



Ciência Rural

ISSN: 0103-8478

cienciarural@mail.ufsm.br

Universidade Federal de Santa Maria

Brasil

Mendes Jorge, André; Andriguetto, Cristiana; Domingues Millen, Danilo; Golfetto Calixto, Michel;
Rodrigues, Érico; Marinho Storti, Sílvia Maria; Colares Vilela, Letícia

Características bioquímicas da carne de bubalinos Mediterrâneo terminados em confinamento e
abatidos em diferentes pesos

Ciência Rural, vol. 36, núm. 5, setembro-outubro, 2006, pp. 1534-1539

Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33136530>

- ▶ Como citar este artigo
- ▶ Número completo
- ▶ Mais artigos
- ▶ Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Características bioquímicas da carne de bubalinos Mediterrâneo terminados em confinamento e abatidos em diferentes pesos

Biochemicals meat traits from Mediterranean buffaloes finished in feedlot and slaughtered at different weights

André Mendes Jorge¹ Cristiana Andriguetto² Danilo Domingues Millen³ Michel Golfetto Calixto²
Érico Rodrigues² Sílvia Maria Marinho Storti² Letícia Colares Vilela⁴

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar as características bioquímicas da carne de bubalinos Mediterrâneo terminados em confinamento e abatidos em diferentes pesos. Foram utilizados 28 bubalinos Mediterrâneo jovens, com idade de 9 meses, e peso vivo médio inicial de 240kg. Os animais foram alimentados com ração total à vontade em regime de confinamento até atingirem pesos de abate de 450, 480, 510 e 540kg de peso vivo (tratamentos). Os valores de pH e temperatura dos músculos Longissimus dorsi e Biceps femoris foram coletados a intervalos de duas horas durante 24 horas após o abate. Determinou-se a cor da carne pelos métodos subjetivo e objetivo. Não houve efeito de interação entre tratamento e tempo de coleta. Não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação ao pH e à temperatura nos dois músculos estudados (Longissimus dorsi e biceps femoris) durante o processo de resfriamento das carcaças. Os valores médios de pH inicial e pH final dos músculos Longissimus dorsi e biceps femoris foram de 6,6 e 5,4; e de 6,3 e 5,5, respectivamente. Os valores médios de temperatura inicial e final dos músculos Longissimus dorsi e biceps femoris foram 39,7°C e 4,1°C; 40,4°C e 7,0°C, respectivamente. Quanto à cor da carne, pelo método subjetivo, não houve diferença significativa entre os tratamentos estudados, obtendo-se a média geral de 3,41 pontos. Em relação à cor da carne pelo método objetivo, não houve diferença significativa entre os tratamentos estudados. Os valores médios encontrados foram: $L^* = 35,16$; $a^* = 12,43$ e $b^* = 5,29$. A carne bubalina, apesar de se apresentar mais escura que a carne bovina, não traz prejuízos quanto ao aspecto visual para o consumidor.

ABSTRACT

This work was aimed at evaluating the biochemical meat traits from Mediterranean buffaloes finished in feedlot and slaughtered at different weights. Twenty eight Mediterranean young buffaloes, averaging 240kg initial live weight and nine months of age, were used. The animals were full fed with total mixed ration in feedlot until reaching slaughter weights of 450, 480, 510 and 540kg live weight (treatments). The pH values and temperature of the Longissimus dorsi and Biceps femoris muscles were collected at 2 hours intervals during 24 hours after the slaughter. Meat color was determined through the subjective and objective methods. No interaction effect was observed between treatment and time of ph and temperature collection. No treatment effects was observed in relation to the pH and temperature in the two studied muscles (Longissimus dorsi and Biceps femoris) during the cooling carcass process. The average values of initial pH and ultimate pH of Longissimus dorsi and Biceps femoris muscles were 6.6 and 5.4; 6.3 and 5.5, respectively. The average values of initial and ultimate temperature of Longissimus dorsi and Biceps femoris muscles, were 39.7°C and 4.1°C; 40.4°C and 7.0°C, respectively. Meat color by the subjective method, did not differ among treatments studied, with general average of 3.41 points. Meat color obtained by the objective method, did not differ among the treatments studied, with average values: $L^* = 35,16$; $a^* = 12,43$ and $b^* = 5,29$. In spite of presenting darker than bovine meat, buffalo meat doesn't bring damages as for the visual aspect for the consumer.

Palavras-chave: búfalos, Biceps femoris, cor, Longissimus dorsi, pH, temperatura.

Key words: buffaloes, Biceps femoris, color, Longissimus dorsi, pH, temperature.

¹Departamento de Produção e Exploração Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), 18618-000, Botucatu, SP, Brasil. E-mail: andrejorge@fmvz.unesp.br. Autor para correspondência.

²Programa de Pós-graduação em Zootecnia, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

³Curso de Zootecnia, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Energia na Agricultura, Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

Com a abertura dos mercados, não só nacional como internacional, e o aumento da exigência do consumidor, a qualidade da carne tem sido um fator determinante na hora da sua escolha. Para garantir essa qualidade, é preciso levar em consideração alguns fatores *ante mortem*, como manejo, alimentação, sexo, idade, e *post mortem*, como a curva de queda de pH e a temperatura. Esses fatores são importantes para se determinar outros parâmetros de qualidade como cor, maciez e conservação da carne (LUCHIARI FILHO, 2000).

Entre os vários fatores de qualidade exigidos pelo mercado de carne é a manutenção da cor vermelha, a qual dá impressão de satisfação ao consumidor (GASPERLIN et al., 2001). Esses mesmos autores relataram que qualquer mudança no músculo ou na superfície muscular irá afetar diretamente a cor da carne. Para os consumidores, a cor da carne é o principal parâmetro indicador de qualidade. A cor vermelho-cereja foi eleita, também pelos consumidores, a cor de preferência, com mais de 50% de aceitação. Também no momento do preparo do produto cárneo a coloração da carne é o principal fator levado em consideração pelo consumidor (HOFFMAN, 2006).

A tendência dos consumidores, no momento da compra da carne, é avaliar a sua qualidade principalmente pela cor vermelha e, após consumi-la, também pela suculência, maciez e sabor. DRANSFIELD (1994) relatou em seu estudo que a maioria dos consumidores tem dificuldades em escolher uma carne de boa qualidade. As carnes escuras e firmes (DFD) não são atrativas para o consumidor. Carnes DFD possuem valores de pH maiores que 5,8, apresentando uma vida de prateleira reduzida, pouco sabor e a indesejável cor vermelha escura, sendo que a causa de pH elevado é a baixa concentração de glicogênio muscular no *post mortem* (IMMONEN et al., 2000, 2000a, 2000b, 2000c).

Alguns aspectos físicos, como a cor e a maciez, e químicos, como o pH final, podem ser afetados pelo manejo *ante mortem*. O abate de animais estressados eleva o pH final, baixa a taxa de glicogênio muscular e ocasiona a cor escura na carne. (LAHUCKY et al., 1997). LISTER (1989) constatou que uma boa alimentação, como uma dieta de alta energia, ajuda a prevenir a perda de glicogênio principalmente no transporte para o abate, pois a queima de glicogênio no jejum será retardada. Para que, após o abate, o músculo do animal se transforme em carne, é necessário que ocorram reações físico-químicas, dentre elas a formação do ácido lático, que vai diminuir o pH da

carne, tornando-a mais macia e com uma coloração agradável ao consumidor (HOFFMAN, 2006).

Diante do exposto, é necessário conhecer profundamente as características químicas, como queda de pH e temperatura pós-abate, para que se possa oferecer ao consumidor uma carne bubalina atrativa, de boa aparência e de melhor qualidade. Desse modo, este estudo foi conduzido com o objetivo de se determinar o pH muscular, a temperatura de resfriamento da carcaça pós-abate e a cor da carne de bubalinos abatidos em diferentes pesos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), no município de Botucatu/SP. Foram utilizados 28 bubalinos desmamados, não-castrados, com idade de 9 meses e com peso vivo médio inicial de aproximadamente 240kg. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de sete animais e alocados em quatro baías possuindo 20m de largura por 30m de comprimento e bebedouro do tipo australiano, com capacidade para 1.500 litros. O fornecimento da ração completa aos animais foi *ad libitum*, de forma que as sobras nos cochos, em período de 24 horas, foi de 5% a 10% da matéria seca. A ração foi fornecida em duas porções diárias, às 8 e 15 horas. As quantidades oferecidas e as sobras foram registradas e amostradas diariamente e re-amotadas semanalmente.

O experimento foi constituído por quatro tratamentos, sendo: T1, abate com 450kg de peso vivo; T2, abate com 480kg de peso vivo; T3, abate com 510kg de peso vivo; T4, abate com 540kg de peso vivo. Para estabelecimento das exigências e formulação da dieta, utilizou-se o programa do NRC (1996) nível 2, baseando-se em simulação ruminal, para animais não-castrados, com níveis de ganho de 1,40kg/dia. Os alimentos usados na formulação da ração foram feno de *coast cross*, silagem de milho, caroço de algodão, silagem de milho úmido, farelo de algodão, uréia, Rumensin® e minerais. A composição da ração experimental se encontra na tabela 1. Antes do período de adaptação, os animais foram desverminados, recebendo Ivermectina para combater endo e ectoparasitos, e identificados com brincos numerados. Os animais passaram por um período de 21 dias de adaptação às instalações de confinamento e à dieta experimental, recebendo o alimento duas vezes ao dia (8 e 15h).

Tabela 1 - Composição dos ingredientes utilizados e da dieta total.

Ingredientes	%
Silagem de milho	7,8
Feno de <i>coast cross</i>	20,6
Caroço de algodão	8,2
Silagem de milho úmido	46,0
Concentrado NUTRUMIN ¹	17,4
Rumensin®	0,03
Dieta total	
Proteína bruta (%)	13,0
Fígado detergente neutro (%)	27,0
Nutrientes digestíveis totais (%)	74,0
Energia metabolizável (Mcal/Kg) [*]	2,68

¹Composição do concentrado NUTRUMIN: 42,2% polpa cítrica, 29,2% farelo de mandioca, 13,4% farelo de soja, 11,9% proteinose, 2,6% núcleo mineral², 0,7% uréia e 0,02% rumensin.

²Composição do núcleo mineral: (por kg de produto): 180g Ca, 130g P, 1.250mg Cu, 5.270mg Zn, 2.000mg Mn, 100mg Co, 90mg I, 15mg Se, 2.200mg Fé, 1.300mg F.

*Valores obtidos de KEARL (1982).

Os animais foram pesados a cada 28 dias após jejum de sólidos de 16 horas, sendo que o período de confinamento não teve duração pré-fixada. Os animais foram abatidos quando atingiram os pesos preestabelecidos (450, 480, 510 e 540kg). À medida que o animal se aproximava do peso de abate preestabelecido, era pesado em intervalos de 7-14 dias para ser abatido nos pesos preditos. Antes do abate, os animais passaram por um jejum de sólidos de 14 h e foram posteriormente enviados para o abate.

imediatamente após o abate, obteve-se os valores de temperatura e pH, sendo determinado o tempo zero. Os valores foram coletados no músculo *Longissimus dorsi* e *Biceps femoris* em intervalos de 2h, em um período de 24h. As mensurações foram realizadas por meio de termômetro eletrônico marca GULTAN, modelo D-120, com sensor metálico de penetração e com potenciômetro digital marca ANALION, modelo PM 603, com eletrodo/sensor de vidro para penetração, modelo V-620, com um pHmetro e um termômetro.

Após o resfriamento das carcaças por 24h a 1°C, realizou-se um corte transversal no músculo *Longissimus dorsi* na região entre a 12^a e a 13^a costelas e, após 30 minutos, foi feita a avaliação subjetiva da cor segundo escala de pontos preconizada por MÜLLER (1980).

Para o método objetivo da cor da carne, foi utilizado um bife de 2,5cm de espessura. As medidas foram realizadas em colorímetro MINOLTA CR 300

(Osaka - Japão), operando no sistema CIE (L^* , a^* , b^*). O colorímetro foi calibrado com placa de cerâmica branca e o iluminante utilizado foi o D65. Foram feitas três medidas, em quatro diferentes pontos do bife, anotando-se os valores médios de L^* , a^* e b^* (ABULARACH et al., 1998).

imediatamente após o abate, realizaram-se as coletas dos valores de temperatura e pH, sendo determinado o tempo zero. Os valores foram coletados no músculo *Longissimus dorsi* e *Biceps femoris* em intervalos de 2h em um período de 24 horas. As mensurações foram realizadas com um pHmetro e um termômetro.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em quatro grupos experimentais referentes aos 4 pesos de abate (450, 480, 510 e 540kg de peso vivo).

Para análises da cor, temperatura e pH, utilizou-se o seguinte modelo: $Y_{ijk} = \mu + PA_i + IT_j + PA * IT_{ij} + E_{ijk}$, onde Y_{ijk} = observação referente ao animal k, do peso de abate i e tempo de colheita j; μ = média geral; PA_i = efeito do peso de abate i, em que $i = 1(450\text{kg}), 2(480\text{kg}), 3(510\text{kg})$ e $4(540\text{kg})$; IT_j = efeito do intervalo de tempo j, em que $j = 1$ (0horas); 2 (2h); 3 (4h); 4 (6h); 5 (8h); 6 (10h); 7 (12h); 8 (14h); 9 (16h); 10 (18h); 11 (20h); 12 (22h) e 13 (24h); $PA * IT_{ij}$ = efeito da interação entre o peso de abate i e o intervalo de tempo j; E_{ijk} = erro aleatório, pressuposto normalmente distribuído, com média zero e variância. Para as variáveis em que a suposição de normalidade não foi adequada, a análise estatística foi efetuada utilizando-se procedimentos não-paramétricos de Kruskal-Wallis (ZAR, 1996). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o procedimento GLM do pacote estatístico SAS (1996). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não se observou efeito significativo de interação ($P < 0,05$) entre tratamentos (pesos de abate) e hora da coleta para as variáveis pH e temperatura dos músculos *Longissimus dorsi* (LD) e *Biceps femoris* (BF). Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos em relação ao pH e à temperatura durante o processo de resfriamento das carcaças nos dois músculos estudados (*Longissimus dorsi* - contrafilé e *Biceps femoris* - coxão duro). Em relação à temperatura final das carcaças, foram encontrados valores de 6,98°C e 4,07°C para o coxão duro e o contrafilé, respectivamente, mostrando estar dentro dos padrões do Ministério da Agricultura, que recomenda temperaturas na carcaça abaixo de 7°C após 24h de resfriamento.

O valor médio de temperatura final encontrado no contrafilé foi semelhante ao encontrado por FARIA et al. (2003) com bovinos, que foi de 6,96°C. A temperatura final média das carcaças foi menor no contrafilé que no coxão duro, provavelmente devido ao maior isolamento térmico e à quantidade de gordura do coxão duro em relação ao contrafilé. O experimento mostrou haver uma correlação não-significativa ($P<0,05$) entre o pH e a temperatura no processo de resfriamento das carcaças, concluindo que a queda de pH não depende exclusivamente da temperatura, mas também de outros fatores como o glicogênio muscular.

Em relação ao pH inicial, a média dos 28 animais foi de 6,56 e 6,34 no contrafilé e no coxão duro, respectivamente; valores inferiores ao de 7,0, encontrado para bovinos (FARIA et al., 2003). O pH das carcaças dos bubalinos mostra uma tendência em se estabilizar mais cedo (Figuras 1 e 2), em torno de 6 a 8h post mortem, em relação ao dos bovinos, devido a este pH inicial dos bubalinos ser mais baixo. Em relação ao pH final, a média dos 28 bubalinos foi de 5,43 e 5,46 no contrafilé e no coxão duro, respectivamente; valores também abaixo dos encontrados por FARIA et al. (2003) com raças bovinas como Guzerá (5,73), Gir (5,69), Nelore (5,68) e Caracu (5,63). Estes resultados provavelmente se devem à maior docilidade dos bubalinos, o que leva a um menor estresse desses animais antes do abate e, consequentemente, a uma menor exaustão do glicogênio muscular, tendo com isso uma menor

possibilidade de ocorrência de DFD em bubalinos. Em relação à temperatura inicial, foram encontrados valores médios de 40,4°C e 39,7°C para coxão duro e contrafilé, respectivamente; valores próximos ao encontrado por FARIA et al. (2003) com bovinos, que foi em torno de 40,5°C.

Não se observou diferença significativa ($P<0,05$) entre tratamentos em relação à cor da carne, obtida pelo método subjetivo. Trabalhando com animais das raças Charolês, Nelore e seus mestiços e avaliando a carne pelo método subjetivo, MENEZES et al. (2003) observaram média em torno de 4,00 pontos; isto mostra a tendência dos bubalinos a apresentarem uma carne mais escura (mas não DFD) em relação aos bovinos.

Em relação à cor da carne pelo método objetivo, também não houve diferença significativa ($P<0,05$) entre os tratamentos estudados. Os valores médios encontrados para os 28 bubalinos estudados estão representados na tabela 2. Houve tendência de os animais abatidos mais pesados apresentarem cor da carne mais escura em relação aos abatidos mais leves, apesar de não serem diferentes estatisticamente. RIBEIRO et al. (2002), trabalhando com bovinos $\frac{3}{4}$ *Bos taurus taurus*, encontraram para o método objetivo os seguintes valores médios: $L^*=37,16$; $a^*=15,19$ e $b^*=11,61$; mostrando também que, por este método, há uma tendência de a carne bubalina ser mais escura (mas não DFD) que a carne bovina.

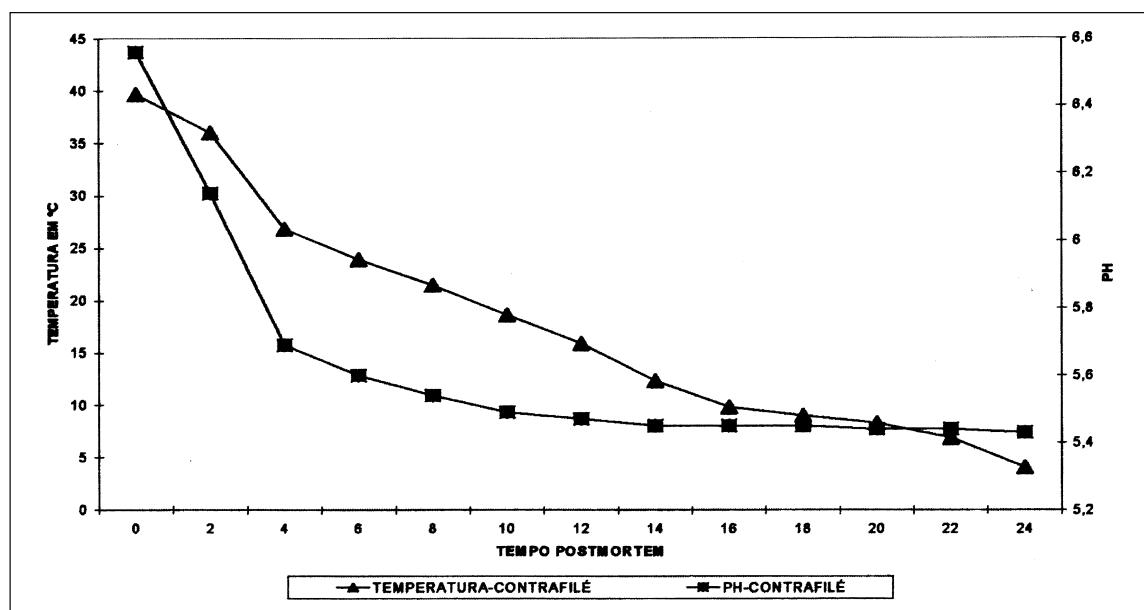


Figura 1 – pH e temperatura do músculo *Longissimus dorsi* (contra-filé) de bubalinos Mediterrâneo criados em confinamento abatidos em diferentes pesos.

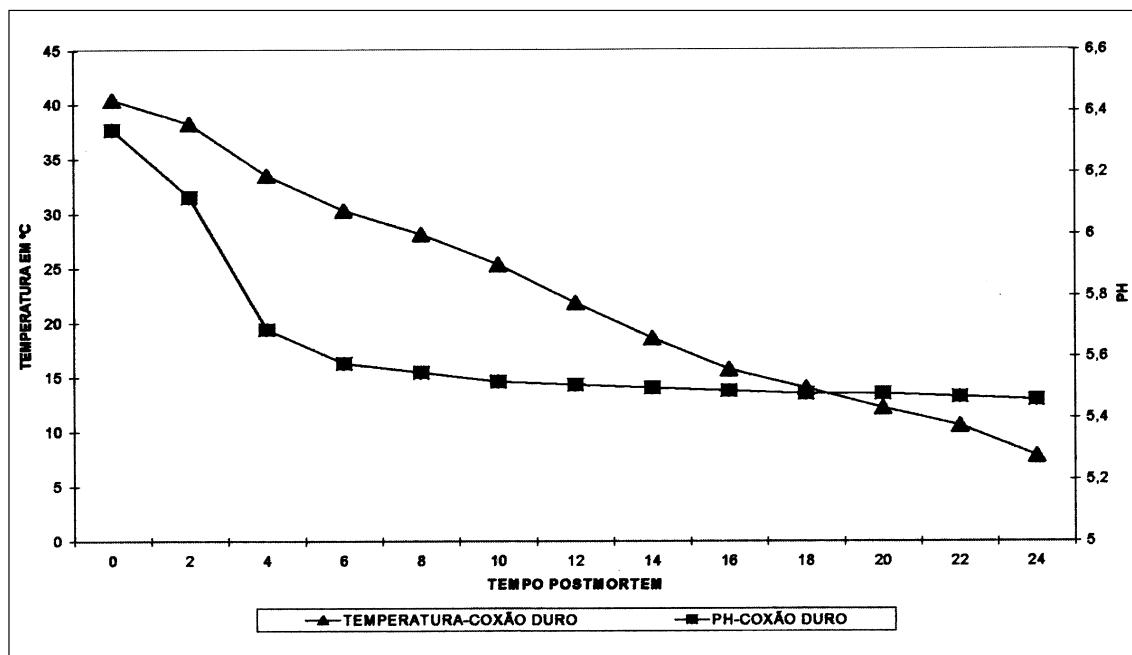


Figura 2 – pH e temperatura no músculo *Biceps femoris* (coxão duro) de bubalinos Mediterrâneo criados em confinamento e abatidos em diferentes pesos.

Não houve correlação ($P<0,05$) entre o pH e a cor da carne (método objetivo) do músculo *Longissimus dorsi* (contrafilé), mostrando que o pH não é o maior determinante para o estabelecimento da cor da carne bubalina. Há a necessidade de maiores estudos sobre pH e temperatura de outros músculos, bem como da investigação de possíveis diferenças entre outros grupos genéticos de bubalinos (raças Jafarabadi, Murrah, Carabao e seus cruzamentos).

CONCLUSÃO

A queda de pH e de temperatura das carcaças de bubalinos Mediterrâneo ocorre dentro dos padrões de normalidade. Há tendência de o pH muscular de

bubalinos se estabilizar mais cedo em relação ao dos bovinos, fato que pode estar associado à maior docilidade dos bubalinos, o que consequentemente dificulta o aparecimento de carnes DFDs nesses animais. Em relação à cor da carne, conclui-se que a carne dos bubalinos apresenta tendência a ser mais escura que a dos bovinos, embora não traga prejuízos quanto ao aspecto visual para o consumidor.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa concedida a Jorge ao CNPq, pela Bolsa de Iniciação Científica concedida a Millen e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de Doutorado concedida a Andrighetto.

Tabela 2 – Cor subjetiva e objetiva da carne de bubalinos jovens “Mediterrâneo” criados em confinamento e abatidos em diferentes pesos.

Parâmetros	Pesos de Abate (kg)			
	450	480	510	540
Cor subjetiva ¹	4 ^a	3 ^a	2,29 ^a	2,43 ^a
Cor objetiva L	35,23 ^a	35,91 ^a	35,25 ^a	35,99 ^a
Cor objetiva a	12,48 ^a	12,99 ^a	12,62 ^a	11,93 ^a
Cor objetiva b	5,92 ^a	5,18 ^a	5,82 ^a	5,74 ^a

¹Escala de 1 a 5 pontos, sendo 1 = vermelho escuro e 5 = vermelho brilhante.

REFERÊNCIAS

- ABULARACH, M.L. et al. Características de qualidade do contra filé (m. *L. dorsi*) de touros jovens da raça Nelore. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.2, p.205-210, 1998.
- DRANSFIELD, E. Optimisation of tenderisation, ageing, and tenderness. **Meat Science**, v.36, p. 105-121, 1994.
- FARIA, M.H. et al. Estudo da variação do pH e temperatura durante o processo de resfriamento da carcaça de animais de diferentes grupos genéticos abatidos em três pontos de acabamento. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., Santa Maria. RS. Brasil. **Anais...** Santa Maria: SBZ, 2003. CD-Rom.
- GASPERLIN, L. et al. Colour of beef heated to different temperatures as related to meat ageing. **Meat Science**, v.57, p.23-30, 2001.
- HOFFMAN, L.C. Sensory and physical characteristics of enhanced vs. non-enhanced meat from mature cows. **Meat Science**, v.72, p.195-202, 2006.
- IMMONEN, K. et al. The relative effect of dietary energy density on repleted and resting muscle glycogen concentrations. **Meat Science**, v.54, p.155-162, 2000.
- IMMONEN, K. et al. Glycogen concentrations in bovine longissimus dorsi muscle. **Meat Science**, v.54, p.163-167, 2000a.
- IMMONEN, K. et al. Variation of residual glycogen-glucose concentration at ultimate pH values below 5.75. **Meat Science**, v.55, p.279-283, 2000b.
- IMMONEN, K. et al. Bovine muscle glycogen concentration in relation to finish diet, slaughter and ultimate pH. **Meat Science**, v.55, p.25-31, 2000c.
- KEARL, L.C. **Nutrient requirements of ruminant in development countries**. Logan: Utah State University, 1982. 381p.
- LAHUCKY, R. et al. Effect of preslaughter handling on muscle glycogen level and select meat quality traits in beef. **Meat Science**, v.53, p.389-393, 1997.
- LISTER, D. Muscle metabolism and animal physiology in the dark-cutting condition. In: FABIANSSON, S.U. et al. Dark-cutting in cattle and sheep, **Proceedings of an Australian Workshop**. Sydney, Australia: Australian Meat & Live-stock Research & Development Corporation, 1989. p.19-25.
- LUCHIARI FILHO, A. **Pecuária da carne bovina**. São Paulo: 2000. 134p.
- MENEZES, L.F.G. et al. Efeito da monensina sódica na qualidade da carne de novilhos terminados em confinamento. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., Santa Maria. RS, Brasil. **Anais...** Santa Maria: SBZ, 2003. CD-Rom.
- MÜLLER, L. **Normas para avaliação de carcaças e concurso de carcaças de novilhos**. Santa Maria, UFSM, 1980. 31p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7ed. Washington DC., 1996. 242p.
- RIBEIRO, F.G. et al. Características da carcaça e qualidade da carne de tourinhos alimentados com dietas de alta energia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.749-756, 2002.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM (SAS). **User's guide: statistics**. SAS. Cary, North Caroline, 1996. 956p.
- ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 3.ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 1996. 781p.