

A BIOQUÍMICA E A QUALIDADE DA CARNE PARA CONSUMO – UMA APROXIMAÇÃO EXPERIMENTAL PARA ALUNOS DO 1.º ANO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Joana Capela-Pires

Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade
Évora, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal
jmcp@uevora.pt

Marta Candeias

Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade
Évora, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal
msgc@uevora.pt

Isabel Alves-Pereira

Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais e Departamento de Química, Escola de Ciências e
Tecnologia, Universidade Évora, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal
iap@uevora.pt

Rui Ferreira

Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais e Departamento de Química, Escola de Ciências e
Tecnologia, Universidade Évora, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal
raf@uevora.pt

Resumo

A oxidação de lípidos constitui a principal causa de degradação da carne, levando à perda do seu valor nutritivo. A quantidade intramuscular de agentes oxidantes é finamente regulada por agentes redutores endógenos como o ascorbato ou catalases que decrescem rapidamente durante a conversão do músculo em carne. Assim, os níveis de catalase ou o conteúdo lipídico podem ser bons indicadores da qualidade da carne. Nesse contexto, o desenvolvimento do estudo aqui descrito possibilitou aos alunos de uma turma-piloto da unidade curricular Bioquímica I do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, da Universidade de Évora, participarem ativamente no planeamento e na preparação de uma atividade laboratorial, com o objetivo de determinar marcadores nutricionais e de peroxidação lipídica da carne de *Meleagris ocellata*, *Sus scrofa domesticus* e *Bos taurus*. Os resultados obtidos na quantificação gravimétrica de lípidos, espetrométrica do colesterol e catalases, mobilizaram os alunos para uma aproximação bioquímica à caracterização de carnes



de diferente origem animal. A avaliação das competências desenvolvidas pelos alunos, observacional e por resposta a questionários antes e após a realização das diferentes etapas da aula, revelou que estes ampliaram o seu grau de cumprimento em termos de destreza laboratorial, aquisição, leitura e interpretação de resultados, adquirindo desse modo uma aprendizagem significativa

Palavras-chave: Colesterol; Catalase; Competências laboratoriais.

Abstract

The lipid oxidation is a major cause of degradation of the meat, leading to loss of its nutritional value. Intramuscular amount of oxidizing agents is finely regulated by endogenous reducing agents such as ascorbate and catalase, which decrease rapidly during its conversion in meat. Therefore, the catalase levels or lipid content in muscle may be good markers of the meat quality. In this context, the development of the study described here has enabled students of a pilot class of Biochemistry I course of the MSc. in Veterinary Medicine, University of Évora, participate actively in the planning and preparation of a laboratory activity, with the purpose of determining nutritional and lipid peroxidation markers of meat of *Meleagris ocellata*, *Sus scrofa domesticus* and *Bos taurus*. The results obtained in gravimetric quantification of lipids and spectrometric determination of cholesterol and catalases, have mobilized students for a biochemical approach to characterization of meat from different animal origin. The assessment of skills developed by the students, observational and response to questionnaires before and after the completion of the various stages of the class revealed that they expanded their degree of compliance, in terms of laboratory skill acquisition, reading and interpretation of results, acquiring this so meaningful learning.

Keywords: Cholesterol; Catalase; Laboratory skills.

Introdução

O termo "carne" refere-se a todas as partes comestíveis da carcaça de um animal abatido. A carne inclui o tecido muscular magro adjacente, intra e intermuscular, e o tecido adiposo (Nollet, 2009, McAfee, 2010). A gordura



intramuscular corresponde a ácidos gordos acumulados no tecido adiposo intramuscular e nas fibras musculares, composto por adipócitos, isolados ou em grupo, dispostos ao longo das fibras e na área interfascicular (Nollet, 2009). Relativamente ao homem, o consumo de ácidos gordos saturados e colesterol é correlacionado com o risco de patologias cardiovasculares. Neste contexto, a determinação dos níveis de colesterol dos alimentos tornou-se uma questão relevante, tendo diversas publicações recomendado uma diminuição do consumo deste esteroide na prevenção de doenças cardíacas (Dinh, 2011; Nollet, 2009). Apesar de quimicamente estável, o colesterol é vulnerável à oxidação, uma vez que apresenta estrutura química com deslocalização eletrónica. Os produtos primários resultantes da oxidação do colesterol são peróxidos, fortemente reativos que se decompõem rapidamente, produzindo uma mistura complexa de derivados não-voláteis e voláteis, como aldeídos e cetonas, que afetam a qualidade geral do produto em termos do sabor e toxicidade (Pignoli, 2009). Assim a degradação oxidativa de lípidos e colesterol envolve mecanismos moleculares que geram espécies reativas de oxigénio (ROS) capazes de danificar a carne. Após o abate, o processamento da carne aumenta acentuadamente a sua deterioração oxidativa, reforçando reações entre ROS e compostos insaturados (Nollet, 2009). A qualidade da carne pode ser protegida por antioxidantes naturais que bloqueiam reações radicalares, comportando-se como segunda linha de defesa contra as ROS (Lee, 2010). No entanto, a primeira linha de defesa antioxidante inclui enzimas como catalases (CTT) que promovem a decomposição do H_2O_2 em O_2 e H_2O (Gatellier, 2005; Insani, 2008).

A execução desta actividade experimental ocupou três sessões laboratoriais de duas horas ao longo de três semanas, tendo-se utilizado amostras de carne para consumo de ave, suíno e bovino da cidade de Évora. O plano da aula, bem como, os protocolos experimentais foram elaborados e testados no âmbito da unidade curricular Atividades Complementares à Tese II, do 4º semestre do plano de Doutoramento em Bioquímica, desenvolvido pela primeira autora. Na primeira fase do trabalho efectuou-se uma exposição teórica com planificação acompanhada da atividade experimental. Em seguida, estimularam-se os alunos a aplicar os conhecimentos da extração por solventes, gravimetria, centrifugação e espectrometria de absorção molecular à execução do protocolo experimental, bem como à comparação do conteúdo em lípidos, colesterol e catalase de diferentes tipos de carne para consumo, contextualizando-se o ensino da Bioquímica na avaliação da qualidade das carnes, devido à progressiva importância atribuída pelos consumidores a esses parâmetros.



Objetivos

Gerais

Avaliar a qualidade da carne para consumo humano, recorrendo a marcadores bioquímicos da deposição de lípidos e colesterol, bem como da expressão funcional do enzima catalase (CTT, EC 1.11.1.6) (Domingos, 1987).

Específicos

Conhecer, compreender e dar valor a: (i) propriedades da carne para consumo humano, (ii) estrutura e propriedades biológicas de lípidos e colesterol; (iii) agentes e mecanismos que influenciam a peroxidação de lípidos e colesterol; (iv) papel biológico do enzima CTT; (v) metodologia para quantificar proteínas, lípidos, colesterol e catalases na carne. Aplicar os conhecimentos adquiridos para avaliar a qualidade da carne (nutricional/conservação), utilizando marcadores bioquímicos (Domingos, 1987).

Competências a Desenvolver

Processual

Desenvolver capacidade para: (i) identificar, seleccionar e operar com micropipetas e espectrómetros de absorção molecular; (ii) obter extratos lipídicos; (iii) obter curvas de calibração e curvas de reacção; (iv) quantificar lípidos, colesterol e catalases em carnes de diferente origem animal.

Concetual

Desenvolver capacidade para: (i) interpretar a simbologia de uso corrente em laboratórios de Bioquímica relativos à segurança de pessoas e instalações, conservação e manuseamento de carnes, armazenamento, manipulação e eliminação de resíduos; (ii) aplicar conceitos de fotometria e enzimologia à quantificação do colesterol e da catalase, (iii) discutir validade dos resultados; (iv) formular hipóteses sobre a qualidade da carne.

Social, atitudinal e axiológico

Desenvolver capacidade para expor e discutir planos de trabalho e resultados.



Competências Avaliadas

(i) planificação da atividade experimental: “influência dos níveis de colesterol e da atividade catalase na determinação da qualidade da carne”, (ii) obtenção de suspensões e extratos de carne, sua caracterização bioquímica, (iii) escolha e manuseamento adequado do equipamento necessário à execução da atividade experimental e (iv) obtenção de resultados experimentais precisos relativos à determinação da qualidade da carne por marcadores bioquímicos (Gómez, 2007).

Desenvolvimento da Atividade

O tema destaca a relevância do colesterol e das catalases como marcadores nutricionais ou antioxidantes da carne, enquadrando-se na unidade curricular Bioquímica I do primeiro ciclo do Mestrado integrado em Medicina Veterinária, da Universidade de Évora. Desenvolveu-se em dois instantes: I. Exposição teórica e planificação acompanhada da atividade experimental; II. Desenvolvimento da atividade experimental em quatro fases: (a) homogeneização do tecido, e preparação do extrato aquoso tamponado; (b) homogeneização do tecido e preparação do extrato de lípidos e colesterol; (c) obtenção da curva de calibração e quantificação do colesterol dos tecidos; (d) obtenção de curvas de reação e determinação da atividade catalase.

Estratégia

Abordagem experimental

A atividade decorreu no Laboratório de Bioquímica Analítica, Departamento de Química, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Évora, utilizando como material biológico músculo de *Meleagris ocellata*, *Sus scrofa domesticus* e *Bos taurus*, com recurso a técnicas como (i) pesagem em balança analítica e microanalítica; (ii) homogeneização de tecidos; (iii) extração por solventes; (iv) espectrometria de absorção molecular quantitativa e de varrimento de tempo.

Abordagem pedagógica

O universo incluiu uma turma-piloto de 12 membros inscritos na unidade curricular (UC) Bioquímica I do semestre ímpar do 1º ano do Mestrado integrado em Medicina Veterinária, da Universidade de Évora (2012-2013), com distribuição etária



de 17 (17%), 18 (75%) e superior a 19 (8%) anos de idade, sendo 25% do género masculino e 75% do género feminino frequentando pela 1ª vez a dita UC. A ação decorreu em 3 sessões de duas 2 h. A avaliação da atividade centrou-se na determinação das competências adquiridas durante e após a ação, recorrendo ao mesmo conjunto de perguntas problema colocadas antes e após a realização das quatro fases da atividade experimental.

Procedimento Experimental

O principal alvo

Aproximar jovens estudantes à problemática que envolve a importância do colesterol como nutriente e da catalase como antioxidante na determinação da qualidade da carne para consumo humano.

Protocolos

Nesta aula recorreu-se à homogeneização de carne de suínos (*Sus scrofa domesticus*), de bovinos (*Bos taurus*) e de aves (*Meleagris ocellata*), seguida pela obtenção do extrato rico em lípidos e colesterol, recorrendo à extração por solventes, separação de fases por centrifugação diferencial, filtração e secagem em corrente de N₂ (Folch, 1952), quantificação por espectrometria de absorção molecular do conteúdo em proteínas a 720 nm, segundo Lowry (1951) e do colesterol a 510 nm, segundo Baggio (2006), bem como à determinação da catalase (180 s, 240 nm) da carne em espectrómetro de absorção molecular Genesys 10S, à temperatura de 25 °C, em banho com circulação de água (Beers, 1952).

Análise estatística

A cada pergunta do inquérito de avaliação de competências foi atribuída pontuação entre 0 e 100, sendo as diferenças entre cada instante detetadas pelo teste *t-student* para amostras independentes. Na análise de pormenor foi aplicada pontuação às fases a, b, c e d da actividade, ANOVA II, teste post-hoc HSD de Tuckey, pelo Software SPSS (versão 22, Chicago, IL), licenciado para a Universidade de Évora. O grau de satisfação pessoal dos alunos recorreu a inquérito de opinião, e foi analisado pelo valor percentual das respostas obtidas em cada item (Sokal, 1997).

Organigrama do trabalho laboratorial

A apresentação de todo o procedimento experimental sob a forma de organigrama (imagem 1) permite obter uma percepção global de todo o trabalho.

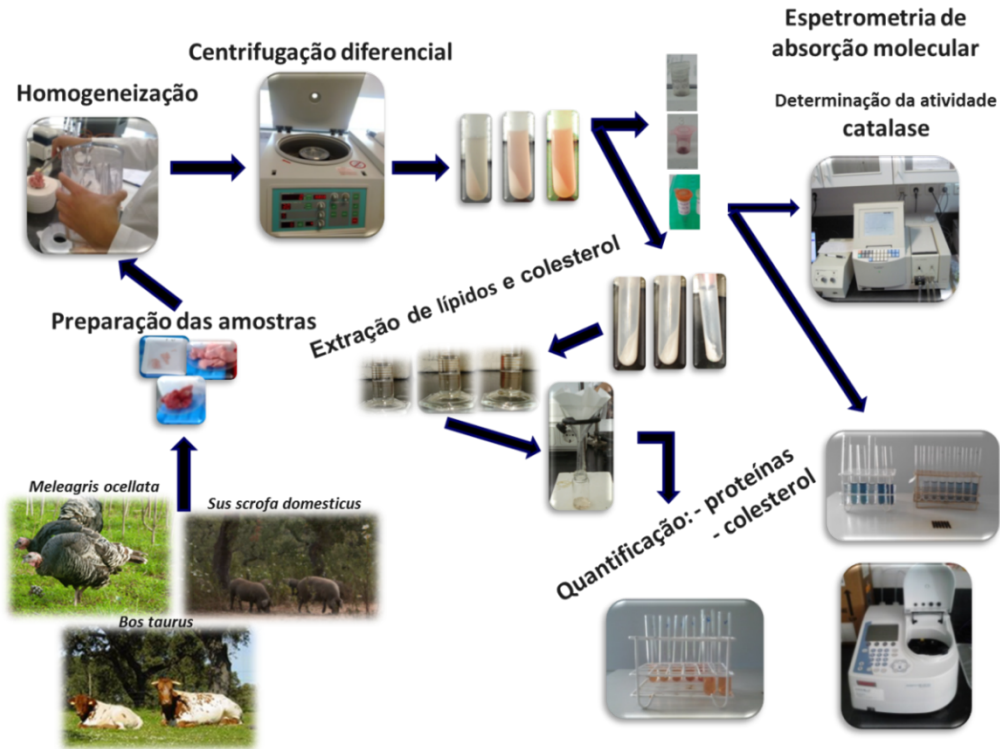


Imagem 1 – Esquema resumo do procedimento experimental adoptado

Resultados

Os resultados obtidos nos subtemas: (a) *determinação do conteúdo proteico aquossolúvel de amostras de carne* e (c) *determinação enzimática do conteúdo em colesterol, de diferentes amostras de carne* – permitiram traçar com sucesso curvas de calibração, A_{720nm} f [BSA] e A_{510nm} f [colesterol], lineares com coeficientes de correlação (r) entre 0,9964 e 0,9894, passando pela origem e consequentemente obedecendo à lei de Beer (imagem 2A e 2B). A análise crítica dos mesmos permitiu identificar fragilidades operacionais, interpolar os valores de absorvência das amostras de carne e valorizar a obtenção de curvas de calibração com qualidade, como ponto de partida fulcral para a quantificar proteínas aquossolúveis e colesterol na carne. A interpretação dos resultados obtidos para cada amostra mostrou que a carne de suíno possuía o nível mais elevado de proteínas aquossolúveis enquanto a de bovino ficava



pelo valor menor (imagem 2D). Por outro lado, as carnes de suíno e de bovino exibiram níveis superiores de colesterol enquanto a de peru exibiu o menor valor (imagem 2F). A determinação do conteúdo em colesterol ilustrou ainda a aplicabilidade de enzimas à quantificação de materiais biológicos.

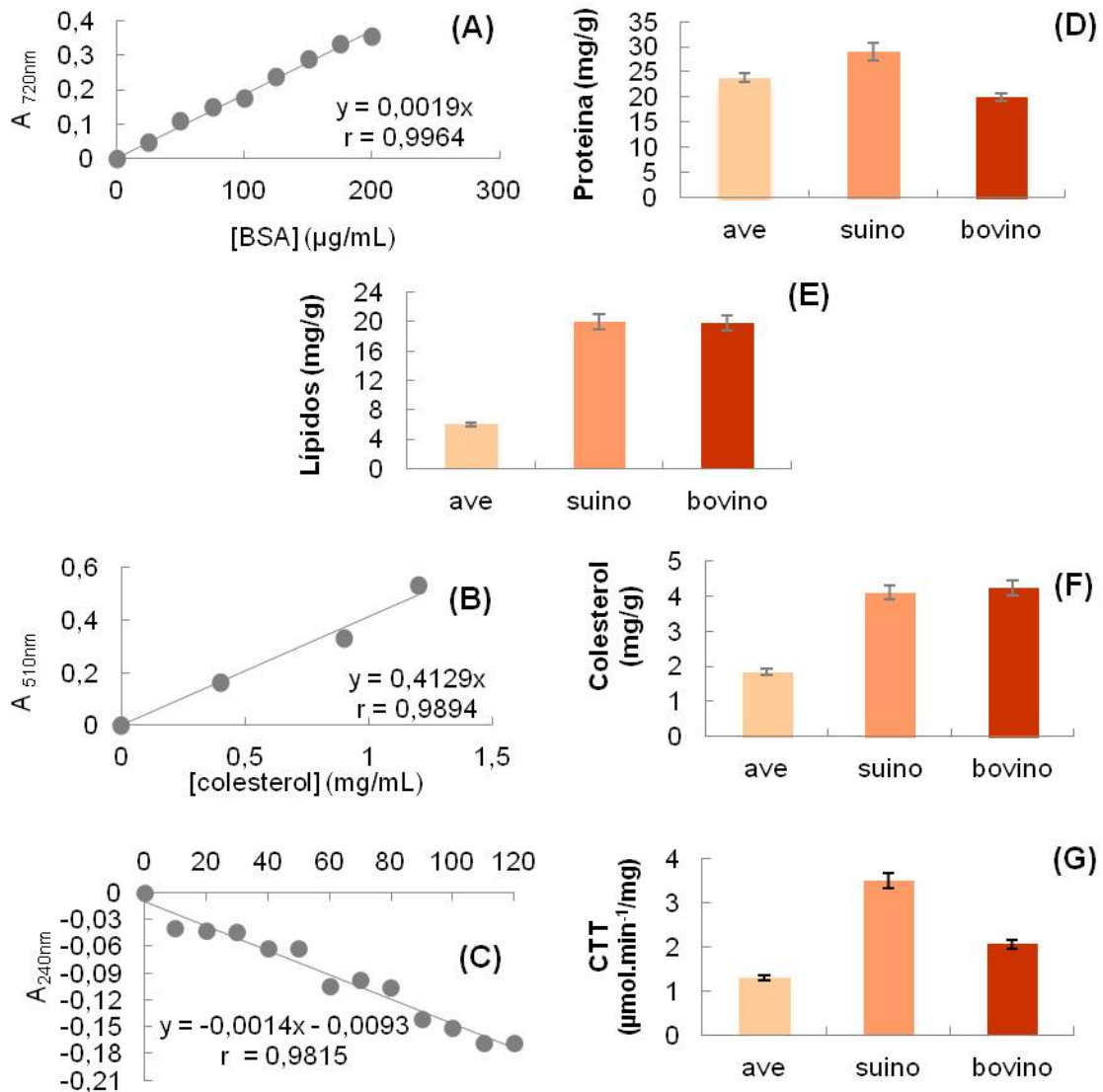


Imagem 2 – Curvas de calibração de proteínas (A) e colesterol (B), bem como de reacção CTT (C); conteúdo em proteínas aquossolúveis (D), lípidos (mg/g) (E) e colesterol (mg/g) (F), atividade específica CTT ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg}$) (G) de amostras de carne de ave, suíno e bovino para consumo na cidade de Évora.

Os resultados obtidos no subtema (b) - *determinação do conteúdo lipídico de amostras de carne* – exibidos na imagem 2E mostraram que as carnes de suíno e de

bovino apresentavam conteúdo lipídico superior ao da carne de peru, confirmando o perfil lipídico usualmente descrito na literatura (Dinh, 2011). Por fim o sub-tema: *determinação da atividade enzimática catalase (CTT)* permitiu testar numa primeira aproximação a linearidade da reação, a partir de curvas de reacção como a ilustrada na imagem 2C, tendo-se obtido retas com coeficientes de correlação entre 0,9875 e 0,9966. Numa segunda fase os alunos tiveram oportunidade de calcular a referida atividade enzimática a partir dos coeficientes angulares das curvas obtidas, bem como a atividade específica utilizando o conteúdo proteico determinado previamente. O valor mais elevado da atividade antioxidante CTT foi detetado na carne de suíno, seguido pela de bovino e finalmente nas amostras de ave (imagem 2G).

Os estudantes registaram igualmente as referidas diferenças e postularam eventuais interpretações do fenómeno, admitindo alguns deles, durante o espaço de discussão que o elevado conteúdo lipídico e em colesterol das amostras de carne de suíno e de bovino poderá ter determinado a indução de mecanismos de defesa como a catalase correlacionável com o índice de espécies reativas de oxigénio.

A pontuação média obtida antes e após a atividade experimental 23,0 e 62,20 %, respetivamente, revelaram uma evolução global positiva das competências desenvolvidas pelos alunos, no que diz respeito à seleção e manipulação de micropipetas e espectrómetros de absorção molecular, à obtenção de extratos de carne enriquecidos em lípidos e colesterol, à obtenção de curvas de calibração por métodos químicos e enzimáticos, bem como de curvas de reação, inferindo a sua utilidade, na determinação do conteúdo em colesterol e catalases de carnes com diferente origem animal (imagem 3). O teste *t-student* revelou que essa evolução corresponde a uma diferença significativa com um acréscimo de 39,20 pontos percentuais, na pontuação média obtida após o desenvolvimento da atividade experimental ($p < 0,05$) (imagem 3A). Os estudantes revelaram ainda aquisição de competências para aplicar conceitos de enzimologia e discutir limites de validade dos resultados que incluem o observador, equipamentos e técnicas para quantificar materiais, discutindo em equipa hipóteses interpretativas da qualidade nutritiva e do valor comercial das carnes analisadas. A imagem 3B revela ainda de forma mais detalhada um efeito positivo, com significado estatístico das fases de desenvolvimento experimental a, b, c e d ($p < 0,05$), entre os instantes de avaliação, antes e após a realização da atividade experimental ($p < 0,05$).

Os resultados referentes ao inquérito de opinião relativo à atividade letiva onde os alunos expressaram a sua opinião quanto à forma como avaliaram o



acompanhamento teórico e experimental do docente, o impacto da atividade nos seus conhecimentos acerca da investigação com tecidos animais, bem como, as suas aplicações em estudos de qualidade da carne, revelaram que a maioria dos inquiridos considerou a duração da atividade boa (90%), assim como, adequados os meios de trabalho (89%) e o grau de dificuldade (100%).

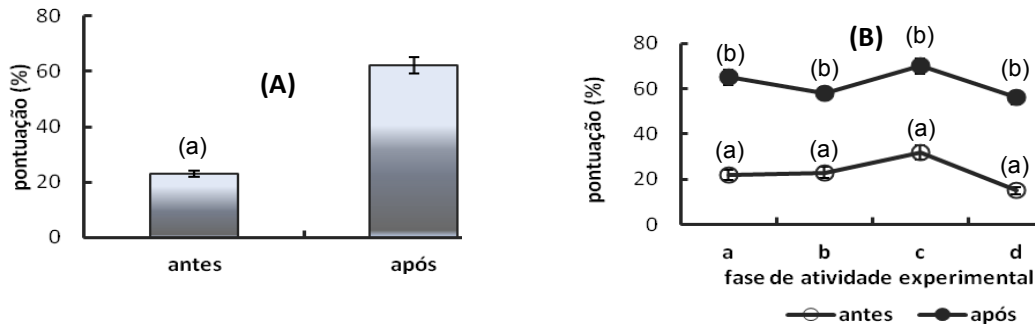


Imagem 3 – Pontuação média obtida pelos alunos, antes e após o desenvolvimento da ação (A). Pontuação média obtida pelos alunos, antes e após cada fase da atividade experimental (B). Os valores são apresentados como a média \pm SEM e as diferenças entre as médias dos dois grupos são estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Em termos do grau de satisfação, 90%/10% dos estudantes consideraram bom/excelente participar nesta atividade laboratorial, realçando a oportunidade de aplicar técnicas separativas e espetrométricas à determinação da qualidade da carne para consumo. Relativamente aos aspetos que menos gostaram, esses prenderam-se com os tempos de espera (10%), embora grande parte dos alunos não tenham referido algo menos bom. Quanto ao grau de satisfação e aprendizagem, a maioria dos estudantes (89%) consideraram que aprenderam de forma agradável, tendo 70% referido que foi importante correlacionar os aspetos teóricos com a sua aplicação prática, sentindo que os docentes os incentivaram a refletir e a questionarem-se sobre todo o processo (80%) adquirindo conhecimentos que podem vir a ser importantes para o seu futuro profissional, estando 60% totalmente de acordo e 40% apenas de acordo com esta afirmação. A totalidade dos alunos (60% concordaram totalmente/40% concordaram) que se continue a oferecer esta atividade aos alunos de Medicina Veterinária (MI) de modo a proporcionar uma relação mais direta entre o ambiente escolar e a sua aplicação a problemas do quotidiano.



Conclusões

Os alunos da turma-piloto de Bioquímica I, do 1º ano de Medicina Veterinária (MI) participaram com sucesso no planeamento da atividade: “A Bioquímica e a qualidade da carne para consumo – uma aproximação experimental para alunos do 1º Ano de Medicina Veterinária”, bem como na preparação da atividade laboratorial que permitiu ampliar valências como: (i) escolha e manuseamento adequado do equipamento para os ensaios, (ii) obtenção de suspensões e extratos de carne, (iii) caracterização bioquímica dos extratos obtidos (iv) determinação da qualidade da carne por marcadores bioquímicos.

Os resultados obtidos: (i) massa de extrato lipídico, (ii) curvas de calibração para proteínas e colesterol obedecendo à lei de Beer e (iii) curvas de reação para CTT, lineares nos instantes iniciais da reação despoletaram nos estudantes uma motivação particular para prosseguir a execução do protocolo, quantificando proteínas, lípidos, colesterol e enzima CTT nas amostras de carne recolhidas, ampliando os seus conhecimentos relativos à qualidade da carne para consumo e eventuais consequências no seu valor comercial.

A avaliação de competências desenvolvidas pelos alunos, perante uma série de perguntas problema colocadas antes e após a realização da atividade experimental revelou que estes melhoraram o seu grau de cumprimento, adquirindo desse modo uma aprendizagem significativa (Araújo, 2008, Domingos, 1987).

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Fatores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, no âmbito do Projecto Estratégico PEst-C/AGR/UI0115/2011.

Referências Bibliográficas

- Araújo, S. (2008). *Contributos para uma educação para a cidadania: professores e alunos em contexto intercultural*. Editorial do Ministério da Educação: Lisboa.
- Baggio, S. R., Bragagnolo, N. (2006). Cholesterol oxide, cholesterol, total lipid and fatty acid contents in processed meat products during storage, *LWT*, 39, 513–520.
- Beers, R., Sizer. I. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown



- of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.*, 195, 133-140.
- Dinh, T. T. N., Thompson, L. D., Galyean, M. L., Brooks, J. C., Patterson K. Y., and Boylan, L. M. (2011). Cholesterol content and methods for cholesterol determination in meat and poultry, *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 10, 269-289.
- Domingos, A. M., Neves, I. P. & Galhardo, L. (1987). *Uma forma de estruturar o ensino e a aprendizagem*, Livros Horizonte, LDA: Lisboa.
- Folch, J., Lees, M., Sloane, S. G. H. (1956). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, 1, 497-509.
- Gatellier, P., Mercier, Y., Juin, H., Renner, M. (2005). Effect of finishing mode (pasture- or mixed-diet) on lipid composition, colour stability and lipid oxidation in meat from Charolais cattle, *Meat Science*, 69, 175–186.
- Gómez, G., Ruiz, M., Sáiz, M. (2007). Evaluación de Competências en un Contexto de Aprendizaje Mixto. (pp.39-43). Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz: Cádiz.
- Hur, S. J., Park, G. B., Joo, S. T. (2007). Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products, *Food Control*, 18, 939–947.
- Insani, E. M., Eyherabide, A., Grigoni, G., Sancho, A. M., Pensel, N. A., Descalzo, A. M. (2008). Oxidative stability and its relationship with natural antioxidants during refrigerated retail display of beef produced in Argentina, *Meat Science*, 79, 444–452.
- Lee, M., Choi, J., Choi, Y., Han, D., Kim, H., Shim, S., Chung, H., Kim, C. (2010). The antioxidative properties of mustard leaf (*Brassica juncea*) kimchi extracts on refrigerated raw ground pork meat against lipid oxidation, *Meat Science*, 84, 498–504.
- Lowry, O., Rosebrough G., Farr, A. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Mcafee, A.J., Mcsorley, E.M., Cuskelly, G.J., Moss, B.W., Wallace, J.M.W., Bonham, M.P., Fearon, A.M. (2010). Red meat consumption: An overview of the risks and benefits, *Meat Science*, 84, 1-13.
- Nollet, L. M. L., Toldrá, F. (2009). Handbook of Muscle Foods Analysis, (pp. 990-1000) Taylor & Francis Group, London.
- Pignoli, G., Bou, R., Rodriguez-Estrada, M. T.; Decker, E.A. (2009) - Suitability of saturated aldehydes as lipid oxidation markers in washed turkey meat, *Meat Sci.* 83, 412–416.
- Pratiwi, N. M. W., Murray, P. J., Taylor, D. G. (2006). Total cholesterol concentrations



of the muscles in castrated Boer goats, *Small Rum. Res.*, 64 , 77–81.

Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. (1997). *Biometry*. W. H. Freeman: New York.