

## Análise de amostras de contra-filé bovino pela RMN de $^{31}\text{P}$ em alta resolução

Forato, L.A.<sup>1</sup>; Colnago, L.A.<sup>1</sup>; Corrêa, C.C.<sup>1,2</sup>; Ribeiro, F.Z.<sup>1,2</sup>; Tullio, R.R.<sup>3</sup>; Cruz, G.M.

<sup>1</sup> Embrapa Instrumentação Agropecuária – São Carlos/SP/Brazil – e-mail: lucimara@cnpdia.embrapa.br

<sup>2</sup> Instituto de Química de São Carlos – USP- São Carlos/SP/Brazil – email: catia@cnpdia.embrapa.br

<sup>3</sup> Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos/SP/Brazil – e-mail: rymer@cnpse.embrapa.br

### Introdução

A conversão de músculo em carne passa por vários processos bioquímicos. A velocidade do metabolismo energético pós-morte é responsável pela taxa de formação de lactato e a subsequente queda do pH na conversão do músculo à carne (Bertram et al. 2002). Normalmente as células do músculo obtêm sua energia (ATP) pela respiração via mitocôndria. A respiração aeróbica cessa, após o abate do animal, com a parada da circulação sanguínea e o aporte de oxigênio. Sob tais condições as células usam a fosfocreatina (PCr) para gerar ATP a partir de ADP. Entretanto, a principal fonte bioquímica anaeróbica pós-morte para suprimento de energia é via a quebra do glicogênio e glicólise, que além de ATP gera também ácido láctico (Lundberg et al. 1987). Neste processo o glicogênio é convertido em ácido láctico até que o pH caia em torno de 5,4 a 5,5 e inative as enzimas glicolíticas. A redução do pH pós-morte é influenciada por fatores intrínsecos como o tipo de músculo e a variabilidade entre animais; além de fatores extrínsecos como administração de drogas antes do abate, temperatura ambiente entre outros (Lawrie, 2005).

Além da extensão do metabolismo pós-morte, a diminuição do pH também está associada a fatores importantes que governam a palatabilidade da carne. Isto pois a desnaturação das proteínas é uma função tanto do pH quanto da temperatura, sendo as velocidades nas quais tais processos ocorrem de grande relevância (Lundberg et al. 1987).

Atualmente a medida de pH é realizada com o método convencional com pHmetro, onde insere-se o eletrodo na peça a ser avaliada. No entanto, esse método apesar do baixo custo é lento e invasivo, podendo ser uma fonte de propagação de microorganismos indesejados. Dentre os métodos alternativos, não invasivos e não destrutivos de medida de pH em materiais biológicos está a ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^{31}\text{P}$ . A RMN de  $^{31}\text{P}$  tem sido usada de modo não destrutivo para analisar o metabolismo dos principais metabólitos fosforilados como ATP, PCr, fosfatos de açúcares e compostos relacionados, principalmente glicose-6 fosfato (G6P) e fosfato inorgânico (Pi).

Vogel & Lundberg, 1985 analisaram músculos bovinos pela RMN de  $^{31}\text{P}$  para avaliar a presença de compostos fosforilados pós-morte. Os espectros indicaram que após 3 horas de abate foram observados os seguintes sinais: açúcares de fosfato (SP) em 4,25ppm; Pi em 2,15 ppm; PCr em -2,35 ppm, ATP  $\gamma$  em -4,95 ppm; ATP $\alpha$ +NADH em -9,90 ppm e ATP $\beta$  em -18,70 ppm. O espectro obtido 6 horas após o abate demonstrou a diminuição da intensidade da maioria dos sinais, exceto para o Pi. Após 24 horas então observou-se apenas um sinal intenso para o Pi e um de

menor intensidade para SP. Assim neste trabalho, avaliou-se a utilização da RMN de  $^{31}\text{P}$  para se analisar o pH de amostras de contra-filé bovino aproximadamente 48 horas pós-morte. Para isso utilizou-se o sinal do Pi, pois como mencionado é o sinal de maior intensidade após 24h. Além disso, esse método já é bastante usado para medidas in vivo de pH em músculos e outros tecidos. Ele se baseia na sensibilidade do deslocamento químico (DQ) do  $^{31}\text{P}$  do grupo fosfato do Pi com o pH. O DQ é linear na faixa de pH de 5 a 7. Para a medida do pH é necessário fazer uma curva de calibração, com amostras com pHs conhecido, para previsão nas amostras de carne.

### Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o uso de RMN de  $^{31}\text{P}$  em alta resolução para se medir o pH da carne bovina 48 horas pós-morte, como um método não invasivo e não destrutivo.

### Materiais e Métodos

As carnes analisadas foram obtidas de 20 filhos de touro raça Angus e vacas cruzadas Angus x Nelore (AXTA); e, 14 animais filhos de touro raça Angus e vacas cruzadas Simental x Nelore (AXTS). 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 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 (Tullio 2004).

Analisou-se amostras de carne da região do contra-filé do tipo músculo – *longissimus lumborum* - retiradas da região da 12ª costela e analisadas com pHmetro Testo. Dessa mesma amostra retirou-se pedaços de carne de 8 mm de diâmetro por cerca de 10 mm de espessura para serem analisadas por RMN.

Os espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  foram obtidos num espectrômetro Varian INOVA 400, campo de 9,4T, usando um tempo de aquisição de 0,5 s; tempo de espera de 2s e largura de pulso de 90 graus de 10  $\mu\text{s}$ . Nos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  das amostras de carne foram observadas a presença de três sinais, que são relativos aos fosfo-mono-ésteres, Pi e fosfo-di-ésteres. A medida de pH, pela RMN de  $^{31}\text{P}$ , pode ser feita então a partir do DQ do Pi usando a equação de Henderson-Hasselbach:  $\text{pH} = \text{pK}_a + \log[(d_0 + 2,52 - d_a) / (-2,52 - d_b - d_0)]$ . Onde  $\text{K}_a$  é segunda constante de dissociação para o  $\text{H}_2\text{PO}_4$ , e  $d_0$ ,  $d_a$  e  $d_b$  são os DQs do Pi,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{HPO}_4^{2-}$ , respectivamente.

## Resultados e Discussão

Para se calcular o pH das amostras de carne a partir dos DQs do Pi, obteve-se uma curva de titulação do DQ do Pi, em espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$ , de soluções tampão fosfato 10 mMol/L na região de pH de 4,5 a 7,8; com passo de 0,3 unidades de pH entre cada solução. O ajuste sigmoidal, obtido a partir dos deslocamentos químicos das soluções tampão, forneceu os seguintes valores:  $\text{pK}_a=6,6$ ;  $d_a=0,64$  e  $d_b=2,98$  (figura 1).

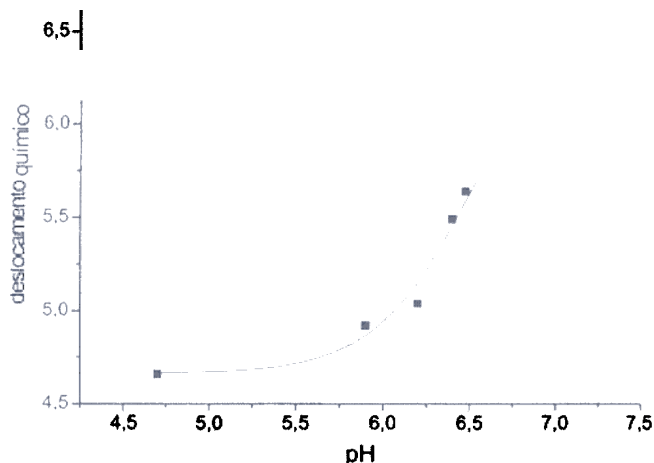


Figura 1. Curva de Calibração para soluções tampão fosfato 10 mMol/L na região de pH de 4,5 a 7,8. Equação:  $\text{pH} = \text{pK}_a + \log\left[\frac{(d_0 + 2,52 - d_a)}{(-2,52 - d_b - d_0)}\right]$ , onde  $\text{pK}_a=6,6$ ;  $d_a=0,64$  e  $d_b=2,98$  e  $d_0$  o deslocamento químico observado. -!- são os dados experimentais e a linha contínua representa o ajuste sigmoidal.

Os valores de  $\text{pK}_a$ ,  $d_a$  e  $d_b$ , foram utilizados na equação de Henderson-Hasselbach, citada acima, para se calcular o pH das amostras de carne analisadas. O valor de  $d_0$  é o DQ do Pi observado para as amostras de carne. Nos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  das amostras de carne analisadas é possível se observar a presença de três sinais, que são relativos ao Pi, mono- e di- ésteres do ácido fosfórico (MPE e DPE, respectivamente) (figura 3a).

Foi obtido ajuste linear para gráficos contendo valores de DQ do Pi das amostras de carne obtidos pela RMN de  $^{31}\text{P}$  versus pH medido pelo método convencional (figura 3b). O coeficiente de correlação obtido foi 0,74. Este valor de correlação indica uma boa correlação entre os valores dos DQs dos Pis com o pH, uma vez que deve ser considerada a pequena dispersão dos valores pH, observados nesses animais jovens (18 a 24 meses), com mesmo manejo (alimentação, confinamento, etc) e abatidos com uma espessura de gordura de aproximadamente 3mm (Corrêa 2007). Outra fonte de erro entre as duas medidas é que as médias com pHmetro e RMN foram feitas em amostras diferentes obtidas do mesmo corte.

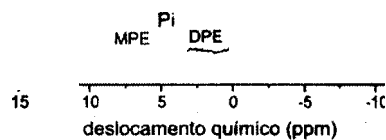
PROCI-2007.00190

FOR

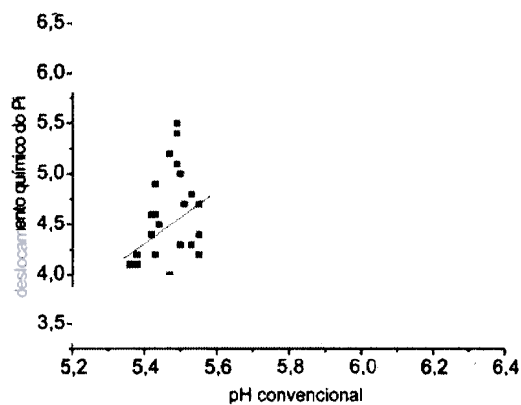
2007

SP-2007.00190

$\text{H}_2\text{PO}_4^-$



a



b

Figura 3. a) Espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  de uma amostra contrafilé bovino; b) gráfico dos DQs dos Pis observados para as amostras de carne analisadas pela RMN de  $^{31}\text{P}$  em função do pH medido para as mesmas amostras com pHmetro Testo. O valor de r obtido foi 0,74.

## Agradecimentos

CNPq e FAPESP.

## Referências Bibliográficas

- BERTRAM, H.C.; JORGENSEN-STODKILDE, H.; KARLSSON, A.H. ANDERSEN, H.J. Post mortem energy metabolism and meat quality of porcine M. Longissimus dorsi as influenced by stunning method – A  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopic study. Meat Science, 62, 113-119, 2002
- CORRÊA, C.C. Análise da qualidade de carne bovina por RMN em baixa resolução. 2007. 119p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- LAWRIE, A.A. Ciência da Carne. Porto Alegre, Artmed. 2005, p.88-90.
- Lundberg, P.; Vogel, H.J. Post Mortem Metabolism in Fresh Porcine, Ovine and Frozen Bovine Muscle. Meat Science 19, 1-14, 1987.
- 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.
- VOGEL, H.J.; LUNDBERG, P. Pos Mortem Energy metabolism in Bovine Muscles Studied by Non-Invasive Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance. Meat Science, 13, 1-18, 1985.

Análise de amostras de contra-  
2007 SP-2007.00190



17218-1