

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial**



Tese

**ÁCIDO ASCÓRBICO, ERITORBATO E MISTURA COMERCIAL NA REDUÇÃO DA  
OXIDAÇÃO DE HAMBURGUER BOVINO PROCESSADO COM ÁGUA OZONIZADA**

**PRISCILA VASCONCELLOS CHIATTONE**

Pelotas, 2010.

**PRISCILA VASCONCELLOS CHIATTONE**

**Bel. Química de Alimentos**

**Mestre em Ciências**

**ÁCIDO ASCÓRBICO, ERITORBATO E MISTURA COMERCIAL NA REDUÇÃO DA  
OXIDAÇÃO DE HAMBURGUER BOVINO FORMULADO COM ÁGUA OZONIZADA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências (Ciência e Tecnologia Agroindustrial).

Orientador: PhD. Rui Carlos Zambiasi

Pelotas, 2010.

**Dados de catalogação na fonte:**

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

C532a Chiattonne, Priscila Vasconcellos  
Ácido ascórbico, eritorbato e mistura comercial na redução da oxidação de hambúrguer bovino processado com água ozonizada / Priscila Vasconcellos Chiattonne; orientador Rui Carlos Zambiasi. – Pelotas, 2010. – 123f. : il. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

1.Hambúrguer. 2.Antioxidantes. 3.Ozônio. 4.Oxidação. 5.Lipídios. 6.Colesterol. I.Zambiasi, Rui Carlos. II.Título.

CDD: 664.926

**BANCA EXAMINADORA**

**PhD. Rui Carlos Zambiasi – UFPel**

**Dra. Leonor Almeida de Souza Soares – FURG**

**Dra. Cristiane Brauer Zaicovski – CAVG/UFPel**

**Dra. Márcia Monks Jantzen - UFPel**

À minha família,  
pelo amor incondicional,  
dedico.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rui Carlos Zambiasi pela orientação, apoio, estímulo, sugestões, paciência e amizade.

Aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – UFPel.

À professora Neura Bragagnolo da UNICAMP, pelo auxílio nas análises de óxidos de colesterol.

A todos os colegas do PPGCTA, pelo apoio e incentivo durante o trabalho.

À Heloisa Antunez , amiga e companheiras de ozônio.

À Tatiane Fonseca Pires, querida estagiaria que me ajudou muito.

Às amigas Lisiane Torres, Renata Filgueras, Cristiane Simões da Costa e Cristiane Zaicovski pela amizade, carinho, incentivo e auxílio em todos os momentos.

À indústria OZ- Engenharia pelo convênio realizado com a UFPel e por ceder o equipamento gerador de Ozônio.

À Capes, fonte de financiamento para esta pesquisa.

Aos meus pais, Nara e Volni, pelo amor e incentivo durante todos os anos de meus estudos. Às minhas irmãs Michele e Melissa simplesmente por existirem, pois não seria o que sou sem o amor, companheirismo e amizade delas.

Ao meu companheiro de estudos, amor e amizade, Fernando Maraninchi, quem acompanhou e incentivou todos meus esforços para conclusão deste trabalho.

Finalmente, a Deus...

“A vida é para quem topa qualquer parada. Não para quem pára em qualquer topada.”

Bob Marley

## RESUMO

CHIATTONE, Priscila Vasconcellos. **Ácido ascórbico, eritorbato e mistura comercial na redução da oxidação de hambúrguer bovino processado com água ozonizada.** 2010. 123 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O uso do ozônio nos alimentos reduz a carga de microrganismos e esporos, em níveis que dependem da sua forma de aplicação e de sua concentração. A grande vantagem de seu uso perante outros agentes sanitizantes é que o ozônio age diretamente na parede celular, causando sua ruptura e morte em menor tempo de contato, inviabilizando a recuperação dos microrganismos após o ataque, além de não deixar residual químico nos alimentos. Porém praticamente inexistem dados sobre a ação do ozônio sobre os lipídeos presentes nos alimentos. Neste estudo objetivou-se avaliar o efeito da ozonização sobre os ácidos graxos e o colesterol em hambúrguer bovino elaborado com os antioxidantes ácido ascórbico, eritorbato de sódio e mistura de ácido cítrico e eritorbato de sódio. Após o processamento e durante o período de estocagem sob congelamento, foram realizadas as análises do perfil de ácidos graxos, e da acidez, pH, ácido tiobarbitúrico, índice de peróxidos, colesterol e óxidos de colesterol. A adição de 0,6 ppm de ozônio na formulação de hambúrgueres causou oxidação nos seus ácidos graxos, aumentando a proporção de ácidos graxos saturados. Porém, os resultados de TBARS, mesmo sendo mais altos para a amostra com ozônio, ficaram abaixo do limite recomendado para amostras oxidadas. O ozônio não esteve associado a presença dos óxidos 7 $\beta$ -Hidroxicolesterol e de 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol nos hambúrgueres, mas esteve associado a presença do 7-cetocolesterol. No entanto, esse valor, quando comparado com os citados na literatura encontrados em alimentos, é considerado baixo.

**Palavras-chave:** hambúrguer, ozônio, oxidação, lipídios, colesterol, antioxidantes.



## ABSTRACT

CHIATTONE, Priscila Vasconcellos. **Ácido ascórbico, eritorbato e mistura comercial na redução da oxidação de hambúrguer bovino processado com água ozonizada.** 2010. 123 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The application of ozone during the sanitization process causes a reduction of microorganisms and spores population at levels that depends on their form of application and its concentration. The great advantage of its use to other sanitizers is that the ozone acts directly on the cell wall, causing its collapse and death in less time of contact, preventing the recovery of microorganisms after the attack, and do not leaving residual chemicals in the food. However practically there is no data about the lipid effect due to the application of ozone on foods. This study aimed to evaluate the effect of ozonization on the fatty acid profile of meet hamburger containing the antioxidant ascorbic acid, sodium erythorbate and mixture of citric acid and sodium erythorbate. After processing and during the period of storage under freezing, were done the analysis of the fatty acid profile, and the acidity, pH, tiobarbituric acid, peroxide value, cholesterol and cholesterol oxides. The addition of 0.6 ppm of ozone resulted in the formulation of hamburgers in their fatty acid oxidation, increasing the proportion of saturated fatty acids. However, the results of TBARS, although higher for the sample with ozone, were below the limit recommended for oxidized samples. Ozone was not related with the presence of  $7\beta$ -hydroxycholesterol and  $7\alpha$ -hydroxycholesterol oxides, but it was associated with the presence of 7-ketocholesterol. However, this value, when compared with the existing literature to food is considered low.

**Keywords:** hamburger, ozone, oxidation, lipids, antioxidants, cholesterol, antioxidants.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Molécula de Colesterol.....	25
Figura 2 – Fómula estrutural do ácido ascórbico.....	35
Figura 3 – Fómula estrutural do ácido eritórbico.....	38
Figura 4 – Fómula estrutural do ácido cítrico... ..	39

### CAPÍTULO 1

Figura 1 – Estrutura do ozônio molecular.....	54
Figura 2 – Síntese de ozônio pelo método de descarga elétrica.....	54
Figura 3 – Mecanismo de ação do ozônio nos microrganismos.....	58
Figura 4 – Imagem de esporo de <i>B. subtilis</i> OSU494 por micorscopia de transmissão.....	60

### CAPÍTULO 2

Figure 1 – Hamburger elaboration squeme.....	77
Figure 2 – Peroxide value (meq.kg <sup>-1</sup> ) of hamburgers during the storage period.....	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentuais relativos de ácidos graxos insaturados encontrados em carnes de diferentes fontes.....	21
<b>CAPÍTULO 1</b>	
Tabela 1 – Relação da temperatura e da solubilidade do ozônio em água.....	56
Tabela 2 – Poder oxidante relativo de desinfetantes.....	58
<b>CAPÍTULO 2</b>	
Table 1 – Formulation of hamburgers (%).....	78
Table 2 – Acidity (%) of the hamburgers after processing and during storage time....	81
Table 3 – pH value of hamburgers during the storage period.....	82
Table 4 – TBARS values of hamburgers during the storage period (mg Malonaldehyde/kg sample).....	87
Table 5 – Fatty acid profile of the hamburgers after processing (T1).....	92
Table 6 – Fatty acid profile of the hamburgers after two months of storage (T2).....	94
Table 7 – Fatty acid profile <sup>1</sup> of the hamburgers after four months of storage (T3).....	96
<b>CAPÍTULO 3</b>	
Tabela 1 – Formulação dos hambúrgueres (%).....	106
Tabela 2 – Conteúdos de colesterol, 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol em hambúrgueres processados com ozônio e antioxidantes após o processamento.....	110
Tabela 3 – Conteúdos de colesterol, 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol em hambúrgueres processados com ozônio e antioxidantes após 4 meses de armazenamento a -18°C.....	113

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	vii
<b>ABSTRACT.....</b>	viii
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	ix
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	x
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	14
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	16
<b>2.1 Hambúrguer.....</b>	16
<b>2.1.1 História.....</b>	16
<b>2.1.2 Aspectos gerais.....</b>	17
<b>2.2 Caracterização da matéria-prima: carne bovina.....</b>	18
<b>2.3 Perfil de ácidos graxos de carne.....</b>	19
<b>2.4 Oxidação lipídica.....</b>	21
<b>2.4.1 Oxidação lipídica em carnes.....</b>	24
<b>2.5 O Colesterol e seus produtos de oxidação (COPs).....</b>	26
<b>2.6 Colesterol e óxidos de colesterol em carnes.....</b>	29
<b>2.7 A ação dos Antioxidantes: Ácido Ascórbico, ácido cítrico e eritorbato sódio.....</b>	33
<b>2.7.1 Ácido Ascórbico.....</b>	35
<b>2.7.2 Eritorbato de sódio.....</b>	38
<b>2.7.3 Ácido cítrico.....</b>	39
<b>2.8 O Uso do ozônio na indústria de alimentos.....</b>	40
<b>3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	41
<b>4 CAPÍTULO 1: O uso do ozônio na indústria de alimentos.....</b>	51
<b>RESUMO.....</b>	51
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	52
<b>PROPRIEDADES FISICO-QUÍMICAS.....</b>	53

<b>SÍNTESE</b> .....	54
<b>ESTABILIDADE EM MEIO AQUOSO</b> .....	55
<b>MEDIÇÃO DE OZÔNIO</b> .....	56
<b>EFEITO GERMICIDA</b> .....	57
<b>USO NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA</b> .....	60
<b>EFEITO NA SAÚDE HUMANA</b> .....	66
<b>CONCLUSÃO</b> .....	66
<b>SUMMARY</b> .....	67
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	67
<b>5 CAPÍTULO 2: Effect of ozone application on bovine hamburger lipids formulated with different antioxidants</b> .....	74
<b>Summary</b> .....	74
<b>Introduction</b> .....	75
<b>Materials and methods</b> .....	76
<b>Results and Discussion</b> .....	80
<b>Conclusions</b> .....	97
<b>Acknowledgements</b> .....	97
<b>References</b> .....	98
<b>6 CAPÍTULO 3: Efeito da ozonização sobre o colesterol em hambúrguer bovino</b> .....	102
<b>RESUMO</b> .....	102
<b>ABSTRACT</b> .....	102
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	103
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	106
<b>RESULTADOS E DISCUSSOES</b> .....	109
<b>CONCLUSÕES</b> .....	115
<b>Agradecimentos</b> .....	116
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	116

**7 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 122**

## **1 INTRODUÇÃO GERAL**

A demanda por produtos semi-industrializados vem aumentando principalmente pela facilidade do preparo. Outra vantagem de consumo desses produtos está na sua segurança alimentar, uma vez que nas formulações geralmente constam aditivos e conservantes, embora estas substâncias não tenham a tendência de aceitação por parte dos consumidores.

Atualmente, estuda-se como uma das alternativas a substituição desses aditivos pelo processo de ozonização, a qual reduz a contagem bacteriana inicial nos alimentos de origem vegetal e animal. Porém, o ozônio, por ter uma forte ação oxidante, aumenta a formação de radicais livres, acelerando as reações de oxidação de vários compostos, como dos ácidos graxos, o que é indesejável nos alimentos.

Os produtos oriundos da oxidação de lipídeos (peróxidos e os produtos de sua degradação) podem ser absorvidos pelo organismo humano (fígado) e, até mesmo na ausência de absorção pelo fígado representam riscos para a mucosa intestinal. Os peróxidos afetam a atividade de diversas enzimas, alteram as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) que estão envolvidas no desenvolvimento de lesões arteroscleróticas e interagem com o DNA, atuando como promotores da carcinogênese. Acredita-se que a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) seja a principal causa das

doenças cardiovasculares, e que a decomposição de peróxidos formados pela ação da lipoxigenase pode ser o passo inicial da oxidação do LDL.

Os hidroperóxidos de ácidos graxos polinsaturados formados durante a oxidação lipídica propiciam o processo de oxidação do colesterol. Sabe-se que os produtos da oxidação do colesterol (COPs) são mais prejudiciais para as células arterianas que o próprio colesterol e estão diretamente envolvidos com o desenvolvimento de arteriosclerose e doenças coronárias (GUARDIOLA et al., 1996; BÖSSINGER et al., 1993).

A interação entre antioxidantes contribui para reduzir a oxidação dos ácidos graxos; porém, não há estudos demonstrando a possibilidade de controlar a oxidação causada pelo ozônio em produtos cárneos através do uso de antioxidantes. Uma alternativa para reduzir a formação de radicais livres, e especialmente os COPs, poderia ser o uso dos antioxidantes normalmente utilizados em produtos cárneos, como o ácido ascórbico, eritorbato de sódio e o ácido cítrico.

Em função disto, este estudo teve como principal objetivo avaliar o efeito da aplicação de ozônio e de ozônio combinado com aditivos, sobre a oxidação de ácidos graxos e na formação de produtos de oxidação do colesterol, em hambúrgueres processados com carne bovina.



## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFIA**

### **2.1 Hambúrguer**

#### **2.1.1 História**

No século XIII, os cavaleiros tártaros utilizavam uma técnica peculiar para moer a carne dura e crua levando-a na sela de seus cavalos. Após horas de galope o alimento se transformava em uma pasta mais fácil para mastigar. Era o chamado "bife tártaro", que se consumia cru, como ainda se serve em restaurantes, acompanhado de uma gema de ovo também crua. Cinco séculos mais tarde o alimento chegou ao porto de Hamburgo, na Alemanha, onde se incorporou aos hábitos alimentares da população local (JOAKIN'S, 2008; RAMALHO, 2008).

No início do século XIX, imigrantes alemães levaram para os Estados Unidos a receita já adaptada aos seus costumes, que consistia em grelhar a carne levemente com cebolas. No final desse século um dono de restaurante em Washington teve a idéia de colocar o hambúrguer entre duas fatias de pão e transformá-lo em sanduíche (COSTA, 2004).

A introdução do hambúrguer nos costumes do brasileiro deve-se ao americano Robert Falkenburg, campeão de tênis em Wimbledon, que apostou nessa idéia e abriu

em 1952, no Rio de Janeiro, a primeira lanchonete que seguia os padrões americanos. Atréadas ao hambúrguer vieram outras novidades como o *milk shake* e o *sundae*. O sucesso aconteceu imediatamente, e esta lanchonete passou a fazer parte da crônica social do Rio e do Brasil. Celebidades da época como o compositor Villa Lobos, o músico de jazz Booker Pittman, entre outros, eram freqüentadores assíduos do local (COSTA, 2004; RAMALHO, 2008).

### **2.1.2 Aspectos Gerais**

Mediante a importância e a popularidade do consumo de carnes, sua transformação em produtos industrializados é de suma importância para a praticidade, variedade e balanceamento do cardápio. Essa diversificação de oferta inclui um grande número de produtos como almôndegas, hambúrgueres, empanados, lingüiças, mortadelas, salames, entre outros.

O consumo do hambúrguer se expandiu no globo e como qualquer outra mercadoria globalizada teve que se adequar a culturas e costumes muito diferentes; na Índia, por exemplo, utiliza-se carne de carneiro no lugar da bovina (A história do hambúrguer, 2004).

Entende-se por Hambúrguer o produto cárneo industrializado, obtido da carne moída dos animais de açougue, adicionado ou não de tecido adiposo e ingredientes, moldado e submetido a processo tecnológico adequado. Trata-se de um produto que pode ser produzido cru, semi-frito, cozido, frito, congelado ou resfriado (INSTRUÇÃO NORMATIVA N.20, DE 31 DE JULHO DE 2000).

Alguns ingredientes podem ser acrescentados na formulação do hambúrguer, sendo denominados de ingredientes opcionais: gordura animal, gordura vegetal, água, sal, proteínas de origem animal e/ou vegetal, leite em pó, açúcares, maltodextrina, aditivos intencionais, condimentos, aromas e especiarias, vegetais e queijos (INSTRUÇÃO NORMATIVA N.20, DE 31 DE JULHO DE 2000).

A partir da formulação (matérias-primas) podem-se produzir vários tipos de hambúrgueres. Os tipos de hambúrguer comercializados no Brasil em relação à matéria-prima são: hambúrguer de carne bovina ou hambúrguer bovino, hambúrguer de carne suína ou hambúrguer suíno, hambúrguer de carne de peru ou hambúrguer de peru, hambúrguer de carne de frango ou hambúrguer de frango (COSTA, 2004).

Durante o processo de obtenção dos produtos moídos e emulsificados, existem fatores que afetam a qualidade do produto final e que devem ser controladas, tais como: a qualidade da matéria prima, o tipo de equipamento utilizado, o nível de redução e a temperatura da carne durante o processo (ROCHA, 2001).

Segundo Pardi et al. (1993), a carne é um dos alimentos mais suscetíveis à deterioração microbiana, sendo que o grau de higienização do abatedouro influencia no tipo e no número de microrganismos presentes. A flora microbiana da carne moída depende das aparas e recortes a serem utilizados, da higiene adotada durante o processo de moagem, do tipo de embalagem, do processamento e das condições de estocagem (ALMEIDA; SCHNEIDER, 1983 apud COSTA et al., 2004).

## **2.2 Caracterização da matéria-prima: carne bovina**

Nos últimos anos criou-se uma falsa idéia de que o consumo de produtos de origem animal, principalmente da carne bovina, estaria associado à incidência de doenças cardiovasculares. No entanto, a maioria das informações veiculadas, por ignorância ou falta de conhecimento, tem sido apresentadas de forma exagerada e sensacionalista. São ressaltados apenas os aspectos negativos, ignorando-se a importância da carne bovina como um dos principais componentes de uma dieta saudável (VALLE 2000; FREITAS, 2006).

A carne bovina magra é considerada um alimento de alta densidade nutricional, por apresentar em sua composição uma grande quantidade de nutrientes, com alta

disponibilidade e baixo valor calórico. Ela é rica em proteínas de alta qualidade (por conter os amino ácidos isoleucina, lisina, leucina, triptofano, treonina, metionina, fenilalanina, valina e histidina), em ácidos graxos essenciais (ácido linoléico e linolênico), em vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina, niacina, biotina, ácido pantotênico, folacina, vitaminas B6 e B12) e em minerais como ferro, zinco e fósforo. Todos os nutrientes contidos na carne bovina são de primordial importância na alimentação (VALLE 2000; LOBATO; FREITAS, 2006).

No entanto, informações sobre as carnes vermelhas têm sido veiculadas de forma distorcida e sem o devido respaldo científico. Sabe-se hoje que o consumo excessivo de gordura, seja de origem vegetal ou animal, é um fator de risco considerável no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Quando, no entanto, a gordura for ingerida de forma consciente e controlada, é altamente benéfica à saúde humana. Além de conferir sabor aos alimentos, a gordura também desempenha papel importante no transporte e absorção das vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) pelo organismo (VALLE 2000).

### **2.3 Perfil de ácidos graxos de carnes**

Os ácidos graxos presentes nas carnes podem ser classificados em: saturados (ácidos graxos sem dupla ligação em suas cadeias) e insaturados (ácidos graxos com uma ou mais ligações duplas em suas cadeias), sendo estes últimos divididos em: monoinsaturados (com uma insaturação ou dupla ligação), diinsaturados e poliinsaturados (com duas ou mais insaturações, respectivamente) (LOBATO; FREITAS, 2006).

Os ácidos graxos com mais de uma dupla ligação (ômega6 –  $\omega_6$  e ômega3 –  $\omega_3$ ) são considerados essenciais devido a incapacidade do organismo de sintetizá-los, motivo pelo qual devem ser incorporados na dieta. Além destes, o ácido linoléico conjugado (CLA), encontrado apenas em produtos de ruminantes, tem se mostrado

como anticarcinogênico, antiarterosclerótico, antitrombótico, hipocolesterolêmico, imunoestimulatório, atuando no aumento de massa muscular, reduzindo a gordura corporal e prevenindo diabetes. Segundo Academia de Ciência dos Estados Unidos, este ácido graxo é reconhecido por evitar o aparecimento de câncer e combatê-lo depois de instalado (LOBATO; FREITAS, 2006).

Nos alimentos em geral, bem como na carne, são identificados inúmeros ácidos graxos que compõem a fração gordurosa dos tecidos de bovinos, mas praticamente seis deles são os mais representativos e correspondem a cerca de 90% do total. Neste conjunto estão presentes o ácido mirístico (C14:0), o palmítico (C16:0), o esteárico (C18:0), o palmitoléico (C16:1  $\omega$ 7), o oléico (C18:1  $\omega$ 9) e o linoléico (C18:2  $\omega$ 6) (LOBATO; FREITAS, 2006).

A gordura subcutânea de aves, suínos e bovinos apresentam em média, respectivamente, 33, 45 e 54% de ácidos graxos saturados. Independente da localização das gorduras da carne, o ácido graxo mais abundante é o ácido oléico, representando cerca de 40% do total dos ácidos graxos. Entretanto, outros ácidos graxos presentes em altas proporções são saturados, como o ácido palmítico (27%) e o esteárico (13%). Assim, as gorduras da carne são rotuladas como saturadas, enquanto que as gorduras vegetais são consideradas insaturadas, por apresentarem percentuais inferiores de gorduras saturadas (BONFIM, 2003).

Segundo Kuss et al. (2006), os principais ácidos graxos presentes na gordura intramuscular de *Longissimus dorsi* de vacas de descarte são os ácidos oléico (40,95 %), palmítico (30,13 %) e esteárico (19,32%), representando 90,4 % do total dos ácidos graxos.

Freitas (2006) avaliou o perfil de ácidos graxos de novilhos Nelore recriados em pastagens e terminados em confinamento com 22 meses de idade, constatando que esses apresentaram 3,2% de ácidos graxos poliinsaturados, 41,6% de ácidos graxos monoinsaturados e 54,8% de ácidos graxos saturados.

Na tab. 1, apresentada por Araújo (2004), pode-se visualizar a composição de ácidos graxos insaturados de carne de carneiro, boi, porco, frango e peixe. No entanto, cabe salientar que essas quantidades representam valores médios, pois suas quantidades podem variar de acordo com o tipo de músculo do animal, tipo de dieta, dentre outros fatores.

Os ácidos graxos poliinsaturados mais representativos na carne bovina são os ácidos linoléico (C18:2  $\omega$ 6) e araquidônico (C20:4  $\omega$ 6) (LAGE, 2003). Neste grupo de ácidos graxos, atenção tem sido dada para os  $\omega$ 6 e  $\omega$ 3. Os ácidos graxos de cadeia longa da família  $\omega$ 3 - eicosapentaenóico (C20:5  $\omega$ 3) e docosahexaenóico (C22:6  $\omega$ 3) - têm demonstrado efeitos fisiológicos benéficos, embora presentes em apenas pequenas quantidades na carne bovina (WILLIAMS, 2000).

Tabela 1 – Percentuais relativos de ácidos graxos insaturados encontrados em carnes de diferentes fontes.

Ac. Graxo	%				
	carneiro	Boi	porco	Frango	peixe
C18:1	19,5	33,5	12,8	20,2	19,6
C18:2	18,5	10,5	35,1	14,2	5,8
C18:3	0,4	1,7	0,3	0,9	8,1
C22:2	0,3	0,7	-	-	0,2
C20:3	0,6	2,8	1,3	1,3	0,4
C20:4	13,2	8,5	9,5	11,6	3,8
C20:5	-	0,8	1,3	1,5	7,2
C22:4	-	0,9	1,0	2,1	0,7
C22:5	-	0,9	2,3	5,8	2,4
C22:6	-	-	2,3	5,8	2,39

Fonte: ARAUJO, 2004, p. 42.

A ingestão de ácidos graxos saturados aumenta os níveis de colesterol sérico em humanos (EWIN, 1997). French et al. (2003) relataram que o ácido graxo mais indesejável seria o ácido mirístico (C14:0), o qual no estudo de Freitas (2006) representou apenas 3% do total dos ácidos graxos na carne bovina. No entanto, nem todos os ácidos graxos saturados são considerados maléficos à saúde humana. O

ácido palmítico (C16:0) foi citado como o de menor efeito hipercolesterolêmico e o ácido esteárico (C18:0), com 43% do total dos ácidos graxos saturados na carne (FREITAS, 2006), teria efeito nulo, pois se transforma em ácido oléico (C18:1) no organismo (SINCLAIR, 1993), não influenciando os níveis sanguíneos de colesterol. Assim, segundo Medeiros (2003), não faz sentido considerar o somatório desses três ácidos graxos saturados, como normalmente se faz, para fins de limitação da ingestão da carne bovina na dieta.

## **2.4 Oxidação lipídica**

A oxidação lipídica é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, tornando os alimentos impróprios para consumo, além de também provocar outras alterações que irão afetar não só a qualidade nutricional, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, mas também a integridade e segurança dos alimentos, através da formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos (ARAÚJO, 2008).

Os lipídios são constituídos por uma mistura de tri, di e monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicolipídios, fosfolipídios, esteróis e outras substâncias lipossolúveis. A maior parte destes constituintes é oxidável em diferentes graus, sendo que os ácidos graxos insaturados são as estruturas mais susceptíveis ao processo oxidativo (RAMALHO; JORGE, 2006).

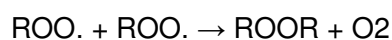
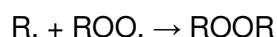
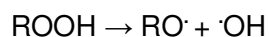
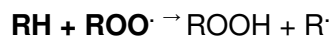
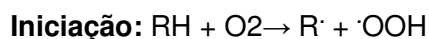
Segundo Allen, Foegeding (1981) e Araújo (2008), a oxidação lipídica depende de vários fatores, sendo o mais importante o nível de ácidos graxos insaturados. Estudo realizado por Igene et al. (1980) demonstrou que os triacilgliceróis e os fosfolipídios foram importantes no desenvolvimento da oxidação lipídica em carne de frangos. A influencia dos triacilgliceróis no desenvolvimento da rancidez foi relacionada com o grau das insaturações dos lipídios. Os ácidos graxopolinsaturados dos músculos variam entre as espécies e diminuem na ordem: pescado > aves > suínos > bovinos > carneiro.

A oxidação lipídica é catalizada pela mioglobina, hemoglobina, citocromos, ferro não heme e outros metais pesados de transição (HUR; PARK; JOO, 2007). Os lipídios podem ser oxidados via reações de oxidação enzimática, fotoxidação e autoxidação.

A oxidação por via enzimática ocorre pela ação das enzimas lipoxigenases, as quais atuam sobre os ácidos graxos poliinsaturados, catalisando a adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada poliinsaturada. Os produtos iniciais consistem de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas, que podem envolver-se em diferentes reações degradativas (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

O mecanismo de fotoxidação de gorduras insaturadas é promovido essencialmente pela radiação UV em presença de fotossensibilizadores (clorofila, mioglobina, riboflavina e outros) que absorvem a energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível e a transferem para o oxigênio tripleto ( $^3\text{O}_2$ ), gerando o estado singlete ( $^1\text{O}_2$ ). O oxigênio singlete reage diretamente com as ligações duplas por adição formando hidroperóxidos diferentes dos que se observam na ausência de luz e de sensibilizadores, e que por degradação posterior originam aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

A autoxidação é o principal mecanismo de oxidação das gorduras e está associada à reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados, consistindo em três fases: iniciação, propagação e terminação (FERNÁNDEZ et al., 1997).



Onde: RH – Ácido graxo insaturado; R. – Radical livre; ROO. – Radical peróxido; e ROOH – Hidroperóxido.



A reação inicial ocorre quando o átomo de hidrogênio é removido do grupo metileno do ácido graxo insaturado, formando radical livre. Esse processo ocorre a partir de uma variedade de diferentes iniciadores presentes no alimento, incluindo peróxidos, íons metálicos de transição, luz UV e enzimas. Uma vez formado o radical livre, este reage com o oxigênio para formar o radical peroxil. Esses radicais são altamente reativos e capazes de remover átomos de hidrogênio de outros ácidos graxos insaturados, propagando, portanto, a reação de oxidação. A reação terminal ocorre com a interação dos dois radicais livres formando um não-radical e, assim, finalizando a sua participação na reação (ARAUJO, 2008).

Para evitar a autooxidação de gorduras há a necessidade, portanto, de reduzir a incidência de todos os fatores que a favorecem, mantendo ao mínimo os níveis de energia (temperatura e luz) que são responsáveis pelo desencadeamento do processo de formação de radicais livres, evitando a presença de traços de metais, evitando ao máximo o contato com oxigênio e bloqueando a formação de radicais livres por meio de antioxidantes, os quais, em pequenas quantidades, atuam interferindo nos processos de oxidação de lipídios (TAI et al., 1999; RAMALHO; JORGE, 2006).

A suscetibilidade dos músculos à oxidação lipídica é influenciada pela presença dos antioxidantes. Dietas suplementadas com vitamina E aumentam a estabilidade oxidativa dos músculos bovinos (KERRY; MORRISSEY; BUCKLEY, 2002 apud HUR et al., 2007).

#### **2.4.1 Oxidação lipídica em carnes**

A degradação de lipídeos pode ser ocasionada por oxidação, hidrólise, polimerização, pirólise e absorção de sabores e odores estranhos. As reações hidrolíticas são catalisadas pelas enzimas lipases ou pela ação de calor e umidade, com formação de ácidos graxos livres. No entanto, a principal causa da deterioração da carne é a rancidez oxidativa envolvendo a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados. Exceto em peixes, todos os ácidos graxos poliinsaturados estão associados

predominantemente aos fosfolipídios (FENNEMA, 1993, FERNÁNDEZ et al., 1997, ARAÚJO, 2008).

As reações de oxidação em lipídeos são causadas pelo oxigênio atmosférico, menos frequentemente pelo ozônio, peróxido, metais e outros agentes oxidantes. No tecido animal, a oxidação lipídica é acelerada pela hemoglobina, mioglobina e pelo citocromo C (ARAÚJO, 2008).

A oxidação lipídica gera produtos que mudam a qualidade dos alimentos, alterando diversas propriedades, como qualidade sensorial (sabor, aroma, textura e cor), valor nutricional, funcionalidade e toxidez (FERNÁNDEZ et al., 1997, ARAUJO, 2008).

A carne crua não apresenta altas taxas de oxidação e a degradação em condições de refrigeração é devido principalmente à ação bacteriana ou enzimática. O armazenamento a 0°C mantém a carne em boas condições por período de três a seis semanas e, sob congelamento à temperatura entre -18°C e -20°C, por 9 a 15 meses. Porém, a desintegração da carne (carne moída) libera ácidos graxos insaturados dos fosfolipídeos (membrana) e íons Fe<sup>++</sup> da mioglobina, iniciando a oxidação mesmo em condições de resfriamento (ARAÚJO, 2008).

A aplicação de ozônio tem sido utilizada para reduzir a ação bacteriana e enzimática. Ao avaliar o efeito do ozônio ativado (com DeligenII) sobre a gordura e carne moída bovina, Smith (2001) verificou que este composto não causou um aumento significativo na oxidação das gorduras quando estas foram expostas a 9,46ppm de ozônio. Por outro lado, a aplicação do ozônio em carne moída resultou em valores de oxidação (substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico - TBARS) superiores ao da amostra controle.

Pelo estudo de Smith (2001) conclui-se que ao expor carne moída a 9,45ppm de ozônio ocorre um aumento no valor de TBARS, porém esses valores ainda

encontram-se abaixo do limite recomendado de  $1 \text{ mg.MA.kg}^{-1}$  (SMITH 2000 apud SMITH, 2001).

## 2.5 O Colesterol e seus produtos de oxidação (COPs)

O colesterol (Fig. 1) é um importante constituinte dos produtos de origem animal, pois apresenta funções importantes no organismo humano. Este composto está presente em todas as membranas celulares, sendo a chave intermediária na síntese de ácidos biliares e de hormônios, além de participar da síntese da vitamina  $D_3$  (BAGGIO, 2004). No entanto, uma taxa elevada de colesterol no sangue é um dos fatores de risco para doenças cardiovasculares, que é a principal causa de morte no Brasil e em muitos outros países (BRAGAGNOLO; AMAYA, 2001).

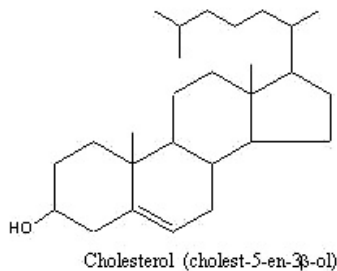


Figura 1 – Molécula de Colesterol

Fonte: Cyberlipid Center, s/p.

O colesterol é um constituinte lipídico insaturado, e portanto, susceptível à oxidação, levando à formação de vários produtos de oxidação. A autoxidação do colesterol pode ocorrer sob várias condições, como pela exposição ao ar, a temperaturas elevadas, iniciadores de radicais livres, luz, radiação ionizante, íons metálicos ou à combinação destes (ARAÚJO, 2008). Carnes frescas não contém ou apresentam apenas traços de COPs (ADDIS; WARNER, 1991).

A irradiação, que tem sido usada para aumentar a segurança microbiológica das carnes, pode ser um fator crucial para iniciar a oxidação do colesterol por propiciar o aumento da oxidação dos ácidos graxos em carnes (MAERKER; JONES, 1991).

Os principais óxidos de colesterol até o momento identificados em alimentos são: 20 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol, colestano-3 $\beta$ -5 $\alpha$ -6 $\beta$ -tríol, 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol, 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol, 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol e o colestano-4,6-dieno-3-ona. Destes óxidos de colesterol, o 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol, o 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol, o 7-cetocolesterol, o 20 $\alpha$ -hidroxicolesterol e o 25-hidroxicolesterol são produtos primários da oxidação do colesterol, enquanto que o 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, o 7 $\beta$ -hidroxicolesterol, o colestano-4,6-dieno-3-ona e o colestano-3 $\beta$ -5 $\alpha$ -6 $\beta$ -tríol são produtos secundários (TAI et al., 1999). Por ocorrer em concentrações relativamente altas e por ser produzido nos estágios iniciais da oxidação, o 7-cetocolesterol tem sido usado como indicador da oxidação do colesterol (SMITH, 1987; NAM, 2001).

Os produtos da oxidação do colesterol possuem estruturas semelhantes à do colesterol, com grupos funcionais como hidroxilas, cetona e epóxido adicionados no núcleo esterol e/ou na cadeia lateral da molécula. Estes compostos podem entrar na circulação sanguínea como contaminantes de alimentos contendo colesterol ou como resultado da oxidação de lipoproteínas, ou ainda, como resultado do catabolismo intracelular (MOREL; CHEN, 1996).

Os óxidos de colesterol apresentam possivelmente um papel mais importante no desenvolvimento de placas ateroscleróticas do que o próprio colesterol (KUMAR; SINGHAL, 1991), bem como em outros efeitos biológicos indesejáveis como citotoxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade, alterações nas propriedades das membranas celulares e na inibição da atividade da enzima HMG-CoA (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA) redutase (GUARDIOLA et al., 1996; BÖSSINGER; LUF; BRANDL, 1993). Segundo Lund e Björkhem (1994) os COPs ainda diminuem a biodisponibilidade do colesterol por inibir sua síntese.

Smith (1987) sugeriu que os hidroperóxidos de ácidos graxos polinsaturados formados durante a oxidação lipídica podem ser necessários para iniciar a oxidação do colesterol, e que a presença de gorduras insaturadas poderia aumentar a oxidação do colesterol sinergisticamente. Nam et al (2001) confirmaram estudo anteriores, demonstrando que a oxidação dos ácidos graxos aceleram a oxidação do colesterol em carne de perus e de suínos. No entanto, essa relação não foi encontrada para carne bovina, pois neste caso ocorreu oxidação do colesterol sem que houvesse a oxidação dos ácidos graxos.

Estudos utilizando a aplicação de 12 óxidos de colesterol em culturas de células musculares de aortas de coelhos brancos revelaram que o 25-hidroxicolesterol e o colestano-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol, dentro de 24 horas, provocaram necroses em 25% das células, usando uma concentração mínima de 10 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de meio de cultura (BÖSSINGUER, S.; LUF, W.; BRANDL, 1993).

Segundo Dzeletovic et al. (1995), a modificação oxidativa da LDL é uma hipótese da causa de aterosclerose. Derivados oxigenados do colesterol em LDL oxidada em lesões arteriais foram identificados em pesquisas com doenças cardiovasculares (BROWN; JESSUP, 1999, apud BAGIO; BRAGAGNOLO, 2004).

A contribuição dos óxidos de colesterol para a formação de lesões arteriais “in vivo” foi explicada por Guardiola et al. (1996), os quais relatam que os óxidos aumentam a permeabilidade vascular à albumina e a outras macromoléculas, estimulando a agregação de plaquetas por alterações no equilíbrio das prostaglandinas e alterando a composição lipídica da LDL. Estes compostos também inibem a expressão dos receptores de LDL e reprimem o relaxamento do endotélio arterial (PENG et al., 1996, apud BAGIO, BRAGAGNOLO, 2004).

Chisolm et al. (1994) demonstraram a presença de lesões ateroscleróticas humanas e identificaram o 7 $\beta$ -hidroxicolesterol como responsável pela oxidação de LDL (BAGIO; BRAGAGNOLO, 2004). Pesquisas realizadas por Hughes et al. (1994),

identificaram o 7-cetocolesterol e o 7 $\beta$ -hidroxicolesterol em LDL após a sua oxidação “in vitro” na presença de íons cobre (BAGIO, 2004). Quantidades significantes de óxidos de colesterol também foram identificadas em tecidos humanos das aortas, plasma e fígado de indivíduos hipercolesterolêmicos e ateroscleróticos (SPENCER et al., 1985; KUMAR; SINGHAL, 1991).

Quanto aos efeitos mutagênico e carcinogênico, estes estão intimamente relacionados com a formação do 5,6-epoxicolesterol (SEVANI; PETERSON, 1984). Segundo Sevanian e Peterson (1986), os pacientes com um aumento de colestano-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol no trato gastrointestinal, apresentaram incidência de câncer de cólon.

Várias pesquisas sugeriram que a prevenção da oxidação do colesterol em alimentos processados deva ser similar aos procedimentos para prevenir a oxidação lipídica dos alimentos (HUR; PARK; JOO, 2007).

A formação de COPs em produtos animais pode ser minimizada pela aplicação de baixas temperaturas de processamento, através do mínimo processamento, do uso de embalagens à vácuo e de atmosfera modificada, bem como pelas baixas temperaturas e ausência de luz no armazenamento, pelo uso de antioxidantes na dieta dos animais ou adição de antioxidantes aos alimentos (HUR et al., 2007).

Morgan e Armstrong (1987) demonstraram que temperaturas elevadas e agentes pró-oxidantes (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) aumentam a produção do óxido 5-6-epoxicolesterol. Portanto, os antioxidantes Butil-hidroxianisol e butil-hidroxitolueno apresentaram efeito oxidante inibitório.

## **2.6 Colesterol e óxidos de colesterol em carnes**

Segundo Bragagnolo e Amaya (2001), conteúdos de colesterol em carnes, citados na literatura, variam largamente. Esta discrepância pode ser atribuída à

variação natural das amostras devido aos fatores como tipo de corte, idade, raça e dieta do animal; como também pelos diferentes métodos analíticos utilizados.

Dentre as técnicas utilizadas para a determinação do colesterol, os métodos cromatográficos, embora mais caros, são mais específicos, pois além de separar os esteróis, separam outros possíveis interferentes (BAGGIO, 2004).

Segundo Pikul et al (1984) o teor médio de lípidos na carne magra é de 10% (base úmida), dos quais os triglicerídeos e os fosfolípidos são os componentes majoritários e o colesterol apresenta-se como um dos componentes minoritários.

Larkeson, Dutta e Hansson (2000) determinaram o teor de colesterol em almôndegas (50% de carne bovina + 50% de carne suína) e hambúrgueres crus e obtiveram resultados de 38,9 e 46,1mg.100g<sup>-1</sup>, respectivamente. Rodriguez-estrada et al. (1997), encontraram um teor de colesterol de 83,4mg.hambúrguer bovino cru<sup>-1</sup>.

Os óxidos de colesterol podem ser formados durante o processamento e o preparo do alimento quando exposto a temperaturas elevadas, ar, luz, radiação ou à combinação destes fatores (HUBBARD et al., 1989, apud BAGIO; BRAGAGNOLO, 2004). Segundo Paniangvait et al. (1995), condições impróprias de armazenamento também podem facilitar a formação dos produtos da oxidação do colesterol.

Segundo Novelli et al. (1998) ao desfazer-se a estrutura muscular da carne através de processos como fragmentação, picagem e mistura, aumenta-se a superfície de exposição ao oxigênio e a outros catalisadores da oxidação, o que pode dar origem a radicais livres, desencadeando as reações de oxidação do colesterol.

Outro fator favorável à oxidação é o tratamento térmico, pois provoca a desnaturação das proteínas, principalmente da globina, deixando o íon ferro<sup>+2</sup> susceptível à oxidação, ocorrendo a liberação de oxigênio molecular da oximioglobina

presente nos músculos, produzindo desta maneira as condições para a produção de peróxidos de hidrogênio.

Segundo Addis e Warner (1991) a carne bovina fresca não apresenta óxidos de colesterol. Quanto às carnes processadas, De Vore (1988) não observou produção de 7-cetocolesterol durante o processamento de carne bovina. Baggio e Bragagnolo (2006) também avaliaram o efeito do tratamento térmico na formação de óxidos de colesterol em produtos cárneos (almôndega, hambúrguer e salsichas) e verificaram que não houve formação de óxidos após aplicação do calor.

Rodriguez-Estrada et al. (1997) submeterem hambúrguer a seis processamentos diferentes e também não observaram aumento na concentração de 7-cetocolesterol. Lerker e Rodrigues-Estrada (2000) também relataram que não houve diferença significativa nos valores de 7-cetocolesterol quando as amostras foram submetidas à diferentes processos de cozimento. Esses autores ainda afirmaram que as carnes cruas apresentaram um valor inicial alto de 7-cetocolesterol (3,5ppm) e explicaram este resultado como consequência do período de maturação que a carne usualmente é submetida, 4-6°C por 10 a 15 dias, para aumentar a maciez e promover a formação do *flavor*.

Moura e Tenuta-Filho (2002) alegaram que não foi confirmada a expectativa de que houvesse formação de 7-cetocolesterol, como resultado da oxidação do colesterol, durante os processamentos térmicos (fritura à 140°C em óleo de soja por 3min e cozimento em água fervente por 4min) do camarão-rosa. Esses pesquisadores verificaram que este óxido diminuiu após os processamentos e relataram que isso ocorreu devido à sua eluição nos meios de processamento. Vicente e Torres (2007) também observaram redução de óxidos após processamento térmico de hambúrgueres e explicaram este fenômeno da mesma forma que os autores anteriormente citados.

Os estudos que comprovaram a formação de óxidos de colesterol durante o processamento, geralmente utilizaram períodos prolongados de aquecimento, de 6, 12



e até 24 horas, sendo que a oxidação se inicia dentro das primeiras horas de aquecimento e continua de maneira gradual (OSADA et al., 1993).

Baggio e Bragagnolo (2006) estudaram a oxidação do colesterol em carnes, salames, mortadela de frango e mortadela de chester durante o período de armazenamento (mortadelas à 6°C e os outros produtos à temperatura ambiente) e não detectaram COPs. Baggio e Bragagnolo (2008) ainda avaliaram óxidos de colesterol em produtos cárneos adquiridos no mercado e encontraram o 7-cetocolesterol em uma amostra de hambúrguer ( $3,2\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), em duas amostras de salsichas (1,6 e  $2,0\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e em uma amostra de mortadela ( $2,6\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Estes autores também relataram que a baixa degradação oxidativa das amostras pode ser atribuída à presença do antioxidante eritorbato de sódio presente nas amostras avaliadas.

Monahan et al (1992) demonstraram que em costeletas suínas cruas os produtos iniciais da oxidação do colesterol não foram detectados, e mesmo após 8 dias de armazenamento refrigerado os COPS detectáveis foram encontrados em apenas algumas amostras. No seu estudo, esses autores demonstraram que a taxa de oxidação do colesterol na carne suína é extremamente acelerada durante o armazenamento, seguido do cozimento e que a oxidação do colesterol parece seguir a mesma tendência que a oxidação lipídica em geral.

Nam et al. (2001) estudaram o efeito da irradiação na oxidação do colesterol de carne bovina, de peru e suína sob diferentes condições de armazenamento (aeróbico ou à vácuo, a 4°C). Esses pesquisadores relataram que a irradiação não aumentou os níveis de óxidos de colesterol em coxa de peru (dia 0); após sete dias de armazenamento as amostras acondicionadas aerobicamente apresentaram mais COPs que as amostras armazenadas à vácuo, e a irradiação aumentou os COPs nas amostras armazenadas com oxigênio. Em carne bovina, o tipo de armazenamento (aeróbico ou à vácuo) não apresentou efeito sobre os COPs. Os óxidos encontrados em carne no dia zero foram  $7\alpha$  e  $7\beta$ -hidroxicolesterol ( $19\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ),  $\alpha$ -epóxido ( $7,0\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e 7-cetocolesterol ( $12,8\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Em relação à carne suína, as amostras armazenadas

aerobicamente e irradiadas apresentaram a maior quantidade de  $7\alpha$ ,  $7\beta$ -hidroxicolesterol e menor COPs totais.

Segundo Tai et al. (1999), o uso de antioxidantes nas formulações e o emprego de embalagens apropriadas, que proporcionem uma barreira física ao ar e à luz, podem impedir a formação de produtos de oxidação do colesterol.

## **2.7 A ação dos Antioxidantes: Ácido Ascórbico, ácido cítrico e eritorbato de sódio**

A oxidação de lipídios, ou autooxidação, se inicia com a formação de radicais livres e os hidroperóxidos formados podem causar alterações sensoriais indesejáveis em óleos, gorduras ou alimentos que os contêm, reduzindo o tempo de vida útil. Além disso, os produtos da oxidação lipídica podem desencadear a peroxidação *in vivo*, resultando em problemas de saúde, que podem variar desde o envelhecimento precoce até a instalação de doenças degenerativas, como câncer, aterosclerose, artrite reumática e também, compostos secundários como aldeídos e cetonas, que podem provocar mutações (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Os antioxidantes apresentam-se como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa dos alimentos e minimizar os danos oxidativos nos seres vivos, uma vez que são substâncias capazes de retardar ou reduzir a velocidade da oxidação (ARAÚJO, 2008).

A oxidação lipídica da carne, da oximioglobina à metamioglobina, pode ocasionar seu escurecimento. Segundo o *Food and Drug Administration* – FDA, antioxidantes são substâncias utilizadas para preservar alimentos através do retardo da deterioração, rancidez e descoloração decorrentes da autooxidação.

Do ponto de vista químico, os antioxidantes são majoritariamente compostos aromáticos que contêm pelo menos uma hidroxila, podendo ser sintéticos como o butilhidroxianisol (BHA) e o butilhidroxitolueno (BHT), os quais são largamente empregados pela indústria de alimentos, ou naturais, substâncias bioativas tais como organosulfurados, fenólicos e terpenos, que fazem parte da constituição de diversos alimentos.

Os aspectos toxicológicos dos antioxidantes têm sido uma das áreas de maior controvérsia nos debates sobre a segurança dos aditivos alimentares. O interesse pelos antioxidantes naturais teve início nos anos 80 diante da comprovação de efeitos maléficos causados por doses elevadas de BHT, BHA e TBHQ (t-butilhidroquinona) sobre o peso do fígado, pela marcada proliferação do retículo endoplasmático, entre outras. Como consequência, ênfase foi dada à identificação e purificação de novos compostos com atividade antioxidante, provenientes de fontes naturais, que possam atuar isolada ou sinergicamente com outros aditivos, como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e limitar o uso dos antioxidantes sintéticos (CAMPOS, 1996).

Na seleção de antioxidantes, são desejáveis propriedades como eficácia em baixas concentrações; ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor e em outras características; compatibilidade com o alimento e fácil aplicação; estabilidade nas condições de processo e armazenamento; e o composto e seus produtos de oxidação devem ser atóxicos, mesmo em doses muito maiores das que normalmente seriam ingeridas no alimento (RAMALHO; JORGE, 2006). Além disso, na escolha de um antioxidante deve-se considerar também outros fatores, incluindo legislação, custo e preferência do consumidor por antioxidantes naturais.

O mecanismo de ação dos antioxidantes pode ser classificado como primário ou secundário. Os primários, também denominados de bloqueadores, atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos

radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, formando um complexo lipídio-antioxidante que pode reagir com outro radical livre, a exemplo do BHA, os ésteres do ácido gálico, butilhidroquinona, tocoferol e flavonóides. Os secundários ou complexantes, atuam retardando a etapa de iniciação da autoxidação, através de diversos mecanismos, que incluem complexação com metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação do oxigênio singlete.

Os sinergistas são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, que podem aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando usados em combinação adequada. Alguns antioxidantes primários, quando usados em combinação, podem atuar sinergisticamente (RAMALHO, 2008).

### 2.7.1 Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico ou vitamina C ( $C_6H_8O_6$ , ascorbato, quando na forma ionizada) é uma molécula (Fig. 2) usada na hidroxilação de várias outras em reações bioquímicas nas células.

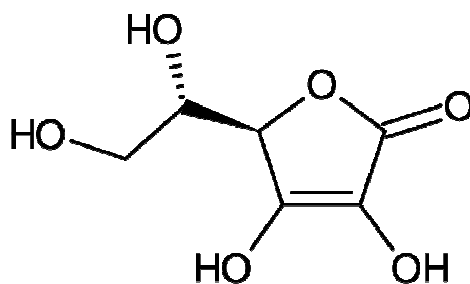


Figura 2 - Fórmula estrutural do ácido ascórbico

Fonte: Wikipédia, 2009.

A sua principal função é a hidroxilação do colágeno, que consiste na proteína fibrilar que confere resistência aos ossos, dentes, tendões e paredes dos vasos sanguíneos. Além disso, é um poderoso antioxidante, sendo usado para transformar os radicais livres de oxigênio em formas inertes. É também usado na síntese de algumas moléculas que servem como hormônios ou neurotransmissores (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

Pertencente à família dos antioxidantes removedores de oxigênio, o ácido ascórbico e seus isômeros e derivados, atuam capturando o oxigênio presente no meio, tornando-o indisponível para atuar como propagador da autooxidação. O ácido ascórbico pode atuar também como sinergista na regeneração de antioxidantes primários (BAILEY, 1996 *apud* RAMALHO; JORGE, 2006).

Segundo Odin (1997) *apud* Bianchi e Antunes (1999) a vitamina C atua na fase aquosa como um excelente antioxidante sobre os radicais livres, mas não é capaz de agir nos compartimentos lipofílicos para inibir a peroxidação dos lipídeos. Por outro lado, estudos *in vitro* demonstram que essa vitamina pode atuar como uma molécula pró-oxidante e gerar os radicais  $H_2O_2$  e  $OH^\cdot$  na presença de metais de transição, tais como o ferro. Geralmente, esses metais estão disponíveis em quantidades muito limitadas e as propriedades antioxidantes dessa vitamina predominam *in vivo* (HERBERT; JAYATILLEKE, 1996 *apud* CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

O ácido ascórbico é um sólido cristalino de cor branca, inodoro, hidrossolúvel e pouco solúvel em solventes orgânicos. Este antioxidante é destruído à temperaturas elevadas por um período prolongado. Também sofre oxidação irreversível, perdendo a sua atividade biológica, em alimentos frescos guardados por longos períodos.

De acordo com a Legislação Brasileira (ANVISA) o ácido ascórbico pode ser usado como aditivo nos produtos cárneos sem limite de quantidade. Nos Estados Unidos, segundo o USDA (1994), este aditivo também pode ser aplicado na superfície de carnes frescas.

Além de beneficiar a dieta humana, o ácido ascórbico tem sido usado como um ingrediente alimentar devido ao seu poder redutor e a sua atividade antioxidante. Este composto previne tanto a oxidação dos lipídios quanto a dos pigmentos da carne, aumentando a vida útil das mesmas (OGDEN et al., 1996; MITSUMOTO et al., 1991; MANCINI et al., 2004).

Segundo Giroux (2001), o ácido ascórbico, como muitos outros ácidos orgânicos, inibe o crescimento de várias bactérias patogênicas. A eficiência dos ácidos orgânicos no controle de patógenos na carne varia entre os estudos de acordo com as diferenças de concentração dos ácidos utilizados, com os métodos de aplicação dos mesmos, com a temperatura e tempo de contato, com as técnicas de amostragem utilizadas e com o tipo de tecido e organismo dos estudos (GREER; DILTS; 1992).

Os ácidos orgânicos têm sido usados para sanitizar carcaças devido a sua atividade bactericida (QUARTEY-PAPAFIO; CARPENTER, 1980) e porque são geralmente reconhecidos como aditivos seguros (GRAS) (FDA, 1982).

Devido ao ácido ascórbico ser extremamente susceptível a oxidação, especialmente na presença de íons metálicos como o Cu (II) e o Fe (III), possivelmente seja rapidamente oxidado quando adicionado em carnes. Seu potencial de degradação depende do metal envolvido na reação, do seu estado de oxidação e da presença de quelantes (LEE, HENDRICKS; CORNFORTH, 1999).

Os antioxidantes fenólicos não previnem a oxidação do ácido ascórbico quando são usados no processamento das carnes. Portanto, a carnosina ( $\beta$ -alanina L-histidina) o protege contra a reação de oxidação causada pelos metais catalizadores, principalmente pelo Cu (II), uma vez que a carnosina forma complexos inativos com o Cu (II) e inativa radicais livres (CHAN, et al. 1994; LEE, HENDRICKS,

1997). No estudo realizado por Lee, Hendricks e Cornforth (1999), o uso de 1% de carnosina e 0,1% de ácido ascórbico foi eficiente para inibir a oxidação da mioglobina à metamioglobina em carne moída.

Segundo Ogden et al. (1996), o uso isolado do ácido ascórbico ou em combinação com outros ácidos orgânicos, em superfícies de carnes é eficaz para controlar o crescimento de bactérias e aumentar a vida-útil das carnes, minimizando também a produção de *off-flavors* derivados da oxidação lipídica. Ahn e Nam (2004) ainda complementam que o ácido ascórbico é efetivo para prevenir a mudança na coloração causada pelo uso da irradiação sobre carne moída.

### 2.7.2 Eritorbato de sódio

O ácido eritórbito ( $C_6H_8O_6$ , Fig. 3) e o eritorbato de sódio ( $C_6H_7O_6Na \cdot H_2O$ ), são estereoisômeros dos ascorbatos e funcionam de modo similar aos antioxidantes. Devido a sua estrutura eno-diol, os eritorbatos são fortes agentes redutores (admissão de oxigênio) e previnem ou minimizam as deteriorações oxidativas do sabor e da cor. Em aplicações de antioxidantes em alimentos, onde a atividade da Vitamina C não é desejada ou necessária, o ácido eritórbito e o eritorbato de sódio são produtos que podem ser escolhidos.

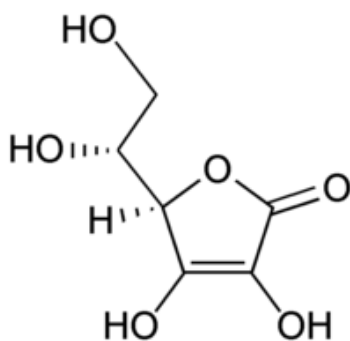


Figura 3 - Fórmula estrutural do ácido eritórbito.

Fonte: Wikipédia, 2009.

O eritorbato de sódio é usado predominantemente em carne bovina, aves, e bebidas não alcoólicas na indústria de alimentos. Quando usado em carne processada, tais como as salsichas e "beef sticks", reduz a taxa na qual o nitrato reduz-se a óxido nítrico, conservando a coloração rósea. Como um antioxidante, este composto ajuda a melhorar a estabilidade do sabor de maneira similar a vitamina C e a prevenir a formação das nitrosaminas carcinogênicas (GREATS FOODS BRASIL, 2009).

No estado seco cristalizado, os eritorbatos não são reativos. Em solução de água, entretanto, os eritorbatos reagem rapidamente com o oxigênio atmosférico e outros agentes oxidantes. É essa propriedade que os torna tão valiosos como antioxidantes. A reação com o oxigênio é catalisada por traços de cobre e, em alguns casos, por traços de ferro na solução (GREATS FOODS BRASIL, 2009).

### 2.7.3 Ácido cítrico

O ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ ) ou citrato de hidrogênio, ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico (Fig. 4), é um ácido orgânico fraco, que se pode encontrar nos citrinos. É usado como conservante natural, sendo conhecido também como acidulante INS 330, resultando em sabor ácido e refrescante na preparação de alimentos e de bebidas.

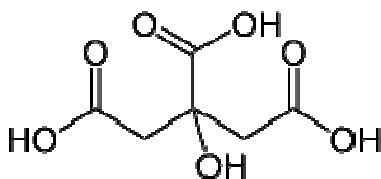


Figura 4 - Fórmula estrutural do ácido cítrico.

Fonte: Wikipédia, 2009.

A acidez do ácido cítrico é devida aos três grupos carboxilas (-COOH) que podem perder um elétron quando em solução. Como consequência forma-se um íon citrato, o qual atua como controlador de pH de soluções ácidas.



Os íons citratos formam sais citratos com muitos íons metálicos. Como exemplo o citrato de cálcio ou "sal amargo", que se utiliza geralmente na preservação e condimentação dos alimentos. Além disso, os citratos podem quelar íons metálicos, e com isto, podem ser utilizados como conservantes e suavizadores de água (GASTRONOMY LAB, 2009).

Na temperatura ambiente, o ácido cítrico consiste em um pó cristalino branco. Pode existir na forma anidra (sem água) ou monohidrato, o qual contém uma molécula de água para cada molécula de ácido cítrico. A forma anidra se cristaliza em água quente, enquanto a forma monohidratada do ácido cítrico se cristaliza em água fria. O monohidrato pode ser convertido na forma anidra aquecendo-se acima de 74 °C (GASTRONOMY LAB, 2009).

Como acidulantes, atuam no ajuste do pH dos alimentos, agindo como agente tamponante durante estágios do processamento de produtos alimentícios. É utilizado como conservantes (agente bacteriostático), prevenindo o crescimento de microrganismos ou do desenvolvimento de esporos de bactérias patogênicas. Atuam ainda em sinergia com antioxidantes na preservação de gorduras e do escurecimento não enzimático de produtos alimentícios (PLURY QUÍMICA, 2009).

## **2.8 O Uso do ozônio na indústria de alimentos**

Este ítem será abordado em capítulo a parte, por ter sido material para publicação de uma revisão sobre o assunto na revista "Alimentos e Nutrição".

### 3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A história do hambúrguer. **Revista Citta São Paulo**. 2004. Disponível em: <<http://www.revistacitta.com.br/?p=17>>. Acesso em 20/01/2008.

ADDIS, P. B.; PARK, P. S. W. Cholesterol oxide content of foods. In: **Biological Effects of Cholesterol Oxides**, C. R. C. Press, London, UK, p.71-81, 1992.

ADDIS, P. B.; WARNER, G. J. The potential health aspects of lipid oxidation products in food. In: AROUMA, O. I.; HALLIWELL, B. **Free radicals and food additives**. London, Taylor and Francis Ltda, p.77-119, 1991.

AHN, D. U.; NAM, K. C. Effects of ascorbic acid and antioxidants on color, lipid oxidation and volatiles of irradiated ground beef. **Radiation Physics and Chemistry**, v.71, p. 149-154, 2004.

ALLEN, C.E.; FOEGEDING, E.A. Some lipid characteristics and interactions in muscle foods. A review. **Food Technology**, v.35, p.253-257, 1981.

ANVISA. Legislação em Vigilância Sanitária. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 07/01/2006.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos**: teoria e prática. 4.ed. Viçosa, MG: UFV, 2004. 478p.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos**: teoria e prática. 4.ed. Viçosa, MG: UFV, 2008. 596p.

BAGIO, S. R. **Óxidos de colesterol, colesterol, lipídios totais e ácidos graxos em produtos cárneos processados**. 2004. 202f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BAGIO, S. R.; BRANGAGNOLO, N. Validação da metodologia para determinação simultânea, por CLAE, de colesterol e óxidos de colesterol em produtos cárneos processados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.1, p.64-70, 2004.

BAGIO, S. R.; BRANGAGNOLO, N. The effect of heat treatment on the cholesterol oxides, cholesterol total lipid and fatty acid contents of processed meat products. **Food Chemistry**, v.95, p.611-619, 2006.

BAGIO, S.R; BRAGAGNOLO, N. Lipid fraction quality evaluation of brasiliann meat-based products. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.19, N.3, p.463-470, 2008.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.12, n.2, p.123-130, 1999.

BONFIM, L. M. 2003. **Composição Química e valor nutricional da carne bovina: proteínas e gorduras.** Disponível em: <http://www.rehagro.com.br/siterehagro/publicacao.do?cdnoticia=514>. Acesso em: 28/01/2009.

BÖSSINGUER, S.; LUF, W.; BRANDL, E. Oxysterols: Their occurrence and biological effects. **International Dairy Journal**, v.3, p.1-33, 1993.

BRAGAGNOLO, N.; AMAYA, D. B. R. Determinação de colesterol em carne: comparação de um método colorimétrico e um método por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.60, n.1, p.53-57, 2001.

CAMPOS, M. A. P. Perspectivas do uso de aditivos em alimentos: os antioxidantes. **Revista Nacional da Carne**, n. 227, jan. 1996.

CERQUEIRA, F.M.; MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v.30, n.2, 441-449, 2007.

CHAN, W. K. M. et al. EPR spin-trapping studies of the hydroxyl radical scavenging activity of carnosine and related dipeptides. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v.42, p.1407-1410, 1994.

CYBERLIPID CENTER. **Cholesterol Peroxidation.** Disponível em: <http://www.cyberlipid.org/index.htm>. Acesso em: 22/12/2009.

COSTA, L. O. **Processamento e diminuição do reprocesso do hambúrguer bovino (HBV).** 2004. 127f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Matemática e Física, Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2004.

DE VORE, V.R. TBA values and 7-ketocholesterol in refrigerated raw and cooked ground beef. **Journal of Food Science**, v.53, n.4, p.1058-1061, 1998.

DZELETOVIC, S. et al. Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution – mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 225, p. 73-81, 1995.

EWIN, J. **O lado sadio das gorduras**. Tradução de Ana Beatriz Rodrigues. Editora Campus Ltda: Rio de Janeiro, 1997. 162 p.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. Spain, Zaragoza: ACRIBIA, 1993.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **GRAS status of acetic acid, ammonium acetate, sodium acetate, and sodium diacetate**. Fed. Regist. 47:27813, 1982.

FERNÁNDEZ, J. et al. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. **Food Chemistry**, v.59, n.3, p.345-353, 1997.

FREITAS, A.K. **Características da carcaça, da carne e perfil dos ácidos graxos de novilhos Nelore inteiros ou castrados em duas idades**. 2006. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

FRENCH, R. et al. Fatty acid composition of intramuscular triacylglycerols of steers fed autumn Grass and concentrates. **Livestock Production Science**, v.81, p.307-317, 2003.

GASTRONOMY LAB. **Ácido cítrico**. Disponível em: <http://gastronomy1.lojatemporaria.com/acido-citrico.html>. Acesso em: 10/12/2009.

GIROUX, M. et al. Combined effect of ascorbic acid and gamma irradiation on microbial and sensorial characteristics of beef patties during refrigerated storage. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p.919-925, 2001.

GREAT FOODS BRASIL. **Ácido eritórico e eritorbato de sódio**. Disponível em: <http://www.greatfoodsbrasil.com/acidoeritorbico.htm>. Acesso em: 28/12/2009.

GREER, G. G.; DILTS, B. D. Factors Affecting the Susceptibility of Meatborn Pathogens and Spoilage Bacteria to Organic Acids. **Food Research International**, v.25, p.355-364, 1992.

GUARDIOLA, F. et al. Biological Effects of Oxysterols: Current Status. **Food and Chemical Toxicology**, v.34, p.193-198, 1996.

HUR, S. J.; PARK, G. B.; JOO, S. T. Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products. **Food Control**, v.18, n.8, p.939-947, 2007.

IGENE, J.O. et al. Role of tryglycerides and phospholipids on development of rancidity in model meat systems during frozen storage. **Food Chemistry**, v.5, p.263-276, 1980.

JOAKIN'S. **A história do hambúrguer**. Disponível em: <http://www.joakins.com.br/site/hamburguer>. Acesso em: 21/01/2008.

KUMAR, N.; SINGHAL, O. P. Cholesterol oxides and atherosclerosis: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.55, p. 497-510, 1991.

KUSS, F. et al. Perfil de ácidos graxos e qualidade da carne de vacas de descarte terminadas em confinamento recebendo dietas com ou sem adição de monensina. **Ciência Rural**, v.36, p.1518-1521, 2006.

LAGE, M. E. Efeito da suplementação de vitamina "E" na dieta, de bovinos da raça Nelore, na qualidade da carne maturada embalada à vácuo e processada. Qualificação (doutorado), Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de alimentos, 2003.

LARKESON, B.; DUTTA, P. C.; HANSSON, I. Effects of frying and storage on cholesterol oxidation in minced meat products. **Journal of American Oil Chemists Society**, v.77, p. 675-680, 2000.

LEE, B. J.; HENDRICKS, D. G. Antioxidant effect of L-carnosine on liposomes and beef homogenates. *Journal of food science*, v.62, p.931-934, 1997.

LEE, B. J.; HENDRICKS, D. G.; CORNFORTH, D. P. A Comparison of Carnosine and Ascorbic Acid on color and lipid Stability in a ground pattie model system. **Meat Science**, v.51, p. 245-253, 1999.

LERCKER, G; RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T. Cholesterol oxidation: presence of 7-ketocholesterol in different food products. **Journal of Food Composition Analysis**, v.13, p.625-631, 2000.

LOBATO, J. F. P.; FREITAS, A.K. **Carne bovina: mitos e verdades**. In: José Mauro Cachapuz; Ricardo Avancini Trois. (Org.). *Pecuária competitiva*. Porto Alegre: Ideograf, 2006, v. 14, p. 93-115.

LUND, E.; BJORKHEM, I. Down-regulation of hepatic HMG-CoA reductase in mice by dietary cholesterol: importance of the 5 double Bond and evidence that oxidation at C-3, C-5, C-6 or C-7 is not involved. **Biochemistry**, v.33, p.291-297, 1994.

MAERKER, G.; JONES, K.C. Unusual product ratios resulting from the gamma-irradiation of cholesterol in liposomes. **Lipids**, v.26, p.139-144, 1991.

MANCINI, R. A. et al. Ascorbic acid minimizes lumbar vertebral discoloration. **Meat Science**, v.68, n.3, p.339-345, 2004.

MEDEIROS, S.R. Modulação do perfil lipídico de bovinos: implicações na produção e aceitação da carne. In: **V Simpósio Goiano sobre Manejo e Nutrição de Bovinos de Corte e Leite**. Goiânia: CBNA, 2003. p. 43-72.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 20, DE 31 DE JULHO DE 2000. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Hambúrguer.

MITSUMOTO, M., et al. Vitamins E and C pigment and lipid stability in ground beef. **Journal of Food Science**, v.56, p.194-197, 1991.

MONAHAN, F.J. et al. Influence of dietary treatment on lipid and cholesterol oxidation in pork. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.40, p.1310-1315, 1992.

MOREL, D. W.; CHEN, I. L. Cellular bilchemistry of oxysterols derived from the diet or oxidation in vivo. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 495-506, 1996.

MORGAN, J. N.; ARMSTRONG, D. J. Formation of cholesterol 5, 6 - epoxides during spray drying of egg yolk. **Journal of food science**, v.52, p.1224-1227, 1987.

MOURA, A. F. P; TENUTA-FILHO, A. Efeito do processamento sobre os níveis de colesterol e 7-cetocolesterol em camarão-rosa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.2, p.117-121, 2002.

NAM, K. C. et al. Cholesterol oxidation products in irradiated raw meat with different packaging and storage time. **Meat Science**, v.58, p. 431-435, 2001.

NOVELLI, E. Et al. Lipid and Cholesterol Oxidation in Frozen Stored Pork, Salame Milano and Mortadella. **Meat Science**, v.48, p.29-40, 1998.



OGDEN S.K., et al. The effect of combining propionic and ascorbic acid on the keeping qualities of fresh minced pork during storage. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.29, p.227-233, 1996.

OSADA, K., et al. Levels and formation of oxidized cholesterol in processed marine foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.1893-1898, 1993.

PANIANGVAIT, P.; et al. Cholesterol oxides in foods of animal origin. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 6, p. 1159-1174, 1995.

PARDI, M. C. et all. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. Goiânia :Cegraf-UFG/Niterói : EDUFF, 1993. 586p.

PIKUL, J. et al. Effects of frozen storage and cooking on lipid oxidation in chicken meat. **Journal of Food Science**, v.49, p.838-843, 1984.

PLURY QUÍMICA. **Ácido cítrico anidro**. Disponível em: <http://www.pluryquimica.com.br/pdf/%C1cido%20C%EDtrico%20Anidro.pdf>. Acesso em 16/12/2009.

QUARTEY-PAPAFIO, A. E.; CARPENTER, J. A. Short chain fatty acids as sanitizers for beef. **Journal of Food Protection**, v.43, p.168-171, 1980.

RAMALHO, C. O lado B dos chefes. **Revista Diálogo Médico**, ed. jan.-fev, 2007. Disponível em: <[http://www.dialogomedico.com.br/dm/2007\\_01\\_02/reportagens/gastronomia\\_PT.htm](http://www.dialogomedico.com.br/dm/2007_01_02/reportagens/gastronomia_PT.htm)>. Acesso em 20/01/2008.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v.29, n.4, p.755-760, 2006.

ROCHA, Ana Elias M.C. Cómo obtener mejores productos molidos. **Carnetec: a la vanguardia da tecnologia de la carne**, v.8, n.5, p.52 - 53, jul./ago. 2001.

RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T.et al. Effect of different cooking methods on some lipid and protein components of hamburguers. **Meat Science**, v. 45, p. 365-375, 1997.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DO GRAU DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA E DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE. **Química Nova**, v.21, n.1, 1999.

SINCLAIR, A.J. Dietary fat and cardiovascular disease : the significance of recent developments for the food industry. *Food Australia*, v.45, n.5, p.226-231,1993.

SPENCER, T. A. et al. 24(S)-, 25-Epoxycholesterol. Evidence consistent with a rolo in the regulation of hepatic cholesterol-genesis. **Journal of Biological Chemistry**, v.260, p. 13391-13398, 1985.

SEVANIAN, A.; PETERSON, A. R. Cholesterol epoxide is a direct acting mutagen. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 81, p. 4198-4205, 1984.

SEVANIAN, A.; PETERSON, A. R. The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, p. 1103-1109, 1986.

SMITH, L. L. Cholesterol autoxidation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.44, p. 87-125, 1987.

SMITH, C.D. et al. **Effects of activated ozone, on lipid peroxidation, when applied to carcasses and to ground beef during blending**. 2001. Disponível em: <<http://ansci.colostate.edu/dp/msfs/cdso12.pdf>>. Acesso em: 10/10/2008.

TAI, C. Y.; et al. Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods: An overview (Part I). **Journal of Food And Drug Analysis**, v.7, n. 4, p. 243, 1999.

USDA. **Ascorbic acid, erythobic acid, citric acid, sodium ascorbate, and sodium citrate on beef, lamb, and pork cuts**. Federal Register, v.59, n.52, p. 12536-12538, 1994.

VALLE, E. R. **Mitos e realidades sobre o consumo de carne bovina**. EMBRAPA GADO DE CORTE. Documentos, 100. 2000, 33p. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc100/index.htm>>. Acesso em: 23/01/2008.

VICENTE, S.J.V.; TOREES, E.A.F.S. Formation of four cholesterol oxidation products and loss of free lipids, cholesterol and water in beef hamburgers as a function of thermal processing. **Food Control**, v.18, p.63-68, 2007.

WIKIPÉDIA. **Ácido cítrico**. Disponível em: <[http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido\\_c%C3%ADtrico](http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_c%C3%ADtrico)>. Acesso em: 10/12/2009.

WIKIPÉDIA. **Ácido ascórbico**. Disponível em: <[http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido\\_asc%C3%B3rbico](http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_asc%C3%B3rbico)>. Acesso em: 10/12/2009.

WIKIPÉDIA. **Ácido eritorbico**. Disponível em: <[http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido\\_erit%C3%B3rbico](http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_erit%C3%B3rbico)>. Acesso em: 10/12/2009.

WILLIAMS, S.C.M. Dietary fatty acids and human health. **Annals of zootechnology**, v.49, p.165-180, 2000.

#### 4      **CAPÍTULO 1**

CHIATTONE, P.V; TORRES, L.M; ZAMBIAZI, R.C. Aplicação do ozônio na indústria de alimentos. Alimentos e Nutrição, v.19, n.3, 341-349, 2008.

### **APLICAÇÃO DO OZÔNIO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS**

Priscila Vasconcellos CHIATTONE<sup>1</sup>

Lisiane Mendes TORRES<sup>1</sup>

Rui Carlos ZAMBIAZI<sup>2</sup>

**RESUMO:** Realizou-se um levantamento de dados disponíveis sobre o ozônio, enfocando suas propriedades físico-químicas, métodos de síntese e medição, estabilidade em meio aquoso, poder germicida, efeitos sobre a saúde humana e vantagens de sua aplicação na indústria alimentícia, em que se destaca seu uso na higienização e sanitização de produtos e equipamentos, bem como no tratamento de efluentes. O ozônio é uma molécula fortemente oxidante e reativa, conhecido e utilizado há décadas como coadjuvante na desinfecção da água em países da União Européia. Além disso, uma gama de aplicabilidades tem surgido para o ozônio, sobretudo devido aos novos conhecimentos quanto às suas características e propriedades. Por ser bactericida, investigações de sua atuação sobre uma grande variedade de microrganismos, na forma de células vegetativas ou esporos, em ambientes industriais e também nos alimentos, têm despertado atenção especial de

---

\* Curso de Pós-graduação - Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – Universidade Federal de Pelotas.

\*\* Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – Universidade Federal de Pelotas - 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil.

pesquisadores de todo o mundo. A importância em estudar o ozônio na indústria alimentícia baseia-se no aspecto de tratar-se de uma molécula que se decompõe facilmente sem deixar resíduos, podendo ser aplicado em alimentos, sem risco de toxidez para os consumidores.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ozônio; efeito bactericida; indústria de alimentos.

## **INTRODUÇÃO**

O ozônio é permitido na Europa, como desinfetante de água para o consumo humano desde 1893. Nos Estados Unidos, apenas em 1982 o *Food and Drug Administration* (FDA), por considerá-lo substância *Generally Recognized as Safe* (GRAS), liberou seu uso no processo de lavagem de garrafas para comercialização de água.<sup>40</sup> No entanto, como agente conservante de alimentos seu primeiro uso foi em 1909, na forma gasosa, em câmaras frias de estocagem de carnes. De qualquer modo, o ozônio, como desinfetante, não atingiu maiores proporções na indústria de alimentos, principalmente, devido ao seu custo em relação a outras substâncias como, por exemplo, o cloro, que, por ser barato e eficiente, passou a ser o agente primordial na indústria mundial para esse fim. O problema é que os compostos clorados vêm sofrendo restrições desde 1975, quando se descobriu que sua aplicação em materiais orgânicos pode gerar compostos organoclorados (Trihalometanos – THM) os quais são potencialmente cancerígenos<sup>46</sup>. O reconhecimento oficial do ozônio como agente sanificante seguro, que se deu em 1997 pelo *Electric Power Research Institute* (EPRI), criou oportunidades adicionais para a sua aplicação na indústria de alimentos e outros setores.<sup>16, 40, 50</sup> Como consequência, ainda em 1997, foi aprovada pelo departamento de agricultura dos Estados Unidos a utilização legal de ozônio na água usada na lavagem de carcaças da indústria de processamento de frangos. No Brasil, entretanto, o

emprego de ozônio na indústria alimentícia ainda é limitado, não havendo até o momento uma legislação específica para seu uso em alimentos.

Sabe-se que o ozônio exerce forte efeito germicida devido ao seu alto potencial oxidante,<sup>14, 23, 24</sup> e que sua aplicação na indústria de alimentos apresenta vantagens na higienização de alimentos,<sup>1,7,8,9,10,11,31,45</sup> no tratamento de água para reuso,<sup>25,32</sup> no tratamento de efluentes,<sup>4,5,13</sup> na redução da demanda química e bioquímica de oxigênio, na redução de trihalometanos (THM's), na remoção de ferro e manganês solúveis e na remoção de gostos e odores indesejáveis.<sup>16</sup> Além disso, o ozônio tem sido utilizado em torres de resfriamento de água para reduzir a formação de incrustações; como agente branqueador de compostos orgânicos; no armazenamento e conservação de pescado; na forma de gelo ozonizado; na desodorização de ambientes; em lavanderias hospitalares, com fins de reduzir custos em energia para esterilização; na odontologia, como tratamento alternativo de cáries; e, na medicina, em Ozonoterapia.<sup>14</sup> A multifuncionalidade do ozônio faz dele um agente promissor não só na indústria alimentícia como também em diversas outras atividades, sobre as quais muitos estudos vêm sendo desenvolvidos. Em função do potencial do uso do ozônio esta revisão aborda alguns aspectos da sua utilização, tais como, propriedades físico-químicas, síntese, estabilidade em meio aquoso, métodos de medição, potencial germicida, aplicabilidade nas indústrias alimentícias e efeito na saúde humana.

## **PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**

O ozônio (O<sub>3</sub>) é uma forma alotrópica instável do oxigênio (O<sub>2</sub>), o qual foi descoberto pelo pesquisador europeu Schönbein, que, em 1839, produziu ozônio sintético a partir da eletrólise do ácido sulfúrico.<sup>22, 23</sup> A composição química do ozônio, caracterizada pela forma

triatômica do oxigênio (Figura1), foi estabelecida em 1872. Os três átomos de oxigênio da molécula do ozônio estão arranjados em ângulo obtuso, onde o oxigênio central é ligado a dois átomos de oxigênio equidistantes. O ozônio é cerca de cinquenta por cento mais denso que o oxigênio, apresenta-se como um gás incolor e de odor pungente, tem massa molecular igual a 48 uma, liquefaz-se a  $-112^{\circ}\text{C}$ , possui ponto de congelamento de  $-251,4^{\circ}\text{C}$ , e sua decomposição ocorre rapidamente, sendo uma reação explosiva quando em temperaturas acima de  $100^{\circ}\text{C}$ , ou ambiental, na pesença de catalisadores.<sup>23, 24</sup>

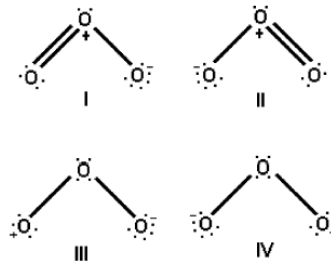


FIGURA 1 – Estrutura do ozônio molecular.  
Fonte: Guzel-Seydim, et al.<sup>16</sup>

Diferentemente do oxigênio que respiramos, o ozônio é instável e muito reativo. Assim, para sua utilização comercial, o ozônio deve ser produzido no local, pois, devido a sua instabilidade, não é possível armazená-lo.<sup>24</sup>

## SÍNTESE

Os principais métodos para a síntese do ozônio consistem na exposição do  $\text{O}_2$  à luz ultravioleta a 185nm e pela descarga eletroquímica.<sup>4, 14, 17, 23</sup> Na formação do ozônio, o oxigênio molecular é dissociado e o oxigênio livre resultante reage com outro oxigênio diatômico para

formar a molécula triatômica de ozônio. Portanto, para quebrar a ligação O-O requer-se uma grande energia.

Na síntese de ozônio pelo método da luz ultravioleta, os átomos de oxigênio formados na fotodissociação do  $O_2$  pela baixa radiação ultravioleta reagem com o  $O_2$  para formar a molécula de ozônio. O método de descarga eletroquímica, conhecido como efeito corona, é o mais utilizado, pois gera uma quantidade maior de ozônio com menor custo.<sup>4, 23</sup> No efeito corona, o ozônio é gerado quando uma corrente alternada de alta voltagem é descarregada na presença de oxigênio<sup>4, 14, 16, 23</sup> (Figura 2). Um exemplo característico desse efeito é o que ocorre na natureza quando, em dias de tempestade, há grande produção de ozônio na atmosfera, devido às elevadas descargas elétricas provenientes dos relâmpagos. O gerador artificial de ozônio reproduz, de forma controlada e eficaz, este fenômeno natural, aliando alta tecnologia na área de materiais e eletroeletrônica avançada.<sup>37</sup>

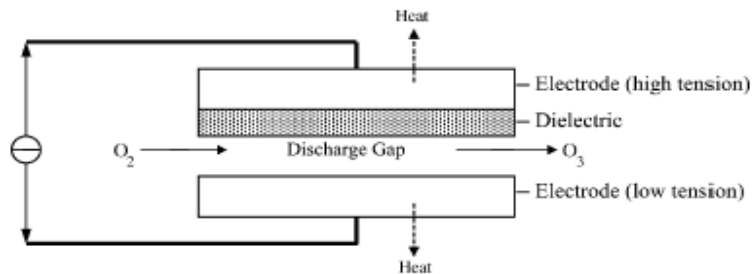
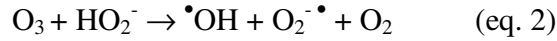
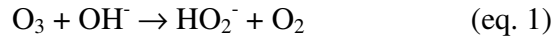


FIGURA 2 – Síntese de ozônio pelo método de descarga elétrica.  
Fonte: GUZEL-SEYDIM, et al.<sup>16</sup>

## ESTABILIDADE EM MEIO AQUOSO

Sabe-se que, em fase aquosa, o ozônio é relativamente instável e decompõe-se facilmente na forma do oxigênio molecular (equações 1 e 2).





A estabilidade do ozônio em solução aumenta com a acidificação e redução de temperatura<sup>4, 23, 24, 48, 44</sup> (Tabela 1).

Tabela 1 – Relação da temperatura e da solubilidade do ozônio em água.

Temperatura (°C)	Solubilidade (litros ozônio/litros água)
0	0,640
15	0,456
27	0,270
40	0,112
60	0,000

Fonte: Rice et al.<sup>32</sup>

A taxa de solubilização do ozônio depende do tamanho das bolhas do gás que borbulham na água, pois quanto menores as bolhas formadas, maior a superfície de contato. O tamanho mais adequado deve variar entre 1 e 3mm de diâmetro. A taxa de fluxo do ozônio e o tempo de contato também afetam a transferência do gás para a água. A agitação da amostra incrementa o contato e a solubilização.<sup>23</sup>

## MEDIÇÃO DE OZÔNIO

Vários métodos são utilizados para quantificar o ozônio. Esses métodos podem ser classificados em físicos, químicos e físico-químicos. Os métodos físicos medem a capacidade de adsorção de radiações no espectro visível, UV ou Infravermelho;<sup>23</sup> os métodos químicos medem a formação de produtos quando o ozônio reage com substâncias como o iodeto de potássio (KI) ou iodeto de hidrogênio (HI); e os métodos físico-químicos medem o efeito físico da reação do ozônio com substâncias quimio luminescentes (luminol, acedium), onde se mede a luz produzida por oxidação química, o que confere maior sensibilidade ao método.<sup>9, 23, 37</sup>

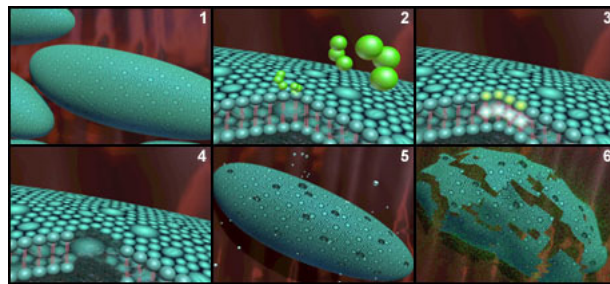
O método colorimétrico do índigo, desenvolvido por Bader & Hoigné,<sup>6</sup> é o método padrão para medida da concentração em experimentos com ozônio. Aceito mundialmente pelo *Environmental Protection Agency* (EPA),<sup>41</sup> é o único método a constar no *Standards methods for the examination of water and wastewater*.<sup>38</sup> Sensível, preciso e rápido, o método do índigo é mais seletivo para o ozônio que os outros métodos. Esse método está baseado na oxidação do corante índigo pela molécula do ozônio, causando redução na intensidade da cor azul.<sup>23,38</sup>

## **EFEITO GERMICIDA**

O efeito antimicrobiano do ozônio tem sido estudado e documentado para uma ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias Gram positivas e negativas, esporos e células vegetativas.<sup>14,16</sup> Geralmente essa substância é mais efetiva contra células vegetativas de bactérias do que em esporos ou fungos (da mesma forma que as bactérias Gram negativas são mais sensíveis ao ozônio do que as Gram positivas<sup>23</sup>). O ozônio tem demonstrado ser eficaz na destruição de espécies de vírus, dentre os quais a encefalomielite venezuelana equina, hepatite A, influenza A, estomatite vesicular e rinotraqueíte.<sup>17,24</sup>

A inativação de bactérias pelo ozônio é um processo complexo, pois o ozônio ataca vários constituintes celulares como proteínas, lipídios insaturados e enzimas da membrana celular, peptoglicanas da parede celular, enzimas e ácidos nucleicos do citoplasma; além de proteínas e peptoglicanas da capa dos esporos bacterianos e capsídeos virais.<sup>23</sup> Dessa maneira, o que basicamente diferencia o ozônio de outros agentes desinfetantes é seu mecanismo de destruição dos microrganismos. O cloro, especificamente, atua por difusão através da parede celular, agindo sobre os elementos vitais localizados no interior da célula, como enzimas,

proteínas, DNA e RNA. O ozônio, por apresentar uma capacidade de oxidação superior, age diretamente na parede da célula, causando sua ruptura e morte em menor tempo de contato, inviabilizando a recuperação dos microrganismos após o ataque (Fig.3). Com isso, dependendo do tipo de microrganismo, o ozônio pode agir até 3.125 vezes mais rápido do que o cloro na inativação celular.<sup>37</sup>



1. Bactéria; 2. Parede celular em contato com ozônio; 3. Oxidação da parede celular da bactéria; 4, 5 e 6. Ruptura e destruição da bactéria.

FIGURA 3 – Mecanismo de ação do ozônio nos microrganismos.  
Fonte: Snatural.<sup>37</sup>

Dentre as substâncias desinfetantes mais empregadas na indústria de alimentos, o ozônio possui o maior poder de oxidação, superando inclusive, o peróxido de hidrogênio, o hipoclorito e o cloro<sup>24, 37</sup> (Tabela 2).

Tabela 2 - Poder oxidante relativo de desinfetantes.

Substâncias Desinfetantes	Potencial de Oxidação (Volts)	Poder relativo de Oxidação *
Ozônio	2,07	1,52
Peróxido de hidrogênio	1,77	1,30
Hipoclorito	1,49	1,10
Cloro	1,36	1,00

\* Baseado no cloro como referência (=1,00)

Fonte: Snatural.<sup>37</sup>

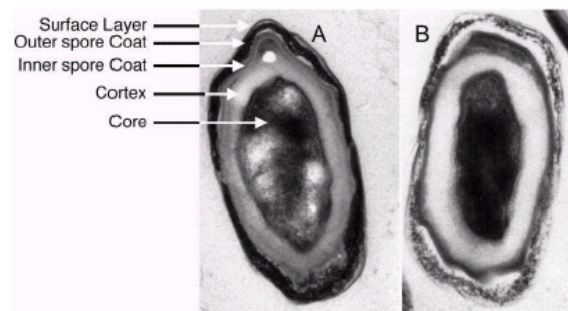
Por ser uma molécula altamente reativa, a oxidação de compostos orgânicos e inorgânicos — durante o processo de ozonização — pode ocorrer via ozônio molecular, através de uma reação direta (predominante em meio ácido) ou via radical hidroxila, por meio de uma reação indireta (predominante em meio alcalino).<sup>24</sup> Porém, na prática, a oxidação de compostos não ocorre de uma só maneira, havendo a contribuição desses dois mecanismos, simultaneamente. Assim, na reação direta ocorre o ataque eletrofílico do ozônio molecular aos compostos que contêm ligações do tipo C=C, a alguns grupos compostos com funcionais específicos (OH, CH<sub>3</sub> e OCH<sub>3</sub>), e outros contendo átomos que apresentam densidade de carga negativa (N, P, O e S). A reação indireta, no entanto, não é seletiva, sendo capaz de promover um ataque aos compostos orgânicos 10<sup>6</sup>-10<sup>9</sup> vezes mais rápido que outros agentes oxidantes conhecidos, como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou mesmo o próprio ozônio na reação direta. O radical hidroxila (<sup>•</sup>OH) pode reagir através de três mecanismos: 1) abstração de hidrogênio; 2) transferência de elétrons; e 3) pela adição de radicais O<sub>3</sub>.<sup>27</sup> Cada uma das formas oxidantes assume diferentes graus de importância em função da aplicação específica utilizada. Enquanto processos de desinfecção ocorrem predominantemente via ozônio molecular, processos de oxidação podem ocorrer tanto por meio do ozônio molecular como via radical hidroxila.<sup>4</sup>

O cloro, embora mais conhecido e amplamente utilizado, pode gerar subprodutos prejudiciais à saúde humana, além de não mostrar eficiência no combate de microrganismos como a *Giardia lamblia* e o *Cryptosporidium parvum*, dentre outros.<sup>5</sup>

Um estudo comparativo entre o ozônio e o peróxido de hidrogênio, comparando-se a efetividade esporicida em oito cepas de esporos de *Bacillus spp* – *B. subtilis* OSU494, *B. subtilis* OSU848, *B. subtilis var niger* ATCC 9372, *B. subtilis* ATCC 19659, *B. cereus* OSU11, *B. polymyxa* OSU443, *B. megaterium* OSU125, e *B. stearothermophilus* OSU24 – , demonstrou que 11ppm (0,0011%) de ozônio em água reduziram a contagem de esporos em 6,1 ciclos

logarítmicos, enquanto que a solução de peróxido de hidrogênio a 100.000ppm (10%) conferiu uma redução de, no máximo, 1,6 ciclos logarítmicos.<sup>21</sup> Essa comprovação assegura a eficiência do ozônio como substituto do cloro e do peróxido de hidrogênio na indústria de alimentos.<sup>22</sup>

O esporo mais resistente ao ozônio é o de *Bacillus subtilis*,<sup>49</sup> que serve como indicador de eficiência do processo do ozônio como sanificante de alimentos. Agentes oxidantes, como ozônio e peróxido de hidrogênio, provavelmente agem na eliminação de esporos através da degradação de seus componentes externos (Fig.4), expondo seu interior à ação sanificante.<sup>21</sup>



(A) controle; (B) esporo exposto à ação do ozônio. Os esporos tratados com ozônio foram submetidos ao tratamento com água ozonizada (10ppm) a 22°C por 1 min, seguido pela neutralização com tiosulfato de sódio. Note que as duas camadas externas são as estruturas aparentemente mais atingidas pelo ozônio.

FIGURA 4 – Imagem de esporo de *B. subtilis* OSU494 por microrscopia de transmissão de elétrons.

Fonte: Khadre & Yousef.<sup>21</sup>

## USO NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA

O ozônio vem ganhando espaço no processamento de alimentos devido ao seu alto poder sanificante e pela sua rápida degradação, não deixando resíduos nos alimentos tratados. Essas propriedades intrínsecas permitem a ingestão de alimentos ozonizados sem riscos à saúde.<sup>18, 25, 33</sup>

Decorrente dessas vantagens, o ozônio já vem sendo utilizado na manipulação e no

processamento de alimentos de origem vegetal e animal com garantia na higiene, cor, odor e aspecto visual, sem deixar resíduos que possam provocar reações indesejáveis.

O ozônio melhora a qualidade e realça o sabor da maioria dos alimentos perecíveis, pois oxida os pesticidas e neutraliza os gases de amônia e etileno produzidos durante os processos de amadurecimento e decomposição.<sup>20</sup> Os pesticidas *methylparathion*, *parathion*, *diazinon* e *cypermethrin*, largamente utilizados em frutas, são totalmente oxidados pelo ozônio em concentrações de 1,4ppm por cinco minutos.<sup>47</sup>

Com o objetivo de conservar os alimentos, o ozônio pode ser utilizado na forma gasosa em câmaras frigoríficas, silos e depósitos de alimentos, protegendo e conservando cereais, frutas, hortaliças, carnes e laticínios. Como a maioria das perdas pós-colheita e as perdas decorrentes da manipulação excessiva de alimentos ocorrem por ação de bactérias, fungos e infestações por insetos, a injeção direta de gás ozônio em depósitos mantém o ambiente limpo e esterilizado, mesmo quando há altos índices de calor e umidade, o que assegura maior tempo de armazenamento e vida útil dos alimentos. De outra maneira, o ozônio pode também ser utilizado dissolvido em água na lavagem de alimentos, a exemplo do que ocorre nos Estados Unidos na etapa de lavagem de carcaças de frangos, em abatedouros frigoríficos.<sup>43</sup>

O tratamento com ozônio, tanto na forma líquida quanto gasosa, interfere significativamente no tempo de vida útil dos alimentos.<sup>45</sup> O gás ozônio produz desinfecção da água proveniente de esgoto em apenas dois minutos, a qual pode ser reutilizada para irrigação em pequenas propriedades agrícolas, e na lavagem de vegetais e leguminosas destinados ao consumo na forma cozida.<sup>5</sup>

A exposição de champignons (*Agaris bisporus*) a um ambiente contendo 100ppm de gás ozônio durante 0, 15 e 30 minutos causa menor escurecimento externo e um retardamento do escurecimento interno no armazenamento em bandejas de poliestireno.<sup>12</sup> Por outro lado — e de

forma positiva —, essas concentrações de ozônio não causaram efeitos perceptíveis nas características de textura, maturação e perda de peso dos champignons. Em outro estudo, Yuk et al.,<sup>51</sup> ao avaliarem as condições microbianas também em champignons, obtiveram uma redução de 0,94 e 0,34 Log na contagem de *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, respectivamente, ao utilizarem 3ppm de ozônio durante cinco minutos. Índices ainda maiores de redução da carga microbiana foram obtidos quando uma solução de tratamento combinado, contendo 3ppm (0,0003%) de ozônio e 10.000ppm (1%) de ácido cítrico foi aplicada aos espécimes: 2,26 Log para *E. coli* e 1,33 Log para *L. monocytogenes*.<sup>43</sup> Da mesma forma, Singh et al.<sup>36</sup> encontraram melhores resultados com tratamentos combinados. O uso isolado de ozônio (0; 5,2; 9,7 e 16,5 mL.L<sup>-1</sup>), óleos essenciais (0; 0,1; 1,0 e 10,0mL.L<sup>-1</sup>) ou mesmo ClO<sub>2</sub> (0; 5; 10 e 20mg.L<sup>-1</sup>) no processo de lavagem de alface e cenouras não foi eficaz para a obtenção de uma redução significativa na contagem de *Escherichia coli* O157:H7. Porém, lavagens seqüenciais de uma mesma amostra com esses três tipos de sanificantes foram capazes de reduzir a contagem dessa bactéria em até 4,28 unidades logarítmicas. Singh et al.<sup>35</sup> também relataram uma maior eficiência desse mesmo tratamento combinado para controle microbiano de sementes de alfafa. A lavagem das sementes com água ozonizada a 14ppm reduz a contagem de *Escherichia coli* O157:H7 em 0,87 unidades Log, enquanto que a combinação de óleos essenciais (1,0; 2,5 e 5,0 mL.L<sup>-1</sup>), ozônio (4,60; 9,27 e 14,3 mg.L<sup>-1</sup>) e ClO<sub>2</sub> (10; 25 e 50 mg.L<sup>-1</sup>) inferiram em uma redução na contagem de até 3,32 Log UFC.g<sup>-1</sup>, quando utilizados nas maiores concentrações. Em contrapartida, há autores<sup>1</sup> que obtiveram resultados diferentes, já que seus melhores resultados foram obtidos com o uso isolado de ozônio (1,45L.min<sup>-1</sup>), quando este era aplicado na água de lavagem de maçãs, ocasionando uma redução da carga de *Escherichia coli* de até 3,7 Log.

Expondo pistaches ao ozônio gasoso (0,1; 0,5; e 1,0ppm) em ambiente a 20°C e 70% de umidade relativa do ar, Akbas & Ozdemir<sup>2</sup> concluíram que a eficiência deste gás na redução da

contagem da *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* aumenta proporcionalmente ao tempo de exposição e concentração. Apenas 1ppm de ozônio foi suficiente para reduzir, na polpa e na casca de pistaches, 3,5 Log de UFC g<sup>-1</sup> de *Escherichia coli* e 3 Log de UFC g<sup>-1</sup> de *Bacillus cereus*, sem qualquer alteração nas suas propriedades físico-químicas (pH, ácidos graxos livres, índice de peróxidos, cor e composição de ácidos graxos).

No âmbito da armazenagem de grãos, ainda que limitado a estudos laboratoriais e experimentais, o uso do ozônio também tem se mostrado uma eficiente ferramenta de ajuda na conservação.<sup>19, 34</sup> O ozônio pode substituir, em muitos casos, o controle químico de insetos e pragas e, dessa forma, evitar o uso de inseticidas como piretróides, organofosforados e fumigantes (como a fosfina - PH<sub>3</sub>), os quais apresentam atividade nociva ao organismo humano, quando ingeridos e manipulados em excesso. Do ponto de vista operacional, essa tecnologia é bastante segura e de fácil execução, pois é um sistema que atua com fluxo contínuo e não requer absoluta precisão no controle de volume, além de ser ambientalmente limpo e eficaz no controle de parasitas, sobretudo em grãos armazenados.<sup>11</sup> Nesse sentido, resultados de pesquisas conduzidas na Universidade Federal de Viçosa (UFV) indicam o controle de 95% dos insetos-praga *Sitophilus zeamais* (caruncho dos cereais) e *Tribolium castaneum* (besouro dos cereais), em um período de 24h e 64h, respectivamente, onde, em uma quantidade de grãos armazenados a 25°C, os insetos foram expostos diretamente ao gás ozônio numa concentração de 50ppm. Assim, o tempo de exposição necessário para o controle das pragas depende de fatores como a temperatura da massa de grãos e a camada em que os insetos estão localizados, ou seja, a proximidade do alvo ao ponto de injeção do gás é um fator bastante importante.<sup>34</sup>

A água ozonizada pode ser utilizada também para lavar grãos duros de trigo, reduzindo a contagem total de bactérias, mofos e fungos sem afetar a qualidade de sua farinha.<sup>19</sup> Além disso, o poder oxidante do ozônio tem sido usado como um potente agente no tratamento para sanificar



a superfície de carne bovina, pois a oxidação causa danos irreversíveis aos ácidos adiposos da membrana e às proteínas celulares dos microrganismos.<sup>15,39</sup> Segundo Reagan et al.,<sup>30</sup> água ozonizada a 2,3ppm em carcaças de bovinos ocasiona uma redução de 1,3 log UFC/g de bactérias mesófilas aeróbias encontradas superficialmente.

Concentrações de ozônio de 0,5 e 1,0ppm utilizadas na sanificação de carne bovina maturada são significativas para reduzir bactérias mesófilas em 0,81 e 0,95 ciclos logarítmicos, respectivamente. No entanto, o tratamento torna-se mais eficaz em combinação com o ácido ascórbico (0,2 e 0,5%), chegando a uma redução de 1,34 log UFC/g (1,0ppm e 0,5% ácido ascórbico).<sup>10</sup> Ainda, ao submeter carne finamente dividida com um banho de água ozonizada de 2ppm a 7,2°C durante 15 minutos, observou-se uma redução de 0,44, 0,78 e 0,57 ciclos log de UFC/g de Coliformes, *Salmonella typhimurium* e da microbiota psicrotrófica, respectivamente.<sup>35</sup> Porém, obteve-se melhores resultados foram obtidos com uma solução combinada de ozônio 2ppm com ácido acético a 5% (p/v).<sup>29</sup> As reduções, com a participação do ácido, são de 1,42, 1,66, 1,84 e 1,27 ciclos log de UFC/g de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, Coliformes e de bactérias aeróbias mesófilas, respectivamente.

No tratamento de carcaças de frango com uma solução de água ozonizada entre 3 e 3,5ppm, a 4°C, o ozônio foi efetivo para reduzir os microrganismos aeróbicos mesófilos (89,8%), psicrotróficos (75,0%), Coliformes totais (78,9%), *Escherichia coli* (75,0%), fungos filamentosos e leveduras (58,6%), *Staphylococcus coagulase positiva* (70,0%), *Salmonella sp.* (100%) e *Pseudomonas sp.* (100%), enquanto a água hiperclorada foi ineficaz para a eliminação de *Salmonella sp.* e *Pseudomonas sp.*<sup>43</sup> Quando na forma gasosa (>2000ppm por 30 min), porém, a redução observada foi de até 97% de *Salmonella sp.* e de 95% de *Pseudomonas sp.*<sup>3</sup>

O ozônio também tem sido utilizado e recomendado para aumentar a vida útil de pescados. Em um sistema de 40% de gelo e 60% de água ozonizada (0,17ppm), sardinhas

alcançam uma vida útil de 19 dias, enquanto no sistema 40% gelo e 60% água e utilizando-se somente gelo em flocos, as mesmas duram 15 e 8 dias, respectivamente. Dessa forma, o armazenamento de sardinhas no ozônio é mais eficaz que o sistema sem ozônio, reduzindo as populações de bactérias mesófilas (0,79 UFC.cm<sup>-2</sup>), psicotróficas (0,6 UFC.cm<sup>-2</sup>), anaeróbias (0,49 UFC.cm<sup>-2</sup>), proteolíticas (0,69 UFC.cm<sup>-2</sup>) e lipolíticas (0,93 UFC.cm<sup>-2</sup>), bem como coliformes (0,31 UFC.cm<sup>-2</sup>) na carne e bactérias mesófilas (0,52 UFC.cm<sup>-2</sup>) e psicotróficas (0,42 UFC.cm<sup>-2</sup>) na pele de pescado.<sup>7</sup> Nesse sentido, para Campos et al.,<sup>8</sup> o armazenamento de pescado (*Psetta maxima*) em 40% de gelo e 60% de água ozonizada (0,2ppm) confere uma vida útil de 14 dias ao produto *in natura*, enquanto que o pescado armazenado sem a adição de ozônio atinge apenas cerca da metade deste tempo. Além disso, cabe ressaltar que o sistema de conservação com ozônio também infere reduções significativas da atividade dos principais mecanismos responsáveis pela hidrólise e oxidação lipídica em carnes de pescado investigadas.<sup>8</sup>

Ainda quanto à conservação de alimentos perecíveis como o pescado, Manousaridis et al.<sup>26</sup> relatam reduções nas contagens de bactérias mesófilas aeróbicas, *Pseudomonas spp.* sulfito redutoras e bactérias lácticas de até 2,1, 1,1, 2,5 e 0,8 ciclos logarítmicos, respectivamente, em mexilhões tratados com água ozonizada a 1ppm. Entretanto, na sua forma gasosa, a uma concentração de 0,1ppm, o ozônio não foi efetivo para causar uma redução na contagem de *Listeria innocua* 2030c e bactérias mesófilas durante processo de defumação a frio de salmão.<sup>42</sup>

Com base no exposto, observa-se que a inativação microbiana pelo uso do ozônio varia de acordo com as condições do meio, como do tipo de alimento, quantidade de matéria orgânica, tempo de contato do ozônio, pH, temperatura e presença de aditivos químicos,<sup>7, 17, 31</sup> o que demonstra que estudos nesse campo de pesquisa ainda se fazem necessários para que se tenha um efetivo conhecimento das potencialidades do ozônio, benefícios e melhores formas de aplicação tecnológica.

## **EFEITO NA SAÚDE HUMANA**

Embora estudos demonstrem que o consumo de alimentos tratados com ozônio não causa qualquer efeito tóxico à saúde humana e de animais, é importante que haja o monitoramento e proteção das pessoas que trabalham na manipulação dessa substância na indústria e em outras atividades. Por ser volátil, o gás ozônio pode afetar o sistema respiratório e causar sintomas de toxicidade, como dor de cabeça, tontura, sensação de queimação na região dos olhos, irritação da garganta e tosse. Em baixas concentrações, o ozônio não provoca sinais de toxicidade, mas em altas concentrações pode ser fatal aos humanos. Os níveis máximos de exposição ao ozônio, segundo a Associação Americana de Higiene Industrial (AIHA) e a Administração de Saúde e Segurança Ocupacional (OSHA), são de  $0,2\text{mg}/\text{m}^3$  (0,1ppm em volume) por 8 horas ou  $0,6\text{mg}/\text{m}^3$  (0,3ppm em volume) durante 10 minutos. No entanto, um indivíduo pode detectar o cheiro característico do ozônio em concentrações de  $0,02\text{-}0,1\text{mg}/\text{m}^3$  (0,01 a 0,05ppm).<sup>14,16</sup>

## **CONCLUSÃO**

O ozônio, em alimentos, destrói microrganismos e oxida pesticidas sem deixar resíduos tóxicos, constituindo-se em excelente alternativa para substituir o cloro e o peróxido de hidrogênio, os quais são os principais sanitizantes relacionados como produtos tóxicos. À semelhança de outros países, muitos estudos e divulgação devem ter lugar, nas condições do Brasil, para o bom entendimento das limitações, dosagens, segurança, aplicações e benefícios do ozônio na indústria alimentícia. Com isso, pode-se auxiliar os órgãos reguladores da segurança alimentar quanto às condições para seu uso na substituição de outros produtos menos seguros e que, por legislação, são autorizados. Todavia, por ser de suma importância, os benefícios do

ozônio devem ser analisados de forma adequada, servindo esta revisão como auxílio para os estudos futuros.

## **SUMMARY**

### **APPLICATION OF OZONE IN INDUSTRY OF FOOD**

It was done a review about the ozone application, including its physical and chemical properties, methods of synthesis, stability in aqueous media, methods of measurement, germicidal power, effects on human health, and advantages of its application in the food industry, mainly what concerns the products and equipment higienization and sanitization, as well as the treatment of effluents. The ozone is a strong oxidant and reactive molecule and has been known and used for decades as an adjunct for water disinfection, in countries of the European Union. Besides, a range of applicabilities have emerged for ozone, mainly due to new knowledge about its characteristics and properties. Due to its bactericidal property, the investigation of their actions in a variety of microorganisms, vegetative cells or spores, inside of the industry and in food, have aroused particular attention from researchers around the world. The importance in studying the ozone in the food industry lies in the fact that it is a molecule which decomposes easily without leaving residues and can be applied to food, safe mode on toxicity to consumers.

Keywords: Ozone; bactericidal effect; food industry.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. ACHEN, M.; YOUSEF, A. E. Efficacy of ozone against *Escherichia coli* O157:H7 on apples. **J. Food Sci.**, v.66, n. 9, p.1380-1384. 2001.
2. AKBAS, M. Y.; OZDEMIR, M. Effectiveness of ozone for inactivation of *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* in pistachios. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v. 41, n.5, p.513-519. 2006.

3. AL-HADDAD, K. S. H.; AL-QASSEMI, R. A. S.; ROBINSON, R. K. The use of gaseous ozone and gas packaging to control populations of *Salmonella infantis* and *Pseudomonas aeruginosa* on the skin of chicken portions. **Food Control**, v. 16, n.5, p.405-410. 2005.
4. ALMEIDA, E. et al. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Quím. Nova**, v.27, n.5, p.818-824. 2004.
5. ASSIRATI, D. M. **Ozônio é usado como desinfetante de efluentes**. Jornal da Unicamp, Ed. 296 - 8 a 14 de agosto de 2005. Disponível em: [http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp\\_hoje/ju/agosto2005/ju296pag08.html](http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/agosto2005/ju296pag08.html). Acesso em: 16 jun. 2007.
6. BADER, H.; HOINE, J. Determination of Ozone in Water by the Indigo Method. A Submitted Standard Method, Ozone: **Sci. Eng.** v.169, n.4. 1982.
7. CAMPOS, C. et al. Effects of storage in ozonized slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (*sardine pilchardus*). **J. Food Microbiol.**, v. 103, p.121-130. 2005.
8. CAMPOS, C. A. et al. Evaluation of ozone-slurry ice combined refrigeration system for the storage of farmed turbot (*Psetta maxima*). **Food Chem.**, v.97, n.2, p.223-230. 2006.
9. Chawla, A. S. **Application of ozonated water technology for improving quality and safety of peeled shrimp meat**. 2006. 111f. Mestrado (Master in Science) - Department of Food Science, Technology in Dairy Technology Gujarat Agricultural Univeristy, India, 2002.
10. CHIATTONE, P. **Ozônio e ácido ascórbico na coloração e microbiota da carne bovina maturada**. 2006. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

11. EMBRAPA. **Ozônio: tecnologia limpa e segura no controle de pragas em grãos armazenados**. Disponível em: <http://www.agronline.com.br/agronoticias/noticia.php?id=2437>. Acesso em: 10 dez. 2006.
12. ESCRICHE, I. et al. Effect of ozone treatment and storage temperature on Physicochemical Properties of mushrooms (*Agaricus bisporus*). **Int. Food Sci. Technol.**, v.7, n.3, p. 251-258. 2001.
13. FRANCO, D. et al. Electrochemical ozone production as an environmentally friendly technology for water treatment. **Clean**, v.36, n.1, p.34-44, 2008.
14. FRANKEN, M. S. **The application of ozone technology for public health and industry**. Disponível em: <http://fss.k-state.edu>. Acesso em: 11 nov. 2007.
15. GORMAN, B. M. et al. Evaluation of hand-trimming, various sanitizing agents, and hot water spray-washing as decontamination interventions for beef brisket adipose tissue. **J. Food Prot.**, v.58, n.8, p.899-907. 1995.
16. GUZEL-SEYDİM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDİM, A. C. Use of ozone in food industry. **Lebensm-Wiss.u.-Technol**, v. 37, p. 453-460. 2004.
17. GUZEL-SEYDİM, Z. B; BEVER Jr. P. I.; GREENE, A. K. Efficacy of ozone to reduce bacterial populations in the presence of food components. **Food Microbiol.**, v.21, n.4, p.475-479. 2004.
18. HORVÁTH, M.; BILITZKY, L.; HÜTTNER, J. Bactericidal, sterilizing and other effects in lower organisms. In: **OZONE**. Budapest, cap. 3, p.69-74. 1985.
19. IBANOGLU, S. Wheat washing with ozonated water: effects on selected flour properties. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v.37, p.579-584. 2002.
20. JAKSCH, D. et al. The effect of ozone treatment on the microbial contamination of pork meat measured by detecting the emissions using PTR-MS and by enumeration of microorganisms. **Int. J. Mass Spectrom.**, v. 239, p. 239-214. 2004.

21. KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E. Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 71, n.2-3, p. 131-138. 2001.
22. KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E. Decontamination of a multilaminate aseptic food packaging material and stainless steel by ozone. **J. Food Safety**, v.21, n.1, p.1-13. 2001.
23. KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E.; KIM, J.-G. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. **J. Food Sci.**, v.66, n.9. 2001.
24. KIM, J.G; YOUSEF, A.E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **J. Food Prot**, v.62, n.9, p.1071-1087. 1999.
25. MANCUSO, P. C.; SANTOS, H. Tecnologia de reuso de água. In: **REÚSO DE ÁGUA**. Barueri, SP: Manole, 2003; p.314-316.
26. MANOUSARIDIS, G. A. et al. Effect of ozone on microbial, chemical and sensory attributes of shucked mussels. **Food Microbiol.**, v. 22, n.1, p. 1-9. 2005.
27. MORAES, S.G; FREIRE, R.S; DURÁN, N. Degradation and toxicity reduction of textile effluent by combined photocatalytic and ozonation processes. **Chemosph.**, v.40, p.369-373. 2000.
28. NGADI, M. et al. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in poultry chiller water using combined ultraviolet light, pulsed electric field and ozone treatments. **Int. J. Poultry Sci.**, v.3, n.11, p. 733-737. 2004.
29. POHLMAN, F. W. et al. The effects of Ozone, chlorine dioxide, cetylpyridinium chloride and trisodium phosphate as multiple antimicrobial interventions on microbiological, instrumental color, and sensory color and odor characteristics of ground beef. **Meat Sci.**, v.61, p. 307-313, 2002.
30. REAGAN, J. O. et al. Trimming and washing of beef carcasses as a method of improving the microbiological quality of meat. **J. Food Prot.**, v.59, n.7, p.751-756. 1996.

31. RESTAINO, L. Efficacy of ozonated water against various food related micro-organisms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.61, n.1, p.3471-3475. 1995.
32. RICE, J. O. et al. Uses of ozone in drinking water treatment. **J. Am. Water Works Assoc.**, v.73, n.1. p.44-57. 1981.
33. RICE, J. O. et al. Trimming and washing of beef carcasses as a method of improving the microbiological quality of meat. **J. Food Prot.**, v.59, p.751-756. 1996.
34. ROZADO, A. F. **Ozônio: tecnologia para controle de pragas em grãos armazenados**. 9<sup>a</sup> Conferência Internacional de Proteção de Produtos Armazenados Campinas, São Paulo, Brasil, 2006. Disponível em: <http://www.seedquest.com/News/releases/2006/october/17248.htm>. Acesso em: 04 fev. 2007.
35. SINGH, N.; SINGH, R. K.; BHUNIA, A. K. Sequential disinfection of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated alfafa seeds before and during sprouting using aqueous chlorine dioxide, ozonated water, and thyme essential oil. **Lebensm.-Wiss.u.-Technol**, v.36, p.235-243. 2003.
36. SINGH, N. et al. Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. **Lebensm.-Wiss.u.-Technol.**, v. 35, p.720-729. 2002.
37. SNATURAL – Tecnologias Ambientais Ltda. **Ozônio**. Disponível em: <http://www.snatural.com.br/Ozonio.htm>. Acesso em: 15 fev. 2007.
38. STANDAR METHODS OF WATER. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 1997. Disponível em: <http://www.standardmethods.org/store/ProductView.cfm?ProductID=196>. Acesso em: 10 jan. 2008.



39. STIVARIUS, M.R. et al. Microbial, instrumental color and sensory color and odor characteristics of ground beef produced from beef trimmings treated with ozone or chlorine dioxide. **Meat Sci.**, v.60, n.3, p.299-305. 2002.
40. USDA. **Code of Federal Regulations**, Title 9, Part 381.66 – poultry products; temperatures and chilling and freezing procedures. (1997). Office of the Federal Register National Archives and Records Administration, Washington, DC.
41. United States Environmental Protection Agency - EPA 815-R-99-014 - Office of Water. **Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual**. 1999. Disponível em: [www.epa.gov/safewater/mdbp/alternative\\_disinfectants\\_guidance.pdf](http://www.epa.gov/safewater/mdbp/alternative_disinfectants_guidance.pdf)-. Acesso em: 12 jan. 2008.
42. VAZ-VELHO, M. et al. Inactivation by ozone of *Listeria innocua* on salmon-trout during cold-smoke processing. **Food Control**, v.17, n.8, p.609-616. 2006.
43. VEIGA, S. M. O. M. Utilização de água potável, hiperclorada e ozonizada e do ultra-som, combinados ou não, em um protótipo de chiller, para a sanificação de carcaças de frango. In:\_\_\_\_\_. **Sanificação de carcaças de frango: processos alternativos**. 2003. cap.3, p.99-166, p.291. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
44. WALTER, R.H.; SHERMAN, R.M. Duration of ozone in water in the upper solubility range. **J. Food Sci.**, v.993, n.41. 1976.
45. WEBB, J. **Uso de ozônio para prolongar a vida dos alimentos**. Disponível em: <http://www.aguaonline.com.br/matéria.asp?codigo=1045>. Acesso em: 02 jun. 2007.
46. WEI, C.I; COOK, D.L.; KIRK, J.R. Use of chlorine compounds in the food industry. **Food Technol.**, v.39, p.107-115. 1985.
47. WU. J. et. al. Removal of residual pesticides on vegetable using ozonated water. **Food Control**, v.18, n.5, p.466-472. 2007.

48. YANG, P. P., CHEN, T. C. Stability of ozone and its germicidal properties on poultry meat microorganisms in liquid phase. **J. Food Sci.**, v.44, n.2, p.501-504. 1979.
49. YOUNG, S. B.; SETLOW, P. Mechanisms of *Bacillus subtilis* spore resistance to and killing by aqueous ozone. **J Appl Microbiol**, v.96, n.5, p.1133-1142, 2004.
50. YUAN, J.; STEINER, E.; NOVAK, J. Ozone processing: historical perspectives, system integration, and potential food applications. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL OZONE ASSOCIATION, 14, 1999, Detroit. **Proceeding**...Detroit, 1999, p.337-341.
51. YUK, H. et al. Effect of combined ozone and organic acid treatment for control of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on enoki mushroom. **Food Control**, v.18, n.5, p.548-553. 2007.



increasing the proportion of saturated fatty acids. However, the TBARS results, although higher for the sample with ozone, remained quite below the limit recommended for oxidized samples.

**Keywords:** hamburger, ozone, lipid oxidation, antioxidants.

## **Introduction**

The demand for semi industrialized products has been increasing, due to the ease of their preparation and due to the microbiological security since the formulations generally present additives and preservatives which, although may not enjoy acceptance by consumers, confer a higher degree of microbiological harmlessness.

Recent studies refer to the possibility of substitution of these additives by the process of ozone application. Ozone ( $O_3$ ) is an allotropic, unstable form of oxygen ( $O_2$ ), characterized by the tri-atomic form of oxygen. This compound is nearly fifty percent more dense than oxygen and presents itself as a colourless gas of pungent odour, has a molecular weight equal to 48g, liquefies itself at  $-112^\circ\text{C}$ , possesses a freezing point of  $-251^\circ\text{C}$  and its decomposition occurs rapidly at temperatures above  $100^\circ\text{C}$  or at room temperature, in the presence of catalyzing agents (Kim; Yousef; Dave, 1999).

Some works demonstrate the reduction of the initial bacterial count on foods of vegetable and animal origin when submitted to treatment with ozone (Al-Haddad; Al-Qassemi; Robinson, 2005; Akbas; Ozdemir, 2006; Chiattonne, 2006; Yuk et al., 2007). However, few works refer to the effect that ozone may cause on the physical-chemical properties of meat, mainly when applied to processed products (Chiattonne; Torres; Zambiazzi, 2008). It is presumed that due to the high anti oxidant action of ozone, its application, in addition to reducing the microbial counting, may induce the formation of

free radicals, accelerating the oxidation reactions on fatty acids and on natural pigments of meat, presenting as a consequence, a darker coloration (Mckenna et al., 2005; Goldstein; Samuni, 2005). However, its effect depends to a great extent on its concentration, on its form of application, on the type of food to which it was applied, period of contact, environment pH, temperature and on the chemical additives present in the food (Guzel-Seydim; Bever; Greene, 2004).

Products originating from primary and secondary oxidation of lipids (peroxides and the products of its degradation) can be absorbed by the organism (liver) and even in the absence of absorption, represent risks for the intestinal mucous membrane. Peroxides affect the activity of several enzymes, alter low-density lipoproteins (LDL) which are involved in the development of arteriosclerotic lesions and interact with the DNA, acting as promoters of carcinogenesis (Araújo, 2008). It is believed that the oxidation of the low-density lipid-proteins be the main cause of cardio-vascular deceases and that the decomposition of peroxides formed by the action of lipoxygenases may be the initial mechanism of the LDL oxidation (Zambiasi, 1999).

The objective of this work was to evaluate the effect of the application of ozone during the processing of hamburger, on the degree of lipid oxidation and on its fatty acid profile.

## **Materials and methods**

### **Materials**

For the preparation of the hamburgers, fresh bovine chuck steak meat was used with a level of 6% of fat, acquired in a commercial butcher's in the city of Pelotas/RS and immediately sent to the Laboratory of Chemical and Bromatological Analyses of FAEM

(UFPEl). The other ingredients utilized in this formulation (Table 1) were also acquired in the local commerce except for hamburger mixture which was donated by the company Duas Rodas Industrial (SC).

### Processing of hamburgers

The processing of hamburgers followed the flowchart exposed in figure 1, utilizing condiments and antioxidants based on a standard formulation (Center of Technology of Food Products, 1998).

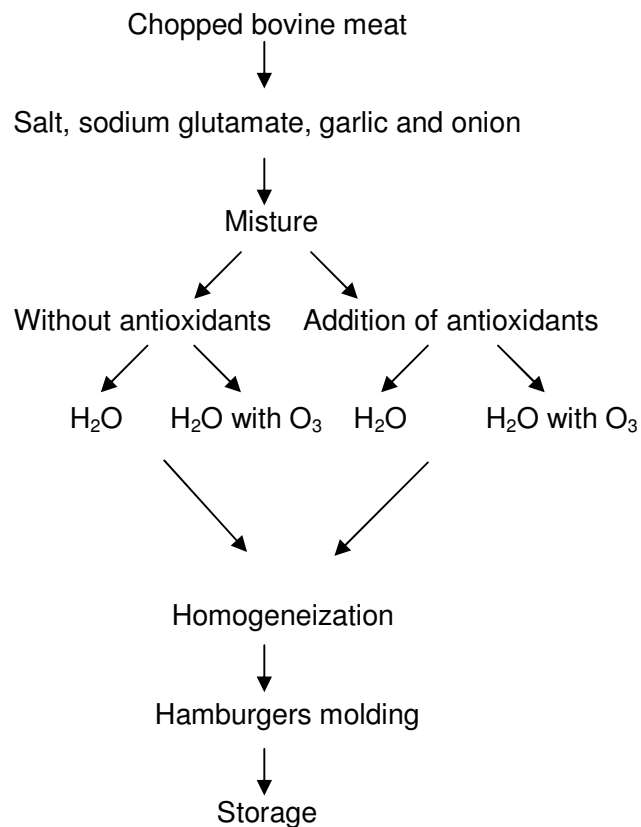


Figure 1 – Hamburger elaboration scheme

Initially, chopped bovine meat was mixed with salt, sodium glutamate, garlic and onion, followed by the homogenizing of the material and later, this material was separated in seven different lots. In one (01) of the lots, antioxidants were not added and in the other six (06), one of the following antioxidants was added: sodium eritorbate, ascorbic acid or a mixture of sodium eritorbate with citric acid (commercial mixture for hamburger), for each one, in the concentrations of 0.3 and 0.6%. Each one of these seven lots was subdivided into two lots, where in one of them 3% (v/p) of distilled water was added and in the other 3% (v/p) of ozonized water was added. Thus, this work counted with 14 treatments (Table 1).

Table 1 – Formulation of hamburgers (%).

Treatments	Meat	Water	O <sub>3</sub>	Ingredients*	Sodium Eritorbate	Ascorbic acid	Mixture**
C	94.8	3.0	0.0	2.2	0.0	0.0	0.0
O	94.8	0.0	3.0	2.2	0.0	0.0	0.0
3E	94.5	3.0	0.0	2.2	0.3	0.0	0.0
3EO	94.5	0.0	3.0	2.2	0.3	0.0	0.0
6E	94.5	3.0	0.0	2.2	0.6	0.0	0.0
6EO	94.5	0.0	3.0	2.2	0.6	0.0	0.0
3VC	94.5	3.0	0.0	2.2	0.0	0.3	0.0
3VCO	94.5	0.0	3.0	2.2	0.0	0.3	0.0
6VC	94.5	3.0	0.0	2.2	0.0	0.6	0.0
6VCO	94.5	0.0	3.0	2.2	0.0	0.6	0.0
3M	94.5	3.0	0.0	2.2	0.0	0.0	0.3
3MO	94.5	0.0	3.0	2.2	0.0	0.0	0.3
6M	94.5	3.0	0.0	2.2	0.0	0.0	0.6
6MO	94.5	0.0	3.0	2.2	0.0	0.0	0.6

\* salt (1,5%), garlic (0,2%), onion (0,3%), sodium glutamate (0,2%). \*\* Mixture = citric acid and sodium eritorbate. Control (C), ozone (O), 0,3% sodium eritorbate (3E), 0,3% sodium eritorbate and ozone (3EO), 0,6% sodium eritorbate (6E), 0,6% sodium eritorbate and ozone (6EO), 0,3% of ascorbic acid (3VC), 0,3% of ascorbic acid and ozone (3VCO), 0,6% of ascorbic acid (6VC), 0,6% of ascorbic acid and ozone (6VCO), 0,3% of mixture (3M), 0,3% of mixture with ozone (3MO), 0,6% of mixture (6M) and 0,6% of mixture and ozone (6MO).

The ozonized water was generated by bubbling ozone gas in distilled water at 2°C for 3 minutes. For this purpose, ozone generating equipment was utilized (Trata OZ, model TSL 6A), made available by the company OZ Engenharia Ltda (RS), which is based on the corone effect, that is, in the generation of ozone through electric discharge on oxygen. The ozone residue in water was measured by the Indigo Pattern method, accepted worldwide by the Environmental Protection Agency (EPA) and by the International Ozone Association (IOA), that is the only method contained in the Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater (1997). At the end of the ozone application, a residue in the water of  $0.6 \text{ mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$  was obtained.

After the addition of water, the material was homogenized, manually molded and conditioned in petri plates, then placed in a freezer (-18°C), where it remained for 4 months.

### **Evaluations**

The hamburgers were analyzed immediately after processing, after 2 months and after 4 months of storage.

The evaluations of pH, acidity, peroxide value, tiobarbituric acid (TBARS) and fatty acid profile were carried out in triplicate. Measurements of pH, acidity, peroxides and TBARS were carried out in accordance with methodology of the America Oil Chemists' Society (A.O.C.S.) (1992). The fatty acid profile was determined through gaseous chromatography. Lipids were extracted with chloroform and methanol in the proportion 2:1 (v/v), following the methodology described by Folch et al. (1957), being esterified in accordance with methodology described by Zambiasi (1997). A gaseous chromatograph (Shimadzu GC-14B) was used, equipped with flame ionization detector



(FID) and capillary column (J & W Scientific) with dimensions of 30 m x 0.252 mm, covered with a liquid phase film DB-225 with 0.25 $\mu$ m. For the reception and analyses of data, the software Glass-GC10 was utilized. Samples were manually injected, 1-2  $\mu$ L, with (PerkinElmer) syringe with 10  $\mu$ L capacity. The injector and detector temperature was 250 $^{\circ}$ C. The initial temperature of the column was 130 $^{\circ}$ C, which was maintained for 1 minute. The increase of the temperature was programmed at 3 $^{\circ}$ C/min until reaching 145 $^{\circ}$ C; 1.2 $^{\circ}$ C/min up to 165 $^{\circ}$ C and finally 2.5 $^{\circ}$ C up to 200 $^{\circ}$ C. At each stage of the program the temperature was maintained for 1.5; 0.5 and 1.5 minutes, respectively. The carrier gas utilized was nitrogen, at the flow rate of 1mL/min. A mixture of fatty acid (Sigma brand) was utilized as chromatographic pattern. Collected data were statistically analyzed by the utilization of the Anova and averages were analyzed by the test of Tukey at the significance level of 5%, through the program of statistical analyses, STATÍSTICA for Windows® version 6.0 (Statsoft, 1998).

## **Results and Discussion**

### **Values of pH and total acidity**

On tables 2 and 3 are the data referring to the results of acidity and pH, respectively, of the hamburgers after processing (T1), second (T2) and fourth (T3) month of storage under freezing conditions (-18 $^{\circ}$ C). A high value of acidity indicates that the fat has gone through a process of hydrolysis, that is, that there occurred a break in the chains of triacylglycerols, liberating free fatty acids.

It was observed that just after the processing (T1) the different treatments did not present differences in the values of acidity and pH when compared with the control sample, except the samples with vitamin C (6VC) and with vitamin C and ozone (6VCO),

that presented pH values significantly lower (5.45 and 5.48, respectively) than the control sample. The samples with eritorbate (3E, 3EO, 6E) and with the mixture (6M, 6MO), presented values of acidity lower than that of the sample without additive and ozone (O).

When comparing treatments with antioxidants and with antioxidants and ozone, it was observed that there was not a significant difference in the values of pH and acidity.

This study demonstrated that during the evaluation period, the application of ozone did not cause a significant increase of the acidity value nor a reduction in the pH value of the samples of hamburgers when compared with the control samples.

Table 2 – Acidity (%) of the hamburgers after processing and during storage time.

Treatments	Time		
	T1	T2	T3
C	0.70 <sup>bAB1</sup>	0.89 <sup>abBC</sup>	1.11 <sup>aAB</sup>
O	0.80 <sup>Aa</sup>	0.92 <sup>aBC</sup>	1.13 <sup>aAB</sup>
3E	0.61 <sup>bB</sup>	0.70 <sup>bC</sup>	0.99 <sup>aAB</sup>
3EO	0.62 <sup>cB</sup>	0.89 <sup>bBC</sup>	1.00 <sup>aAB</sup>
6E	0.62 <sup>cB</sup>	0.72 <sup>bC</sup>	0.81 <sup>aB</sup>
6EO	0.73 <sup>aAB</sup>	0.72 <sup>aC</sup>	0.82 <sup>aB</sup>
3VC	0.70 <sup>cAB</sup>	1.07 <sup>bABC</sup>	0.94 <sup>aAB</sup>
3VCO	0.83 <sup>aA</sup>	1.22 <sup>aAB</sup>	0.92 <sup>aAB</sup>
6VC	0.81 <sup>cA</sup>	1.45 <sup>bA</sup>	1.23 <sup>aA</sup>
6VCO	0.87 <sup>bA</sup>	1.22 <sup>aAB</sup>	1.22 <sup>aA</sup>
3M	0.71 <sup>bAB</sup>	0.71 <sup>bC</sup>	1.00 <sup>aAB</sup>
3MO	0.74 <sup>bAB</sup>	0.80 <sup>bBC</sup>	1.13 <sup>aAB</sup>
6M	0.58 <sup>bB</sup>	0.72 <sup>bC</sup>	0.98 <sup>aAB</sup>
6MO	0.62 <sup>bB</sup>	0.81 <sup>bBC</sup>	1.05 <sup>aAB</sup>

<sup>a</sup> Values followed by an identical small letter in the same line and an identical capital letter in the same column, means that did not differ beyond a 5 % significance (test of Tukey,  $p < 0.05$ ). Treatments: Control (C), ozone (O), 0,3% sodium eritorbate (3E), 0,3% sodium eritorbate and ozone (3EO), 0,6% sodium eritorbate (6E), 0,6% sodium eritorbate and ozone (6EO), 0,3% of ascorbic acid (3VC), 0,3% of ascorbic acid and ozone (3VCO), 0,6% of ascorbic acid (6VC), 0,6% of ascorbic acid and ozone (6VCO), 0,3% of mixture (3M), 0,3% of mixture with ozone (3MO), 0,6% of mixture (6M) and 0,6% of mixture and ozone (6MO).

Upon two months of storage (T2), the only sample which differed significantly from the control was the sample containing 0,6% of vitamin C (6VC), presenting an increase in the level of acidity of 0.56% and a reduction of 0.55% in the pH value. The high level of acidity of this sample (6VC, 1.45%) coincided with the lower pH value (5.01). The low pH value of this sample may have caused the increase in the process of hydrolysis and consequently in the content of free fatty acids. On the fourth month of storage (T3) this sample continued to present the higher value of acidity (1.23%); however, as in all other treatments, it did not present significant difference when compared with the control (1.11%). With regard to pH, the sample with 0,6% of vitamin C (6VC) continued to present a value (5.49) significantly inferior to that of the control (6.06).

Table 3 – pH value of hamburgers during the storage period.

Treatments	Time		
	T1	T2	T3
C	6.07 <sup>aA1</sup>	5.56 <sup>bABC</sup>	6.06 <sup>aAB</sup>
O	6.07 <sup>aA</sup>	5.66 <sup>bAB</sup>	6.01 <sup>abAB</sup>
3E	6.12 <sup>aA</sup>	5.75 <sup>Bab</sup>	6.18 <sup>aA</sup>
3 EO	6.14 <sup>aA</sup>	5.7 <sup>bAB</sup>	6.14 <sup>aA</sup>
6E	5.96 <sup>abA</sup>	5.79 <sup>bAB</sup>	6.24 <sup>aA</sup>
6EO	6.01 <sup>aA</sup>	5.73 <sup>bAB</sup>	6.22 <sup>aA</sup>
3VC	5.85 <sup>aAB</sup>	5.80 <sup>aAB</sup>	5.82 <sup>aBC</sup>
3VCO	5.83 <sup>aAB</sup>	5.42 <sup>bBCD</sup>	5.95 <sup>aAB</sup>
6VC	5.45 <sup>aB</sup>	5.01 <sup>bD</sup>	5.49 <sup>aC</sup>
6VCO	5.48 <sup>aB</sup>	5.23 <sup>aCD</sup>	5.74 <sup>aBC</sup>
3M	6.15 <sup>aA</sup>	5.60 <sup>bABC</sup>	6.06 <sup>aAB</sup>
3MO	5.99 <sup>aA</sup>	5.95 <sup>aA</sup>	5.96 <sup>aAB</sup>
6M	5.86 <sup>abAB</sup>	5.66 <sup>bAB</sup>	6.01 <sup>aAB</sup>
6MO	5.96 <sup>aA</sup>	5.58 <sup>aABC</sup>	5.96 <sup>aAB</sup>

<sup>a</sup> Values followed by an identical small letter in the same line and an identical capital letter in the same column, means that did not differ beyond a 5 % significance (test of Tukey,  $p < 0.05$ ). Treatments: Control (C), ozone (O), 0,3% sodium eritorbate (3E), 0,3% sodium eritorbate and ozone (3EO), 0,6% sodium eritorbate (6E), 0,6% sodium eritorbate and ozone (6EO), 0,3% of ascorbic acid (3VC), 0,3% of ascorbic acid and ozone (3VCO), 0,6% of ascorbic acid (6VC), 0,6% of ascorbic acid and ozone (6VCO), 0,3% of mixture (3M), 0,3% of mixture with ozone (3MO), 0,6% of mixture (6M) and 0,6% of mixture and ozone (6MO).

A tendency is observed of the gradual increase of acidity in the samples during the period of storage, except in the samples to which ascorbic acid (3VC and 6VC) was added, which presented a small decrease of acidity between the periods of 2 (T2) and 4 (T3) months of storage. This decrease of acidity was accompanied by the increase of the pH value.

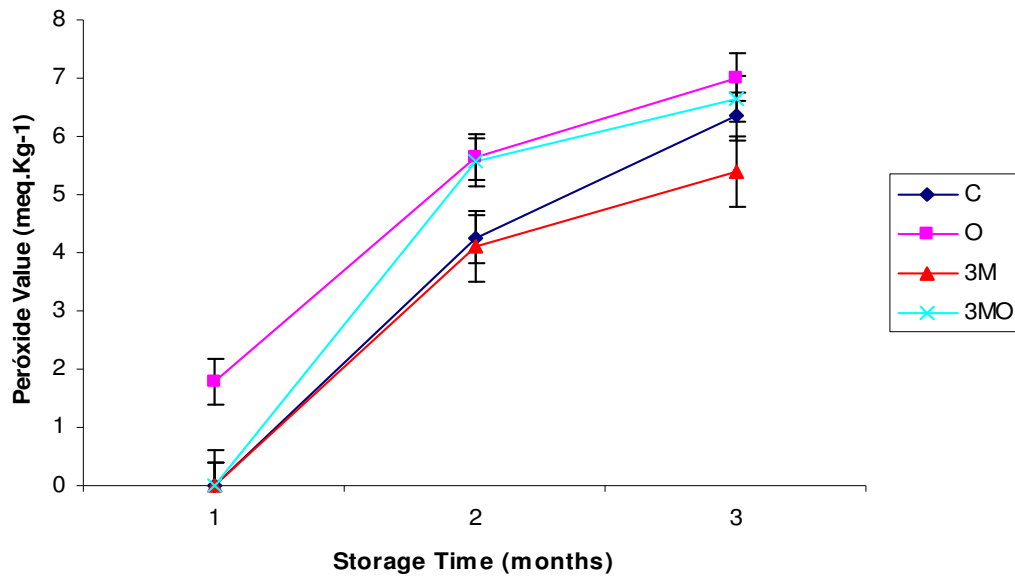
The samples of hamburger with ozone (O), as well as the samples with 0.6% of eritorbate and ozone (6EO) and with 0.3% ascorbic acid and ozone (3VCO) did not present increase in content of acidity during the storage period. This same tendency was observed for the variation in the pH values, except for the sample with 0.6% of eritorbate and ozone, which presented a pH value inferior to the second month of storage (T2). It was observed therefore, that the application of ozone was not responsible for the increase of acidity of the samples during the period of storage.

### **Peroxide value**

The peroxide value is a sensitive indicator in the initial stage of oxidation and its presence is an indication that the deterioration of flavor and smell, as a result of lipid instability, is about to occur (Zambiasi, 1999).

In evaluating the primary products of lipid oxidation, it was verified that the addition of ozonized water to hamburgers without additives caused the formation of peroxides just after the processing (Figure 2). The samples with 0.3% of sodium eritorbate (3E), 0.3% sodium eritorbate and ozone (3EO), 0.6% of sodium eritorbate (6E), 0.6% sodium eritorbate and ozone (6EO), 0.3% of ascorbic acid (3VC), 0.3% of ascorbic acid and ozone (3VCO), 0.6% of ascorbic acid (6VC), 0.6% of ascorbic acid

and ozone (6VCO), 0.6% of mixture (6M) and with 0.6% of mixture and ozone (6MO) did not present values of peroxides during the evaluation period.



Period of Storage: 0 month (T1), 2 months (T2), 4 months (T3). Treatments: Control (C), ozone (O), 0.3% of mixture (3M), 0.3% of mixture and ozone (3MO). Other treatments did not present peroxide value during the storage period

Figure 2 – Peroxide value ( $\text{meq.kg}^{-1}$ ) of hamburgers during the storage period

The formation of peroxides on the sample only with ozone (O) was not related with the level of acidity as the hamburger sample which contained 0.6% of vitamin C in its formulation (6VC) in the second month of storage, which presented the highest level of acidity even though the formation of peroxides was not observed.

The content of peroxides in the sample without additives and ozone (O) presented a progressive increase during the period of storage, where there occurred an increase in its values in 3.84% after processing (T1) for the two months of storage (T2) and of 1.38% of the two (T2) for the four (T3) months of storage. This confirms studies

which predict that once the self-oxidation process starts to occur, the formation of peroxides occurs in a continuous manner up to the moment in which the peroxides start to degrade into secondary products (Zambiasi, 1999).

Campos et al. (2006) also found high peroxide values (around 8) in fish stored in slurry-ice (40% of ice and 60% of ozonized water or not), but these values, although higher in samples stored in ozone, were not significant.

The sample of hamburger with ozonized water (O) presented peroxide values higher than the other samples during the entire process of storage, even superior to the control sample (C), although not presenting values significantly superior to those of hamburgers with 0.3% of eritorbate and ozone (3EO), on the second month of storage and the samples with 0.3% of mixture and ozone (3MO) and the control (C) on the fourth month of storage (T3).

From the second month of storage (T2) onwards, there occurred the presence of peroxides in the control sample (C) and in the samples containing 0.3% of non ozonized commercial mixture (3M) and with ozone (3MO), indicating the inefficiency of the mixture, in this percentage, in retarding the oxidation process. The hamburger containing 0.3% of commercial mixture and ozone (3MO) presented a level of peroxide superior to the sample containing 0.3% of the commercial mixture (3M), suggesting that the ozone accelerates the oxidation processes.

The antioxidants sodium eritorbate and ascorbic acid, in the concentrations of 0.3% to 0.6% and the commercial mixture in the concentration of 0.6% did not result in the formation of peroxides when added to hamburgers during the period of 4 months of storage.

### **Tiobarbituric Acid (TBARS)**

The TBARS test is commonly used as an indicator of lipid oxidation in meat products, with which the content of secondary products of oxidation are evaluated (Fernández; Pérez-Álvarez; Fernández-Lopez, 1997). The TBARS Values of the hamburgers stored under freezing (-18°C) can be visualized on Table 4.

The samples with eritorbate (3E, 3EO, 6E, 6EO), with vitamin C (3VC, 3VCO, 6VC, 6VCO) and with the mixture (6M, 6MO), even while not presenting values for peroxides, pointed toward the formation of secondary products of lipid oxidation. However, the samples which presented level of peroxide (C, O, 3M, 3MO) were those which obtained the highest TBARS values during the entire storage period. The samples containing 0.6% of the mixture (6M and 6MO) presented the lowest TBARS values during the entire period of storage.

The sample which only had the addition of ozone (O) presented TBARS values above that of the control sample (C). This sample also demonstrated an increase of TBARS of the second month – T2 (0.21) for the fourth month of storage – T3 (0.35). These values coincide with their higher contents in peroxides.

The Increase in TBARS values in ozonized samples was expected since once the surface of the muscles oxidizes, it promotes the formation of free radicals and consequently an increase of lipid oxidation.

Table 4 – TBARS values of hamburgers during the storage period (mg Malonaldehyde/kg sample)

Tratamientos	Tempo		
	T1	T2	T3
C	0.18 <sup>CA1</sup>	0.19 <sup>bBC</sup>	0.22 <sup>aB</sup>
O	0.19 <sup>bA</sup>	0.21 <sup>bA</sup>	0.35 <sup>aA</sup>
3E	0.16 <sup>cAB</sup>	0.17 <sup>bE</sup>	0.18 <sup>aEF</sup>
3EO	0.18 <sup>bAB</sup>	0.19 <sup>aCD</sup>	0.20 <sup>aCD</sup>
6E	0.14 <sup>bBCD</sup>	0.14 <sup>bH</sup>	0.15 <sup>aG</sup>
6EO	0.14 <sup>cABC</sup>	0.16 <sup>bF</sup>	0.19 <sup>aDEF</sup>
3VC	0.15 <sup>bAB</sup>	0.17 <sup>aE</sup>	0.18 <sup>aEF</sup>
3VCO	0.16 <sup>cAB</sup>	0.18 <sup>bD</sup>	0.19 <sup>aCDE</sup>
6VC	0.13 <sup>cBCD</sup>	0.15 <sup>bG</sup>	0.17 <sup>aF</sup>
6VCO	0.14 <sup>cABC</sup>	0.16 <sup>bF</sup>	0.19 <sup>aDE</sup>
3M	0.16 <sup>cAB</sup>	0.19 <sup>bCD</sup>	0.21 <sup>aBC</sup>
3MO	0.16 <sup>cABC</sup>	0.20 <sup>bAB</sup>	0.22 <sup>aB</sup>
6M	0.11 <sup>cCD</sup>	0.12 <sup>bl</sup>	0.13 <sup>aH</sup>
6MO	0.10 <sup>cD</sup>	0.12 <sup>bl</sup>	0.14 <sup>aGH</sup>

<sup>a</sup> Values followed by an identical small letter in the same line and an identical capital letter in the same column, means that did not differ beyond a 5 % significance (test of Tukey,  $p < 0.05$ ). Treatments: Control (C), ozone (O), 0,3% sodium eritorbate (3E), 0,3% sodium eritorbate and ozone (3EO), 0,6% sodium eritorbate (6E), 0,6% sodium eritorbate and ozone (6EO), 0,3% of ascorbic acid (3VC), 0,3% of ascorbic acid and ozone (3VCO), 0,6% of ascorbic acid (6VC), 0,6% of ascorbic acid and ozone (6VCO), 0,3% of mixture (3M), 0,3% of mixture with ozone (3MO), 0,6% of mixture (6M) and 0,6% of mixture and ozone (6MO).

Nieto, Jiménez-Colmenero and Peláez (1984), when exposing hens to ozone gas (40mg.h<sup>-1</sup>) in cold chamber (2°C) during 13 days, found TBARS results lower than the control until the 4<sup>th</sup> day of storage. After this period, the TBARS value started increasing until the 10<sup>th</sup> day. The initial TBARS values for both treatments remained around 0.8 mgMA/kg and for the control sample a slightly ascending tendency was observed, remaining at the end of 13 days with a value of 2 mgMA/kg. The highest TBARS value of the treatment with ozone was around 4.3 mgMA/kg on the 10<sup>th</sup> day of evaluation.

According to Smith et al. (2001), the immersion of bovine fat in ozonized water (9.46 ppm) led to a small variation in the TBARS value when compared to the control sample. The initial value (day 2) of the ozonized sample was statistically inferior to the



value of the control sample, approximately 0.34 and 0.42, respectively. This significant difference was not observed on days 12 and 24. The TBARS value for the ozonized sample on the 36<sup>th</sup> day of evaluation was higher (0.43) than the control (0.32). The authors comment that these results were not a surprise given the reduction in bacterial count due to the oxidation action on the cellular wall of microorganisms. These same authors also added ozone (10% for 30 and 60s; 6.5% for 60s and 3.2% for 60s) to chopped meat and found TBARS values higher than those of the control sample. Smith et al. (2001) even complement that the oxidation caused by ozone is directly proportional to its concentration and to the time in contact with the samples and that strategies that may increase the bactericidal effect of ozone (greater concentrations or greater exposure time) might result in an unacceptable level of lipid peroxidation.

In opposition to the data of this work and of other studies presented, Campos et al. (2006) found TBARS values for fish stored in ozonized slurry-ice (40% ice and 60% of ozone) lower than the control sample (40% ice and 60% distilled water) after 21 days of storage. This reduction was not significant in the peroxide results.

In the same manner, Manousaridis et al. (2005), when exposing mussels to water saturated with ozone gas (ppm) for 60 and 90 min., obtained TBARS results lower than the control sample during the 12 days of storage, refrigerated in vacuum packing. According to the authors, a possible explanation for this phenomenon would be that the malonaldehydes and other oxidation products could also have oxidized, presenting, in this manner, a false TBA value.

According Smith (2000 apud Smith, 2001) bovine and swine meat are considered rancid when they present a TBARS Value equal or superior to 1 mgMA/kg. On the other hand, for Williams (2000 apud Smith, 2001), this limit would be of only 0.5 mgMA/kg.

The maximum value found in this study with bovine hamburgers found itself within the limits recommended by the authors.

### **Fatty Acid profile**

The profile of fatty acids in hamburgers immediately after processing (T1) and at two (T2) and at four months of storage (T3) are presents in Tables 5, 6 and 7, respectively.

The results of this work demonstrate that, just after processing (T1, Table 5), the control sample presents a total of 54.6% of saturated fatty acids, 34.2% of mono-saturated and 11.2% of poly-saturated, totaling 45.4% of unsaturated fatty acids. These results are in agreement with those found in literature for bovine, with some variations according to age, race, feeding, among others. According to Freitas (2006), Nelore calves raised in pasture and ending in confinement at 22 years of age, presented 54.8% of saturated fatty acids, 41.6% of mono-unsaturated and 3.2%of poly-unsaturated. Menezes at al. (2006) analyzed the profile of fatty acids in the long chain of calves and found 50.2% of saturated fatty acids, 47.1% of mono-unsaturated and 2.7% of poly-unsaturated, totaling 49.8% of unsaturated fatty acids. Silva et al. (2006) encountered values of saturated fatty acids (39.5%) lower than those of the range found by the majority of the authors reviewed. According to the authors, it is possible that these lower results have been provoked by the diet, by the low chronological age of the animals and by the fact that the animals were not castrated.

The fatty acids found predominantly in hamburgers just after preparation were oleic, palmitic and estearic acids. In the control sample, the values of these fatty acids were of 32.0% (C18:1), 25.5% (C16:0) and 23.8% (C18:0), respectively. Silva et al.

(2006) also found predominance of these three fatty acids for Sindi cattle ended in confinement (32.3% oleic, 22.8% palmitic and 15.5% estearic). According to Kuss et al. (2006), the main fatty acids found in the intramuscular fat of Longissimus dorsi of discarded cows were also the acids oleic (40.95%), palmitic (30.13% and estearic (19.325), representing 90.4% of the total fatty acids. Similar results have also been described by Varela et al. (2004) and Menezes et al. (2006).

During this same period (T1), the hamburgers formulated with ozone and without antioxidants (O) presented 57.7% of saturated fatty acids, 32.8% of monounsaturated and 9.5% of polyunsaturated, totaling 42.3% of unsaturated fatty acids. It is perceived that the samples treated with ozone presented a reduction of 3.1% in the proportion of unsaturated fatty acids when compared with the control (C). The polyunsaturated fatty acid which presented greater oxidation by ozone was the eicosatrienoic acid (C20:3), which presented a reduction of 1%. This sample (O) was the only one which did not present the decosahexaenoic acid (C22:6), which consists of a fatty acid highly susceptible to oxidative processes. This behavior is related with the values observed in the evaluations of peroxide value (IP) and of tiobarbituric acid (TBARS), which presented values higher than the control sample (C), indicating that there occurred the oxidative process in greater scale in these samples.

This effect was reduced when the antioxidants eritorbate, ascorbic acid and sodium eritorbate with citric acid (commercial mixtures for hamburgers) were added. The hamburgers prepared with ozone and these antioxidants in concentrations of 0.3 and 0.6% presented values of unsaturated fatty acids in the order of 45.9% (3EO); 44.0% (3VCO); 45.5% (3MO); 44.5% (6EO); 44.1% (6VCO) and of 46.3% (6MO). These values are clearly higher than those found in the sample which only contained ozone (42.3%).

However, the use of ascorbic acid in hamburgers submitted to ozone (6VCO) reduced in 1.3% the proportion of unsaturated fatty acids when compared to the control (C). This pro-oxidative effect of the ascorbic acid at 0.6% 6VCO coincided with the high level of acidity and low level of pH, but was not observed in relationship with the content of peroxide (IP) and of tiobarbituric acid (TBARS).

The most effective antioxidant was the mixture of eritorbate and citric acid in the concentration of 0.6% (6M) since the hamburgers formulated with this mixture were those which presented the highest level of unsaturated fatty acids, 48.1% for the mixture (6M) and 46.3% for the mixture and ozone (6MO). The use of 0.6% of the mixture in hamburgers with ozone (6MO) resulted in a percentage of 4% superior in content of unsaturated fatty acids when compared with hamburgers which were only treated with ozone (O). The greater effect of the antioxidant of the mixture was also observed on the evaluations of peroxides (IP) and of tiobarbituric acid (TBARS), which ones presented lower values in these determinations, indicating lower level of oxidation of fats of these samples.

On the second month of storage (T2) (Table 6), the control sample (C) presented an increase in the proportion of saturated fatty acids in 1.9% and the mixture with ozone (O) presented an increase of 2.6%. The saturated fatty acids in the control sample (C) that presented greater increments were palmitic- C16:0 (0.6%) and estearic fatty acids- C18:0 (0.5%) while in the sample with ozone (O) the fatty acids which increased most were miristic- C14:0 (0.9%), palmitic- C16:0 (0.6%), estearic- C18:0 (0.3%) and lignoceric- C24:0 (0.6%).

Table 5 – Fatty acid profile<sup>1</sup> of the hamburgers after processing (T1).

AG <sup>2</sup>	Treatments													
	C	O	3E	3EO	6E	6EO	3VC	3VCO	6VC	6VCO	3M	3MO	6M	6MO
C10:0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1
C12:0	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.3	0.1	0.1
C14:0	2.6	2.5	2.6	2.5	2.3	2.4	2.7	2.7	2.6	2.6	2.4	2.4	2.3	2.5
C14:1	0.3	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
C16:0	25.5	26.9	25.2	25.7	24.6	25.4	26.1	26.2	26.1	26.1	25.7	25.6	23.9	24.8
C16:1	1.8	1.3	1.7	1.6	1.8	1.8	1.8	1.8	1.7	1.7	1.6	1.7	1.9	1.8
C17:0	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.6	0.6	0.7	0.7
C18:0	23.8	25.5	23.8	23.8	23.9	25.1	23.5	24.2	23.9	24.4	23.0	23.7	23.1	23.8
C18:1	32.0	31.2	32.7	32.6	33.2	31.7	31.9	31.7	31.8	31.6	32.8	33.1	33.1	32.5
C18:2	5.6	5.3	5.5	5.4	5.5	5.4	5.3	5.2	5.5	5.5	5.7	5.4	6.3	6.0
C18:3	1.5	1.4	1.4	1.4	1.6	1.4	1.4	1.4	1.4	1.3	1.7	1.4	2.2	1.4
C20:0	0.4	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	0.4	0.3	0.3
C20:3	3.8	2.8	3.8	3.6	3.8	3.6	3.8	3.6	3.7	3.6	3.8	3.3	3.9	3.9
C22:6	0.3	0.0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	0.1	0.2	0.2	0.3	0.3	0.4	0.4
C24:0	1.4	1.4	1.3	1.4	1.4	1.4	1.4	1.5	1.5	1.4	1.6	1.3	1.4	1.4
<b>% SAT</b>	<b>54.6</b>	<b>57.7</b>	<b>54.3</b>	<b>54.7</b>	<b>53.6</b>	<b>55.5</b>	<b>55.0</b>	<b>55.5</b>	<b>55.5</b>	<b>55.8</b>	<b>53.8</b>	<b>54.5</b>	<b>51.9</b>	<b>53.7</b>
<b>% MUFA</b>	<b>34.2</b>	<b>32.8</b>	<b>34.6</b>	<b>35.3</b>	<b>35.2</b>	<b>33.8</b>	<b>34.0</b>	<b>34.4</b>	<b>33.8</b>	<b>33.6</b>	<b>34.7</b>	<b>35.1</b>	<b>35.3</b>	<b>34.6</b>
<b>% PUFA</b>	<b>11.2</b>	<b>9.5</b>	<b>10.7</b>	<b>10.5</b>	<b>11.2</b>	<b>10.7</b>	<b>10.9</b>	<b>10.1</b>	<b>10.8</b>	<b>10.6</b>	<b>11.5</b>	<b>10.3</b>	<b>12.8</b>	<b>11.7</b>
<b>%TINSAT</b>	<b>45.4</b>	<b>42.3</b>	<b>45.3</b>	<b>45.9</b>	<b>46.4</b>	<b>44.5</b>	<b>45.0</b>	<b>44.0</b>	<b>44.5</b>	<b>44.1</b>	<b>46.2</b>	<b>45.5</b>	<b>48.1</b>	<b>46.3</b>

<sup>1</sup> Relative proportion in relation to the fatty acid content.

<sup>2</sup> C10:0 = Capric acid; C12:0 = Lauric acid; C14:0 = Miristic acid; C14:1 = Miristoleic acid; C16:0 = Palmitic acid; C16:1 = Palmitoleic acid; C17 = Heptadecanoic acid; C18:0 = Stearic acid; C18:1 = Oleic acid; C18:2 = Linoleic acid; C18:3 = Linolenic acid; C20:0 = Araquidic acid; C20:3 = Eicosatrienoic acid; C22:6 = Docosahexaenoic acid; C24:0 = Lignoceric acid; AG = fatty acids; SAT = saturated fatty acids; MUFA = monounsaturated fatty acids; PUFA = polyunsaturated fatty acids; INSAT = unsaturated fatty acids. Control (C), ozone (O), 0,3% sodium eritorbate (3E), 0,3% sodium eritorbate and ozone (3EO), 0,6% sodium eritorbate (6E), 0,6% sodium eritorbate and ozone (6EO), 0,3% of ascorbic acid (3VC), 0,3% of ascorbic acid and ozone (3VCO), 0,6% of ascorbic acid (6VC), 0,6% of ascorbic acid and ozone (6VCO), 0,3% of mixture (3M), 0,3% of mixture with ozone (3MO), 0,6% of mixture (6M) and 0,6% of mixture and ozone (6MO).

During the processing period (T1) and two months of storage (T2), in the sample with ozone (O), the monounsaturated fatty acid meristoleic (C14:1) reduced from 0.3% to zero (0%), while the palmitoleic (C16:1) and the oleic fatty acid (C18:1) reduced from 0.1% and 0.3%, respectively. The polyunsaturated fatty acids linoleic (C18:2), linoleic C18:3) and lignoceric (C20:3) presented reductions of 0.4%, 1.0% and 0.5%, respectively totaling a reduction of these unsaturated of 1.9%. Thus, a greater reduction is perceived of the polyunsaturated fatty acids than of the monounsaturated fatty acids.

In this period (T2), the most efficient antioxidant continued to be 0.6% of mixture (6M), since this sample presented the highest levels of unsaturated fatty acids, 47.0% for the 0.6% of the mixture (6M) and of 45.5% for 0.6% of the mixture with ozone (6MO).

On the fourth month of storage (T3) (Table 7), the unsaturated fatty acids continue oxidizing by the action of ozone. At 2 (T2) and 4 (T3) months of storage, it is presumed that this action could be due to the radicals of decomposition of ozone, hydroxyl (OH) and superoxide (O<sub>2</sub>), once the action of the ozone, properly said, is momentary.

In this storage period, the control sample (C) presented 58.7% of saturated fatty acids, being 2.2% more than on the second month (T2) and 4.1% more than in the first evaluation carried out (T1). This occurs due to the oxidation process of chopped meat without the protection of antioxidants.

Table 6 – Fatty acid profile<sup>1</sup> of the hamburgers after two months of storage (T2).

AG <sup>2</sup>	Treatments													
	C	O	3E	3EO	6E	6EO	3VC	3VCO	6VC	6VCO	3M	3MO	6M	6MO
C10:0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0,1	0.1	0,1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1
C12:0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0,2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
C14:0	2.9	3.4	2.8	2.7	2.9	2.6	2.7	2.8	2,9	2.7	2.8	3.4	2.6	2.7
C14:1	0.1	0.0	0.2	0.1	0.3	0.1	0.2	0.0	0,2	0.2	0.0	0.0	0.3	0.3
C16:0	26.1	27.5	25.5	26.1	25.3	25.3	26.1	26.1	26,3	26.1	26.3	27.0	24.8	25.3
C16:1	1.8	1.2	1.6	1.7	1.8	1.8	1.7	1.8	1,7	1.7	1.6	1.7	1.8	1.7
C17:0	0.8	0.8	0.7	0.7	0.8	0.7	0.8	0.7	0,7	0.8	0.8	1.0	0.7	0.7
C18:0	24.3	25.8	24.2	24.2	23.2	25.1	24.0	24.2	24,0	24.6	23.6	26.3	23.0	23.8
C18:1	31.8	30.9	32.6	32.4	33.0	31.7	31.7	31.9	31,6	31.6	32.3	30.3	32.7	32.5
C18:2	5.2	4.9	5.3	5.1	5.5	5.4	5.4	5.1	5,4	5.4	5.2	4.0	6.1	6.0
C18:3	1.1	0.4	1.2	1.1	1.2	1.2	1.3	1.3	1,2	1.1	1.1	1.0	1.9	1.2
C20:0	0.3	0.4	0.3	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0,3	0.2	0.5	0.4	0.2	0.3
C20:3	3.3	2.3	3.7	3.5	3.8	3.6	3.8	3.7	3,7	3.5	3.5	2.9	3.9	3.7
C22:6	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0,0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.1
C24:0	1.7	2.1	1.6	1.7	1.6	1.7	1.7	1.7	1,7	1.8	2.0	1.7	1.5	1.5
<b>% SAT</b>	<b>56.5</b>	<b>60.3</b>	<b>55.4</b>	<b>56.1</b>	<b>54.3</b>	<b>56.2</b>	<b>55.9</b>	<b>56.3</b>	<b>56,2</b>	<b>56.5</b>	<b>56.3</b>	<b>60.0</b>	<b>53.0</b>	<b>54.5</b>
<b>% MUFA</b>	<b>33.8</b>	<b>32.1</b>	<b>34.3</b>	<b>34.2</b>	<b>35.0</b>	<b>33.6</b>	<b>33.6</b>	<b>33.6</b>	<b>33,6</b>	<b>33.5</b>	<b>33.9</b>	<b>32.0</b>	<b>34.8</b>	<b>34.5</b>
<b>% PUFA</b>	<b>9.7</b>	<b>7.6</b>	<b>10.2</b>	<b>9.7</b>	<b>10.7</b>	<b>10.2</b>	<b>10.5</b>	<b>10.1</b>	<b>10,2</b>	<b>10.0</b>	<b>9.8</b>	<b>8.0</b>	<b>12.1</b>	<b>10.9</b>
<b>%TINSAT</b>	<b>43.5</b>	<b>39.7</b>	<b>44.6</b>	<b>43.9</b>	<b>45.7</b>	<b>43.8</b>	<b>44.1</b>	<b>43.7</b>	<b>43,8</b>	<b>43.5</b>	<b>43.7</b>	<b>40.0</b>	<b>47.0</b>	<b>45.5</b>

<sup>1</sup> Relative proportion in relation to the fatty acid content.

<sup>2</sup> C10:0 = Capric acid; C12:0 = Lauric acid; C14:0 = Miristic acid; C14:1 = Miristoleic acid; C16:0 = Palmitic acid; C16:1= Palmitoleic acid; C17 = Heptadecanoic acid; C18:0 = Stearic acid; C18:1 = Oleic acid; C18:2 = Linoleic acid; C18:3 = Linolenic acid; C20:0 = Araquidic acid; C20:3 = Eicosatrienoic acid; C22:6 = Docosahexaenoic acid; C24:0 = Lignoceric acid; AG = fatty acids; SAT = saturated fatty acids; MUFA = monounsaturated fatty acids; PUFA = polyunsaturated fatty acids; INSAT = unsaturated fatty acids. Control (C), ozone (O), 0,3% sodium eritorbate (3E), 0,3% sodium eritorbate and ozone (3EO), 0,6% sodium eritorbate (6E), 0,6% sodium eritorbate and ozone (6EO), 0,3% of ascorbic acid (3VC), 0,3% of ascorbic acid and ozone (3VCO), 0,6% of ascorbic acid (6VC), 0,6% of ascorbic acid and ozone (6VCO), 0,3% of mixture (3M), 0,3% of mixture with ozone (3MO), 0,6% of mixture (6M) and 0,6% of mixture and ozone (6MO).

The sample with ozone (O) presented 62.9% of saturated fatty acids and its saturation was also progressive with the period of storage, being of 2.6% and of 5.2% above that of the second month (T2) and just after processing (T1), respectively. The saturated fatty acids which presented greater increase from the second (T2) for the fourth (T3) month of storage, both for the control sample (C) as for the sample with ozone (O), were the palmitic (C16:0) and the stearic fatty acid (C18), presenting increases of 1.2% and of 0.3% for the control (C), and of 1.1% and of 0.9% for the sample with ozone (O), respectively.

In the course of the second month (T2) and as opposed from the first to the second month, a greater reduction was observed of the monounsaturated fatty acids (1.4%) than of the polyunsaturated (1.2%) by the action of ozone. This confirms the oxidative preference, initially by polyunsaturated fatty acids. The hamburgers with antioxidants continue to present values of saturated fatty acids inferior to the control sample (C) with the exception of the one to which a 0.3% of mixture (58.8% for 3M and 61.2% for 3MO) was added. In the IP and TBARS tests, the values were not inferior to those of the sample either. During the entire period of storage, the treatments which presented higher values of unsaturated fatty acids were only those to which antioxidants were added.

Through works carried out previously and from other sources (Al-Haddad; Al-Qassemi; Robinson, 2005, Manousaridis, 2005, Yuk, 2007), it was observed that ozone reduces the bacterial charge of meats, increasing its useful life. For this reason, it is recommended the use of ozonized water in the processing of hamburger formulated with the mixture of 0.6% of citric acid and sodium eritorbate (6M) as, under these conditions, it does not compromise the product with regard to lipid oxidation.



Table 7 – Fatty acid profile<sup>1</sup> of the hamburgers after four months of storage (T3).

AG <sup>2</sup>	Tratamentos													
	C	O	3E	3EO	6E	6EO	3VC	3VCO	6VC	6VCO	3M	3MO	6M	6MO
C10:0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
C12:0	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.1
C14:0	3.1	3.6	3.1	3.0	3.1	2.9	3.0	3.0	3.0	2.9	3.1	3.3	2.7	2.7
C14:1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
C16:0	27.3	28.6	26.4	27.2	26.1	26.3	26.4	27.5	27.3	27.5	27.4	27.6	25.2	26.3
C16:1	1.4	0.7	1.4	1.3	1.6	1.5	1.5	1.3	1.4	1.3	1.2	1.3	1.7	1.5
C17:0	0.8	1.0	0.7	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.9	0.8	0.8	1.2	0.8	0.8
C18:0	24.6	26.7	24.4	24.5	23.4	25.1	24.6	24.6	25.0	25.3	24.5	26.7	23.3	23.8
C18:1	31.1	30.0	32.0	31.9	32.7	31.2	31.3	31.0	30.8	31.0	31.1	30.0	32.6	32.2
C18:2	4.9	4.4	5.1	4.8	5.3	5.2	5.1	4.8	5.0	4.8	4.9	3.9	6.0	5.8
C18:3	0.8	0.0	1.0	0.7	1.0	1.0	1.1	0.9	0.8	0.8	0.8	0.9	1.7	1.2
C20:0	0.5	0.5	0.3	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3	0.5	0.3	0.3	0.3
C20:3	3.1	2.0	3.5	3.3	3.7	3.6	3.6	3.4	3.4	3.3	3.1	2.8	3.8	3.5
C22:6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:0	2.0	2.1	1.7	1.7	1.6	1.7	1.8	1.8	1.7	1.7	2.1	2.0	1.7	1.7
<b>% SAT</b>	<b>58.7</b>	<b>62.9</b>	<b>57.0</b>	<b>58.0</b>	<b>55.6</b>	<b>57.6</b>	<b>57.4</b>	<b>58.5</b>	<b>58.5</b>	<b>58.9</b>	<b>58.8</b>	<b>61.2</b>	<b>54.1</b>	<b>55.8</b>
<b>% MUFA</b>	<b>32.5</b>	<b>30.7</b>	<b>33.4</b>	<b>33.2</b>	<b>34.3</b>	<b>32.7</b>	<b>32.8</b>	<b>32.4</b>	<b>32.2</b>	<b>32.3</b>	<b>32.3</b>	<b>31.3</b>	<b>34.4</b>	<b>33.7</b>
<b>% PUFA</b>	<b>8.8</b>	<b>6.4</b>	<b>9.6</b>	<b>8.8</b>	<b>10.0</b>	<b>9.7</b>	<b>9.8</b>	<b>9.1</b>	<b>9.3</b>	<b>8.8</b>	<b>8.8</b>	<b>7.5</b>	<b>11.5</b>	<b>10.4</b>
<b>%TINSAT</b>	<b>41.3</b>	<b>37.1</b>	<b>43.0</b>	<b>42.0</b>	<b>44.4</b>	<b>42.4</b>	<b>42.6</b>	<b>41.5</b>	<b>41.5</b>	<b>41.1</b>	<b>41.2</b>	<b>38.8</b>	<b>45.9</b>	<b>44.1</b>

<sup>1</sup> Relative proportion in relation to the fatty acid content.

<sup>2</sup> C10:0 = Capric acid; C12:0 = Lauric acid; C14:0 = Myristic acid; C14:1 = Myristoleic acid; C16:0 = Palmitic acid; C16:1 = Palmitoleic acid; C17 = Heptadecanoic acid; C18:0 = Stearic acid; C18:1 = Oleic acid; C18:2 = Linoleic acid; C18:3 = Linolenic acid; C20:0 = Arachidic acid; C20:3 = Eicosatrienoic acid; C22:6 = Docosahexaenoic acid; C24:0 = Lignoceric acid; AG = fatty acids; SAT = saturated fatty acids; MUFA = monounsaturated fatty acids; PUFA = polyunsaturated fatty acids; INSAT = unsaturated fatty acids. Control (C), ozone (O), 0,3% sodium eritorbate (3E), 0,3% sodium eritorbate and ozone (3EO), 0,6% sodium eritorbate (6E), 0,6% sodium eritorbate and ozone (6EO), 0,3% of ascorbic acid (3VC), 0,3% of ascorbic acid and ozone (3VCO), 0,6% of ascorbic acid (6VC), 0,6% of ascorbic acid and ozone (6VCO), 0,3% of mixture (3M), 0,3% of mixture with ozone (3MO), 0,6% of mixture (6M) and 0,6% of mixture and ozone (6MO).

## **Conclusions**

Hamburgers formulated with the treatments without additive and with ozonized water, as well as those with 0.3% of mixture (sodium eritorbate and citric acid) presented the highest values of peroxides and of tiobarbituric acid, during the storage period.

A progressive decrease of unsaturated fatty acids was observed during the storage period, mainly in the control samples and with ozone. This effect was reduced with the use of the antioxidants utilized.

The addition of 0.6 ppm of ozone in the formulation of hamburgers caused oxidation in their fatty acids, increasing the proportion of saturated fatty acids and reduction in the proportion of unsaturated fatty acids. However, the TBARS results, although higher for the sample with ozone, remained well below the limit recommended in the literature. The antioxidant which showed itself most efficient against the oxidizing effect of ozone was the one added to the commercial mixture for hamburgers (citric acid and sodium eritorbate), mainly in the concentration of 0.6%.

## **Acknowledgements**

We thank the company of Equipamentos e Geradores de Ozônio – OZ Engenharia (Porto Alegre, RS, Brazil), for the collaboration in the execution of this work; the company Duas Rodas (Jaraguá do Sul, SC, Brazil) for the commercial mixture for Hamburger; and the Capes, source of funding for this research.

## References

- AKBAS, M. Y. & OZDEMIR, M. (2006). Effectiveness of ozone for inactivation of *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* in pistachios. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 513-519.
- AL-HADDAD, K. S. H., AL-QASSEMI, R. A. S. & ROBINSON, R. K. (2005). The use of gaseous ozone and gas packaging to control populations of *Salmonella infantis* and *Pseudomonas aeruginosa* on the skin of chicken portions. *Food Control*, 16, 405-410.
- AOCS (1992). *American Oil Chemists' Society. Oficial and tentative methods of the American Oils Chemists' Society*, Champaign, IL.
- ARAÚJO, J. M. A. (2008). *Química de alimentos - teoria e prática*. 4 ed. Viçosa: Imprensa Universitária. 596p.
- CAMPOS, C. et al. (2006). Evaluation of an ozone-slurry ice combined refrigeration system for the storage of farmed turbot (*Psetta maxima*). *Food Chemistry*, 97, 223-230.
- CHIATTONE, P. V., TORRES, L. M. & ZAMBIAZI, R. C. (2008). APLICAÇÃO DO OZÔNIO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS. *Alimentos e Nutrição*, Araraquara, 19, 341-349.
- CHIATTONE, P. Ozônio e ácido ascórbico na coloração e microbiota de carne bovina maturada. 2006. 51f. Dissertation (Master in Science and Agro-industrial Technology) -Department of Science and Agro-industrial Technology, Federal University of Pelotas, Pelotas.
- FERNÁNDEZ, J., PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. & FERNÁNDEZ-LOPEZ, J. A. (1997). Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, 59, 345-353.

FOLCH, J. et al. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.

FREITAS, A.K. *Características da carcaça, da carne e perfil dos ácidos graxos de novilhos Nelore inteiros ou castrados em duas idades*. 2006. 68 f Dissertation (Master in Animal Science) - School of Veterinary Medicine, Federal University of Goiás, Goiânia.

GOLDSTEIN S & SAMUNI A. (2005). Intra- and intermolecular oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin induced by hydroxyl and carbonate radicals. *Free Radical Biology & Medicine*, 39, 511–519.

GUZEL-SEYDIM, Z. B., BEVER Jr. P. I. & GREENE, A. K. (2004). Efficacy of ozone to reduce bacterial populations in the presence of food components. *Food Microbiology*, 21, 475-479.

KIM, J.G; YOUSEF, A.E. & DAVE, S. 1999. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *Journal of food protection*, 62, 1071-1087.

KUSS, F. et al. (2006). Perfil de ácidos graxos e qualidade da carne de vacas de descarte terminadas em confinamento recebendo dietas com ou sem adição de monensina. *Ciência Rural*, 36, 1518-1521.

MCKENNA, D. R. et al. (2005). Biochemical and physical factors affecting discoloration characteristics of 19 bovine muscles. *Meat Science*, 70, 665-682.

MANOUSARIDIS, G. et al. (2005). Effect of ozone on microbial, chemical and sensory attributes of shucked mussels. *Food Microbiology*, 22, 1-9.

MENEZES, L.F.G. et al. (2006). Perfil de ácidos graxos de cadeia longa e qualidade da carne de novilhos terminados em confinamento com diferentes níveis de monensina sódica na dieta. *Ciência Rural*, 36, 186-190.

NIETO, J.C., JIMÉNEZ-COLMENERO & PELÁEZ, M. A. C. (1984). Effect of ozone on bacterial flora in poultry during refrigerated storage. *International Journal of Refrigeration*, 7.

STANDAR METHODS OF WATER. (1997). Standard methods for the examination of water and wastewater. [Internet document] URL <http://www.standardmethods.org/store/ProductView.cfm? ProductID=196>; Accessed 10/01/2008.

STATSOFT (1998). *Statistical for windows*. General conventions and statistics, statsoft, Tulsa. OK. Inc.

SILVA, J. C. G, et al. (2006). Perfil de Ácidos Graxos de Bovinos e Búfalos Terminados em Confinamento. *Revista da Univerividade Rural, Série. Ciências Exatas e da Terra*, RJ, EDUR. 26.

SMITH, C.D. et al. (2001). *Effects of activated ozone, on lipid peroxidation, when applied to carcasses and to ground beef during blending*. [Internet document] URL <http://ansci.colostate.edu/dp/msfs/cdso12.pdf>. Accessed 10/10/2008.

United States Environmental Protection Agency - EPA 815-R-99-014 - Office of Water. (1999). *Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual*. [Internet document] URL [www.epa.gov/safewater/mdbp/alternative\\_disinfectants\\_guidance.pdf](http://www.epa.gov/safewater/mdbp/alternative_disinfectants_guidance.pdf). Accessed 12/01/2008.

VARELA, A. et al. (2004). Effect of pasture finishing on the meat characteristics and intramuscular fatty acid profile of steers of the Rubia Gallega breed. *Meat Science*, 67, 515-522.

YUK, H. et al. (2007). Effect of combined ozone and organic acid treatment for control of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on enoki mushroom. *Food Control*, 18, 548-553.

ZAMBIAZI, R. C. *The oil endogenous lipid components on vegetable oil stability*. Tese de doutorado. 1997. 304p. Foods and nutritional science interdepartmental program. University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba-Canada, april.

ZAMBIAZI, R. C. (1999). Oxidation reactions of vegetable oils and fats. *Boletim do SBCTA*, 33, 1-7.

### **Efeito da ozonização sobre o colesterol em hambúrguer bovino**

PRISCILA CHIATTONE<sup>3</sup>; RUI CARLOS ZAMBIAZI<sup>4</sup>; LILIAN R. B. MARIUTTI<sup>5</sup>; GISLAINE C. NOGUEIRA<sup>6</sup>; NEURA BRAGAGNOLO<sup>7</sup>

#### **RESUMO**

O ozônio tem sido utilizado na indústria alimentícia com o objetivo de reduzir a contagem microbiana dos alimentos. Esta molécula se sobressai perante outros agentes oxidantes por possuir um maior potencial de oxidação e por não deixar residual nos alimentos. No entanto, inexitem relatos na literatura de seu efeito sobre possível oxidação do colesterol em alimentos. Os óxidos de colesterol estão relacionados com o desenvolvimento de placas ateroscleróticas, citotoxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade, alterações nas propriedades das membranas celulares e inibição da atividade da enzima HMG-Coa redutase. Desta forma, este estudo teve como objetivo verificar se o uso do ozônio em hambúrgueres causa oxidação do colesterol. Constatou-se que este oxidante, na concentração de 0,6ppm, não esteve associado a presença dos óxidos 7 $\beta$ -Hidroxicolesterol e de 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, mas esteve associado a presença do 7-cetocolesterol (0,25 $\mu$ g.g<sup>-1</sup>). No entanto, esse valor, quando comparado com os citados na literatura encontrados em alimentos é considerado baixo.

**PALAVRAS-CHAVE:** hambúrguer, ozônio, óxidos de colesterol.

#### **ABSTRACT**

Ozone has been used in the food industry with the goal of reducing the microbial contamination of food. This molecule stands out against other agents due to its potential for oxidation and not leaving residual in foods. However, there is no literature report about possible effects of this compound on cholesterol oxidation in foods. The cholesterol oxides are related to the development of atherosclerotic plaque, cytotoxicity, carcinogenicity, mutagenicity, changes in properties of cell membranes and inhibiting the activity of the enzyme HMG-CoA reductase. Thus, this study aimed to examine whether the use of ozone in hamburgers cause oxidation of cholesterol. It was found that this oxidant, in the concentration of 0,6 ppm, was not related with the presence of 7 $\beta$ -hydroxycholesterol and 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol

---

<sup>3</sup> Doutoranda em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas – UFPEL, RS, Professora da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, PR, Brasil. Endereço: Av. Tarquínio Joslin dos Santos, 1300 - Caixa Postal: 861, Polo Universitário, Foz do Iguaçu - PR - 85870-900; e-mail: priscilachiattoni@hotmail.com.

<sup>4</sup> Departamento de Ciência dos Alimentos da UFPel. Endereço: Rua Gomes Carneiro, 1, Centro, CEP 96010-610 Pelotas, RS, Caixa Postal 354; e-mail: zambiazzi@gmail.com.

<sup>5,4,5</sup> Departamento de Ciência dos Alimentos, Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 13083-862, Campinas, São Paulo, Brasil

oxides, but it was associated with the presence of 7-ketocholesterol (0,25  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ). However, this value, when compared with the existing literature to food is considered low.

KEYWORDS: hamburger, ozone, oxides of cholesterol.

## INTRODUÇÃO

Uma das grandes preocupações nas indústrias frigoríficas é conseguir manter a qualidade microbiológica das carnes, principalmente quando moída, a qual passa por uma constante manipulação, trituração e incorporação de oxigênio. Uma alternativa para este processo é o uso do ozônio, pois diminui a contagem bacteriana inicial dos alimentos (ACHEN; YOUSEF, 2001; AKBAS, OZDEMIR, 2006; AL-HADDAD; AL-QASSEMI; ROBINSON, 2005; CAMPOS et al., 2006; CHIATTONE, 2006; RICE et al., 1996; YUK, H. et al., 2007).

No processamento de alimentos, o ozônio vem ganhando espaço devido ao seu alto poder sanitizante e pela sua rápida degradação, não deixando resíduos nos alimentos. Estas propriedades intrínsecas permitem a ingestão de alimentos ozonizados sem riscos à saúde (CHIATTONE, TORRES, ZAMBIAZI, 2009).

O ozônio possui alto poder de oxidação (1,52), superando inclusive o peróxido de hidrogênio (1,30), o hipoclorito (1,10) e o cloro (1,0) (KIM, YOUSEF, DAVE, 1999; SNATURAL, 2009). Por sua forte ação oxidante, aumenta a formação de radicais livres acelerando as reações de oxidação nos ácidos graxos, o que é indesejável nos alimentos (SMITH et al., 2001). Portanto, há a necessidade de estudos para avaliar a ação do ozônio sobre o colesterol.

O colesterol é um importante constituinte dos produtos de origem animal, pois está presente em todas as membranas celulares, sendo a chave intermediária na síntese de ácidos biliares e de hormônios, além de participar da síntese da vitamina D<sub>3</sub> (BAGGIO; BRAGAGNOLO, 2004). No entanto, uma taxa elevada de colesterol no sangue é um dos fatores de risco para doenças cardiovasculares, a principal causa de morte no Brasil e em muitos outros países (BRAGAGNOLO; AMAYA, 2001).

Por ser um componente insaturado presente na fração lipídica, o colesterol é susceptível à oxidação, levando à formação de vários produtos de oxidação indesejáveis nos alimentos, muito dos quais estão relacionados às doenças ateroscleróticas (PENG, HU, MORIN, 1992; PENG; MORIN, 1992). A auto-oxidação



do colesterol pode ocorrer sob várias condições, como sua exposição ao ar, a temperaturas elevadas, a iniciadores de radicais livres, a luz, a radiação ionizante, a íons metálicos ou à combinação destes (ARAÚJO, 2004, MORALES-AIZPURÚA; TENUTA-FILHO, et al. 2003).

Enquanto o colesterol é oxidado, outros ácidos graxos também podem ser afetados. No entanto, a oxidação dos ácidos graxos pode ser reconhecida pelo *off-flavour*, enquanto que a oxidação do colesterol não produz componentes de flavor, não podendo ser reconhecida ou detectada pelo consumidor (ADDIS; PARK, 1992).

Os principais óxidos de colesterol identificados em alimentos são: 25-hidroxicolesterol (25-OH), 20 $\alpha$ -hidroxicolesterol, colestano-3 $\beta$ -5 $\alpha$ -6 $\beta$ -triol (triol), 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol, 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol, 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol. Por ocorrer em concentrações relativamente altas, o 7-cetocolesterol tem sido usado como indicador da oxidação do colesterol. Por outro lado, o 25-OH e o triol são os de menor ocorrência (SMITH, 1987; NAM, et al. 2001). No entanto, o 25-OH, os epóxidos e o triol foram identificados como sendo os óxidos com efeitos de maior toxidez em células de animais (KUMAR; SINGHAL, 1991).

Os óxidos de colesterol são absorvidos através dos alimentos e entram na circulação sanguínea como contaminantes (LINSEISEN; WOLFRAM, 1998), apresentando possivelmente um papel mais importante no desenvolvimento de placas ateroscleróticas do que o próprio colesterol (KUMAR; SINGHAL, 1991), bem como outros efeitos biológicos indesejáveis como citotoxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade, alterações nas propriedades das membranas celulares e inibição da atividade da enzima HMG-CoA (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA) redutase (GUARDIOLA et al., 1996; BÖSSINGER et al., 1993).

Estudos utilizando a aplicação de óxidos de colesterol em culturas de células musculares de aortas de coelhos brancos revelaram que o 25-hidroxicolesterol e o colestano-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol, dentro de 24 horas, provocaram necroses em 25% das células, usando uma concentração mínima de 10 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> no meio de cultura (BÖSSINGER et al., 1993).

Segundo Dzeletovic et al. (1995), a modificação oxidativa da LDL é uma hipótese da causa de aterosclerose. Derivados oxigenados do colesterol em

lipoproteína oxidada em lesões arteriais foram identificados em pesquisas com doenças cardiovasculares (BROWN; JESSUP, 1999, apud BAGGIO, 2004).

A contribuição dos óxidos de colesterol para a formação de lesões arteriais “in vivo” foi descrita por Guardiola et al. (1996), os quais relatam que os óxidos aumentam a permeabilidade vascular à albumina e a outras macromoléculas, estimulando a agregação de plaquetas por alterações no equilíbrio das prostaglandinas e alterando a composição lipídica da LDL. Estes compostos também inibem a expressão dos receptores de LDL e reprimem o relaxamento do endotélio arterial (PENG et al., 1996, apud BAGGIO, 2004).

Chisolm et al. (1994) demonstraram a presença de lesões ateroscleróticas humanas e identificaram o 7 $\beta$ -hidroxicolesterol como responsável pela oxidação de LDL (BAGGIO, 2004). Pesquisas realizadas por Hughes et al. (1994), identificaram o 7-cetocolesterol e o 7 $\beta$ -hidroxicolesterol em LDL após a sua oxidação “in vitro” na presença de íons cobre (BAGGIO, 2004). Quantidades significantes de óxidos de colesterol foram identificados em tecidos humanos das aortas, plasma e fígado de indivíduos hipercolesterolêmicos e ateroscleróticos (SPENCER et al., 1985; KUMAR; SINGHAL, 1991).

Os efeitos mutagênicos e carcinogênicos estão intimamente relacionados com a formação do 5,6-epoxicolesterol. Este composto foi encontrado depositado em células e verificou-se que se transforma em colestano-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol, que é mais tóxico e possui alto potencial de inibição da síntese de DNA. No entanto, em concentrações inferiores a 17,8 $\mu$ M este composto não é considerado mutagênico (SEVANI; PETERSON, 1984). Segundo Sevanian e Peterson (1986), os pacientes com um aumento de colestano-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol no trato gastrointestinal, apresentaram incidência de câncer de cólon.

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar e quantificar os óxidos de colesterol em hambúrgueres processados com água ozonizada, uma vez que o ozônio tem demonstrado ser um agente sanitizante promissor na indústria de alimentos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Matéria-prima e ingredientes para o preparo dos hambúrgueres

Para o preparo de hambúrgueres foi utilizada carne moída fresca de paleta bovina, com teor de 6 % de gordura, adquirida em açougue comercial localizado na cidade de Pelotas (RS) e transportada imediatamente ao Laboratório de Análises Químicas e Bromatológicas da FAEM (UFPel), sob refrigeração. Os outros ingredientes utilizados na formulação (tab. 1), também foram adquiridos no comércio local, com exceção da mistura para hambúrguer, a qual foi doada pela empresa Duas Rodas Industrial (SC).

**Tabela 1 – Formulação dos hambúrgueres (%).**

Tratamentos	Carne	Água	O <sub>3</sub>	Ingredientes*	Eritorbato de sódio	Acido ascórbico	Mistura**
C	94,8	3,0	0,0	2,2	0,0	0,0	0,0
O	94,8	0,0	3,0	2,2	0,0	0,0	0,0
3E	94,5	3,0	0	2,2	0,3	0,0	0,0
3EO	94,5	0	3,0	2,2	0,3	0,0	0,0
6E	94,5	3,0	0	2,2	0,6	0,0	0,0
6EO	94,5	0,0	3,0	2,2	0,6	0,0	0,0
3VC	94,5	3,0	0	2,2	0,0	0,3	0,0
3VCO	94,5	0,0	3,0	2,2	0,0	0,3	0,0
6VC	94,5	3,0	0	2,2	0,0	0,6	0,0
6VCO	94,5	0,0	3,0	2,2	0,0	0,6	0,0
3M	94,5	3,0	0	2,2	0,0	0,0	0,3
3MO	94,5	0,0	3,0	2,2	0,0	0,0	0,3
6M	94,5	3,0	0	2,2	0,0	0,0	0,6
6MO	94,5	0,0	3,0	2,2	0,0	0,0	0,6

\* sal (1,5%), alho (0,2%), cebola (0,3%), glutamato (0,2%). \*\* Mistura = ácido cítrico e eritorbato de sódio. Controle (C), ozônio (O), 0,3% eritorbato de sódio (3E), 0,3% eritorbato de sódio e ozônio (3EO), 0,6% eritorbato de sódio (6E), 0,6% eritorbato de sódio e ozônio (6EO), 0,3% de ácido ascórbico (3VC), 0,3% de ácido ascórbico e ozônio (3VCO), 0,6% de ácido ascórbico (6VC), 0,6% de ácido ascórbico e ozônio (6VCO), 0,3% de mistura (3M), 0,3% de mistura e ozônio (3MO), 0,6% de mistura (6M), e 0,6% de mistura e ozônio (6MO).

### Processamento dos hambúrgueres

Inicialmente misturou-se na carne bovina moída o sal, o glutamato, o alho e a cebola, seguindo-se uma homogeneização do material, e após separou-se este material em sete lotes distintos. Em um (01) dos lotes não foi adicionado antioxidante, e nos outros 06 (seis) lotes foi adicionado um dos antioxidantes: eritorbato de sódio, ácido ascórbico ou uma mistura de eritorbato de sódio com ácido cítrico (mistura comercial para hambúrguer), para cada um nas concentrações de 0,3 e 0,6%. A cada um destes sete lotes, subdividiu-se em dois lotes, onde em um deles

foi adicionado 3% (v/p) de água destilada e no outro 3% (v/p) de água ozonizada. Desta forma, este trabalho contou com 14 tratamentos. Realizou-se o processamento segundo uma formulação padrão, tabela 1 (Centro de Tecnologia de Produtos Alimentares, 1998).

A água ozonizada foi gerada borbulhando-se o gás ozônio em água destilada a 2°C por 3 minutos. Para isso foi utilizado um equipamento gerador de ozônio (Trata OZ, modelo TLS 6A) cedido pela empresa OZ Engenharia Ltda. (RS), o qual se fundamenta no efeito corona, ou seja, na geração de ozônio pela descarga elétrica sobre o oxigênio. O residual de ozônio na água foi medido pelo método Padrão do índigo, aceito mundialmente pelo *United States Environmental Protection Agency* (EPA) e pelo *International Ozone Association* (IOA), sendo o único método a constar no *Standards methods for the examination of water and wastewater* (1997). Ao final da ozonização obteve-se um residual na água de 0,6mgO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>.

Após a adição de água, o material foi homogeneizado, moldado manualmente, e acondicionado em placas de petri, e a seguir foi colocado em congelador (-18°C), onde permaneceu pelo período de 4 meses.

### **Produtos químicos e reagents utilizados nas avaliações**

Os hambúrgueres foram avaliados quanto ao teor de colesterol e seus óxidos (7-cetocolesterol, 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol e do 7 $\beta$ -hidroxicolesterol) logo após o processamento, e aos quatro meses de estocagem.

Os padrões de Colesterol e do óxido 7-cetocolesterol (7-ceto), foram adquiridos da Sigma (Milford, MA); o 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol (7 $\alpha$ -OH) e o 7 $\beta$ -hidroxicolesterol (7 $\beta$ -OH) foram adquiridos da Steraloids (Newport, RI). As purezas dos padrões variaram de 95 a 98%.

### **Delineamento experimental**

Os procedimentos de extração e saponificação foram baseados no método desenvolvido por Mazalli et al. (2006) e otimizados por meio da metodologia de superfície de resposta (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978, apud MARIUTTI; NOGUEIRA; BRAGAGNOLO, 2008). Inicialmente realizou-se uma triagem fatorial 27<sup>3</sup> (com três pontos centrais) para verificar os efeitos simultâneos das variáveis independentes sobre a eficiência de extração do colesterol e dos seus produtos de

oxidação, e também para escolher o melhor solvente para a extração da porção insaponificável, entre hexano e éter etílico. As variáveis independentes foram o peso da amostra de hambúrguer, a concentração da solução de KOH no etanol, o tempo de saponificação, o volume de água adicionada para a partição, o número de extrações, o número de lavagens para a limpeza da matéria insaponificável, e o volume de solvente utilizado para lavar o sulfato de sódio anidro no papel de filtro. Posteriormente, um fatorial de  $2^4$  composto por oito pontos axiais e quatro pontos centrais foi desenvolvido utilizando as variáveis estatisticamente significativas ( $p < 0,10$ ) mais o peso da amostra de hambúrguer.

### **Validação do Método**

O método analítico foi validado pela linearidade, recuperação, repetibilidade e limite de detecção. A linearidade foi observada através de coeficientes de correlação ( $r^2$ ) das curvas de calibração construída com sete pontos de soluções padrões, com concentrações variando de 0,2 a 6  $\text{mg.mL}^{-1}$  para o colesterol e entre 0,5 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para os óxidos de colesterol. As análises de recuperação de colesterol e dos óxidos de colesterol foram feitas separadamente e ambas foram realizadas em dois níveis com 10 repetições para cada nível. A repetibilidade foi avaliada pelos desvios padrões relativos. Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com as recomendações da International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC (LONG; WINEFORDNER, 1983).

### **Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - HPLC**

Foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com o detector UV (SPD-10 AVVP). A coluna analítica foi a Nova Pak CN HP (Waters, Milford, MA), 300 × 3.9 mm i.d. × 4  $\mu\text{m}$ ; volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ ; temperatura inicial da coluna de 32°C. A fase móvel foi n-hexano/2-propanol (97:3) com fluxo de 1  $\text{mL.min}^{-1}$  (SALDANHA et al, 2006). O Colesterol e os COPs foram detectados pelo detector de UV a 210 nm. A identificação do colesterol e dos COPs foi feita por comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com os padrões de referência. A quantificação foi feita por calibração externa.

## **Cromatografia Líquida de Alto Desempenho Acoplado a Espectrometria de Massa - HPLC-MS**

Para confirmar a identidade dos produtos de oxidação do colesterol (COPs), as amostras de hambúrguer foram injetadas em um HPLC Shimadzu equipado com bomba quaternária (LC-20ad) e uma unidade desgaseificadora (DGU-20A5) ligados em série a um detector de arranjo de diodos (PDA) (SPD-M20A) e um espectrômetro de massa (MS) da Bruker Daltonics (Esquire modelo 4000, Bremen, Alemanha) com uma fonte de ionização na pressão atmosférica (APCI) e um analisador coletor de íons. As condições de HPLC foram as mesmas descritas anteriormente. Os parâmetros de MS definidos foram: modo positivo; temperatura da fonte de 400°C; corona de 4000 NA; gás seco (N<sub>2</sub>) à 300°C, 5 L.min<sup>-1</sup> de fluxo e nebulizador 65 psi; intervalo de varredura de 80 a 450 m.z<sup>-1</sup>. Os espectros de MS dos COPs a partir das amostras de hambúrguer foram comparados com os espectros de MS dos padrões dos COPs no tempo de retenção correspondente. O espectro de MS do 7-ceto apresentou a molécula protonada ([M + H]<sup>+</sup>) em 401 m/z e o fragmento correspondente à perda de 1 molécula de água (m/z 383). Por outro lado, os espectros de MS dos Hidroxicolesteróis não apresentaram a molécula protonada, e apenas os fragmentos em 385 e 367 m.z<sup>-1</sup>, correspondendo à perda de uma e duas moléculas de água, respectivamente, foram detectados.

### **Estatística**

Os dados coletados foram analisados estatisticamente utilizando análise de variância (Anova), e as médias foram analisadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

## **RESULTADOS E DISCUSSOES**

Observou-se que os tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si quanto ao conteúdo de colesterol nos hambúrgueres logo após o processamento (tab. 2). Em geral, a quantidade de colesterol da carne de diferentes espécies varia de 50 a 89 mg.100g<sup>-1</sup> (PIKUL et al., 1984 apud NAM et al., 2001). Rodriguez-estrada et al. (1997) relatam em hambúrgueres, conteúdos de colesterol (83,4mg.100g<sup>-1</sup>) superiores aos encontrados neste trabalho. No entanto, em estudo realizado por Baggio e Bragagnolo (2008), amostras comerciais de hambúrgueres apresentaram teores de colesterol de 177 a 377 mg.100g<sup>-1</sup>, sendo superiores aos

apresentados no presente estudo. Em outro estudo, Baggio e Bragagnolo (2006) relatam conteúdos de colesterol de 30 mg.100g<sup>-1</sup> e 89,7 mg.100g<sup>-1</sup>, base úmida e seca, respectivamente, para hambúrguer cru adquirido no comércio. Larkeson et al. (2000) determinaram teores de colesterol em hambúrgueres bovinos e encontraram teores de 46,1 mg.100g<sup>-1</sup> nas amostras de hambúrgueres crus e de 28,6 mg.100g<sup>-1</sup> nos hambúrgueres pré-fritos. Essas oscilações nos valores de colesterol podem ser explicadas devido à diferença na composição dos hambúrgueres, do tipo de corte utilizado no seu preparo, da raça e idade do animal abatido, dentre outros. Ressalta-se ainda que hambúrgueres comerciais geralmente apresentam na sua composição proteína vegetal, gordura hidrogenada e o antioxidante eritorbato de sódio, os quais podem interferir na quantidade de colesterol (BAGGIO; BRAGAGNOLO, 2006).

Tabela 2 – Conteúdos de colesterol, 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol em hambúrgueres processados com ozônio e antioxidantes logo após o processamento.

Tratam.	Colesterol (mg.100g <sup>-1</sup> )	7 $\alpha$ -OH ( $\mu$ g.g <sup>-1</sup> )	7 $\beta$ -OH ( $\mu$ g.g <sup>-1</sup> )	7-ceto ( $\mu$ g.g <sup>-1</sup> )	$\Sigma$ óxidos
C	72,70 <sup>A</sup> (2,66)	0,00 <sup>C</sup> (0,0)	0,00 <sup>E</sup> (0,00)	0,00 <sup>F</sup> (0,00)	0,00
O	73,80 <sup>A</sup> (3,12)	0,00 <sup>C</sup> (0,0)	0,00 <sup>E</sup> (0,00)	0,25 <sup>CD</sup> (0,03)	0,25
3E	71,50 <sup>A</sup> (0,14)	0,00 <sup>C</sup> (0,0)	0,17 <sup>DE</sup> (0,03)	0,00 <sup>F</sup> (0,00)	0,17
3EO	73,60 <sup>A</sup> (7,40)	0,00 <sup>C</sup> (0,0)	0,00 <sup>E</sup> (0,00)	0,07 <sup>EF</sup> (0,01)	0,07
6E	73,90 <sup>A</sup> (5,47)	0,00 <sup>C</sup> (0,0)	0,22 <sup>CD</sup> (0,02)	0,12 <sup>EF</sup> (0,01)	0,34
6EO	72,40 <sup>A</sup> (0,71)	0,59 <sup>B</sup> (0,08)	0,12 <sup>DE</sup> (0,00)	0,32 <sup>C</sup> (0,08)	1,03
3VC	73,00 <sup>A</sup> (3,03)	0,00 <sup>C</sup> (0,0)	0,00 <sup>E</sup> (0,00)	0,04 <sup>EF</sup> (0,01)	0,04
3VCO	73,10 <sup>A</sup> (2,11)	0,00 <sup>C</sup> (0,0)	0,00 <sup>E</sup> (0,00)	0,10 <sup>EF</sup> (0,01)	0,10
6VC	73,00 <sup>A</sup> (3,29)	0,66 <sup>B</sup> (0,04)	0,20 <sup>CD</sup> (0,04)	0,08 <sup>EF</sup> (0,00)	0,94
6VCO	72,00 <sup>A</sup> (2,31)	2,12 <sup>A</sup> (0,35)	0,64 <sup>BA</sup> (0,01)	0,47 <sup>B</sup> (0,06)	3,23
3M	71,20 <sup>A</sup> (2,60)	0,00 <sup>C</sup> (0,0)	0,00 <sup>bE</sup> (0,00)	0,05 <sup>Bef</sup> (0,00)	0,05
3MO	73,10 <sup>A</sup> (5,56)	0,00 <sup>C</sup> (0,0)	0,56 <sup>bAB</sup> (0,09)	0,13 <sup>bDE</sup> (0,00)	0,69
6M	71,80 <sup>A</sup> (0,34)	0,0 <sup>C</sup> (0,0)	0,37 <sup>aBC</sup> (0,13)	0,64 <sup>aA</sup> (0,02)	1,01
6MO	72,90 <sup>A</sup> (0,15)	0,0 <sup>C</sup> (0,0)	0,18 <sup>aDE</sup> (0,04)	0,31 <sup>aC</sup> (0,00)	0,49

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente ( $p \leq 0,05$ ). Tratamentos: Controle (C), ozônio (O), 0,3% eritorbato de sódio (3E), 0,3% eritorbato de sódio e ozônio (3EO), 0,6% eritorbato de sódio (6E), 0,6% eritorbato de sódio e ozônio (6EO), 0,3% de ácido ascórbico (3VC), 0,3% de ácido ascórbico e ozônio (3VCO), 0,6% de ácido ascórbico (6VC), 0,6% de ácido ascórbico e ozônio (6VCO), 0,3% de mistura (3M), 0,3% de mistura e ozônio (3MO), 0,6% de mistura (6M), e 0,6% de mistura e ozônio (6MO).

Segundo Baggio (2004), os estudos sobre óxidos de colesterol em produtos cárneos processados são escassos na literatura, e os resultados de diferentes pesquisas são muitas vezes conflitantes. Além disso, ainda não existe no Brasil uma legislação sobre óxidos de colesterol em alimentos.

Após o processamento dos hambúrgueres (tab. 2) observou-se que não houve a presença de óxidos na amostra controle (C), e que na amostra adicionada de ozônio (O) ocorreu a formação de  $0,25 \mu\text{g.g}^{-1}$  de óxidos. Na grande maioria dos tratamentos onde foi aplicado o ozônio, comparando o tratamento com o mesmo aditivo (na mesma concentração) sem a aplicação de ozônio, ocorreu uma tendência de aumento na formação de óxidos, como o observado nos tratamentos com 0,6% de eritorbato (6EO), com 0,3% de ácido ascórbico (3VCO), com 0,6% de ácido ascórbico (6VCO) e com 0,3% de mistura (3MO).

Apenas nos tratamentos com eritorbato a 0,3% (3EO) e com ácido ascórbico a 0,3% (3VCO) ocorreu a presença de óxidos em quantidades inferiores ao tratamento no qual se utilizou apenas ozônio (O), indicando uma possível ação positiva dos diferentes aditivos na formação dos óxidos de colesterol em hambúrguer.

Este indício é suportado quando se comparam os tratamentos utilizando concentrações mais elevadas de aditivos, onde, com exceção do tratamento com 0,6% de mistura (6MO), todos os tratamentos com concentrações de 0,6% apresentaram maior quantidade de óxidos que os tratamentos com 0,3% de aditivo.

Ao avaliar-se o efeito do ozônio sobre uma possível oxidação do colesterol, constatou-se que este oxidante utilizado isoladamente, na concentração de 0,6ppm (O), não esteve associado a presença dos óxidos  $7\beta$ -Hidroxicolesterol ( $7\beta$ -OH) e de  $7\alpha$ -hidroxicolesterol ( $7\alpha$ -OH), mas esteve associado a presença do 7-cetocolesterol (7-ceto,  $0,25\mu\text{g.g}^{-1}$ ). O óxido 7-cetocolesterol ocorre em concentrações relativamente alta nos alimentos, sendo formado nos estágios iniciais da oxidação do colesterol (SMITH, 1987).

Morgan e Armstrong (1987) avaliaram o efeito de agentes pró-oxidantes ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e demonstraram que em temperaturas elevadas aumentam a produção do óxido 5-6-epoxicolesterol. Os antioxidantes Butil-hidroxianisol e butil-hidroxitolueno apresentaram efeito oxidante inibitório.

A amostra que apresentou maiores valores de  $7\alpha$ -OH e  $7\beta$ -OH (2,22 e  $0,64 \mu\text{g.g}^{-1}$ , respectivamente), após o processamento, foi a adicionada de 0,6% de ácido ascórbico e ozônio (6VCO), obtendo valores superiores, inclusive, à amostra somente com ozônio (O). Observa-se que este antioxidante adicionado no hambúrguer sem ozônio (6VC) apresentou valores de  $7\alpha$ -OH e  $7\beta$ -OH



estatisticamente inferiores (0,66 e 0,20  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , respectivamente) ao adicionado de ozônio (6VCO).

De Vore (1988) não observou produção de 7-cetocolesterol durante o processamento de carne bovina. Park e Addis (1985), bem como Baggio e Bragagnolo (2006), relataram a ausência de óxidos de colesterol em hambúrguer adquiridos em mercado local, que segundo os autores, esta ausência estaria associada pela presença de eritorbato de sódio em suas formulações. No entanto, Higley et al. (1986) identificaram 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol em hambúrguer cozido (72 $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), 7 $\beta$ -hidroxicolesterol em hambúrguer cru (3,6 $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) e traços de 7-cetocolesterol em hambúrguer cru e cozido. Rodriguez-Estrada et al. (1997) também identificaram o 7-cetocolesterol em amostras de hambúrguer bovino (25,2  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ). Esses autores ainda avaliaram o efeito do tratamento térmico sobre a oxidação do colesterol e relataram que os diferentes preparos térmicos reduziram o conteúdo de 7-cetocolesterol em relação à amostra crua. Embora existam relatos que altas temperaturas aumentem a oxidação dos lipídios de uma forma geral, esses autores explicam que pode ter ocorrido uma eluição dos óxidos nos meios de cozimento. Em estudo realizado por Osada et al. (2000) demonstra a existência dos óxidos 7 $\beta$ -hidroxicolesterol +  $\beta$ -epoxicolesterol,  $\alpha$ -epoxicolesterol, colestanoetriol e 7-cetocolesterol, sendo 10, 5,27, 3,41 e 9,09  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , respectivamente, em hambúrguer com carne bovina.

Tenuta-Filho et al. (2003) avaliaram óxidos em hambúrguer frito e encontraram um total de óxidos de 11,11  $\mu\text{g.g}^{-1}$ . Os teores de 7-ceto ficaram entre 3,45 e 5,33  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , os de 7 $\alpha$ -OH entre 0,79 e 2,79  $\mu\text{g.g}^{-1}$  e os de 7 $\beta$ -OH entre 5,09 e 5,61  $\mu\text{g.g}^{-1}$ .

Dentre os vários óxidos de colesterol pesquisados (colesta-4,6-dien-3-ona, 20 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol, 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol e 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol) por Baggio e Bragagnolo (2008), apenas o 7-cetocolesterol (3,2  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) foi encontrado em hambúrguer bovino adquirido no mercado.

De acordo com Baggio e Bragagnolo (2006) essas grandes discrepâncias nos valores dos óxidos de colesterol encontrados na literatura são relacionadas com as variações das metodologias e erros de quantificação devido à presença de substâncias interferentes.

Mesmo sem haver diferença significativa entre os tratamentos durante o período de estocagem, para a amostra controle (C) e para os tratamentos utilizando somente ozônio (O), 0,6% de eritorbato de sódio (6E) e utilizando 0,3% de mistura e ozônio (3MO), observou-se uma tendência de decréscimo no conteúdo de colesterol ao final de 4 meses de estocagem, o que poderia ser um indício de transformação do colesterol em seus óxidos (Anexo). Esta tendência se confirmou quando ocorreu um aumento no conteúdo dos óxidos nestes tratamentos ao quarto mês de estocagem.

Tabela 3 – Conteúdos de colesterol, 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol em hambúrgueres processados com ozônio e antioxidantes após 4 meses de armazenamento a -18°C.

Tratam.	Colesterol (mg.100g <sup>-1</sup> )	7 $\alpha$ -OH ( $\mu$ g.g <sup>-1</sup> )	7 $\beta$ -OH ( $\mu$ g.g <sup>-1</sup> )	7-ceto ( $\mu$ g.g <sup>-1</sup> )	$\Sigma$ óxidos
C	72,30 <sup>A</sup> (4,53)	0,0 <sup>E</sup> (0,0)	0,80 <sup>DE</sup> (0,04)	0,22 <sup>EF</sup> (0,01)	1,02
O	72,90 <sup>A</sup> (3,62)	0,0 <sup>E</sup> (0,0)	0,29 <sup>DE</sup> (0,04)	0,53 <sup>DEF</sup> (0,08)	0,82
3E	73,49 <sup>A</sup> (2,10)	0,0 <sup>E</sup> (0,0)	1,92 <sup>BC</sup> (0,57)	0,83 <sup>CDEF</sup> (0,04)	2,75
3EO	73,90 <sup>A</sup> (3,70)	3,54 <sup>B</sup> (1,04)	2,99 <sup>A</sup> (0,15)	1,04 <sup>BCD</sup> (0,35)	7,57
6E	73,50 <sup>A</sup> (1,12)	0,0 <sup>E</sup> (0,0)	0,00 <sup>E</sup> (0,00)	1,01 <sup>BCD</sup> (0,02)	1,01
6EO	73,20 <sup>A</sup> (3,82)	0,0 <sup>E</sup> (0,0)	0,00 <sup>E</sup> (0,00)	0,45 <sup>BCDE</sup> (0,04)	0,45
3VC	73,40 <sup>A</sup> (11,08)	1,56 <sup>CD</sup> (0,32)	2,72 <sup>AB</sup> (0,27)	0,98 <sup>BCDE</sup> (0,09)	5,26
3VCO	73,60 <sup>A</sup> (4,20)	2,22 <sup>BC</sup> (0,04)	1,91 <sup>BC</sup> (0,17)	0,06 <sup>F</sup> (0,01)	4,19
6VC	73,00 <sup>A</sup> (5,49)	0,0 <sup>E</sup> (0,0)	0,00 <sup>E</sup> (0,00)	0,14 <sup>F</sup> (0,02)	0,14
6VCO	72,00 <sup>A</sup> (5,67)	0,0 <sup>E</sup> (0,0)	0,00 <sup>E</sup> (0,00)	2,49 <sup>A</sup> (0,17)	2,49
3M	73,60 <sup>A</sup> (0,72)	1,98 <sup>BCD</sup> (0,45)	1,16 <sup>CD</sup> (0,30)	1,49 <sup>BC</sup> (0,14)	4,63
3MO	72,40 <sup>A</sup> (6,46)	6,58 <sup>A</sup> (1,66)	1,98 <sup>ABC</sup> (0,59)	1,63 <sup>B</sup> (0,58)	10,19
6M	74,63 <sup>A</sup> (0,13)	0,0 <sup>E</sup> (0,0)	0,00 <sup>E</sup> (0,00)	0,62 <sup>DEF</sup> (0,06)	0,62
6MO	73,30 <sup>A</sup> (3,05)	0,0 <sup>E</sup> (0,0)	0,00 <sup>E</sup> (0,00)	0,31 <sup>DEF</sup> (0,03)	0,31

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente ( $p \leq 0,05$ ). Tratamentos: Controle (C), ozônio (O), 0,3% eritorbato de sódio (3E), 0,3% eritorbato de sódio e ozônio (3EO), 0,6% eritorbato de sódio (6E), 0,6% eritorbato de sódio e ozônio (6EO), 0,3% de ácido ascórbico (3VC), 0,3% de ácido ascórbico e ozônio (3VCO), 0,6% de ácido ascórbico (6VC), 0,6% de ácido ascórbico e ozônio (6VCO), 0,3% de mistura (3M), 0,3% de mistura e ozônio (3MO), 0,6% de mistura (6M), e 0,6% de mistura e ozônio (6MO).

Na maioria das amostras ocorreu um aumento no conteúdo total dos óxidos com o tempo de armazenamento, com exceção das amostras adicionadas de 0,6% de eritorbato e ozônio (6EO), 0,6% de ácido ascórbico e ozônio (6VCO), e 0,6% de mistura com e sem ozônio (6M e 6MO). O tratamento que apresentou maior aumento no conteúdo de óxidos (9,5  $\mu$ g.g<sup>-1</sup>) foi aquele contendo 0,3% de mistura e ozônio (3MO), seguido pelo tratamento com 0,3% de eritorbato e ozônio (3EO, 7,50  $\mu$ g.g<sup>-1</sup>).

Ao contrário do observado logo após ao processamento dos hambúrgueres, em todos os tratamentos onde foi aplicado menor quantidade de aditivo (0,3%), comparando tratamentos com o mesmo aditivo (0,6%), independente da aplicação do ozônio, apresentaram maior quantidade total de óxidos aos quatro meses de armazenamento. Isto indica que os tratamentos contendo concentrações de 0,6% de aditivo foram mais eficientes na prevenção quanto a formação de óxidos durante o período de armazenamento sob congelamento, inclusive proporcionaram um decréscimo na quantidade de óxidos formados.

Ao comparar tratamentos com os mesmos aditivos, adicionados ou não de ozônio, não se observou tendência alguma em incremento do conteúdo total de óxidos em função da aplicação de ozônio. Com isto, tem-se um indicativo de que a aplicação de ozônio não inferiu na formação dos óxidos durante o período de armazenamento.

No geral, as maiores quantidades formadas foram dos óxidos  $7\alpha$ -hidroxicolesterol e  $7\beta$ -hidroxicolesterol, mas o óxido 7-cetocolesterol foi o único que foi identificado em todas as amostras.

Larkeson et al. (2000) também observaram um aumento na concentração de óxidos em hambúrgueres com o tempo de estocagem. Esses autores verificaram a presença de óxidos de colesterol em amostras de hambúrguer bovino após 2 semanas, e encontraram  $7\alpha$ -hidroxicolesterol (0,7 a  $9,9 \mu\text{g}^{-1}$ ),  $7\beta$ -hidroxicolesterol (1,4 a  $9,4 \mu\text{g}^{-1}$ ), 7-cetocolesterol (0,8 a  $15,7 \mu\text{g}^{-1}$ ), 5,  $6\alpha$ -epoxicolesterol (0,7 a  $3,7 \mu\text{g}^{-1}$ ), 5,  $6\beta$ -epoxicolesterol (0,9 a  $10,3 \mu\text{g}^{-1}$ ) e colestanoetriol (traços a  $1,0 \mu\text{g}^{-1}$ ). As amostras utilizadas eram cruas e pré-fritas, sendo que os autores encontraram teores de óxidos totais aumentados, quando essas foram fritas e estocadas na ausência de luz a  $4^{\circ}\text{C}$ . As amostras cruas apresentaram um teor de óxidos de colesterol total de  $7,2\mu\text{g.g}^{-1}$  em duas semanas de armazenamento, onde o maior aumento foi determinado nos hambúrgueres pré-fritos ( $49,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ ). Esses valores são bem superiores aos do presente estudo. A adição de ingredientes tais como cebola e alho nos hambúrgueres deste estudo pode ter interferido positivamente na estabilidade lipídica, uma vez que estes dois ingredientes possuem compostos com atividade antioxidante. Segundo Souza et al. (2009) encontraram compostos fenólicos em cebolas (2,3, 3 e  $0,08\text{mg.g}^{-1}$  de cebola) e relataram que o extrato da cebola diminuiu a oxidação ocasionada pela catálise metálica em sistema lipídico.

Nam et al. (2001) descreveram esta mesma tendência de aumento de óxidos com o armazenamento em carnes refrigeradas, estocadas na presença de oxigênio, durante o período de armazenamento, relatando quantidades de  $39,4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  no dia zero e  $45,6\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  após 7 dias. No entanto, Vicente e Torres (2007) avaliaram produtos de oxidação do colesterol em hambúrgueres bovinos congelados ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) e estocados por 4 semanas em ambiente protegido da luz e não detectaram presença de óxidos de colesterol. Segundo Tai et al. (1999) apud Baggio (2004), o uso de antioxidantes nas formulações e o emprego de embalagens apropriadas, que proporcionem uma barreira física ao ar e à luz, podem impedir a formação de produtos de oxidação do colesterol. Vicente e Torres (2007) encontraram aumento de produtos de oxidação do colesterol (COPs) com o tempo de armazenamento somente quando avaliaram os hambúrgueres depois que esses passaram 4 semanas da data de validade (de 4 meses), encontrando  $7\alpha$ -hidroxicolesterol ( $1,41\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de hambúrguer),  $7\beta$ -hidroxicolesterol ( $5,34\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de hambúrguer) e de 7-cetocolesterol ( $8,25\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de hambúrguer).

## CONCLUSÕES

A aplicação de o ozônio, na concentração de 6ppm, não causou alteração significativa no conteúdo de colesterol e na formação dos óxidos  $7\alpha$ -hidroxicolesterol,  $7\beta$ -hidroxicolesterol nos hambúrgueres bovinos durante o período de estocagem de 4 meses na temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$ . No entanto, logo após o processamento observou-se formação do 7-cetocolesterol pela aplicação de ozônio.

O uso dos antioxidantes ácido ascórbico, eritorbato de sódio ou da mistura comercial em hambúrgueres, na proporção de 0,3% apresentou uma tendência de retardar a oxidação logo após o processamento, mas de induzir a formação de maior quantidade de óxidos durante o período de armazenamento; enquanto que, na proporção de 0,6% foi observado o oposto, inclusive com tendência de redução no conteúdo de óxidos durante o período de armazenamento. por 4 meses a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Assim, sabendo-se do alto poder bactericida do ozônio e de seu baixo efeito sobre a oxidação do colesterol, recomenda-se o uso do ozônio no processamento de hambúrgueres.

## Agradecimentos

Agradecemos a empresa de Equipamentos e Geradores de Ozônio – OZ Engenharia, pelo convênio realizado com a UFPel e pela colaboração na execução deste trabalho, à empresa Duas Rodas pela mistura comercial para Hambúrguer, à Unicamp pelo auxílio na execução das avaliações e à Capes, fonte de financiamento para esta pesquisa

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ACHEN, M.; YOUSEF, A. E. Efficacy of ozone against *Escherichia coli* O157:H7 on apples. **Journal of Food Science**, v.66, n. 9, p.1380-1384. 2001.

ADDIS, P. B.; PARK, P. S. W. Cholesterol oxide content of foods. In: **Biological Effects of Cholesterol Oxides**, C. R. C. Press, London, UK, p.71-81, 1992.

AKBAS, M. Y.; OZDEMIR, M. Effectiveness of ozone for inactivation of *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* in pistachios. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n.5, p.513-519. 2006.

AL-HADDAD, K. S. H.; AL-QASSEMI, R. A. S.; ROBINSON, R. K. The use of gaseous ozone and gas packaging to control populations of *Salmonella infantis* and *Pseudomonas aeruginosa* on the skin of chicken portions. **Food Control**, v. 16, n.5, p.405-410. 2005.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: teoria e prática**. 3.ed. Viçosa, MG: UFV, 2004. 478p.

a-BAGIO, S. R.; BRANGAGNOLO, N. Validação da metodologia para determinação simultânea, por CLAE, de colesterol e óxidos de colesterol em produtos cárneos processados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.1, p.64-70, 2004.

b-BAGIO, S. R.; BRANGAGNOLO, N. **Óxidos de colesterol, colesterol, lipídios totais e ácidos graxos em produtos cárneos processados**. 2004. 202f. Tese

(Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BAGIO, S. R.; BRANGAGNOLO, N. The effect of heat treatment on the cholesterol oxides, cholesterol total lipid and fatty acid contents of processed meat products. **Food Chemistry**, v.95, p.611-619, 2006.

BAGIO, S. R.; BRANGAGNOLO, N. Lipid Fraction Quality Evaluation of Brazilian Meat-based Products. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.19, n.3, 463-470, 2008.

BÖSSINGUER, S.; LUF, W. & BRANDL, E. Oxysterols: Their occurrence and biological effects. **International Dairy Journal**, v.3, p.1-33, 1993.

BRAGAGNOLO, N.; AMAYA, D. B. R. Determinação de colesterol em carne: comparação de um método colorimétrico e um método por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.60, n.1, p.53-57, 2001.

CAMPOS, C. et al. Evaluation of an ozone-slurry ice combined refrigeration system for the storage of farmed turbot (*Psetta maxima*). **Food Chemistry**, v.97, p. 223-230. 2006.

CHIATTONE, P. V.; TORRES, L. M.; ZAMBIAZI, R. C. 2008. APLICAÇÃO DO OZÔNIO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, 19.

CHIATTONE, P. *Ozônio e ácido ascórbico na coloração e microbiota da carne bovina maturada*. 2006. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

DE VORE, V. R. TBA values and 7-ketocholesterol in refrigerated raw and cooked ground beef. **Journal of Food Science**, v.53, n.4, p.1058-1061, 1988.

DZELETOVIC, S. et al. Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution – mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 225, p. 73-81, 1995.

GUARDIOLA, F. et al. Biological Effects of Oxysterols: Current Status. **Food and Chemical Toxicology**, v.34, p.193-198, 1996.

HIGLEY, N. A., et al. Cholesterol oxides in processed meats. **Meat Science**, v.16, p.175-188, 1986.

KIM, J.G; YOUSEF, A.E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **Journal of Food Protection**, v.62, n.9, p.1071-1087. 1999.

KUMAR, N.; SINGHAL, O. P. Cholesterol oxides and atherosclerosis: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.55, p. 497-510, 1991.

LARKESON, B.; DUTTA, P. C. & HANSSON, I. Effects of frying and storage on cholesterol oxidation in minced meat products. **Journal of American Oil Chemists Society**, v .77, p. 675-680, 2000.

LINSEISEN, J.; WOLFRAM, G. Absorption of cholesterol oxidation products from ordinary foodstuff in humans. **Annals of nutrition & metabolism**, v.42, p.221-230, 1998.

LONG, G.L.; WINEFORDNER, J.D. Limit of detection: a closer look at the IUPAC detection. **Analytical Chemistry**, v.55, p.712-724, 1983.

MAZALLI, M. R., et al. HPLC method for quantification and characterization of cholesterol and its oxidation products in eggs. **Lipids**, v.41, p.615-622, 2006.

MARIUTTI, L. R. B.; NOGUEIRA, G. C.; BRAGAGNOLO, N. Optimization and validation of analytical conditions for cholesterol and cholesterol oxides extraction in

chicken meat using response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.9, p. 2913-2918, 2008.

MORALES-AIZPURÚA, I.C.; TENUTA-FILHO, A. Óxidos de colesterol: ocorrência em alimentos, formação e efeitos biológicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, v.38, n.4, p.431-442, 2002.

MORGAN, J. N.; ARMSTRONG, D. J. Formation of cholesterol 5, 6 - epoxides during spray drying of egg yolk. **Journal of food science**, v.52, p.1224-1227, 1987.

NAM, K. C. et al. Cholesterol oxidation products in irradiated raw meat with different packaging and storage time. **Meat Science**, v.58, p. 431-435, 2001.

OSADA, K.; HOSHINA, S.; NAKAMURA, S. & SUGANO, M. Cholesterol oxidation in meat products and its regulation by supplementation of sodium nitrite and apple polyphenol before processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.3823-3829, 2000.

PARK, S. W.; ADDIS, P. B. HPLC determination of C7 oxidized cholesterol derivatives in foods. **Journal of Food Science**, v.50, p.1437-1444, 1985.

PENG, S.K.; HU, B.; MORIN, R.J. Effects of Cholesterol oxides on atherogenesis. In: **Biological Effects of Cholesterol Oxides**, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p.167-190, 1992.

PENG, S.K.; MORIN, R.J. **Biological Effects of Cholesterol Oxides**. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1992.

RICE, J. O. et al. Trimming and washing of beef carcasses as a method of improving the microbiological quality of meat. **Journal of Food Protection**, v.59, p.751-756. 1996.

RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T. et al. Effect of different cooking methods on some lipid and protein components of hamburgers. **Meat Science**, v.45, p.365-375, 1997.



SALDANHA, T. et al. HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish: comparative study of RI, UV, and APCI-MS detectors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.4107-4113, 2006.

SOUZA, M. M. et al. Estudo das condições de extração de compostos fenólicos de cebola (*Allium cepa* L.) Revista do Instituto Adolfo Lutz, v.68, n.2, p.26-34, 2009.

SNATURAL – Tecnologias Ambientais Ltda. **Ozônio**. Disponível em: <http://www.snatural.com.br/Ozonio.htm>. Acesso em: 15/02/2009.

SPENCER, T. A. et al. 24(S)-, 25-Epoxycholesterol. Evidence consistent with a role in the regulation of hepatic cholesterol-genesis. **Journal of Biological Chemistry**, v.260, p. 13391-13398,1985.

SEVANIAN, A. & PETERSON, A. R. Cholesterol epoxide is a direct acting mutagen. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 81, p. 4198-4205, 1984.

SEVANIAN, A.; PETERSON, A. R. The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, p. 1103-1109, 1986.

SMITH, L. L. Cholesterol autoxidation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.44, p. 87-125, 1987.

SMITH, C.D. et al. **Effects of activated ozone, on lipid peroxidation, when applied to carcasses and to ground beef during blending**. 2001. Disponível em: <<http://ansci.colostate.edu/dp/msfs/cdso12.pdf>>. Acesso em: 10/10/2008.

TENUTA-FILHO, A. et al. Óxidos de colesterol em alimentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 3, 2003.

United States Environmental Protection Agency - EPA 815-R-99-014 - Office of Water. **Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual**. 1999. In:

[www.epa.gov/safewater/mdbp/alternative\\_disinfectants\\_guidance.pdf](http://www.epa.gov/safewater/mdbp/alternative_disinfectants_guidance.pdf); consulta: 12/01/2008.

VICENTE, S.J.V.; TORRES, E.A.F.S. Formation of four oxidation products and loss of free lipids, cholesterol and water in beef hamburgers as a function of thermal processing. **Food Control**, v.18, p.63-68, 2007.

YUK, H. et al. Effect of combined ozone and organic acid treatment for control of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on enoki mushroom. **Food Control**, v.18, n.5, p.548-553. 2007.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os hambúrgueres formulados com os tratamentos sem aditivo e com água ozonizada, bem como os tratamentos com 0,3% de mistura comercial (eritorbato de sódio e ácido cítrico), apresentaram os maiores valores para o índice de peróxidos e de ácido tiobarbitúrico durante o período de estocagem por quatro meses. No entanto, os resultados de TBARS, mesmo sendo mais altos para a amostra com ozônio, ficaram bem abaixo do limite recomendado na literatura. O tratamento com 0,3% da mistura para hambúrguer também apresentou valores de óxidos de colesterol superiores ao controle aos quatro meses de estocagem, principalmente quando em combinação com o ozônio.

O ozônio, na concentração de 0,6ppm, não esteve associado a presença dos óxidos  $7\beta$ -Hidroxicolesterol e de  $7\alpha$ -hidroxicolesterol, mas esteve associado a presença do 7-cetocolesterol ( $0,25\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). No entanto, esse valor, quando comparado com os existentes na literatura, é considerado baixo.

O uso dos antioxidantes foi efetivo para retardar a saturação dos ácidos graxos insaturados nas amostras durante o período de estocagem. Na proporção de 0,3% apresentaram uma tendência de retardar a oxidação logo após o processamento, mas de induzir a formação de maior quantidade de óxidos durante o período de armazenamento; enquanto que, na proporção de 0,6% foi observado o oposto, inclusive com tendência de redução no conteúdo de óxidos durante o período de armazenamento por 4 meses a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

O aditivo que demonstrou maior efeito contra a oxidação causada pelo ozônio foi o adicionado da mistura comercial para hambúrguer na concentração de 0,6%. Este tratamento apresentou efeito nulo quanto à formação de COPs.

Assim, sabendo-se do alto poder bactericida do ozônio e de seu baixo efeito sobre a oxidação do colesterol durante o período de armazenamento, recomenda-se o seu uso no processamento de hambúrgueres. Pode-se ainda adicionar-se à formulação a mistura comercial para hambúrguer na concentração de 0,6%, com a finalidade de diminuir a saturação dos lipídios.

O estudo demonstrou que não houve uma relação direta entre o grau de oxidação dos ácidos graxos e a formação de óxidos de colesterol.