

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA POR NIRS PARA A
PREDIÇÃO DE CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DA CARNE
BOVINA**

Raphael Rocha de Oliveira
Orientador: Prof. Dr. Moacir Evandro Lage

GOIÂNIA
2014



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TE-DE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: **Raphael Rocha de Oliveira** E-mail: **rapha.vet@gmail.com**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? Sim Não

Vínculo Empregatício do autor: Agência de fomento:

País: UF: CNPJ: Sigla:

Título: Modelos de calibração multivariada por NIRS para a predição de características de qualidade da carne bovina Palavras-chave: **força de cisalhamento, infravermelho próximo, maciez, proteína, quimiometria, regressão PLS**

Título em outra língua: **Multivariate calibration models for NIRS to predict beef quality characteristics**

Palavras-chave em outra língua: **chemometric, near infrared, PLS regression, protein, shear force, tenderness**

Área de concentração: **Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos** Data defesa: (dd/mm/aaaa) **28/06/2014**

Programa de Pós-Graduação: **Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

Orientador(a): **Moacir Evandro Lage** E-mail: **moacir@cpa.vet.ufg.br**

Co-orientador(1): **Cíntia Silva Minafra e Rezende** E-mail: **cintia@cpa.vet.ufg.br**

Co-orientador(2): **Cristiano Sales Prado** E-mail: **pradocs@cpa.vet.ufg.br**

3. Informações de acesso ao documento:

Liberção para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

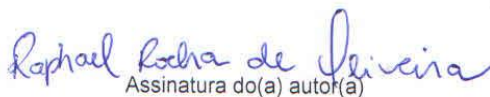
[] Capítulos. Especifique:

[] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 1 de julho de 2014


Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

RAPHAEL ROCHA DE OLIVEIRA

**MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA POR NIRS PARA A
PREDIÇÃO DE CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DA CARNE
BOVINA**

Tese apresentada para obtenção do
grau de Doutor em Ciência Animal junto
à Escola de Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:

Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos

Orientador:

Prof. Dr. Moacir Evandro Lage - UFG

Comitê de Orientação:

Profa. Dra. Cíntia Silva Minafra e Rezende - UFG

Prof. Dr. Cristiano Sales Prado - UFG

GOIÂNIA
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG**

Oliveira, Raphael Rocha de.
O48m Modelos de calibração multivariada por NIRS para a
predição de características de qualidade da carne bovina
[manuscrito]:/ Raphael Rocha de Oliveira. - 2014.
117 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Moacir Evandro Lage.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,
Escola de Veterinária e Zootecnia, 2014.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, tabelas e abreviaturas.

1. Carne bovina – Qualidade
2. Carne bovina – Maciez
3. Carne bovina – Químiometria I. Título.

CDU: 637.5'62

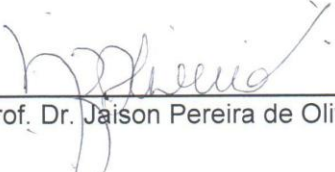
RAPHAEL ROCHA DE OLIVEIRA


Tese defendida e aprovada em **28/06/2014** pela Banca Examinadora constituída pelos professores:


Prof. Dr. Moacir Evandro Lage
(ORIENTADOR (A))


Prof. Dr. José Gabriel Amorim - MAPA


Prof^a. Dr^a. Cláudia Peixoto Bueno


Prof. Dr. Jaison Pereira de Oliveira


Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau

Dedico este trabalho à

Minha esposa Michelle Costa de Sales Oliveira,
por seu amor, companheirismo, apoio e
incentivo em todos os momentos, que me
encorajaram a enfrentar as dificuldades e a
perseverar para a conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde, física e psíquica, disposição, paciência e as condições necessárias para o cumprimento desta importante etapa.

Aos meus pais, Gilton Pereira de Oliveira e Maria do Socorro Bandeira Rocha de Oliveira, que passaram por dificuldades diversas, mas não mediram esforços para criar ambiente favorável para que eu pudesse me focar apenas nos estudos.

Aos meus irmãos, Gracielle Rocha de Oliveira Borges e Gilton Pereira de Oliveira Júnior, pelo apoio e força e ao meu avô, Adauto Rocha Nogueira, pela fé e orações dedicadas a mim.

Ao meu primo, Dr. Jaison Pereira de Oliveira, que desde o início da graduação, incentivou-me a realizar estágios e a participar de projetos nesta área de pesquisa, sendo seu apoio fundamental para a conclusão deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Moacir Evandro Lage, que desde a graduação, vem contribuindo para o meu desenvolvimento acadêmico, com sugestões valiosas e conhecimentos técnicos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Goiás, especialmente aos meus co-orientadores, Profa. Dra. Cíntia Silva Minafra e Rezende e Prof. Dr. Cristiano Sales Prado.

Aos professores, Dr. Edmar Soares Nicolau, Dra. Cláudia Peixoto Bueno e ao Dr. José Gabriel Amoril, membros da Banca de Defesa e à Profa. Dra. Karyne Oliveira Coelho, membro da Banca de Qualificação, pela importante contribuição.

Ao Centro de Pesquisa em Alimentos, da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, que com recursos próprios possibilitou a execução das análises laboratoriais realizadas neste estudo.

Aos funcionários administrativos e analistas do Centro de Pesquisa em Alimentos.

Aos professores, Dr. José Neuman Miranda Neiva e PhD. João Restle, pela importante colaboração na etapa de confinamento dos animais.

À Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins e aos funcionários e alunos da instituição, que participaram da etapa de confinamento dos animais utilizados no estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para o confinamento dos animais.

Aos meus grandes amigos, Fabrício de Oliveira Pereira, Osvaldo José da Silveira Neto e Valter Mário Canedo Filho, companheiros, nos momentos bons e ruins, desde o início da graduação.

Às doutorandas, Maria Izabel Amaral Souza e Francine Oliveira Souza Duarte, pela amizade e contribuição importante nas análises físico-químicas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás pela oportunidade concedida.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
REFERÊNCIAS.....	17
CAPÍTULO 2 – MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA POR NIRS PARA A DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CARNE BOVINA.....	23
RESUMO.....	23
ABSTRACT	24
1 INTRODUÇÃO	25
2 MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1 Análises físico-químicas	29
2.1.1 Umidade	29
2.1.2 Resíduo mineral fixo (RMF).....	29
2.1.3 Lipídios totais	30
2.1.4 Proteína.....	31
2.1.5 Análise estatística.....	32
2.2 Procedimentos NIRS	32
2.2.1 Obtenção dos espectros.....	32
2.2.2 Definição do método de seleção de espectros e pré-tratamentos matemáticos	33
2.2.3 Validação externa.....	35
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS.....	56
CAPÍTULO 3 – MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA POR NIRS PARA DETERMINAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS DE MACIEZ NA CARNE BOVINA	62
RESUMO.....	62
ABSTRACT	63
1 INTRODUÇÃO	64
2 MATERIAL E MÉTODOS	68
2.1 Análises físico-químicas	69
2.1.1 Capacidade de retenção de água.....	69

2.1.2 Força de cisalhamento	69
2.1.3 Índice de fragmentação miofibrilar (IFM)	70
2.1.4 Potencial hidrogeniônico (PH)	73
2.1.5 Quantificação do colágeno total	74
2.1.6 Quantificação do colágeno solúvel	76
2.1.7 Análise estatística.....	79
2.2 Procedimentos NIRS	79
2.2.1 Obtenção dos espectros.....	79
2.2.2 Definição do método de seleção de espectros e pré-tratamentos matemáticos	80
2.2.3 Validação externa.....	82
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
4 CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS	101
CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
APÊNDICE 1	113
APÊNDICE 2	115

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 – O espectro eletromagnético	2
FIGURA 2 – Tipos de vibrações moleculares.....	3
FIGURA 3 – Alisamento através do método de Savitzky-Golay.....	7
FIGURA 4 – Espectros de absorvância NIR antes do MSC (A) e depois do MSC (B)	8
FIGURA 5 – Esquema geral do processo de calibração	10
FIGURA 6 – Processo de compressão de dados	11

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 – Espectros de carnes bovinas utilizadas no conjunto de calibração sem a aplicação de pré-tratamentos	39
FIGURA 2 – Espectros de carne bovina com a utilização de primeira derivada (A) e segunda derivada (B).....	42
FIGURA 3 – Espectros de carne bovina com a utilização de detrend.....	42
FIGURA 4 – Espectros de carne bovina com a SNV (A) e MSC (B)	43
FIGURA 5 – Diferenças espectrais observadas para lipídios totais em carne bovina.....	47
FIGURA 6 – Relação entre os valores determinados pelo NIRS e os valores de referência obtidos para a determinação de proteína nas amostras do conjunto de calibração (A) e validação (B)	52
FIGURA 7 – Diferenças espectrais observadas para umidade em carne bovina.....	53

CAPÍTULO 3

FIGURA 1 – Relação entre os valores determinados pelo NIRS e os valores de referência da determinação de pH das amostras dos conjuntos de calibração (A) e de validação (B)	98
---	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1 – Intervalo, média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) da composição química das amostras de carnes bovinas utilizadas no conjunto de calibração.....	37
TABELA 2 – Teores médios de lipídios totais e umidade na carne dos bovinos utilizados nos conjuntos de calibração e validação.....	38
TABELA 3 – Correlação entre os constituintes de composição química da carne bovina.....	38
TABELA 4 – Modelos de calibração multivariada por NIRS considerados com boa ou excelente capacidade preditiva na determinação de constituintes da composição química em carne bovina, desenvolvidos com o método PLS na faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm	41

CAPÍTULO 3

TABELA 1 – Curva padrão com albumina sérica bovina (BSA)	71
TABELA 2 – Preparo das concentrações-padrão de hidroxiprolina para obtenção de curva-padrão	75
TABELA 3 – Intervalo, média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) de características de maciez das amostras de carnes bovinas utilizadas no conjunto de calibração	84
TABELA 4 – Correlação entre os atributos de maciez da carne bovina.....	85
TABELA 5 – Modelos de calibração multivariada por NIRS considerados com boa ou excelente capacidade preditiva para a determinação de características de maciez da carne bovina, desenvolvidos com o método PLS na faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm.....	86

APÊNDICE 1

TABELA 1 – Resultados para a obtenção de modelos de calibração por NIRS para a predição de lipídios totais em carne bovina, utilizando o método PLS e a faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm	113
TABELA 2 – Resultados para a obtenção de modelos de calibração por NIRS para a predição de proteínas em carne bovina,	

utilizando o método PLS e a faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm	113
TABELA 3 – Resultados para a obtenção de modelos de calibração por NIRS para a predição de resíduo mineral fixo em carne bovina, utilizando o método PLS e a faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm	114
TABELA 4 – Resultados para a obtenção de modelos de calibração por NIRS para a predição de umidade em carne bovina, utilizando o método PLS e a faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm	114

APÊNDICE 2

TABELA 1 – Resultados para a obtenção de modelos de calibração por NIRS para a predição da capacidade de retenção de água em carne bovina, utilizando o método PLS e a faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm.....	115
TABELA 2 – Resultados para a obtenção de modelos de calibração por NIRS para a predição do conteúdo de colágeno total em carne bovina, utilizando o método PLS e a faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm	115
TABELA 3 – Resultados para a obtenção de modelos de calibração por NIRS para a predição do conteúdo de colágeno solúvel em carne bovina, utilizando o método PLS e a faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm	116
TABELA 4 – Resultados para a obtenção de modelos de calibração por NIRS para a predição da força de cisalhamento em carne bovina, utilizando o método PLS e a faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm	116
TABELA 5 – Resultados para a obtenção de modelos de calibração por NIRS para a predição do índice de fragmentação miofibrilar em carne bovina, utilizando o método PLS e a faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm.....	117
TABELA 6 – Resultados para a obtenção de modelos de calibração por NIRS para a predição de pH em carne bovina, utilizando o método PLS e a faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS

BC	Correção da linha de base
BSA	Albumina sérica bovina
CRA	Capacidade de retenção de água
CV	Coefficiente de variação
DM	Distância de Mahalanobis
DP	Desvio padrão
FMB	Farelo do mesocarpo do babaçu
IFM	Índice de fragmentação miofibrilar
IML	Interactive Matrix Language
MD	Máxima distância
MPLS	Mínimos quadrados parciais modificada
MSC	Correção multiplicativa de sinal
NIRS	Espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo
NM	Nanômetros
PCA	Análise dos componentes principais
PCR	Regressão por componentes principais
pH	Potencial hidrogeniônico
PLS	Mínimos quadrados parciais
PRESS	Quadrado dos erros de previsão
R ²	Coefficiente de determinação
RMF	Resíduo mineral fixo
RPD	Relação de desempenho do desvio
SAS	Statistical Analysis System
SEC	Erro padrão de calibração
SEP	Erro padrão de validação
SG	Savitzky-Golay
SNV	Variável normal padronizada
WBSF	Warner-Bratzler shear force

RESUMO GERAL

A espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIRS) tem sido aplicada com êxito na determinação quantitativa dos principais constituintes da carne bovina, mas tem apresentado resultados inconsistentes na determinação das características relacionadas à maciez. Além disso, os diferentes aspectos relacionados ao processamento dos dados (pré-tratamentos matemáticos, faixas espectrais, apresentação das amostras, método de regressão), devem ser avaliados constantemente, já que afetam a capacidade de predição do NIRS. Assim sendo, o presente estudo foi desenvolvido para determinar quais métodos de processamento de dados espectrais possibilitam, com o método de regressão PLS, a obtenção de modelos de calibração robustos para a determinação da composição química e das características de maciez da carne bovina, sendo a acurácia dos modelos determinada por validação externa. Para o desenvolvimento dos modelos de calibração, foram coletados três espectros de cada amostra do músculo *Longissimus dorsi* de 25 novilhos mestiços leiteiros castrados, divididos em cinco tratamentos, cinco repetições em cada, com base no fornecimento de dietas contendo milho e inclusão de farelo do mesocarpo do babaçu nas proporções de 0; 12; 24; 36 e 48% na matéria seca da dieta total, totalizando 75 espectros. Para o conjunto de validação externa, foram utilizadas amostras de cinco novilhos mestiços leiteiros castrados submetidos à dieta à base de milho e soja, totalizando 15 espectros. Para a determinação da composição química (lipídios totais, proteína, resíduo mineral fixo e umidade) e de propriedades de maciez (capacidade de retenção de água, colágeno total e solúvel, força de cisalhamento, IFM e pH), foram desenvolvidos 135 modelos de calibração com os pré-tratamentos matemáticos disponíveis no *software* VISION, versão 3.1, utilizando a regressão PLS, dos quais 37 (27,41% do total) apresentaram valores de coeficientes de determinação considerados como boa ou excelente capacidade preditiva. O pré-tratamento com “primeira derivada” possibilitou o desenvolvimento de modelos mais robustos para as propriedades de composição química, exceto para RMF, em que “Savitzky-Golay” e “segunda derivada” foram mais eficientes, obtendo valores de R^2 e RPD superiores aos disponíveis na literatura. Para a determinação das propriedades de maciez em carne bovina, os modelos desenvolvidos com os pré-tratamentos com “primeira e segunda derivadas”, isoladamente ou com a utilização dos métodos de suavização “Savitzky-Golay” ou “correção multiplicativa de sinal”, apresentaram os maiores valores de RPD, demonstrando ser ferramentas quimiométricas eficientes para a obtenção de modelos de calibração robustos. Foram obtidos modelos com capacidade preditiva limitada apenas para a determinação de lipídios totais e quantificação do colágeno total, provavelmente, devido à baixa variabilidade apresentada nas amostras utilizadas e à baixa sensibilidade do NIRS para o colágeno total. Conclui-se, que a espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo pode ser utilizada em substituição aos métodos convencionais, por ser uma técnica rápida, precisa, sensível e que permite a análise simultânea das características de qualidade da carne bovina.

Palavras-chave: força de cisalhamento, infravermelho próximo, maciez, proteína, quimiometria, regressão PLS

ABSTRACT

Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) has been successfully applied in the quantitative determination of the main constituents of beef but it has been presenting inconsistent results in determining characteristics relating to tenderness. In addition, the various aspects related to data processing (mathematical pre-treatments, spectral bands, sample presentation, regression method), should be constantly evaluated, since they affect the prediction capacity of NIRS. In this context, the present study was developed to determine which spectral data-processing methods make it possible, using the PLS regression method, to obtain robust calibration models that determine the chemical composition and tenderness characteristics of beef. The accuracy of the models was determined by external validation, which has been little used in previously published studies. To develop the calibration models, three spectra were collected from each sample of the *Longissimus dorsi* muscle of 25 mixed-breed castrated dairy calves, divided into five treatments (five repetitions in each) based on supplying diets containing millet and including babassu mesocarp bran at proportions of 0; 12; 24; 36 and 48% in the dry matter of the total diet, comprising 75 spectra. For the external validation set, samples were used from five mixed-breed castrated dairy calves fed on a diet based on maize and soybean, totalling 15 spectra. To determine the chemical composition (fat content, protein, ash content and moisture) and the tenderness properties (water holding capacity – WHC -, total and soluble collagen, shear force, FMI and pH), 135 calibration models were developed with mathematical pre-treatments available on VISION software, version 3.1, using PLS regression, from which 37 (27.41% of the total) presented coefficients of determination considered good or excellent in their predictive capacity. The pre-treatment with “first derivatives” made it possible to develop more robust models for the chemical composition properties, except for RMF, in which “Savitzky-Golay” and “second derivatives” were more efficient, obtaining R^2 and RPD values above those available in the literature. For determining the tenderness properties in beef, the models developed with “first and second derivatives” pre-treatments, in isolation or with “Savitzky-Golay” or “multiplicative scatter correction” smoothing methods, presented the highest values of RPD, demonstrating that themselves are efficient chemometric tools for obtaining robust calibration models. Models were obtained with limited predictive capacity only in the determination of total fats and total collagen quantification. This was probably due to the low variability presented in the samples used and to the low sensitivity of NIRS for total collagen. It was concluded that NIRS can be used to replace conventional methods, being a fast and precise technique, as well as allowing simultaneous analysis of beef quality characteristics.

Keywords: chemometric, near infrared, PLS regression, protein, shear force, tenderness

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A carne bovina é um importante alimento na dieta humana, por ser fonte de proteína de alto valor biológico, minerais e todas as vitaminas do complexo B. Além do aspecto nutricional, a demanda mundial por carne tem apresentado aumento substancial, impulsionado pelo crescimento populacional, urbanização e crescente melhoria do poder aquisitivo da população. Para atender o consumo previsto para 2050, a produção mundial de carne bovina deve ser de 91 milhões de toneladas (OECD-FAO, 2012), sendo que a produção mundial de carne bovina estimada para 2014 é de 58,856 milhões de toneladas (USDA, 2014).

Além do aumento na produção, a cadeia da carne bovina deve apresentar severas e profundas mudanças para atender o consumidor final, que tem exigido elevados níveis de qualidade. A carne é um produto com elevado grau de heterogeneidade, pois a sua composição química, os atributos tecnológicos e sensoriais são altamente influenciados por fatores *ante* e *post mortem* (PRIETO et al., 2009). Portanto, a variabilidade nas características da qualidade da carne é a principal preocupação dos consumidores, que estão dispostos a pagar preços mais altos para a carne homogênea e de qualidade (LEROY et al., 2003; WARRISS, 2010).

Embora a análise da composição química possa fornecer informações confiáveis sobre a qualidade da carne (PREVOLNIK et al., 2004), no momento da aquisição do produto, os principais atributos de qualidade são a cor e a quantidade de gordura e, no momento do consumo, a maciez é considerada a mais importante pela média dos consumidores (LEROY et al., 2003; LAWRIE, 2005).

Para determinar a composição química e as características relacionadas com a maciez da carne bovina, podem-se utilizar métodos físicos, químicos ou sensoriais. Entretanto, são métodos extremamente morosos, laboriosos, caros, destrutivos e que exigem a utilização de reagentes agressivos, que representam riscos aos analistas e ao meio ambiente.

Como a indústria e laboratórios necessitam de respostas rápidas, há a necessidade de desenvolver técnicas que exijam menor manipulação, preparo e

tempo de análise reduzidos, que permitam a determinação simultânea de vários atributos; além de apresentarem bom grau de precisão. Neste sentido, a técnica de espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) apresenta-se como uma alternativa promissora (CEN & HE, 2007).

Basicamente, o termo espectroscopia tem sido utilizado para designar métodos analíticos em que se estuda a interação de radiações eletromagnéticas com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos, o estudo dos níveis de energia de átomos ou moléculas (PANTOJA, 2006).

A parte do espectro eletromagnético visível ao olho humano se estende de 400 a 780 nm, enquanto que o espectro eletromagnético do infravermelho se situa na faixa entre 780 e 1.000.000 nm (Figura 1), sendo dividido em três faixas, dependendo da proximidade da região do visível: infravermelho próximo (780 a 2.500 nm), infravermelho médio (2.500 a 50.000 nm) e infravermelho distante (50.000 a 1.000.000 nm) (SKOOG et al., 2002).

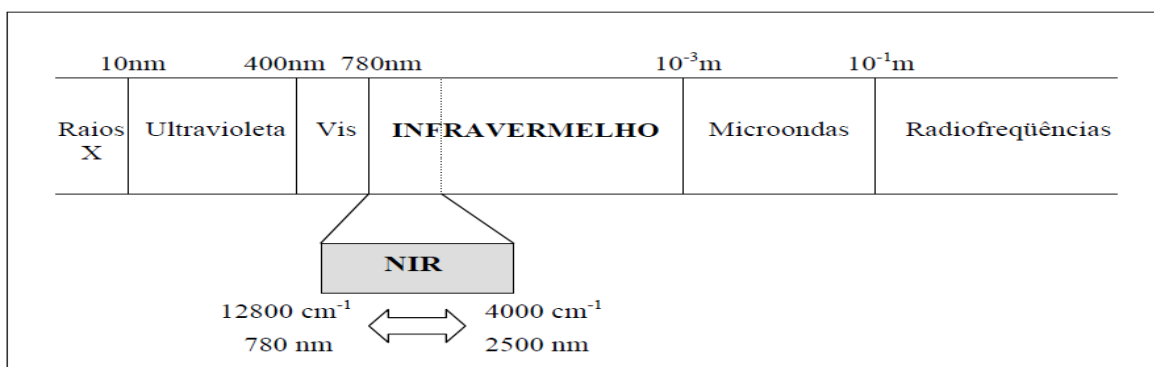


FIGURA 1 - O espectro eletromagnético (Sotelo, 2006)

NIRS é a sigla de uma técnica denominada *near infrared reflectance spectroscopy* (espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo). O funcionamento de um espectrômetro de infravermelho é similar ao de outros espectrômetros. Radiações em comprimentos de onda específicos são geradas e entram em contato com a amostra que, por sua vez, irá interagir com a radiação incidente, gerando absorções em comprimentos de onda específicos, correspondente ao tipo de composto, ligação e interação existentes na amostra (ZENI, 2005).

A base física de absorção de luz é relacionada à natureza das ligações moleculares que, por sua vez, são definidas pelos vínculos entre átomos dentro da molécula (VAN KEMPEM & JACKSON, 1996). Dependendo da massa e das ligações químicas em torno de um átomo, da geometria molecular e, eventualmente, do acoplamento vibrônico, têm-se efeitos vibracionais distintos na molécula (KROGSGAARD-LANRSEN et al., 1996). Os diferentes tipos de vibrações são mostrados na Figura 2, podendo ser classificados em deformação axial (ou estiramento) e deformação angular, que podem ser simétricas ou assimétricas. As vibrações angulares podem ainda ser classificadas como no plano ou fora do plano (DURRANT, 2009).

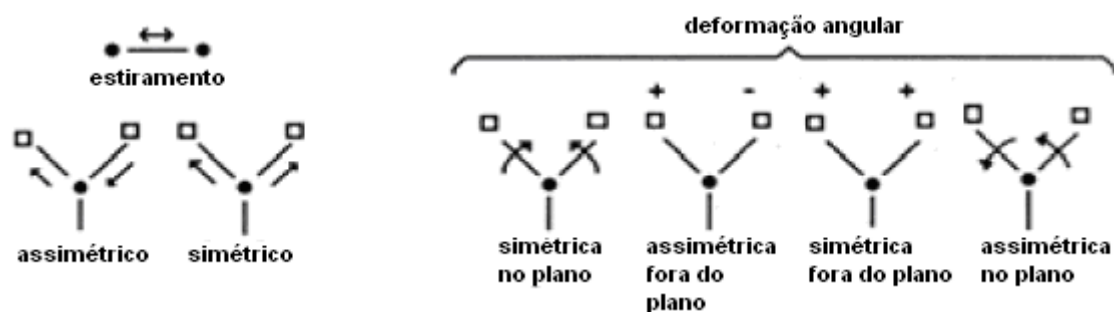


FIGURA 2 - Tipos de vibrações moleculares (Adaptado de Durrant, 2009)

Devido a este caráter vibracional, as moléculas, quando submetidas à ação de radiações, estão sujeitas ao desenvolvimento de uma série de efeitos inerentes às ondas eletromagnéticas, tais como absorção, refração, reflexão e espalhamento. Tais efeitos são específicos dos átomos presentes na molécula, bem como da região do espectro envolvida, permitindo a identificação de compostos (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

Segundo os mesmos autores, como a intensidade de uma banda de absorção é proporcional à concentração do componente que causou esta banda, a quantidade de um composto presente em uma amostra pode ser determinada através de uma curva de calibração (intensidade da banda *versus* concentração) construída a partir de amostras com concentrações conhecidas do composto em questão.

Existem diferenças básicas no comportamento da emissão de luz nas diferentes regiões do infravermelho. Enquanto que o infravermelho próximo

caracteriza-se por uma combinação de harmônicas ou sobretons (ondas curtas com 700 a 1.400 nm) e bandas de vibrações (1.400 a 2.500 nm), o infravermelho médio se caracteriza por uma propagação de luz como vibrações fundamentais (2.500 a 50.000 nm), e o infravermelho distante apresenta ondas muito longas (50.000 a 1.000.000 nm) propagando-se como rotações (GIVENS et al., 1997).

Os alimentos são compostos, principalmente, de matéria orgânica e uma fração inorgânica menor. Todas as ligações orgânicas têm bandas de absorção na região do infravermelho próximo, enquanto que os minerais só são detectados quando em complexos orgânicos ou quelatos (VAN KEMPEN & JACKSON, 1996).

Por causa da baixa massa atômica do hidrogênio, as harmônicas e combinações de banda do hidrogênio tornam os grupos funcionais C-H, O-H e N-H dominantes no espectro do infravermelho próximo em alimentos, possuindo comprimentos de onda de absorção característicos (SKOOG et al., 2002).

Entretanto, os alimentos apresentam grande número de ligações moleculares que caracterizam diversos compostos orgânicos, mas que absorvem luz de um mesmo comprimento de onda, gerando espectros com combinações e forte sobreposição das bandas de vibração e harmônicas. Além disso, as absorções são 100 a 1000 vezes menos intensas do que as observadas no infravermelho médio e distante, e há grande interferência da água, que pode mascarar outros compostos. Conseqüentemente, os espectros NIR não são facilmente interpretáveis, o que inviabilizou a técnica NIRS até a década de 80 (VAN KEMPEN & JACKSON, 1996; WORKMAN et al., 1996; SOTELO 2006).

Com a popularização dos microcomputadores e o surgimento de uma nova área na química, a quimiometria, o infravermelho próximo voltou a ser objeto de estudos em química analítica (NATALINO, 2006). A quimiometria pode ser definida como uma disciplina da química que utiliza métodos matemáticos, estatísticos e lógica formal, a fim de selecionar os melhores procedimentos experimentais para a obtenção de informações químicas de natureza multivariada (HOPKE, 2003).

A calibração multivariada é uma área da quimiometria que permite determinar um componente de interesse em matrizes complexas, ou analisar, simultaneamente, vários componentes em sistemas mais simples (MALUF, 2008).

Os métodos de calibração multivariada, em conjunto com técnicas espectroscópicas, permitem a extração de informações dos espectros completos e/ou de faixas espectrais, pois utilizam *software* que estabelecem correlação entre os resultados da propriedade de interesse, determinados inicialmente por um método de referência conhecido, com os espectros obtidos por NIRS, que servirão para a construção do modelo matemático (BRAGA & POPPI, 2004; PANTOJA, 2006). A base da calibração multivariada é, portanto, um sistema de determinação indireta (NATALINO, 2006).

A calibração multivariada também é de suma importância para corrigir erros e efeitos não lineares no espectro NIRS, causados por: perdas de energia da amostra por absorvência, refração interna, difusão interna e reflexão especular; interação complexa entre os componentes da amostra; reprodutibilidade pobre das medições; distorções espectrais causadas pelo *hardware* do equipamento (deslocamentos da linha de base, deslocamentos de comprimentos de onda, efeitos da não-linearidade do detector e ruído no detector); variações imprevisíveis (vibrações, correntes de ar, movimento aleatório de moléculas); interferências de parâmetros espectrais (espalhamento de luz, profundidade de penetração da luz); variações no espectro devido à temperatura; entre outros (CEN & HE, 2007; QUEJI, 2008; SIESLER et al., 2008).

Os erros e efeitos não lineares (ruídos) podem variar de um espectro a outro, mesmo que seja da mesma amostra, ocasionando dificuldades na análise dos dados, interferindo na extração de informações relevantes, bem como na sua interpretação (FERREIRA et al., 1999), originando modelos de baixa previsão de propriedades (MARTENS & NAES, 1991).

Para reduzir, eliminar ou padronizar os impactos sobre os espectros, sem alterar a informação espectroscópica contida neles, são utilizados pré-tratamentos matemáticos. A utilização de pré-tratamentos também facilita a interpretação dos espectros, pois ajudam na obtenção de dados importantes e na exclusão de dados desnecessários, melhorando a qualidade de previsão dos modelos de calibração (ZENI, 2005).

Uma das primeiras fases no desenvolvimento dos modelos é detectar amostras anômalas ou *outliers*, que são aquelas cujas características se diferenciam muito do valor global (H), calculado para cada tratamento (SIMAS,

2005). É necessária a identificação e a eliminação destes elementos já no processo de calibração, pois caso contrário pode-se obter um modelo não representativo (MARTENS & TORMOD, 1992).

A “distância de Mahalanobis” e a “máxima distância” são métodos muito utilizados para a seleção de espectros, pois medem a que distância está uma amostra a partir do centro de distribuição, identificando e eliminando os espectros que diferenciam muito do valor global, melhorando a eficiência do modelo de calibração (FERREIRA et al., 1999; CANTOR et al., 2011).

No entanto, tal procedimento deve ser realizado com cautela, pois algumas vezes a presença de uma amostra diferente das demais pode conter, ao invés de erros, informações importantes que não são encontradas nos outros dados e, dessa forma, sua presença irá contribuir muito para o desenvolvimento do modelo (MARTENS & TORMOD, 1992).

Para a redução dos ruídos espectrais, podem-se utilizar métodos de alisamento, que de maneira geral, aumentam a relação sinal/ruído, mas deve-se ter cuidado, pois poderá haver redução da altura e aumento da largura dos picos gerando distorção. O grau de intensidade deste efeito depende do número de pontos considerados no algoritmo respectivo e a largura do pico. Quanto mais estreito for o pico maior será a distorção. Razões de alisamento (relação entre a largura do alisamento e o número de pontos) maiores do que 1,0 são raramente usadas por causa da distorção excessiva. No caso de espectros simples e simétricos, o alisamento permite medir de forma mais exata características espectrais do pico, tais como posição, altura, largura, área, etc. (O’HAVER, 2013).

O método de alisamento proposto por SAVITZKY & GOLAY (1964) é um algoritmo baseado no ajuste polinomial dos espectros através de mínimos quadrados parciais, produzindo o alisamento ilustrado na Figura 3, em que os círculos indicam os pontos originais do sinal e a linha pontilhada indica o sinal analisado (GORRY, 1990). Apesar de ter sido corrigido por STEINER et al. (1972), esse método ficou conhecido como “Savitzky-Golay” e tem como principais objetivos aumentar a percentagem do sinal face ao ruído existente nos dados originais e derivação dos sinais pela subtração da linha de base, com consequente melhoria da resolução visual.

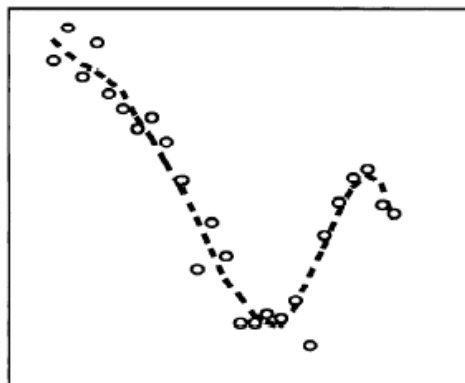


FIGURA 3 - Alisamento através do método de Savitzky-Golay (Gorry, 1990)

Outro pré-processamento muito utilizado é a “correção multiplicativa de sinal” (MSC – *Multiplicative Signal Correction*). O objetivo da MSC é a eliminação dos efeitos de variações causadas por diferenças no percurso óptico das amostras ou em consequência de processos de dispersão e espalhamento de luz, causados, principalmente, pela falta de homogeneidade das amostras, por diferenças de granulometria, geometria, empacotamento e orientação das partículas (NAES et al., 2002; ROGGO et al., 2007).

O método MSC baseia-se no fato empírico que em muitos casos, o gráfico dos valores espectrais para uma determinada amostra *versus* os valores espectrais médios correspondentes é aproximadamente uma linha reta, de modo que diferentes amostras apresentam diferentes inclinações (HELLAND et al., 1995). Para cada amostra o espalhamento é estimado em relação ao de uma amostra de referência (normalmente o espectro médio do conjunto de calibração) e cada espectro é corrigido de forma que todas as amostras tenham o mesmo nível de espalhamento da amostra de referência. Essa correção assume que o coeficiente de espalhamento é o mesmo para todos os comprimentos de onda, ignorando-se alterações que ocorrem por variações químicas (NAES et al., 2002; QUEIJI, 2008).

Neste sentido, o espectro de cada amostra é modelado como uma função linear do espectro médio do conjunto total, ou espectro ideal, sendo o efeito final típico ilustrado na Figura 4.

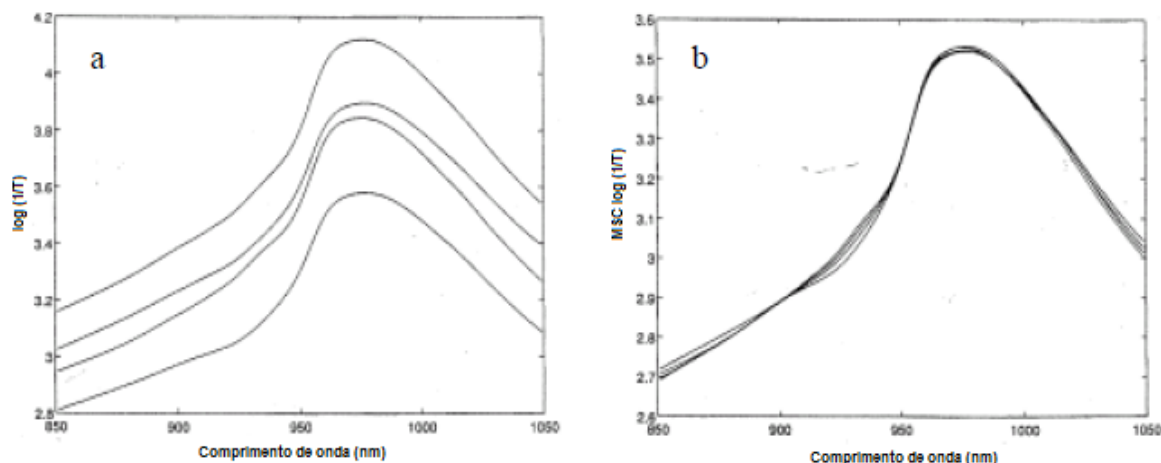


FIGURA 4 - Espectros de absorvância NIR antes do MSC (a) e depois do MSC (b) (adaptado de Naes & Isaksson, 1994)

A inclinação e desvios da linha de base podem ser removidos pela aplicação de derivadas (PEDRO, 2004). As linhas de base da curva que apresentam tais características podem ser aproximadas por um modelo linear do tipo:

$$A = a\lambda + b$$

em que a absorvância “A” é influenciada por uma inclinação “a” e por um termo constante “b”, que representa o desvio da linha base.

A “primeira derivada” da expressão acima fornece:

$$\frac{dA}{d\lambda} = a$$

e, deste modo, o termo constante “b” é removido, melhorando a separação de sinais não totalmente sobrepostos (ombros), realçando-os (NAES et al., 2002).

Já com a aplicação da “segunda derivada”, obtém-se também a exclusão do termo “a”, que representa a inclinação da linha de base (normalmente devido a efeitos de espalhamento), como pode ser observado na próxima equação. Com isso, uma completa regularização da linha de base é obtida:

$$\frac{d^2 A}{d\lambda^2} = 0$$

É comum empregar o alisamento junto com a aplicação de derivadas, pois além dos sinais espectrais, os ruídos também se tornam acentuados (QUEIJI, 2008).

A “variável normal padronizada” (SNV - *Standard Normal Variate*) é utilizada em muitas aplicações espectroscópicas, com o objetivo de remover as interferências multiplicativas de dispersão, tamanho de partículas, variação de luz e distância nas análises por NIRS (MALUF, 2008). Este pré-tratamento realiza um ajuste aditivo e multiplicativo tal como a “correção multiplicativa de sinal”, embora os fatores de correção sejam determinados de modo diferente. Para cada espectro da amostra o desvio ajustado é simplesmente a média de todos os valores sobre todas as variáveis e o ajuste multiplicativo é o desvio padrão dos valores de todas as variáveis (NAES et al., 2002).

Ainda podem ser aplicados nos espectros os pré-tratamentos “correção da linha de base”, que reduz o deslocamento da linha de base e curvilinearidades (LUYAPERT et al., 2002) e a “eliminação de tendências” (detrend), que remove ou reduz os efeitos lineares e a curvatura quadrática de cada espectro (ALOMAR et al., 2009).

Uma vez feito o pré-processamento dos dados, a etapa seguinte é a construção do modelo de calibração, considerando que após a seleção de espectros e a aplicação de pré-tratamentos matemáticos, a complexidade do modelo deverá ser menor, melhorando, portanto, o desempenho do método de regressão utilizado. De maneira geral, o modelo deve extrair a informação relevante contida nos espectros de infravermelho próximo, a qual está relacionada diretamente com a informação que se deseja prever no futuro, utilizando o modelo de calibração desenvolvido (SOTELO, 2006).

O esquema geral do processo de calibração é ilustrado na Figura 5. A matriz Y representa os valores dos analitos de interesse obtidos por métodos de referência, que é a informação que o modelo deve representar, reproduzir e estimar quando amostras desconhecidas sejam analisadas. O modelo de calibração é simplesmente a relação estabelecida pelo método de regressão entre X, que são os espectros das amostras de calibração coletados pelo equipamento NIRS, e Y (propriedades a modelar).

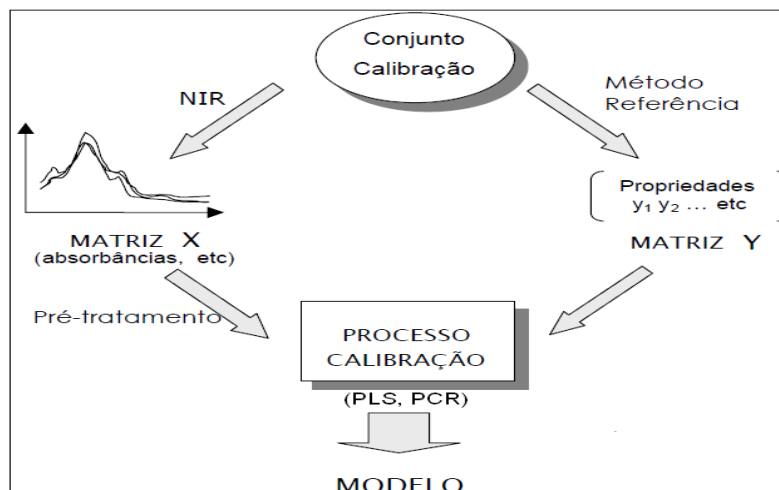


FIGURA 5 - Esquema geral do processo de calibração (Sotelo, 2006)

Neste processo, é usual que as variáveis X (variáveis espectrais) sejam capazes de conter diversos tipos de informações ao mesmo tempo, em proporções diferentes. Como consequência, tem-se uma abundância de dados, sendo a compressão dessa informação a melhor forma de contornar este problema, principalmente, quando o comportamento do sistema não é conhecido (SOTELO, 2006).

Os métodos de regressão PCR (regressão de componentes principais) e o PLS (mínimos quadrados parciais) são os mais utilizados para a compressão. No entanto, a regressão PLS pode ser considerada técnica de calibração padrão para espectroscopia no infravermelho, pois, usualmente, produz bons modelos usando um número menor de componentes principais do que modelos de PCR (PASQUINI, 2003, MALUF, 2008). Além disso, apresenta a vantagem de não restringir ao número de comprimentos de onda para a calibração, possibilitando extrair o maior número de informações do espectro; requer somente a concentração do analito de interesse e seus parâmetros praticamente não são alterados com a inclusão de novas amostras no conjunto de calibração (ESCANDAR, 2006; QUEJI, 2008; BAJWA et al., 2009).

Portanto, o PLS é um método robusto, pois todas as variáveis relevantes são incluídas nos modelos, o que implica que a calibração pode ser realizada eficientemente mesmo na presença de interferentes (ruídos experimentais, colinearidades e não linearidades), não necessitando conhecer o número e a natureza dos mesmos (FERREIRA et al., 1999).

No processo de compressão de dados (Figura 6), o método por regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) representa a vasta informação contida nos espectros em outro sistema de variáveis, reduzido, sem perder informação relevante, onde as novas variáveis são chamadas de fatores (t_s) ou variáveis latentes. Os fatores são combinações lineares das variáveis originais, superando assim os problemas de seletividade (não eliminando nenhuma variável) e colinearidade (muitas variáveis contêm tipos de informações similares).

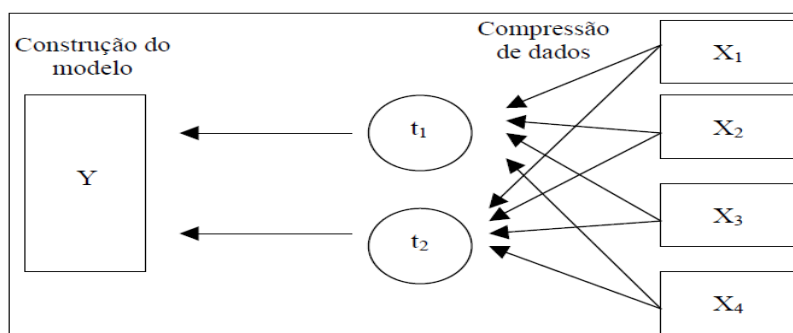


FIGURA 6 - Processo de compressão de dados (Sotelo, 2006)

O método baseia-se na projeção da matriz X em um espaço de dimensão menor, que consiste na decomposição dos espectros de modo a diferenciar a relação entre as amostras e a relação entre as variáveis espectrais. Para isso, a regressão PLS reduz a matriz dos dados considerando tanto a informação em X , como a informação em Y , de forma a maximizar a sua relação com os fatores calculados. Com isto, são obtidos componentes que melhor se relacionam com Y e, ao mesmo tempo, explicam da melhor maneira possível a variabilidade em X (GELADI & KOWALSKI, 1986).

Nesta etapa, a matriz de espectros é decomposta em duas matrizes de variações: *loadings* (pesos) e *scores* (escores). Os escores são as coordenadas dos espectros no sistema agora definido pelos componentes principais, indicando a relação entre as amostras. Os pesos, representam a relação das variáveis espectrais entre o sistema original e o sistema definido pelos fatores. A interação entre os escores e os pesos define os componentes principais, sendo que cada um define a dimensão que as variáveis estão medindo em comum, o que pode

ser interpretado como uma interação relevante entre as variáveis envolvidas (CHAMINADE et al., 1998).

Assim, o método PLS pode ser dividido, basicamente, em três etapas. A primeira consiste em montar as matrizes de dados X a partir dos dados espectrais (variáveis independentes) e Y a partir das propriedades de interesse (variáveis dependentes). A segunda etapa consiste em eliminar informações que não são relevantes ao sistema, através de combinações lineares das colunas da matriz X feita pela análise dos componentes principais (PCA). A terceira e última etapa consiste em obter-se a relação entre as matrizes X (reduzida pela PCA) e matriz Y que possui a propriedade de interesse (ZENI, 2005).

Entretanto, após a obtenção do modelo de calibração, o equipamento NIRS ainda não está pronto para ser utilizado na predição de uma propriedade qualquer, já que a calibração deve ser testada em um processo denominado de validação (PASQUINI, 2003), que pode ser realizado por dois métodos, a validação externa e a validação cruzada.

Na validação externa, para se verificar a eficácia da predição dos constituintes, é utilizado um conjunto de teste separado e diferente do conjunto de calibração. Com o conjunto de calibração, obtêm-se equações de regressão que serão usadas para prever o valor das amostras do conjunto de validação, a partir dos seus espectros de infravermelho próximo. Dessa forma, é possível comparar os valores estimados com os valores determinados pelo método de referência (MILAGRES, 2009).

O uso de um conjunto separado constitui a abordagem de validação mais direta. Portanto, recomenda-se utilizar a validação externa sempre que possível, pois os modelos obtidos usualmente fornecem melhores resultados (PASQUINI, 2003).

Na validação cruzada, uma ou mais amostras são removidas do conjunto de calibração, são construídos novos modelos de calibração para serem utilizados para prever os resultados dos dados removidos. As amostras da predição retornam ao conjunto de calibração e novas amostras são removidas como amostras de predição. Este processo é repetido até que todas as amostras do conjunto de calibração tenham passado pelo conjunto de predição (SIMAS, 2005).

Sugere-se que a validação cruzada seja usada apenas quando o número de amostras for limitado, nos casos em que o custo das análises laboratoriais seja elevado (PASQUINI, 2003).

Dessa forma, o completo processamento para o desenvolvimento de modelos para medições por NIRS segue quatro etapas: (1) aquisições de dados espectrais; (2) pré-processamento dos dados para eliminar ruídos e variações espectrais provocadas pelo instrumento, pela manipulação das amostras, por variações externas, etc.; (3) construção de modelos de calibração utilizando um conjunto de amostras com concentrações conhecidas por análises em métodos de referência apropriados; e (4) validação dos modelos utilizando outro conjunto de amostras com concentrações conhecidas por análises em métodos de referência apropriados, que não fazem parte do conjunto usado nos modelos de calibração (CEN & HE, 2007).

Por fim, para a avaliação da capacidade preditiva do modelo de calibração desenvolvido, deve-se analisar criticamente alguns parâmetros, como o “coeficiente de determinação” (R^2), a quantidade de fatores, o “erro padrão de calibração” (SEC), o “erro padrão de validação” (SEP) e a “relação de desempenho do desvio” (RPD).

O “coeficiente de determinação” (R^2) deve ser interpretado como a proporção de variação total da variável dependente que é explicada pela variação da variável independente. A análise do valor de R^2 nos mostra a correlação dos pontos da curva de calibração, quanto mais próximo a 1,00 este valor, mais correlacionado estão os valores com a reta obtida (ZENI, 2005).

O número apropriado de fatores na calibração PLS (mínimos quadrados parciais) pode ser determinado pelo PRESS (*predicted residual error sum of squares*), que é a soma dos desvios quadrados para os valores estimados em relação aos valores reais (FERRÃO et al., 2004), como mostrado na equação a seguir:

$$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

Nesta equação, “ n ” representa o número de amostras do conjunto de calibração “ y_i ” é o valor de referência (valor real), e “ \hat{y}_i ” é o valor previsto (valor estimado) pelo modelo para a i ésima amostra.

Um decréscimo no valor de PRESS indica que a quantidade de fatores é adequada. Por exemplo, se a capacidade de predição é boa, ou seja, se o valor obtido pelo modelo de calibração for próximo do valor obtido pelo método de referência, a diferença entre esses valores será pequena. Assim, o somatório dessas pequenas diferenças resultará em um valor de PRESS também pequeno, significando que o modelo tem habilidade de previsão.

Baixos valores de “erro padrão de calibração” (SEC) indicam um bom ajuste das amostras usadas para a calibração. Os valores de SEC são preditos após a construção do modelo com todas as amostras, ou seja, o modelo faz a predição para todas as amostras de calibração de uma única vez, conforme equação a seguir (GUTHRIE, 2005):

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - A - 1}}$$

Onde “ y_i ” é o valor de referência; “ \hat{y}_i ” é o valor previsto pelo modelo para a i ésima amostra; “ n ” é o número de amostras do conjunto de calibração; “ A ” é o número de variáveis latentes (componentes principais) no modelo de regressão utilizado na calibração.

A mesma equação mostrada para SEC pode ser utilizada para obter o valor de “erro padrão de validação” (SEP), onde se substitui os valores para as amostras do conjunto de validação. Valor de SEP muito maior que o de SEC indica modelo sobre-ajustado, isto é, a regressão encontrada considera dados que não estão realmente correlacionados, como por exemplo, ruídos, erros sistemáticos, etc. (FERRÃO et al., 2004). Assim, na avaliação do ajuste do modelo de calibração, o método ideal de predição é aquele que minimiza o SEP na validação externa.

Neste contexto, como o valor da “relação de desempenho do desvio” (RPD) é obtido pela relação entre o desvio padrão dos dados obtidos por análise convencional e o erro padrão da validação externa (SEP), sendo que os valores de SEP e RPD são inversamente proporcionais, o modelo mais robusto é o que apresentar o maior valor de RPD, sendo esse parâmetro o mais utilizado para avaliar a habilidade preditiva de um modelo de calibração (WILLIAM & NORRIS,

1987; PRIETO et al., 2013), pois fornece padronização do erro padrão da previsão e torna possível a comparação de diferentes propriedades (WILLIAMS & SOBERING, 1993).

Com relação a aplicação do NIRS em carnes, vários estudos foram desenvolvidos para a determinação da composição química (gorduras, umidade, proteína, resíduo mineral fixo, mioglobina e colágeno) (PREVOLNIK et al., 2004; BERZAGHI et al., 2005; PRIETO et al., 2006; VILJOEN et al., 2007), de propriedades tecnológicas (valor de pH, capacidade de retenção de água, força de cisalhamento) e de atributos sensoriais (cor, odor, sabor, dureza, suculência) (RØDBOTTEN et al., 2000; ABENI & BERGOGLIO, 2001; CHAN et al., 2002; GEESINK et al., 2003; HOVING-BOLINK et al., 2005; ANDRÉS et al., 2007).

Entretanto, a maioria dos estudos publicados estimou a habilidade preditiva dos modelos por meio da validação cruzada, utilizando amostras retiradas do conjunto de calibração. Assim, são necessários estudos que testem a capacidade preditiva por meio da validação externa, que é mais direta e usualmente, fornece melhores resultados. Além disso, os resultados da técnica NIRS para a previsão de propriedades relacionadas à maciez da carne bovina tem sido inconsistentes para a força de cisalhamento, capacidade de retenção de água, pH, colágeno total e solúvel (RØDBOTTEN et al., 2000; LEROY et al., 2003; LIU et al., 2003), além de não terem sido encontrados estudos com a técnica NIRS para a determinação do índice de fragmentação miofibrilar.

Também, para a construção dos modelos de calibração, diferentes aspectos relacionados ao processamento dos dados (pré-tratamentos matemáticos, faixas espectrais, apresentação das amostras, método de regressão) afetam a capacidade de predição do NIRS (MURRAY & WILLIAMS, 1990; CEN & HE, 2007), podendo ser definidos apenas por tentativa e erro (SHENK & WESTERHAUS, 1995).

Conseqüentemente, modelos de calibrações por NIRS devem ser continuamente desenvolvidos, de modo que o potencial da técnica possa ser alcançado, para as determinações de qualidade em carne bovina (PRIETO et al., 2009).

Diante do exposto, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de estabelecer quais métodos de seleção de espectros e pré-tratamentos

matemáticos, juntamente com o método de regressão PLS, possibilitam a obtenção de modelos de calibração robustos para a determinação da composição química (lipídios totais, proteína, resíduo mineral fixo e umidade) e das características relacionadas à maciez da carne bovina (capacidade de retenção de água, colágeno total e solúvel, força de cisalhamento, índice de fragmentação miofibrilar e pH).

REFERÊNCIAS

1. ABENI, F.; BERGOGLIO, G. Characterization of different strains of broiler chicken by carcass measurements, chemical and physical parameters and NIRS on breast muscle. **Meat Science**, v. 57, n. 2, p. 133–137, 2001.
2. ALOMAR, D.; FUCHSLOCHER, R.; CUEVAS, J.; MARDONES, R.; CUEVAS, E. Prediction of the composition of fresh pastures by near infrared reflectance or interactance-reflectance spectroscopy. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 69, n. 2, p. 198-206, 2009.
3. ANDRÉS, S.; MURRAY, I.; NAVAJAS, E.A.; FISHER, A.V.; LAMBE, N.R.; BUNGER, L. Prediction of sensory characteristics of lamb meat samples by near infrared reflectance spectroscopy. **Meat Science**, v. 76, n. 3, p. 509–516, 2007.
4. BAJWA, S.G.; KANDASWAMY, J.; APPLE, J.K. Spectroscopic evaluation of the nutrient value of ground beef patties. **Journal of Food Engineering**, v. 92, n. 4, p. 454–460, 2009.
5. BERZAGHI, P.; DALLA ZOTTE, A.; JANSSON, L.M.; ANDRIGHETTO, I. Near-infrared reflectance spectroscopy as a method to predict chemical composition of breast meat and discriminate between different n-3 feeding sources. **Poultry Science**, v. 84, n. 1, p. 128–136, 2005.
6. BRAGA, J.W.B.; POPPI, R.J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 1004-1011, 2004.
7. CANTOR, S.L.; HOAG, S.W.; ELLISON, C.D.; KHAN, M.A.; LYON, R.C. NIR Spectroscopy Applications in the Development of a Compacted Multiparticulate System for Modified Release. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 12, n. 1, p. 262-278, 2011.
8. CEN, H.; HE, Y. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 2, p. 72–83, 2007.
9. CHAMINADE, P.; BAILLET, A.; FERRIER, D. Data treatment in near infrared spectroscopy. **Analisis**, v. 26, n. 4, p. 33-38, 1998.
10. CHAN, D.E.; WALKER, P.N.; MILLS, E.W. Prediction of pork quality characteristics using visible and near-infrared spectroscopy. **American Society of Agricultural Engineers**, v. 45, n.5, p. 1519–1527, 2002.
11. DURRANT, S.F. Material didático: **Espectroscopia no Infravermelho**. In: UNESP, Sorocaba-SP, 2009. Disponível em:

<http://www.sorocaba.unesp.br/professor/steve/POSMAT%20S%202009/Espetroscopia%20IR/Infravermelho%20I.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2013.

12. ESCANDAR, G.M. A review of multivariate calibration methods applied to biomedical analysis. **Microchemical Journal**, v. 82, n. 1, p. 29-42, 2006.
13. FERRÃO, M.F.; CARVALHO, C.W.; MÜLLER, E.I.; DAVANZO, C.U. Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha de trigo empregando NIR-PLS e DRIFT-PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 333-340, 2004.
14. FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELO, M.S., VOLPE, P.L.O. Quimiometria I: Calibração Multivariada, um Tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.
15. GEESINK, G.H.; SCHREUTELKAMP, F.H.; FRANKHUIZEN, R.; VEDDER, H.W.; FABER, N.M.; KRANEN, R. W.; GERRITZEN, M.A. Prediction of pork quality attributes from near infrared reflectance spectra. **Meat Science**, v. 65, n. 1, p. 661–668, 2003.
16. GELADI, P.E.; KOWALSKI, B.R. Partial least-squares regression: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 185, p. 1-17, 1986.
17. GIVENS, D.I.; DE BOEVER, J.L.; DEAVILLE, E.R. The principles, practices and some future applications of near infrared spectroscopy for predicting the nutritive value of foods for animals and ruminants. **Nutrition Research Reviews**, v. 10, n. 1, p. 83-114, 1997.
18. GORRY, P.A. General least-squares smoothing and differentiation by the convolution (Savitzky-Golay) method. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 570–573, 1990.
19. GUTHRIE, J.A. **Robustness of NIR Calibrations for assessing fruit quality**. 2005. 283 f. Tese (Doutorado) – Central Queensland University, Rockhampton, Austrália.
20. HELLAND, I.S.; NAES, T.; ISAKSSON, T. Related versions of the multiplicative scatter correction method for preprocessing spectroscopic data. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 29, n. 2, p. 233–241, 1995.
21. HOPKE, P.K. The evolution of chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 500, n. 1-2, p. 365-377, 2003.
22. HOVING-BOLINK, A.H.; VEDDER, H.W.; MERKS, J.W.M.; DE KLEIN, W.J.H.; REIMERT, H.G.M.; FRANKHUIZENE, R. Perspective of NIRS measurements early post mortem for prediction of pork quality. **Meat Science**, v. 69, n. 3, p. 417–423, 2005.

23. KROGSGAARD-LANRSEN, P.; LILJEFORS, T.; MADSEN, U. **A textbook of drug design and development**. Amsterdam:Harwood Academic Publishers, 2ª Ed, 1996, 543 p.
24. LAWRIE, R.A. **Ciência da carne**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 384 p.
25. LEROY, B.; LAMBOTTE, S.; DOTREPPE, O.; LECOCQ, H.; ISTASSE, L.; CLINQUART, A. Prediction of technological and organoleptic properties of beef *longissimus thoracis* from near-infrared reflectance and transmission spectra. **Meat Science**, v. 66, n. 1, p. 45–54, 2003.
26. LIU, Y.; LYON, B.G.; WINDHAM, W.R.; REALINI, C.E.; PRINGLE, T.D.D.; DUCKETT, S. Prediction of color, texture, and sensory characteristics of beef steaks by visible and near infrared reflectance spectroscopy. A feasibility study. **Meat Science**, v. 65, n. 3, p. 1107–1115, 2003.
27. LUYAPAERT, J.; HEUERDING, S.; DE JONG, S.; MASSART, D.L. An evaluation of direct orthogonal signal correction and other preprocessing methods for the classification of clinical study lots of a dermatological cream. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, n. 3, p. 453-466, 2002.
28. MALUF, D.F. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de sibutramina em forma farmacêutica e estudo de dissolução *in vitro***. 2008. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
29. MARTENS, H.; NAES, T. Extended multiplicative signal correction and spectral interference subtraction - new preprocessing methods for near-infrared spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 9, n. 8, p. 625-635, 1991.
30. MARTENS, H.; TORMOD, N. **Multivariate Calibration**. New York: John Wiley & Sons, 1992. 438 p. Disponível em: <http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0471930474.html>. Acesso em: 22 nov. 2013.
31. MILAGRES, F.R. **Avaliação da madeira de híbridos de *eucalyptus globulus* com *e. grandis* e *e. urophylla*, para produção de celulose, utilizando espectroscopia NIR**. 2009. 142 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
32. MURRAY, I.; WILLIAMS, P.C. Chemical Principles of Near-Infrared Technology. In: WILLIAMS, P.C; NORRIS, K.H. **Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries**. 2.ed. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1990, p. 17-34.
33. NAES, T.; ISAKSSON, T. Some aspects of scatter-correction in calibration. Part I. **NIR News Chemometric Space Articles**, v. 5, p. 4-5, 1994.

34. NAES, T.; ISAKSSON, T.; FEARN, T.; DAVIES, T. **A User Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification**. Chichester: NIR Publications, 2002. 344 p.
35. NATALINO, R. **Caracterização de açúcar mascavo aplicando análise das componentes principais a dados espectrométricos**. 2006. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
36. O’HAVER, T. **A Pragmatic Introduction to Signal Processing with applications in Chemical Analysis**. 2013. 121 p. Disponível em: <http://terpconnect.umd.edu/~toh/spectrum/>. Acesso em: 21 out. 2013.
37. OECD-FAO. **Agricultural Outlook 2012-2021**. 2012. OECD Publishing and FAO. Disponível em: http://www.keepeek.com/Digital-Asset-Management/oecd/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2012_agr_outlook-2012-en. Acesso em: 25 out. 2013.
38. PANTOJA, P.A. **Aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo na caracterização da carga de petróleo para o processo de destilação atmosférica**. 2006. 122 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade de São Paulo, São Paulo.
39. PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals practical aspects and analytical applications. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198-219, 2003.
40. PEDRO, A.M.K. **Determinação simultânea e não-destrutiva de sólidos totais e solúveis, licopeno e beta-caroteno em produtos de tomate por espectroscopia no infravermelho próximo utilizando calibração multivariada**. 2004. 71 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
41. PREVOLNIK, M.; CANDEK-POTOKAR, M.; ŠKORJANC, D. Ability of NIR spectroscopy to predict meat chemical composition and quality: a review. **Journal of Animal Science**, v. 49, n. 11, p. 500–510, 2004.
42. PRIETO, N.; ANDRÉS, S.; GIRALDEZ, F.J.; MANTECON, A.R.; LAVIN, P. Potential use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for the estimation of chemical composition of oxen meat samples. **Meat Science**, v. 74, n. 3, p. 487–496, 2006.
43. PRIETO, N.; ROEHE, R.; LAVIN, P.; BATTEN, G.; ANDRÉS, S. Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review. **Meat Science**, v. 83, n. 2, p. 175-186, 2009.
44. PRIETO, N.; DUGAN, M.E.R.; LÓPEZ-CAMPOS, O.; AALHUS, J.L.; UTTARO, B. At line prediction of PUFA and biohydrogenation intermediates in

perirenal and subcutaneous fat from cattle fed sunflower or flaxseed by near infrared spectroscopy. **Meat Science**, v. 94, n. 1, p. 27–33, 2013.

45. QUEJI, M.D. **Determinação de açúcares simples, ácido málico e compostos fenólicos totais em bagaço de maçã por espectroscopia no infravermelho e método de calibração multivariada**. 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.
46. RØDBOTTEN, R.; NILSEN, B.N.; HILDRUM, K.I. Prediction beef quality attributes from early post mortem near infrared reflectance spectra. **Food Chemistry**, v. 69, n. 4, p. 427–436, 2000.
47. ROGGO, Y.; CHALUS, P.; MAURER, L.; LEMA-MARTINEZ, C.; EDMOND, A.; JENT, N.A. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n.3, p. 683-700, 2007.
48. SAVITZKY, A.; GOLAY, M.J.E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 1627-1639, 1964.
49. SHENK, J.S.; WESTERHAUS, M.O. The application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to forage analysis. In: FAHEY JR., G.C.; MOSSER, L.E.; MERTENS, D.R.; COLLINS, M. (Eds.). **Forage quality, evaluation and utilization**. Wisconsin: American Society of Agronomy Inc., 1995. p. 406–449.
50. SIESLER, H.W.; OZAKI, Y.; KAWATA, S.; HEISE, H.M. **Near-Infrared Spectroscopy. Principles, Instruments, Applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 4^a. Ed., 2008. 361 p.
51. SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000, p. 67-78.
52. SIMAS, R. C. **Determinação de proteína bruta e aminoácidos em farelo de soja por espectroscopia de infravermelho próximo**. 2005. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
53. SKOOG. D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5.ed. São Paulo: Editora Oficial da Sociedade Brasileira de Química, 2002, 836 p.
54. SOTELO, F.F. **Aplicação da espectroscopia de Infravermelho Próximo na caracterização de petróleo. Simulação de uma unidade de destilação atmosférica**. 2006. 77 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

55. STEINER, J.; TERMONIA, Y.; DELTOUR, J. Comments on Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Square Procedure. **Analytical Chemistry**, v. 44, n. 11, p. 1906-1909, 1972.
56. USDA. Livestock and Poultry: World Markets and Trade. Disponível em: <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/livestock-poultry-ma/livestock-poultry-ma-04-18-2014.pdf>. Acesso em 16 mai. 2014.
57. VAN KEMPEN, T.A.T.G.; JACKSON, D. NIRS may provide rapid evaluation of amino acids. **Feedstuffs**, v. 68, p. 12-15, 1996.
58. VILJOEN, M.; HOFFMAN, L.C.; BRAND, T.S. Prediction of the chemical composition of mutton with near infrared reflectance spectroscopy. **Small Ruminant Research**, v. 69, p. 88–94, 2007.
59. WARRISS, P.D. **Meat Science. An introductory text**. 2.ed. Wallingford: CABI Head Office, 2010. 310 p.
60. WILLIAM, P.; NORRIS, K. **Near-infrared technology in the agricultural and food industries**. St. Paul: AACC Press, 1987. 312 p.
61. WILLIAMS, P.C.; SOBERING, D.C. Comparison of commercial near infrared transmittance and reflectance instruments for analysis of whole grains and seeds. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 1, p. 25–32, 1993.
62. WORKMAN, J.J.; MOBLEY, P.R.; KOWALSKY, B.R.; BRO, R. Interpretive spectroscopy for near infrared. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 31, p. 251-320, 1996.
63. ZENI, D. **Determinação de cloridrato de propranolol em medicamentos por espectroscopia no infravermelho com calibração multivariada (PLS)**. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

CAPÍTULO 2 – MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA POR NIRS PARA A DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CARNE BOVINA

RESUMO: A espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIRS) tem sido avaliada com o objetivo de substituir os métodos convencionais, que embora possam fornecer informações confiáveis sobre a composição química da carne, e assim sobre a sua qualidade, são demorados, caros, destrutivos e impróprios para aplicação *on-line*. A técnica NIRS tem sido aplicada com êxito para a determinação quantitativa dos principais constituintes da carne, porém, o presente estudo foi desenvolvido, a fim de melhorar as previsões frente aos diferentes aspectos relacionados ao processamento dos dados, além de testar a acurácia dos modelos através da validação externa, pouco utilizada nos estudos publicados. Para o desenvolvimento de modelos de calibração, foram utilizadas amostras do músculo *Longissimus dorsi* de 25 novilhos mestiços leiteiros castrados, divididos em cinco tratamentos, cinco repetições em cada, com base no fornecimento de dietas contendo milho e inclusão de farelo do mesocarpo do babaçu nas proporções de 0; 12; 24; 36 e 48% na matéria seca da dieta total. Foram coletados três espectros de cada amostra, totalizando 75 espectros para o conjunto de calibração. Para o conjunto de validação externa, foram utilizadas amostras de cinco novilhos mestiços leiteiros castrados submetidos à dieta à base de milho e soja, totalizando 15 espectros. Para a determinação de lipídios totais, proteína, resíduo mineral fixo e umidade, foram desenvolvidos 52 modelos com os pré-tratamentos matemáticos disponíveis no *software* VISION, versão 3.1, utilizando a regressão PLS e a faixa de 1.100 a 2.500 nm, e cinco modelos em faixas espectrais específicas, obtendo 57 modelos no total. Os resultados demonstraram uma gama de composição relativamente estreita nas amostras de calibração para todos os constituintes. A “máxima distância” foi o método de seleção de espectros mais eficiente para lipídios totais, RMF e umidade e a “distância de Mahalanobis” foi o método mais eficiente para proteínas. Os modelos de calibração desenvolvidos sem a aplicação de pré-tratamentos apresentaram baixa capacidade preditiva para todos os constituintes (R^2 entre 0,16 e 0,64). Com os pré-tratamentos, 18 modelos foram considerados com boa (R^2 entre 0,72 e 0,85) ou excelente capacidade preditiva (R^2 entre 0,92 e 0,98). Com o pré-tratamento “primeira derivada” só não foi desenvolvido o modelo mais robusto na determinação de RMF, que, desenvolvido com “Savitzky-Golay” e “segunda derivada” obteve valores de R^2 e RPD superiores aos encontrados na literatura. As diferenças espectrais observadas nas faixas 1.100-1292 e 1678-1788 nm possibilitaram melhor acurácia ao modelo desenvolvido para a determinação de lipídios. Utilizando o modelo considerado mais adequado para cada propriedade, descrito no presente trabalho, desde que se utilize um conjunto de amostras de calibração com maior variabilidade, pode-se maximizar a previsibilidade da técnica NIRS, podendo ser uma alternativa rápida e precisa aos métodos convencionais, além de permitir a análise simultânea dos constituintes de composição química da carne bovina.

Palavras-chave: infravermelho próximo, lipídios, proteína, regressão PLS, umidade

MULTIVARIATE CALIBRATION MODELS FOR NIRS TO DETERMINE CHEMICAL COMPOSITION OF BEEF

ABSTRACT: Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) has been evaluated with the objective of substituting conventional methods. Although these can supply reliable information about the chemical composition of meat, and thus about its quality, they are lengthy, expensive, destructive and inappropriate for on-line application. NIRS has been applied successfully to the quantitative determination of the main constituents of meat, but this present study was developed to improve the predictions about various aspects related to data processing, as well as to test the accuracy of the models by means of external validation, which has been used little in published studies. To develop the calibration models, three spectra were collected from each sample of the *Longissimus dorsi* muscle of 25 mixed-breed castrated dairy calves, divided into five treatments (five repetitions in each) based on supplying diets containing millet and including babassu mesocarp bran at the proportions of 0; 12; 24; 36 and 48% in the dry matter of the total diet. Three spectra were collected from each sample, totalling 75 spectra for the calibration set. For the external validation set, samples were used from five mixed-breed castrated dairy calves fed on a diet based on maize and soybean, totalling 15 spectra. To determine total fats, protein, fixed mineral residue and moisture, 52 models were developed with mathematical pre-treatments available on VISION software, version 3.1, using PLS regression and a band of 1100 to 2500 nm, and five models in specific spectral bands, obtaining 57 models in all. The results demonstrated a relatively narrow composition range in the calibration samples for all the constituents. The most efficient spectrum selection method was “maximum distance” for fat content, ash content and moisture, and “Mahalanobis distance” was the most efficient method for proteins. The calibration models developed without the application of pre-treatments presented a low predictive capacity for all constituents (R^2 between 0.16 and 0.64). With the pre-treatments, 18 models were considered to have a predictive capacity that was good (R^2 between 0.72 and 0.85) or excellent (R^2 between 0.92 and 0.98). With the “first derivative” pre-treatment the only robust model that was not developed was that for determining ash content which, developed with “Savitzky-Golay” and “second derivative”, obtained values of R^2 and RPD above those found in the literature. The spectral differences observed in the bands 1100-1292 and 1678-1788 nm allowed for better accuracy in the model developed to determine fat content. Using the model considered most appropriate for each property (described in the present study), as long as a set of calibration samples with greater variability is used, NIRS predictability can be maximized. This may be a rapid and precise alternative to conventional methods, as well as allowing simultaneous analysis of the chemical constituents of beef.

Keywords: fat content, moisture, near infrared, PLS regression, protein

1 INTRODUÇÃO

A carne é um dos alimentos mais importantes na dieta humana, por ser fonte de proteína de alto valor biológico, minerais e de todas as vitaminas do complexo B. Com a globalização da economia mundial, a cadeia da carne bovina tem apresentado severas e profundas mudanças para atender o consumidor final, que tem exigido do setor elevados níveis de qualidade. Para isto, foram criados critérios de avaliação que ultrapassam a qualidade sensorial e nutricional, pois incluem também a apresentação e o modo de produção da carne.

No entanto, a carne é um produto com elevado grau de heterogeneidade, pois a sua composição química, os atributos tecnológicos e sensoriais são altamente influenciados por fatores *ante mortem* (raça, sexo, idade, peso, técnicas de criação, alimentação, transporte, meio ambiente) e *post mortem* (condições de abate, armazenamento; tempo/temperatura) (ANDRÉS et al., 2007; PRIETO et al., 2009). Portanto, a variabilidade nas características da qualidade da carne é a principal preocupação dos consumidores (LEROY et al., 2003; WARRISS, 2010), principalmente, àqueles em que o poder de compra não se limita a aquisição de carne, mas que estão dispostos a pagar preços mais altos para a carne que apresente homogeneidade e certas características de qualidade (LEROY et al., 2003).

A composição química da carne é relativamente constante, sendo aproximadamente 75% água, 19 a 25% proteínas, entre 1 e 2% minerais e carboidratos. Contudo, os lipídios apresentam grande variação em sua concentração (GEAY et al., 2001). Tem-se enfatizado o estudo da quantidade de lipídios em razão da preocupação mundial quanto ao consumo excessivo de carne bovina, que tem sido descrito como um fator preponderante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, pois a carne apresenta elevado teor de ácidos graxos saturados com efeito hipercolesterolêmico (FRENCH et al., 2003). Além disso, a gordura saturada está relacionada com o diabetes mellitus não insulino-dependente e a vários tipos de câncer (BELLO, 2007).

A análise química da carne, em termos de umidade, resíduo mineral fixo, proteína e lipídios totais pode fornecer informações confiáveis sobre a sua qualidade (PREVOLNIK et al., 2004), no entanto, as diversas técnicas de análise

de rotina disponíveis são demoradas, caras, destrutivas e impróprias para aplicação *on-line* (LEROY et al., 2003; LIU et al., 2004).

Diante disto, em relação à carne, as pesquisas têm sido direcionadas no sentido de encontrar e viabilizar novas técnicas para estimar sua qualidade. Neste contexto, com o desenvolvimento da ciência da computação e da quimiometria, as aplicações disponíveis da espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIRS) tornaram-se populares, se destacando como ferramenta em potencial para a avaliação da qualidade da carne, pois, em contraste com os métodos convencionais, é sensível, rápida, exige simples preparação das amostras, permite a avaliação simultânea de várias propriedades e não necessita do emprego de reagentes (CEN & HE, 2007).

Como na região do infravermelho próximo do espectro eletromagnético (780 a 2.500 nm) aparecem bandas relativas a ligações entre carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio, é possível utilizar a técnica em um grande número de aplicações em alimentos (NATALINO, 2006). Em carnes, o NIRS tem sido aplicado com êxito para a determinação quantitativa dos principais constituintes da carne: umidade, gordura, proteína (LANZA, 1983; ALOMAR et al., 2003; TØGERSEN et al., 2003; PREVOLNIK et al., 2005; PRIETO et al., 2006) e resíduo mineral fixo (VILJOEN et al., 2007).

Entretanto, a maioria dos estudos publicados estimou a habilidade preditiva dos modelos por meio da validação cruzada, utilizando amostras retiradas do conjunto de validação. Assim, são necessários estudos que testem a capacidade preditiva por meio da validação externa, que é mais direta e usualmente, fornece resultados mais confiáveis (PASQUINI, 2003).

Além disso, uma vez que a carne é um alimento muito complexo, o sucesso da técnica NIRS depende parcialmente da variabilidade presente nas amostras utilizadas para a calibração (RIPOLL et al., 2008). Sabe-se que os efeitos nutricionais da dieta interferem na estrutura e na composição do músculo e, conseqüentemente, nas propriedades e na qualidade da carne (BRIDI & CONSTANTINO, 2010).

Dessa forma, animais submetidos a dietas contendo milho e níveis diferentes de farelo do mesocarpo do babaçu, podem apresentar diferenças na

composição química da carne, propiciando variabilidade adequada para o desenvolvimento de bons modelos de calibração por NIRS.

Também, diferentes aspectos relacionados ao processamento dos dados (pré-tratamentos matemáticos, faixas espectrais, apresentação das amostras, método de regressão) afetam a capacidade de predição do NIRS (MURRAY & WILLIAMS, 1990; CEN & HE, 2007). Consequentemente, modelos de calibrações por NIRS devem ser continuamente desenvolvidos, pois os tratamentos matemáticos para o processamento dos dados podem ser definidos apenas por tentativa e erro (SHENK & WESTERHAUS, 1995; PRIETO et al., 2009).

Diante do exposto, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de estabelecer quais métodos de seleção de espectros e pré-tratamentos matemáticos, juntamente com o método de regressão PLS, possibilitam a obtenção de modelos de calibração robustos para a determinação da composição química da carne bovina, no tocante a lipídios totais, proteínas, resíduo mineral fixo e umidade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento dos modelos de calibração foram utilizados 25 novilhos mestiços leiteiros castrados com idade média inicial de 30 meses e peso médio de 371 kg. Os animais foram confinados na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins, Campus de Araguaína-TO, no ano de 2012. O período total do confinamento foi de 98 dias, com 14 dias de adaptação.

Os bovinos foram divididos em cinco tratamentos, cinco repetições em cada, com base no fornecimento de dietas contendo milho e inclusão de farelo do mesocarpo do babaçu (FMB) nas proporções de 0; 12; 24; 36 e 48% na matéria seca da dieta total, sendo que o percentual de milho nas dietas foi de 77,5; 65,0; 52,6; 36,0 e 29,5%, respectivamente.

Ao final do período experimental, os animais apresentaram um peso médio de 478,1 kg, sendo, então, abatidos em frigorífico sob Serviço de Inspeção Federal, localizado em Araguaína-TO. As carcaças foram resfriadas por 24 horas, em temperatura de 0°C a 2°C, e desossadas. Amostras retiradas do músculo *Longissimus dorsi* (entre a 10^a e 12^a costela) dos 25 animais, foram cortadas em bifes de 2,5 cm de espessura (aproximadamente 200 gramas cada bife), identificadas, embaladas em lâmina de filme de polietileno e papel pardo e transportadas congeladas ao Centro de Pesquisa em Alimentos, da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, onde permaneceram congeladas (-16°C) até a execução das análises físico-químicas e os procedimentos NIRS.

Para a construção dos modelos de calibração, foi utilizado um conjunto de amostras em que os analitos de interesse foram determinados por métodos de referência apropriados, descritos a seguir:

2.1 Análises físico-químicas

2.1.1 Umidade

As análises foram realizadas em duplicata, conforme BRASIL (1999). Foram colocados cadinhos em estufa a 105°C durante 1 hora. Depois, os cadinhos foram esfriados em dessecador e pesados em balança analítica. As amostras de carne, previamente descongeladas (4°C por 12 horas), foram moídas e homogeneizadas em multiprocessador de alimentos. Foram pesados aproximadamente cinco gramas da amostra e levados à estufa por três horas.

Os conjuntos cadinho mais amostra foram esfriados em dessecador e pesados. Foram colocados novamente em estufa a 105°C durante 1 hora, esfriados em dessecador e pesados. As operações foram repetidas de hora em hora até o peso constante (a variação entre duas pesagens consecutivas não poderia ultrapassar a 0,0005 g para cada grama de amostra).

Procedeu-se os cálculos utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ umidade e voláteis} = \frac{100 \times P1}{P2}, \text{ em que:}$$

P1 = perda de massa em gramas; P2 = massa da amostra em gramas.

2.1.2 Resíduo Mineral Fixo (RMF)

As análises foram realizadas em duplicata, conforme BRASIL (1999). Foram colocados cadinhos de porcelana em mufla a 550°C durante 30 minutos e, depois, foram esfriados em dessecador. As amostras de carne, previamente descongeladas (4°C por 12 horas), foram moídas e homogeneizadas em multiprocessador de alimentos e, então, aproximadamente cinco gramas da amostra foram pesados em balança analítica. Os conjuntos cadinho mais amostra foram levados ao bico de Bunsen até carbonização completa da amostra e depois colocados em mufla programada, começando com uma temperatura de 200°C,

ocorrendo aumento de 50°C a cada hora até atingir a temperatura de 550°C. As amostras foram mantidas em mufla por 10 horas, após isso, nas amostras que não apresentaram cinzas claras, foram adicionadas três gotas de água, realizou-se a secagem em chapa aquecedora e incineração em mufla até a obtenção de cinzas claras.

Procedeu-se os cálculos utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ RMF} = \frac{100 \times P1}{P2}, \text{ em que:}$$

P1 = diferença em gramas entre a massa do cadinho com amostra após calcinação e a massa do cadinho vazio; P2 = massa da amostra em gramas.

2.1.3 Lipídios totais

Para a determinação de lipídios totais, em triplicata, foi utilizado o método de BLIGH & DYER (1959) com modificações.

As amostras de carne, previamente descongeladas (4°C por 12 horas), foram moídas e homogeneizadas em multiprocessador de alimentos e, então, foram pesadas aproximadamente 5 g da amostra e transferida para um erlenmeyer de 250 mL. Adicionou-se a essa amostra 10 mL de clorofórmio e 20 mL de metanol. Posteriormente, adicionou-se novamente 10 mL de clorofórmio e 10 mL de água, que a seguir foi agitada, com o auxílio de um agitador mecânico, por 15 minutos, em capela química. O material homogeneizado foi filtrado, utilizando-se funil de vidro com papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro, para um béquer. Após completa separação e clarificação, a camada de clorofórmio (inferior) foi recolhida em balão de fundo chato com boca esmerilhada, previamente dessecado em estufa a 105°C por 30 minutos, resfriado em dessecador e pesado em balança analítica. Em seguida, o conjunto foi levado ao rotaevaporador com temperatura controlada a 30°C até a completa remoção do solvente (pesado em balança analítica até peso constante), sendo realizado no final o seguinte cálculo:

$$\% \text{ lipídios totais} = \frac{100 \times N}{P}$$

Em que: P = massa da amostra em g; N = (massa do balão + massa da amostra extraída) – massa do balão.

2.1.4 Proteína

A determinação de proteína foi realizada em duplicata pelo Método Micro-Kjeldahl, conforme BRASIL (1999).

As amostras de carne, previamente descongeladas (4°C por 12 horas), foram moídas e homogeneizadas em multiprocessador de alimentos. Foi pesado aproximadamente 0,25 g da amostra e colocada em tubo digestor juntamente com 2,5 g de mistura catalisadora (sulfato de potássio-K₂SO₄ P.A. com sulfato de cobre pentahidratado-CuSO₄.5H₂O P.A.; na proporção de 10:1) e 7 mL de ácido sulfúrico P.A. O tubo foi colocado no bloco digestor da marca TECNAL, modelo 040125, em temperatura inicial de 50°C, sendo elevada gradativamente até atingir 400°C, permanecendo no bloco até o aparecimento de coloração azul-esverdeada (entre 3 e 4 horas). Depois, o tubo foi retirado do bloco digestor, e mantido na capela. Após atingir a temperatura ambiente, foram adicionados 10 mL de água destilada.

Em um erlenmeyer de 250 mL, foram colocados 20 mL de ácido bórico a 4%, contendo o indicador misto (preparado com 0,132 g de vermelho de metila-C₁₅H₁₅N₃O₂ e 0,06 g de verde de bromocresol-C₂₁H₁₄Br₄O₅S, dissolvidos em 200mL de álcool etílico a 70%, v/v; incorporado à solução de ácido bórico a 4% na proporção de 8mL por litro.). A seguir, o erlenmeyer foi acoplado ao destilador de nitrogênio marca TECNAL, modelo TE 036/1.

O tubo com a amostra digerida foi colocado no aparelho e iniciou-se a destilação. Foi adicionado NaOH 50% até que a solução do tubo se tornasse negra (± 20 mL) e a destilação foi mantida até o recolhimento de cerca de 50 mL

do filtrado. Após a conclusão do processo, titulou-se com solução de ácido sulfúrico 0,1N até o ponto de viragem do indicador e procedeu-se o cálculo:

$$\% \text{ Nitrogênio total} = \frac{V \times N \times f \times 0,014 \times 100}{P}$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ nitrogênio total} \times F$$

Em que: V = mililitros de solução de ácido sulfúrico 0,1 N gastos na titulação; N= normalidade da solução de ácido sulfúrico 0,1 N; f= fator de correção da solução de ácido sulfúrico 0,1 N; P= massa da amostra em gramas; F= fator de conversão da relação nitrogênio/proteína, que para carne é 6,25.

2.1.5 Análise estatística

Foram calculados a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação das amostras utilizadas, além da análise de variância e a comparação entre médias dos tratamentos utilizados nos conjuntos de calibração e validação pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Todos os cálculos estatísticos foram implementados no sistema computacional SAS (Statistical Analysis System), por meio de seu procedimento IML (Interactive Matrix Language) (SAS INSTITUTE, 2002).

2.2 Procedimentos NIRS

2.2.1 Obtenção dos espectros

As amostras dos 25 animais foram descongeladas durante a noite em geladeira, armazenadas em sacos plásticos para prevenir a perda de água por evaporação e, antes de realizar os procedimentos para a obtenção dos espectros, foram mantidas por uma hora em temperatura ambiente, para diminuir as interferências da temperatura nos espectros, conforme metodologia utilizada por

ALOMAR et al. (2003); ANDRÉS et al. (2007) e ANDRÉS et al. (2008). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de infravermelho próximo (NIRS) da Perstorp Analytical Company, modelo 6500 (Silver Spring, MD, EUA) equipado com detector de reflectância, na faixa de 1.100 a 2.500 nm, em intervalos de 2 nm, utilizando célula coarce com janela de quartzo.

Antes das leituras espectrais, as amostras foram moídas e homogeneizadas em multiprocessador de alimentos e também compactadas ao serem colocadas na célula para leitura espectral, visando eliminar problemas de leitura surgidos pelo efeito de superfície.

Para eliminar ruídos aleatórios (ruídos da rede elétrica, por exemplo) as medidas no aparelho foram realizadas 32 vezes para cada amostra, sendo obtido e armazenado o espectro médio. Para garantir que variações extremas de temperatura não interferissem na coleta dos espectros, o equipamento foi mantido em uma sala climatizada com temperatura de aproximadamente 25°C.

Para cada amostra, foram armazenados espectros em três repetições (em torno de 20 segundos para cada leitura), sendo coletados da seguinte maneira: (1) procedeu-se a primeira leitura e o espectro foi armazenado; (2) posteriormente, a amostra foi retirada da célula, misturada com o restante da mesma amostra e então colocada novamente na célula para a coleta de outro espectro por NIRS e; (3) repetiu-se o mesmo procedimento para a coleta do terceiro espectro. Esse procedimento foi realizado na coleta dos espectros das 25 amostras, obtendo 75 espectros no total para o conjunto de calibração. Desta maneira, considerou-se a maior quantidade possível de informações de cada amostra. Os espectros armazenados foram posteriormente submetidos aos tratamentos quimiométricos.

2.2.2 Definição do método de seleção de espectros e pré-tratamentos matemáticos

Inicialmente, para cada propriedade (lipídios totais, proteína, resíduo mineral fixo e umidade), foram desenvolvidos modelos para definir o método mais adequado de seleção de espectros. Nesta etapa, foram obtidos dois modelos para

cada propriedade, um com a “distância de Mahalanobis” e outro com a “máxima distância”, pois tanto um método como o outro poderia ser adequado a um grupo de amostras, dependendo das características da mesma. Essa avaliação só foi possível após uma simulação com os métodos.

Para a escolha do melhor método de seleção, foi considerado como critério inicial o maior “coeficiente de determinação” (R^2), e caso se mostrassem próximos, o critério inicial baseou-se nos menores valores de “erro padrão de calibração” (SEC). Já o número apropriado de fatores (variáveis latentes), foi selecionado automaticamente pelo *software* VISION, versão 3.1 (FOSS NIRSystems, Silver Spring, MD, USA), em função do menor valor de PRESS.

Posteriormente, foram desenvolvidos modelos de calibração utilizando o método de seleção de espectros mais adequado para cada propriedade, juntamente com os pré-tratamentos disponíveis no *software* VISION, versão 3.1 (FOSS NIRSystems, Silver Spring, MD, EUA): 1ª derivada, 2ª derivada, variável normal padronizada (SNV); correção da linha de base; eliminação de tendências (detrend); Savitzky-Golay e correção multiplicativa de sinal (MSC).

Com a utilização de derivadas, não só os sinais espectrais, como também os ruídos, podem se tornar acentuados (BRAGA & POPPI, 2004). Por este motivo, também foram desenvolvidos modelos utilizando os métodos de alisamento “Savitzky-Golay” e “correção multiplicativa de sinal” juntamente com a “primeira e segunda derivadas”.

O método de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) é considerado o mais robusto para a modelagem quimiométrica de dados espectrais das concentrações de nutrientes da carne e de outros produtos alimentícios (BAJWA et al., 2009). Então, para o desenvolvimento de todos os modelos, além do método de seleção de espectros e pré-tratamentos matemáticos, foram utilizados o método de regressão PLS e a informação contida na faixa de 1.100 a 2.500 nm.

Assim sendo, para cada um dos quatro componentes de composição da carne bovina analisados neste trabalho, foram desenvolvidos 13 modelos de calibração, descritos no Quadro 1, totalizando 52 equações.

QUADRO 1 – Métodos utilizados para o desenvolvimento dos modelos de calibração por NIRS para a determinação de cada constituinte da composição química da carne bovina, utilizando o método PLS e a faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm

Método	R ²	SEC ^{IV}	Fatores	Outliers
Distância de Mahalanobis (DM)				
Máxima distância (MD)				
DM ou MD ^I com 1 ^a derivada				
DM ou MD ^I com 2 ^a derivada				
DM ou MD ^I com SNV ^{II}				
DM ou MD ^I com correção da linha de base				
DM ou MD ^I com detrend				
DM ou MD ^I com Savitzky-Golay				
DM ou MD* com MSC ^{III}				
DM ou MD ^I com Savitzky-Golay e 1 ^a derivada				
DM ou MD ^I com Savitzky-Golay e 2 ^a derivada				
DM ou MD ^I com MSC e 1 ^a derivada				
DM ou MD ^I com MSC e 2 ^a derivada				

I = O método de seleção de espectros mais adequado para cada propriedade foi utilizado com os pré-tratamentos matemáticos, na sequência descrita no Quadro; II = varável normal padronizada; III = correção multiplicativa de sinal; IV = Erro-padrão de calibração.

De todos os modelos desenvolvidos, devido ao grande volume de dados, foram considerados nos resultados apenas equações com “coeficientes de determinação” (R²) considerados na literatura (SHENK & WESTERHAUS, 1996) com boa (R² entre 0,69 e 0,89) ou excelente capacidade preditiva (R² igual ou superior a 0,90).

Segundo PRIETO et al. (2009), ao compreendermos os comprimentos de onda que estão intimamente associados com as características de interesse, é possível obter calibrações mais robustas. Então, também foram desenvolvidos modelos utilizando regiões espectrais específicas, observadas na análise espectral ou apontadas na literatura, com os tratamentos quimiométricos considerados mais robustos para cada propriedade.

2.2.3 Validação externa

A capacidade preditiva dos modelos de calibração foi avaliada por validação externa, utilizando-se amostras de cinco novilhos mestiços leiteiros castrados, que não fizeram parte do conjunto de calibração. Esses animais foram alimentados com dieta padrão, à base de milho e soja, confinados no mesmo local, pelo mesmo período e abatidos sob as mesmas condições dos animais utilizados para a obtenção dos conjuntos de calibração.

As amostras provenientes desses animais foram submetidas aos mesmos procedimentos das amostras do conjunto de calibração, quanto à coleta, condições de armazenamento, análises físico-químicas e procedimentos por NIRS. Assim, 15 espectros formaram o conjunto de validação.

As amostras do conjunto de validação foram preditas por modelos de calibração considerados com boa ou excelente capacidade preditiva, obtendo-se valores de “erro padrão da validação” (SEP). Posteriormente, a acurácia de cada um desses modelos de calibração foi determinada através da “relação de desempenho do desvio” (RPD), obtido pela relação entre o desvio padrão dos dados obtidos por análise convencional (análise de referência) e o erro padrão da validação externa. O RPD é considerado o melhor parâmetro para estimar a qualidade dos modelos de calibração NIRS (WILLIAM & NORRIS, 1987; PRIETO et al., 2013), pois fornece padronização do erro da previsão e torna possível a comparação de diferentes propriedades (WILLIAMS & SOBERING, 1993).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O intervalo, a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação da composição química das amostras utilizadas no conjunto de calibração estão apresentados na Tabela 1, além do nível de significância entre as amostras do conjunto de calibração e do conjunto teste (validação externa).

TABELA 1 - Intervalo, média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) da composição química das amostras de carnes bovinas utilizadas no conjunto de calibração

Propriedade	Intervalo	Média	DP	CV (%)	NS*
Lipídios totais (%)	1,21-5,73	2,68	1,150	42,78	P<0,05
Proteína (%)	18,85-22,70	20,96	1,030	4,91	P>0,05
Resíduo mineral fixo (%)	0,89-1,11	1,03	0,051	4,96	P>0,05
Umidade (%)	69,11-73,45	70,82	1,023	1,44	P<0,05

*NS = Nível de significância entre as amostras do conjunto de calibração e conjunto de validação

A gama de composição de todas as frações parece relativamente estreita, com intervalos de 4,52%; 3,85%; 0,22% e 4,34% para lipídios totais, proteína, resíduo mineral fixo (RMF) e umidade, respectivamente. ALOMAR et al. (2003) encontraram médias semelhantes às do presente trabalho para os três primeiros constituintes e, intervalos semelhantes para todos os constituintes, explicando que poderiam resultar em falta de variabilidade suficiente para obter regressões de espectros e dados analíticos, principalmente com relação à umidade e teor de lipídios totais, que apresentaram intervalos e médias menores do que a relatada em literatura (LANZA, 1983; ISAKSSON et al., 1996; TØGERSEN et al., 1999).

Na análise de variância, os animais do conjunto de validação, submetidos a dieta à base de milho e soja, apresentaram carnes com os componentes lipídios totais e umidade significativamente diferentes ($P<0,05$) das amostras do conjunto de calibração, sendo que a diferença se deu em relação aos animais submetidos às dietas com ração à base de milho, sem inclusão do farelo do mesocarpo do babaçu (FMB), e aos tratamentos em que ocorreu maior substituição do milho por FMB (Tabela 2).

TABELA 2 – Teores médios de lipídios totais e umidade na carne dos bovinos utilizados nos conjuntos de calibração e validação

Dieta	Lipídios totais (%)	Umidade (%)
Milheto, sem farelo do mesocarpo do babaçu (FMB) (calibração)	2,59 ^b	71,60 ^a
48% de substituição do milho por FMB (calibração)	2,18 ^b	70,81 ^{ab}
36% de substituição do milho por FMB (calibração)	2,16 ^b	70,99 ^{ab}
24% de substituição do milho por FMB (calibração)	3,25 ^{ab}	70,53 ^{abc}
12% de substituição do milho por FMB (calibração)	3,21 ^{ab}	70,18 ^{bc}
Dieta padrão, milho e soja (validação)	4,51 ^a	69,46 ^c

Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($P < 0,05$)

Para lipídios totais e umidade, os animais do conjunto de validação apresentaram resultados não significativos ($P > 0,05$) aos tratamentos em que a substituição de milho por FMB foi de até 24% e significativo ($P < 0,05$) para maiores inclusões de FMB e utilização de dieta à base de milho, ou seja, dietas à base de milho e com alta inclusão de FMB promoveram redução significativa ($P < 0,05$) no teor de lipídios totais e aumento significativo ($P < 0,05$) na umidade, sendo encontrada baixa correlação negativa entre esses constituintes (Tabela 3), também relatada por MITSUMOTO et al. (1991).

TABELA 3 - Correlação entre os constituintes de composição química da carne bovina

	Lipídios totais	Proteínas	Resíduo mineral fixo
Proteínas	-0,20		
Resíduo mineral fixo	-0,13	0,00	
Umidade	-0,27	-0,22	-0,12

A diferença de perfil entre as amostras do próprio conjunto de calibração é importante por possibilitar maior gama de informações espectrais das propriedades dos analitos que serão modelados por NIRS. Além disso, amostras do conjunto de validação com componentes com médias diferentes das amostras do conjunto de calibração são úteis por permitir melhor avaliação da robustez dos

modelos desenvolvidos, pois, se demonstrarem boa habilidade preditiva para os resultados das amostras externas, que são significativamente diferentes, poderia-se afirmar com segurança que as escolhas dos tratamentos matemáticos foram adequadas.

Os 75 espectros da absorção da radiação no infravermelho próximo das amostras das carnes bovinas utilizadas no conjunto de calibração podem ser visualizados na Figura 1.

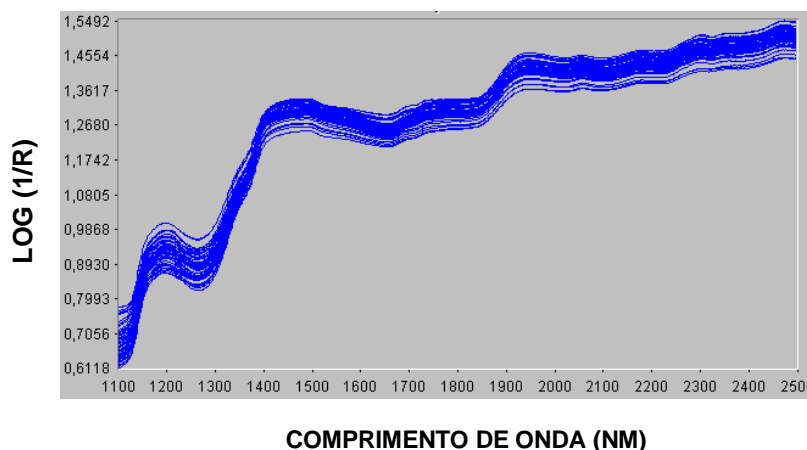


FIGURA 1 - Espectros de carnes bovinas utilizadas no conjunto de calibração sem a aplicação de pré-tratamentos

Todos os espectros apresentaram a mesma forma, sendo o desenho semelhante ao espectro NIR típico de reflectância da carne, apresentado por PRIETO et al. (2009). Na Figura 1, os espectros sofrem influência da inclinação e desvios da linha de base. Devido a isso, a visualização e interpretação das modificações espectrais associadas à concentração do analito de interesse são prejudicadas.

Os resultados dos 52 modelos de calibração desenvolvidos para os constituintes de composição de carne bovina, considerando a faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm, podem ser visualizados nas Tabelas do APÊNDICE 1. Como esperado, os modelos de calibração desenvolvidos sem a aplicação de pré-tratamentos, apenas com a utilização dos métodos de seleção de espectros, foram considerados com baixa capacidade preditiva para todos os constituintes analisados (R^2 entre 0,16 e 0,64). Entretanto, os métodos de seleção devem ser

utilizados para eliminar espectros anômalos (*outliers*), com informações não correlacionadas com o analito de interesse, permitindo, assim, melhor ajuste aos modelos de calibração com a aplicação de pré-tratamentos matemáticos.

Neste contexto, dos sete pré-tratamentos testados, apenas a “correção da linha de base” não se mostrou útil em nenhum dos constituintes analisados, apresentando baixos valores de “coeficientes de determinação” (R^2) (entre 0,16 e 0,67). Os outros pré-tratamentos se mostraram importantes na determinação de pelo menos um constituinte de composição química da carne bovina por NIRS, já que 18 modelos (34,62% do total) foram considerados com boa (R^2 entre 0,72 e 0,85) ou excelente capacidade preditiva (R^2 entre 0,92 e 0,98), conforme resultados apresentados na Tabela 4.

Para o conteúdo de lipídios totais, utilizando a máxima distância com o método de regressão PLS na faixa de 1.100 a 2.500 nm, cinco pré-tratamentos matemáticos possibilitaram o desenvolvimento de modelos com valores de R^2 considerados com boa e excelente capacidade preditiva (Tabela 4), sendo que quanto maior o valor de R^2 , menor o valor de “erro padrão de calibração” (SEC). Maior valor de R^2 indica maior correlação com os valores da reta obtida (ZENI, 2005), demonstrando maior ajuste entre os dois métodos, NIRS e o de referência. Já o valor de SEC é importante para comparar diferentes calibrações geradas a partir de um mesmo grupo de dados, indicando a incerteza da calibração (DAVIES & GRANT, 1987), ou seja, quanto mais baixo o valor de SEC, melhor o ajuste das amostras usadas para a calibração.

O modelo desenvolvido com a “segunda derivada” apresentou maior valor de R^2 do que o desenvolvido com a “primeira derivada”, demonstrando que para a calibração, as eliminações do desvio e da inclinação da linha de base (efeito nos espectros demonstrado na Figura 2B) se mostraram mais adequadas do que apenas a regularização do desvio da linha da base (Figura 2A).

TABELA 4 - Modelos de calibração multivariada por NIRS considerados com boa ou excelente capacidade preditiva na determinação de constituintes de composição química em carne bovina, desenvolvidos com o método PLS na faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm

Constituinte	Modelo (nº)	Método de seleção	Tratamentos	R ²	SEC ^{III}	Fatores	Outliers	SEP ^{IV}	RPD ^V
Lipídios totais	1	Máxima distância	1ª derivada	0,82	0,476	5	2	1,988	0,58
	2		2ª derivada	0,92	0,475	3	7	2,054	0,56
	3		SNV ^I	0,73	0,588	8	0	2,055	0,56
	4		Detrend	0,93	0,309	5	0	2,012	0,57
	5		MSC ^{II}	0,72	0,598	8	0	2,052	0,56
Proteínas	6	Distância de Mahalanobis	1ª derivada	0,92	0,605	6	9	0,753	1,38
	7		2ª derivada	0,85	0,700	2	9	0,815	1,26
	8		MSC e 1ª derivada	0,77	0,731	4	9	0,798	1,29
	9		MSC e 2ª derivada	0,96	0,778	4	11	0,812	1,27
Resíduo mineral fixo	10	Máxima distância	2ª derivada	0,98	0,022	5	7	0,034	1,50
	11		Savitzky-Golay e 2ª derivada	0,76	0,032	2	10	0,030	1,70
Umidade	12	Máxima distância	1ª derivada	0,81	0,459	5	2	0,651	1,57
	13		2ª derivada	0,98	0,496	5	7	0,680	1,50
	14		Savitzky-Golay	0,84	0,458	4	4	0,690	1,48
	15		Savitzky-Golay e 1ª derivada	0,77	0,593	2	7	0,736	1,40
	16		Savitzky-Golay e 2ª derivada	0,75	0,719	2	10	0,740	1,38
	17		MSC e 1ª derivada	0,75	0,574	4	2	0,654	1,56
	18		MSC e 2ª derivada	0,84	0,579	2	9	0,689	1,48

I = variável normal padronizada; II = correção multiplicativa de sinal; III = erro-padrão de calibração; IV = erro-padrão de validação; V = relação de desempenho do desvio.

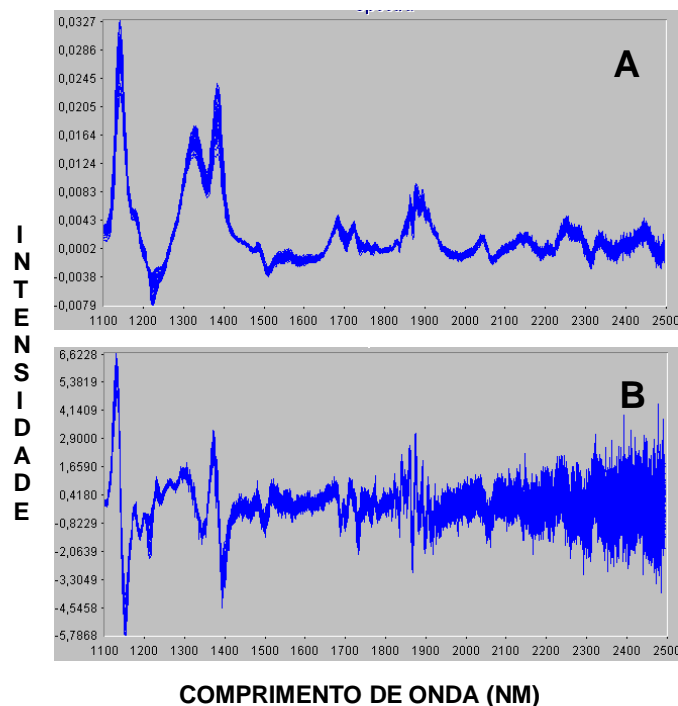


FIGURA 2 - Espectros de carne bovina com a utilização de primeira derivada (A) e segunda derivada (B)

A “eliminação de tendências” (detrend) também se mostrou importante no desenvolvimento de modelos para a determinação de lipídios totais por NIRS, gerando valor de R^2 considerado com excelente capacidade preditiva (modelo 4, Tabela 4). Provavelmente, o tratamento matemático foi importante por atenuar os efeitos compensatórios na linha de base, como também a inclinação ou a curvatura dos espectros (Figura 3), geralmente causados pela dispersão da luz e/ou compactação das amostras (LUYAPERT et al., 2002).

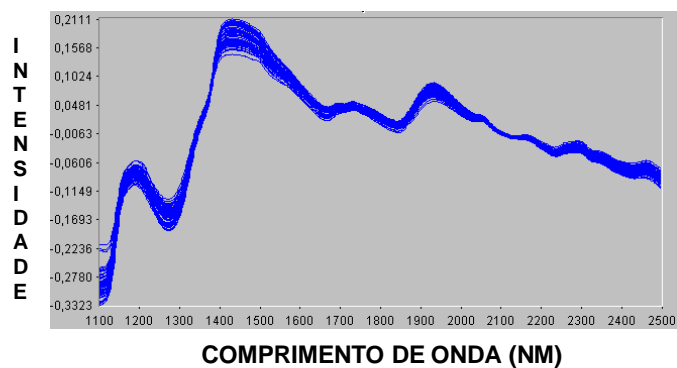


FIGURA 3 - Espectros de carne bovina com a utilização de detrend

Já os pré-tratamentos “variável normal padronizada” (SNV) e “correção multiplicativa de sinal” (MSC) apresentaram modelos considerados com boa capacidade preditiva, mas com menores valores de “coeficientes de determinação” (R^2) e altos valores de “erro padrão de calibração” (SEC). Ambos realizam um ajuste aditivo e multiplicativo, sendo que os espectros se apresentam muito semelhantes (Figura 4), embora os fatores de correção sejam determinados de modo diferente. No SNV, para cada espectro da amostra o desvio ajustado é simplesmente a média de todos os valores sobre todas as variáveis e o ajuste multiplicativo é o desvio padrão dos valores de todas as variáveis (NAES et al., 2002). Além disso, o método SNV não simplifica o modelo e não reduz as interferências sistemáticas (NAES et al., 2002) e o método MSC, na tentativa de minimizar o efeito do espalhamento de luz, pode ter deixado de considerar informações importantes relacionadas ao analito de interesse.

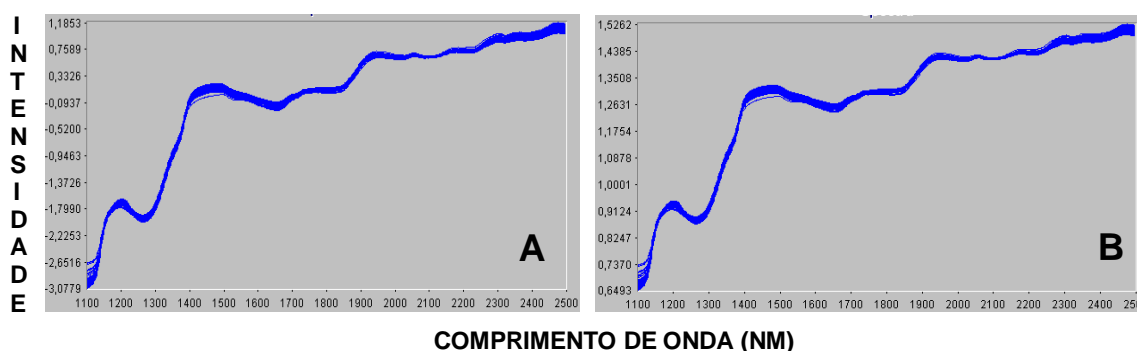


FIGURA 4 - Espectros de carne bovina com a SNV (A) e MSC (B)

A determinação do número de variáveis latentes é um fator relevante para a qualidade dos modelos elaborados com o método de regressão PLS (KOWALSKI & SEASHOLTZ, 1991), tendo sido considerados adequados entre três e oito fatores para os modelos desenvolvidos para lipídios totais (Tabela 4).

A seleção do número de fatores é importante porque o modelo deve descrever as fontes significativas de variância sem armazenar informação desnecessária ou não correlacionada com a propriedade medida. Quanto maior o número de fatores, menor o desvio da reta de calibração. Porém, se fossem utilizados mais fatores que o indicado pelo *software*, através dos valores de PRESS, poderia ocorrer a obtenção de modelos com maiores valores de R^2 , mas,

seriam modelos sobre-ajustados (FERRÃO & DAVANZO, 2005), isto é, a regressão encontrada considerou dados que não estão realmente correlacionados, como por exemplo ruídos, erros sistemáticos, etc (FERRÃO et al., 2004). Por outro lado, se fosse utilizado um menor número de fatores, poderia ocorrer o efeito denominado de ajustamento inferior (CARNEIRO, 2008), em que informações importantes não seriam modeladas.

Na avaliação do ajuste do modelo de calibração, o método ideal de predição é aquele que minimiza o erro padrão na validação externa. Valores de “erro padrão de validação” (SEP) muito superiores aos de “erro padrão de calibração” (SEC) indicam modelos sobre-ajustados. Assim, pode-se observar na Tabela 4 que o melhor ajuste foi obtido no modelo com a “primeira derivada”, que apresentou menor valor de SEP. Como os valores de SEP e da “relação de desempenho do desvio” (RPD) são inversamente proporcionais, a minimização do erro pelo modelo 1 gerou maior valor de RPD, demonstrando maior acurácia desse modelo na determinação de lipídios totais em carne bovina.

Assim, se fossem analisados apenas os dados de calibração, o modelo 4 (Tabela 4) seria mais adequado, mas testando a acurácia dos modelos, o modelo 1 se mostrou mais robusto na predição dos resultados do conjunto externo, demonstrando a importância de avaliar os modelos de calibração por NIRS em todos os seus aspectos.

Embora os valores de “coeficientes de determinação” (R^2) tenham indicado boa relação entre o método de referência e o instrumento NIRS, demonstrando ser sensível para a determinação de lipídios totais, os cinco modelos apresentaram baixa acurácia, por gerarem valores de RPD semelhantes, mas baixos, significando pouca habilidade de predição nas concentrações das amostras externas.

O alto coeficiente de variação obtido para lipídios totais (Tabela 1) demonstra um conjunto heterogêneo de amostras para o conjunto de calibração. Entretanto, os modelos de calibração foram desenvolvidos considerando informações espectrais de amostras com baixos valores de lipídios totais, que ao serem utilizados para predizer os resultados do conjunto de validação, significativamente maiores ($P < 0,05$) (Tabela 2), apresentou-se pouco robusto, por

não ter sido desenvolvido com informações suficientes do analito de interesse na faixa necessária de valores.

Assim sendo, os dados de referência do conjunto de calibração devem apresentar valores suficientes para abranger a faixa de concentração de interesse, para maximizar a previsibilidade NIRS em relação ao teor de lipídios totais em carne bovina.

Apesar de vários estudos terem sido realizados para a obtenção de modelos de calibração por NIRS para a determinação da composição da carne bovina, é difícil estabelecer comparações entre eles, já que os tratamentos matemáticos, as faixas espectrais, a forma de apresentação da amostra e até mesmo o tipo de músculo utilizado interferem na obtenção dos resultados. Então, foram selecionados estudos mais semelhantes às condições do presente trabalho.

PRIETO et al. (2006) analisaram amostras trituradas do músculo *Longissimus thoracis* de 53 bovinos (quatro espectros de cada amostra; duplicatas de duas repetições). O melhor modelo apresentou $R^2 = 0,92$, RPD = 3,32 e foi desenvolvido com os métodos “correção multiplicativa de sinal” (MSC) e “segunda derivada”, regressão PLS com três fatores, na faixa de 1.100 a 2.500 nm, com 2 nm de intervalo.

DE MARCHI et al. (2007) encontraram os mais altos valores de R^2 (0,99) e RPD (9,23) disponíveis na literatura. Analisaram amostras trituradas do músculo *Longissimus thoracis* de 148 bovinos, sendo os espectros obtidos na faixa de 1.110-2498 nm, com 2 nm de intervalo. Utilizaram, mas não especificaram quais derivadas e tratamentos para correções espectrais foram aplicadas no modelo. Entretanto, diferentemente do presente estudo e de PRIETO et al. (2006), os autores utilizaram a regressão por mínimos quadrados parciais modificada (MPLS), que é frequentemente mais estável e precisa do que a regressão PLS, por padronizar os resultados obtidos entre o método de referência e os dados de reflectância para cada comprimento de onda, considerando o valor de um desvio padrão para cada termo da regressão (MARCHÃO et al., 2011).

Além disso, PRIETO et al. (2006) e DE MARCHI et al. (2007) estimaram a habilidade de previsão dos modelos desenvolvidos por meio da

validação cruzada, usando amostras retiradas do conjunto de calibração. Assim sendo, as amostras do conjunto de validação, provavelmente, apresentavam características de composição química muito próximas às modeladas pelo conjunto de calibração, ou seja, a robustez do sistema através do valor de RPD pode ter sido subavaliada, não possuindo boa capacidade preditiva para um conjunto externo com características diferentes.

Utilizando a validação externa, RIPOLL et al. (2008) encontraram valores de $R^2 = 0,75$, $SEC = 0,490$ e $RPD = 1,00$. Os autores coletaram dois espectros de cada amostra do músculo *Longissimus thoracis* de 190 bovinos, previamente trituradas, apresentando valores de lipídios totais entre 0,33 e 2,20%. O modelo foi obtido utilizando a faixa de 1108–2492.8 nm, a “distância de Mahalanobis”, os pré-tratamentos “variável normal padronizada” (SNV) e “1ª derivada”, com a regressão por mínimos quadrados parciais modificada (MPLS), utilizando cinco fatores. Mesmo utilizando o método MPLS, o baixo valor da “relação de desempenho do desvio” (RPD) demonstra a baixa robustez do modelo em prever teores de lipídios totais em amostras externas.

Quando se utiliza a informação de toda a faixa espectral na calibração multivariada pelo método PLS, devido ao grande número, algumas variáveis podem interferir na modelagem, além de tornar o tratamento dos dados mais lento. Além disso, podem ser consideradas informações não relevantes, como por exemplo, bandas que não contenham nenhuma informação das propriedades a serem analisadas e a amplitude da razão sinal-ruído (NORGAARD et al., 2000).

Na tentativa de melhorar o desempenho das técnicas de calibração multivariada, utilizando as condições do modelo 1 (Tabela 4), foi desenvolvido um modelo com as seguintes faixas associadas aos movimentos vibracionais dos lipídios: 1.100-1.400 nm (estiramento C-H) (BRØNDUM et al., 2000; LEROY et al., 2003; PRIETO et al., 2008); 1.676-1.776 nm (combinações de bandas C-H) (RØDBOTTEN et al., 2000) e 2.100-2.500 nm (combinações de bandas C-H) (HIDAJAT & CHONG, 2000; MURRAY & WILLIAMS, 1990). Como resultados, uma amostra anômala foi eliminada e foram encontrados baixos valores de R^2 (0,47) e SEC (0,902) com três fatores.

Analisando os espectros dos dois maiores resultados de lipídios totais do conjunto de validação (7,75 e 5,81%) (cor vermelha) e os dois menores

resultados dos animais submetidos a dietas com milho, sem inclusão de FMB (1,21 e 1,28%) (cor azul), foram observadas diferenças nítidas nas faixas demonstradas na Figura 5.

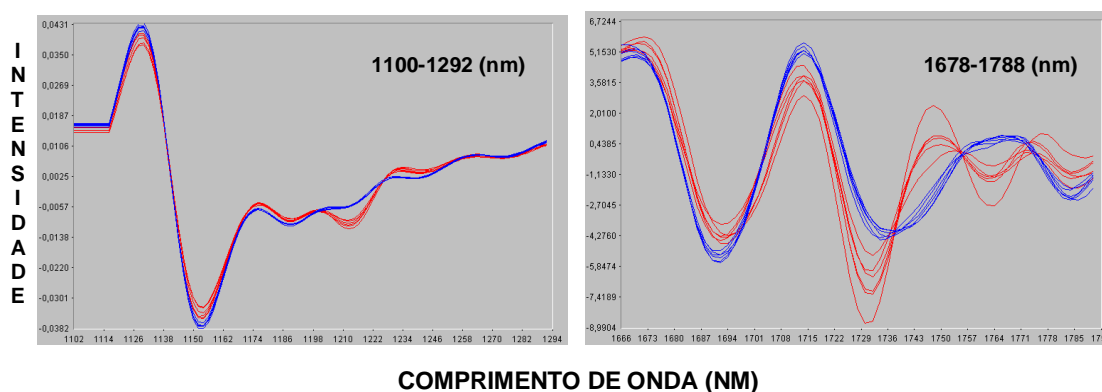


FIGURA 5 - Diferenças espectrais observadas para lipídios totais em carne bovina

O modelo desenvolvido apenas com estas faixas de comprimento de onda, utilizando as condições do modelo 1 (Tabela 4), não detectou amostra *outlier* e os resultados apresentaram valor de $R^2 = 0,81$; $SEC = 0,917$; utilização de oito fatores; $SEP = 1,683$; $RPD = 0,68$. A seleção dessas duas faixas espectrais foi importante por gerar modelo com valor de $SEP 18,12\%$ mais baixo que o modelo 1 e valor de $RPD 17,24\%$ superior, demonstrando serem regiões sensíveis aos movimentos vibracionais dos lipídios.

A “distância de Mahalanobis” se mostrou mais eficiente que a “máxima distância” na eliminação de espectros apenas no desenvolvimento de modelos de calibração para a quantificação de proteína (Tabela 4). As aplicações de derivadas isoladamente e com o método de alisamento “correção multiplicativa de sinal” (MSC) se mostraram adequadas no desenvolvimento de modelos considerados com boa ou excelente capacidade preditiva para a determinação de proteína, sendo que o modelo 9, com o MSC e “segunda derivada”, foi o que apresentou maior valor de R^2 . No entanto, os modelos desenvolvidos com a segunda derivada (7 e 9) apresentaram maiores valores de “erro padrão de calibração” (SEC) e “erro padrão de validação” (SEP), e conseqüentemente, menores valores de “relação de desempenho do desvio” (RPD) que os modelos obtidos com a “1ª derivada” (6 e 8).

A principal desvantagem da utilização de derivadas é que os ruídos, presentes nos espectros, podem ser potencializados, principalmente com a aplicação da “segunda derivada”, o que diminui a relação sinal/ruído (BRAGA & POPPI, 2004). Isso poderia justificar a maior robustez dos modelos desenvolvidos com a “primeira derivada”.

Métodos de alisamento, por aumentarem a relação sinal-ruído, poderiam minimizar os efeitos das derivadas (O’HAVER, 2013), mas a “correção multiplicativa de sinal” (MSC) não se mostrou relevante nos modelos, já que apresentou menor valor de coeficiente de determinação (R^2) (modelo 8) em comparação com o modelo utilizando apenas a “1ª derivada” (modelo 6) e gerou maior valor de “erro padrão de calibração” (SEC) que o modelo utilizando apenas a “2ª derivada” (modelo 7). Segundo O’HAVER (2013), o método de alisamento MSC pode promover redução da altura e aumento da largura dos picos, gerando distorção, e assim, modelos com menor capacidade de previsão.

Para proteínas, todos os modelos apresentaram alta percentagem de eliminação de *outliers* (entre 12 e 14,7% do total do conjunto da calibração) (Tabela 4). A exclusão de amostras anômalas é necessária para a melhoria da qualidade da calibração. Entretanto, é necessário ser prudente, pois a supressão de uma grande quantidade de amostras *outliers* resulta na diminuição da representatividade (PASQUINI, 2003), o que pode ter ocorrido no modelo 9, em que a exclusão de mais amostras, pode ter eliminado do conjunto informações não encontradas nos outros dados.

Mesmo utilizando a validação cruzada, DE MARCHI et al. (2007), encontraram valores de R^2 (0,85) e RPD (1,42) similares aos obtidos no presente trabalho. O modelo foi desenvolvido na faixa de 1.110-2498 nm, com 2 nm de intervalo, com a regressão por mínimos quadrados parciais modificada (MPLS) e pré-tratamentos (não especificados).

Também por validação cruzada, ALOMAR et al. (2003) obtiveram altos valores de R^2 (0,82) e de RPD (2,33), em estudo utilizando 72 espectros dos músculos *Longissimus thoracis et lumborum*, *Supraspinatus* e *Semitendinosus* de bovinos, apresentando valores de proteína entre 18,25% e 22,56%. O modelo foi desenvolvido com método de seleção de espectros (não especificado), “segunda derivada” e o método MPLS, com três fatores.

Os autores podem ter obtido o alto valor de RPD devido ao uso da validação cruzada, do método MPLS e por terem utilizado a região visível/infravermelho próximo do espectro eletromagnético (400 a 2.500 nm), em 2 nm de intervalo. Não foram encontrados estudos para a predição de proteína, mas CLARK & SHORT (1994) e BAJWA et al. (2009), relataram na região visível (400-1.100 nm) alto potencial para estimar as concentrações de umidade e lipídios totais na carne. Portanto, não se sabe exatamente a real contribuição da região do infravermelho próximo para a obtenção do bom modelo de calibração desenvolvido por ALOMAR et al. (2003).

RIPOLL et al. (2008), utilizando amostras do músculo *Longissimus thoracis*, apresentando teor de proteína entre 17,08 e 23,82%, desenvolveram modelo com as mesmas condições do modelo 8 (Tabela 4), porém, com a regressão por mínimos quadrados parciais modificada (MPLS). Os autores obtiveram por validação externa valores de R^2 (0,11) e de RPD (1,09) inferiores aos obtidos pelo presente trabalho, mesmo utilizando os mesmos tratamentos matemáticos.

No entanto, como não houve diferença significativa nos valores de proteína entre as amostras dos conjuntos de calibração e de validação (Tabela 1), o baixo desvio padrão entre os dados de referência (baixa variabilidade) pode ter afetado negativamente a previsibilidade dos modelos desenvolvidos no presente trabalho para as análises externas. Além disso, as diferenças entre a determinação analítica de Kjeldahl, que mede o teor de nitrogênio, e o NIRS, que mede movimentos vibracionais dos aminoácidos, podem dificultar as previsões do teor de proteínas por NIRS (LANZA, 1983).

Analisando os espectros das duas amostras do conjunto de calibração que apresentaram os menores valores de proteína (18,85 e 19,56%) com as duas amostras que apresentaram os maiores valores (22,62 e 22,70%), não se observou qualquer variação sistemática nos espectros, possivelmente, devido ao alto sinal da água, que mascara as informações espectrais dos movimentos vibracionais das proteínas (BRØNDUM et al., 2000; ALOMAR et al., 2003).

Entretanto, MURRAY & WILLIAMS (1990) mostraram em seu estudo as regiões do infravermelho próximo em que ocorrem movimentos associados às vibrações dos aminoácidos (em nm): 1100-1310 (3^a sobretons: estiramento N-H

de todos os aminoácidos); 1490-1680 (1ª sobretons: estiramento N-H de todos os aminoácidos); 1780-1970 (1ª sobretons: absorção desconhecida de vários aminoácidos); 2020-2150 (2ª sobretons: deformação N-H de aminas primárias e secundárias); 2200-2250 (2ª sobretons: deformação $\text{NH}_3 + \text{NH}$ de aminoácidos); 2310-2420 (estiramento COO^- ou combinação de bandas de vários aminoácidos).

Foi desenvolvido um modelo com essas faixas, utilizando os tratamentos do modelo 6 (Tabela 4). Uma amostra foi considerada *outlier* e o modelo apresentou menor capacidade preditiva ($R^2 = 0,49$; $\text{SEC} = 0,843$ com dois fatores) que o modelo desenvolvido na faixa de 1.110 a 2.500 nm.

Para a determinação do resíduo mineral fixo (RMF), embora o modelo desenvolvido com a “segunda derivada” tenha apresentado valor de R^2 considerado de excelente capacidade preditiva (Tabela 4), o modelo desenvolvido com o método de alisamento “Savitzky-Golay” apresentou menor valor de SEP, e assim, maior valor de RPD, demonstrando ser um modelo com maior habilidade de previsão.

A utilização do método Savitzky-Golay foi adequada por eliminar ruídos, decorrentes da utilização da “segunda derivada”, aumentando a relação sinal-ruído. Além disso, simplificou o modelo, já que reduziu o número de fatores e permitiu a eliminação de mais amostras anômalas, com informações não correlacionadas com a propriedade de interesse.

Poucos estudos foram desenvolvidos em carne bovina para estimar o teor de RMF, mas a maior parte dos autores encontrou baixos valores de R^2 (entre 0,17 e 0,42) (SANDERSON et al., 1997; COZZOLINO et al., 2002; PRIETO et al., 2006). Baixos valores para a predição de RMF são esperados, pois a radiação no infravermelho próximo não interage com minerais puros ou compostos inorgânicos, em suas formas iônicas ou de sais, a não ser que o conteúdo mineral esteja relacionado com a fração orgânica por meio de associações com ácidos orgânicos ou quelatos que modificam os espectros NIRS (SHENK & WESTERHAUS, 1995).

Pode ser esta a justificativa para a obtenção dos dois bons modelos de calibração encontrados no presente trabalho, principalmente o modelo 11 (Tabela 4) que apresentou valores superiores aos maiores valores para RMF disponíveis na literatura ($R^2 = 0,66$ e $\text{RPD} = 1,67$), encontrados por ALOMAR et al. (2003),

que utilizaram amostras de músculos *Longissimus thoracis et lumborum*, *Supraspinatus* e *Semitendinosus* triturados, apresentando valores entre 0,93% e 1,15%. O modelo foi desenvolvido com método de seleção de espectros (não especificado), pré-tratamentos “variável normal padronizada” (SNV) juntamente com “detrend” (eliminação de tendências) e a regressão por mínimos quadrados parciais modificada (MPLS) com quatro fatores. Entretanto, os autores utilizaram a validação cruzada e a faixa visível/infravermelho próximo (400 a 2.500 nm), em 2 nm de intervalo.

Além disso, o modelo 11, na predição das amostras do conjunto de validação, gerou média de resíduos (valor obtido pelo método de referência – valor obtido pelo método NIRS) de apenas 0,031%, demonstrando que o NIRS pode ser utilizado para a determinação de RMF em carne bovina.

A umidade foi a determinação em que se obteve o maior número de modelos de calibração considerados com boa ou excelente capacidade preditiva (Tabela 4). O pré-tratamento “2ª derivada” foi o que gerou maior valor de “coeficiente de determinação” (R^2) (modelo 13), o “Savitzky-Golay” o menor valor de “erro padrão de calibração” (SEC) (modelo 14) e a “primeira derivada” o menor valor de “erro padrão de validação” (SEP) (modelo 12), e conseqüentemente, o maior valor de “relação de desempenho do desvio” (RPD), demonstrando a importância de testar todas as ferramentas quimiométricas disponíveis na seleção dos modelos de calibração mais adequados.

A utilização dos métodos de alisamento “Savitzky-Golay” e “correção multiplicativa de sinal” (MSC) simplificaram os modelos, já que houve diminuição do número de fatores nos modelos 15, 16, 17 e 18 quando comparados com os modelos obtidos apenas com a utilização de derivadas (modelos 13 e 14).

A relação entre os valores determinados pelo modelo 12, com “primeira derivada”, e os valores obtidos pela análise de referência é mostrada na Figura 6. Estes resultados mostram o ajuste dos dados do método de referência com os dados obtidos pelo método de calibração (Figura 6A) e pelo método de validação (Figura 6B). Por este modelo, pode-se observar na Figura 6B a tendência do modelo de calibração em superestimar os valores das amostras externas, ou seja, os valores obtidos por NIRS foram maiores que os obtidos pelo método de

referência, sendo que 60% das amostras foram previstas com resíduos de até 1,5%.

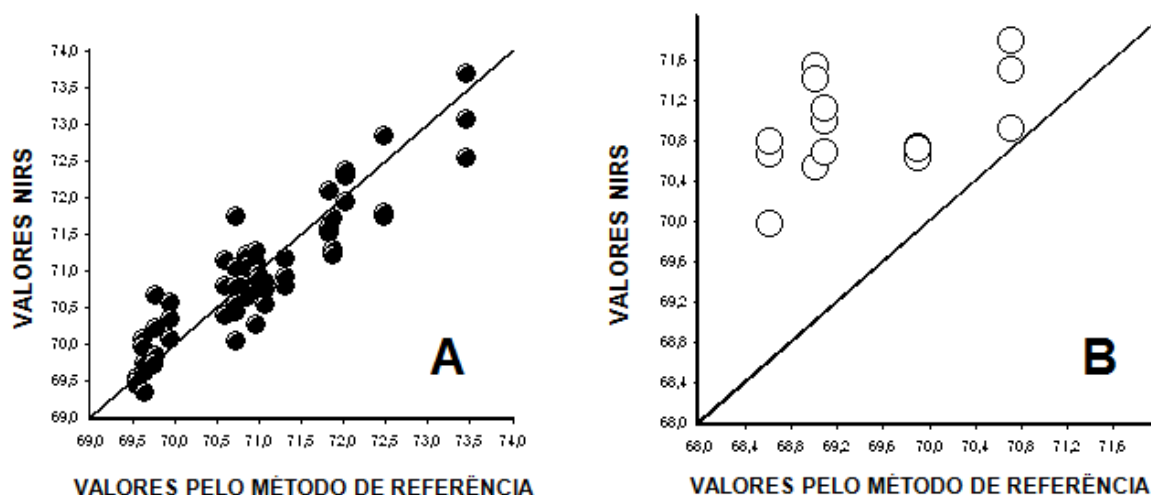


FIGURA 6 - Relação entre os valores determinados pelo NIRS e os valores de referência obtidos para a determinação de proteína nas amostras do conjunto de calibração (A) e validação (B)

Poucos estudos determinaram o teor de umidade por NIRS em carne bovina, e mesmo assim, a maioria foi realizado sob condições diferentes às do presente trabalho, como mensurações *on-line* em escala industrial (TØGERSEN et al., 1999; TØGERSEN et al., 2003), utilização da região visível/infravermelho próximo do espectro eletromagnético (COZZOLINO et al., 2002).

Em condições semelhantes às do presente trabalho, utilizando a validação externa, RIPOLL et al. (2008), encontraram modelo mais robusto ($R^2 = 0,86$, SEC = 0,369 e RPD = 1,87) que os obtidos no presente trabalho. Utilizaram amostras do músculo *Longissimus thoracis* de 190 bovinos, apresentando valores de umidade entre 73,31 e 77,91%, sendo o modelo desenvolvido com a “distância de Mahalanobis”, a “1ª derivada”, porém, com a regressão por mínimos quadrados parciais modificada (MPLS) com quatro fatores, na faixa de 1.500 a 2.460,8 nm.

Movimentos associados com a umidade foram detectados nas faixas 1.390- 1.450 nm (estiramento O-H) por MURRAY & WILLIAMS (1990); 1.938 a 2.004 nm por BRØNDUM et al. (2000), ALOMAR et al. (2003) e LEROY et al. (2003) (bandas de combinação, estiramento + deformação angular das ligações

O-H) e; 2.040 a 2.150 nm por BÜNING-PFAUE (2003) e MORGANO et al. (2007) (bandas de combinação, estiramento + deformação angular das ligações O-H). O modelo desenvolvido com essas faixas, com os tratamentos espectrais do modelo 12, apresentou baixa capacidade preditiva ($R^2 = 0,36$) com dois fatores.

Avaliando os espectros das duas amostras do conjunto de calibração que apresentaram os maiores valores de umidade (72,01 e 72,47%) (cor vermelha) com as duas amostras do conjunto de validação que apresentaram os menores valores (68,61 e 69,01%) (cor azul), observou-se variação sistemática apenas na faixa 1.354-1.482 nm (Figura 7). O modelo desenvolvido nessa faixa, com as condições do modelo 12, apresentou baixíssimo valor de R^2 (0,05) com 2 fatores, demonstrando que a correta seleção de ferramentas quimiométricas é essencial para extrair as informações contidas nos espectros, já que é difícil observar diferenças visuais bem definidas.

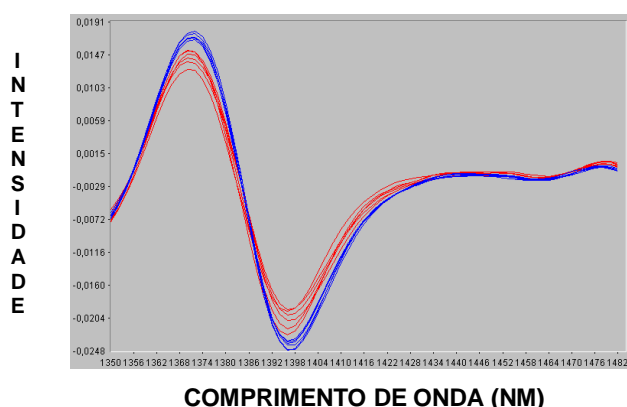


FIGURA 7 - Diferenças espectrais observadas para umidade em carne bovina

Para a determinação da umidade, grandes erros nos dados de referência poderiam reduzir a previsibilidade NIRS. A espectroscopia NIR considera os movimentos vibracionais da molécula de água e as técnicas de secagem em estufa não medem o conteúdo verdadeiro da água nos alimentos, já que a água fortemente ligada não é determinada e a distinção entre a água livre e ligada é quase impossível (RÜCKOLD et al., 2000). Além disso, a perda de massa não é causada apenas pela água, mas também por substâncias voláteis produzidas sob as condições de secagem. Assim sendo, os resultados dos métodos de secagem não poderiam ser denominados como conteúdo de água ou

umidade, mas perda de massa seria a expressão mais adequada (ISENGARD, 2001).

Além disso, as variações na umidade da carne, provocadas pela perda de água por evaporação entre a análise de umidade pelo método convencional e a coleta dos espectros, poderiam reduzir a previsibilidade dos modelos de calibração por NIRS, na determinação de umidade em amostras de carne (COZZOLINO et al., 2002).

4 CONCLUSÕES

A adequada seleção dos pré-tratamentos matemáticos é imprescindível para que os modelos de calibração possam ter habilidade de previsão na determinação da composição química da carne bovina.

Para a maior parte dos constituintes (lipídios totais, resíduo mineral fixo e umidade), o método de seleção “máxima distância” é mais eficiente para o desenvolvimento de modelos de calibração mais adequados, sendo a “primeira derivada” o pré-tratamento matemático de eleição para as determinações de proteínas, umidade e lipídios totais.

Para lipídios totais, as faixas 1.100-1292 nm e 1678-1788 nm, permitem o desenvolvimento de modelo mais robusto do que toda a faixa espectral.

Para a determinação de resíduo mineral fixo, o modelo de calibração com “máxima distância”, com os pré-tratamentos “Savitzky-Golay” e “segunda derivada”, na faixa de 1.100 a 2.500 nm é uma opção que traz melhores resultados do que os encontrados na literatura para carne bovina.

A espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo é uma alternativa adequada aos métodos convencionais, quando se utiliza o método de regressão PLS e os tratamentos matemáticos mais adequados para cada propriedade analisada, além de um conjunto de amostras de calibração com alta variabilidade.

REFERÊNCIAS

1. ALOMAR, D.; GALLO, C.; CASTANEDA, M.; FUCHSLOCHER, R. Chemical and discriminant analysis of bovine meat by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). **Meat Science**, v. 63, n. 4, p. 441–450, 2003.
2. ANDRÉS, S.; MURRAY, I.; NAVAJAS, E.A.; FISHER, A.V.; LAMBE, N.R.; BUNGER, L. Prediction of sensory characteristics of lamb meat samples by near infrared reflectance spectroscopy. **Meat Science**, v. 76, n. 3, p. 509–516, 2007.
3. ANDRÉS, S.; SILVA, A.; SOARES-PEREIRA, A.L.; MARTINS, C.; BRUNO-SOARES, A.M.; Murray, I. The use of visible and near infrared reflectance spectroscopy to predict beef M. *Longissimus thoracis et lumborum* quality attributes. **Meat Science**, v. 78, n. 3, p. 217–224, 2008.
4. BAJWA, S.G.; KANDASWAMY, J.; APPLE, J.K. Spectroscopic evaluation of the nutrient value of ground beef patties. **Journal of Food Engineering**, v. 92, n. 4, p. 454–460, 2009.
5. BELLO, S.R.B. **Estudo da suplementação com óleo de peixe associado ao de fígado de tubarão sobre o crescimento tumoral e resposta de macrófagos peritoneais em ratos portadores de tumor de Walker 256**. 2007. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
6. BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.
7. BRAGA, J.W.B.; POPPI, R.J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 1004-1011, 2004.
8. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 20, 21 jul. 1999. Oficializa os Métodos Analíticos Físico-Químicos, para Controle de Produtos Cárneos e seus Ingredientes - Sal e Salmoura. **Diário Oficial da União**, Brasília, 27 jul. 1999. Seção 1.
9. BRIDI, A. M.; CONSTANTINO, C. Material didático: **Qualidade e Avaliação de Carcaças e Carnes Bovinas**. In: Universidade Estadual de Londrina, 2010. Disponível em: <http://www.uel.br/grupopesquisa/gpac/pages/arquivos/texto%20palestra%20maringa%202010.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2013.
10. BRØNDUM, J.; MUNCK, L.; HENCKEL, P.; KARLSSON, A.; TORNBERG, E.; ENGELSEN, S.B. Prediction of water-holding capacity and composition of

- porcine meat by comparative spectroscopy. **Meat Science**, v. 55, n. 2, p. 177–185, 2000.
11. BÜNING-PFAUE, H. Analysis of water in food by near infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 82, n. 1, p. 107-115, 2003.
 12. CARNEIRO, M.E. **Classificação de lâminas de madeira de *pinus spp* por espectroscopia óptica**. 2008. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
 13. CEN, H.; HE, Y. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 2, p. 72–83, 2007.
 14. CLARK, D.H.; SHORT, R.E. Comparison of AOAC and light spectroscopy analyzes of uncooked, ground beef. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 4, p. 925–931, 1994.
 15. COZZOLINO, D.; DE MATTOS, D.; MARTINS, V. Visible/near infrared reflectance spectroscopy for predicting composition and tracing system of production of beef muscle. **Animal Science**, v. 74, p. 477–484, 2002.
 16. DAVIES, A.M.C.; GRANT A. Review: Near infra-red analysis of food. **International Journal of Food Science and Technoly**, v. 22, p. 191–207, 1987.
 17. DE MARCHI, M.; BERZAGHI, P.; BOUKHA, A.; MIRISOLA, M.; GALLO, L. Use of near infrared spectroscopy for assessment of beef quality traits. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 421–423, 2007.
 18. FERRÃO, M.F.; CARVALHO, C.W.; MÜLLER, E.I.; DAVANZO, C.U. Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha de trigo empregando NIR-PLS e DRIFT-PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 333-340, 2004.
 19. FERRÃO, M.F.; DAVANZO, C.U. Horizontal attenuated total reflection applied to simultaneous determination of ash and protein contents in commercial wheat flour. **Analytica Chimica Acta**, v. 440, n. 2, p. 411-415, 2005.
 20. FRENCH, P.; O'RIORDAN, E.G.; MONAHAN, F.J.; CAFFREY, P.F.; MOLONEY, A.P. Fatty acid composition of intra-muscular triacylglycerols of steers fed autumn grass and concentrates. **Livestock Production Science**, v. 81, p. 307-317. 2003.
 21. GEAY, Y.; BAUCHART, D.; HOCQUETTE, J.F.; CULIOLI, J. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. **Reproduction Nutrition Development**, v. 41, n. 1, p. 1-26, 2001.

22. HIDAJAT, K.; CHONG S.M. Quality characterisation of crude oils by partial least squares calibration of NIR spectral profiles. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v.8, p.53–59, 2000.
23. ISAKSSON, T.; NILSEN, B.N.; TØGERSEN, G.; HAMMOND, R.P.; HILDRUM, K.I. Online, proximate analysis of ground beef directly at a meat grinder outlet. **Meat Science**, v. 43, n. 3-4, p. 245–253, 1996.
24. ISENGARD, H.D. Water content, one of the most important properties of food. **Food Control**, v. 12, n. 7, p. 395-400, 2001.
25. KOWALSKI, B.R.; SEASHOLTZ, M.B. Recent developments in multivariate calibration. **Journal of Chemometrics**, v. 5, n. 3, p. 129-145, 1991.
26. LANZA, E. Determination of moisture, protein, fat, and calories in raw pork and beef by near infrared spectroscopy. **Journal of Food Science**, v. 48, n. 2, p. 471–474, 1983.
27. LEROY, B.; LAMBOTTE, S.; DOTREPPE, O.; LECOCQ, H.; ISTASSE, L.; CLINQUART, A. Prediction of technological and organoleptic properties of beef longissimus thoracis from near-infrared reflectance and transmission spectra. **Meat Science**, v. 66, n. 1, p. 45–54, 2003.
28. LIU, Y.; LYON, B.G.; WINDHAM, W.R.; LYON, C. E.; SAVAGE, E.M. Prediction of physical, color, and sensory characteristics of broiler breasts by visible/near infrared reflectance spectroscopy. **Poultry Science**, v. 83, n. 8, p. 1467–1474. 2004.
29. LUYAPAERT, J.; HEUERDING, S.; DE JONG, S.; MASSART, D.L. An evaluation of direct orthogonal signal correction and other preprocessing methods for the classification of clinical study lots of a dermatological cream. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, n. 3, p. 453-466, 2002.
30. MARCHÃO, R.L.; BECQUER, T.; BRUNET, D. **Predição dos teores de carbono e nitrogênio do solo utilizando espectroscopia de infravermelho próximo**. EMPRAPA: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 304, 2011. 21 p.
31. MITSUMOTO, M.; MAEDA, S.; MITSUHASHI, T.; OZAWA, S.H. Near-infrared spectroscopy determination of physical and chemical characteristics in beef cuts. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 6, p. 1493–1496, 1991.
32. MORGANO, M.A.; FARIA, C.G.; FERRÃO, M.F.; FERREIRA, M.M.C. Determinação de açúcar total em café cru por espectroscopia no infravermelho próximo e regressão por mínimos quadrados parciais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 346-350, 2007.

33. MURRAY, I.; WILLIAMS, P.C. Chemical Principles of Near-Infrared Technology. In: WILLIAMS, P.C; NORRIS, K.H. **Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries**. 2.ed. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1990, p. 17-34.
34. NAES, T.; ISAKSSON, T.; FEARN, T.; DAVIES, T. **A user-friendly guide to multivariate calibration and classification**. Chichester: NIR Publications, 2002, 344 p.
35. NATALINO, R. **Caracterização de açúcar mascavo aplicando análise das componentes principais a dados espectrométricos**. 2006. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
36. NORGAARD, L.; SAUDLAND, A.; WAGNER, J.; NIELSEN J.P.; MUNCK, L.; ENGELSEN, S.B. Interval Partial Least Square Regression (iPLS): A comparative Chemometric Study with an Example from near-infrared spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 54, n. 3, p. 413-419, 2000.
37. O’HAVER, T. **A Pragmatic Introduction to Signal Processing with applications in Chemical Analysis**. 2013. 121 p. Disponível em: <http://terpconnect.umd.edu/~toh/spectrum/> Acessado em 21 out. 2013.
38. PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals practical aspects and analytical applications. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198-219, 2003.
39. PREVOLNIK, M.; CANDEK-POTOKAR, M.; ŠKORJANC, D. Ability of NIR spectroscopy to predict meat chemical composition and quality: a review. **Journal of Animal Science**, v. 49, n. 11, p. 500–510, 2004.
40. PREVOLNIK, M.; CANDEK-POTOKAR, M.; ŠKORJANC, D.; VELIKONJA-BOLTA, S.; ŠKRLEP, M.Z.; NIDARŠIČ, T. Predicting intramuscular fat content in pork and beef by near infrared spectroscopy. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 13, n. 2, p. 77–85, 2005.
41. PRIETO, N.; ANDRÉS, S.; GIRALDEZ, F.J.; MANTECON, A.R.; LAVIN, P. Potential use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for the estimation of chemical composition of oxen meat samples. **Meat Science**, v. 74, n. 3, p. 487–496, 2006.
42. PRIETO, N.; ANDRÉS, S.; GIRALDEZ, F.J.; MANTECON, A.R.; LAVIN, P. Ability of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to estimate physical parameters of adult steers (oxen) and young cattle meat samples. **Meat Science**, v. 79; n. 4, p. 692–699, 2008.
43. PRIETO, N.; ROEHE, R.; LAVIN, P.; BATTEN, G.; ANDRÉS, S. Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review. **Meat Science**, v. 83, n. 2, p. 175-186, 2009.

44. PRIETO, N.; DUGAN, M.E.R.; LÓPEZ-CAMPOS, O.; AALHUS, J.L.; UTTARO, B. At line prediction of PUFA and biohydrogenation intermediates in perirenal and subcutaneous fat from cattle fed sunflower or flaxseed by near infrared spectroscopy. **Meat Science**, v. 94, n. 1, p. 27–33, 2013.
45. RIPOLL, G.; ALBERTI, P.; PANEA, B.; OLLETA, J.L.; SANUDO, C. Near-infrared reflectance spectroscopy for predicting chemical, instrumental and sensory quality of beef. **Meat Science**, v. 80, n. 3, p. 697–702, 2008.
46. RØDBOTTEN, R.; NILSEN, B.N.; HILDRUM, K.I. Prediction beef quality attributes from early post mortem near infrared reflectance spectra. **Food Chemistry**, v. 69, n. 4, p. 427–436, 2000.
47. RÜCKOLD, S.; GROBECKER, K.H.; ISENGARD, H.D. Determinations of the contents of water and moisture in milk powder. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 368, p. 522-527, 2000.
48. SANDERSON, R.; LISTER, S.J.; DHANOA, M.S.; BARNES, R.J.; THOMAS, C. Use of near infrared reflectance spectroscopy to predict and compare the composition of carcass samples from young steers. **Animal Science**, v. 65, n. 1, p. 45–54, 1997.
49. SAS INSTITUTE. 2002. SAS/STAT Software: changes and enhancements through release 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.
50. SHENK, J.S.; WESTERHAUS, M.O. The application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to forage analysis. In: FAHEY JR., G.C.; MOSSER, L.E.; MERTENS, D.R.; COLLINS, M. (Eds.). **Forage quality, evaluation and utilization**. Wisconsin: American Society of Agronomy Inc., 1995. p. 406–449.
51. SHENK J.; WESTERHAUS, M.O. Calibration the ISI way. In: DAVIES, A.M.C.; WILLIAMS, P. (eds). **Near Infrared Spectroscopy: The future Waves**. Chichester: NIR Publications, 1996. 742 p.
52. TØGERSEN, G.; ISAKSSON, T.; NIELSEN, B.N.; BAKER, E.A.; HILDRUM, K.I. On-line NIR analysis of fat, water and protein in industrial scale ground meat batches. **Meat Science**, v. 51, n. 1, p. 97–102, 1999.
53. TØGERSEN, G.; ARNESEN, J.F.; NIELSEN, B.N.; HILDRUM, K.I. On-line prediction of chemical composition of semi-frozen ground beef by non-invasive NIR spectroscopy. **Meat Science**, v. 63, n. 4, p. 515–523, 2003.
54. VILJOEN, M.; HOFFMAN, L.C.; BRAND, T.S. Prediction of the chemical composition of mutton with near infrared reflectance spectroscopy. **Small Ruminant Research**, v. 69, p. 88–94, 2007.

55. WARRISS, P.D. **Meat Science. An introductory text.** 2.ed. Wallingford: CABI Head Office, 2010. 310 p.
56. WILLIAM, P.; NORRIS, K. **Near-infrared technology in the agricultural and food industries.** St. Paul: AACC Press, 1987. 312 p.
57. WILLIAMS, P.C.; SOBERING, D.C. Comparison of commercial near infrared transmittance and reflectance instruments for analysis of whole grains and seeds. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 1, p. 25–32, 1993.
58. ZENI, D. **Determinação de cloridrato de propranolol em medicamentos por espectroscopia no infravermelho com calibração multivariada (PLS).** 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

CAPÍTULO 3 – MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA POR NIRS PARA DETERMINAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS DE MACIEZ NA CARNE BOVINA

RESUMO: A maciez da carne bovina é considerada o atributo mais importante pela média dos consumidores, mas as várias propriedades relacionadas à maciez são difíceis de serem analisadas pelos métodos convencionais, havendo a necessidade de substituí-las por técnicas que sejam rápidas e que possuam alta seletividade e alta repetibilidade, como é o caso da espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIRS). Para a determinação das características de maciez, o NIRS tem apresentado resultados inconsistentes, havendo a necessidade do desenvolvimento de modelos de calibrações mais robustos, por isso, desenvolveu-se o presente estudo. Para o desenvolvimento dos modelos de calibração, foram coletados três espectros de cada amostra do músculo *Longissimus dorsi* de 25 novilhos mestiços leiteiros castrados, divididos em cinco tratamentos, cinco repetições em cada, com base no fornecimento de dietas contendo milho e inclusão de farelo do mesocarpo do babaçu nas proporções de 0; 12; 24; 36 e 48% na matéria seca da dieta total, totalizando 75 espectros. Para o conjunto de validação externa, foram utilizadas amostras de cinco novilhos mestiços leiteiros castrados submetidos à dieta à base de milho e soja, totalizando 15 espectros. Dos 78 modelos de calibração desenvolvidos para definir o método de seleção de espectros e pré-tratamento(s) matemático(s) mais adequados para cada característica (capacidade de retenção de água, colágeno total e solúvel, força de cisalhamento, índice de fragmentação miofibrilar e pH), 19 modelos (24,36% do total) foram considerados com boa (R^2 entre 0,72 e 0,88) ou excelente capacidade preditiva (R^2 entre 0,91 e 0,99). Ainda que a “máxima distância” tenha sido mais eficiente na seleção de espectros para CRA e IFM e a “distância de Mahalanobis” para os demais, os modelos desenvolvidos apenas com esses métodos apresentaram baixa capacidade preditiva, demonstrando ser imprescindível a adequada seleção de pré-tratamentos matemáticos. Foi obtido modelo com capacidade preditiva limitada apenas para a quantificação do colágeno total, provavelmente, devido à baixa variabilidade apresentada nas amostras utilizadas e à baixa sensibilidade do método NIRS para constituintes menores. Para as demais características, a dieta utilizada gerou variabilidade suficiente para o desenvolvimento de bons modelos. Os modelos desenvolvidos com os pré-tratamentos “primeira” e/ou “segunda derivada”, isoladamente ou com a utilização dos métodos de suavização “Savitzky-Golay” ou “correção multiplicativa de sinal”, apresentaram os maiores valores de RPD, demonstrando ser ferramentas quimiométricas eficientes para a obtenção de modelos de calibração robustos para a determinação das características de maciez em carne bovina, na faixa de 1.100 a 2.500 nm, com o método PLS, utilizando entre 2 e 5 fatores. Conclui-se, que a espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo pode ser utilizada em substituição aos métodos convencionais, por ser uma técnica rápida, precisa, sensível e que permite a análise simultânea das características de maciez da carne bovina.

Palavras-chave: força de cisalhamento, índice de fragmentação miofibrilar, infravermelho próximo, regressão PLS

MULTIVARIATE CALIBRATION MODELS FOR NIRS TO DETERMINE TENDERNESS CHARACTERISTICS OF BEEF

ABSTRACT: Tenderness in beef is considered its most important characteristic by many consumers, but the various properties related to tenderness are difficult to be analysed by conventional methods. They need to be replaced by techniques that are rapid and have high selectivity and high repeatability, e.g. near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). To determine tenderness characteristics, NIRS has presented inconsistent results, showing the need to develop more robust calibration models, and this study was developed for that reason. To develop calibration models, three spectra were collected from each sample of the *Longissimus dorsi* muscle of 25 mixed-breed castrated dairy calves, divided into five treatments (five repetitions in each) based on supplying diets containing millet and including babassu mesocarp bran at proportions of 0; 12; 24; 36 and 48% in the dry matter of the total diet, totalling 75 spectra. For the external validation set, samples were used from five mixed-breed castrated dairy calves fed on a diet based on maize and soybean, totalling 15 spectra. Of the 78 calibration models developed to define the selection method for spectra and the most appropriate mathematical pre-treatment for each characteristic (water holding capacity – WHC, total and soluble collagen, shear force, FMI and pH), 19 models (24.36% of the total) were considered to have good (R^2 between 0.72 and 0.88) or excellent (R^2 between 0.91 and 0.99) predictive capacity. Although the maximum distance was efficient in selecting spectra for WHC and FMI, and Mahalanobis distance was efficient for the others, the models developed only with these methods presented low predictive capacity, demonstrating that appropriate selection of mathematical pre-treatments is essential. A model with limited predictive capacity was obtained only for quantification of total collagen, probably due to the low variability presented in the samples used and the low sensitivity of the NIRS method for smaller constituents. For the other characteristics, the diet used generated enough variability to develop good models. The models developed with the “first and/or second derivatives” pre-treatments, alone or with “Savitzky-Golay” or “multiplicative scatter correction” smoothing methods, presented the highest RPD values, demonstrating themselves to be efficient chemometric tools for obtaining robust calibration models to determine tenderness characteristics of beef, in the band 1100 to 2500 nm, with PLS using between 2 and 5 factors. We concluded that NIRS can be used to replace conventional methods, being a fast and precise technique, as well as allowing simultaneous analysis of beef tenderness characteristics.

Keywords: myofibrillar fragmentation index, near infrared, PLS regression, shear force

1 INTRODUÇÃO

A qualidade da carne bovina é um conceito extremamente amplo, ligado a uma série de fatores agregados ao produto, como aspectos sensoriais (cor, suculência, sabor, odor, maciez), funcionais (pH, capacidade de retenção de água), nutricionais (teor de gordura, perfil dos ácidos graxos, porcentagem de proteínas, vitaminas e minerais), éticos (bem-estar animal), sociais (o não uso de mão de obra infantil e escrava), além de fatores relacionados à segurança dos alimentos (ausência de microrganismos patogênicos, ausência de resíduos de antibióticos ou outras substâncias contaminantes) e à preservação ambiental (produção sustentável) (BRIDI et al., 2011). A definição da qualidade de carne é, portanto, um exercício complexo porque o conceito é multifacetado.

Entretanto, no momento da aquisição da carne bovina, os principais atributos de qualidade são a cor e a quantidade de gordura e, no momento do consumo, a maciez é considerada a mais importante pela média dos consumidores (LEROY et al., 2003; LAWRIE, 2005), sendo que a satisfação em relação ao consumo é embasada na interação entre maciez, suculência e sabor (KOOHMARAIE et al., 2002).

A maciez pode ser atribuída à percepção sensorial (paladar) que o consumidor tem da carne, como: resistência à língua, à pressão do dente, aderência e resíduo pós-mastigatório, sendo, portanto, uma série de fatores fortemente subjetivos (MUCHENJE et al., 2009).

Durante o processo de produção da carne, alguns fatores provocam variação na suculência e no sabor, entretanto, vários aspectos estão envolvidos na variação da maciez, sendo considerados mais importantes os fatores *ante mortem* (declínio do pH durante o processo de transformação do músculo em carne, a genética, a alimentação, o sexo e a idade do animal ao abate); a gordura de cobertura e intramuscular (marmorização); o tecido conjuntivo (quantidade, localização, tamanho da fibra e tipo de ligação cruzada do colágeno); o estado de contração do músculo; as características da fibra muscular; o comprimento do sarcômero; a força iônica; a degradação das proteínas miofibrilares e os tratamentos *post mortem* (velocidade de resfriamento, a estimulação elétrica das carcaças durante o abate, o tempo de maturação e os métodos de cocção da

carne) (KOOHMARAIE, 1994; FELÍCIO, 1997; MONSON et al., 2004; DELGADO et al., 2006; MUCHENJE et al., 2009).

Logo após o abate do animal, tem início na musculatura estriada uma série de transformações bioquímicas e físicas que culminam no estabelecimento do *rigor mortis*, quando o músculo torna-se rígido e a sua extensibilidade torna-se nula. Este processo, denominado conversão do músculo em carne, prossegue com o aumento progressivo na maciez da carne, resultante da degradação enzimática das proteínas responsáveis por manter a estrutura e a integridade do tecido muscular (SAVELL et al., 2005; VOLPELLI et al., 2005).

Em condições normais, o pH do músculo decresce de aproximadamente 7,0, no animal vivo, para cerca de 5,3 a 5,8, após o abate de bovinos com taxa glicolítica normal (DRANSFIELD, 1992). A queda do pH ativa dois sistemas enzimáticos principais: as proteases neutras dependentes do cálcio (calpaínas) e as proteases lisossomais (catepsinas), que promovem a proteólise das proteínas miofibrilares, levando à fragmentação das miofibrilas e, conseqüentemente, tornando a carne mais macia (KOOHMARAIE et al., 2002).

À medida que a idade do animal avança, ocorre o aparecimento das ligações cruzadas intra e intermoleculares do colágeno, que se tornam irreversíveis e termoestáveis, o que diminui a solubilidade do colágeno, diminuindo o efeito da digestão enzimática ou do tratamento térmico, motivo pelo qual a carne de animais mais velhos tende a ser menos macia (NISHIMURA, 2010).

As catepsinas são enzimas importantes no processo de maturação, pois degradam tanto as proteínas miofibrilares (como as calpaínas o fazem), como também exercem ação sobre as proteínas do tecido conjuntivo, clivando o colágeno insolúvel em fragmentos solúveis, o que pode indicar um sinergismo entre os dois sistemas. Assim sendo, em carnes maturadas, a quantidade de colágeno solubilizado é maior que em carnes não maturadas (MONSÓN et al., 2004).

A maior capacidade de retenção da água (CRA) da carne pode estar relacionada com a crescente capacidade de ligação entre a miosina e a água à medida que o pH alcança valores superiores a 5,5 (ponto isoelétrico), além de ocorrer o aumento das forças eletrostáticas de repulsão entre as proteínas,

formando uma matriz miofibrilar menos compacta, facilitando a retenção das moléculas de água (BOND et al., 2004; LAWRIE, 2005). A CRA tem relação direta com o pH, com o grau de desnaturação proteica e, conseqüentemente, com a degradação proteolítica, que pode ser avaliada pelo índice de fragmentação miofibrilar (IFM), que é um método bastante utilizado para predizer a maciez da carne maturada (CULLER et al., 1978; HOPKINS et al., 2000).

Para determinar a maciez da carne bovina, podem-se utilizar métodos físicos, químicos ou sensoriais. Como método mecânico, pode-se citar a resistência ao cisalhamento ou força de corte da carne pelo método Warner-Bratzler (WBSF) como o mais utilizado (BELEW et al., 2003). Por sua vez, os métodos químicos estão ligados a análises laboratoriais, relacionando este atributo à quantificação de colágeno total e solúvel, capacidade de retenção de água, atividade enzimática, índice de fragmentação miofibrilar, entre outros. Entretanto, são métodos extremamente morosos, laboriosos, caros, destrutivos e que exigem a utilização de reagentes agressivos, associados a riscos aos analistas e ao meio ambiente.

Redução importante no tempo e no processamento das análises poderia ocorrer se fossem estabelecidos métodos rápidos e precisos para a rotina de determinações de propriedades de qualidade em carne bovina. Neste sentido, a espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIRS) tem se mostrado promissora (LEROY et al., 2003).

Como vantagens do NIRS sobre os métodos convencionais podem-se citar medidas frequentes e rápidas, entre 15 e 90 segundos por análise; pequena quantidade de amostra utilizada; preparação rápida e simples das amostras; determinação simultânea de diferentes atributos; além de possuir alta seletividade, baixo capital de investimento, baixos custos de operação, alta repetibilidade, instalação flexível e ser um método limpo, pois não é necessária a utilização de reagentes (ALOMAR et al., 2003; CEN & HE, 2007; PRIETO et al., 2009).

A parte do espectro eletromagnético situada entre 780 a 2.500 nm é denominada de infravermelho próximo (SOTELO, 2006). Nesta região, aparecem bandas relativas a ligações entre carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio, fazendo com que a técnica NIRS possa ser utilizada em um grande número de

aplicações (NATALINO, 2006). Além disso, a energia da radiação NIR é suficientemente pequena, permitindo a análise não destrutiva das amostras. Isso é importante porque quanto mais tratamentos forem utilizados na amostra, até se obter um resultado, maior será a introdução de erros na análise (SOTELO, 2006).

Ao longo dos anos, os resultados da espectroscopia NIRS para a previsão de características relacionadas à maciez da carne bovina tem sido inconsistentes para a força de cisalhamento, capacidade de retenção de água, pH, colágeno total e solúvel (RØDBOTTEN et al., 2000; LEROY et al., 2003; LIU et al., 2003), além de não terem sido encontrados estudos com o IFM. Portanto, são necessários melhores modelos de calibrações por NIRS para as características de maciez em carne bovina (PRIETO et al., 2009).

Uma vez que a carne é um alimento muito complexo, os métodos NIRS para medições de propriedades de qualidade em carne terão de ser calibrados com amostras que apresentem grande variação na composição. Sabe-se que os efeitos nutricionais da dieta interferem na estrutura e composição do músculo e, conseqüentemente, nas propriedades de qualidade da carne, como em sua maciez, por exemplo (BRIDI & CONSTANTINO, 2010).

Animais submetidos a dietas contendo milho e diferentes níveis de inclusão de farelo do mesocarpo do babaçu podem apresentar diferenças na composição da carne que, se relacionada à maciez, pode apresentar variabilidade adequada para o desenvolvimento de bons modelos de calibração por NIRS.

Diante do exposto, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de estabelecer quais métodos de seleção de espectros e pré-tratamentos matemáticos, juntamente com o método de regressão PLS, possibilitam a obtenção de modelos de calibração robustos para a determinação das características de maciez em carne bovina, no tocante a capacidade de retenção de água, colágeno total e solúvel, força de cisalhamento, índice de fragmentação miofibrilar e pH.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento dos modelos de calibração foram utilizados 25 novilhos mestiços leiteiros castrados com idade média inicial de 30 meses e peso médio de 371 kg. Os animais foram confinados na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins, Campus de Araguaína-TO, no ano de 2012. O período total do confinamento foi de 98 dias, com 14 dias de adaptação.

Os bovinos foram divididos em cinco tratamentos, cinco repetições em cada, com base no fornecimento de dietas contendo milho e inclusão de farelo do mesocarpo do babaçu (FMB) nas proporções de 0; 12; 24; 36 e 48% na matéria seca da dieta total, sendo que o percentual de milho nas dietas foi de 77,5; 65,0; 52,6; 36,0 e 29,5%, respectivamente.

Ao final do período experimental, os animais apresentaram um peso médio de 478,1 kg, sendo, então, abatidos em frigorífico sob Serviço de Inspeção Federal, localizado em Araguaína-TO. As carcaças foram resfriadas por 24 horas, em temperatura de 0°C a 2°C, e desossadas. Amostras retiradas do músculo *Longissimus dorsi* (entre a 10^a e 12^a costela) dos 25 animais, foram cortadas em bifes de 2,5 cm de espessura (aproximadamente 200 gramas cada bife), identificadas, embaladas em lâmina de filme de polietileno e papel pardo e transportadas congeladas ao Centro de Pesquisa em Alimentos, da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, onde permaneceram congeladas (-16°C) até a execução das análises físico-químicas e os procedimentos NIRS.

Para a construção dos modelos de calibração, foi utilizado um conjunto de amostras em que os analitos de interesse foram determinados por métodos de referência apropriados, descritos a seguir:

2.1 Análises físico-químicas

2.1.1 Capacidade de retenção de água

As análises foram realizadas em triplicata segundo o método proposto por HAMM (1960), em que se calcula a perda de água ao aplicar pressão sobre porções de carne.

Das amostras de carne, previamente descongeladas (4°C por 12 horas), foram cortados cubos de carne de aproximadamente 2 g, colocados entre dois papéis filtros e pressionados entre placas de acrílico com uma tensão de 10 quilogramas (duas anilhas de 5 kg em cima das placas de acrílico), em um período de 5 minutos. Posteriormente, a amostra foi pesada e a relação do peso inicial com o peso final foi dada em percentagem (%).

2.1.2 Força de cisalhamento

A avaliação da força de cisalhamento foi realizada conforme protocolo experimental descrito por WHEELER et al. (2005).

Os bifes foram assados em forno elétrico da marca VENÂNCIO, modelo FEP 90 SÉRIE ITÁLIA, com ajuste de temperatura (°C) e dotado de sistema de resistência elétrica na parte superior e inferior. O forno foi previamente ligado na posição máxima com a temperatura ajustada para manter a temperatura em aproximadamente 170°C.

Os bifes foram pesados, colocados dentro do forno pré-aquecido, e virados após atingir a temperatura de 40°C internamente. Neste momento, o controle de resistência da temperatura do forno foi ajustado para a posição mínimo, mantendo somente a resistência superior ligada. Quando os bifes atingiram a temperatura interna de 71°C, foram retirados do forno. O controle da temperatura interna dos bifes foi feita através de um termopar metálico, da marca TEXTO, modelo 0602.5792, inserido na região central do bife.

Imediatamente depois de retirados do forno, os bifes foram pesados novamente e então foram calculadas perdas por cozimento. Quando os bifes atingiram a temperatura ambiente foram embalados em sacos plásticos, com identificação, e levados para refrigerador a temperatura de 7°C por um período de 24 horas.

Após serem resfriados, foram retirados de cada bife seis cilindros de ½ polegada (aproximadamente 1,27 cm), paralelamente ao sentido das fibras musculares, utilizando um amostrador (*coring cutter*) acoplado a uma furadeira elétrica. Os cilindros não uniformes em diâmetro, ou que apresentaram partes com tecido conjuntivo aparente ou outros defeitos foram descartados. A força de cisalhamento foi medida utilizando o equipamento WARNER-BRATZLER MEAT SHEAR (G-R Manufacturing Co. Manhattan) modelo 235. O resultado foi registrado em kgf e o valor expresso pelas médias de cada tratamento.

2.1.3 Índice de fragmentação miofibrilar (IFM)

A técnica para estimar o índice de fragmentação miofibrilar, em duplicata, se baseou na metodologia de OLSON et al. (1976) e CULLER et al. (1978).

Para o preparo da solução tampão IFM, utilizou-se os seguintes reagentes:

KCl	14,91g;	KH ₂ PO ₄	2,72g;	K ₂ HPO ₄	3,50g;
EDTA	0,76g;	MgCl ₂	0,41g;	NaN ₃	0,13g.

Os reagentes foram dissolvidos em água destilada, tendo seu pH ajustado para 7,0 com a utilização de uma solução de NaOH (1M), em pHmetro Thermo Scientific, Orion 3 Star. A solução tampão foi transferida para um balão volumétrico de dois litros, tendo seu volume completado com água destilada. Depois de preparado, o tampão foi armazenado em frascos de vidro âmbar e refrigerado a 2°C.

Para o preparo do reagente de biureto, utilizaram-se os seguintes reagentes:

Sulfato de cobre pentahidratado - $\text{CuSO}_4 \cdot (5\text{H}_2\text{O})$3,0g
 Tartarato de Sódio e Potássio - $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot (4 \text{H}_2\text{O})$12,0g

Os reagentes, sulfato de cobre pentahidratado e tartarato de sódio e potássio foram dissolvidos em um litro de água destilada e transferidos quantitativamente para balão volumétrico de dois litros. Com constante agitação, adicionou-se 600 mL de uma solução de NaOH (10%) recém-preparada; completando o volume final do balão com água destilada. O reagente foi armazenado em frascos marrons de polietileno em temperatura ambiente, descartando-o caso aparecesse precipitado preto ou vermelho.

Para o preparo da solução padrão estoque de albumina sérica bovina (BSA), adicionou-se 0,416 g de BSA a 20 mL de água destilada (20 mg/mL), sem agitar, aguardou-se a solubilização da mesma em repouso, sendo posteriormente guardada sob refrigeração a 4°C.

A curva-padrão com BSA foi feita utilizando as seguintes concentrações de albumina: zero (branco), 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 mg/mL. Na Tabela 1 podem-se verificar as concentrações e os volumes da solução de BSA, água destilada e reagente de biureto adicionados a tubos de ensaio, necessários para a determinação da curva-padrão.

TABELA 1 – Curva padrão com Albumina Sérica Bovina (BSA)

Concentração BSA (mg/mL)	Volume da solução de BSA (mL)	Água destilada (mL)	Reagente de Biureto (mL)
0,0	0,000	1,000	4,0
0,5	0,025	0,975	4,0
1,0	0,050	0,950	4,0
1,5	0,075	0,925	4,0
2,0	0,100	0,900	4,0
2,5	0,125	0,875	4,0
5,0	0,250	0,750	4,0
7,5	0,375	0,625	4,0
10,0	0,500	0,500	4,0

A absorbância dos pontos da curva-padrão foi lida a 540nm, por espectrofotômetro UV/VIS 600S da marca FEMTO. O gráfico e a equação da curva-padrão foram obtidos através do programa Origin 5.0 (OriginLab,

Northampton, MA, EUA), utilizando os valores das concentrações de BSA e os valores encontrados de absorvância para cada concentração de BSA.

A extração das miofibrilas foi conduzida em duplicata. De cada amostra previamente descongelada (4°C por 12 horas), livre de gordura e tecido conjuntivo, e finamente picadas com auxílio de tesoura, foram retiradas 4g de tecido muscular. Tais porções foram colocadas em copos homogeneizadores de alumínio, adicionando-se a eles 40 mL de tampão IFM à temperatura de 2°C, sendo então homogeneizados por 30 segundos.

O conteúdo homogeneizado foi transferido para tubos de centrífuga Falcon de 50 mL; estes foram devidamente fechados e colocados em centrífuga refrigerada MEGAFUGE 16R, programada a 1.000 g (2°C) por 15 minutos.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o decantado foi ressuspenso com 40 mL de tampão IFM (2°C). O conteúdo foi misturado com ajuda de um bastão de vidro (sem agitar no vórtex) e novamente centrifugado a 1.000 g, em temperatura de 2°C por 15 minutos. Depois desta etapa, e com descarte do sobrenadante, o precipitado foi mais uma vez suspenso com 10 mL de tampão IFM a 2°C e agitado no vórtex até completa homogeneização. O material foi passado por uma peneira de polietileno para remoção de pedaços maiores e fragmentos de tecido conjuntivo. Nos tubos de centrífuga foram acrescentados 10 mL de tampão IFM (2°C), sendo os mesmos agitados para sua completa lavagem; o conteúdo restante do tubo foi passado através da peneira de polietileno.

Em tubos de ensaio foram pipetados 0,25 mL da solução de miofibrilas, 0,75 mL da solução tampão IFM (2°C) e 4 mL de reagente biureto. No tubo “branco” foram colocados 4 mL de reagente biureto e 1 mL de solução tampão (2°C). As soluções foram homogeneizadas em vórtex e colocadas em ambiente escuro por 30 minutos para que ocorresse a reação. Após o período de incubação, as absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro a 540nm.

Pôde-se então, determinar a concentração de proteína das suspensões de miofibrilas em mg/mL, colocando os valores das absorvâncias obtidas na equação da curva-padrão da BSA.

Na equação, o Y foi considerado o valor da absorbância e o X a quantidade de proteína necessária para se obter uma solução com 0,5 mg de proteína/mL em uma solução final de 8 mL.

A partir da fórmula $C1.V1 = C2.V2$, foi possível calcular o volume da alíquota a ser retirada da solução de miofibrilas para serem diluídas com tampão IFM, onde: C1 = concentração de 0,5 mg de proteína/mL; V1 = volume final da solução (8 mL); C2 = concentração de proteína na solução de miofibrilas necessária para se obter uma solução com 0,5mg de proteína/mL; V2 = volume de solução de miofibrilas necessário para que se obtenha uma concentração de 0,5 mg de proteína/mL.

De acordo com os cálculos, em tubos de ensaio foram colocadas quantidades apropriadas de solução de miofibrilas e solução tampão para fazer 8 mL de solução com 0,5 mg de proteína/mL. Os tubos foram agitados em vórtex com imediata leitura da absorbância das soluções a 540nm.

O índice de fragmentação miofibrilar (IFM) foi obtido pela seguinte equação: $IFM = 200 \cdot A_{540nm}$.

A constante 200 é utilizada para trazer os valores de absorbância a 540 nm (A_{540nm}) para uma faixa de 30 a 100, sendo esses valores denominados IFM.

2.1.4 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH das amostras foram determinados em duplicata conforme metodologia descrita em BRASIL (1999). As amostras foram descongeladas (4°C por 12 horas), trituradas e pesadas (cerca de 50 g). Depois, foram homogeneizadas com 20 mL de água recentemente fervida e posteriormente resfriada. O pH das amostras preparadas foram medidos por phmetro Thermo Scientific, Orion 3 Star, previamente calibrado com as soluções tampão pH 4 e 7.

2.1.5 Quantificação do colágeno total

O protocolo de análise na determinação do conteúdo de colágeno em amostras de carne seguiu metodologia reportada pela AOAC (1996), com pequenas modificações, e com a quantificação da hidroxiprolina sendo realizada segundo procedimento de NEUMAN & LOGAN (1950), modificado por BERGMAN & LOXLEY (1963).

As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente. Posteriormente, após remoção de vasos sanguíneos, gordura e o epimísio da peça muscular, foram trituradas e pesadas em triplicata cerca de 4 g em frascos Erlenmeyers de 125 mL devidamente identificados. Aos frascos contendo as amostras foram adicionados 30 mL de ácido sulfúrico (~ 7,0M), sendo então cobertos com vidro relógio e colocados em estufa a 105°C. O conjunto permaneceu hidrolisando por cerca de 16 horas. Decorrido este período, o hidrolisado foi retirado da estufa e transferido quantitativamente, ainda quente, para um balão volumétrico de 500 mL, sendo o frasco lavado cuidadosamente com água destilada. O volume do balão foi completado com água destilada. Parte da solução do hidrolisado diluído já resfriado a temperatura ambiente foi então filtrada por papel filtro quantitativo para frascos de 100 mL; sendo estabelecido um prazo de estabilidade para o filtrado de duas semanas desde que armazenados a 4°C.

Foi retirada uma alíquota do filtrado e diluída com água destilada em um balão volumétrico de 100 mL de forma a conter entre 1 e 5 µg/mL de hidroxiprolina em solução. O fator de diluição varia de acordo com a quantidade de colágeno na amostra, dependendo também do tipo de músculo usado. Assim, uma diluição de 20 mL do filtrado em 100 mL de água destilada foi o suficiente.

Para a quantificação da hidroxiprolina, foram pipetados uma alíquota de 2 mL da diluição de cada amostra em tubos de ensaio de 10 mL, utilizando um tubo-controle contendo água destilada em substituição à amostra. A cada tubo foi adicionado 1 mL de uma solução oxidante, preparada por diluição de 10 mL de solução-estoque de cloramina T em 40 mL de tampão citrato, sendo misturados por agitador de tubos tipo vórtex e deixados em repouso por exatos 20 minutos à temperatura ambiente.

Após o repouso, foi adicionado a cada tubo 1 mL da solução de Ehrlich, misturando-se bem a solução em agitador tipo vórtex. Os tubos foram cobertos com papel alumínio, colocados imediatamente em banho-maria a 60°C por exatos 15 minutos, e resfriados em água corrente por pelo menos três minutos.

A absorbância das amostras foi lida a 558nm, por espectrofotômetro 600S da marca FEMTO, utilizando o controle como branco.

Para se obter a curva-padrão, foram preparadas concentrações-padrão de hidroxiprolina diluindo-se uma solução de hidroxiprolina (6 µg/mL) em tubos de ensaio de 10 mL nas porções indicadas na Tabela 2.

TABELA 2 – Preparo das concentrações-padrão de hidroxiprolina para obtenção de curva-padrão

Concentração ¹	0,6	1,2	1,8	2,4	3,0
Solução de Hidroxiprolina	1	2	3	4	5
Água	9	8	7	6	5
HyPro ²	1,2	2,4	3,6	4,8	6,0

¹Concentração (µg/mL) de hidroxiprolina no tubo. ²Quantidade (µg) de hidroxiprolina nos 2 mL de solução analisada (cubeta). A absorbância medida deve ser representada graficamente (eixo-y) em razão destes valores (eixo-x)

De cada tubo, foram retirados uma alíquota de 2 mL seguindo-se posteriormente as mesmas etapas descritas na quantificação de hidroxiprolina. Com os resultados lidos pelo espectrofotômetro de UV-VIS e através do programa Origin 5.0 (OriginLab, Northampton, MA, EUA), construiu-se o gráfico (µg de hidroxiprolina x Absorbância), fez-se a regressão linear dos dados obtendo a equação da reta. Com a equação da reta, obtida pela curva-padrão, a quantidade de hidroxiprolina na cubeta (*h*) pôde ser calculada.

De acordo com as diluições feitas, a concentração de hidroxiprolina na amostra (*H*) pode ser obtida pela seguinte fórmula:

$$H = 10^{-4} \cdot \frac{h \cdot V_a \cdot V_d}{2 \cdot v \cdot P_a} \quad [\text{g de hidroxiprolina}/100\text{g de amostra}]$$

Em que: *H*= quantidade de hidroxiprolina na amostra (g/100g); *h*= quantidade de hidroxiprolina na cubeta (µg), calculada pela curva-padrão; *V_d*=

volume de diluição do hidrolisado; v = alíquota do filtrado, retirada para diluição (mL); V_a = volume de diluição da alíquota v (mL); P_a = peso da amostra (g).

Determinando-se a quantidade de hidroxiprolina na amostra (H), através da equação anterior, é possível calcular a concentração de colágeno na amostra pela fórmula:

$$\text{Colágeno} = H \cdot f_c \quad [\text{g de colágeno}/100\text{g de amostra}].$$

Onde f_c = fator de conversão de hidroxiprolina em colágeno.

O fator de 7,25, sugerido por GOLL et al. (1963) é o mais empregado, já que de acordo com estes autores, o fator foi corrigido de acordo com a quantidade de elastina presente, uma vez que no músculo a razão entre conteúdo de colágeno e elastina é de 3:1 e considerando que a molécula de colágeno contém 13,3% de hidroxiprolina.

2.1.6 Quantificação do colágeno solúvel

As análises foram realizadas conforme a metodologia reportada pela AOAC (1996), com pequenas modificações, e com a quantificação da hidroxiprolina sendo realizada seguindo procedimento de NEUMAN & LOGAN (1950), modificado por BERGMAN & LOXLEY (1963).

As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente. Posteriormente, após remoção de vasos sanguíneos, gordura e o epimísio da peça muscular, as amostras cárneas foram trituradas e pesadas em triplicata (cerca de 4 g) em tubos de centrifuga de 50 mL. Adicionou-se ao conteúdo 12 mL de uma solução de extração (solução de Ringer com $\frac{1}{4}$ de força iônica), misturado com uma espátula. Os tubos foram colocados em banho-maria a 77°C por 70 minutos em constante agitação.

Depois, os tubos foram resfriados em água fria e centrifugados em centrífuga refrigerada MEGAFUGE 16R, a 3.000 g (4°C) por 10 minutos. Decorrido este processo, o sobrenadante gerado foi transferido para tubos de autoclave com tampa de teflon. O resíduo foi ressuscitado com 8 mL da solução de extração e novamente centrifugado a 3.000 g (4°C / 10 minutos). O novo

sobrenadante foi transferido para o tubo contendo o primeiro sobrenadante e o resíduo foi repassado, quantitativamente, lavando cuidadosamente o tubo de centrífuga com 5 mL da solução de extração por pelo menos duas vezes, para outro tubo de autoclave.

Foram adicionados ao tubo de resíduo 10 mL de uma solução HCl (6M) e 20 mL no tubo do sobrenadante. Tanto os tubos de sobrenadante quanto os de resíduo foram devidamente fechados e submetidos a hidrólise em estufa a 105°C por cerca de 18 horas. As amostras foram então removidas da estufa e esfriadas a temperatura ambiente.

Em cada tubo foi adicionado 1 g de carvão ativado ao hidrolisado, misturando-se rigorosamente por alguns segundos, em agitador de tubos tipo vórtex. A mistura foi filtrada em papel-filtro quantitativo para frascos erlenmeyer de boca larga de 250 mL. O papel-filtro foi lavado por pelo menos três vezes com 50 mL de água destilada. Ao filtrado presente nos frascos foi acrescentada uma gota de indicador vermelho de metila sendo submetidos a titulação com solução de NaOH 2 M até que o hidrolisado mudasse da cor rósea para amarela (pH entre 6,0 e 7,0, conferido com papel indicador). O neutralizado foi novamente filtrado em balão volumétrico cujo volume permitisse uma diluição da amostra de forma a conter entre 1 e 5 µg/mL de hidroxiprolina em solução. Após alguns testes foi possível estabelecer a diluição correta. O sobrenadante foi diluído com água destilada em balão de 200 mL e o resíduo em balão de 500 mL. Entretanto, mesmo com esta diluição, o resíduo apresentou alta concentração, sendo necessária nova diluição, para isso, uma alíquota de 50 mL do filtrado diluído foi retirada do balão de 500 mL e repassada para balão de 100 mL tendo seu volume completado com água destilada.

Para a quantificação da hidroxiprolina, foram pipetados uma alíquota de 2 mL da diluição de cada amostra em tubos de ensaio de 10 mL, utilizando um tubo-controle contendo água destilada em substituição à amostra. A cada tubo foi adicionado 1 mL de uma solução oxidante, preparada por diluição de 10 mL de solução-estoque de cloramina T em 40 mL de tampão citrato, sendo misturados por agitador de tubos tipo vórtex e deixados em repouso por exatos 20 minutos à temperatura ambiente.

Após o repouso, foi adicionado a cada tubo 1 mL da solução de Ehrlich, misturando-se bem a solução em agitador tipo vórtex. Os tubos foram cobertos com papel alumínio, colocados imediatamente em banho-maria a 60°C por exatos 15 minutos, e resfriados em água corrente por pelo menos três minutos.

A absorvância das amostras foi lida a 558nm, por espectrofotômetro 600S da marca FEMTO, utilizando o controle como branco.

Para a obtenção da curva-padrão, procedeu-se conforme descrito para a quantificação do colágeno total (Tabela 2).

Com a equação da reta foi calculada a quantidade de hidroxiprolina na cubeta (h) e baseando-se nas diluições ocorridas pode-se obter a concentração de hidroxiprolina na amostra com a fórmula a seguir:

$$H = 10^{-4} \cdot \frac{h \cdot V_d}{2 P_a} \quad [\text{g de hidroxiprolina}/100\text{g de amostra}]$$

Em que: H = quantidade de hidroxiprolina na amostra (g/100g); h = quantidade de hidroxiprolina na cubeta (μg); V_d = volume de diluição após neutralização (mL); P_a = peso da amostra (g)

Com a quantidade de hidroxiprolina na amostra (H) calculou-se a concentração de cada fração do colágeno na amostra, ou seja, colágeno solúvel e insolúvel, pela fórmula demonstrada abaixo:

$$\text{Colágeno} = H \cdot f_c \quad [\text{g de colágeno}/100\text{g de amostra}]$$

Onde f_c = fator de conversão de hidroxiprolina em colágeno

Para muitos autores o fator f_c considera dois valores, um para fração solúvel e outro para a insolúvel. De acordo com CROSS et al. (1973), foi empregado o fator de 7,25 apenas para a fração insolúvel (resíduo) e o fator de 7,52 para a fração solúvel (sobrenadante). Logo, considerando as equações acima, o percentual de cada fração de colágeno na amostra pode ser calculado desta forma:

$$\% \text{Colágeno}_{\text{Fração}} = 0,5 \times 10^{-4} \cdot \frac{h \cdot V_d}{P_a} \cdot f_c$$

2.1.7 Análise estatística

Foram calculados a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação das amostras utilizadas, além da análise de variância e a comparação entre médias dos tratamentos utilizados nos conjuntos de calibração e validação pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Todos os cálculos estatísticos foram implementados no sistema computacional SAS (Statistical Analysis System), por meio de seu procedimento IML (Interactive Matrix Language) (SAS INSTITUTE, 2002).

2.2 Procedimentos NIRS

2.2.1 Obtenção dos espectros

As amostras dos 25 animais foram descongeladas durante a noite em geladeira, armazenadas em sacos plásticos para prevenir a perda de água por evaporação e, antes de realizar os procedimentos para a obtenção dos espectros, foram mantidas por uma hora em temperatura ambiente, para diminuir as interferências da temperatura nos espectros, conforme metodologia utilizada por ALOMAR et al. (2003); ANDRÉS et al. (2007) e ANDRÉS et al. (2008). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de infravermelho próximo (NIRS) da Perstorp Analytical Company, modelo 6500 (Silver Spring, MD, EUA) equipado com detector de reflectância, na faixa de 1.100 a 2.500 nm, em intervalos de 2 nm, utilizando célula coarse com janela de quartzo.

Antes das leituras espectrais, as amostras foram moídas e homogeneizadas em multiprocessador de alimentos e também compactadas ao serem colocadas na célula para leitura espectral, visando eliminar problemas de leitura surgidos pelo efeito de superfície.

Para eliminar ruídos aleatórios (ruídos da rede elétrica, por exemplo) as medidas no aparelho foram realizadas 32 vezes para cada amostra, sendo obtido e armazenado o espectro médio. Para garantir que variações extremas de

temperatura não interferissem na coleta dos espectros, o equipamento foi mantido em uma sala climatizada com temperatura de aproximadamente 25°C.

Para cada amostra, foram armazenados espectros em três repetições (em torno de 20 segundos para cada leitura), sendo coletados da seguinte maneira: (1) procedeu-se a primeira leitura e o espectro foi armazenado; (2) posteriormente, a amostra foi retirada da célula, misturada com o restante da mesma amostra e então colocada novamente na célula para a coleta de outro espectro por NIRS e; (3) repetiu-se o mesmo procedimento para a coleta do terceiro espectro. Esse procedimento foi realizado na coleta dos espectros das 25 amostras, obtendo 75 espectros no total para o conjunto de calibração. Desta maneira, considerou-se a maior quantidade possível de informações de cada amostra. Os espectros armazenados foram posteriormente submetidos aos tratamentos quimiométricos.

2.2.2 Definição do método de seleção de espectros e pré-tratamentos matemáticos

Inicialmente, para cada características de maciez da carne bovina (capacidade de retenção de água, colágeno total e solúvel, força de cisalhamento, índice de fragmentação miofibrilar e pH), foram desenvolvidos modelos para definir o método de seleção de espectros mais adequado. Nesta etapa, foram obtidos dois modelos para cada característica, um com a “distância de Mahalanobis” e outro com a “máxima distância”, pois tanto um método como o outro poderia ser adequado a um grupo de amostras, dependendo das características da mesma. Essa avaliação só foi possível após uma simulação com os métodos.

Para a escolha do melhor método de seleção, foi considerado como critério inicial o maior “coeficiente de determinação” (R^2), e caso se mostrassem próximos, o critério inicial baseou-se nos menores valores de “erro padrão de calibração” (SEC). Já o número apropriado de fatores (variáveis latentes), foi selecionado automaticamente pelo *software* VISION, versão 3.1 (FOSS NIRSystems, Silver Spring, MD, EUA), em função do menor valor de PRESS.

Posteriormente, foram desenvolvidos modelos de calibração utilizando o método de seleção de espectros mais adequado para cada característica analisada, juntamente com os pré-tratamentos disponíveis no *software* VISION, versão 3.1 (FOSS NIRSystems, Silver Spring, MD, EUA): 1ª derivada, 2ª derivada, variável normal padronizada (SNV); correção da linha de base; eliminação de tendências; Savitzky-Golay; correção multiplicativa de sinal (MSC).

Com a utilização de derivadas, não só os sinais espectrais, como também os ruídos, podem se tornar acentuados (BRAGA & POPPI, 2004). Por este motivo, também foram desenvolvidos modelos utilizando os métodos de alisamento “Savitzky-Golay” e “correção multiplicativa de sinal” juntamente com a primeira e segunda derivadas.

O método de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) é considerado o mais robusto para a modelagem quimiométrica de dados espectrais das concentrações de nutrientes da carne e de outros produtos alimentícios (BAJWA et al., 2009). Então, para o desenvolvimento de todos os modelos, além do método de seleção de espectros e pré-tratamentos matemáticos, foram utilizados o método de regressão PLS e a informação contida na faixa de 1.100 a 2.500 nm. Assim sendo, para cada uma das seis propriedades de avaliação de maciez analisadas neste trabalho, foram desenvolvidos 13 modelos de calibração, descritos no Quadro 1, totalizando 78 equações.

De todos os modelos desenvolvidos, devido ao grande volume de dados, foram considerados nos resultados apenas equações com “coeficientes de determinação” (R^2) considerados na literatura (SHENK & WESTERHAUS, 1996) com boa (R^2 entre 0,69 e 0,89) ou excelente capacidade preditiva (R^2 igual ou superior a 0,90).

QUADRO 1 – Métodos utilizados para o desenvolvimento de modelos de calibração por NIRS para a determinação de cada característica de maciez em carne bovina, utilizando o método PLS e a faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm

Método	R ²	SEC ^{IV}	Fatores	Outliers
Distância de Mahalanobis (DM)				
Máxima Distância (MD)				
DM ou MD ^I com 1 ^a derivada				
DM ou MD ^I com 2 ^a derivada				
DM ou MD ^I com SNV ^{II}				
DM ou MD ^I com correção da linha de base				
DM ou MD ^I com detrend				
DM ou MD ^I com Savitzky-Golay				
DM ou MD ^I com MSC ^{III}				
DM ou MD ^I com Savitzky-Golay e 1 ^a derivada				
DM ou MD ^I com Savitzky-Golay e 2 ^a derivada				
DM ou MD ^I com MSC e 1 ^a derivada				
DM ou MD ^I com MSC e 2 ^a derivada				

I = O método de seleção de espectros mais adequado para cada característica foi utilizado com os pré-tratamentos matemáticos, na sequência descrita no Quadro; II = variável normal padronizada; III = correção multiplicativa de sinal; IV = Erro-padrão de calibração.

2.2.3 Validação externa

A capacidade preditiva dos modelos de calibração foi avaliada por validação externa, utilizando-se amostras de cinco novilhos mestiços leiteiros castrados, que não fizeram parte do conjunto de calibração. Esses animais foram alimentados com dieta padrão, à base de milho e soja, confinados no mesmo local, pelo mesmo período e abatidos sob as mesmas condições dos animais utilizados para a obtenção dos conjuntos de calibração.

As amostras provenientes desses animais foram submetidas aos mesmos procedimentos das amostras do conjunto de calibração, quanto à coleta, condições de armazenamento, análises físico-químicas e procedimentos por NIRS. Assim, 15 espectros formaram o conjunto de validação.

As amostras do conjunto de validação foram preditas por modelos de calibração considerados com boa ou excelente capacidade preditiva, obtendo-se valores de “erro padrão de validação” (SEP). Posteriormente, a acurácia de cada

um desses modelos de calibração foi determinada através da “relação de desempenho do desvio” (RPD), obtido pela relação entre o desvio padrão dos dados obtidos por análise convencional (referência) e o erro padrão da validação externa. O RPD é considerado o melhor parâmetro para estimar a qualidade dos modelos de calibração NIRS (WILLIAM & NORRIS, 1987; PRIETO et al., 2013), pois fornece padronização do erro padrão da previsão e torna possível a comparação de diferentes propriedades (WILLIAMS & SOBERING, 1993).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O intervalo, a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação das amostras utilizadas no conjunto de calibração estão apresentados na Tabela 3, além do nível de significância entre as amostras do conjunto de calibração e do conjunto teste (validação externa).

TABELA 3 - Intervalo, média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) de características de maciez das amostras de carnes bovinas utilizadas no conjunto de calibração

Característica	Intervalo	Média	DP	CV (%)	NS*
CRA (%)	21,43-29,48	26,85	1,83	6,81	p>0,05
Colágeno total (%)	2,15-4,32	3,04	0,52	17,00	p>0,05
Colágeno solúvel (%)	4,60-9,76	7,49	1,35	17,95	p>0,05
IFM	75,0-152,4	118,60	21,2	17,88	p>0,05
Força de cisalhamento (kgf)	3,40-9,58	5,73	1,54	26,85	p>0,05
pH	5,11-5,95	5,42	0,19	3,43	p>0,05

*NS = Nível de significância entre as amostras do conjunto de calibração e conjunto de validação

Embora não tenham sido observadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os animais dos tratamentos do conjunto de calibração e de validação, submetidos a dietas à base de milho e contendo inclusão do farelo do mesocarpo do babaçu em até 48%, as diferentes dietas fornecidas na terminação dos bovinos possibilitaram variabilidade nas características de maciez, que apresentaram intervalos de 8,05%; 2,17%; 5,16%; 77,4; 6,18 kgf e 0,84, respectivamente (Tabela 3). Esses intervalos de valores foram adequados para modelar as características importantes das propriedades, tornando possível o desenvolvimento de bons modelos de calibração por NIRS.

Correlação negativa moderada foi encontrada entre o colágeno total e o colágeno solúvel (Tabela 4), mantendo a convicção de que a quantidade de colágeno é importante na determinação da maciez da carne. Baixas correlações negativas foram encontradas entre o colágeno total e as características força de cisalhamento e pH, além de baixas correlações positivas entre colágeno solúvel e índice de fragmentação miofibrilar (IFM) e pH. A correlação entre as

características de maciez poderá ser útil para o desenvolvimento de modelos de calibração por NIRS, que poderão apresentar respostas espectrais similares.

TABELA 4 - Correlação entre os atributos de maciez da carne bovina

	CRA	Colágeno total	Colágeno solúvel	IFM	Força de cisalhamento
Colágeno total	-0,17				
Colágeno solúvel	0,13	-0,53			
IFM	-0,01	-0,11	0,34		
Força de cisalhamento	0,17	-0,28	-0,07	-0,13	
pH	-0,02	-0,32	0,36	0,12	-0,14

Os 78 modelos de calibração desenvolvidos para todos as características de maciez da carne bovina podem ser visualizados nas Tabelas do APÊNDICE 2.

Os modelos desenvolvidos apenas com os métodos de seleção de espectros, sem a utilização de pré-tratamentos, foram considerados com baixa capacidade preditiva para todos as características analisadas, apresentando valores de R^2 entre 0,01 e 0,40. No entanto, são necessários para eliminar espectros anômalos (*outliers*), com informações não correlacionadas com o analito de interesse, permitindo o aperfeiçoamento dos modelos de calibração com a aplicação de pré-tratamentos matemáticos. Porém, dos sete pré-tratamentos testados, quatro, utilizados isoladamente, não se mostraram úteis para nenhuma das características analisadas, apresentando baixos valores de R^2 : “variável normal padronizada” (entre 0,07 e 0,58); “correção da linha de base” (entre 0,06 e 0,39); “eliminação de tendências” (detrend) (entre 0,01 e 0,45) e “correção multiplicativa de sinal” (MSC) (entre 0,06 e 0,57).

O pré-tratamento “Savitzky-Golay”, utilizado isoladamente, “a primeira e segunda derivadas”, utilizadas isoladamente ou com os métodos de alisamento “Savitzky-Golay” e MSC, foram importantes na determinação de pelo menos uma propriedade de maciez da carne bovina por NIRS, já que 19 modelos de calibração (24,36% do total) foram considerados com boa (R^2 entre 0,72 e 0,88) ou excelente capacidade preditiva (R^2 entre 0,91 e 0,99), conforme resultados apresentados na Tabela 5.

TABELA 5 - Modelos de calibração multivariada por NIRS considerados com boa ou excelente capacidade preditiva para a determinação de características de maciez em carne bovina, desenvolvidos com o método PLS na faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm

Característica	Modelo (nº)	Método de seleção	Pré-tratamentos	R ²	SEC ^{II}	Fatores	Outliers	SEP ^{III}	RPD ^{IV}
Capacidade de retenção de água	1	Máxima distância	1ª derivada	0,83	0,823	5	2	0,938	1,95
	2		2ª derivada	0,94	0,836	4	7	0,936	1,96
	3		MSC ^I e 1ª derivada	0,79	0,816	5	2	0,936	1,96
	4		MSC e 2ª derivada	0,95	1,154	4	9	0,940	1,95
Colágeno total	5	Distância de Mahalanobis	MSC e 2ª derivada	0,77	0,397	2	11	0,642	0,81
Colágeno solúvel	6	Distância de Mahalanobis	2ª derivada	0,93	0,745	3	9	0,604	2,24
	7		Savitzky-Golay	0,88	0,643	4	6	0,486	2,78
	8		Savitzky-Golay e 1ª derivada	0,72	0,838	2	6	0,590	2,29
	9		Savitzky-Golay e 2ª derivada	0,83	0,730	3	6	0,485	2,78
	10		MSC e 1ª derivada	0,91	0,832	5	9	0,581	2,32
Força de cisalhamento	11	Distância de Mahalanobis	MSC e 1ª derivada	0,73	0,895	4	9	0,391	3,94
	12	Distância de Mahalanobis	MSC e 2ª derivada	0,85	0,848	2	11	0,508	3,03
Índice de fragmentação miofibrilar	13	Máxima distância	1ª derivada	0,91	6,77	6	2	11,43	1,85
	14		2ª derivada	0,95	10,77	2	7	11,27	1,88
	15		Savitzky-Golay e 1ª derivada	0,99	12,17	6	7	12,52	1,69
	16		Savitzky-Golay e 2ª derivada	0,75	15,36	2	10	12,03	1,76
	17		MSC e 1ª derivada	0,91	8,77	6	2	10,72	1,98
	18		MSC e 2ª derivada	0,86	12,26	2	9	10,14	2,09
pH	19	Distância de Mahalanobis	Savitzky-Golay e 2ª derivada	0,91	0,110	4	6	0,044	4,32

I = correção multiplicativa de sinal; II = erro-padrão de calibração; III = erro-padrão de validação; IV = relação de desempenho do desvio.

Para a determinação da capacidade de retenção de água (CRA) em carne bovina, modelos considerados com boa e excelente capacidade preditiva foram obtidos com a “máxima distância”, com os pré-tratamentos matemáticos “primeira e segunda derivadas”, utilizadas isoladamente e com o método de alisamento “correção multiplicativa de sinal” (MSC), utilizando o método de regressão PLS na faixa de 1.100 a 2.500 nm.

Os modelos desenvolvidos com a “segunda derivada” (2 e 4, Tabela 5) apresentaram maiores valores de “coeficientes de determinação” (R^2) do que os desenvolvidos com a “primeira derivada” (1 e 3), demonstrando que para a calibração, a eliminação do desvio e da inclinação da linha de base se mostraram mais adequadas do que apenas a regularização do desvio da linha da base. O maior valor de R^2 foi obtido com o método de alisamento MSC e “segunda derivada” (modelo 4). Entretanto, esse modelo gerou maior valor de “erro padrão de calibração” (SEC) que o desenvolvido apenas com a “segunda derivada” (modelo 2).

Maior valor de R^2 significa maior correlação com os valores da reta obtida (ZENI, 2005), indicando maior ajuste entre os dois métodos, NIRS e o de referência. No entanto, o SEC, que tem como função comparar diferentes calibrações geradas a partir de um mesmo grupo de dados, indicando a incerteza da calibração (DAVIES & GRANT, 1987), aumentou com a utilização do MSC com a “segunda derivada”. Além disso, o método de alisamento MSC com a “primeira derivada” (modelo 3), apresentou menor valor de R^2 que o modelo desenvolvido apenas com a “primeira derivada” (modelo 1). Deste modo, o método MSC, na tentativa de minimizar o efeito do espalhamento de luz, pode ter deixado de modelar informações importantes, correlacionadas com a propriedade de interesse.

A exclusão de amostras anômalas é necessária para a melhoria da qualidade da calibração. Entretanto, a supressão de uma grande quantidade de amostras *outliers* resulta na diminuição da representatividade (PASQUINI, 2003), o que pode ter ocorrido no modelo 4, que pode ter eliminado do conjunto informações não encontradas nos outros dados.

Os modelos para CRA foram considerados adequados utilizando quatro ou cinco fatores (Tabela 5). A seleção do número de fatores é importante

porque o modelo deve descrever as fontes significativas de variância sem armazenar informação desnecessária ou não correlacionada com a propriedade medida. Quanto maior o número de fatores, menor o desvio da reta de calibração, ou seja, maior é o valor de R^2 . Porém, se fossem utilizados mais fatores que o indicado pelo *software*, através dos menores valores de PRESS, poderia ocorrer a obtenção de modelos sobre-ajustados (FERRÃO & DAVANZO, 2005), isto é, a regressão encontrada considera dados que não estão realmente correlacionados, como por exemplo, ruídos, erros sistemáticos, etc (FERRÃO et al., 2004). Por outro lado, se fosse utilizado um menor número de fatores, poderia ocorrer o efeito denominado de ajustamento inferior (CARNEIRO, 2008), em que informações importantes não seriam modeladas.

Na avaliação do ajuste do modelo de calibração, o método ideal de predição é aquele que minimiza o “erro padrão de validação” (SEP). Valores de SEP muito superiores aos de “erro padrão de calibração” (SEC) indicam modelos sobre-ajustados (FERRÃO et al., 2004). Na tabela 5, pode-se observar que o maior valor de SEP foi obtido no modelo com o maior valor de “coeficiente de determinação” (R^2), demonstrando que foram consideradas na calibração informações não relacionadas ao analito de interesse. Entretanto, os resultados de SEP dos quatro modelos foram próximos.

Além disso, pelo fato dos valores de SEP e de “relação de desempenho do desvio” (RPD) serem inversamente proporcionais, considera-se que quanto maior o valor de RPD, melhor é o ajuste do modelo, ou seja, maior é a habilidade de previsão da calibração (FUJIMOTO et al., 2008). Assim sendo, os quatro modelos para capacidade de retenção de água (CRA) apresentaram acurácia similar, por apresentarem valores de RPD semelhantes, mas pode-se considerar que os melhores resultados foram obtidos com o modelo 2 (Tabela 5), que embora tenha apresentado o mesmo valor de RPD que o modelo 3, apresentou maior valor de R^2 utilizando menos fatores.

No que diz respeito ao desenvolvimento de modelos de calibração por NIRS, a maioria dos autores demonstrou que o NIRS tem capacidade de predição limitada ($R^2 = 0,001-0,58$; RPD = 0,49-1,46) para estimar a CRA por perda por pressão na carne suína (BRØNDUM et al., 2000; CHAN et al., 2002), por perda por gotejamento na carne suína (GEESINK et al., 2003; HOVING-BOLINK et al.,

2005; SAVENIJE et al., 2006) e bovina (DE MARCHI et al., 2007) e por perda por cozimento na carne bovina (LEROY et al., 2003; ANDRÉS et al., 2008; PRIETO et al., 2008).

São escassos os trabalhos por NIRS que utilizaram as perdas por pressão como método convencional para a determinação da CRA em carne bovina. RIPOLL et al. (2008), utilizaram amostras do músculo *Longissimus thoracis* de 190 bovinos, previamente triturados, apresentando valores de CRA entre 21,17 e 29,17%. Os autores, por validação externa, encontraram bons valores de R^2 (0,86), SEC (1,502) e RPD = 1,76; utilizando a “distância de Mahalanobis”, a “1ª derivada” e a regressão por mínimos quadrados parciais modificada (MPLS) com quatro fatores.

Entretanto, os autores utilizaram a regressão MPLS, que é frequentemente mais estável e precisa do que o PLS, por padronizar os resultados obtidos entre o método de referência e os dados de reflectância para cada comprimento de onda, considerando o valor de um desvio padrão para cada termo da regressão (MARCHÃO et al., 2011). Além disso, utilizaram a faixa visível/infravermelho próximo (408 a 2492.8 nm), pois, segundo eles, BRØNDUM et al. (2000) encontraram maiores coeficientes de correlação para a perda por gotejamento na faixa visível do espectro eletromagnético do que por NIRS. Portanto, não se sabe exatamente a contribuição da região do infravermelho próximo para a obtenção do bom modelo de calibração desenvolvido por RIPOLL et al. (2008).

Os resultados do presente estudo foram superiores aos de RIPOLL et al. (2008), demonstrando que bons modelos para a determinação da CRA por NIRS podem ser desenvolvidos utilizando apenas a região do infravermelho próximo, podendo ser otimizados por métodos de regressão considerados mais precisos.

A “distância de Mahalanobis” se mostrou mais eficiente que a “máxima distância” na seleção de espectros para o desenvolvimento de modelos de calibração para a quantificação de colágeno total e colágeno solúvel (Tabela 5).

Para o conteúdo de colágeno total, o modelo desenvolvido com os pré-tratamentos “correção multiplicativa de sinal” (MSC) e “segunda derivada” foi o único com valor de R^2 considerado com boa capacidade preditiva.

A principal desvantagem da utilização de derivadas é que o ruído, presente nos espectros, pode ter seu valor potencializado, o que diminui a relação sinal/ruído (BRAGA & POPPI, 2004). Desta forma, o modelo desenvolvido apenas com a “segunda derivada” apresentou baixos valores de “coeficientes de determinação” (R^2) (0,53) e “erro padrão de calibração” (SEC) (0,424), mas o método de alisamento “correção multiplicativa de sinal” (MSC), que realiza um ajuste aditivo e multiplicativo, reduzindo o ruído, ao ser aplicado com a “segunda derivada” possibilitou ao modelo 5 bom valor de R^2 . Ainda assim, a regressão considerou dados que não estão realmente correlacionados com a propriedade de interesse, uma vez que o valor de “erro padrão de validação” (SEP) foi muito superior ao de SEC, resultando em baixo valor de “relação de desempenho do desvio” (RPD), o que indica baixa capacidade preditiva do modelo.

Não foram encontrados estudos com as condições do modelo 5, mas outros autores demonstraram baixa capacidade preditiva nos modelos desenvolvidos com a “segunda derivada”. ALOMAR et al. (2003), encontraram $R^2 = 0,18$ e $RPD = 1,1$ na análise de 72 espectros dos músculos *Longissimus thoracis et lumborum*, *Supraspinatus* e *Semitendinosus* triturados, utilizando o método MPLS, com 1 fator, na faixa visível/infravermelho próximo (400 a 2.500 nm), em 2 nm de intervalo. PRIETO et al. (2006), sob condições semelhantes às do presente trabalho (segunda derivada, método PLS com quatro fatores, na faixa de 1.100 a 2.500 nm, com 2 nm de intervalo) encontraram $R^2 = 0,47$ e $RPD = 1,26$, em amostras trituradas do músculo *Longissimus thoracis* de 53 bovinos.

Já DE MARCHI et al. (2007), analisando amostras trituradas do músculo *Longissimus thoracis* de 148 bovinos, obtendo os espectros na faixa de 1.110-2498 nm, com 2 nm de intervalo, utilizando o método MPLS, derivadas e tratamentos para correções espectrais (não especificados), encontraram maiores valores de R^2 (0,56) e RPD (1,74) que os estudos de ALOMAR et al. (2003) e PRIETO et al. (2006).

Embora os autores citados tenham encontrado valores de RPD superiores ao obtido pelo presente estudo, todos utilizaram a validação cruzada para verificar o desempenho dos modelos, ou seja, foram utilizadas amostras removidas do conjunto de calibração, o que, conseqüentemente, possibilita maior capacidade do modelo em prever os valores que na análise por validação

externa, que utiliza um conjunto de teste separado e diferente do conjunto de calibração. No entanto, a validação externa fornece resultados muito mais confiáveis para a habilidade de previsão de um modelo.

A baixa previsibilidade para a determinação do colágeno total deve ter ocorrido pelo fato do NIRS apresentar baixa sensibilidade para constituintes menores (BUNING-PFAUE et al., 2003). O colágeno é uma glicoproteína que integra de forma predominante as matrizes extracelulares (LISENMAYER, 1991). Suas moléculas são compostas por tríplexes cadeias polipeptídicas, que assumem um arranjo helicoidal, possuindo uma sequência repetitiva lógica de aminoácidos Glicina- X-Y e que se estende por 1000 resíduos de aminoácidos, onde o “X” frequentemente é a prolina e o “Y” a 4-hidroxi prolina (BAILEY, 1991). Desses, a hidroxiprolina se destaca por ser um aminoácido exclusivo do colágeno, por isso é utilizada para estabelecer a quantidade de colágeno presente na carne e derivados. Assim, bons modelos por NIRS seriam desenvolvidos se detectassem os movimentos vibracionais da hidroxiprolina.

Além disso, os espectros do colágeno são muito semelhantes aos espectros das proteínas miofibrilares, que estão presentes no músculo em concentrações 10 vezes mais elevadas do que o colágeno, o que reduz as previsões por NIRS (DOWNEY & HILDRUM, 2004). Também, a baixa confiabilidade do método de referência (colorimétrica), para tecidos de baixo conteúdo de colágeno, como é o caso da carne (ETHERINGTON & SIMS, 1981) e a falta de variabilidade no teor de colágeno nas amostras de carne dificultam o desenvolvimento de modelos (ALOMAR et al., 2003). As dietas utilizadas no presente trabalho possibilitaram coeficiente de variação de 17%, o que pode ter sido suficiente para a obtenção do valor de R^2 superior aos demais.

Já para a quantificação de colágeno solúvel, três modelos foram considerados com boa capacidade preditiva (7, 8 e 9; Tabela 5) e dois modelos com excelente capacidade preditiva (6 e 10), sendo todos considerados robustos, por apresentarem altos valores de “relação de desempenho do desvio” (RPD).

Embora os modelos desenvolvidos com a “segunda derivada” e com a “correção multiplicativa de sinal” (MSC) mais a “primeira derivada” tenham apresentado maiores valores de “coeficientes de determinação” (R^2), os modelos desenvolvidos com o método de alisamento “Savitzky-Golay” apresentaram maior

acurácia, por gerarem menores valores de “erro padrão de validação” (SEP) e, conseqüentemente, maiores valores de “relação de desempenho do desvio” (RPD).

A utilização do método “Savitzky-Golay” foi adequada por eliminar ruídos, aumentando a relação sinal-ruído, sem que houvesse a perda de informação importante, como pode ter ocorrido com a utilização de outros tratamentos.

YOUNG et al. (1996) também encontraram melhores valores de “coeficientes de determinação” (R^2) para colágeno solúvel (entre 0,50 e 0,83) do que para colágeno total (R^2 de 0,29). Ainda que a literatura não apresente explicações para isso, a correlação com o índice de fragmentação miofibrilar (IFM) (0,34) e com o pH (0,36) (Tabela 4) pode ter sido determinante para a obtenção dos bons modelos do presente trabalho.

Para a determinação da força de cisalhamento por NIRS, a “distância de Mahalanobis”, juntamente com o método “correção multiplicativa de sinal” (MSC) e a aplicação de derivadas, possibilitaram o desenvolvimento de modelos de calibração com excelente capacidade preditiva (valores de RPD > 3,0; Tabela 5). O método de suavização MSC, nesse caso, produziu efeitos importantes em relação aos modelos desenvolvidos com primeira e segunda derivadas (apresentaram $R^2 = 0,04$ e $0,55$; SEC = 1,486 e 1,163; respectivamente), provavelmente, por diminuir o ruído e melhorar a sua linearidade (NAES et al., 2002).

Se fossem analisados apenas os dados de calibração, o modelo 12 (Tabela 5) seria mais adequado, mas testando a acurácia dos modelos, o modelo 11 se mostrou mais robusto na predição dos resultados do conjunto externo, demonstrando a importância de avaliar os modelos de calibração por NIRS em todos os seus aspectos.

Os primeiros estudos para a determinação por NIRS da força de cisalhamento foram desenvolvidos sem a utilização de pré-tratamentos matemáticos, o que justifica os baixos valores de R^2 (0,61) e RPD (1,3) encontrados por BYRNE et al. (1998), utilizando o método PLS com 7 fatores. Além da ausência de pré-tratamentos, utilizaram a faixa de 750 a 1.098 nm, que pode ter contribuído no desenvolvimento do modelo com menor habilidade de

previsão, já que a região de 780 a 1.100 nm apresenta excesso de ruídos e baixa relação sinal/ruído nos detectores NIRS, quando comparada com a faixa de 1.100 a 2.500 nm (FRANKHUIZEN, 2001).

Mesmo sem aplicar pré-tratamentos, PARK et al. (1998), avaliando porções intactas do músculo *Longissimus thoracis* de 80 animais na faixa de 1.100 a 2.498 nm, com 2 nm de intervalo, encontraram valores superiores ($R^2 = 0,67$; RPD = 1,64 com o método PLS com seis fatores) aos de BYRNE et al. (1998). Segundo os autores, com esse modelo de calibração, 97,3% das amostras do conjunto de validação foram preditas com resíduos (valor obtido pelo método de referência – valor obtido pelo método NIRS) de até 3 kgf e que utilizando um sistema de classificação por maciez, 79% das amostras teriam a mesma classificação que a obtida pelo método Warner-Bratzler (WBSF). Por isso, concluíram que a espectroscopia no infravermelho próximo permitia a predição da força de cisalhamento na carne bovina em substituição ao WBSF.

No presente estudo, o maior resíduo foi de 2,2 kgf e 80% das amostras do conjunto de validação foram preditas com resíduos de até 1,3 kgf, demonstrando a robustez do modelo desenvolvido.

Mesmo utilizando pré-tratamentos matemáticos e a validação cruzada, os modelos relatados na literatura apresentaram resultados inferiores aos desenvolvidos no presente trabalho para a determinação de força de cisalhamento.

LEROY et al. (2003) utilizaram um conjunto de 189 espectros na calibração, coletados no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos (amostra intacta). Os modelos foram desenvolvidos na faixa entre 935 e 2.327 nm, com o método PLS, distância de Mahalanobis e os pré-tratamentos: “correção da linha de base”, “correção multiplicativa de sinal” (MSC), “variável normal padronizada” (SNV), primeira e segunda derivadas. Nos resultados, os autores não relataram quais pré-tratamentos foram utilizados no melhor modelo, mas encontraram R^2 de 0,12 (utilizando 6 fatores com RPD de 1,17) e 0,19 (utilizando 10 fatores com RPD de 1,24).

ANDRÉS et al. (2008) utilizaram um conjunto de 120 espectros, sendo coletados em porções intactas do músculo *Longissimus thoracis et lumborum* de 30 bovinos. Os modelos foram desenvolvidos na faixa de 400 a 2.498 nm, em

intervalos de 2 nm, com método de seleção de espectros, regressão PLS e os pré-tratamentos SNV, MSC, primeira e segunda derivadas. Nos resultados, os autores não relataram qual método de seleção e pré-tratamentos foram utilizados, mostrando apenas que o melhor modelo apresentou “coeficiente de determinação” (R^2) de 0,65, “erro padrão de calibração” (SEC) de 2,30, “relação de desempenho do desvio” (RPD) de 1,46, utilizando 5 fatores.

PRIETO et al. (2008) utilizaram amostras do músculo *Longissimus thoracis* de 53 bovinos adultos e de 67 novilhos, previamente trituradas e homogeneizadas. Utilizando a faixa de 1.100 a 2.500 nm, com intervalos de 2 nm e o método de regressão PLS, com cinco fatores, o pré-tratamento MSC foi o mais adequado na obtenção do modelo para animais adultos, apresentando $R^2 = 0,45$, SEC = 0,95 e RPD = 1,18. Para novilhos, a “segunda derivada”, com dois fatores, foi a que gerou melhor modelo, apresentando $R^2 = 0,17$, SEC = 1,60 e RPD = 1,07.

Utilizando a validação externa, RIPOLL et al. (2008), analisando amostras do músculo *Longissimus thoracis* de 190 bovinos, previamente trituradas, em modelo desenvolvido na faixa de 1.108–2.492,8 nm, com a distância de Mahalanobis, os pré-tratamentos SNV, detrend e 1ª derivada, com a regressão por mínimos quadrados parciais modificada (MPLS), utilizando cinco fatores, encontraram resultados superiores aos dos estudos citados ($R^2 = 0,74$; SEC = 0,663; RPD = 1,44), mas com valor de RPD 173,6% inferior ao obtido pelo modelo 11 (Tabela 5), demonstrando a robustez e a acurácia do modelo desenvolvido no presente trabalho para a determinação da força de cisalhamento em carne bovina.

O coeficiente de variação encontrado no presente trabalho para a força de cisalhamento (26,85%) (Tabela 3) pode ter sido determinante para o desenvolvimento dos bons modelos de calibração. LEROY et al. (2003), apesar de não terem apresentado os valores de coeficiente de variação, justificaram que os baixos valores de R^2 foram obtidos pelo fato das amostras apresentarem baixa variabilidade na força de cisalhamento, pois foram escolhidas aleatoriamente e não selecionadas por valores de WBSF. MEULEMANS et al. (2003) não divulgaram os valores para força de cisalhamento, explicando que os modelos não foram confiáveis por apresentarem intervalos estreitos nos valores de

referência. Por outro lado, RIPOLL et al. (2008), explicaram que o alto coeficiente de variação (cerca de 31%) foi que proporcionou um bom modelo de previsão no seu estudo.

TØGERSEN et al. (2003), PREVOLNIK et al. (2005), BARLOCCO et al. (2006) e GAITÁN-JURADO et al. (2008), demonstraram que os analitos em amostras trituradas podem ser mais precisamente previstos por NIRS do que em tecidos intactos, muito provavelmente porque amostras moídas são mais homogêneas. Além disso, em amostras de carne intactas, as fibras musculares ou miofibrilas podem atuar como fibras ópticas que tendem a conduzir a luz ao longo do seu comprimento por uma série de reflexões internas, além de absorver mais energia, tendo menos reflectância quando comparado com músculos homogeneizados.

O presente estudo corrobora essa tese, já que obteve modelo com previsibilidade superior às encontradas por LEROY et al. (2003) e ANDRÉS et al. (2008), que utilizaram pré-tratamentos matemáticos, mas em amostras intactas. Recentemente, com os mesmos tratamentos do modelo 11 (Tabela 5), porém aplicando diretamente a sonda de fibra óptica na superfície da carcaça, utilizando a faixa visível/infravermelho próximo (350-1.800 nm), DE MARCHI et al. (2013), encontraram baixos valores de R^2 (0,08) e RPD (1,02), demonstrando que mais estudos devem ser realizados para a obtenção de bons modelos em amostras intactas.

Outro fator que diminui a capacidade preditiva dos modelos é a grande variação entre as medidas de força de cisalhamento de subamostras em uma única peça de carne, indicando que o desempenho do NIRS pudesse ser melhorado se a falta de precisão nos dados de referência fosse evitada (CHAN et al., 2002). No entanto, BARLOCCO et al. (2006) explicam que isto é difícil de ser evitado quando o método Warner-Bratzler é utilizado como método de referência. No presente trabalho, para as oito porções analisadas nas amostras de cada bovino, foram encontrados coeficientes de variação entre 6,20 e 30,16%. Depreende-se, que é possível encontrar resultados ainda mais robustos por NIRS para a predição da força de cisalhamento em carne bovina, se houvesse maior precisão dos resultados pelo método de referência.

Assim como nos modelos desenvolvidos para a capacidade de retenção de água, a “máxima distância” foi mais adequada que a “distância de Mahalanobis” na seleção de espectros para a determinação do índice de fragmentação miofibrilar (IFM). Analisando a Tabela 5, dois modelos apresentaram valores de “coeficientes de determinação” (R^2) considerados com boa capacidade preditiva (16 e 18) e quatro modelos com excelente capacidade preditiva (13, 14, 15 e 17). Menor capacidade preditiva foi observada nos modelos em que ocorreram maiores exclusões de amostras *outliers*, podendo ter havido a perda de informações espectrais importantes.

O modelo desenvolvido com a “máxima distância”, os pré-tratamentos “Savitzky-Golay” e “1ª derivada”, com o método PLS com seis fatores, na faixa de 1.100 a 2.500 nm, apresentou altíssimo valor de R^2 (0,99), mas também foi o que apresentou maior valor de “erro padrão de validação” (SEP), e assim, menor valor de “relação de desempenho do desvio” (RPD), o que demonstra ter considerado informações não correlacionadas com a propriedade de interesse no conjunto de calibração e, conseqüentemente, menor habilidade de predição do IFM das amostras da validação externa.

Os modelos desenvolvidos com a utilização de “correção multiplicativa de sinal” (MSC) e aplicação de derivadas apresentaram os menores valores de SEP, gerando altos valores de RPD, principalmente com a utilização da “segunda derivada” (modelo 18, Tabela 5). Além disso, é interessante notar que os modelos desenvolvidos com a “primeira derivada” apresentaram maiores valores de R^2 e menores valores de “erro padrão de calibração” (SEC) que os respectivos modelos desenvolvidos com a “segunda derivada” (comparações entre os modelos 13 e 14, 15 e 16, 17 e 18). Porém, com a “primeira derivada”, utilizou-se mais fatores, obteve-se maiores valores de SEP, e assim, menores valores de RPD, demonstrando que a “segunda derivada” deve ter modelado informações desnecessárias para o ajuste das amostras de calibração, mas necessárias na determinação de IFM das amostras do conjunto de validação.

A correlação do IFM com o colágeno solúvel (0,34) (Tabela 4) pode ter sido importante para a alta previsibilidade NIRS.

Não foram encontrados estudos avaliando o IFM por NIRS, mas através dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se afirmar que a

reflectância no infravermelho próximo pode prever com confiabilidade os resultados de IFM na carne bovina. A alta capacidade preditiva NIRS para a determinação de IFM demonstra que a técnica é sensível à degradação física ou enzimática das proteínas da estrutura muscular, sendo importante na avaliação da maciez da carne, já que CULLER et al. (1978), propuseram que o índice de fragmentação miofibrilar explica mais que 50% da variação da maciez na carne, e que o IFM tinha um efeito mais importante na maciez que a solubilidade do colágeno ou o comprimento do sarcômero.

Quanto à obtenção dos modelos de calibração para a determinação de pH, um método espectroscópico não irá medir o pH diretamente como é o caso de eletrodos sensíveis a íons H^+ . O espectrofotômetro, trabalhando na região do infravermelho próximo, registrará diferenças nos padrões de absorção devido às mudanças nas forças intermoleculares ou mudanças estruturais na carne em diferentes níveis de pH (ANDERSEN et al., 1999).

O modelo desenvolvido com a “distância de Mahalanobis”, “Savitzky-Golay” e “2ª derivada”, com o método PLS utilizando quatro fatores, na faixa de 1.100 a 2.500 nm (Tabela 5) apresentou valor de “coeficiente de determinação” (R^2) considerado de excelente capacidade preditiva, além de apresentar alto valor de “relação de desempenho do desvio” (RPD), demonstrando a habilidade do modelo em prever o valor de pH nas amostras do conjunto externo.

A relação entre os valores determinados por este modelo e os valores das amostras do conjunto de calibração, obtidos pela análise de referência (pHmetro), é mostrada na Figura 1A. Por este modelo, todos os resultados das amostras do conjunto de validação foram previstos dentro de 0,15 unidade de pH (Figura 1B), demonstrando ser um modelo robusto para medições de pH.

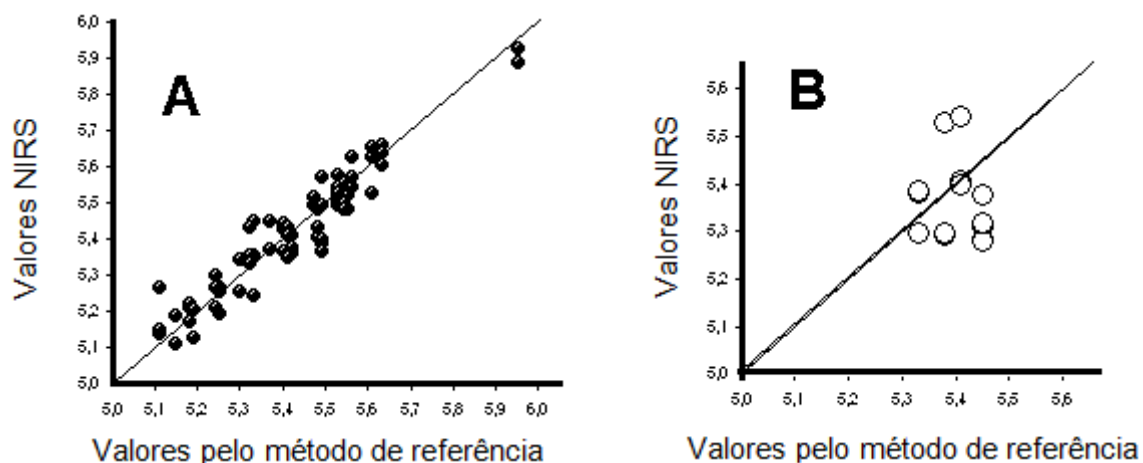


FIGURA 1 - Relação entre os valores determinados pelo NIRS e os valores de referência da determinação de pH das amostras dos conjuntos de calibração (A) e de validação (B)

Poucos estudos foram realizados em bovinos com a reflectância no infravermelho próximo na faixa de 1.100 a 2.500 nm. PRIETO et al. (2008), analisaram amostras do músculo *Longissimus thoracis* de 53 bovinos, encontrando como melhores resultados R^2 de 0,41, SEC de 0,06 e RPD de 1,12, utilizando cinco fatores e a “segunda derivada”. Já na análise de músculo *Longissimus thoracis* de novilhos, encontraram R^2 de 0,47, SEC de 0,07 e RPD de 1,26, utilizando três fatores, sem a utilização de pré-tratamentos. Como os autores não desenvolveram modelos utilizando o método “Savitzky-Golay”, pode ter sido a suavização dos espectros realizada pelo método o diferencial para os excelentes resultados obtidos pelo presente trabalho.

ANDRÉS et al. (2008) utilizaram amostras do músculo *Longissimus thoracis et lumborum* de 30 bovinos apresentando valores de pH entre 5,50 e 6,67, com coeficiente de variação de 5,53%. Os espectros foram coletados na faixa de 400 a 2.498 nm, em intervalos de 2 nm, com método de seleção de espectros, método PLS e os pré-tratamentos “variável normal padronizada” (SNV), “correção multiplicativa de sinal” (MSC), primeira e segunda derivadas. Os autores não relataram quais pré-tratamentos foram utilizados, mostrando apenas que o melhor modelo apresentou R^2 de 0,97, SEC de 0,06, utilizando três fatores. Encontraram alto valor de RPD (3,17) na validação cruzada, porém, abaixo do obtido pelo presente trabalho com validação externa, que fornece resultados mais confiáveis para a habilidade de previsão de um modelo.

ANDRÉS et al. (2008) explicaram que a ampla gama de dados de referência e a boa repetibilidade do método convencional foram preponderantes para o bom modelo desenvolvido por eles. É justamente a falta de variabilidade (valores de pH entre 5,2 e 5,8) a principal justificativa em muitos estudos que não obtiveram equações de calibração satisfatórias em carne bovina (PAGE et al., 2001; PRIETO et al., 2008; DE MARCHI et al., 2013), suína (MEULEMANS et al., 2003; LIAO et al., 2010) e de frango (BERZAGHI et al., 2005; DE MARCHI et al., 2011).

O intervalo e o coeficiente de variação das amostras utilizadas no presente trabalho, embora tenham sido menores que os obtidos por ANDRÉS et al. (2008), possibilitaram ao modelo desenvolvido boa previsibilidade por NIRS, podendo ser uma alternativa ao método convencional, o que seria interessante, já que os eletrodos de vidro para a determinação de pH apresentam problemas, como a rápida deterioração do desempenho do eletrodo, causada pelas proteínas da carne, as dificuldades de padronização para análises a campo e do risco de quebra (ANDERSEN et al., 1999).

4 CONCLUSÕES

A adequada seleção dos pré-tratamentos matemáticos é imprescindível para que os modelos de calibração possam apresentar habilidade de previsão na determinação das características de maciez da carne bovina.

A “segunda derivada” isoladamente ou com os métodos de alisamento “Savitzky-Golay” ou “correção multiplicativa de sinal” (MSC) possibilitam aos modelos os maiores valores de “relação de desempenho do desvio” (RPD), demonstrando ser ferramentas quimiométricas eficientes para a obtenção de modelos de calibração robustos para as determinações de capacidade de retenção de água, colágeno solúvel, índice de fragmentação miofibrilar e pH, utilizando a faixa de 1.100 a 2.500 nm, com o método PLS.

O método de alisamento MSC com a aplicação de primeira ou segunda derivada, utilizando o método PLS na faixa de 1.100 a 2.500 nm, permite a obtenção de modelos com alta capacidade preditiva para a determinação da força de cisalhamento em carne bovina.

A espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo é uma alternativa aos métodos convencionais, permitindo a determinação simultânea, rápida e precisa das características de maciez da carne bovina.

REFERÊNCIAS

1. ALOMAR, D.; GALLO, C.; CASTANEDA, M.; FUCHSLOCHER, R. Chemical and discriminant analysis of bovine meat by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). **Meat Science**, v. 63, n. 4, p. 441–450, 2003.
2. ANDERSEN, J.R.; BORGGAARD, C.; RASMUSSEN, A.J.; HOUMOLLER, L.P. Optical measurements of pH in meat. **Meat Science**, v. 53, n. 2, p. 135–141, 1999.
3. ANDRÉS, S.; MURRAY, I.; NAVAJAS, E.A.; FISHER, A.V.; LAMBE, N.R.; BUNGER, L. Prediction of sensory characteristics of lamb meat samples by near infrared reflectance spectroscopy. **Meat Science**, v. 76, n. 3, p. 509–516, 2007.
4. ANDRÉS, S.; SILVA, A.; SOARES-PEREIRA, A.L.; MARTINS, C.; BRUNO-SOARES, A.M.; Murray, I. The use of visible and near infrared reflectance spectroscopy to predict beef M. *Longissimus thoracis et lumborum* quality attributes. **Meat Science**, v. 78, n. 3, p. 217–224, 2008.
5. AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 16.ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1996.
6. BAILEY, A.J. Procter memorial lecture collagen-nature's framework in the medical, food collagen and leather industries. **Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists**, v. 76, p. 111-127, 1991.
7. BAJWA, S.G.; KANDASWAMY, J.; APPLE, J.K. Spectroscopic evaluation of the nutrient value of ground beef patties. **Journal of Food Engineering**, v. 92, n. 4, p. 454–460, 2009.
8. BARLOCCO, N.; VADELL, A.; BALLESTEROS, F.; GALIETTA, G.; COZZOLINO, D. Predicting intramuscular fat, moisture and Warner–Bratzler shear force in pork muscle using near infrared reflectance spectroscopy. **Animal Science**, v. 82, n. 1, p. 111–116, 2006.
9. BELEW, J.B.; BROOKS, J.C.; MCKENNA, D.R.; SAVELL, J.W. Warner-Bratzler shear evaluations of 40 bovine muscles. **Meat Science**, v. 64, n. 4, p. 507-512, 2003.
10. BERGMAN, I.; LOXLEY, R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. **Analytical Chemistry**, v. 35, n. 2, p. 1961–1965, 1963.
11. BERZAGHI, P.; DALLA ZOTTE, A.; JANSSON, L. M.; ANDRIGHETTO, I. Near-infrared reflectance spectroscopy as a method to predict chemical

- composition of breast meat and discriminate between different n-3 feeding sources. **Poultry Science**, v. 84, n. 1, p. 128–136, 2005.
12. BOND, J.J.; CAN, A.B.; WARNER, R.D. The effect of exercise stress, adrenaline injection and electrical stimulation on changes in quality attributes and proteins in *Semimembranosus* muscle of lamb. **Meat Science**, v. 68, n. 3, p. 469-477, 2004.
 13. BRAGA, J.W.B.; POPPI, R.J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 1004-1011, 2004.
 14. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 20, 21 jul. 1999. Oficializa os Métodos Analíticos Físico-Químicos, para Controle de Produtos Cárneos e seus Ingredientes - Sal e Salmoura. **Diário Oficial da União**, Brasília, 27 jul. 1999. Seção 1.
 15. BRIDI, A.M.; CONSTANTINO, C. Material didático: **Qualidade e Avaliação de Carcaças e Carnes Bovinas**. In: Universidade Estadual de Londrina, 2010. Disponível em: <http://www.uel.br/grupopesquisa/gpac/pages/arquivos/texto%20palestra%20maringa%2010.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2013.
 16. BRIDI, A.M.; CONSTANTINO, C.; TARSITANO, M.A. Material didático: **Qualidade da carne de bovinos produzidos em pasto**. In: Universidade Estadual de Londrina, 2011. Disponível em: <http://www.uel.br/grupopesquisa/gpac/pages/arquivos/Qualidade%20da%20Carne%20de%20Bovinos%20Produzidos%20em%20Pasto.pdf>. Acesso em: 14 dez. 2013.
 17. BRØNDUM, J.; MUNCK, L.; HENCKEL, P.; KARLSSON, A.; TORNBERG, E.; ENGELSEN, S. B. Prediction of water-holding capacity and composition of porcine meat by comparative spectroscopy. **Meat Science**, v. 55, n. 2, p. 177–185, 2000.
 18. BÜNING-PFAUE, H. Analysis of water in food by near infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 82, n. 1, p. 107-115, 2003.
 19. BYRNE, C.E.; DOWNEY, G.; TROY, D.J.; BUCKLEY, D.J. Non-destructive prediction of selected quality attributes of beef by near-infrared reflectance spectroscopy between 750 and 1098 nm. **Meat Science**, v. 49, n. 4, p. 399–409, 1998.
 20. CARNEIRO, M.E. **Classificação de lâminas de madeira de *pinus spp* por espectroscopia óptica**. 2008. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

21. CEN, H.; HE, Y. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n, 2, p. 72–83, 2007.
22. CHAN, D.E.; WALKER, P.N.; MILLS, E.W. Prediction of pork quality characteristics using visible and near-infrared spectroscopy. **American Society of Agricultural Engineers**, v. 45, n. 5, p. 1519–1527, 2002.
23. CROSS, H.R.; CARPENTER, Z.L.; SMITH, G.C. Effects of intramuscular collagen and elastin on bovine muscle tenderness. **Journal of Food Science**, v. 38, n. 6, p. 998–1003, 1973.
24. CULLER R.D.; PARRISH, F.C.; SMITH, G.C.; CROSS, H.R. Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical and sensory characteristics of bovine *longissimus* muscle. **Journal of Food Science**, v. 43, n. 4, p. 1177-80, 1978.
25. DAVIES, A.M.C.; GRANT A. Review: Near infra-red analysis of food. **International Journal of Food Science and Technoly**, v. 22, p. 191–207, 1987.
26. DE MARCHI, M.; BERZAGHI, P.; BOUKHA, A.; MIRISOLA, M.; GALLO, L. Use of near infrared spectroscopy for assessment of beef quality traits. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 421–423, 2007.
27. DE MARCHI, M.; PENASA, M.; BATTAGIN, M.; ZANETTI, E.; PULICI, C; CASSANDRO, M. Feasibility of the direct application of near-infrared reflectance spectroscopy on intact chicken breasts to predict meat color and physical traits. **Poultry Science**, v. 90, n. 7, p. 1594–1599, 2011.
28. DE MARCHI, M. On-line prediction of beef quality traits using near infrared spectroscopy. **Meat Science**, v. 94, n. 4, p. 455-460, 2013.
29. DELGADO, E.F.; AGUIAR, A.P.; ORTEGA, E.M.M.; SPOTO, M.H.F.; CASTILLO, C.J.C. Brazilian consumers perception of tenderness of beef steaks classified by shear force and taste. **Scientia Agricola**, v. 63, n. 3, p. 232-239, 2006.
30. DOWNEY, G.; HILDRUM, K.I. Analysis of meats. In: AL-AMOODI, L.; CRAIG, R.; WORKMAN, J.; REEVES, J. (Eds.), **Near-infrared spectroscopy in agriculture**. Madison: American Society of Agronomy Inc., Crop Science Society of America Inc., Soil Science Society of America Inc. 2004. p. 599-632.
31. DRANSFIELD, E. Modelling post-mortem tenderisation-III: Role of calpain I in conditioning. **Meat Science**, v. 31, n. 1, p. 85-94, 1992.
32. ETHERINGTON, D.J.; SIMS, T.J. Detection and Estimation of Collagen. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 32, n. 6, p. 539–546, 1981.

33. FELICIO, E.P. Fatores *ante e post mortem* que influenciam na qualidade da carne bovina. In: PEIXOTO, A. M.; MOURA, J. C.; FARIA, V. P. **Produção de Novilho de Corte**. 1.ed. Piracicaba: FEALQ. 1997. p. 79-97.
34. FERRÃO, M.F.; CARVALHO, C.W.; MÜLLER, E.I.; DAVANZO, C.U. Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha de trigo empregando NIR-PLS e DRIFT-PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 333-340, 2004.
35. FERRÃO, M.F.; DAVANZO, C.U. Horizontal attenuated total reflection applied to simultaneous determination of ash and protein contents in commercial wheat flour. **Analytica Chimica Acta**, v. 440, n. 2, p. 411-415, 2005.
36. FRANKHUIZEN, R. NIR analysis of dairy products. In: BURNS, A.D.; CIURCZAK, E.W. (eds). **Handbook of near infrared analysis**. New York: Marcel Dekker, 2001. p. 399-534.
37. FUJIMOTO, T.; KURATA, Y.; MATSUMOTO K.; TSUSHIKAWA, S. Application of near infrared spectroscopy for estimating wood mechanical properties of small clear and full length lumber specimens. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 16, p. 529-537, 2008.
38. GAITAN-JURADO, A.J.; ORTIZ-SOMOVILLA, V.; ESPANA-ESPANA, F.; PEREZ-APARICIO, J.; DE PEDRO-SANZ, E.J. Quantitative analysis of pork dry-cured sausages to quality control by NIR spectroscopy. **Meat Science**, v. 78, n. 4, p. 391-399, 2008.
39. GEESINK, G.H.; SCHREUTELKAMP, F.H.; FRANKHUIZEN, R.; VEDDER, H.W.; FABER, N.M.; KRANEN, R.W.; GERRITZEN, M.A. Prediction of pork quality attributes from near infrared reflectance spectra. **Meat Science**, v. 65, n. 1, p.661-668, 2003.
40. GOLL, D.E.; HOEKSTRA, W.G.; BRAY, R.W. Age-associated changes in muscle composition. The isolation and properties of a collagenous residue from bovine muscle. **Journal of Food Science**, v. 28, n. 5, p. 503-509, 1963.
41. HAMM, R. Biochemistry of meat hydration. **Advances in food research**, v. 10, n. 2, p. 335-443, 1960.
42. HOPKINS, D.L.; LITTLEFIELD, P.J.; THOMPSON, J.M. A research note on factors affecting the determination of myofibrillar fragmentation. **Meat Science**, v. 56, n. 1, p. 19-22, 2000.
43. HOVING-BOLINK, A.H.; VEDDER, H.W.; MERKS, J.W.M.; DE KLEIN, W.J.H.; REIMERT, H.G.M.; FRANKHUIZENE, R. Perspective of NIRS measurements early post mortem for prediction of pork quality. **Meat Science**, v. 69, n. 3, p. 417-423, 2005.

44. KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat aging. **Meat Science**, v. 36, n. 3, p. 93-104. 1994.
45. KOOHMARAIE, M.; KENT, M.P.; SHACKELFORD, S.D.; VEISETH, E.; WHEELER, T.L. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? **Meat Science**, v. 62, n. 3, p. 345-352, 2002.
46. LAWRIE, R.A. **Ciência da carne**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 384 p.
47. LEROY, B.; LAMBOTTE, S.; DOTREPPE, O.; LECOCQ, H.; ISTASSE, L.; CLINQUART, A. Prediction of technological and organoleptic properties of beef longissimus thoracis from near-infrared reflectance and transmission spectra. **Meat Science**, v. 66, n. 1, p. 45–54, 2003.
48. LIAO, Y.T.; FAN, Y.X.; CHENG, F. On-line prediction of fresh pork quality using visible/near-infrared reflectance spectroscopy. **Meat Science**, v. 86, n. 4, p. 901–907, 2010.
49. LIENMAYER, T.F. Collagen. In: HAY, E.D. (ed). **Cell biology and extracellular matrix**. London: Plenum Press, 1991. p. 7-44.
50. LIU, Y.; LYON, B.G.; WINDHAM, W.R.; REALINI, C.E.; PRINGLE, T.D.D.; DUCKETT, S. Prediction of color, texture, and sensory characteristics of beef steaks by visible and near infrared reflectance spectroscopy. A feasibility study. **Meat Science**, v. 65, n. 3, p. 1107–1115, 2003.
51. MARCHÃO, R.L.; BECQUER, T.; BRUNET, D. **Predição dos teores de carbono e nitrogênio do solo utilizando espectroscopia de infravermelho próximo**. EMPRAPA: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 304, 2011. 21 p.
52. MEULEMANS, A.; DOTREPPE, O.; LEROY, B.; ISTASSE, L.; CLINQUART, A. Prediction of organoleptic and technological characteristics of pork meat by near infrared spectroscopy. **Sciences des Aliments**, v. 23, p. 159–162, 2003.
53. MONSÓN, F.; SAÑUDO, C.; SURRE, I. Influence of cattle breed and ageing time on textural meat quality. **Meat Science**, v. 68, n. 4, p.565-602, 2004.
54. MUCHENJE, V.; DZAMA, K.; CHIMONYO, M.; STRYDOM, P.E.; HUGO, A.; RAATS, J.C. Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: a review. **Food Chemistry**, v. 112, n. 2, p. 279-289, 2009.
55. NAES, T.; ISAKSSON, T.; FEARN, T.; DAVIES, T. **A user-friendly guide to multivariate calibration and classification**. Chichester: NIR Publications, 2002. 344 p.
56. NATALINO, R. **Caracterização de açúcar mascavo aplicando análise das componentes principais a dados espectrométricos**. 2006. 52 f.

Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

57. NEUMAN, R.E.; LOGAN, M.A. The determination of collagen and elastin in tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 186, p. 549–556, 1950.
58. NISHIMURA, T. The role of intramuscular connective tissue in meat texture. **Animal Science Journal**, v. 81, n.1, p. 21-27, 2010.
59. OLSON, D.G.; PARRISH, F.C.; STROMER, M.H. Myofibril fragmentation and shear resistance of three bovine muscles during postmortem storage. **Journal of Food Science**, v. 41, n. 5, p. 1036-41, 1976.
60. PAGE, K.; WULF, D.M.; SCHWOTZER, T.R. A survey of beef muscle color and pH. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 3, p. 678-687, 2001.
61. PARK, B.; CHEN, Y.R.; HRUSCHKA, H.R.; SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M. Near-infrared reflectance analysis for predicting beef longissimus tenderness. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 8, p. 2115-2120, 1998.
62. PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals practical aspects and analytical applications. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198-219, 2003.
63. PREVOLNIK, M.; CANDEK-POTOKAR, M.; ŠKORJANC, D.; VELIKONJA-BOLTA, S.; ŠKRLEP, M.Z.; NIDARŠIĆ, T. Predicting intramuscular fat content in pork and beef by near infrared spectroscopy. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 13, n. 2, p. 77–85, 2005.
64. PRIETO, N.; ANDRÉS, S.; GIRALDEZ, F.J.; MANTECON, A.R.; LAVIN, P. Potential use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for the estimation of chemical composition of oxen meat samples. **Meat Science**, v. 74, n. 3, p. 487–496, 2006.
65. PRIETO, N.; ANDRÉS, S.; GIRALDEZ, F.J.; MANTECON, A.R.; LAVIN, P. Ability of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to estimate physical parameters of adult steers (oxen) and young cattle meat samples. **Meat Science**, v. 79; n. 4, p. 692–699, 2008.
66. PRIETO, N.; ROEHE, R.; LAVIN, P.; BATTEN, G.; ANDRÉS, S. Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review. **Meat Science**, v. 83, n. 2, p. 175-186, 2009.
67. PRIETO, N.; DUGAN, M.E.R.; LÓPEZ-CAMPOS, O.; AALHUS, J.L.; UTTARO, B. At line prediction of PUFA and biohydrogenation intermediates in perirenal and subcutaneous fat from cattle fed sunflower or flaxseed by near infrared spectroscopy. **Meat Science**, v. 94, n. 1, p. 27–33, 2013.

68. RIPOLL, G.; ALBERTI, P.; PANEA, B.; OLLETA, J.L.; SANUDO, C. Near-infrared reflectance spectroscopy for predicting chemical, instrumental and sensory quality of beef. **Meat Science**, v. 80, n. 3, p. 697–702, 2008.
69. RØDBOTTEN, R.; NILSEN, B.N.; HILDRUM, K.I. Prediction beef quality attributes from early post mortem near infrared reflectance spectra. **Food Chemistry**, v. 69, n. 4, p. 427–436, 2000.
70. SAS INSTITUTE. 2002. SAS/STAT Software: changes and enhancements through release 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.
71. SAVELL J.W.; MUELLER, S.L.; BAIRD, B.E. The chilling of carcasses. **Meat Science**, v. 70, n. 3, p. 449-459, 2005.
72. SAVENIJE, B.; GEESINK, G.H.; VAN DER PALEN, J.G.P.; HEMKE, G. Prediction of pork quality using visible/near-infrared reflectance spectroscopy. **Meat Science**, v. 73, n. 1, p. 181–184, 2006.
73. SHENK J.; WESTERHAUS, M.O. Calibration the ISI way. In: DAVIES, A.M.C.; WILLIAMS, P. (eds). **Near Infrared Spectroscopy: The future Waves**. Chichester: NIR Publications, 1996, 742 p.
74. SOTELO, F.F. **Aplicação da espectroscopia de Infravermelho Próximo na caracterização de petróleo. Simulação de uma unidade de destilação atmosférica**. 2006. 77 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
75. TØGERSEN, G.; ARNESEN, J.F.; NIELSEN, B.N.; HILDRUM, K.I. On-line prediction of chemical composition of semi-frozen ground beef by non-invasive NIR spectroscopy. **Meat Science**, v. 63, n. 4, p. 515–523, 2003.
76. VOLPELLI, L.A.; FAILLA, S.; SEPULCRI, A.; PIASENTIER, E. Calpain system in vitro activity and myofibril fragmentation index in fallow deer (*Dama dama*): effects of age and supplementary feeding. **Meat Science**, v. 69, n. 3, p. 579-582, 2005.
77. WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S.D. **Shear Force Procedures for Meat Tenderness Measurement**. 2005. Disponível em: www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/54380530/protocols/ShearForceProcedures.pdf. Acessado em: 06 jan. 2014.
78. WILLIAM, P.; NORRIS, K. **Near-infrared technology in the agricultural and food industries**. St. Paul: AACC Press, 1987. 312 p.
79. WILLIAMS, P.C.; SOBERING, D.C. Comparison of commercial near infrared transmittance and reflectance instruments for analysis of whole grains and seeds. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 1, p. 25–32, 1993.

80. YOUNG, O.A.; BERKER, G.J.; FROST D.A. Determination of collagen solubility and concentration in meat by near infrared spectroscopy. **Journal of Muscle Foods**, v. 7, n. 4, p. 377–387, 1996.
81. ZENI, D. **Determinação de cloridrato de propranolol em medicamentos por espectroscopia no infravermelho com calibração multivariada (PLS)**. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A qualidade da carne bovina deve ser constantemente monitorada, pois a sua composição química e os atributos tecnológicos e sensoriais são altamente influenciados por diversos fatores, que geram produtos com elevado grau de heterogeneidade, indesejáveis pelos consumidores, que cada vez mais exigem carne com qualidade consistente.

Embora a composição química e as características relacionadas com a maciez possam fornecer informações confiáveis sobre a qualidade da carne bovina, os métodos analíticos de rotina são demorados, caros, destrutivos e exigem a utilização de reagentes agressivos, que representam riscos aos analistas e ao meio ambiente.

Como a indústria e laboratórios necessitam de respostas rápidas, estudos têm sido direcionados no sentido de encontrar e viabilizar novas técnicas para estimar a qualidade da carne. Apesar dos resultados publicados variarem consideravelmente, a espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIRS) tem sido sugerida como uma alternativa adequada para substituir os métodos convencionais, pois é sensível, precisa, rápida, exige simples preparação das amostras, possui baixos custos de instalação e operação, além de permitir a avaliação simultânea de várias propriedades e não necessitar do emprego de reagentes.

Mesmo que a comparação direta da capacidade preditiva entre os modelos de calibração desenvolvidos nos diversos estudos seja difícil, já que o equipamento, a fonte de radiação, os detectores, os tratamentos matemáticos, as faixas espectrais, a forma de apresentação, a temperatura da amostra e até mesmo o tipo de músculo utilizado interferem na obtenção dos resultados, o presente estudo demonstrou que o NIRS pode ser aplicado com êxito para a determinação quantitativa dos constituintes proteína, resíduo mineral fixo e umidade; e as características relacionadas à maciez da carne: capacidade de retenção de água, colágeno solúvel, força de cisalhamento, índice de fragmentação miofibrilar (IFM) e pH.

Mesmo avaliando a acurácia dos modelos desenvolvidos por validação externa, o resíduo mineral fixo, a força de cisalhamento e o pH apresentaram modelos mais robustos que os obtidos em estudos que avaliaram a acurácia dos modelos por validação cruzada, demonstrando a robustez e a confiabilidade dos modelos desenvolvidos no presente trabalho para essas propriedades.

Não foram encontrados estudos por NIRS para a determinação do índice de fragmentação miofibrilar em carne, e para a determinação do colágeno solúvel, além de escassos, os trabalhos publicados não relataram os valores de “relação de desempenho do desvio” (RPD). Assim sendo, os resultados do presente estudo demonstraram que tanto o IFM, como o colágeno solúvel, que apresentaram valores de RPD superiores a dois, podem ser preditos com confiabilidade por NIRS.

Embora os modelos desenvolvidos para proteína e capacidade de retenção de água tenham apresentado valores de RPD inferiores aos de estudos por validação cruzada, apresentaram resultados de RPD superiores aos obtidos em estudos por validação externa. Uma das desvantagens do método NIRS é a sua dependência do método de referência. Para a determinação de proteína, as diferenças entre a determinação analítica de Kjeldahl, que mede o teor de nitrogênio, e o NIRS, que mede movimentos vibracionais dos aminoácidos, podem ter dificultado o desenvolvimento de melhores modelos de calibração.

Além disso, o fato do valor de RPD para umidade ter sido menor que os divulgados na literatura por validação externa, corrobora a tese de que a falta de confiabilidade dos métodos de referência pode interferir na previsibilidade dos modelos NIRS, já que a secagem em estufa não mede o conteúdo verdadeiro da água nos alimentos, pois a água de ligação só é removida por métodos extremos, além de poder considerar como água a perda de outros compostos voláteis, ao contrário do NIRS, que é específico para os movimentos vibracionais das moléculas de água.

O mesmo argumento é válido para a baixa capacidade preditiva do modelo desenvolvido para a quantificação do colágeno total, já que o método de referência (colorimétrico) é pouco confiável para tecidos de baixo conteúdo de colágeno, como é o caso da carne.

Depreende-se, que é possível encontrar resultados ainda mais robustos por NIRS para a predição da proteína, umidade e colágeno total na carne bovina se houver maior precisão dos resultados pelo método de referência.

Também, a baixa sensibilidade do NIRS para os componentes menores e o baixo desvio padrão entre os dados de referência (baixa variabilidade) podem ter afetado negativamente a previsibilidade do modelo NIRS desenvolvido para a quantificação do colágeno total.

Nesse contexto, a diferença significativa observada entre os resultados de lipídios totais das amostras do conjunto de calibração e do conjunto teste (validação externa), foi determinante para a baixa robustez dos modelos de calibração desenvolvidos para a determinação do constituinte, demonstrando a importância de se utilizar um conjunto de calibração com grande variedade dos valores de referência, para maximizar a previsibilidade da técnica NIRS.

Em vista do exposto, considerando que os estabelecimentos industriais e laboratórios processam um grande número de amostras, pode-se obter com facilidade um conjunto heterogêneo, com largos intervalos de valores de referência, que possibilitaria aos modelos maiores capacidades preditivas para as propriedades de interesse em carne bovina.

Através das diferenças espectrais observadas visualmente, só foi possível gerar modelo com maior habilidade preditiva para lipídios totais, utilizando as regiões espectrais 1.110-1.292 e 1.678-1.788 nm. Para as outras propriedades, os melhores modelos foram obtidos considerando toda a faixa espectral (1.100 a 2.500 nm).

Nesse contexto, como as diferenças espectrais são difíceis de serem visualizadas, há a necessidade de desenvolver algoritmos com o propósito de pesquisar e selecionar as melhores regiões espectrais, localizando conjuntos de variáveis que podem resultar em melhores modelos de calibração. Ao compreender quais comprimentos de onda estão intimamente associados aos movimentos vibracionais da propriedade de interesse, é possível obter calibrações mais robustas com as ferramentas quimiométricas selecionadas para cada atributo, além de desenvolver instrumentos mais simples e de menor custo, pois serão necessários apenas os comprimentos de onda especificados.

Por fim, é importante ressaltar que os resultados do presente estudo demonstraram que o NIRS apresenta maior capacidade preditiva para as características analisadas em amostras moídas que a relatada nos diversos estudos para tecidos intactos. Esse fato demonstra a necessidade de realizar mais estudos com o objetivo de corrigir ou minimizar os efeitos do processamento NIRS nas amostras intactas, possibilitando o desenvolvimento de modelos de calibração robustos, o que permitiria a determinação simultânea das características diretamente nas carcaças, sendo de grande importância para a avaliação da qualidade da carne na própria linha de produção industrial.

APÊNDICE 1

TABELA 1 – Resultados para a obtenção de modelos de calibração por NIRS para a predição de lipídios totais em carne bovina, utilizando o método PLS e a faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm

Método	R ²	SEC ^{VII}	Fatores	Ots ^{VIII}	SEP ^{IX}	RPD ^X
DM ^I	0,61	0,727	7	6	-	-
MD ^{II}	0,64	0,673	8	0	-	-
MD com 1 ^a derivada	0,82	0,476	5	2	1,988	0,58
MD com 2 ^a derivada	0,92	0,475	3	7	2,054	0,56
MD com SNV ^{III}	0,73	0,588	8	0	2,055	0,56
MD com BC ^{IV}	0,67	0,645	8	1	-	-
MD com detrend	0,93	0,309	5	0	2,012	0,57
MD com SG ^V	0,44	0,861	1	4	-	-
MD com MSC ^{VI}	0,72	0,598	8	0	2,052	0,56
MD com SG 1 ^a derivada	0,48	0,926	1	7	-	-
MD com SG e 2 ^a derivada	0,50	0,973	1	10	-	-
MD com MSC e 1 ^a derivada	0,46	0,852	2	2	-	-
MD com MSC e 2 ^a derivada	0,63	0,791	1	9	-	-

I = Distância de Mahalanobis; II = Máxima distância; III = Variável normal padronizada; IV = Correção da linha de base; V = Savitzky-Golay; VI = Correção multiplicativa de sinal; VII = Erro-padrão da calibração; VIII = Amostras outliers; IX = Erro-padrão da validação; X = Relação de desempenho do desvio.

TABELA 2 – Resultados para a obtenção de modelos de calibração por NIRS para a predição de proteínas em carne bovina, utilizando o método PLS e a faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm

Método	R ²	SEC ^{VII}	Fatores	Ots ^{VIII}	SEP ^{IX}	RPD ^X
DM ^I	0,18	0,909	1	6	-	-
MD ^{II}	0,16	0,914	1	0	-	-
DM com 1 ^a derivada	0,92	0,605	6	9	0,753	1,38
DM com 2 ^a derivada	0,85	0,700	2	9	0,815	1,26
DM com SNV ^{III}	0,47	0,882	7	7	-	-
DM com BC ^{IV}	0,50	0,859	6	6	-	-
DM com detrend	0,29	0,958	2	8	-	-
DM com SG ^V	0,54	0,893	2	6	-	-
DM com MSC ^{VI}	0,26	0,978	2	7	-	-
DM com SG 1 ^a derivada	0,62	0,762	2	6	-	-
DM com SG e 2 ^a derivada	0,36	0,866	1	6	-	-
DM com MSC e 1 ^a derivada	0,77	0,731	4	9	0,798	1,29
DM com MSC e 2 ^a derivada	0,96	0,778	4	11	0,812	1,27

I = Distância de Mahalanobis; II = Máxima distância; III = Variável normal padronizada; IV = Correção da linha de base; V = Savitzky-Golay; VI = Correção multiplicativa de sinal; VII = Erro-padrão da calibração; VIII = Amostras outliers; IX = Erro-padrão da validação; X = Relação de desempenho do desvio.

TABELA 3 – Resultados para a obtenção de modelos de calibração por NIRS para a predição de resíduo mineral fixo em carne bovina, utilizando o método PLS e a faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm

Método	R ²	SEC ^{VII}	Fatores	Ots ^{VIII}	SEP ^{IX}	RPD ^X
DM ^I	0,19	0,043	1	6	-	-
MD ^{II}	0,30	0,042	2	0	-	-
MD com 1 ^a derivada	0,41	0,039	3	2	-	-
MD com 2 ^a derivada	0,98	0,022	5	7	0,034	1,50
MD com SNV ^{III}	0,39	0,039	5	0	-	-
MD com BC ^{IV}	0,16	0,046	2	1	-	-
MD com detrend	0,36	0,040	5	0	-	-
MD com SG ^V	0,28	0,043	1	4	-	-
MD com MSC ^{VI}	0,39	0,039	5	0	-	-
MD com SG 1 ^a derivada	0,38	0,042	1	7	-	-
MD com SG e 2 ^a derivada	0,76	0,032	2	10	0,030	1,70
MD com MSC e 1 ^a derivada	0,51	0,036	3	2	-	-
MD com MSC e 2 ^a derivada	0,51	0,037	1	9	-	-

I = Distância de Mahalanobis; II = Máxima distância; III = Variável normal padronizada; IV = Correção da linha de base; V = Savitzky-Golay; VI = Correção multiplicativa de sinal; VII = Erro-padrão da calibração; VIII = Amostras outliers; IX = Erro-padrão da validação; X = Relação de desempenho do desvio.

TABELA 4 – Resultados para a obtenção de modelos de calibração por NIRS para a predição de umidade em carne bovina, utilizando o método PLS e a faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm

Método	R ²	SEC ^{VII}	Fatores	Ots ^{VIII}	SEP ^{IX}	RPD ^X
DM ^I	0,18	0,921	6	6	-	-
MD ^{II}	0,30	0,836	7	0	-	-
MD com 1 ^a derivada	0,81	0,459	5	2	0,651	1,57
MD com 2 ^a derivada	0,98	0,496	5	7	0,680	1,50
MD com SNV ^{III}	0,24	0,876	4	0	-	-
MD com BC ^{IV}	0,34	0,826	7	1	-	-
MD com detrend	0,24	0,872	4	0	-	-
MD com SG ^V	0,84	0,458	4	4	0,690	1,48
MD com MSC ^{VI}	0,28	0,850	6	0	-	-
MD com SG 1 ^a derivada	0,77	0,593	2	7	0,736	1,40
MD com SG e 2 ^a derivada	0,75	0,719	2	10	0,740	1,38
MD com MSC e 1 ^a derivada	0,75	0,574	4	2	0,654	1,56
MD com MSC e 2 ^a derivada	0,84	0,579	2	9	0,689	1,48

I = Distância de Mahalanobis; II = Máxima distância; III = Variável normal padronizada; IV = Correção da linha de base; V = Savitzky-Golay; VI = Correção multiplicativa de sinal; VII = Erro-padrão da calibração; VIII = Amostras outliers; IX = Erro-padrão da validação; X = Relação de desempenho do desvio.

APÊNDICE 2

TABELA 1 – Resultados para a obtenção de modelos de calibração por NIRS para a predição da capacidade de retenção de água em carne bovina, utilizando o método PLS e a faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm

Método	R ²	SEC ^{VII}	Fatores	Ots ^{VIII}	SEP ^{IX}	RPD ^X
DM ^I	0,07	1,755	3	6	-	-
MD ^{II}	0,11	1,690	5	0	-	-
MD com 1 ^a derivada	0,83	0,823	5	2	0,938	1,95
MD com 2 ^a derivada	0,94	0,836	4	7	0,936	1,96
MD com SNV ^{III}	0,07	1,728	2	0	-	-
MD com BC ^{IV}	0,06	1,741	2	1	-	-
MD com detrend	0,05	1,743	2	0	-	-
MD com SG ^V	0,40	1,506	1	4	-	-
MD com MSC ^{VI}	0,06	1,739	1	0	-	-
MD com SG 1 ^a derivada	0,39	1,568	1	7	-	-
MD com SG e 2 ^a derivada	0,44	1,535	1	10	-	-
MD com MSC e 1 ^a derivada	0,79	0,816	5	2	0,936	1,96
MD com MSC e 2 ^a derivada	0,95	1,154	4	9	0,940	1,95

I = Distância de Mahalanobis; II = Máxima distância; III = Variável normal padronizada; IV = Correção da linha de base; V = Savitzky-Golay; VI = Correção multiplicativa de sinal; VII = Erro-padrão da calibração; VIII = Amostras outliers; IX = Erro-padrão da validação; X = Relação de desempenho do desvio.

TABELA 2 – Resultados para a obtenção de modelos de calibração por NIRS para a predição do conteúdo de colágeno total em carne bovina, utilizando o método PLS e a faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm

Método	R ²	SEC ^{VII}	Fatores	Ots ^{VIII}	SEP ^{IX}	RPD ^X
DM ^I	0,01	0,505	1	6	-	-
MD ^{II}	0,01	0,515	1	0	-	-
DM com 1 ^a derivada	0,15	0,499	2	9	-	-
DM com 2 ^a derivada	0,53	0,424	1	9	-	-
DM com SNV ^{III}	0,20	0,503	2	7	-	-
DM com BC ^{IV}	0,19	0,506	2	6	-	-
DM com detrend	0,19	0,505	2	8	-	-
DM com SG ^V	0,25	0,444	1	6	-	-
DM com MSC ^{VI}	0,20	0,503	1	7	-	-
DM com SG 1 ^a derivada	0,39	0,427	1	6	-	-
DM com SG e 2 ^a derivada	0,32	0,446	1	6	-	-
DM com MSC e 1 ^a derivada	0,06	0,500	1	9	-	-
DM com MSC e 2 ^a derivada	0,77	0,397	2	11	0,642	0,81

I = Distância de Mahalanobis; II = Máxima distância; III = Variável normal padronizada; IV = Correção da linha de base; V = Savitzky-Golay; VI = Correção multiplicativa de sinal; VII = Erro-padrão da calibração; VIII = Amostras outliers; IX = Erro-padrão da validação; X = Relação de desempenho do desvio.

TABELA 3 – Resultados para a obtenção de modelos de calibração por NIRS para a predição do conteúdo de colágeno solúvel em carne bovina, utilizando o método PLS e a faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm

Método	R ²	SEC ^{VII}	Fatores	Ots ^{VIII}	SEP ^{IX}	RPD ^X
DM ^I	0,19	1,204	3	6	-	-
MD ^{II}	0,17	1,201	3	0	-	-
DM com 1 ^a derivada	0,17	1,207	1	9	-	-
DM com 2 ^a derivada	0,93	0,745	3	9	0,604	2,24
DM com SNV ^{III}	0,39	1,233	2	7	-	-
DM com BC ^{IV}	0,39	1,224	2	6	-	-
DM com detrend	0,45	1,222	2	8	-	-
DM com SG ^V	0,88	0,643	4	6	0,486	2,78
DM com MSC ^{VI}	0,42	1,228	3	7	-	-
DM com SG 1 ^a derivada	0,72	0,838	2	6	0,590	2,29
DM com SG e 2 ^a derivada	0,83	0,730	3	6	0,485	2,78
DM com MSC e 1 ^a derivada	0,91	0,832	5	9	0,581	2,32
DM com MSC e 2 ^a derivada	0,59	1,024	1	11	-	-

I = Distância de Mahalanobis; II = Máxima distância; III = Variável normal padronizada; IV = Correção da linha de base; V = Savitzky-Golay; VI = Correção multiplicativa de sinal; VII = Erro-padrão da calibração; VIII = Amostras outliers; IX = Erro-padrão da validação; X = Relação de desempenho do desvio.

TABELA 4 – Resultados para a obtenção de modelos de calibração por NIRS para a predição da força de cisalhamento em carne bovina, utilizando o método PLS e a faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm

Método	R ²	SEC ^{VII}	Fatores	Ots ^{VIII}	SEP ^{IX}	RPD ^X
DM ^I	0,22	1,322	7	6	-	-
MD ^{II}	0,22	1,325	7	0	-	-
DM com 1 ^a derivada	0,04	1,486	1	9	-	-
DM com 2 ^a derivada	0,55	1,163	1	9	-	-
DM com SNV ^{III}	0,10	1,431	3	7	-	-
DM com BC ^{IV}	0,24	1,317	7	6	-	-
DM com detrend	0,01	1,491	1	8	-	-
DM com SG ^V	0,16	1,403	1	6	-	-
DM com MSC ^{VI}	0,20	1,314	5	7	-	-
DM com SG 1 ^a derivada	0,44	1,106	1	6	-	-
DM com SG e 2 ^a derivada	0,42	1,143	1	6	-	-
DM com MSC e 1 ^a derivada	0,73	0,895	4	9	0,391	3,94
DM com MSC e 2 ^a derivada	0,85	0,848	2	11	0,508	3,03

I = Distância de Mahalanobis; II = Máxima distância; III = Variável normal padronizada; IV = Correção da linha de base; V = Savitzky-Golay; VI = Correção multiplicativa de sinal; VII = Erro-padrão da calibração; VIII = Amostras outliers; IX = Erro-padrão da validação; X = Relação de desempenho do desvio.

TABELA 5 – Resultados para a obtenção de modelos de calibração por NIRS para a predição do índice de fragmentação miofibrilar em carne bovina, utilizando o método PLS e a faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm

Método	R ²	SEC ^{VII}	Fatores	Ots ^{VIII}	SEP ^{IX}	RPD ^X
DM ^I	0,39	17,25	4	6	-	-
MD ^{II}	0,40	16,11	7	0	-	-
MD com 1 ^a derivada	0,91	6,77	6	2	11,43	1,85
MD com 2 ^a derivada	0,95	10,77	2	7	11,27	1,88
MD com SNV ^{III}	0,58	13,47	8	0	-	-
MD com BC ^{IV}	0,33	17,26	4	1	-	-
MD com detrend	0,34	16,91	4	0	-	-
MD com SG ^V	0,40	16,54	1	4	-	-
MD com MSC ^{VI}	0,57	13,56	8	0	-	-
MD com SG 1 ^a derivada	0,99	12,17	6	7	12,52	1,69
MD com SG e 2 ^a derivada	0,75	15,36	2	10	12,03	1,76
MD com MSC e 1 ^a derivada	0,91	8,77	6	2	10,72	1,98
MD com MSC e 2 ^a derivada	0,86	12,26	2	9	10,14	2,09

I = Distância de Mahalanobis; II = Máxima distância; III = Variável normal padronizada; IV = Correção da linha de base; V = Savitzky-Golay; VI = Correção multiplicativa de sinal; VII = Erro-padrão da calibração; VIII = Amostras outliers; IX = Erro-padrão da validação; X = Relação de desempenho do desvio.

TABELA 6 – Resultados para a obtenção de modelos de calibração por NIRS para a predição de pH em carne bovina, utilizando o método PLS e a faixa espectral de 1.100 a 2.500 nm

Método	R ²	SEC ^{VII}	Fatores	Ots ^{VIII}	SEP ^{IX}	RPD ^X
DM ^I	0,34	0,148	7	6	-	-
MD ^{II}	0,34	0,152	7	0	-	-
DM com 1 ^a derivada	0,60	0,137	4	9	-	-
DM com 2 ^a derivada	0,54	0,146	1	9	-	-
DM com SNV ^{III}	0,43	0,154	5	7	-	-
DM com BC ^{IV}	0,17	0,170	2	6	-	-
DM com detrend	0,10	0,173	1	8	-	-
DM com SG ^V	0,43	0,	1	6	-	-
DM com MSC ^{VI}	0,45	0,150	6	7	-	-
DM com SG 1 ^a derivada	0,40	0,163	1	11	-	-
DM com SG e 2 ^a derivada	0,91	0,110	4	6	0,044	4,32
DM com MSC e 1 ^a derivada	0,31	0,154	2	9	-	-
DM com MSC e 2 ^a derivada	0,53	0,140	1	11	-	-

I = Distância de Mahalanobis; II = Máxima distância; III = Variável normal padronizada; IV = Correção da linha de base; V = Savitzky-Golay; VI = Correção multiplicativa de sinal; VII = Erro-padrão da calibração; VIII = Amostras outliers; IX = Erro-padrão da validação; X = Relação de desempenho do desvio.