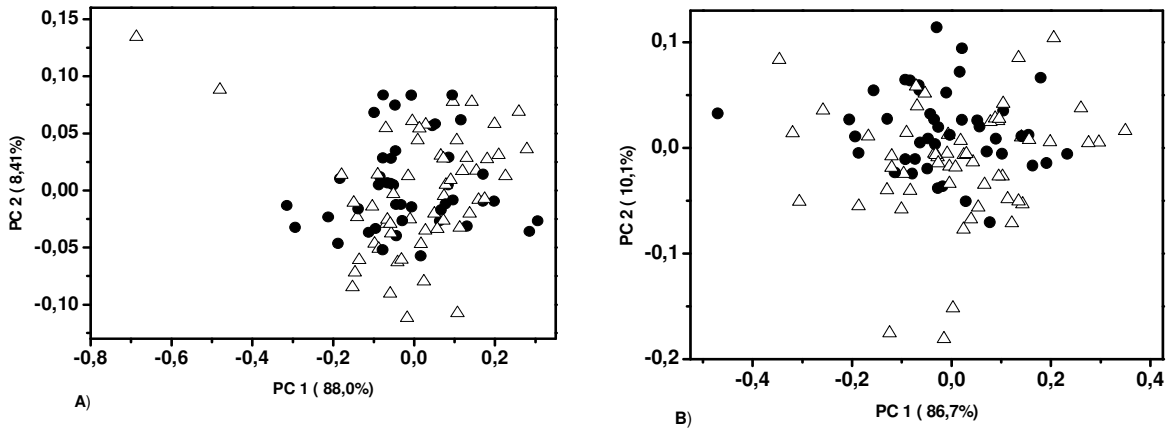

Figura 4.6: Gráficos de escores dos dados de CPMG de amostras de animais fêmeas (●) e machos (△) para a 12ª (A) e da 6ª (B) costela, respectivamente.

Pode-se observar que não houve separação significativa entre machos e fêmeas com os dados de CPMG de todas as amostras dos cortes da 12ª e da 6ª costela. Na figura 4.6 (A) apenas dois dados referentes aos animais machos distinguem-se do agrupamento central e (B) apenas três dados também dos animais machos se separam dos demais.

Em seguida, realizou-se uma comparação dos dados de CPMG dos animais do mesmo grupo genético do pai e separado pelo sexo (machos e fêmeas). Foram analisados os dados de CPMG dos AXM e AXF; BXM e BXF; e CXM e CXF.

Na figura 4.7 (A) e (B) estão os gráficos de escores dos dados de CPMG para os animais BX. Os dados foram centrados na média e 3 componentes principais foram utilizados com uma variância acumulativa de 98,9% e 98,3%, respectivamente. As componentes PC1 e PC2 da figura 4.7 (A) e (B) representam 97,9% e 96,4% da variância total dos dados, respectivamente. Como pode-se

observar não houve distinção entre os dados dos animais BX separados pelo sexo. O mesmo ocorreu para os animais AX e CX.

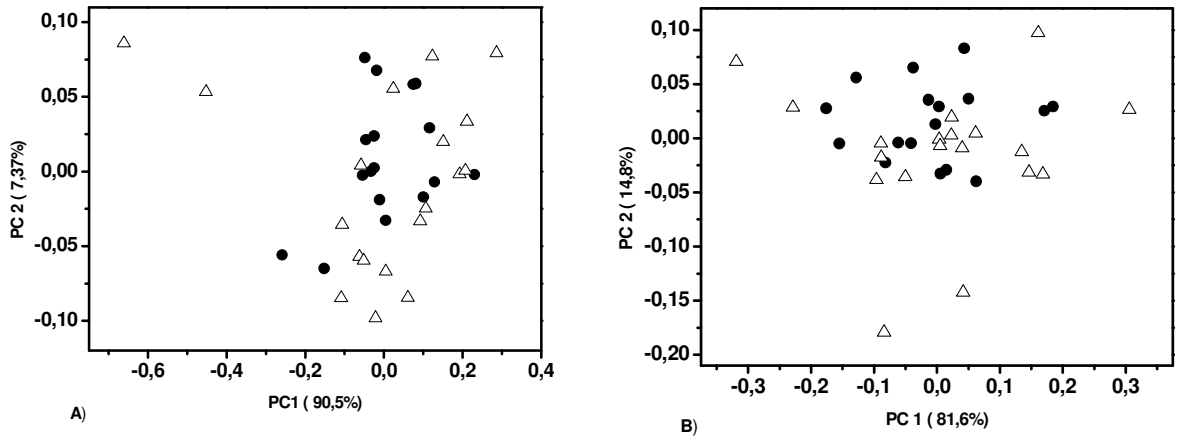

Figura 4.7: Gráficos de escores dos dados de CPMG de amostras de animais BX de fêmeas (●) e machos (△) para a 12ª (A) e da 6ª (B) costela, respectivamente.

Também realizou-se a análise com os três grupos genéticos (AX, BX e CX) para animais do mesmo sexo. O objetivo seria observar se os dados de CPMG continham alguma diferença entre as raças dos animais, pois, a raça Angus (AX) é uma raça que acumula mais gordura do que a raça Bonsmara (BX) e do que a raça Canchim (CX).

As figuras 4.8 (A) e (B), mostram os gráficos de escores para os dados de CPMG referentes aos dois cortes (12ª e 6ª costela) dos animais machos e separados em três classes (AX, BX, CX). Os dados foram centrados na média e utilizou-se 3 componentes principais com uma variância acumulativa de 99,2% e 99,1%, respectivamente. As componentes PC1 e PC2 da figura 4.8 (A) representam 98,6% e da B 97,8% da variância total dos dados. Como pode-se ver os dados de CPMG também não permitiram qualquer separação pelo grupos genéticos dos pais.

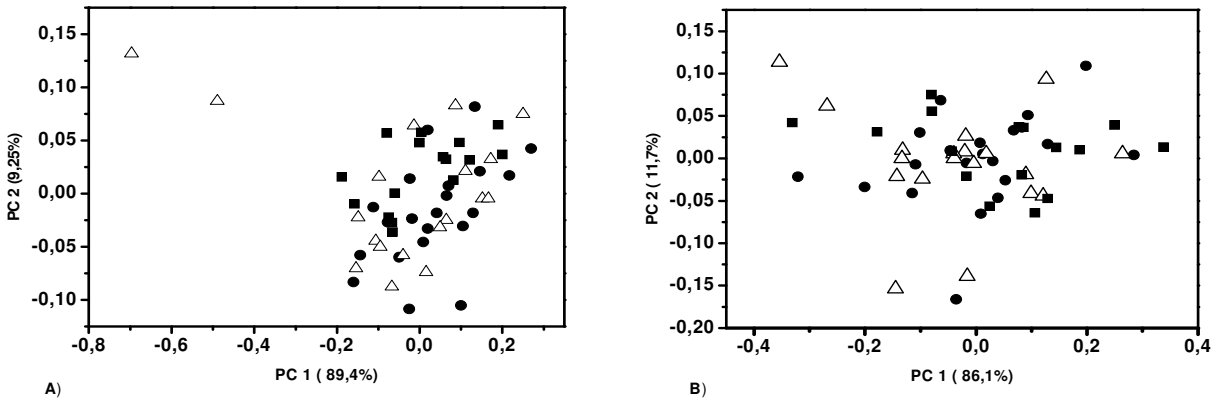

Figura 4.8: Gráficos de escores dos dados de CPMG de amostras de animais machos do AX (●); BX (△) e CX (■) para a 12ª (A) e da 6ª (B) costela, respectivamente.

A mesma análise foi realizada com os dados de CPMG para as fêmeas, para os três grupos genéticos (AX, BX, CX). Nesse PCA, os dados foram centrados na média e 3 componentes principais foram utilizados, com uma variância acumulativa de 97,8% e 98,2%, respectivamente. Os componentes PC1 e PC2 representam 95,7% e 96,1% da variância total dos dados. Pode-se observar na figura 4.9 (A) e (B) que os dados de CPMG não apresentaram separação ,entre as fêmeas.

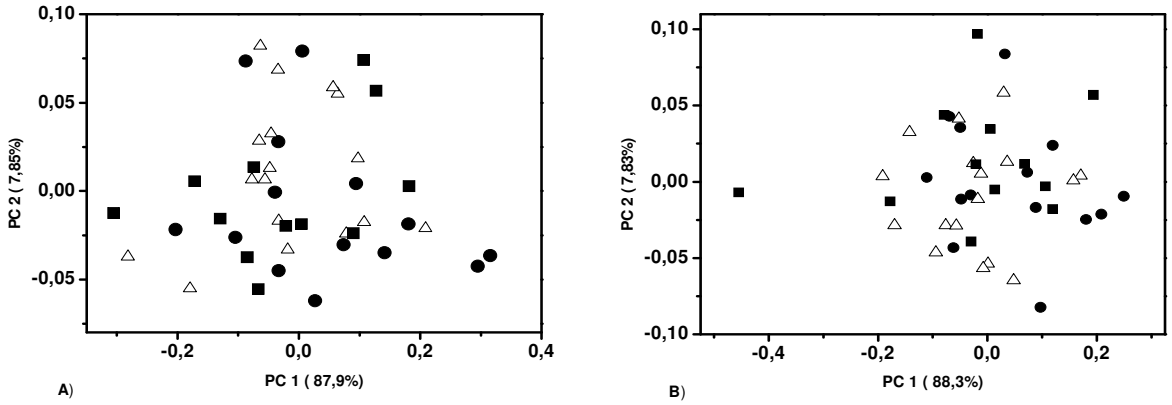

Figura 4.9: Gráficos de escores dos dados de CPMG de amostras de animais fêmeas do AX (●); BX (△) e CX (■) para a 12ª (A) e da 6ª (B) costela, respectivamente.

4.2.2 Analise dos dados de CWFP por Quimiometria

O sinal de RMN obtido pela técnica de CWFP é muito mais complexo do que o de CPMG, pois contém três regimes distintos e informações tanto de T_1 quanto de T_2. A figura 4.10 ilustra um gráfico de CWFP de uma amostra de carne bovina retirada da 6ª costela de um animal AXF. Os dados do sinal de CWFP somente foram analisados pelos métodos quimiométricos, da mesma forma que os dados de CPMG.

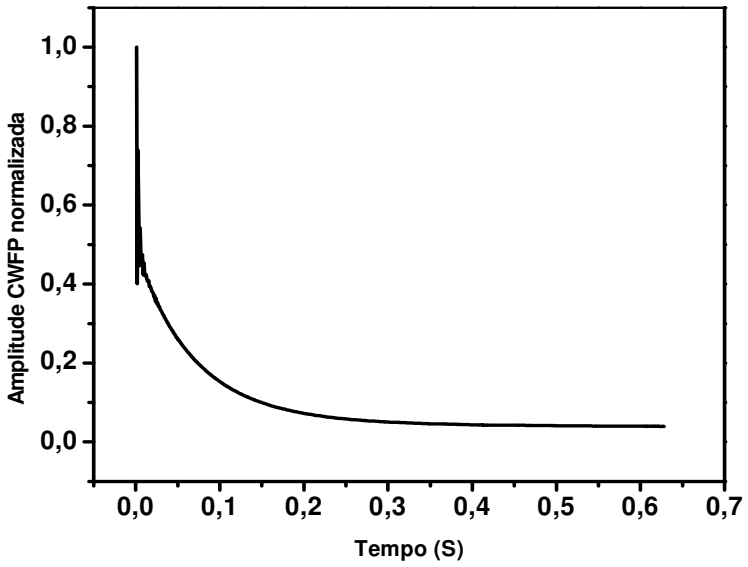

Figura 4.10: Espectro de CWFP de uma amostra de carne bovina.

Na figura 4.11 está o gráfico de escores para as amostras de todos os animais e separados pelas amostras da região da 12ª e 6ª costela. A matriz X contém 198 x 700 elementos, que foram centrados na média, utilizando 4 componentes principais com uma variância acumulativa de 90,7%, sendo que as componentes PC1 e PC2 representam 85,2% da variância total dos dados das

amostras. Assim, como no caso dos dados de CPMG, não se observa diferença significativa entre as amostras dos dois cortes.

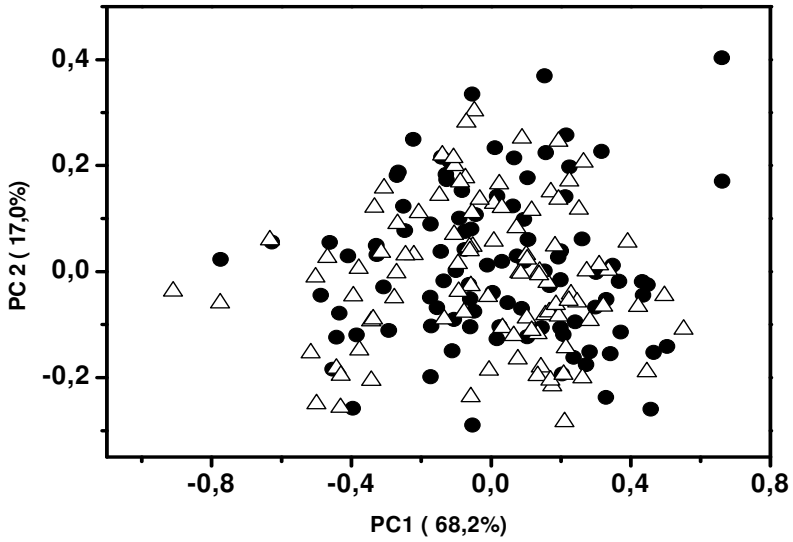

Figura 4.11: Gráfico de escores dos dados de CWFP para todas as amostras da região da 12ª costela (△) e 6ª costela (●).

Na figura 4.12 (A) e (B) mostram os gráficos de escores dos dados de CWFP para as amostras da 12ª e 6ª costela, separadas por seis classes (AXF, AXM, BXF, BXM, CXF, CXM). Assim como no caso do CPMG os grupos genéticos da mãe (TA e TS) também foram desprezados. Os dados foram centrados na média e 3 componentes principais foram utilizados com uma variância acumulativa de 94,8% e 89,9%, respectivamente. As componentes PC1 e PC2 representam 86,4% e 85,0% da variância total dos dados.

Diferentemente das análises por CPMG pode-se observar uma boa separação entre as fêmeas e machos do grupo CX, para ambos os cortes. Também houve uma separação parcial entre os grupos AX e CX machos para a amostra da 12ª costela. Isso pode ser melhor visualizado nas figuras 4.14 e 4.16, onde são apresentados somente os grupos CXM e F e AXM e CXM, respectivamente. Os

outros grupos de machos e fêmeas e entre os grupos genéticos não houve separação.

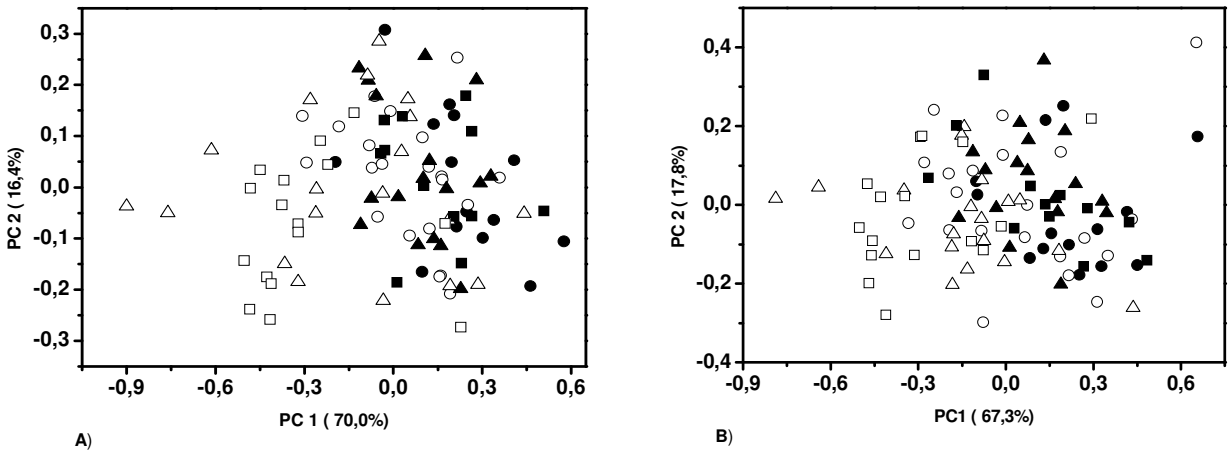

Figura 4.12: Gráficos de escores dos dados de CWFP de amostras de animais AXF (●); AXM (○); BXF (▲); BXM (△); CXF (■); CXM (□), para a 12ª (A) e 6ª (B) costela, respectivamente.

Na figura 4.13 (A) e (B) estão os gráficos dos escores dos dados de CWFP para os dois cortes (12ª e 6ª costela), separados em duas classes (M e F). Os dados foram centrados na média e 3 componentes principais foram utilizados com uma variância acumulativa de 95,2% e 90,0%, respectivamente. As componentes PC1 e PC2 representam 86,5% e 85,5% da variância total dos dados. Com a análise dos dados de CWFP observa-se uma alguma separação entre fêmeas e machos para os cortes da 12ª e 6ª costela, diferentemente do que acontece com os dados de CPMG, onde não se obteve nenhuma separação. Neste caso os machos se agrupam na parte negativa de PC1 e as fêmeas na parte positiva de PC1.

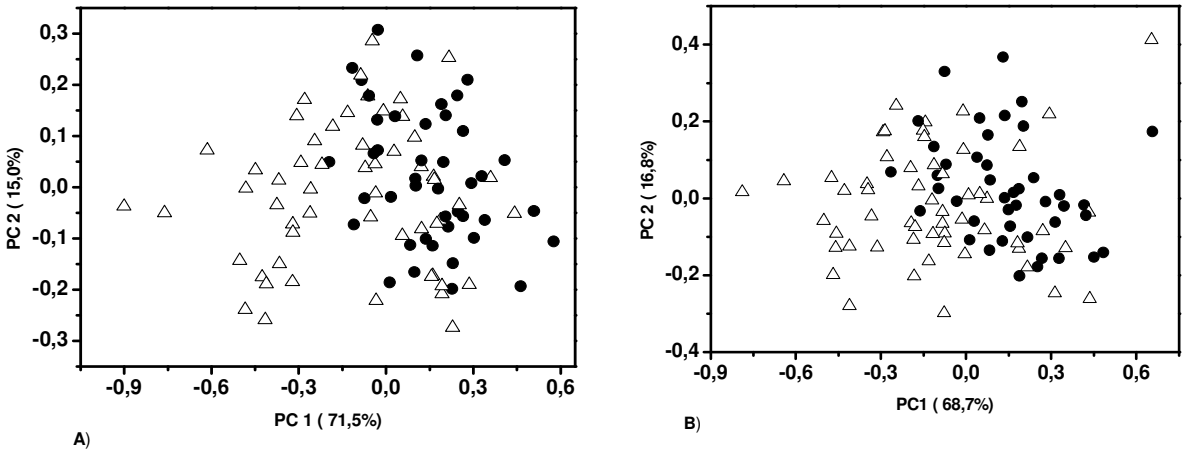

Figura 4.13: Gráficos de escores dos dados de CWFP de amostras de animais fêmeas (●) e machos (△) para a 12ª (A) e da 6ª (B) costela, respectivamente.

Para a análise dos dados da figura 4.14 (A) e (B), os dados foram centrados na média e utilizando 3 componentes principais, com uma variância acumulativa de 97,0% e 92,3%, respectivamente. As componentes PC1 e PC2 representam 86,5% e 87,2% da variância total dos dados.

Na figura 4.14 (A) e (B) estão os gráficos de escores dos dados de CWFP para os dois cortes (12ª e 6ª costela), separados em duas classes fêmeas e machos. Nessa figura pode-se observar uma boa separação entre os machos e fêmeas do grupo genético CX, principalmente para amostras coletadas na região da 12ª costela. Os machos se encontram principalmente nos valores negativos do PC1 e as fêmeas nos positivos.

Como houve essa separação pelo PCA (Figura 4.14) fez-se também a análise desses dados por HCA (figuras 4.15 A e B). Nessas figuras observa-se a formação de 4 grupos, para um índice de similaridade 0,7. Para as amostras da 12ª costela (A) observa-se que quase todos os CXM ficaram na parte superior do dendrograma. Apenas 2 machos se misturaram com as fêmeas CXF, na parte inferior. Assim, como observado no PCA, a análise dos dados de CWFP por HCA

permitiu uma boa separação entre os sexos dos animais. Para a 6ª costela (B), houve uma menor separação que a observada na 12ª costela (A).

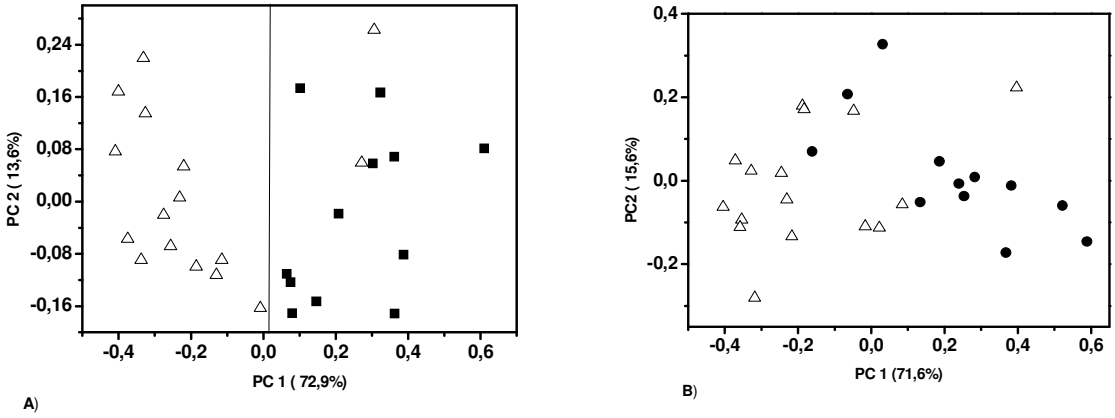

Figura 4.14: Gráficos dos escores dos dados de CWFP de amostras de animais CXF (●) e CXM (△), para a 12ª (A) e 6ª (B) costela, respectivamente.

Na figura 4.16 (A) e (B) estão os gráficos de escores para a 12ª e 6ª costela para as amostras AXM e CXM. Os dados foram centrados na média e utilizou-se 3 componentes principais com uma variância acumulativa de 92,5% e 91,9%, respectivamente. As componentes PC1 e PC2 da figura 4.16 (A) e (B) representam 87,1 e 83,9% da variância total dos dados. Para ambos os cortes o grupo genético CX encontra-se principalmente no lado dos valores negativos de PC1. A separação para as amostras da 12ª costela (A) foi melhor do que para a 6ª costela (B). Os resultados de HCA, não apresentados, também foram similares aos obtidos com PCA.

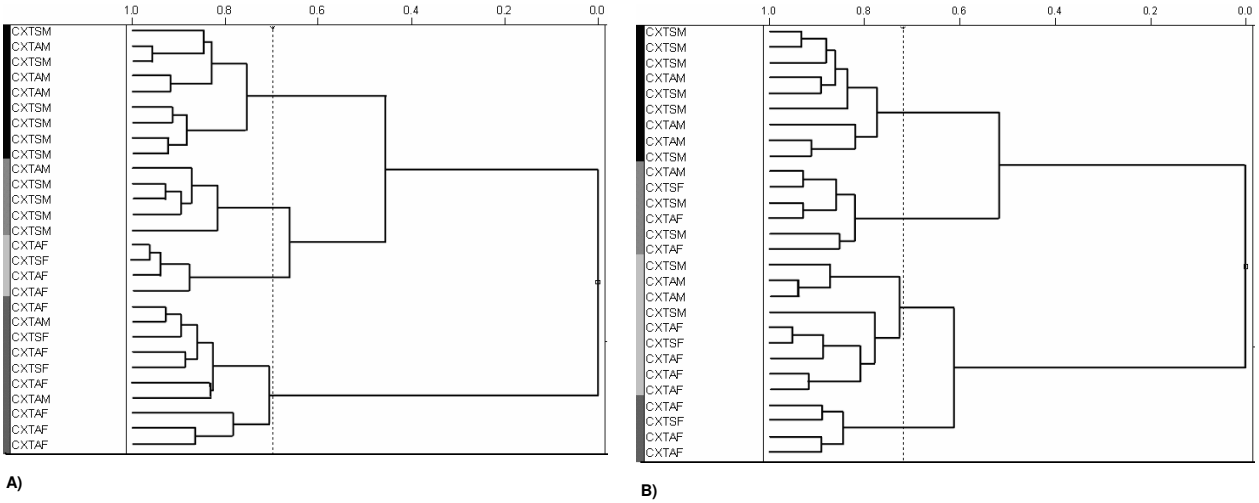

Figura 4.15: Dendrograma dos dados de CWFP das amostras do grupo CXM e CXF para a 12ª costela (A) e 6ª costela (B).

Com isso os dados de CWFP apresentaram maior poder de discriminação para as amostras CX, separadas por sexo CXM e F para as amostras AXM e CXM, do que os dados de CPMG. Isso pode ser devido ao fato dos dados de CWFP ter dependência tanto de T_1 quanto T_2 e os do CPMG apenas de T_2. Uma hipótese para a separação das amostras CXM e CXF e AXM e CXM poderia ser a gordura intramuscular. No caso do CXM e CXF, as fêmeas acumulam mais gordura e no caso AXM e CXM, o AX acumula mais gordura do que o grupo CX. Essa diferença no teor de gordura intramuscular também poderia explicar, por exemplo, porque não houve separação entre CXM e BXM e entre AXM e BXM, já que eles são mais parecidos neste parâmetro.

Para melhor entender o motivo da separação das fêmeas e dos machos da raça Canhim (CX) pela técnica CWFP (e não pela CPMG) fez-se uma análise de componentes principais (PCA) de alguns parâmetros físico-químicos, como pH, CRA, PPC, quantidade de gordura intramuscular e EGAOL coletados de amostras da 12ª costela. Fez-se também uma regressão multivariada com o método

de mínimos quadrados parciais (PLS) dos dados de CPMG e CWFP com esses parâmetros físico-químicos.

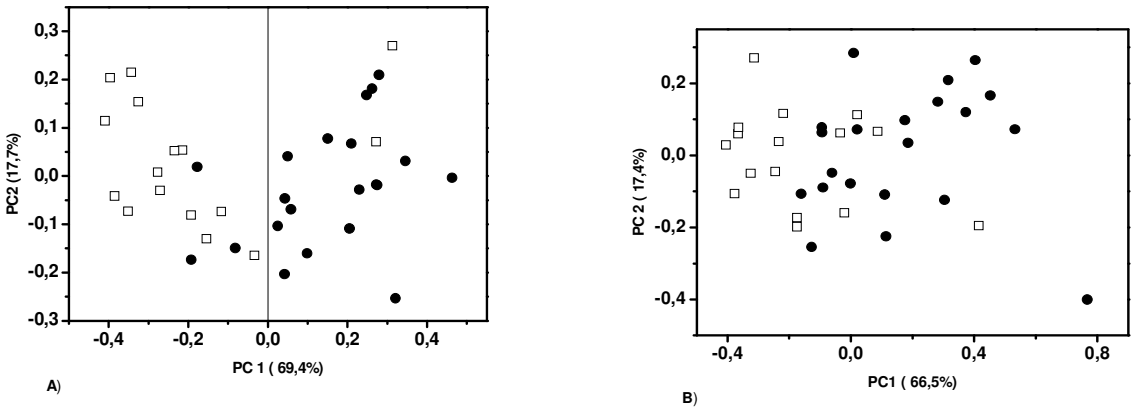

Figura 4.16: Gráficos dos escores dos dados de CWFP de amostras de animais AXM (●) e CXM (□), para a 12ª (A) e 6ª (B) costela, respectivamente.

4.2.2.1 Análise dos fatores de separação do grupo CXM e CXF

4.2.2.1.1 PCA dos dados físico-químicos da 12ª costela para CXM e CXF

Fez-se a análise de PCA com os dados de perda por cocção (PPC), pH, gordura intramuscular extraída, capa de gordura (EGAOL) e capacidade de retenção de água (CRA) para ver a diferenciação entre as amostras coletadas na região da 12ª costela dos animais CXM e CXF.

A figura 4.17 (A) mostra o gráfico de escores (PC1 e PC2) com todos os parâmetros físico-químicos analisados. Os dados foram centrados na média,

utilizando 3 componentes principais com uma variância acumulativa de 97,2%, sendo que a componente PC1 e PC2 representam 80,3% da variância total dos dados. Essa figura não mostra uma boa separação entre os sexos. A figura 4.17 (B) mostra o gráfico dos pesos de cada variável que contribui ou não para a separação.

No gráfico dos pesos (figura 4.17B) observa-se que o PPC que está na parte positiva de PC1 é responsável pelas amostras (figura 4.17A) que estão entre os valores de PC1 (10 a 20); já o pH, EGAOL e gordura intramuscular extraída, são responsáveis pelas amostras (figura 4.17A) que estão próximas do valor zero de PC1 e a CRA é responsável pelas amostras que se encontram na parte superior da figura 4.17A. No PCA observa-se 5 machos no lado das fêmeas e duas fêmeas no lado dos machos.

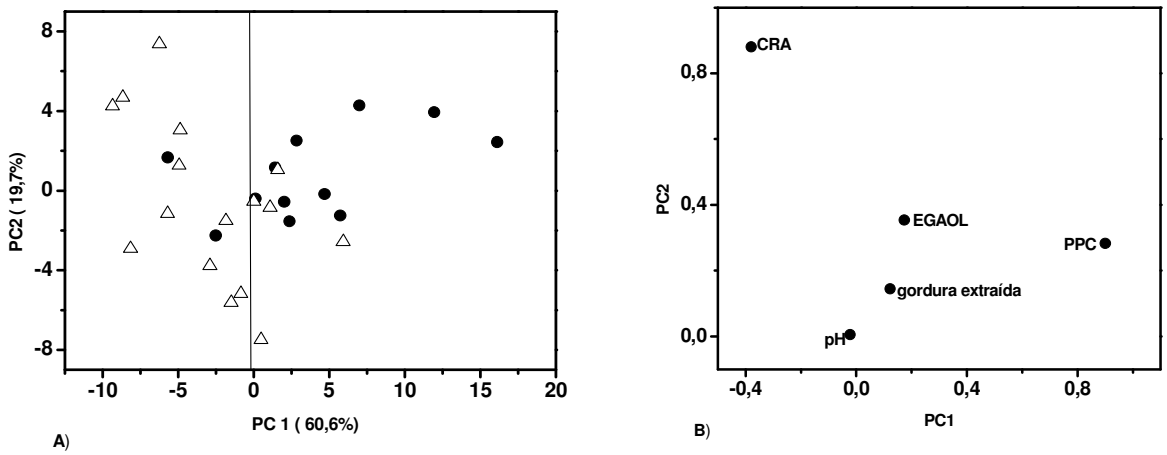

Figura 4.17: Análise de Componentes Principais. PC1 versus PC2 de fêmeas (●) e machos (△) das amostras da 12ª costela do grupo genético CX obtidas pelos métodos convencionais, gráfico de escores (A) e pesos (B).

Os dados acima também foram analisados por HCA. No dendrograma da figura 4.18, observa- se a formação de 5 grupos, com índice de similaridade de 0,65, onde a parte superior fica a maioria dos machos e na parte inferior as fêmeas.

Assim, como é observado no gráfico de escores da figura 4.17A há uma sobreposição no dendrograma, entre machos e fêmeas.

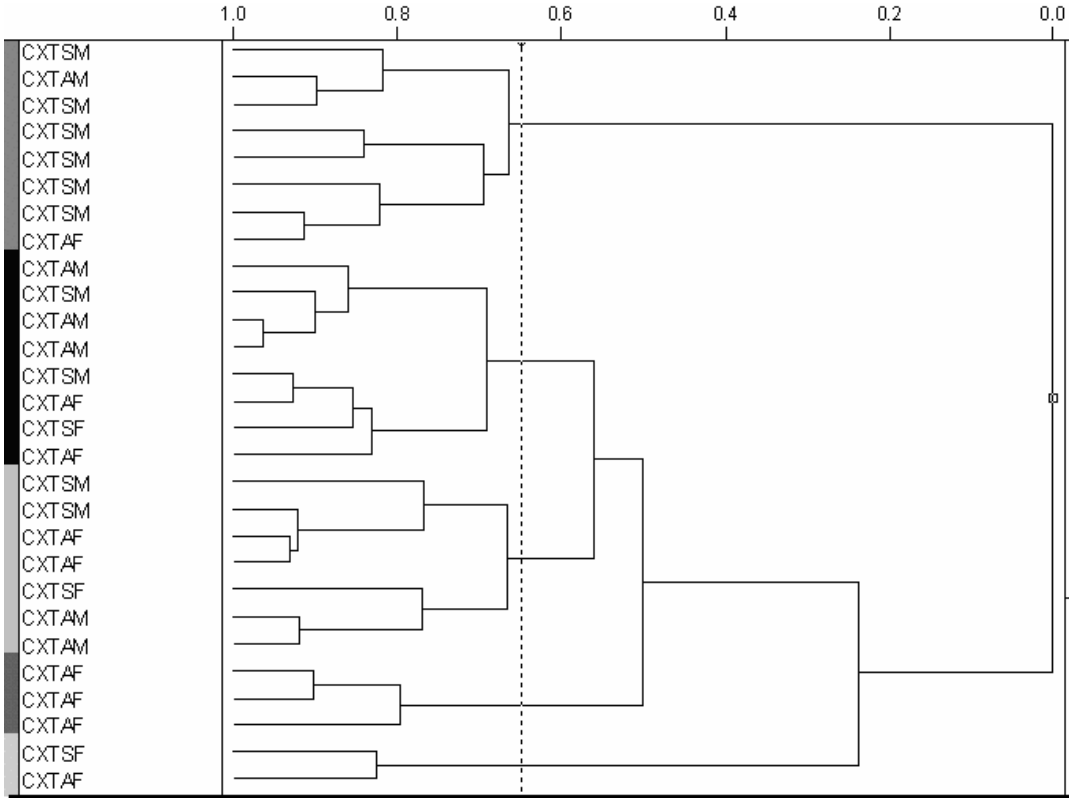

Figura 4.18: Dendrograma dos parâmetros físico-químicos para as amostras do grupo CXM e F.

Fez-se também a análise de PCA com a retirada de um dos parâmetros de cada vez, para observar se algum deles influenciava na separação. Fez-se a análise com os parâmetros:

- CRA, PPC, gordura extraída, pH;
- PPC, gordura extraída, EGAOL, pH;
- CRA, PPC, EGAOL, pH;
- CRA, gordura extraída, EGAOL, pH;
- CRA,PPC, gordura extraída, EGAOL.

Na figura 4.19 estão as analises de PCA e HCA sem a EGAOL. Para o PCA (A), os dados foram autoescalados e utilizou-se 3 componentes principais com uma variância acumulativa de 82,0%, onde as componentes PC1 e PC2 descrevem 70,7% da variância total dos dados. Para o HCA (B) os dados foram autoescalados, houve a formação de 4 grupos de acordo com o grau de similaridade (0,55) entre as amostras. Tanto no PCA quanto no HCA há uma sobreposição entre machos e fêmeas. No caso do PCA há a sobreposição de 3 machos e 2 fêmeas. E no HCA essa sobreposição é maior em relação machos e fêmeas.

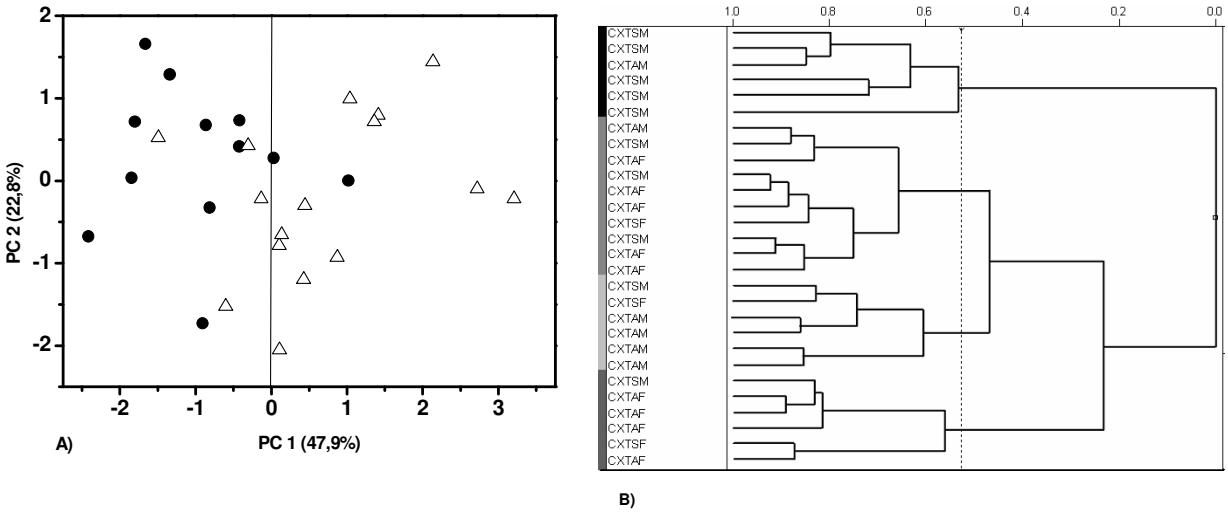

Figura 4.19: Gráfico de escores (A) e dendrograma (B) sem o EGAOL das amostras da 12ª costela do CX de fêmeas (●) e machos (△).

A figura 4.20 (A) e (B) mostram as análises sem a CRA com PCA e HCA respectivamente. No PCA os dados foram autoescalados e 3 componentes principais foram utilizados com uma variância acumulativa de 95,6%, onde as componentes PC1 e PC2 descrevem 90,9% da variância total dos dados. No HCA os dados também foram autoescalados, teve a formação de 5 grupos de acordo com o grau de similaridade (0,57) entre as amostras. Nesse caso também há

sobreposição de 4 machos e 3 fêmeas entre as amostras CXF e CXM. Isso ocorre tanto no PCA quanto no HCA.

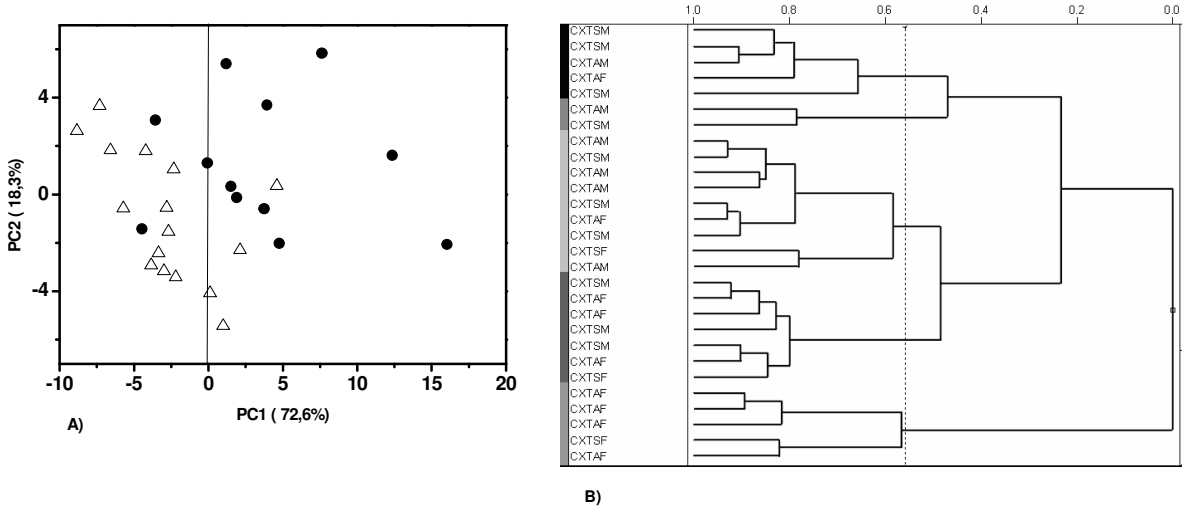

Figura 4.20: Gráfico de escores (A) e dendrograma (B) sem o CRA das amostras da 12ª costela do CX de fêmeas (●) e machos (△).

Na figura 4.21 está a análise realizada sem a gordura intramuscular extraída, apresentou boa distinção entre CXM e CXF. Os dados autoescalados foram analisados com PCA (figura 4.21A) e 3 componentes principais foram utilizados com uma variância acumulativa de 98,7%, sendo que a componente PC1 e PC2 representam 84,3% da variância total dos dados. Pelo gráfico dos pesos (figura 4.21B) os parâmetros pH e CRA são responsáveis pela separação dos machos que se encontram no lado positivo de PC1 e o PPC e EGAOL são responsáveis pelas fêmeas que se encontram na parte negativa de PC1. Nesse caso a gordura intramuscular extraída não teve muita importância na separação.

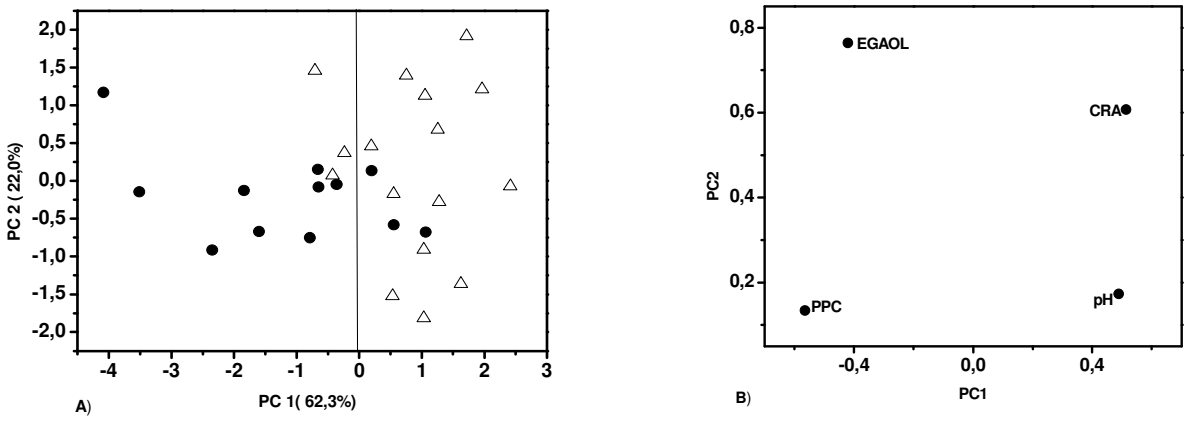

Figura 4.21: Gráfico de escores (A) e dos pesos (B) sem a gordura intramuscular extraída PC1 versus PC2 das amostras da 12ª costela do CX de fêmeas (●) e machos (△).

Essa separação também é observada no dendrograma (figura 22), onde os dados foram autoescalados e houve a formação de 4 grupos de acordo com o grau de similaridade (0,53) entre as amostras. A maioria dos machos estão na parte superior e tem sobreposição de três fêmeas e a maioria das fêmeas estão na parte inferior, com sobreposição de três machos.

Na figura 4.23 (A) e (B) estão as análise de PCA, sem o PPC. Os dados foram autoescalados e 3 componentes principais foram utilizados com uma variância acumulativa de 91,2%, sendo que as componentes PC1 e PC2 representam 84,3% da variância total dos dados. No gráfico de escores (A) há sobreposição de apenas 2 machos e 2 fêmeas.

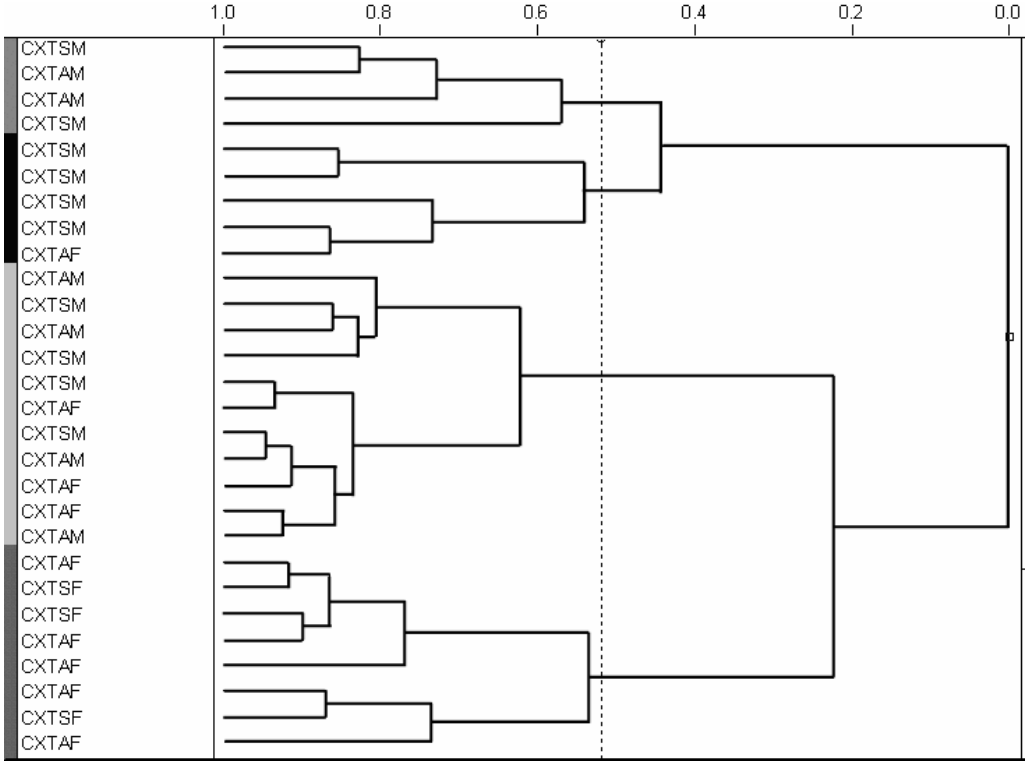

Figura 4.22: Dendrograma dos parâmetros físico-químicos sem a gordura intramuscular extraída para as amostras do grupo CXM e F.

Na figura 4.23 (B) observa-se que os parâmetros responsáveis pela separação das fêmeas são o EGAOL e a gordura intramuscular extraída, já a dos machos são o pH e a CRA. O PPC pode ser desprezado nesse caso para se obter uma boa separação.

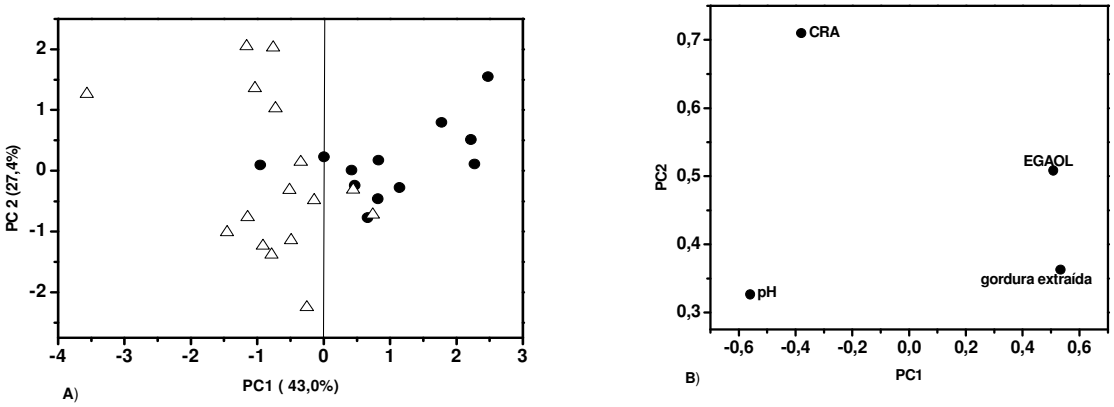

Figura 4.23: Gráfico de escores (A) e dos pesos (B) sem o PPC PC1 versus PC2 das amostras da 12ª costela do CX de fêmeas (●) e machos (△).

A análise de HCA (figura 4.24), dos dados foram autoescalados, sem o PPC, houve a formação de 4 grupos de acordo com o grau de similaridade (0,58) entre as amostras. Obteve-se uma boa separação com exceção de três fêmeas que ficaram na parte superior onde se encontra a maioria dos machos, na parte inferior do dendrograma se encontram a maioria das fêmeas, apenas quatro machos se juntaram no grupo das fêmeas.

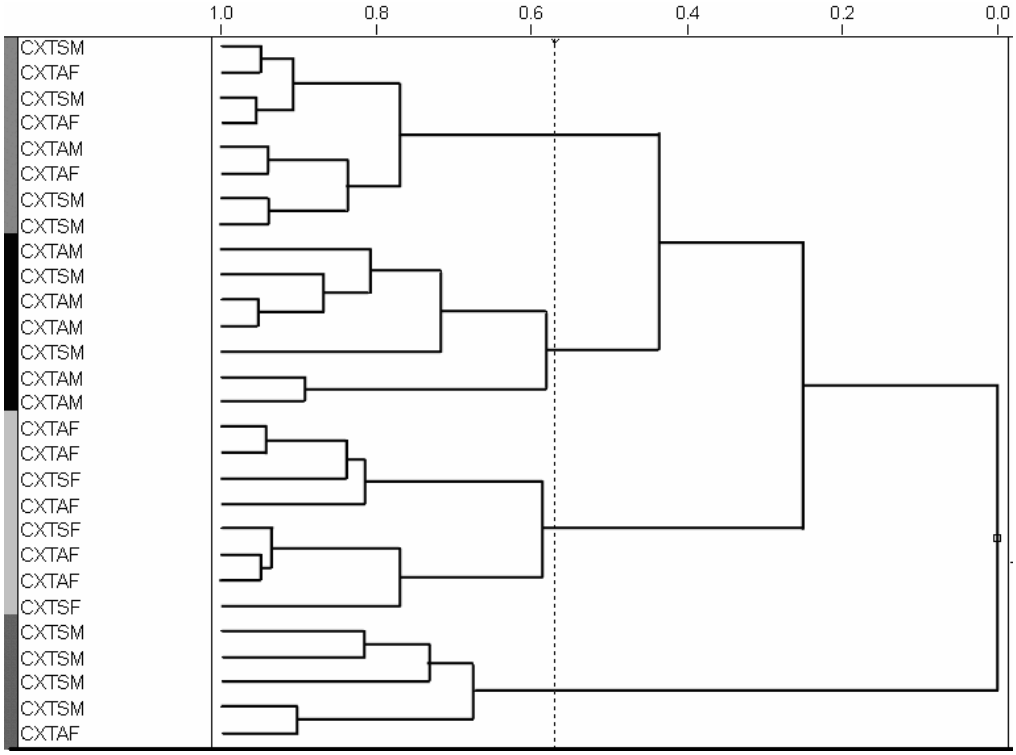

Figura 4.24: Dendrograma dos parâmetros físico-químicos sem o PPC para as amostras do grupo CXM e F.

Na figura 4.25 (A) e (B),.estão as análises de PCA realizadas sem o pH. Os dados foram autoescalados e 3 componentes principais foram utilizados com uma variância acumulativa de 90,5%, sendo que a componente PC1 e PC2 representam 84,3% da variância total dos dados. No gráfico de escores figura 4.24 (A) pode-se observar a sobreposição de apenas 1 macho e uma fêmea.

Pela figura 4.25 (B) pode-se observar que os fatores que contribuíram para a separação das fêmeas foram a gordura intramuscular extraída, a EGAOL e o PPC que no caso estão do lado positivo de PC1, e para a separação dos machos foi a CRA que se encontra na parte negativa de PC1.

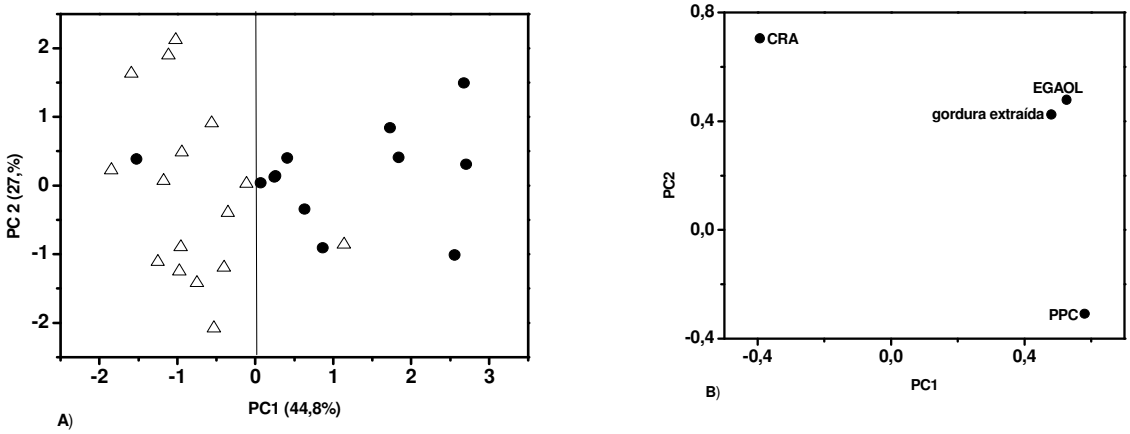

Figura 4.25: Gráfico de escores (A) e dos pesos (B) sem o pH PC1 versus PC2 das amostras da 12ª costela do CX de fêmeas (●) e machos (△).

Na análise de HCA sem o pH, os dados foram autoescalados, e observa-se através do dendrograma da figura 4.26, a separação de 4 grupos de acordo com o grau de similaridade (0,57) entre as amostras. Observa-se uma boa separação onde apenas duas fêmeas estão no grupo dos machos que se encontram na parte superior do dendrograma, e são encontrados dois machos na parte inferior no grupo das fêmeas.

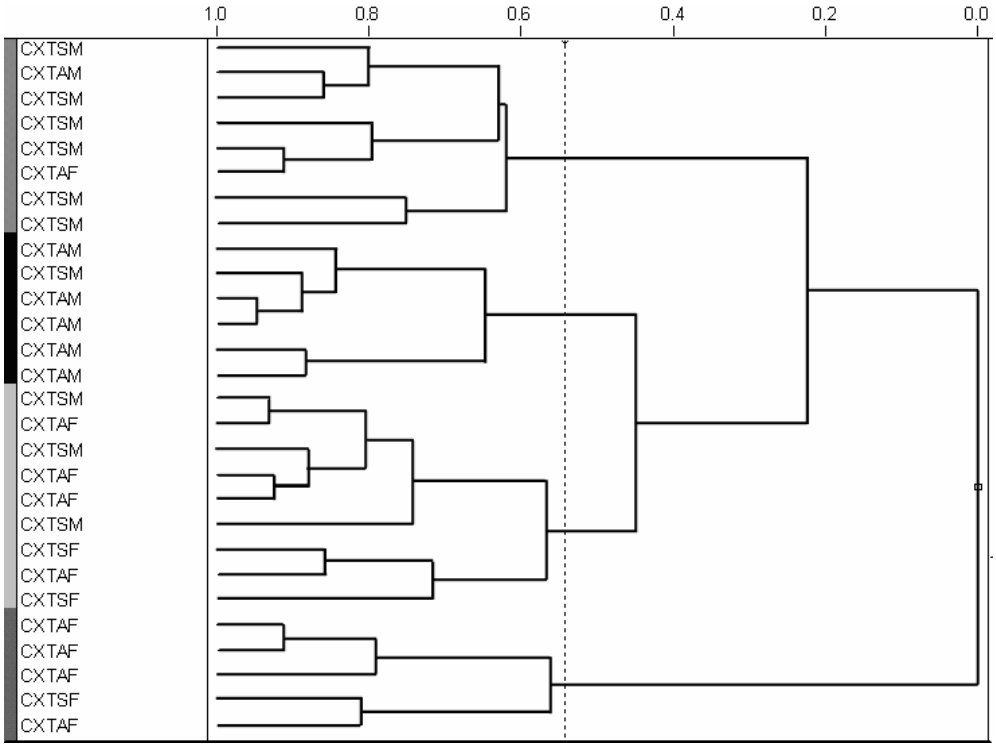

Figura 4.26: Dendrograma dos parâmetros físico-químicos sem o pH para as amostras do grupo CXM e F.

A tabela 4.4 mostra o resumo dessas análises, com os parâmetros usados e os respectivos resultados.

Através da tabela 4.4 observa-se que a análise que teve uma melhor separação entre M e F das amostras da 12ª costela do grupo CX foi na ausência do pH, onde houve a sobreposição de apenas um macho e uma fêmea.

Tabela 4.4: Análise realizada com a utilização dos parâmetros medidos por métodos convencionais e os resultados obtidos

Parâmetros utilizados na análise	Sobreposição de Me F	Total
CRA, PPC,gordura extraída, EGAOL, pH	5 M e 2 F	7
CRA, PPC, gordura extraída, pH	3 M e 2 F	5
PPC, gordura extraída, EGAOL, pH	4 M e 3 F	7
CRA, PPC, EGAOL, pH	3 M e 3 F	6
CRA, gordura extraída, EGAOL, pH	2 M e 2 F	4
CRA,PPC, gordura extraída, EGAOL	1 M e 1F	2

4.2.2.1.2 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

Para as amostras CXM e CXF utilizou-se também o método de regressão multivariada para correlacionar as informações de RMN (CPMG e CWFP) com a CRA, pH, PPC, gordura intramuscular extraída e EGAOL.

No método PLS, calcula-se, além da variância das variáveis independentes, a correlação entre as variáveis latentes e as variáveis dependentes. Para isto, no método PLS são construídos dois modelos, um para as variáveis independentes X (dados de RMN) e outro para as variáveis dependentes y (parâmetros físico-químicos).[58,61] A tabela 4.5 mostra que os valores dos parâmetros utilizados na matriz y.

Tabela 4.5: Valores dos parâmetros físico-químicos para as amostras da 12ª costela do grupo CX, e os valores das médias e desvios padrões de cada parâmetro

Grupo genético	Sexo	PPC	pH	CRA	Gordura extraída (%)	EGAOL (mm)
CXTA	F	22,8	5,59	74,0	8,0	8
CXTA	F	23,1	5,50	80,4	5,3	4
CXTA	F	43,1	5,44	72,9	7,5	8
CXTS	F	38,5	5,59	74,7	8,6	11
CXTA	F	31,0	5,51	78,0	8,0	5
CXTA	F	27,0	5,37	73,6	11,5	9
CXTA	F	33,1	5,40	76,2	12,4	11
CXTS	F	31,8	5,38	72,6	3,4	9
CXTS	F	28,4	5,41	73,6	6,9	7
CXTA	F	26,9	5,53	75,8	9,2	5
CXTA	F	30,0	5,23	73,3	10,2	9
CXTA	F	29,2	5,30	77,3	8,8	4
Total	**F**	**∑=30,4±5,8**	**∑=5,42±0,1**	**∑=75,2±0,8**	**∑=8,32±2,5**	**∑=7,50±2,5**
CXTS	M	21,6	5,34	77,3	5,2	5
CXTS	M	29,8	5,52	77,4	6,2	4
CXTS	M	19,8	5,94	82,7	4,0	10
CXTS	M	31,8	5,56	72,0	10,2	4
CXTA	M	24,9	5,72	72,0	5,7	4
CXTS	M	25,0	6,52	81,9	4,4	3
CXTS	M	24,5	5,45	85,9	6,1	5
CXTS	M	24,7	5,44	75,4	8,2	5
CXTA	M	24,5	6,04	72,1	5,2	3
CXTS	M	25,8	5,48	69,7	4,3	3
CXTA	M	24,2	5,49	74,7	5,2	2
CXTA	M	22,6	5,90	78,9	7,8	6
CXTS	M	19,1	5,88	82,9	8,4	7
CXTS	M	18,1	5,77	76,2	9,0	4
CXTA	M	28,1	5,44	76,6	3,4	4
CXTA	M	29,1	5,39	75,9	1,2	5
Total	**M**	**∑=24,6±3,8**	**∑=5,36±0,3**	**∑=76,9±4,6**	**∑=5,90±2,3**	**∑=4,60±1,9**
Total	**M e F**	**∑=27,1±5,5**	**∑=5,57±0,3**	**∑=76,3±3,9**	**∑=6,90±2,6**	**∑=5,90±2,6**

O modelo PLS é obtido por meio de um processo interativo, no qual se otimiza ao mesmo tempo a projeção das amostras sobre o(s) *loadings*, para a determinação dos *scores*, e o ajuste por uma função linear dos *scores* da matriz X aos *scores* da matriz Y de modo a minimizar os desvios. Essa otimização simultânea

ocasiona pequenas distorções nas direções dos *loadings*, de modo que, rigorosamente eles perdem a ortogonalidade, levando a pequenas redundâncias de informação. Porém, são essas pequenas redundâncias que otimizam a relação linear entre os *scores*[58,61]

Uma grande vantagem do método PLS é sua robustez. Isso significa que os parâmetros do modelo não se alteram de maneira significativa quando novas amostras são acrescentadas ou retiradas do conjunto de calibração.[58]

A análise de PLS foi realizada para todas as amostras CX (macho e fêmea) e para os machos e fêmeas separados, como mostra a figura 4.27 A,B e C.

Para as amostras conjuntas CXF e CXM as análises de PLS (figura 4.27 A), para CRA e PPC versus CPMG não apresentaram correlação, com r~0. As correlações de CRA e PPC também foram baixas para CWFP, com r = 0,15 e r = 0,3, respectivamente. A correlação da gordura extraída foi de r= -0,45 e r= -0,18 para as técnicas de CPMG e CWFP respectivamente. A correlação da EGAOL para as técnicas de CPMG e CWFP foi de r= -0,52 e r = -0,30, respectivamente. O pH demonstrou correlação de r = -0,55 e r = 0,45 para os dados de CPMG e CWFP respectivamente. Para os machos (figura 4.27 B), a correlação de PPC foi nula em ambas técnicas e a CRA teve uma correlação r = 0,31 e r = -0,35 para CPMG e CWFP, respectivamente. A correlação da EGAOL foi melhor para a técnica de CWFP (r = 0,50) do que para CPMG (r = 0,30). A correlação do pH foi melhor com os dados de CPMG (r = -0,78) do que com CWFP (r = 0,2). A correlação da gordura extraída para o CPMG foi de r= 0,25 e de r = 0,48 para o CWFP. Para as fêmeas (figura 4.27 C), a correlação do PPC foi de r = -0,62 em ambas as técnicas, a correlação da CRA foi alta r = -0,82 para CPMG e nula para CWFP e o pH foi por volta de 0,3 para ambas as técnicas e a gordura extraída foi de r = -0,48 para CPMG

e r = 0,48 para CWFP. A correlação de EGAOL foi de r = -0,45 e r = 0,45 para as técnicas de CPMG e CWFP, respectivamente.

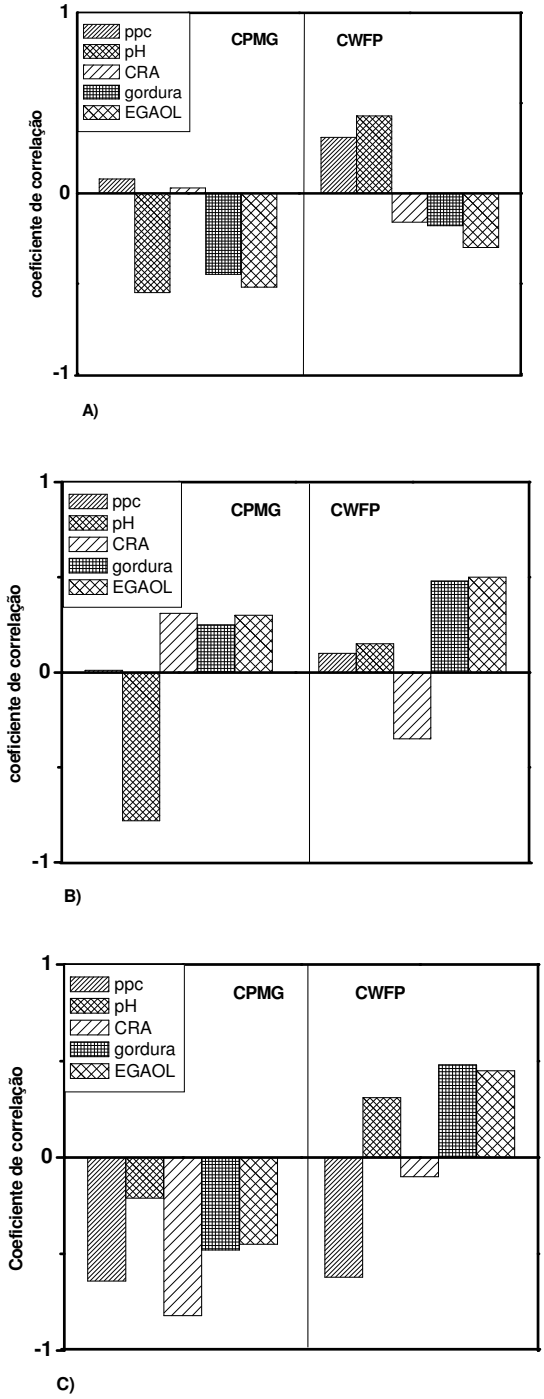

Figura 4.27: Gráficos de colunas com os coeficientes de correlação da PPC, pH, gordura intramuscular extraída, EGAOL e CRA obtidos através do PLS. A) machos e fêmeas; B) machos e C) fêmeas.

A baixa correlação observada nessas amostras pode estar relacionada à dispersão muito baixa nos parâmetros medidos (tabela 4.5) e poderão ser maiores para amostra de animais de diferentes idade e manejo.

4.3 Análise dos valores médios dos dados para os grupos genéticos.

A figura 4.28 apresenta a correlação entre os valores de T_2 médios, obtidos com a técnica CPMG, para cada grupo genético entre os cortes da 12ª e 6ª costela. Cada ponto do gráfico representa a média de todas as amostras pertencentes a cada cruzamento. Como pode-se ver os valores de T_2 da 12ª e 6ª costela apresentam baixa correlação (r = 0,592).

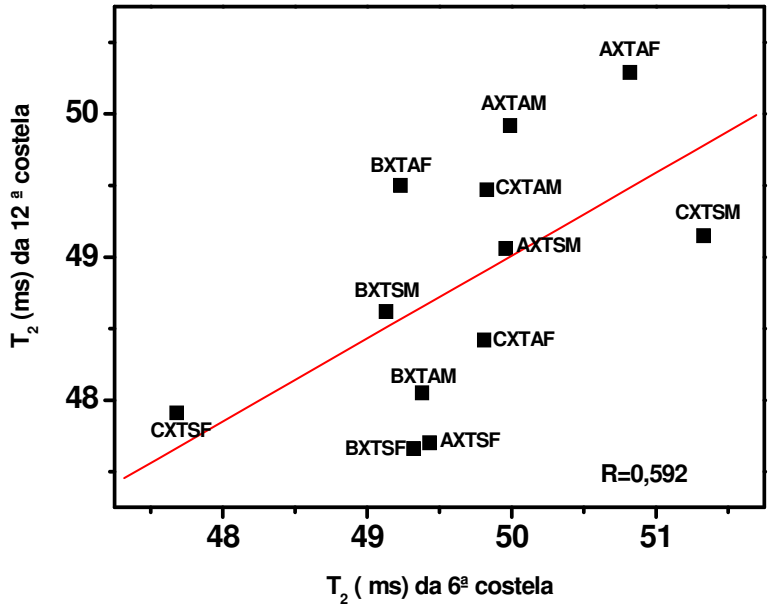

Figura 4.28: Mostra os valores médios de T_2 de cada grupo genético da 6ª e 12ª costela com os dados de CPMG.

Essa mesma análise foi realizada com os dados de CWFP utilizando a razão M_z/M_o dos dois cortes (figura 4.29) onde se obteve uma alta correlação (r = 0,975), diferentemente da correlação encontrada com os dados de CPMG. Isso indica uma maior previsibilidade do CWFP sobre o CPMG.

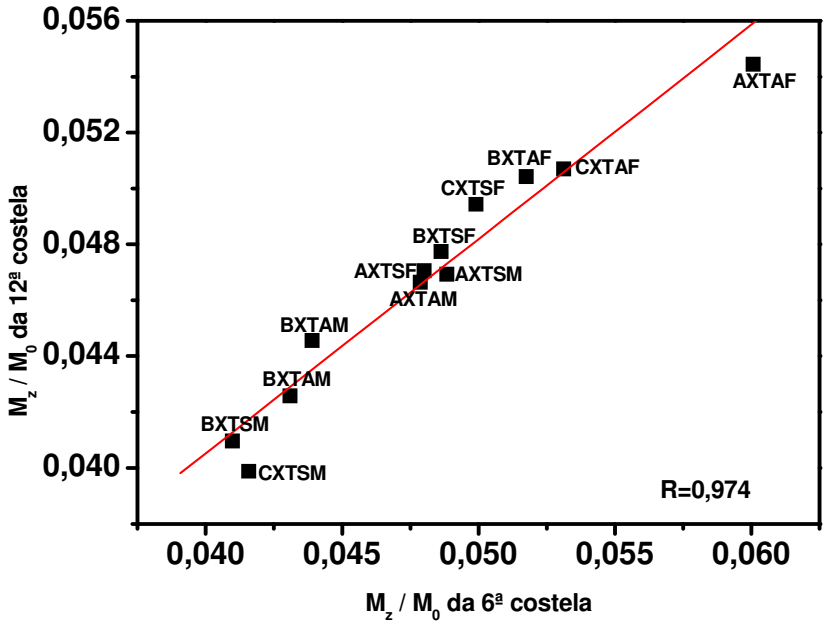

Figura 4.29: Mostra a razão entre M_z / M_0 da 6ª e 12ª costelas com os dados de CWFP.

Realizou-se também analises de PCA e HCA para os valores médios de CPMG e CWFP para as amostras da 12ª e 6ª costela de todos os cruzamentos.

Na figura 4.30 está o gráfico de escores do PC1 e PC2 dos dados de CPMG, centrados na média e 4 componentes principais foram utilizados que descrevem uma variância acumulativa de 98,8%, onde as componentes PC1 e PC2 que descrevem 96,3% da variância total. Nesta figura pode-se observar a formação de 5 grupos onde não há uma lógica em relação à formação dos grupos e não há uma separação entre os sexos dos animais. Não observou-se nos grupos formados

a presença de um mesmo cruzamento da 12ª costela e da 6ª no mesmo grupo, com exceção do grupo representado pelo símbolo (△), pois o AXTAM da 6ª está no mesmo grupo do AXTAM12 da 12ª costela.

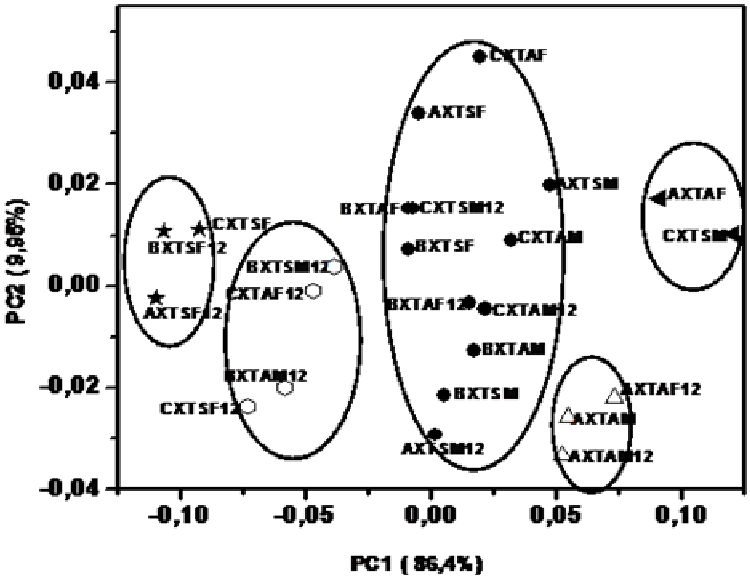

Figura 4.30: Gráfico de escores entre as médias das amostras que possuem o mesmo grupo genético da 12ª e da 6ª costela com os dados de CPMG.

A análise de HCA dos dados de CPMG centrados na média, (figura 4.31) mostra uma separação de 5 grupos que foram formados de acordo com o grau de similaridade (0,76) entre as amostras, onde há baixa separação entre machos e fêmeas e certa distinção entre as amostras da 12ª e 6ª costela. As amostras da 12ª costela ficaram mais concentradas na parte inferior do dendrograma e a 6ª na parte superior.

Essas análises de quimiometria também foram analisadas para os dados de CWFP. A figura 4.32 mostra a análise de PCA, os dados foram centrados

na média, utilizando 3 componentes principais com uma variância acumulativa de 99,1% as componentes PC1 e PC2 descrevem 98,1% da variância total dos dados.

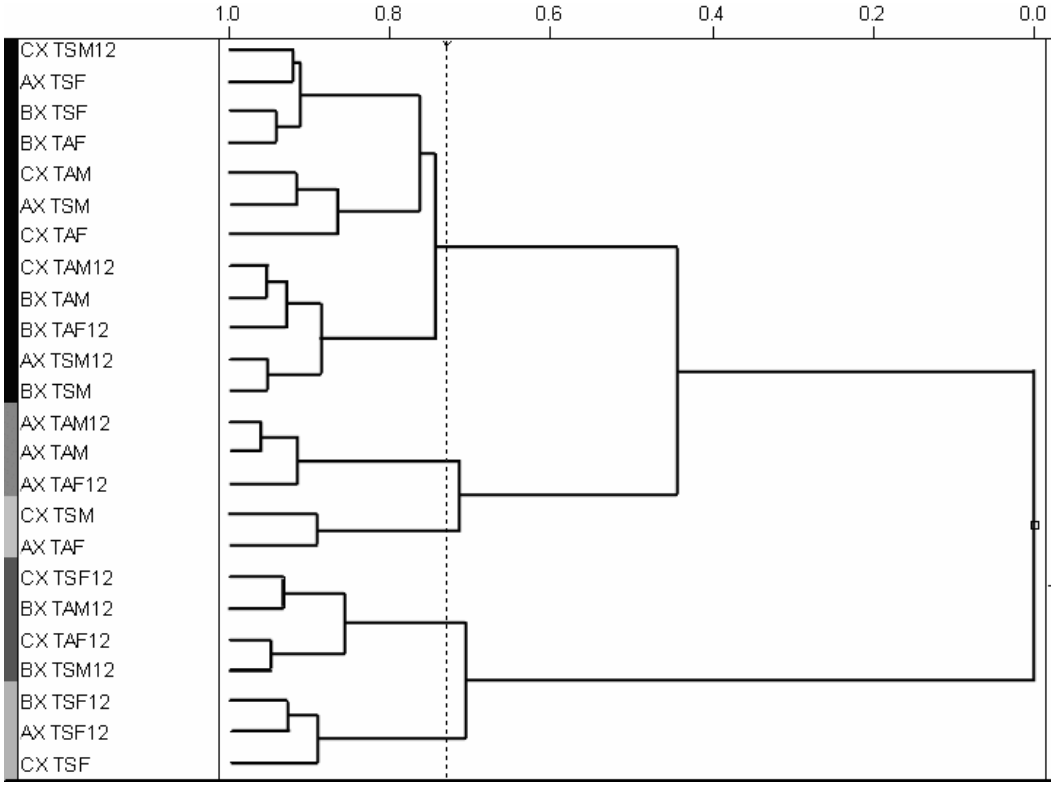

Figura 4.31: Dendrograma entre as médias das amostras que possuem o mesmo grupo genético da 12ª e da 6ª costela com os dados de CPMG.

Pode-se observar a formação de 5 grupos, onde que em cada grupo formado há o grupo genético da 12ª costela e o mesmo grupo da 6ª no mesmo conjunto, como por exemplo, no grupo com o símbolo (□) o AXTAF da 6ª está junto com o AXTAF12 da 12ª costela, e isso ocorre em todos os agrupamentos formados. No caso dos dados de CPMG isso não é observado.

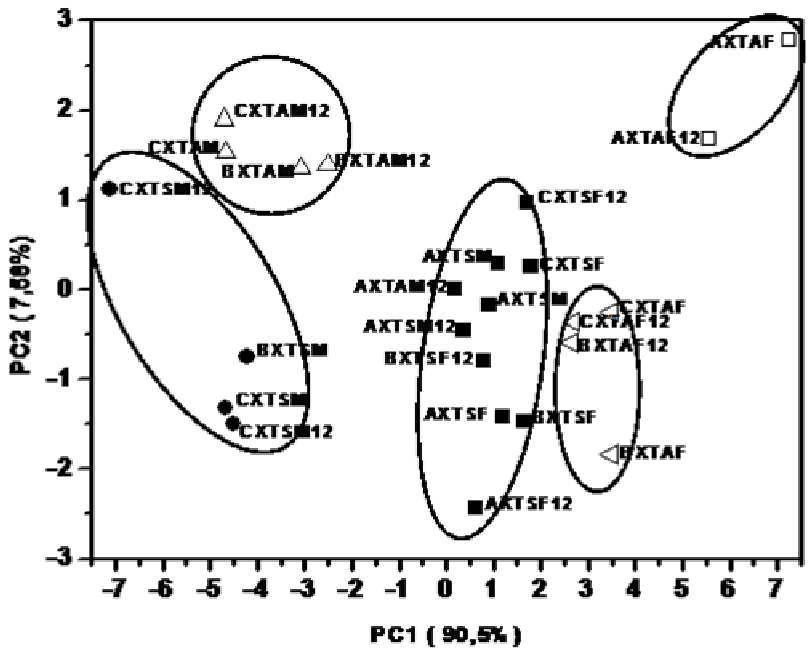

Figura 4.32: Gráfico de escores entre as médias das amostras que possuem o mesmo grupo genético da 12ª e da 6ª costela com os dados de CWFP.

Na análise de HCA para essas amostras também os dados de CWFP foram centrados na média, como mostra a figura 4.33. Onde observa-se que os mesmos cinco grupos formados no PCA se formam no HCA de acordo com o grau de similaridade (0,77) entre as amostras, sendo que no primeiro grupo as amostras da 6ª costela de um mesmo grupo genético ficam próximos das amostras da 12ª costela, sendo isso observado nos demais grupos. Apenas uma amostra de fêmea (CXTSF) se sobrepõe com os machos, isso ocorre devido à raça canchim não acumular gordura intramuscular.

Nas análises quimiométricas para as médias dos grupos genéticos os resultados dos dados de CWFP obtiveram resultados melhores do que os de CPMG, como foi observado quando analisou-se os dados das amostras individuais. Uma explicação para isso seria que os dados de CWFP possuem a dependência de T_1 e T_2 já os dados de CPMG só dependem de T_2. E mesmo com amostras parecidas

entre si a técnica de CWFP possui melhor eficiência na separação dos sexos e até mesmo das raças do que a técnica de CPMG.

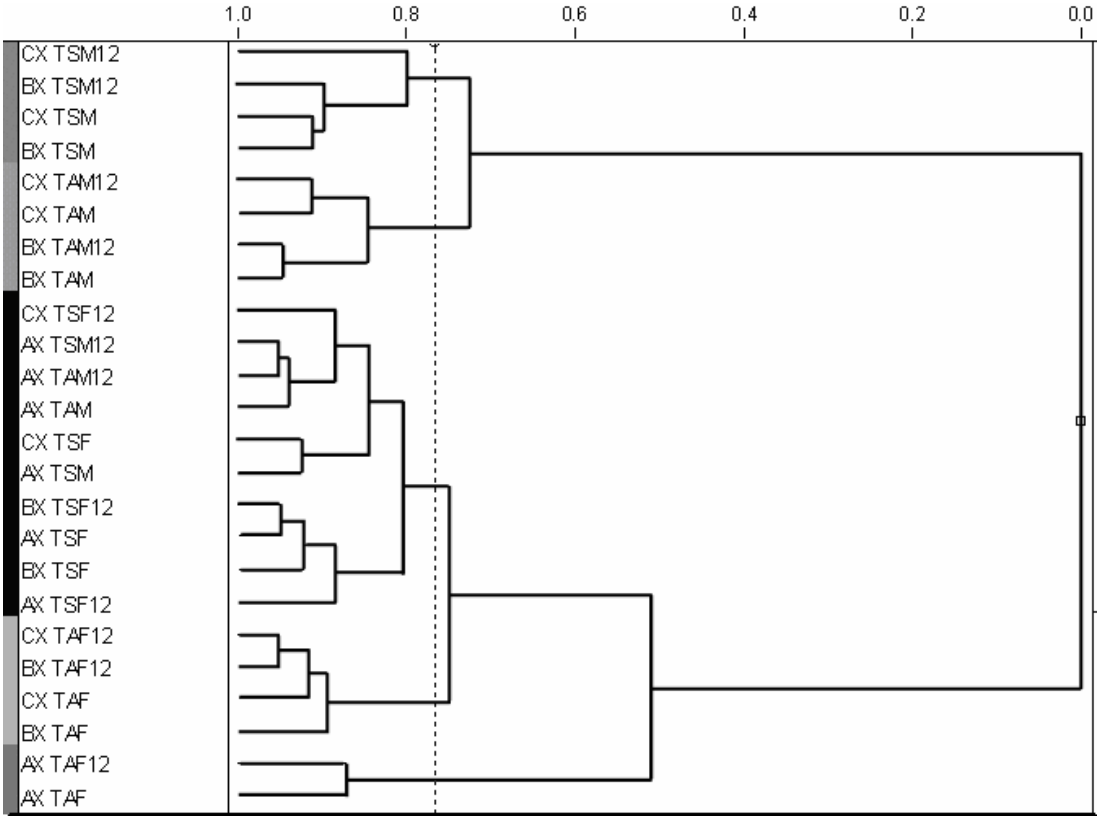

Figura 4.33: Dendrograma entre as médias das amostras que possuem o mesmo grupo genético da 12ª e da 6ª costela com os dados de CWFP.

5. CONCLUSÕES

Concluiu-se que o ajuste monoexponencial, não ajusta perfeitamente a curva de decaimento do sinal do CPMG, devido às amostras de carne bovina serem compostas por dois ou mais tempos de relaxação T_2. No entanto, o valor de T_2 monoexponencial é próximo do valor, com maior área, observado nos ajustes bi e triexponenciais. Os ajustes biexponencial e triexponencial, ajustaram o sinal de CPMG não sendo possível observar diferença entre eles. No entanto não é possível Carr-Purcell-Meibom-Gill saber qual é o mais indicado para cada amostra.

Concluiu-se que a análise do sinal CPMG com a transformada inversa de Laplace (CONTIN) é uma melhor opção que os ajustes exponenciais discretos, pois não precisa da informação do número de exponenciais, fornecida pelo operador, para a determinação dos T_2. No entanto, também está sujeito a erros na determinação de T_2, principalmente nos sinais com baixa razão sinal ruído. Além disso, tanto os ajustes exponenciais discretos quanto o CONTIN, necessitam de correlacionar os valores obtidos com as propriedades da carne.

Concluiu-se que a melhor opção de análise dos sinais de RMN, (CPMG e CWFP) foram os métodos quimiométricos, PCA, HCA e PLS, que têm pouca ou nenhuma interferência do operador e não precisam de assinalamento dos sinais com as qualidades analisadas. Os dados de CPMG analisados por PCA e HCA, obtidos da carne da região da 12ª e da 6ª costela, não apresentaram diferenças significativas entre os dois cortes, entre os sexos e os grupos genéticos dos animais.

Conclui-se que os dados de CWFP foram mais informativos do que os do CPMG pois apresentaram boa separação na análise de PCA, entre machos e fêmeas do grupo genético CX e entre os grupos genéticos AX e CX, para ambos os cortes.

Concluiu-se que as correlações dos sinais CPMG e CWFP com a CRA, pH, PPC, gordura intramuscular extraída e EGAOL, obtidas com PLS, não foram relevantes ($r<0,6$). Somente o pH das carnes dos machos CX teve boa correlação com CPMG ($r = -0,78$). Para as carnes das fêmeas CX, obteve-se uma boa correlação com PPC, $r = -0,62$, com ambas as técnicas e com CRA, $r = -0,82$ com CPMG. Conclui-se que essa baixa correlação pode estar relacionada à pequena dispersão dos valores de PPC, CRA, pH, gordura intramuscular e EGAOL, observados nesses animais jovens (18 a 24 meses), com mesmo manejo (alimentação, confinamento, etc) e abatidos com uma espessura de gordura de aproximadamente 3mm.

O coeficiente de correlação dos valores médios de T_2 (CPMG) e da razão M_z/M_o (CWFP), dos animais do mesmo grupo genético, para os dois cortes, foram de $r=0.59$ e $r=0,97$, respectivamente, indicando uma maior previsibilidade do CWFP sobre o CPMG. Esses resultados de CWFP indicam também que não há diferença significativa entre a carne do corte realizado na 12ª costela (padrão americano) do corte realizado na 6ª costela. Assim, conclui-se que a técnica CWFP é mais eficaz na separação das carnes bovinas (sexo e grupo genético) do que a técnica CPMG.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] COLNAGO, L.A.; VIEIRA, J.A.G.; BISCEGLI, C.I.; CRESTANA, S. Aplicações da espectroscopia e tomografia de ressonância magnética nuclear em alimentos**.** **Boletim/RMN**, v. 3, p. 26-34, 1997. Edição especial.

[2]COLNAGO, L.A.; MARTIN-NETO, L.; BISCEGLI, C.I.; NASCIMENTO, O.R.; BONAGAMBA, T.J.; PANEPUCCI, H.; VIEIRA, E.M.; SEIDEL, P.R.; SPOSITO, G.; OPELLA, S.J. Aplicações da ressonância magnética nuclear (RMN) e ressonância paramagnética eletrônica (EPR). In: CRESTANA, S.; CRUVINEL, P.E.; MASCARENHAS, S.; BISCEGLI, C.I.; MARTIN-NETO, L.; COLNAGO, L.A. (Ed.). **Instrumentação agropecuária:** contribuições no limiar do novo século. Brasília: EMBRAPA-SPI**,** 1996. Cap.1, p.15-50.

[3] GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações.** Lisboa: Fundação Calouste, 1987, p. 3-4

[4] BONAGAMBA, T. J.; CAPELLE, K.W.; AEVEDO, E.R. A RMN e suas aplicações atuais. **Ciência Hoje**, v. 37, nº: 221, 2005. Disponível em: <http://www.cienciahoje.uol.com.br/controlPanel/materia/resource/download/41286>. Acesso em: 05 fev. 2007.

[5] CLARIDGE, T. D. W. **High- resolutinon NMR techiques in organic chemistry.** Amsterdam: Elsevier, 1999. p. 80-120.

[6] FREIBOLIN, H. **Basic one – and two-dimensional NMR spectroscopy.** 2. ed. New York. VCH Publishers, 1993. p. 25-30.

[7] SLICHTER, C. P. **Principles of magnetic resonance.** Springer Verlag, 1990. p. 25-30.

[8] SANDERS, J.K.M.; HUNTER, B.K. **Modern NMR spectroscopy:** a guide for chemists. 2.ed. New York, Oxford University Press, 1993. p. 45-60.

[9]HAHN, E. L. Spin echoes. **Physical Review**, v. 80, p. 580-594, 1950.

[10] DEBLAEY, C.J; VARKEVISSER, F.A.; KALK, A. Pulsed proton NMR and solid liquis fat ratio determinations in suppository vehicles and aminophylline suppositories. **Pharmaceutisch Weekblad-Scientific Edition**, v. 6, n. 5, p. 203-208, 1984.

[11] KERWOOD, D.J.; BOLTON, P.H. Low-field NMR. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 68, n. 3, p. 588-592, 1986.

[12] RUAN, R.R.; LONG, Z.Z.; SONG, A.J.; CHEN, P.L. Determination of the glass transition temperature of food polymers using low field NMR. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 31, n. 6, p. 516-521, 1998.

[13] LATORRACA, G.A.; DUNN, K.J.; WEBBER, P.R.; CARLSON, R.M. Low-field NMR determinations of the properties of heavy oils and water-in-oil emulsions. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 16, n. 5-6, p. 659-662, 1998.

[14]THOMAS, S.R.; PRATT, R.G.; MILLARD, R.W.; SAMARATUNGA, R.C.; SHIFERAW, Y.; MCGORON, A.J.; TAN, K.K. In vivo pO(2) imaging in the porcine model with perfluorocarbon F-19 NMR at low-field. **Magnetic Resonance Imaging,** v. 14, n. 1, p. 103-114, 1996.

[15] DESBOIS, P.; LEBOTLAN, D. Proton low-field NMR measurements on crackers. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 5, p. 1088-1090, 1994.

[16]COLNAGO, L.A.; VAZ, C.M.P. Determinação da concentração de pesticidas fluorados em formulações comerciais por RMN de ^{19}F de baixa resolução. In: ENCONTROS DE USUÁRIOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR, 6., 1997, Angra dos Reis. **Anais...** Rio de Janeiro: AUREMN, 1997. p. 381-385.

[17] NORDON, A.; MCGILL, C. A.; LITTLEJOHN, D. Process NMR spectrometry. **Analyst,** v. 126, n. 2, p. 260-272, 2001.

[18]ALBERT, G.; PUSIOL, D. J.; ZURIAGA, M. J.; Spin-spin and spin-lattice relaxometry in sunflower seeds by NMR. In:BELTON, P. S.; GIL, A. M.; WEBB, G. A.; RUTLEDGE, D. **Resonance in food science**: latest developments. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2003. p. 93-100.

[19] TORNBERG, E. Biophysical aspects of meat tenderness. **Meat Science**, v. 43, p. S175-S191, 1996.

[20]AZEREDO, R.B.V.; COLNAGO, L.A.; SOUZA, A.A.; ENGESLBERG, M.; Continuous Wave Free Precession. Practical Analytical Tool for Low-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Measurements. **Analytica Chimica Acta**, v. 478, p. 313-320; 2003.

[21]AZEREDO, R. B. de V.; ENGELSBERG, M.; COLNAGO, L. A. Quantitative Analysis using Steady-State Free Precession Nuclear Magnetic Resonance. **Analytical Chemistry**. v. 72, number 11, p. 2401-2405, 2000.

[22]AZEREDO, R. B. V.; ENGELSBERG, M.; COLNAGO, L. A. Flow sensitivity and coherence in steady-state free spin precession. **Physical Rewiew E**, v. 64, p. 16309-1-4, 2001.

[23] VENÂNCIO, T.; ENGELSBERG, M.; AZEREDO, R. B.V.; COLNAGO, L. A. Thermal diffusivity and nuclear spin relaxation: A continuous wave free precession NMR study. **Journal of Magnetic Resonance**, p. 2-5, 2006.

[24] VENÂNCIO, T. **Novas aplicações da precessão livre em onda contínua em Ressonância Magnética Nuclear de baixa e alta resolução.** 151f. Tese de Doutorado – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

[25] VENÂNCIO, T.; ENGELSBERG, M.; AZEREDO, R. B. V.; ALEM, N. E. R.; COLNAGO, L. A. Fast and simultaneous measurement of longitudinal and transverse NMR relaxation times in a single continuous wave free precession experiment. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 173, p. 34-36, 2005.

[26] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (abiec). Bom resultado apesar das adversidades. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/imprensa.asp?id_news=354>: Acesso em13 fev. 2007.

[27] ANUÁRIO DA PECUARIA BRASILEIRA (ANUALPEC) 2004: São Paulo: FNP Consultoria&Agroinformativos, 2004. p. 376.

[28] MONIN, G. Recents methods for predicting quality of whole meat. **Meat Science**, v. 49, p. 231-243, 1998.

[29] EMBRAPA PECUARIA SUDESTE (EMBRAPA). Noções de ciência da carne. Disponível em: <http://www.cnpgc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc77/ >. Acesso em 12 fev. 2007.

[30] FELÍCIO, P.E. Qualidade de carne bovina: características Físicas e Orgenolépticas. Faculadade de Engenharia de Alimentos da Unicamp. Disponível em: <http://www.fea.unicamp.br/deptos/dta/carnes/>. Acesso em 12 fev. 2007.

[31] BERTRAM, H. C.; AASLYNG, M. D.; ANDERSEN, H. J. Elucidation of the relationship between cooking temperature, water distribution and sensory attributesof pork- a combined NMR and sensory study. **Meat Science**, v. 70, p. 75-81, 2005.

[32] LEE, J. R.; BAIANU, I. C.; BECHTEL, P. J. Hydration behavior of heart mucle studied by NMR relaxation. Changes with heat treatment in mucle hydration and water distribution in heart mucle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 2350-2355, 1992.

[33] PEARSON, R. T.; DUFF,.I. D.; DERBISHYRE, W.; BLANSHARD, J. M. V. An NMR investigation of rigor in porcine muscle. **Biochimica and Bophysica Acta**, v. 362, p. 188-200, 1974.

[34]RENOU, J.P.; KOPP, J.; VALIN, C.Use of low resolution NRM for determinig fat-content in meat-products. **Journal of food technology**, v. 20, p. 23-29, 1985**.**

[35]RENOU, J.P.; KOPP, J.; GATELLIER, P.; MONIN, G.; KOZAKREISS, G. NMR relaxation of water protons in normal and malignant hyperthermia-susceptible pig muscle. **Meat Science.** v. 26, p.101-114, 1989.

[36]BROWN, R. J. S.; CAPOZZI, F.; CAVANI, C.; CREMONINI, M. A.; PETRACCI, M.; PLACUCCI, G. Relationships betewenn ^{1}H NMR Relaxation Data and Some Technological Parameters of Meat: A Chemometric Approach. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 147, p. 89-94, 2000.

[37]ENGELSEN, B.S.; BRONDUM, J.; MUNCK, L.; HENCKEL, P.; KARLSSON, A.; TORNBERG, E. Prediction of water-holding capacity and composition of porcine meat by comparative spectroscopy. **Meat Science**, v. 55, p. 177-185, 2000.

[38]RENOU, J.P.; BONNY, J.M.; LAURENT, W. Muscle characterisation by NMR imaging and spectroscopic techniques. **Food Chemistry**, v. 69, p. 419-426, 2000.

[39]BERTRAM, H. C.; KARLSSON, A. H.; RASMUSSEN, M.; PEDERSEN, O. D.; DENSTRUP, S.; ANDERSEN, H. J. Origin of Multiexponencial T_2 Relaxation in Muscle Myowater. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, p. 3092-3100, 2001.

[40]NDERSEN, H. J.; KARLSSON, A. H.; DONSTRUP, S.; BERTRAM, H.C. Continuous distribution analysis of T_2 relaxation in meat-an approach in the determination of water-holding capacity. **Meat Science**, v. 60, p. 279-285, 2002.

[41]MICKLANDER, E.; PESHLOW, B.; PURSLOW, P. P.; ENGELSEN, B. NMR-Cooking Monitoring the Changes in Meat During cooking by Low-Field ^{1}H-NMR. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 341-346, 2002.

[42]BERTRAM, H. C.; WHITTAKER, A. K.; ANDERSEN, H. J.; KARLSSON, A. H. pH Dependence of the progression in NMR T_2 relaxation times in post-mortem muscle. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4072-4078, 2003.

[43]BERTRAM, H. C.; WHITTAKER, A.K.; ANDERSEN, H. J.; KARLSSON, A.H. Visualization of drip channels in meat using NRM microimaging. **Meat Science,** v. 68. p. 667-670, 2004.

[44]BERTRAM, H. C. Field gradient CPMG applied on postmortem muscles. **Magnetic Resonance Imaging**, v .22, p. 557-563, 2004.

[45]BERTRAM, H. C.; KRISTENSEN, M.; ANDERSEN, H.J. Functionality of myofibrillar proteins as affected by pH, ionic strength and heat treatment-a low-field NMR study. **Meat Science**, v. 68, p. 249-256, 2004.

[46]SORLAND, G. H.; LARSEN, P. M.; LUNDBY, F.; RUDI, A.; GUIHENEUF, T. determination of total fat and moisture content in meat using low field NMR. **Meat Science**, v. 66, p .543-550, 2004.

[47]BERTRAM, H. C.; Aaslyng, M. D.; ANDERSEN, H. J. Elucidation of the relationship between cooking temperature, water distribution and sensory attributesof pork- a combined NMR and sensory study. **Meat Science**, v. 70, p. 75-81, 2005.

[48]WU, Z.; BERTRAM, H.C.; KOHLER, A.; BOCKER, U.; OFSTAD, R.; ANDERSEN, H.J. Influence of aging and salting on protein secundary structures and water distribution in uncooked and cooked pork. A combined FT-IR microspectroscopy and ^{1}H NMR relaxometry study. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 8589-8597, 2006.

[49]BERTRAM, H. C.; WU, Z.; BERG, F.; ANDERSEN, H. J. NMR relaxometry and differential sacnning calorimetry during meat cooking. **Meat Science**, v. 74, p. 684-689, 2006.

[50]BERTRAM, H. C.; KOHLER, A.; BOCKER, U.; OFSTAD, R.; ANDERSEN, H. J. Heat-induced changes in myofibrillar protein structures and myowater of two pork qualities. A combined FT-IR spectroscopy and low-field NRM relaxometry study. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1740-1746, 2006.

[51]HALL, L. D.; SHAARANI, S. MD.; NOTT, K. P. Combination of NMR and MRI quantitation of moisture and structure changes for convection cooking of fresh chicken meat. **Meat Science**, v. 72, p. 398-403, 2006.

[52]BERTRAM, H. C.; MORTENSEN, M.; ANDERSEN, H. J.; ENGELSEN, S. B. Effect of freezing temperature, thawing and cooking rate on water distribution in two pork qualities. **Meat Science**, v. 72, p. 34-42, 2006.

[53]BERTRAM, H. C.; ANDERSEN, R. H.; ANDERSEN, H.J. Development in myofibrillar water distribution of two pork qualities during 10-month freezer storage. **Meat Science**, v. 75, p. 128-133, 2007.

[54]BERTRAM, H. C.; STRAADT, I. K.; RASMUSSEN, M.; ANDERSEN, H. J. Aging-induced changes in microstructure and water distribution in fresh and cooked pork in relation to water-holding capacity and cooking loss- a combined confocal laser scanning microscopy (CLSM) and low-field nuclear magnetic resonance relaxtion study. **Meat Science**, v. 75, p. 687-695, 2007.

[55]TULLIO, R.R. **Estratégias de manejo para a produção intensiva de bovinos visando a qualidade da carne.** 2004. 106f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Departamento de Tecnologia, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

[56]ALENCAR, M. M.; CRUZ, M. G.; TULLIO, R. R.; CORRÊA, A. L.; SAMPAIO, M. A. A.; BARBOSA, F. P. Peso vivo, idade de abate, duração do confinamento e características de bovinos jovens provenientes de cruzamentos de raças adaptadas e não-adaptadas. **44ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 24 a 27 de julho de 2007.

[57]FUKUSHIMA, E.; ROEDER, S.B.W. **Experimental pulse NMR:** a nuts and bolts approach**.** Massachusetts: Addison-Wesley, 1981. p. 65-100.

[58]PARREIRA, F.T. **Utilização de métodos quimioméricos em dados de natureza multivariados**.2003. 110f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, Universidade de Campinas, Campinas, 2003.

[59]Kroeker, R. M. & Henkelman, M. "Analysis of Biological NMR Relaxation Data with Continuous Distributions of Relaxation Times*",* **Journal of Magnetic Resonance**, **69**, 218, 1986.

[60]MOITA, M. N. J; MOITA, C. G. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova.** v. 21, p. 467-469, 1998.

[61]FERREIRA, M. C. M.; ANTUNES, M. A.; MELGO, S. M.; VOLPE, L. O. P. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**. v. 22, p. 1-19, 2007.