

**ANÁLISE DE CARNE E GORDURA BOVINA USANDO TÉCNICAS BIDIMENSIONAIS
DE RMN NO DOMÍNIO DO TEMPO**T. Monaretto^{1,*}, L. A. Colnago²

¹ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense, 400, 13566-590, São Carlos, São Paulo

² Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, 13560-970, São Carlos, SP

* Autor correspondente, e-mail: tatiana.monaretto@gmail.com

Resumo: Neste trabalho estamos demonstrando a viabilidade de se usar método bidimensional (2D) de Ressonância Magnética Nuclear, no Domínio do Tempo (RMN-DT), para determinação do teor de gordura em carnes bovinas, diretamente na carne intacta e sem necessidade de calibração com método de referência padrão. O método é baseado na sequência de pulsos 2D conhecida como Inversão-Recuperação-Carr-Purcell Meiboom-Gill (IR-CPMG), que gera mapas de correlação entre os tempos de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2). Os resultados mostraram que nos mapas bidimensionais é possível separar facilmente os sinais relacionados com a água na carne e os com a gordura (essa separação não é observada quando são utilizados métodos de análises unidimensionais de T_1 ou T_2). Com isso, pode-se mensurar o teor de gordura usando a razão entre as áreas dos sinais de gordura e dos outros componentes da carne. Além disso, essa técnica demonstrou ser simples, uma vez que não demanda curva de calibração para determinar o teor de gordura e não requer etapas de preparação da amostra com reagentes prejudiciais à saúde, como os métodos de extração por solvente ou fluídos supercríticos. Ainda, os experimentos IR-CPMG podem ser realizados em equipamentos de RMN de bancada de baixo custo.

Palavras-chave: RMN no domínio do tempo, Sequência de pulso bidimensional, Relaxação longitudinal, Relaxação transversal.

ANALYSIS OF BEEF AND BEEF FAT USING TWO-DIMENSIONAL TD-NMR

Abstract: In this work we are demonstrating the use of two-dimensional (2D) Time-Domain Nuclear Magnetic Resonance (TD-NMR) to determine the fat content in beef, directly in intact meat and without calibration with standard reference method. The method is based on the 2D pulse sequence known as Inversion-Recovery-Carr-Purcell Meiboom-Gill (IR-CPMG), which generates correlation maps between longitudinal (T_1) and transverse (T_2) relaxation times. The results showed that in the two-dimensional maps it is possible to easily separate signals related to water into the meat and those ones related to fat (this separation is not observed when using one-dimensional T_1 or T_2 analysis methods). Therefore, it is possible to measure fat content using the ratio between fat area signals and other components of meat. In addition, this technique has been shown to be simple since it does not require a calibration curve to determine fat content and also does not require sample preparation steps with unhealthy reagents such as solvent or supercritical fluid extraction methods. Furthermore, the IR-CPMG experiments can be performed at low-cost in benchtop TD-NMR equipment.

Keywords: Time domain NMR, Bidimensional pulse sequence, Longitudinal relaxation time, Transverse relaxation time.

1. Introdução

O consumidor normalmente avalia a qualidade da carne bovina pelas suas propriedades sensoriais tais como maciez, suculência, entre outros fatores. Estas características por sua vez estão diretamente associadas ao teor de gordura e aos diferentes ambientes químicos em que a água se

encontra na carne: livre, em interação com as miofibrilas, em complexos supramoleculares e em metabólitos solúveis (JÚNIOR *et al.*, 2011). A gordura da carne bovina apresenta na maior parte da sua composição ácidos graxos insaturados, em especial o ácido linolênico conjugado - CLA, (KODANI *et al.*, 2017). Este ácido graxo tem recebido uma atenção especial nos últimos anos porque por ele ser anticarcinogênico, imunoestimulador, e antioxidante (MARIA *et al.*, 2010; MOREIRA *et al.*, 2015). Todavia, estudos têm demonstrados que o consumo excessivo de gordura bovina podem trazer riscos à saúde podendo levar a obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes e alguns tipos de câncer (ALMEIDA *et al.*, 2006; MINISTÉRIO, 2015).

Devido à está crescente busca por informações, referente aos teores e a caracterização da gordura intramuscular da carne bovina, várias técnicas têm sido propostas para determinação de gordura em carne bovina. Dentre elas estão o método clássico de determinação do teor de gorduras, a extração lipídica pelo método Soxhlet (ALMEIDA *et al.*, 2006), a extração por fluido supercrítico (KING *et al.*, 1996), a Ressonância Magnética Nuclear de alta resolução em alto campo (RMN-AR)(MARIA *et al.*, 2010), entre outros. Contudo, esses métodos são demorados, requerem grandes quantidades de solventes orgânicos e/ou necessitam de pré-processamentos da amostra e/ou apresentam alto custo, seja devido aos reagentes ou aos equipamentos necessários para sua realização. Uma alternativa que tem sido proposta é a utilização da RMN em baixo campo, também conhecida como RMN no domínio do tempo (RMN-DT), para a determinação rápida e não-destrutiva do teor de gordura em carne bovina, suínas e de aves. Esse tipo de análise é realizada em um espectrômetro de RMN baseado com ímãs permanentes (campos inferiores a 0,7 T ~ 30 MHz para o ^1H) de baixa homogeneidade, que não necessitam de manutenção com líquidos criogênicos, como os espectrômetros de RMN-AR. Além disso, este método não necessita de solventes orgânicos e, geralmente, não requer preparo da amostra. Esses fatores têm favorecido a aplicação da RMN-DT tanto em processos industriais quanto na área acadêmica e até mesmo como técnica substituta à métodos laboriosos e tradicionais (De ANDRADE e COLNAGO, 2012; COLNAGO *et al.*, 2014).

Na RMN-DT a maioria dos estudos são realizados com base na intensidade do sinal do FID (*Free Induction Decay*) ou eco de spins e nos tempos de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2). O tempo de relaxação T_1 é normalmente determinado pelo método unidimensional (1D) Inversão Recuperação (IR) (VOLD *et al.*, 1968) ou Saturação Recuperação (SR)(MARKLEY *et al.*, 1971). Já a mensuração da relaxação T_2 (1D) é feita com a sequência de pulso denominada de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) (MEIBOOM e GILL, 1958). Outros métodos alternativos têm sido empregados para determinar as constantes de tempo T_1 e T_2 . Dentre esses destacam-se os métodos provenientes da condição CWFP (*Continuous Wave Free Precession*) (VENANCIO *et al.*, 2005). Recentemente, foi desenvolvida uma sequência de pulso CWFP-1D, com pulsos de baixo ângulo de *flip*, denominada de CWFP- T_1 . Esta sequência permite a determinação de T_1 em uma única varredura e foi aplicada com sucesso para a determinação do teor de gordura em carnes bovinas (MORAES *et al.*, 2016). Entretanto, como as distribuições dos tempos de relaxação 1D da água e gordura se sobrepõem, é necessário a elaboração de uma curva de calibração e um estudo prévio do sistema utilizando um método padrão com a extração em Soxhlet. Para evitar esse procedimento de calibração com método externo estamos propondo neste trabalho o uso dos dados de correlação bidimensional (2D) de T_1 e T_2 , os quais permitem que se tenha uma clara separação entre os sinais da água e gordura. Portanto, este trabalho teve como objetivo aplicar o método 2D de RMN-DT que correlaciona T_1 - T_2 para análise de gordura bovina, baseando-se no fato de que métodos 2D fornecem informações mais completas do que os de 1D, tornando desnecessário a construção de curvas de calibração.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostras

Foram analisadas neste trabalho amostras de carne com gordura na proporção 1:1 (carne: gordura), denominada de carne com alto teor de gordura (CATG) e gordura bovina desidratada a vácuo (GPS). Essas amostras foram adquiridas no mercado local.

2.2. Equipamento

Para a realização das análises foi utilizado um espectrômetro de RMN-DT Minispec mq 20 (Bruker, Alemanha) operando com uma frequência de 19,9 MHz para o ^1H (0,47 T) com sonda de 10 mm e pulsos de 10° , 90° e 180° com larguras de 2, 18 e 35 μs , respectivamente, para a atenuação de pulso igual a 28 dB. Todos os experimentos foram realizados a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.3. Sequências de pulsos/inversão dos sinais

A sequência de pulso utilizada, para determinação da correlação bidimensional (2D) de T_1 e T_2 , foi a IR-CPMG (SONG *et al.*, 2002). Neste método a dimensão indireta é representada pela sequência IR e a dimensão direta é gerada pela sequência de pulsos CPMG, ou seja, os sinais são adquiridos somente entre os pulsos da sequência CPMG.

A inversão dos dados bidimensionais foi realizada com o algoritmo *Fast Laplace Inversion* (FLI) e utilizando parâmetro $\alpha = 2$ (SONG *et al.*, 2002; VENKATARAMANAN *et al.*, 2002).

3. Resultados e Discussão

Na Figura 1 (a) é ilustrado o mapa de correlação bidimensional T_1 - T_2 da amostra de carne com alto teor de gordura (CATG) obtido com a sequência de pulsos IR-CPMG. Nesta figura pode-se observar um sinal com correlação T_1 - T_2 de 215 - 130 ms (denominada de componente T_a), o qual está correlacionado com a água ligada nas miofibrilas (RENOU J *et al.*, 1985; BERTRAM *et al.*, 2002). O sinal com correlação T_1 - T_2 de aproximadamente 20 - 7 ms está correlacionado à água ligada a proteínas, conforme relatado por Bertram *et al.* (2002) e Renou *et al.* (1985).

Na Figura 1 (a), também podem ser observados os sinais com correlação T_1 - T_2 de 430 - 305 ms (componente T_c) e 135 - 85 ms (componente T_b) que são assinalados a gordura. Esta associação está de acordo com a literatura, visto que, é comum encontrar dois sinais nas distribuições dos tempos de relaxação de lipídios, os quais são relativos às diferentes mobilidades ao longo da cadeia dos alifática dos ácidos graxos (BERMAN *et al.*, 2015). Estas informações não estão evidentes em espectros da distribuição dos tempos de relaxação 1D (MORAES *et al.*, 2016; MONARETTO *et al.*, 2019), visto que os sinais da gordura geralmente estão sobrepostos com o sinal da carne. A componente T_b se sobrepõe na distribuição 1D de T_2 com o sinal da carne e a componente T_c se sobrepõe com o sinal de carne na distribuição 1D de T_1 (MORAES *et al.*, 2016; MONARETTO *et al.*, 2019). Os resultados associados a gordura foram confirmados pela análise da gordura bovina pura, sendo que os mapas 2D para essa amostra está na Figura 1 (b). Este mapa demonstra que a gordura bovina é composta por dois sinais com valores da correlação T_1 - T_2 em aproximadamente 190 - 120 ms (componente T_c') e 76 - 40 ms (T_b').

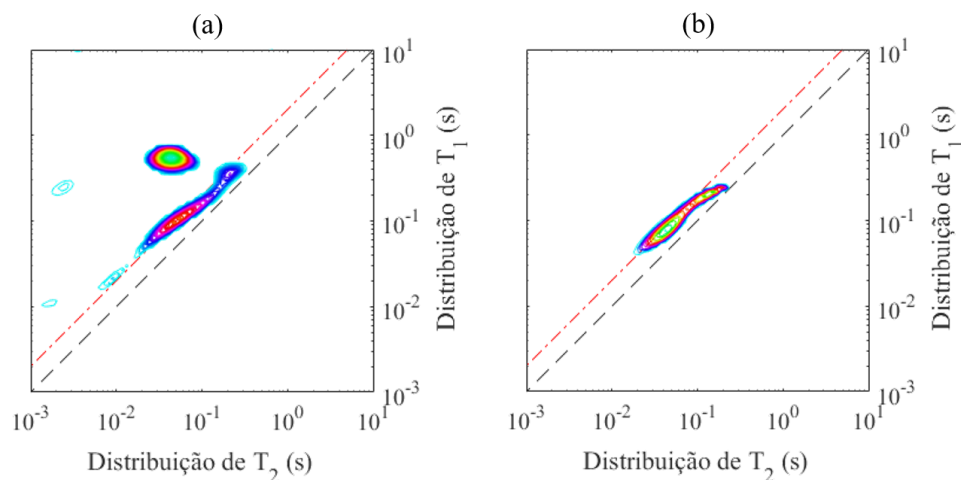


Figura 5. Mapas 2D obtidos dos sinais adquiridos pela sequência de pulso IR-CPMG para a amostra de CATG (a) e GPS (b). Para a obtenção desses mapas foi utilizado o método de processamento FLI. As linhas tracejadas em preto e vermelho indicam a região do mapa onde a T_1/T_2 é igual a 1 e 2, respectivamente.

Utilizando a área dos picos das componentes da gordura (componentes T_b e T_c da Figura 1 (a)) foi possível determinar a percentagem de gordura da amostra CATG, sendo encontrado um teor de 45%. Esses valores estão de acordo com a proporção da amostra (1:1 carne: gordura). Também foi possível determinar pelas áreas dos sinais T_b' e T_c' , dos mapas obtidos para a amostra de gordura pura (Figura 1 (b)), a percentagem de cada componente presente na gordura, sendo encontrado valores de 27 e 73%, respectivamente.

4. Conclusões

A sequência de pulso IR-CPMG demonstrou ser um bom método para determinação do teor de gordura em carne bovina, e os resultados obtidos estão de acordo como o teor de gordura usado no preparo da amostra. Além do mais, a sequência IR-CPMG é uma técnica simples, visto que este não necessita de curva de calibração para determinar o teor de gordura e também não requer etapas de preparação da amostra.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro por meio do processo de financiamento 1541262 e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) também pelo financiamento por meio do processo 2017/12864-0 e 2019/13656-8.

Referências

- ALMEIDA, J. C. D. et al. Fatty acid composition and cholesterol content of beef and chicken meat in Southern Brazil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 1, p. 109-117, 2006.
- BERMAN, P. et al. Study of liquid-phase molecular packing interactions and morphology of fatty acid methyl esters (biodiesel). *Biotechnology for Biofuels*, v. 8, p. 16, Feb 2015.
- BERTRAM, H. C. et al. Continuous distribution analysis of T2 relaxation in meat—an approach in the determination of water-holding capacity. *Meat Science*, v. 60, n. 3, p. 279-285, 2002.
- COLNAGO, L. et al. Why is Inline NMR Rarely Used as Industrial Sensor? Challenges and Opportunities. *Chemical Engineering & Technology*, v. 37, n. 2, p. 191-203, 2014.
- DE ANDRADE, F. D.; COLNAGO, L. A. USE OF NMR AS AN ONLINE SENSOR IN INDUSTRIAL PROCESSES. *Química Nova*, v. 35, n. 10, p. 2019-2024, 2012.
- JÚNIOR, D. M. D. L. et al. ALGUNS ASPECTOS QUALITATIVOS DA CARNE BOVINA: UMA REVISÃO. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 5, n. 4, p. 351-358, 2011.
- KING, J. W. et al. Extraction of Fat from Ground Beef for Nutrient Analysis Using Analytical Supercritical Fluid Extraction. *Journal of Agricultural and food chemistry*, v. 44, n. 9, p. 2700-2704, 1996.
- KODANI, Y. et al. NMR-based metabolomics for simultaneously evaluating multiple determinants of primary beef quality in Japanese Black cattle. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1297, 2017.
- MARIA, R. M. et al. Fast and Simple Nuclear Magnetic Resonance Method To Measure Conjugated Linoleic Acid in Beef. *Journal of Agricultural and food chemistry*, v. 58, n. 11, p. 6562-6564, 2010.
- MARKLEY, J. L.; HORSLEY, W. J.; KLEIN, M. P. SPIN-LATTICE RELAXATION MEASUREMENTS IN SLOWLY RELAXING COMPLEX SPECTRA. *Journal of Chemical Physics*, v. 55, n. 7, p. 3604-&, 1971.
- MEIBOOM, S.; GILL, D. MODIFIED SPIN-ECHO METHOD FOR MEASURING NUCLEAR RELAXATION TIMES. *Review of Scientific Instruments*, v. 29, n. 8, p. 688-691, 1958.
- MINISTÉRIO, D. S. Saiba por que carne com gordura faz mal para a saúde. [Blog da Saúde: Ministério da Saúde](#). 2019 2015.
- MONARETTO, T.; SOUZA, A.; MORAES, T. B.; BERTUCCI-NETO, V.; RONDEAU-MOURO, C.; COLNAGO, L.A. Enhancing signal-to-noise ratio and resolution in low-field NMR relaxation measurements using post-acquisition digital filters, *Magnetic Resonance in*

Chemistry, v.57, p. 616-625, 2019.

- MORAES, T. B.; MONARETTO, T.; COLNAGO, L. A. Rapid and simple determination of T_1 relaxation times in time-domain NMR by Continuous Wave Free Precession sequence. *Journal of Magnetic Resonance*, v. 270, p. 1-6, 2016.
- MOREIRA, J.; KLEIN, P.; ARALDI, D. F. Fatores que interferem no perfil dos ácidos graxos da carne bovina: revisão de literatura. XX Seminário Interinstitucional de ensino, pesquisa e extensão. UNICRUZ. Rrio grande do Sul 2015.
- RENOU J, P.; KOPP, J.; VALIN, C. Use of low resolution NMR for determining fat content in meat products. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 20, n. 1, p. 23-29, 1985.
- SONG, Y. Q. et al. T_1 - T_2 Correlation Spectra Obtained Using a Fast Two-Dimensional Laplace Inversion. *Journal of Magnetic Resonance*, v. 154, n. 2, p. 261-268, 2002.
- VENANCIO, T. et al. 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, n. 1, p. 34-39, 2005.
- VENKATARAMANAN, L.; SONG, Y.-Q.; HURLIMANN, M. D. Solving Fredholm integrals of the first kind with tensor product structure in 2 and 2.5 dimensions. *IEEE Transactions on Signal Processing*, v. 50, p. 1017-1026, 2002.
- VOLD, R. L. et al. MEASUREMENT OF SPIN RELAXATION IN COMPLEX SYSTEMS. *Journal of Chemical Physics*, v. 48, n. 8, p. 3831-&, 1968.