UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Efeito da radiação ionizante sobre a oxidação do colesterol em
hambúrgueres de frango e bovino congelados

Andréa Figueiredo Procópio de Moura

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Alfredo Tenuta Filho

São Paulo
2004

Andréa Figueiredo Procópio de Moura

Efeito da radiação ionizante sobre a oxidação do colesterol em
hambúrgueres de frango e bovinos congelados

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Alfredo Tenuta Filho
Orientador/Presidente

Prof. Dr. Luis Antônio Gioielli

Prof. Dr. Dirceu Martins Vizeu

Profa. Dra. Anna Lúcia C. H. Villavicencio

Profa. Dra. Elizabeth A. F. da Silva Torres

São Paulo, 27 de setembro de 2004

*“Cente
E não diga que a vitória está perdida
Se é de batalhas que se vive a vida
Cente outra vez”*

(Raul Seixas, Paulo Coelho, Marcelo Motta)

*Aos meus pais,
Por terem me ensinado a acreditar
No trabalho como meio de crescimento pessoal*

*Ao Rick ,
Por compreender as minhas ausências,
Pelo companheirismo e eterna cumplicidade!!*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Alfredo Tenuta Filho pela orientação de mais um trabalho.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade da realização desta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo suporte financeiro.

Aos Professores Luis Gustavo Esteves e Elisabeti Kira, do Departamento de Estatística do IME/ USP, pela assessoria estatística prestada e, principalmente, pelo interesse em entender e se fazer entender.

Ao Centro de Tecnologia de Radiações - CTRD, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, pela irradiação dos hambúrgueres. De modo especial ao Carlos e à Beth, do CTRD/IPEN, pelo profissionalismo e enorme boa vontade!

À bibliotecária Leila Aparecida Buonadio pela cuidadosa revisão bibliográfica.

Aos amigos da Secretaria de pós-graduação, Benê, Elaine e Jorge, pelo carinho e pelo tratamento "vip" dispensado em todos estes anos.

Ao Laboratório de Lípidos pela parceria nas análises de ácidos graxos, de modo especial à Rosângela, pela simpatia de sempre!

Aos professores Luis Antônio Gioielli e Anna Lúcia Villavicencio pelas inestimáveis sugestões dadas no exame de qualificação.

Ao Dr. Mário Roberto Nascimento, da Delegacia Federal de Agricultura do Estado de São Paulo, pela interseção junto às indústrias para o fornecimento das amostras.

À casa de Carnes Steak House, pela embalagem a vácuo.

À Marrie e a Vânia pela colaboração no fornecimento dos hambúrgueres.

À Perdigão Agroindustrial S.A., através do Dr. João Batista de Mendonça, pela disponibilidade e colaboração.

Ao Jorge Behrens pela condução da análise sensorial.

Aos participantes do painel sensorial, Chiu, Clarissa, Cláudia, Eduardo, Inar, Jorge "Washington", Joana, Kátia, Luciene, Mônica, Rick, Sandra e Tânia. Vocês foram realmente guerreiros! Muito obrigada pela ajuda, ela foi essencial!

À Inar, pela participação na análise sensorial, pelo auxílio no entendimento estatístico dos dados e, principalmente pela amizade. Sua chegada trouxe mais vida ao laboratório!!

À minha querida Joaninha, pela imensurável ajuda na lavagem de materiais e, principalmente, por tornar muito mais alegre e prazerosa a rotina do laboratório. Você tornava meu dia sempre muito mais feliz !!

Aos colegas de laboratório Álvaro, Cláudia, Cristiane, Luciene e Marliz, pela convivência alegre e amiga. À estagiária Renata, pela ajuda nas análises.

Às minhas queridas "abigas" Isabela Guerra e Raquel Simões que acompanharam mais de perto o tormento!! Pelo apoio nas tantas vezes que, inconsolada, quis desistir e vocês não deixaram!! Obrigada pela convivência alegre e pelo companheirismo!!

Às amigas Aline Rodrigues e Denise Mafra pelo carinho e amizade.

De modo muito especial à Sandra Emi Kitahara, pelas discussões, reflexões e leitura criteriosa deste trabalho tornando-o menos solitário. Obrigada pela companhia nas madrugadas e finais de semana, pelas inestimáveis sugestões e pela amizade!

Ao meu querido amigo Nelmon Oliveira da Costa, pelas infindáveis vezes em que sua ajuda foi decisiva para o prosseguimento de meu experimento. Uma parte deste trabalho pertence a você!!

Aos amigos e colegas de curso, pelas singelas contribuições do dia-a-dia e a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	X
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. IRRADIAÇÃO DE ALIMENTOS.....	3
2.1.1. Histórico da irradiação de alimentos.....	4
2.1.2. Legislação.....	6
2.1.3. O processo de irradiação de alimentos	8
2.2. OXIDAÇÃO DO COLESTEROL	15
2.2.1. Mecanismo da oxidação do colesterol.....	16
2.2.2. Ocorrência de óxidos de colesterol em alimentos	19
2.3. OCORRÊNCIA DE ÓXIDOS DE COLESTEROL EM ALIMENTOS IRRADIADOS	20
3. OBJETIVOS	22
3.1. OBJETIVO GERAL.....	22
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1. MATERIAIS	23
4.2. MÉTODOS.....	28
4.2.1. Determinação de umidade	28
4.2.2. Determinação de lípidos totais	28
4.2.3. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS.....	28
4.2.4. Produtos da oxidação do colesterol - COPS	29
4.2.5. Validação da metodologia.....	30
4.2.6. Análise Sensorial	33
4.2.7. Composição de ácidos graxos	36
4.2.8. Análise estatística	36

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1. EFEITOS DA APLICAÇÃO DE RADIAÇÃO IONIZANTE SOBRE A OXIDAÇÃO DO COLESTEROL	38
5.2. EFEITO DA CONDIÇÃO DE EMBALAGEM DOS HAMBÚRGUERES SOBRE A OXIDAÇÃO DO COLESTEROL.....	44
5.3. EFEITO DO TEMPO DE ESTOCAGEM DOS HAMBÚRGUERES SOBRE A OXIDAÇÃO DO COLESTEROL	48
5.4. EFEITO DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DOS HAMBÚRGUERES SOBRE A OXIDAÇÃO DO COLESTEROL	53
5.5. CORRELAÇÃO ENTRE A OXIDAÇÃO LIPÍDICA E A OXIDAÇÃO DO COLESTEROL	62
5.6. ANÁLISE SENSORIAL DOS HAMBÚRGUERES IRRADIADOS	64
6. CONCLUSÕES.....	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
8. ANEXOS.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do colesterol	16
Figura 2. Estrutura química do colesteril éster.	16
Figura 3. Principais produtos da oxidação do colesterol.	18
Figura 4. Hambúrgueres Bovino e de Frango Embalados a Vácuo e sob aerobiose.	25
Figura 5. Planejamento experimental do Hambúrguer de Frango irradiado estocado sob congelamento.	26
Figura 6. Planejamento Experimental do Hambúrguer Bovino Irradiado Estocado sob Congelamento.	27
Figura 7. Curva de calibração do teste de TBARS.	29
Figura 8. Concentração dos quatro óxidos de colesterol analisados (ppm) em hambúrgueres de carne de frango e de carne bovina segundo a dose de Irradiação (kGy).....	38
Figura 9. Concentração dos quatro óxidos de colesterol avaliados (ppm) em hambúrgueres de frango e de carne bovina em função das condições de embalagem.	44
Figura 10. Perfis médios dos fatores Irradiação e Embalagem para a variável Óxidos de Colesterol em hambúrgueres de carne bovina.	46
Figura 11. Perfis médios dos fatores Irradiação e Embalagem para a variável Óxidos de Colesterol em hambúrgueres de carne de frango	46
Figura 12. Concentração dos quatro óxidos de colesterol avaliados (ppm) em hambúrgueres de carne de frango e de carne bovina em função do tempo de estocagem (dias) sob congelamento.	49
Figura 13.. Concentração total dos quatro óxidos de colesterol avaliados segundo o tipo de hambúrguer.	58
Figura 14. Concentração total dos quatro óxidos de colesterol avaliados segundo a dose de Irradiação e tipo de carne do hambúrguer.	59
Figura 15. Concentração total dos quatro óxidos de colesterol avaliados segundo tipo de Embalagem e tipo de carne do hambúrguer	59
Figura 16. Concentração total dos quatro óxidos de colesterol avaliados segundo tempo de Estocagem e tipo de carne do hambúrguer.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Unidades de radiação e sua correspondência.	10
Tabela 2. Alimentos em que a presença de óxidos de colesterol tem sido determinada.	19
Tabela 3. Concentração/coeficiente de correlação das curvas-padrão do colesterol e óxidos.	30
Tabela 4. Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ), Precisão e Linearidade (R^2) das curvas de calibração do colesterol e 7-cetocolesterol.	31
Tabela 5. Porcentagem de recuperação de colesterol e 7-cetocolesterol adicionados ao hambúrguer	33
Tabela 6. Concentração dos quatro óxidos de colesterol avaliados em hambúrgueres de carne de frango e de carne bovina segundo a dose de Irradiação.	39
Tabela 7. TBARS (mg de malonaldeído/kg) em hambúrgueres de frango e bovino segundo a dose de Irradiação.	42
Tabela 8. Determinação de TBARS (mg de malonaldeído/kg) em hambúrgueres de frango e bovino segundo as condições de embalagem.	48
Tabela 9. TBARS (mg de malonaldeído/kg) em hambúrgueres de frango e bovino segundo o tempo de estocagem.	51
Tabela 10. Composição dos ácidos graxos de hambúrgueres de frango expressa em % de área.	54
Tabela 11. Composição de ácidos graxos dos hambúrgueres bovinos embalados sob aerobiose expressa em % de área.	55
Tabela 12. Composição de ácidos graxos dos hambúrgueres bovinos embalados sob vácuo expressa em % de área.	56
Tabela 13. Concentração de Óxidos de Colesterol (ppm) segundo tempo de Estocagem (dias) e tipo de carne do hambúrguer.	60
Tabela 14. Diferença no sabor observado entre as amostras de hambúrguer de frango irradiadas e congeladas e a amostra padrão	64
Tabela 15: Diferença no sabor observado entre as amostras de hambúrguer bovino irradiadas e congeladas e a amostra padrão	65
Tabela 16. Graus médios de diferença entre a cor das amostras de hambúrguer bovino irradiadas e congeladas e da amostra padrão, obtidos através do teste sensorial de comparação múltipla.	67

RESUMO

Várias tecnologias vêm sendo desenvolvidas com o intuito de assegurar a qualidade dos alimentos. Dentre estes processos tecnológicos, a radiação ionizante vem sendo apontada como uma alternativa viável na conservação de alimentos, principalmente produtos cárneos, por manter inalterado seu estado natural. A utilização da irradiação em hambúrgueres tem sido enfocada devido ao freqüente envolvimento deste produto em surtos de toxinfecção alimentar ocorridos principalmente nos Estados Unidos, geralmente provocados pela *E.coli* O157:H7, muitas vezes com registro de óbitos. Entretanto, a utilização de radiação ionizante neste produto pode gerar radicais livres capazes de desencadear a oxidação lipídica no tecido muscular. Como parte integrante dos lípides da membrana celular, o colesterol também está sujeito à oxidação, levando à formação de compostos biologicamente ativos, com características aterogênicas, mutagênicas, citotóxicas e cancerígenas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de produtos da oxidação do colesterol em hambúrgueres de frango e bovinos submetidos à irradiação e estocados sob congelamento em condições de aerobiose e vácuo. Os resultados obtidos demonstraram que a irradiação promoveu uma elevação, da ordem de 11%, nas concentrações de óxidos de colesterol nos hambúrgueres congelados. A estocagem levou ao aumento nos níveis de óxidos de colesterol durante todo o período, para os hambúrgueres de frango, e somente no final da estocagem para os hambúrgueres bovinos. A embalagem, individualmente, não exerceu efeito significativo sobre as concentrações de óxidos de colesterol nos dois tipos de hambúrgueres pesquisados; entretanto, apresentou interação significativa com a irradiação, em que o uso de embalagem a vácuo preveniu a formação de óxidos de colesterol nos hambúrgueres bovinos irradiados.

ABSTRACT

Several technologies have been developed to assure food quality. Among these technological processes, ionizing radiation has been described as a feasible alternative for food conservation, mainly for meat products, since it keeps their natural properties. In hamburgers, the use of irradiation has been studied due to the frequent implication of such products in outbreaks of food-borne diseases. Some of the outbreaks, which even killed consumers, were caused by *E. coli* O157:H7. But the use of ionizing radiation in hamburgers may form free radicals able to trigger lipid oxidation in the muscle tissue. As a component of the cell membrane lipids, cholesterol may also undergo oxidation and form biologically active compounds, with atherogenic, mutagenic, cytotoxic and cancerous properties. The aim of this work was to evaluate the occurrence of cholesterol oxidation products in chicken hamburgers and beef hamburgers submitted to irradiation and stored frozen, aerobically and under vacuum. The results showed that irradiation caused an increase of around 11% in the concentration of cholesterol oxides in frozen hamburgers. In chicken hamburgers, an increase in the levels of cholesterol oxides was observed all over the storage period, while in beef hamburgers it was observed only in the final part of the storage period. Packaging itself did not have a significant effect on the concentrations of cholesterol oxides in either of the types of hamburgers studied. However, it showed a significant interaction with irradiation, that is, vacuum packaging prevented the formation of cholesterol oxides in irradiated beef hamburgers.

1. INTRODUÇÃO

A busca pela conservação dos alimentos faz parte da vida diária do homem há milhares de anos. No caso das carnes e dos produtos cárneos, a preservação é particularmente importante uma vez que estes alimentos se constituem num ambiente propício para o crescimento microbiano e encontram-se sujeitos à contaminação durante sua obtenção e processamento.

Várias tecnologias foram desenvolvidas ao longo dos anos e vêm sendo empregadas com sucesso no intuito de assegurar a qualidade dos alimentos, tanto do ponto de vista de saúde pública quanto do ponto de vista industrial. Dentre estes processos tecnológicos a radiação ionizante vem sendo apontada como uma alternativa segura e eficaz na eliminação de microorganismos patogênicos em alimentos e conseqüente extensão de sua vida-de-prateleira.

Os primeiros alimentos a serem irradiados foram batatas e grãos, principalmente o trigo e a farinha de trigo, condimentos, ervas e plantas desidratadas utilizadas como temperos. Em seguida foram incluídos os vegetais frescos, frutas e as carnes, inicialmente de ave e depois as carnes vermelhas.

As doses máximas de irradiação regulamentadas pelo FDA/USDA para carnes de aves é de 3KGy enquanto para carnes vermelhas e seus subprodutos, frescos e congelados são 4,5 e 7,0 KGy, respectivamente. Estas doses visam obter o controle microbiológico dos produtos, oferecendo proteção contra microorganismos patogênicos e a extensão da sua vida-de-prateleira. No Brasil, a Resolução RDC nº 21 ANVISA/MS não determina doses mínimas e máximas permitidas para cada produto, uma vez que o estabelecimento destas é realizado em função das características de cada alimento e principalmente de seu comportamento frente à radiação.

Entretanto, o uso da irradiação em determinados alimentos, entre eles os produtos cárneos, apresenta limitações relacionadas à formação de radicais livres e possível geração de "off-flavor" no produto irradiado. Os radicais livres são compostos instáveis e altamente reativos, sendo considerados os iniciadores da oxidação lipídica em carnes. Além de contribuir para uma menor aceitabilidade da carne irradiada pelas alterações provocadas em seu sabor e odor, os produtos gerados na oxidação lipídica podem apresentar efeitos biológicos bastante deletérios. Dentre estes produtos, aqueles gerados a partir da oxidação do colesterol são particularmente importantes por apresentarem características aterogênicas, citotóxicas, mutagênicas e cancerígenas.

Por possuírem tais características, os produtos da oxidação do colesterol têm sido objeto de muitos estudos nos últimos anos. Sua formação se dá através da oxidação da molécula de colesterol, desencadeada pelos mesmos mecanismos da oxidação lipídica em geral, tais como a presença de luz, calor e metais de transição, a exposição ao oxigênio e à radiação ionizante.

Os alimentos de origem animal são as principais fontes de colesterol na dieta, sendo sua concentração variável nos diferentes tipos de produtos. O colesterol, como parte integrante da bicamada lipídica da membrana celular, está presente nos alimentos intimamente associado a outros componentes, como os fosfolipídios. A proximidade do colesterol a outros lípidos pode favorecer sua oxidação, principalmente se estiverem presentes ácidos graxos polinsaturados, que são mais facilmente oxidáveis. Desta forma, acredita-se que a utilização da radiação ionizante em tecidos musculares de diferentes espécies animais, que apresentem graus variados de insaturação lipídica, associada à exposição ao oxigênio, sejam fatores promotores da oxidação lipídica e, conseqüentemente, da oxidação do colesterol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. IRRADIAÇÃO DE ALIMENTOS

Os alimentos são itens de comércio extremamente importantes principalmente em países em desenvolvimento, que têm na agricultura o alicerce de sua economia. Estes países fornecem cerca de 30% de todo o suprimento agrícola do mundo, sendo este índice aumentado quando se considera alguns produtos tropicais específicos como chá, café e condimentos (Loaharanu, 1989). Muitos produtos são perecíveis e têm vida-de-prateleira limitada o que torna cada vez maior a necessidade de se desenvolver métodos eficazes de preservação de alimentos. A FAO calcula que 25% de toda a produção mundial de alimentos seja perdida pela ação de microorganismos, insetos, roedores e pela germinação prematura, no caso dos tubérculos (Greenberg, 1996)

A contaminação dos alimentos, especialmente aqueles de origem animal, com microorganismos, é também outro problema preocupante. O Serviço de Saúde Pública dos EUA estima que ocorram anualmente 9000 mortes e 6,5 a 81 milhões de casos de diarreia provocados por bactérias patogênicas como *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* e *Vibrio parahaemolyticus*, bem como por parasitas como *Toxoplasma gondii* e outros. As doenças de origem alimentar não são só um problema de saúde pública mas também um problema econômico devido aos gastos gerados pelas faltas ao trabalho, perda de produtividade, custos médicos e possíveis ações legais (Thakur e Singh, 1994; Farkas, 1998). Estima-se que as perdas com as intoxicações alimentares (bacterianas e parasitárias) atribuídas às carnes e produtos cárneos varie de 3,8 a 4,2 bilhões de dólares anualmente (Pszczola, 1993).

A eliminação ou redução dos microorganismos patogênicos tem sido conseguida através dos recursos tecnológicos disponíveis na indústria de alimentos: desidratação, congelamento, pasteurização, esterilização, tratamento químico, dentre outros. Os tratamentos térmicos, pelo emprego

do frio ou do calor, são os mais amplamente empregados embora algumas vezes, por razões técnicas ou econômicas, estes métodos não possam ser utilizados. Da mesma forma, os procedimentos de sanitização química, apesar de eficazes, apresentam problemas inerentes aos resíduos e à poluição ambiental, já sendo proibidos em alguns países. Nestes casos, a irradiação surge como uma alternativa viável e eficiente no tratamento de alimentos graças à segurança do processo e à simultânea redução no número de microorganismos sem comprometimento do valor nutricional do alimento (Farkas, 1998).

A irradiação permite que os produtos sejam processados na própria embalagem, como um tratamento final, eliminando a possibilidade de recontaminação até que o alimento seja removido desta. Como o processo é realizado sem elevação da temperatura dos produtos, é freqüentemente chamado de "processamento a frio" e pode ser utilizado em alimentos frescos, como as carnes, sem alterar suas características naturais (Lee et al., 1995). A irradiação tem um impacto significativo no aumento da vida-de-prateleira e na melhora da qualidade higiênica de alimentos crus e processados. Pode ser utilizada para atrasar o amadurecimento dos frutos, inibir o brotamento de tubérculos e destruir insetos e microorganismos, aumentando a disponibilidade de alimentos, as exportações e diminuindo os riscos de surtos alimentares (Thakur e Singh, 1994). A quantidade estimada de alimentos irradiados em 1990 foi de cerca de meio milhão de toneladas, volume esse considerado ainda pequeno quando comparado ao total de alimentos tratados por outros métodos (Greenberg, 1996).

2.1.1. Histórico da irradiação de alimentos

A radiação ionizante tem sido empregada com muito sucesso ao longo dos anos em diferentes ramos da indústria. A aplicação desta tecnologia em alimentos é um desafio que possui grande potencial na

melhoria da preservação, estocagem e distribuição do alimento de forma segura (Del Mastro, 1999).

A idéia de se utilizar a radiação ionizante na preservação de alimentos surgiu quase que imediatamente à descoberta da radioatividade em 1895. Neste mesmo ano, um estudo publicado em um periódico inglês sugeria o uso da energia ionizante para destruição de microorganismos deteriorantes e patogênicos em alimentos (Del Mastro, 1999).

A primeira tentativa de se utilizar a radiação para melhoria da qualidade dos alimentos aconteceu em 1905 na Inglaterra. Os pesquisadores sugeriram o tratamento de cereais e seus produtos com raios alfa, beta ou gama provenientes do rádio ou de outras substâncias radioativas. Porém, a disponibilidade destas substâncias era pequena para a demanda de alimentos a serem irradiados, inviabilizando o processo. Problema semelhante foi enfrentado por Schwartz, em 1921, quando obteve uma patente americana para utilizar raios-X na prevenção de *Trichinella spiralis* em carne suína. As máquinas de raios-X disponíveis naquela época não eram potentes o suficiente para tratar a carne suína em quantidades comercialmente viáveis (Diehl, 1990).

A moderna era das pesquisas sobre a irradiação de alimentos só começou depois da II Guerra Mundial quando um número maior de fontes ionizantes tornou-se disponível. A irradiação de alimentos tornou-se então um processo tecnicamente e comercialmente viável, estimulando o desenvolvimento de uma série de pesquisas sobre suas aplicações e segurança, iniciadas nos Estados Unidos, e posteriormente atingindo outros países como Bélgica, Canadá, França, Holanda, Polônia, Rússia, Alemanha e Inglaterra (Del Mastro, 1999). A primeira aplicação comercial da irradiação de alimentos ocorreu em 1957, na Alemanha, quando uma fábrica de temperos resolveu utilizar um gerador de elétrons para melhorar a qualidade higiênica de seus produtos (Diehl, 1990).

Apesar do sucesso obtido na melhora da qualidade e da vida-de-prateleira dos alimentos pelo emprego da irradiação, ela ainda era vista com suspeita. Em 1970, um projeto internacional foi criado com o objetivo de patrocinar programas de pesquisa mundiais sobre a salubridade de alimentos irradiados. Foram dez anos de pesquisas patrocinadas pela IAEA (International Atomic Energy Agency), FAO (Food and Agriculture Organization), OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) e WHO (World Health Organization) com participação de 24 países. Em 1980, os resultados obtidos deram subsídios para que o comitê criado por estes órgãos concluísse que a irradiação de qualquer tipo de alimento na dose de até 10 KGy não apresenta nenhum risco toxicológico para quem os consumir. Como resultado dessa declaração, vários países no mundo aprovaram a aplicação e comercialização de alimentos irradiados, sendo hoje um total de 34 países a utilizar esta tecnologia, dentre eles, o Brasil (Thakur e Singh, 1994, Giroux e Lacroix, 1998).

2.1.2. Legislação

Apenas três países da América do Sul, Brasil, Argentina e Chile, possuem legislação para irradiação de alimentos (Oliveira, 2000). O primeiro Decreto-lei estabelecendo regras básicas para a irradiação de alimentos no Brasil, data de agosto de 1973. Posteriormente, foram aprovadas pela Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos do Ministério da Saúde, a Portaria nº 09, de 08 de março de 1985 e a Portaria nº 30, de 25 setembro de 1989, regulamentando a irradiação de alimentos. Recentemente estas portarias foram revogadas pela Resolução RDC nº 21, de 26 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001). Essa resolução aprova o uso da irradiação em qualquer alimento desde que sejam observadas as seguintes condições: a dose mínima absorvida deve ser suficiente para alcançar a finalidade pretendida e a dose máxima absorvida deve ser inferior àquela que comprometa as propriedades funcionais e ou atributos sensoriais do

alimento. Todos os alimentos irradiados devem ainda possuir em seu rótulo, além dos dizeres exigidos para os alimentos em geral, a declaração: "*Alimento Tratado por Processo de Irradiação*".

A Resolução RDC nº 21 não determina doses mínimas e máximas permitidas para cada produto, uma vez que o estabelecimento destas é realizado em função das características de cada alimento e principalmente de seu comportamento frente à radiação. Em outros países, como nos Estados Unidos, as normas especificam as doses de radiação permitidas para cada tipo específico de alimento. O FDA (Food and Drug Administration) é o órgão regulador primário envolvido com a irradiação de alimentos nos Estados Unidos. A irradiação de alimentos específicos passa pelo controle do Departamento de Agricultura (USDA), como os alimentos de origem animal regulados pelo Serviço de Inspeção e Segurança Alimentar - FSIS (Food Safety and Inspection Service).

A regulamentação para a irradiação de alimentos nos EUA permaneceu por muitos anos restrita ao controle de insetos no trigo e na farinha de trigo (1963). Posteriormente, novos procedimentos foram adotados como a irradiação de condimentos, ervas e plantas desidratadas para controle de insetos e microorganismos (1983), carne suína para controle da triquinelose (1985), batatas para prevenção do brotamento e irradiação de frutas e vegetais frescos para controle de insetos e da maturação (1986). Em 1992, o FSIS aprovou o uso da irradiação em carne de ave fresca e congelada a fim de controlar microorganismos patogênicos causadores de toxinfecções alimentares e outras bactérias (FSIS, 2000).

A primeira autorização para o uso da irradiação na esterilização de alimentos ocorreu em março de 1995 quando o FDA permitiu a irradiação de carnes congeladas para ser utilizada em um Programa Espacial da NASA (National Aeronautics and Space Administration). A norma publicada em dezembro de 1997 estendeu a aprovação da irradiação para as carnes

vermelhas e os seus produtos para prevenção de patógenos causadores de toxinfecções alimentares e outras bactérias. Este procedimento foi aprovado e autorizado pelo USDA em dezembro de 1999 (Greenberg, 1996, FSIS, 2000, Souza, 2000).

O primeiro estudo utilizando a radiação ionizante em hambúrguer como método de preservação foi realizado em 1943 (Lee *et al.*, 1995). Devido ao seu freqüente envolvimento em surtos de toxinfecção alimentar em lanchonetes e escolas, nos Estados Unidos, inclusive com registros de óbitos, outros estudos têm focado a utilização desta tecnologia em hambúrguer (Roberts & Weese, 1998, Ahn *et al.*, 1998a, 1998b, Chen *et al.*, 1999). Os principais microorganismos envolvidos neste processo são a *Salmonella spp* e a *Escherichia coli* O157:H7, que são quase totalmente eliminados (cerca de 99%) com baixas doses de irradiação (Olson, 1998).

2.1.3. O processo de irradiação de alimentos

2.1.3.1. Fontes de radiação

A irradiação de alimentos consiste na exposição do alimento, já embalado ou a granel, a doses controladas de radiação ionizante, com finalidade sanitária, fitossanitária e ou tecnológica (Brasil, 2001). A radiação ionizante é capaz de remover elétrons de átomos e moléculas, transformando-os em íons e pode ser produzida por partículas carregadas energeticamente, como os elétrons ou fótons de alta energia, raios-X ou raios-gama (Diehl, 1990). Nem todos os tipos de radiação ionizante são empregados na irradiação de alimentos devido ao baixo poder de penetração (partículas alfa) ou porque induzem radioatividade no material irradiado (elétrons ou raios X de alta energia) (Diehl, 1990). As fontes de radiação mais comumente utilizadas na irradiação de alimentos são:

- raios-gama oriundos dos isótopos radioativos ^{60}Co e ^{137}Cs , com nível de energia de 5 MeV,
- raios X gerados por máquinas, com nível de energia de 5 MeV,
- máquinas geradoras de elétrons, com nível de energia de 10 MeV.

Os raios-X e raios-gama são idênticos em suas propriedades físicas e em seus efeitos na matéria, diferindo apenas na sua origem, sendo que os raios-X são produzidos por máquinas e os raios-gama por isótopos radioativos. Estes últimos são compostos instáveis que para se estabilizar emitem radiações na forma de partículas alfa, partículas beta, raios-gama e/ou nêutrons.

Dentre as fontes de radiação citadas, os raios-gama oriundos do ^{60}Co são mais amplamente empregados na área de alimentos devido ao seu alto poder de penetração, "design" simples e distribuição mais uniforme da dose (Thakur e Singh, 1994). O fator limitante quanto ao uso deste radioisótopo seria sua oferta no mercado, que é bastante limitada e praticamente de monopólio de uma única empresa sediada no Canadá. O ^{60}Co é produzido pelo bombardeamento de nêutrons do ^{59}Co , não isotópico (Lagunas-Solar, 1995) e durante seu decaimento dá origem ao ^{60}Ni .

2.1.3.2. Conceitos

A taxa de decaimento radioativo de um isótopo é medido pela sua *meia-vida*, definida como o tempo requerido para desintegração de metade dos átomos de um dado isótopo. No caso do ^{60}Co , a meia-vida é de 5,2 anos e a energia máxima dos raios-gama produzidos é de 1,33 MeV - milhões de elétrons volts (Lagunas-Solas, 1995).

A quantidade de energia absorvida pela massa do material exposto à radiação ionizante é chamada *dose absorvida* ou *dose D*. A unidade (SI)

para a dose de irradiação é Gray (Gy) que é igual à absorção de 1 joule por quilograma de material. Anteriormente a unidade utilizada era rad que equivale a 0,01Gy (Tabela 1).

A energia absorvida por unidade de tempo é chamada *taxa de dose*. As fontes de radiação gama fornecem uma taxa de dose relativamente baixa (dezenas de KGy/hora) enquanto aceleradores de elétrons provêem uma alta taxa de dose (dezenas de KGy/segundo). Como consequência, para se atingir uma dose absorvida específica, a irradiação com uma fonte de raios gama pode levar muitas horas enquanto com um acelerador de elétrons levaria poucos minutos ou segundos (Diehl, 1990).

Tabela 1. Unidades de radiação e sua correspondência.

Unidades de radiação
1 rad = 100 erg/g
1 rad = 0,01 Gy
1 Krad = 10 Gy
1 Mrad = 10 KGy
1Gy = 1J/Kg
1 Gy = 100 rads

Na irradiação de alimentos podem ser utilizados três níveis diferentes de doses, dependendo do objetivo que se pretende atingir com o processo de irradiação. Nas aplicações com doses baixas, de até 1KGy, objetiva-se a inibição do brotamento de tubérculos, a desinfestação de insetos e o tratamento quarentenário, em substituição aos fumigantes químicos. Com o uso de doses médias, de 1 a 10KGy consegue-se a redução na população microbiana patogênica e deteriorante não formadora de esporos. Já com a aplicação de doses elevadas, de 10 a 45 KGy, promove-se a destruição de

patógenos formadores de esporos e obtém-se um grau de conservação similar ao conseguido pelo processo de esterilização comercial.

O emprego da irradiação na conservação dos alimentos recebe, por alguns autores, uma terminologia própria utilizando os conceitos de radurização, radicidação e radapertização. A *radurização* tem por objetivo a extensão da vida-de-prateleira do produto com redução dos microorganismos que compõem a flora deteriorante do alimento. Na *radicidação*, os alimentos são expostos a doses de radiação suficientes para destruição de microorganismos patogênicos não formadores de esporos. E, por fim, a *radapertização* visa conseguir uma redução do número de microorganismos a níveis extremamente baixos, promovendo a esterilização do alimento (Dempster, 1985, Thakur e Singh, 1994).

Muitas hipóteses têm sido propostas e testadas para explicar o mecanismo de ação da radiação ionizante. Quando a radiação ionizante é absorvida pelo material biológico, sua ação poderá se manifestar de forma direta ou indireta. O efeito direto ocorre quando a radiação ionizante age diretamente sobre a célula, provocando alterações na parede celular, no metabolismo energético ou na composição do DNA celular (Urbain, 1986). A ionização ou excitação da molécula de ácido nucléico inicia uma cadeia de eventos que culminam na incapacidade de reprodução e, conseqüentemente, na morte celular. Este tipo de efeito é dominante na irradiação de esporos, que possuem baixa umidade. Já o efeito indireto, mais comum em células vegetativas e citoplasmas celulares com mais de 80% de água, acontece pela interação da radiação com outros átomos ou moléculas da célula, particularmente água, produzindo radicais livres que se difundem facilmente pela célula provocando danos (Diehl, 1990).

2.1.3.3. Efeitos da irradiação sobre a fração lipídica

O mecanismo de ação da radiação ionizante se deve a efeitos primários e secundários resultantes da interação com átomos e moléculas dos alimentos e dos organismos presentes no alimento.

Os efeitos primários resultam da absorção da energia de radiação pelo alimento. Esta transferência de energia causa a expulsão de elétrons levando à ionização ou excitação de átomos do meio. Os efeitos primários são inespecíficos e podem atingir qualquer molécula que está no caminho da radiação. Em moléculas grandes, as partes que têm maior variação na densidade de elétrons ou onde as ligações são mais fracas são os pontos mais prováveis de se ter uma maior absorção de energia, seja ela originada pela irradiação ou pelo calor. Dessa forma, a irradiação e o processamento térmico de alimentos causam quebras de ligações nas mesmas posições da molécula, gerando produtos de degradação semelhantes (Thakur e Singh, 1994).

Radicais livres, elétrons e cátions produzidos pelos efeitos primários da radiação são altamente reativos. A velocidade de reação depende da liberdade de difusão destas espécies através do meio. Em sólidos secos ou alimentos congelados a difusão é muito restrita e os radicais livres permanecem encarcerados no meio por um determinado período. Com a absorção de umidade ou descongelamento, os radicais iniciam a movimentação e as reações entre si ou com os demais componentes alimentares. Este processo, chamado radiólise, culmina com a formação de compostos finais estáveis no alimento, conhecidos como produtos radiolíticos (Thakur e Singh, 1994).

A formação dos radicais livres é o evento de maior relevância no processo radiolítico e o reconhecimento do fato de que as reações geradas por estes compostos são responsáveis pelas mudanças químicas ocorridas

durante a irradiação de alimentos gerou muito interesse no estudo da natureza e quantidade de radicais produzidos em alimentos complexos e componentes alimentares (Nawar, 1983).

Muitas reações induzidas pela radiação continuam a acontecer durante a estocagem dos alimentos irradiados. Como resultado, alguns compostos ausentes ou presentes em concentrações muito baixas imediatamente após a irradiação, poderão estar em concentrações mais elevadas depois de horas ou dias de estocagem. A importância tecnológica e nutricional desses efeitos dependerá da dose de radiação, composição do alimento e condições de estocagem quanto à atmosfera e temperatura utilizadas (Thakur e Singh, 1994).

A interação da radiação ionizante com ácidos graxos, triglicerídeos e alimentos ricos em gordura tem sido estudada intensivamente por mais de vinte anos (Maerker e Jones, 1991). Íons e moléculas excitadas são as primeiras espécies formadas quando a radiação ionizante é absorvida pelo material lipídico. Os radicais livres formados pela dissociação destas moléculas excitadas ou pela reação entre os íons podem combinar entre si nas regiões de alta concentração de radicais, ou podem difundir no meio e reagir com outras moléculas, originando uma grande variedade de compostos como hidrocarbonetos, aldeídos, lactonas, cetonas e outros produtos voláteis (Nawar, 1983; Maerker e Jones, 1991).

A exposição de gorduras à radiação de alta energia e subsequente estocagem na presença de oxigênio aceleram o processo autoxidativo provavelmente por provocar a quebra de hidroperóxidos, a destruição de antioxidantes e uma maior formação de radicais livres que podem combinar com o oxigênio. A irradiação na ausência de condições autoxidativas causa ionização seguida de ruptura preferencial de certos pontos da molécula lipídica (Nawar, 1983).

Nos lipídeos, as reações induzidas pela irradiação seguem caminhos preferenciais fortemente influenciados pela estrutura molecular. Na molécula de triglicéride, a quebra radiolítica ocorrerá preferencialmente nas posições adjacentes ao grupo carbonila e, ocasionalmente, em todas as ligações carbono-carbono remanescentes no ácido graxo. Outros mecanismos podem ainda estar envolvidos na radiólise das gorduras, em particular, reações de polimerização, isomerização e ciclização resultantes da insaturação da molécula de glicerídeo (Nawar, 1983). Além disso, outras mudanças químicas podem ocorrer com componentes não lipídicos levando às interações entre as várias frações ou seus produtos de decomposição dando maior complexidade ao padrão radiolítico (Nawar, 1983).

Produtos radiolíticos podem causar oxidação da mioglobina e da gordura levando à descoloração, rancidez e conseqüente comprometimento do sabor e odor do alimento. O ozônio, um destes compostos, é produzido a partir do oxigênio durante a irradiação e é capaz de oxidar a mioglobina causando um branqueamento da carne (Olson, 1998). Um estudo desenvolvido por Lefebvre *et al* (1994) demonstrou que o congelamento e o emprego de embalagem a vácuo ou atmosfera modificada podem reduzir a produção de compostos radiolíticos, minimizando, conseqüentemente, as alterações de cor, odor e sabor provocados pela irradiação. O mesmo foi confirmado por Olson (1998) que afirmou que a irradiação de alimentos em doses apropriadas e sob certas condições como congelamento e embalagens á vácuo ou com oxigênio reduzido podem minimizar ou evitar o desenvolvimento de características sensoriais indesejáveis.

2.2. OXIDAÇÃO DO COLESTEROL

Os óxidos de colesterol são esteróis similares em estrutura ao colesterol, contendo um grupo adicional que pode ser uma hidroxila, cetona ou epóxido, ligado ao núcleo esterol ou um grupo hidroxila ligado à cadeia lateral. Podem ser formados no próprio organismo, através de processos oxidativos endógenos, ou estar presentes nos alimentos.

Mais de 80 óxidos de colesterol, alguns compostos voláteis e o peróxido de hidrogênio já foram identificados como produtos da oxidação do colesterol (Tai *et al.*, 1999) entretanto, os estudos em alimentos envolvem geralmente o mesmo grupo de óxidos: 7 α - e o 7 β - hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol, 25-hidroxicolesterol, colestanoltriol, 5,6 α - e o 5,6 β -epóxidos (Kim e Nawar, 1991; Chen e Chen, 1994; Park *et al.*, 1996).

Vários estudos têm sido desenvolvidos a fim de elucidar as conseqüências toxicológicas da presença dos óxidos de colesterol no organismo. Autores como Smith e Johnson (1989), Kumar e Singhal (1991), Bösjinger *et al.* (1993), Guardiola *et al.* (1996), Linseisen e Wolfram (1998) e Morales-Aizpurua e Tenuta-Filho (2002) reuniram os estudos referentes aos efeitos biológicos dos óxidos de colesterol publicados nas três últimas décadas. Existem evidências da participação dos óxidos de colesterol em vários processos, caracterizando-os como citotóxicos (Ohtani *et al.*, 1996; 1997), mutagênicos (Sevanian e Peterson, 1986), aterogênicos (Peng *et al.*, 1991) e cancerígenos (Kendall *et al.*, 1992). Embora a implicação destes óxidos com o câncer seja um fator bastante alarmante, é o envolvimento na aterosclerose humana que domina a literatura.

2.2.1. Mecanismo da oxidação do colesterol

A estrutura química do colesterol (Figura 1) é composta por um núcleo policíclico com quatro anéis ligados (A, B, C e D), uma cadeia lateral hidrocarbônica ramificada ligada ao C-17 do anel D, um grupo hidroxila β -orientado ligado ao C-3 do anel A, e uma dupla ligação entre o C-5 e o C-6 do anel B. Uma parte do colesterol presente nos alimentos encontra-se esterificada, isto é, o grupo hidroxila que se projeta do C-3 é ligado a um resíduo de ácido graxo através de uma ligação éster (Figura 2). De relevância para a autooxidação são a insaturação do anel B e a presença de dois carbonos terciários na cadeia lateral, o C-20 e o C-25 (Maerker, 1987).

Figura 1. Estrutura química do colesterol.

Figura 2. Estrutura química do colesterol éster.

O colesterol, bem como os demais esteróis, pode ser oxidado pelas vias enzimática e não-enzimática. A enzimática ocorre no organismo vivo,

predominantemente no fígado e nos tecidos geradores de hormônios esteróides. Dentre os mecanismos de oxidação não-enzimática, a autooxidação é a mais amplamente estudada e a de maior relevância em alimentos. Os produtos formados durante a autooxidação, muitas vezes são exatamente os mesmos produzidos pela oxidação enzimática, dada a semelhança entre estes dois processos e a coincidência dos sítios de oxidação (Smith, 1990).

O mecanismo de iniciação da oxidação do colesterol ainda é obscuro, mas parece estar ligado à formação de um radical no carbono alílico C-7 (Figura 3), produzido pela ação de outro radical ou por radiação ionizante (Maerker, 1987; Smith, 1990). Este radical reage com uma molécula de oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$) gerando o radical peroxila que, pela fixação de um hidrogênio, se estabiliza produzindo as formas epiméricas 7α - e 7β -colesterol hidroperóxido. Os dois epímeros inicialmente se encontram em equilíbrio, mas a forma β é termodinamicamente mais estável que a α e a interconversão ocorre facilmente. A decomposição térmica dos 7-hidroperóxidos produz o 7α - e 7β -hidroxicolesterol e o 7-cetocolesterol que, por desidratação, forma o colest-3,5-dieno-7-ona. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os hidroperóxidos produzidos ao longo do processo oxidativo, atuam como oxidantes do colesterol, produzindo 5,6 epóxidos de colesterol, com a forma β predominando. A hidratação dos epóxidos produz o colestanoltriol que ainda pode ser oxidado a 3 β ,5-di-hidroxi-5 α -colestano-6-ona (Smith, 1987; 1990).

Em adição à autooxidação, existem outros dois mecanismos de oxidação não-enzimática, a peroxidação lipídica e a oxidação fotoquímica. A peroxidação lipídica é de muita importância na oxidação do colesterol em alimentos e implica na presença de ácidos graxos insaturados que serão oxidados previamente. O processo difere da autooxidação basicamente na sua iniciação, que está vinculada à formação de radicais hidroperóxidos ou peróxidos cíclicos oriundos da oxidação lipídica catalisada por enzimas.

Esses radicais desencadeiam a oxidação do colesterol gerando os mesmos produtos da autooxidação do anel B (7α - e 7β -hidróxidos, $5,6\alpha$ - e $5,6\beta$ -epóxidos, 7-cetocolesterol e colestanoltriol).

A oxidação fotoquímica ocorre quando o colesterol é exposto à luz na presença de oxigênio, levando à formação do oxigênio singlete (1O_2), espécie eletronicamente excitada, gerada a partir do oxigênio molecular triplete (3O_2). São formados hidroperóxidos que iniciam o processo oxidativo do colesterol (Smith, 1990).

Figura 3. Principais produtos da oxidação do colesterol.

2.2.2. Ocorrência de óxidos de colesterol em alimentos

O colesterol encontra-se amplamente distribuído nos alimentos de origem animal. Dentre estes, aqueles que possuem maiores concentrações de colesterol, como os ovos, a maioria das carnes, derivados lácteos como a manteiga e alguns tipos de queijo serão conseqüentemente os mais propensos à formação de óxidos, por isso têm sido freqüentemente estudados (Tabela 2).

Outros fatores como a presença de pró-oxidantes e antioxidantes, tipo e condições de processamento a que será submetido o alimento e a sua composição lipídica, também irão determinar a taxa de formação de óxidos de colesterol (Morgan e Armstrong, 1992; Rankin e Pike, 1993).

Tabela 2. Alimentos em que a presença de óxidos de colesterol tem sido determinada.

Produto		Referências
Produtos lácteos	Finocchiaro <i>et al.</i> , 1984 Pie <i>et al.</i> , 1990	Rose-Sallin <i>et al.</i> , 1995 Nielsen <i>et al.</i> , 1996a,
Ovos	Lebovics e Gaal, 1992 Morgan & Armstrong, 1992	Guardiola <i>et al.</i> , 1995b, 1997 Zunin, 1995
Carnes e derivados	De Vore, 1988 Csallany <i>et al.</i> , 1989 Zubillaga e Maerker, 1991	Pie <i>et al.</i> , 1991 Careri <i>et al.</i> , 1998 Vestergaard e Parolari, 1999
Alimentos irradiados	Lebovics e Gaal, 1992 Hwang e Maerker, 1993a Hwang e Maerker, 1993b	Lebovics e Gaal, 1994 Lee <i>et al.</i> , 2000 Ahn <i>et al.</i> , 2001
Pescado	Chen e Yen, 1994 Ohshima <i>et al.</i> , 1996	Shozen <i>et al.</i> , 1995; Moura e Tenuta-Filho, 2002

2.3. OCORRÊNCIA DE ÓXIDOS DE COLESTEROL EM ALIMENTOS IRRADIADOS

A exposição à luz normal, à luz ultravioleta ou à radiação gama podem iniciar a formação de óxidos de colesterol em alimentos (Paniangvait *et al.*, 1995). Estudos realizados em carnes demonstraram que a irradiação promoveu a formação de óxidos de colesterol, principalmente ao longo da estocagem, onde as concentrações destes compostos foram significativamente maiores em relação às carnes não irradiadas. Hwang e Maerker (1993a) obtiveram tais resultados quando analisaram carne bovina e suína frescas irradiadas com a dose de 10 KGy. Lee *et al.* (1999 a e b) também submeteram carne bovina e suína frescas à irradiação, porém utilizando doses mais baixas, 1 e 2 KGy. Eles avaliaram o tempo de estocagem sob refrigeração (0, 7 e 14 dias) e o uso de embalagem a vácuo. Os resultados demonstraram que as concentrações de óxidos de colesterol aumentaram em função do tempo de estocagem e da dose de irradiação. Além disso, as amostras embaladas a vácuo apresentaram menor produção de óxidos em relação às embaladas sob aerobiose.

Em estudo posterior, este mesmo grupo de pesquisadores, Lee *et al.* (2000), investigaram o efeito da irradiação sobre a oxidação do colesterol em carne de frango crua e cozida em diferentes embalagens e tempos de estocagem. Os resultados demonstraram que durante a estocagem, as mudanças oxidativas do colesterol em carne cozida foram mais rápidas do que em carne crua, devendo esta ser embalada a vácuo o mais rápido possível depois do cozimento, a fim de reduzir a oxidação do colesterol. Eles observaram ainda que a produção de óxidos de colesterol se processava de maneira diferente frente à radiação ionizante e às condições de estocagem. Desta forma, a carne crua, ao ser embalada a vácuo, não apresentou 7 α -hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol, presentes na carne embalada sob atmosfera de oxigênio. Já o 7 β -epóxido colesterol não sofreu influência da irradiação e sim do tempo de estocagem, sendo encontrado tanto na carne

irradiada quanto na não irradiada depois de 14 dias de estocagem. Outro óxido, o 7 β -hidroxicolesterol, foi encontrado em maiores concentrações em todas as amostras irradiadas em relação ao controle não irradiado, indicando que a irradiação tem um efeito promotor em sua formação. Estes resultados são extremamente interessantes por sugerirem um padrão oxidativo para o colesterol em função das condições de processamento e do ambiente a que o alimento é exposto.

A importância das condições de estocagem foram também avaliadas por Ahn e colaboradores (1998a). Eles observaram que as condições de embalagem e estocagem da carne crua depois da irradiação foram mais importantes do que a própria irradiação no processo de oxidação lipídica da carne. Em estudo mais recente, Ahn *et al* (2001) avaliaram estes mesmos parâmetros em diferentes tipos musculares. Eles concluíram que a composição da gordura nas carnes tem uma grande importância na oxidação de lípidos e na oxidação do colesterol e reafirmaram que a embalagem da carne cozida teve maior importância na formação de óxidos de colesterol e na oxidação lipídica do que o próprio processo de irradiação.

Os óxidos de colesterol produzidos pela irradiação são basicamente os mesmos formados durante o processo de autooxidação do colesterol (Lebovics e Gaal, 1992) porém alguns pesquisadores observaram que a proporção em que estes óxidos acontecem em alimentos irradiados é diferente dos processos oxidativos naturais (Hwang e Maerker, 1993a e b). Chegou-se a sugerir que estas proporções pouco usuais pudessem ser utilizadas como um parâmetro para se identificar um produto irradiado, porém a falta de similaridade apresentada pelo colesterol em sistemas complexos como os alimentos, não permitiu que uma conclusão fosse tirada a este respeito (Hwang e Maerker, 1993a, Paniangvait *et al*, 1995).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar a ocorrência de produtos da oxidação do colesterol em hambúrgueres submetidos à irradiação e à estocagem sob congelamento.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o efeito da irradiação sobre a formação de óxidos de colesterol em hambúrgueres bovino e de frango congelados;
- ✓ Avaliar o efeito da presença ou ausência de oxigênio sobre a formação de óxidos de colesterol em hambúrgueres bovino e de frango congelados;
- ✓ Avaliar o efeito do tempo de estocagem sob congelamento sobre a concentração de óxidos de colesterol em hambúrgueres bovino e de frango;
- ✓ Avaliar o efeito da composição lipídica sobre a formação de óxidos de colesterol em hambúrgueres bovino e de frango congelados;
- ✓ Estabelecer correlação entre a formação de óxidos de colesterol e a oxidação lipídica, medida pela determinação de TBARS.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

❖ Matéria-prima

Foram utilizados hambúrgueres de carne de frango e de carne bovina obtidos junto a uma indústria processadora de produtos cárneos. Foram adquiridos 3 lotes diferentes para análise em replicata. Cada lote era composto por 120 unidades do hambúrguer de frango e 150 unidades do bovino. Os hambúrgueres de frango foram elaborados com carne de peito e de coxa, sem pele, recebendo ao final do processo uma cobertura para empanamento. Os hambúrgueres bovinos foram confeccionados exclusivamente com carne bovina (cerca de 80% de carne de dianteiro resfriada e 20% de ponta-de-agulha congelada) sem a adição de nenhum tipo de condimento ou aditivo. Todos os hambúrgueres utilizados no estudo eram recém fabricados, com no máximo 3 dias de fabricação.

A irradiação dos hambúrgueres foi realizada no Centro de Tecnologia de Radiações – CTRD, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, utilizando um irradiador de Cobalto 60 Modelo Gammacell 220 (Atomic Energy of Canada Limited – AECL, Ottawa, Canadá). Os hambúrgueres de frango foram irradiados na dose de 3,0KGy e os hambúrgueres bovinos nas doses de 3,0 e 7,0KGy. A taxa de dose era de $5,72 \pm 1,72$ KGy por hora e a distribuição da dose foi monitorada pelo acompanhamento dosimétrico, utilizando Dosímetro Amber 3042 Batch H, que demonstrou oscilação de cerca de 10% em torno da dose solicitada.

Inicialmente as amostras foram divididas em dois grupos. Metade dos hambúrgueres foi mantida sob aerobiose em embalagens de polietileno permeáveis ao oxigênio e a outra metade foi mantida sob vácuo (Figura 4), em filmes de polietileno de alta barreira ao oxigênio (permeabilidade ao oxigênio de $10 \text{ cm}^3/\text{m}^2/\text{dia}$ a 25°C com 0% UR). Durante a aquisição na

indústria, transporte, embalagem e irradiação os hambúrgueres foram mantidos sob congelamento, sendo utilizados para isso freezer ou caixa isotérmica com gelo, de acordo com a disponibilidade. Cada grupo de hambúrguer, vácuo e oxigênio, foi posteriormente subdividido em outros dois grupos, controle e irradiado, no caso de hambúrguer de frango e em três grupos; controle, irradiado com dose de 3KGy e irradiado com dose de 7KGy, no caso de hambúrguer bovino. A partir daí, todos os hambúrgueres foram então submetidos à estocagem sob congelamento.

A estocagem foi conduzida em freezer a -18°C por 4 meses, que corresponde à vida-de-prateleira do produto. As determinações de lípidos totais, umidade, TBARS, colesterol e óxidos de colesterol foram realizadas no dia zero, que correspondia ao dia seguinte à irradiação, e nos dias 60 e 120, que correspondiam à metade e ao final da estocagem, respectivamente (Figura 5 e 6). Em cada momento da estocagem, os hambúrgueres foram descongelados sob temperatura ambiente e em seguida triturados até a formação de uma massa homogênea, de onde eram retiradas alíquotas para as análises físico-químicas. No caso do hambúrguer de frango, a cobertura foi retirada previamente à trituração. Todas as análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos como média $\pm$ desvio-padrão.

❖ Reagentes

O hexano (Aldrich-110-54-3) e o isopropanol (Sigma-Aldrich 67-63-0) utilizados foram de grau HPLC e os demais reagentes de grau ACS. O colest-5-ene-3 β -ol (colesterol - C8667), o 3 β -hidroxicolest-5-ene-7-one (7-cetocolesterol - C2394) e o 3 β -hidroxy-5 α -cholestan-6-one (6-cetocolesterol - K1250) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. O colest-5-ene-3 β , 7 β -diol (7 α -hidroxicolesterol - C6420), o colest-5-ene-3 β , 7 β -diol (7 β -hidroxicolesterol - C6430) e o colest-5-ene-3 β , 25-diol (25-hidroxicolesterol - C6510) foram adquiridos da Steraloids - Inc.

Figura 4. Hambúrgueres de Carne de Frango e de Carne Bovina Embalados a Vácuo e sob Aerobiose.

Figura 5. Planejamento experimental do Hambúrguer de Frango irradiado estocado sob congelamento.

Figura 6. Planejamento Experimental do Hambúrguer Bovino Irradiado Estocado sob Congelamento.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Determinação de umidade

Baseada na perda de peso da amostra submetida a aquecimento em estufa, a 105°C (Pregnotatto e Pregnotatto, 1985).

4.2.2. Determinação de lípides totais

Com base na extração lipídica com clorofórmio/metanol e quantificação gravimétrica (Folch *et al.*, 1957).

4.2.3. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS

Realizada segundo Vyncke (1970), tendo por base a reação entre o ácido tiobarbitúrico e as diversas substâncias resultantes da oxidação lipídica, sendo o malonaldeído o principal produto. A curva de calibração (Figura 7) foi construída utilizando-se o TEP (tetraetoxipropano) como padrão e os resultados foram expressos em mg de malonaldeído / kg de amostra.

Figura 7. Curva de calibração do teste de TBARS.

4.2.4. Produtos da oxidação do colesterol - COPS

Foram determinados quatro produtos da oxidação do colesterol: 7α -hidroxicolesterol (colest-5-ene- 3β , 7β -diol), 7β -hidroxicolesterol (colest-5-ene- 3β , 7β -diol), 7-cetocolesterol (3β -hidroxicolest-5-ene-7-one) e o 25-hidroxicolesterol (colest-5-ene- 3β , 25-diol); além do próprio colesterol. Os resultados foram expressos como total de óxidos de colesterol e correspondem ao somatório dos quatro compostos pesquisados: 7α - e 7β -hidroxicolesterol, 7 cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol.

O procedimento de extração lipídica foi realizado segundo Folch *et al.* (1957) seguida da saponificação fria segundo a metodologia padronizada por Chen e Chen (1994). Após a saponificação, seguiu-se a injeção no HPLC.

Foram empregadas as mesmas condições de análise de Csallany *et al.* (1989), utilizando um sistema de HPLC Shimadzu, modelo SCL-10A_{VP},

equipado com detetor de fotodiodos SPD-M10A_{VP}, sistema de bombas LC-10AD_{VP} e injetor automático de amostras SIL-10AD_{VP}. A análise foi conduzida em coluna de sílica, μ -Porasil 30 x 0,39 cm (Waters Associates), com diâmetro de poro de 10 μ m, em fase normal. A fase móvel foi hexano-isopropanol, com fluxo de 1ml/min. A leitura do 7-cetocolesterol foi realizada a 233nm e a do colesterol e dos demais óxidos a 206nm.

A identificação dos picos de colesterol e dos óxidos foi realizada pela comparação dos tempos de retenção da amostra em relação aos padrões correspondentes. A quantificação foi feita por padronização externa e a faixa de concentração em que foram construídas as curvas, bem como o coeficiente de correlação obtido estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Concentração/coeficiente de correlação das curvas-padrão do colesterol e óxidos.

Composto	Faixa de concentração	Coeficiente de Correlação
Colesterol	5,0 - 25,0 ug	0,99
7-Cetocolesterol	0,2 - 0,8 ug	0,99
7α-Hidroxicolesterol	0,4 - 1,6 ug	0,99
7β-Hidroxicolesterol	0,4 - 1,6 ug	0,99
25-Hidroxicolesterol	0,1 - 0,5 ug	0,99

4.2.5. Validação da metodologia

Para validação da metodologia foram utilizados os seguintes parâmetros: precisão, recuperação, limite de detecção, limite de quantificação e linearidade da curva de calibração.

❖ Precisão

A precisão descreve o grau no qual um dado gerado pela replicata ou medida repetitiva difere uma da outra. Foi calculada a partir de medidas repetidas de uma mesma amostra. O resultado obtido indicou uma dispersão de 2 a 4% em torno da média.

❖ Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) é definido como o nível de concentração mais baixo que pode ser detectado sendo estatisticamente diferente do branco. Para tanto foram realizadas integrações do "ruído" de 10 leituras do branco, utilizando-se o valor de três vezes o desvio padrão, conforme Keith, *et al* (1983) e Long e Winefordner (1983). O valor encontrado para o LD (Tabela 4) demonstra uma sensibilidade adequada do método utilizado nas análises de colesterol e 7-cetocolesterol.

Tabela 4. Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ), Precisão e Linearidade (R^2) das curvas de calibração do colesterol e 7-cetocolesterol

Padrão	LD (g)	LQ (g)	Precisão*	R^2
Colesterol	$1,09 \times 10^{-8}$	$3,62 \times 10^{-8}$	$9,87 \pm 0,25$ (2,5%)	0,98
7-Cetocolesterol	$2,02 \times 10^{-9}$	$6,73 \times 10^{-9}$	$0,036 \pm 0,002$ (4,8%)	0,99

* Média $\pm$ DP (CV) - Colesterol (5 - 40 $\mu\text{g/g}$) e 7-cetocolesterol (0,2 - 1,2 $\mu\text{g/g}$)

❖ Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) é definido como o nível acima do qual resultados quantitativos podem ser obtidos com um certo grau de confiança. O LQ foi calculado como sendo 10 vezes o valor do desvio padrão, de

acordo com Keith, *et al* (1983) e Long e Winefordner (1983). O LQ obtido (Tabela 4) também demonstra uma sensibilidade adequada do método utilizado nas análises de colesterol e 7-cetocolesterol.

❖ Linearidade da Curva de Calibração

O intervalo de linearidade foi verificado através do coeficiente de correlação da curva de calibração. A curva foi construída pelo método de análise de regressão linear dos valores de absorbância (área do pico) das diluições sucessivas de soluções padrão. As concentrações utilizadas foram 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{g/L}$ para o colesterol e 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 $\mu\text{g/L}$ para o 7-cetocolesterol.

Os coeficientes de correlação obtidos para o colesterol e 7-cetocolesterol demonstram uma boa linearidade das curvas nos intervalos estudados (Tabela 4).

❖ Recuperação

Para o cálculo da taxa de recuperação foi utilizado o método de adição de padrão (10 μg para o colesterol e 2 μg para o 7-cetocolesterol) (Keith, *et al*, 1983). A recuperação obtida para o colesterol foi bastante satisfatória, já para o 7-cetocolesterol ela foi mais baixa do que o esperado (Tabela 5). A metodologia foi avaliada e revista, etapa por etapa, a fim de se identificar em qual momento o 7-cetocolesterol poderia estar sendo perdido. Entretanto, uma vez que quase a totalidade do colesterol adicionado foi recuperado, não temos motivo para suspeitar que esta perda ocorra em detrimento de alguma falha no método proposto e sim de uma característica particular ao 7-cetocolesterol. Acredita-se que uma possível justificativa seja a maior sensibilidade do 7-cetocolesterol à hidrólise alcalina que, associado ao fato dele ser adicionado puro na amostra, faz com que se torne mais vulnerável à ação da base, justificando sua perda no processo de

recuperação. Como no alimento o 7-cetocolesterol encontra-se associado a outros compostos, acredita-se que a ação da base seja atenuada, prevenindo sua perda.

Tabela 5. Porcentagem de recuperação de colesterol e 7-cetocolesterol adicionados ao hambúrguer

	Média ± DP	CV	n
Colesterol (%)	99,6 ± 6,6	6,6	8
7-Cetocolesterol (%)	72,1 ± 4,1	5,6	9

DP = Desvio-padrão; CV = coeficiente de variação, n= número de amostras

4.2.6. Análise Sensorial

Com o objetivo de avaliar as alterações provocadas no sabor dos hambúrgueres, em função da estocagem e da irradiação, foi utilizado o teste sensorial de comparação múltipla, também conhecido como teste de diferença do controle (Stone e Sidel, 1993). A análise sensorial foi realizada durante os quatro meses de estocagem, em intervalos bimestrais, sempre em paralelo às análises físico-químicas com a expectativa de se pesquisar uma eventual correspondência entre as alterações de origem química e as alterações sensoriais. Para realização destas análises, o projeto foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, obtendo autorização (Anexo1)

A realização do teste de comparação múltipla foi conduzida com uma equipe composta de 15 provadores entre estudantes e funcionários da FCF/USP. Esta equipe foi selecionada e treinada para verbalizar as sensações, trabalhar em grupo e demonstrar reprodutibilidade nas degustações. A seleção dos provadores se deu através de testes sensoriais de reconhecimento de gostos básicos (Anexo 2) e reconhecimento de odores (Anexo 3) (Meilgaard et al, 1987). Os provadores foram treinados

para reconhecer o gosto de “ranço”, atributo mais comumente associado ao processo de irradiação de carnes. No caso do hambúrguer bovino, foi realizado também testes para verificação de alterações de cor. Cada participante preencheu uma ficha de cadastro contendo um termo de responsabilidade (Anexo 4)

O teste de comparação múltipla teve por objetivo verificar se existe diferença entre o sabor das amostras de hambúrguer irradiadas e congeladas e uma amostra padrão (ou controle) recém processada (fresca). Em seguida, usando-se este teste avaliou-se, através de uma escala, o grau da diferença de sabor entre a amostra padrão e as demais amostras.

Nas avaliações sensoriais os provadores receberam uma amostra padrão (P) e cinco amostras codificadas de hambúrguer de frango, compostas pelas quatro amostras avaliadas:

- oxigênio controle,
- oxigênio irradiado com dose de 3KGy
- vácuo controle;
- vácuo irradiado com dose de 3KGy

e uma quinta amostra que era igual à amostra padrão. Esta última tinha por objetivo avaliar a capacidade do provador ser repetitivo em sua avaliação.

Da mesma forma, no hambúrguer bovino, foram fornecidas duas amostras-padrão (P) e as seis amostras-teste:

- oxigênio controle;
- oxigênio com dose de 3KGy;
- oxigênio com dose de 7KGy;
- vácuo controle;

- vácuo com dose de 3KGy e
- vácuo com dose de 7KGy.

Os indivíduos provaram as amostras, comparando-as uma a uma com o padrão, e indicaram o grau de diferença entre cada amostra e o padrão, usando uma escala numérica de sete pontos (Anexo 5), com termos de intensidade ancorados em seus extremos, sendo zero, nenhuma diferença e sete, extremamente diferente.

❖ Preparação dos hambúrgueres

Para a realização dos testes sensoriais, os hambúrgueres de frango foram submetidos ao processo de fritura por imersão. Esta foi realizada sem a adição de condimento, em óleo de soja, a 180°C, por 4 minutos, empregando fritadeira elétrica Moulinex T49, com tempo e temperatura programáveis. O processamento foi conduzido sem a reutilização do óleo. Os hambúrgueres bovinos foram grelhados em chapa elétrica, da marca Imarflex®, por 5 a 7 minutos, em temperatura de 200°C. Não era utilizado nenhum tipo de óleo no processamento, apenas a gordura que desprendia do produto.

Depois de processados, os hambúrgueres eram cortados em pedaços e mantidos em caixas isotérmicas para manutenção da temperatura. As amostras eram servidas em pratos de plástico codificados com 3 dígitos. Para a limpeza do paladar durante a degustação das amostras, os provadores utilizavam biscoito cream cracker e água mineral, servidos à vontade.

4.2.7. Composição de ácidos graxos

Para preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos, foi utilizado o método de Hartman e Lago (1973). As alíquotas foram injetadas em um cromatógrafo a gás modelo HP 6890, equipado com detetor de ionização de chama, coluna capilar de sílica fundida (Supelcowax 10) com 30m de comprimento e 0,25mm de diâmetro interno. As condições cromatográficas foram as seguintes: coluna isotérmica à temperatura de 230° C, vaporizador à temperatura de 250°C, detetor à temperatura de 250° C, e utilização de hélio como gás de arraste, com fluxo de 1ml/min. A identificação dos ácidos graxos foi realizada pela comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos dos ácidos graxos das amostras com os dos padrões correspondentes. Os resultados foram calculados em percentagem de área.

4.2.8. Análise estatística

A análise estatística foi realizada sob orientação do Serviço de Assessoria Estatística do Instituto de Matemática e Estatística da USP. Os dados foram analisados utilizando o programa Minitab 13 for Windows através de modelos de análise de variância e comparações múltiplas, pelo método de Bonferroni, ao nível de 5% de significância. Todos os resultados foram expressos em base úmida.

Na análise dos resultados as variáveis irradiação, condições de embalagem e estocagem foram avaliadas individualmente para cada tipo de hambúrguer. Posteriormente, foi realizada a comparação entre elas. Para isso foram ajustados modelos de análise de variância e de regressão linear com mínimos quadrados ponderados, utilizando como pesos os inversos das variâncias estimadas para cada fator. Em todos eles as suposições de normalidade e independência dos resíduos foram verificadas.

Os testes sensoriais foram submetidos também à análise de variância, utilizando o programa estatístico SAS – Statistical Analysis System, tendo como causas de variação amostras, provadores e repetições. Também foi realizado o teste de médias de Dunnett ao nível de 5% de significância, a fim de se verificar possíveis diferenças significativas entre as médias das amostras

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. EFEITOS DA APLICAÇÃO DE RADIAÇÃO IONIZANTE SOBRE A OXIDAÇÃO DO COLESTEROL

As concentrações de óxidos de colesterol observadas nos hambúrgueres de frango e bovino submetidos à irradiação estão demonstradas na Figura 8. A irradiação provocou aumento nas concentrações de óxidos de colesterol tanto nos hambúrgueres de frango quanto nos hambúrgueres bovinos. Nestes últimos, entretanto, não foi observada diferença significativa entre os níveis de óxidos de colesterol nas duas doses de irradiação testadas.

Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Figura 8. Concentração dos quatro Óxidos de Colesterol analisados (ppm) em hambúrgueres de carne de frango e de carne bovina segundo a dose de Irradiação (KGy).

O aumento médio nas concentrações de óxidos de colesterol provocado pela irradiação foi de 2,42 ppm nos hambúrgueres de frango e 2,56 ppm nos hambúrgueres bovinos, o que representa, em termos percentuais, um acréscimo de 10,4 e 11,1%, respectivamente (Tabela 6).

O acréscimo nos níveis de óxidos de colesterol provocado pela irradiação difere muito entre os vários estudos realizados. No trabalho desenvolvido por Nam e colaboradores (2001), um índice semelhante ao

obtido no presente estudo, em torno de 10,6%, foi obtido para carne bovina refrigerada irradiada com dose de 4,5KGy. Para a carne de frango, também refrigerada, o aumento nos níveis de óxidos de colesterol foi mais elevado, em torno de 59,1%, com dose de 2KGy, variando de 15,1µg/g de lípide, na amostra controle, para 24,1 µg/g de lípide na amostra irradiada (Lee *et al.*, 2001). Já no estudo de Hwang e Maerker (1993) um aumento bem mais significativo foi observado. As concentrações de óxidos de colesterol praticamente triplicaram indo de 0,45 para 1,26 µg/g quando carne bovina refrigerada foi submetida à irradiação utilizando doses de 10KGy.

Tomando como referência os valores citados, o acréscimo nos níveis de óxidos de colesterol nos hambúrgueres irradiados, observado no presente trabalho, parece pouco significativo. Entretanto, ainda não foi possível estabelecer qual seria a quantidade mínima necessária a partir do qual são manifestados os efeitos biológicos indesejáveis provocados pelos óxidos de colesterol. Sendo assim, não se pode negligenciar qualquer elevação, ainda que pequena, nas concentrações destes compostos até que se tenha uma evidência de sua dosagem crítica.

Tabela 6. Concentração dos quatro óxidos de colesterol avaliados (ppm) em hambúrgueres de carne de frango e de carne bovina segundo a dose de Irradiação (KGy).

Hambúrguer	Irradiação	Média	DP
Frango	0	23,30 ^a	3,61
	3	25,72 ^b	3,36
Bovino	0	23,17 ^a	2,40
	3	25,27 ^b	2,01
	7	26,19 ^b	1,81

Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Uma característica que chama a atenção nos dados deste estudo é a elevada concentração inicial de óxidos de colesterol apresentada pelas amostras controle. Estudos anteriores demonstraram que carnes frescas apresentam ausência de óxidos de colesterol ou sua presença em quantidades traços (Pie *et al.*, 1991, Nam *et al.*, 2001). Entretanto, o que se pôde observar no presente estudo foram concentrações bastante significativas destes compostos nas amostras frescas. O nível médio de óxidos de colesterol nas amostras controle, não irradiadas, no dia zero de estocagem, foi de $20,29 \pm 0,60$ ppm para hambúrgueres de frango e de $21,18 \pm 0,34$ para hambúrguer bovino. Segundo as informações do fabricante, os hambúrgueres eram elaborados com carnes frescas, com no máximo 7 dias de abate, aparentemente não se justificando concentrações tão elevadas.

Outros autores também relataram um comportamento similar, como o de Nam e colaboradores (2001), que analisaram produtos da oxidação do colesterol em carnes frescas irradiadas em diferentes tipos de embalagens e tempos de estocagem. Estes autores relataram a presença de vários óxidos de colesterol em quantidades significativas nas amostras controle, não irradiadas, no início da estocagem. Este fato nos leva a refletir sobre a possibilidade da oxidação do colesterol se dar ainda no músculo do animal vivo, pré-abate, derivado das reações oxidativas endógenas. Uma outra possibilidade seria a da oxidação ocorrer nos momentos que sucedem o abate, nas etapas bioquímicas que transformam o músculo em carne. Nesta fase, as carnes são mantidas em câmaras refrigeradas até que atinjam a temperatura de 7°C, quando então serão desossadas para envio ao comércio ou à indústria de processamento.

A oxidação do colesterol segue padrões muito similares aos da oxidação lipídica uma vez que ambas podem ser desencadeada pelos mesmos fatores. Uma grande variedade de compostos é gerada em diferentes etapas. No estágio inicial de oxidação os mais abundantes são

aqueles derivados da oxidação do carbono 7 ou da cadeia lateral, quais sejam o 7 α e 7 β -hidroxicolesterol, o 7-cetocolesterol e o 25-hidroxicolesterol. Os produtos secundários da oxidação do colesterol, o 5 α - e 5 β -epoxicolesterol e o colestanoetriol são, na maioria das vezes, encontrados em concentrações mais baixas.

Ainda não foi possível identificar um padrão definido na produção de óxidos de colesterol, quanto ao tipo de composto formado e à sua quantidade, resultante do processo de irradiação. Maerker e Jones (1992) submeteram o colesterol e sete produtos de sua oxidação à irradiação com dose de 10 KGy e observaram maior formação de 6-cetocolesterol e 7-cetocolesterol, sugerindo sua utilização como potenciais marcadores da oxidação do colesterol em carne bovina e de frango irradiadas. Zubillaga e Maerker (1991) também relataram predomínio do 7-cetocolesterol em carne irradiada, constituindo mais de 50% do total de óxidos de colesterol produzidos. Lee e colaboradores (2001) observaram que o aumento significativo na produção de óxidos de colesterol em carne de frango irradiada se deu pelos níveis de 7 β -hidroxicolesterol, que foi o principal composto formado. Na carne suína a irradiação também promoveu aumento significativo no 7 α - e 7 β -hidroxicolesterol (Jo *et al.*, 1999). Já na carne bovina, foi observada elevação nas concentrações de 7 α - e 7 β -hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol, α -epóxido e 20-hidroxicolesterol, sendo este último praticamente inexistente no controle não irradiado (Nam *et al.*, 2001).

No presente estudo, as concentrações dos quatro óxidos de colesterol pesquisados foram bastante similares, embora tenha sido percebido um discreto predomínio do 7-cetocolesterol e do 7 α -hidroxicolesterol em relação aos demais óxidos. Os óxidos de colesterol apontados como predominantes em produtos irradiados são também os mais freqüentemente encontrados em alimentos submetidos a outros tipos de tratamento, não sendo

recomendada portanto, a sua utilização como indicadores do uso da irradiação.

Mudanças oxidativas em produtos irradiados têm sido investigadas através da determinação de compostos carbonílicos, índice de peróxido e/ou pelo valor do ácido tiobarbitúrico. No presente estudo, a determinação de TBARS, através da quantificação do malonaldeído, foi o método utilizado como indicador da oxidação lipídica. Os valores encontrados nos hambúrgueres irradiados estão descritos na Tabela 7. A irradiação promoveu aumento no número de TBARS nos dois tipos de hambúrgueres pesquisados, sendo que para o bovino, foi diretamente proporcional à dose de irradiação empregada.

Tabela 7. TBARS (mg de malonaldeído/kg) em hambúrgueres de frango e bovino segundo a dose de Irradiação.

Hambúrguer	Irradiação	Média	DP
Frango	0	3,70 ^a	2,19
	3	10,32 ^b	3,52
Bovino	0	0,42 ^c	0,30
	3	2,31 ^d	1,34
	7	5,18 ^e	4,14

Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Kanatt *et al.* (1998) encontraram resultados semelhantes analisando carne de frango refrigerada e irradiada com a dose de 2,5KGy. As amostras irradiadas apresentaram concentrações de malonaldeído superiores às amostras controle. Heath *et al.* (1990) foram mais além e compararam o grau de oxidação provocado pela irradiação com aquele causado pela estocagem. Eles observaram que doses de 3KGy em frango cozido

aumentaram as concentrações de malonaldeído em níveis comparáveis à estocagem refrigerada por 4 dias.

A maior concentração de malonaldeído nas amostras irradiadas em relação à controle era passível de ocorrer uma vez que a autooxidação lipídica pode ser acelerada pela radiação ionizante, levando à formação de radicais livres que combinam com o oxigênio para formar hidroperóxidos. Estes, por sua vez, podem se decompor em uma série de produtos, incluindo os aldeídos (Nawar, 1983). Neste caso, o emprego da radiação ionizante promoveu tanto a oxidação lipídica, percebida pelo aumento nos níveis de malonaldeído, quanto a oxidação do colesterol, evidenciada pela elevação nas concentrações médias de óxidos de colesterol.

Embora a irradiação tenha provocado aumento nas concentrações de óxidos de colesterol, os valores médios obtidos para os hambúrgueres irradiados, entre 25,3 e 26,2 $\mu\text{g/g}$, são comparáveis àqueles relatados para outros tipos de processamento empregados na indústria de carnes. O cozimento de hambúrguer, por exemplo, elevou a concentração de 7α -hidroxicolesterol de níveis indetectáveis na amostra crua, para 72 $\mu\text{g/g}$ depois do processamento (Higley *et al.*, 1986). Hambúrgueres e bifes grelhados apresentaram concentrações em torno de 11,1 e 22,8 $\mu\text{g/g}$, respectivamente, apenas para os óxidos de colesterol derivados da oxidação do carbono 7 (Tenuta-Filho *et al.*, 2003). Já a utilização de liofilização, levou à formação de óxidos em quantidades variáveis, de 6 a 21 $\mu\text{g/g}$ em carne de peru, e de 2 a 43 $\mu\text{g/g}$ em carne de frango, mais elevadas portanto, que as provocadas pela irradiação no presente estudo (Sander *et al.*, 1989).

O fato da irradiação não provocar uma oxidação drástica do colesterol é bastante favorável, pois esta característica associada à comprovada eficiência na redução da carga microbiana e na inativação de microrganismos patogênicos reforça a viabilidade do emprego desta tecnologia na indústria de produtos cárneos.

5.2. EFEITO DA CONDIÇÃO DE EMBALAGEM DOS HAMBÚRGUERES SOBRE A OXIDAÇÃO DO COLESTEROL

Uma vez que a oxidação do colesterol pode ser desencadeada pela oxidação lipídica prévia (Smith, 1987), o controle das condições de estocagem torna-se uma ferramenta importante na prevenção da formação de óxidos de colesterol. Neste sentido, o uso de embalagens a vácuo tem sido recomendada com o intuito de reduzir a oxidação lipídica e, conseqüentemente, a oxidação do colesterol. Entretanto, no presente estudo, o tipo de embalagem empregada não exerceu nenhum efeito sobre a formação de óxidos de colesterol em hambúrgueres de frango e bovino (Figura 9).

Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Figura 9. Concentração dos quatro óxidos de colesterol avaliados (ppm) em hambúrgueres de frango e de carne bovina em função das condições de embalagem.

Vários relatos na literatura descrevem um efeito positivo do vácuo na prevenção da oxidação do colesterol. No estudo de Lee *et al.* (2001) o uso da embalagem de carne de frango a vácuo impediu a formação de 7-cetocolesterol e do 7 α -hidroxicolesterol, presentes nas amostras sob aerobiose. No estudo realizado por Nam e sua equipe (2001), os hambúrgueres bovinos irradiados mantidos sob aerobiose apresentaram

maiores concentrações de óxidos de colesterol em relação àqueles mantidos sob vácuo. Este mesmo grupo de pesquisadores avaliou o efeito da irradiação e da embalagem sobre a formação de óxidos de colesterol também em carne de peru cozida (Ahn *et al.*, 2001). Eles observaram aumento no total de óxidos de colesterol de cerca de duas vezes, nas amostras embaladas à vácuo, contra aumento de dez vezes nas amostras mantidas sob aerobiose, depois de 7 dias de estocagem refrigerada. Segundo os autores mencionados, a embalagem utilizada, algumas vezes, se mostrou mais decisiva do que a própria irradiação na promoção da oxidação do colesterol (Ahn *et al.*, 2001, Nam *et al.*, 2001).

Embora a atmosfera individualmente não tenha exercido nenhum efeito sobre os níveis de óxidos de colesterol, foi observada uma interação (Figura 10) entre os fatores irradiação e embalagem nos hambúrgueres de carne bovina ($p < 0,05$). Nas amostras embaladas a vácuo, as concentrações médias de óxidos de colesterol não diferiram em função do emprego da irradiação, enquanto nos hambúrgueres embalados sob aerobiose, observou-se acréscimo nos níveis de óxidos de colesterol, cerca de $3,89 \pm 0,20$ ppm, nas amostras irradiadas em relação às amostras controle. Com isso observa-se que, na ausência de um estímulo à oxidação, o vácuo não exerceu efeito protetor significativo sobre a formação de óxidos de colesterol. Entretanto, quando este estímulo aconteceu, a ação preventiva se manifestou, confirmando os relatos da literatura que apontam a utilização de embalagem a vácuo na prevenção da formação de óxidos de colesterol durante a irradiação (Ahn *et al.*, 1998b, Du *et al.*, 2001, Lee *et al.*, 2001).

Nos hambúrgueres de carne de frango não foi observada interação entre os fatores e as condições de embalagem não exerceram influência sobre a concentração média de óxidos de colesterol (Figura 11). Este fato não era esperado, mas pode ser explicado considerando que a cobertura do hambúrguer de frango (empanagem) talvez não tenha permitido uma

adequada exaustão do oxigênio. Dessa forma, não se pôde garantir a ausência total de oxigênio no interior de cada embalagem.

Figura 10. Perfis médios dos fatores Irradiação e Embalagem para a variável Óxidos de Colesterol em hambúrgueres de carne bovina.

Figura 11. Perfis médios dos fatores Irradiação e Embalagem para a variável Óxidos de Colesterol em hambúrgueres de carne de frango

Na presença de oxigênio, a irradiação poderá acelerar a autoxidação lipídica através de uma ou mais das seguintes reações:

- formação de radicais livres que podem combinar com o oxigênio e formar hidroperóxidos;

- quebra de hidroperóxidos gerando uma série de produtos de decomposição, particularmente compostos carbonílicos e
- destruição de antioxidantes (Nawar, 1983).

Este último fator levou muitos pesquisadores a afirmarem que a irradiação tornava o alimento instável (Nawar, 1983). Observa-se ainda que estudos em sistemas modelo geralmente superestimam a ação da irradiação, pois os vários componentes presentes no alimento exercem ação mutuamente protetora contra os possíveis efeitos deletérios da irradiação (ICGFI, 1999).

O efeito das condições de embalagem sobre a oxidação lipídica foi semelhante ao descrito para a oxidação do colesterol. Os hambúrgueres de frango embalados a vácuo apresentaram concentrações de malonaldeído similares àqueles mantidos sob aerobiose, sugerindo que o vácuo não exerceu o efeito protetor esperado contra a oxidação lipídica. Apenas nos hambúrgueres bovinos foi possível observar ação efetiva do vácuo na prevenção da oxidação (Tabela 8).

De modo semelhante ao comentado para a oxidação do colesterol, estudos têm demonstrado que, algumas vezes, as condições de estocagem e embalagem da carne crua são mais importantes do que a própria irradiação na promoção da oxidação lipídica (Ahn *et al.*, 1998b). Du *et al.* (2000) observaram menor formação de malonaldeído em carne de frango embalada à vácuo, principalmente ao final da estocagem sob refrigeração. Nestas amostras, os valores de TBARS, na carne de frango irradiada, reduziram-se de 10,55 mg malonaldeído/Kg na amostra mantida sob aerobiose para 1,22 mg malonaldeído/Kg na mantida sob vácuo.

Apesar do vácuo ter sido efetivo na redução da oxidação lipídica no hambúrguer bovino, era possível uma ação semelhante ou até mais significativa para o hambúrguer de frango, visto que a gordura deste produto

é mais insaturada e, conseqüentemente, mais passível de oxidação. Acredita-se que a ineficiência da aplicação do vácuo, tal como visto anteriormente, tenha sido provocada pelas irregularidades na superfície do hambúrguer, permitindo a retenção de oxigênio entre as reentrâncias da empanagem. Desta forma, possivelmente o oxigênio retido pôde exercer sua ação oxidante.

Tabela 8. Determinação de TBARS (mg de malonaldeído/kg) em hambúrgueres de frango e bovino segundo as condições de embalagem.

Hambúrguer	Embalagem	Média	DP
Frango	oxigênio	7,13 ^a	4,59
	vácuo	6,88 ^a	4,39
Bovino	oxigênio	4,21 ^b	3,75
	vácuo	1,06 ^c	1,08

Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

5.3. EFEITO DO TEMPO DE ESTOCAGEM DOS HAMBÚRGUERES SOBRE A OXIDAÇÃO DO COLESTEROL

As concentrações de óxidos de colesterol aumentaram tanto nos hambúrgueres de frango quanto nos bovinos, em função do tempo de estocagem sob congelamento (Figura 12). Nos hambúrgueres de frango, a comparação das médias, indicou que do dia 0 para o dia 60 a concentração de óxidos de colesterol aumentou $2,81 \pm 0,53$ ppm, do dia 60 para o dia 120, o aumento foi de $4,24 \pm 0,72$ ppm e do dia 0 para o dia 120 foi de $7,05 \pm 0,67$ ppm. Em termos percentuais, estes aumentos representam 13,2%, 19,9% e 33,1%, respectivamente. No caso da carne bovina, os hambúrgueres analisados no dia 0 e dia 60 não apresentaram diferença estatística significativa na concentração média de óxidos de colesterol, mas

nos estocados por 120 dias observou-se aumento de $2,61 \pm 0,10$ ppm, o que corresponde a 11,2%.

A estocagem parece exercer um efeito marcante sobre as concentrações de óxidos de colesterol em carnes refrigeradas. No trabalho de Nam e seus colaboradores (2001), os níveis de óxidos de colesterol em carne bovina subiram de $28,7 \pm 10,9$ ppm, no dia zero, para $45,4 \pm 17,4$ ppm, ao final de 7 dias de estocagem. Este mesmo grupo observou aumento de 5 a 8 vezes na concentração de óxidos de colesterol em carne suína cozida, depois de 7 dias de estocagem sob refrigeração (Ahn *et al.*, 2001). Em carne de frango, o acréscimo nas concentrações de óxidos do colesterol, em função da estocagem, foi de cerca de 3 vezes a quantidade inicial, ao final de 14 dias também sob refrigeração (Lee *et al.*, 2001)

Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Figura 12. Concentração dos quatro óxidos de colesterol avaliados (ppm) em hambúrgueres de carne de frango e de carne bovina em função do tempo de estocagem (dias) sob congelamento.

O aumento nas concentrações de óxidos de colesterol ao longo da estocagem, observado no presente estudo, não atingiu os mesmos índices citados anteriormente. Na verdade, nas carnes congeladas o acréscimo provocado pela estocagem tem se mostrado bem menor do que as carnes

refrigeradas, embora alguns estudos afirmem o contrário. Um bom exemplo disto, são os dados relatados por Pie e colaboradores (1991). Neste estudo, a carne bovina estocada a -20°C, por 90 dias, não apresentou alteração nos níveis de óxidos de colesterol, enquanto os demais tipos cárneos pesquisados, carne suína e de vitela, assim como a manteiga congelada demonstraram um aumento significativo nos níveis destes compostos durante a estocagem. Com base nisto, os autores concluíram que o colesterol presente em um alimento congelado é bem mais susceptível à oxidação do que aquele presente em um alimento fresco (Pie *et al.*, 1990, Pie *et al.*, 1991). Esta afirmação é um tanto controversa, uma vez que a maior mobilidade dos radicais livres, bem como a maior disponibilidade de água nos alimentos frescos, características sabidamente pró-oxidantes, os tornam potencialmente mais propensos à oxidação.

Ao se comparar o aumento na concentração de óxidos de colesterol provocado pela irradiação e pela estocagem observa-se que, para o hambúrguer de frango o tempo de estocagem foi mais decisivo na oxidação do colesterol do que a irradiação. O percentual de aumento observado ao final de 120 dias de estocagem foi de 33,1% contra 10,4% em função da irradiação. No caso do hambúrguer bovino, a elevação nos níveis de óxidos de colesterol foi semelhante para as duas variáveis, atingindo índices de 11,2% e 11,1%, com o tempo de estocagem e a irradiação, respectivamente.

A determinação de TBARS tem sido amplamente empregada como medida de oxidação em carnes (Fernandez *et al.*, 1997). Baseia-se na determinação de malonaldeído, considerado um dos principais compostos secundários oriundos da oxidação lipídica. Vários estudos sugerem o aumento dos níveis de malonaldeído ao longo da estocagem de carnes (De Vore, 1988, Galvin *et al.*, 1998a). A expectativa de que as concentrações de malonaldeído fossem aumentar ao longo da estocagem não se confirmou para nenhum dos dois tipos de hambúrgueres (Tabela 9). Ao contrário do que se esperava, foi observada redução significativa ($p < 0,05$) nos níveis de

malonaldeído dos hambúrgueres de frango, ao longo da estocagem. Nos hambúrgueres bovinos, a estocagem não exerceu efeito significativo sobre os níveis de malonaldeído.

Tabela 9. TBARS (mg de malonaldeído/kg) em hambúrgueres de frango e bovino segundo o tempo de estocagem.

Hambúrguer	Estocagem	Média	DP
Frango	0	9,39 ^a	5,47
	60	6,53 ^b	4,17
	120	5,10 ^c	2,16
Bovino	0	2,81 ^d	2,75
	60	2,21 ^d	2,64
	120	2,89 ^d	4,04

Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

O fato do malonaldeído ser um produto secundário da oxidação lipídica, não significa necessariamente que ele irá aumentar ao longo da estocagem. Ao contrário, Tarladgis e Watts (1960) observaram declínio durante a estocagem sob congelamento de carnes cozidas e produtos marinhos. Outros pesquisadores confirmaram estes resultados, demonstrando que quanto mais extenso o tempo de estocagem de carnes cruas sob congelamento, menor era o valor de TBARS nesta carne depois de cozida (Ilgene *et al.*, 1979). Kesava-Rao e colaboradores (1996) observaram redução nos valores de TBARS em carne de búfalo crua, entre 30 e 60 dias de estocagem sob congelamento, seguida de posterior aumento. A diminuição nos níveis de malonaldeído foi atribuída às interações com as proteínas presentes no alimento (Ilgene *et al.*, 1979, Kesava-Rao *et al.*, 1996). Outros autores associaram a redução nos níveis de malonaldeído à sua instabilidade por longos períodos. Esta é uma das

principais limitações do teste, uma vez que o malonaldeído, bem como os demais produtos de cadeia curta, gerados pela oxidação lipídica, também se oxidam gerando álcoois e ácidos orgânicos que não são determinados pelo teste (Fernandez *et al.*, 1997).

Os efeitos da oxidação parecem ser minimizados pelas temperaturas de congelamento. Em um estudo comparou-se os valores de TBARS durante a estocagem de hambúrguer suíno refrigerado e congelado, e observou-se que as concentrações de malonaldeído aumentaram em todas as amostras ao final de duas semanas a 4°C. Em contrapartida, todos os hambúrgueres apresentaram redução nos níveis de malonaldeído depois de três meses de estocagem a -40°C (Ahn *et al.*, 2000). Da mesma forma, Kesava-Rao e colaboradores (1996) observaram que as mudanças ocorridas nos valores de TBARS em carne de búfalo cozida foram muito mais pronunciadas quando estas foram mantidas sob refrigeração do que quando congeladas, indicando que as alterações oxidativas estavam diretamente relacionadas com o aumento da temperatura de estocagem. Possivelmente, a justificativa para este comportamento estivesse na maior mobilidade dos radicais livres, produzidos pela autooxidação lipídica, no produto resfriado em relação ao congelado, favorecendo o desencadeamento do processo oxidativo.

A análise de variância revelou interação ($p < 0,05$) entre os fatores irradiação e estocagem sobre a variável oxidação lipídica, nos hambúrgueres de frango. Desta forma, os hambúrgueres de frango irradiados apresentaram maiores valores de malonaldeído com o avançar da estocagem, em comparação aos hambúrgueres não irradiados.

5.4. EFEITO DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DOS HAMBÚRGUERES SOBRE A OXIDAÇÃO DO COLESTEROL

A composição de ácidos graxos apresentada pelos hambúrgueres de frango e bovino está demonstrada nas Tabelas 10, 11 e 12. Os hambúrgueres de frango demonstraram maior variabilidade na distribuição dos ácidos graxos, apresentando as seguintes proporções:

- ácidos graxos saturados na faixa entre 22,84 e 30%;
- ácidos graxos monoinsaturados entre 30,21 e 37,84% e
- ácidos graxos polinsaturados na faixa de 20,82 a 29,21%.

Dentre os monoinsaturados, o oléico (C18:1 n-9) foi o de maior representatividade, seguido pelo linoléico (C18:2 n-6) e palmítico (C16:0), no grupo de polinsaturados e saturados, respectivamente. Os hambúrgueres de carne bovina apresentaram proporções de ácidos graxos muito similares nas diferentes amostras compostas por:

- 46,83 a 47,83% de ácidos graxos saturados,
- 43,77 a 44,16% de monoinsaturados e
- 2,42 a 2,84% de polinsaturados.

Individualmente, o ácido graxo encontrado em maior proporção foi o oléico (C18:1 n-9), seguido pelo palmítico (C16:0) e o esteárico (C18:0).

O objetivo da análise do perfil de ácidos graxos dos hambúrgueres era caracterizar o tipo muscular, em relação à predominância de ácidos graxos saturados ou insaturados, e avaliar a influência desta composição nos níveis de óxidos de colesterol produzidos nos dois hambúrgueres. Na comparação dos hambúrgueres de frango irradiados em relação ao controle foi percebido um aumento na proporção dos ácidos graxos não identificados de 8,75 para 26,13%, apenas nas amostras mantidas sob aerobiose (Tabela 10). Este aumento no percentual de não identificados levou, conseqüentemente, à redução na proporção final dos demais ácidos graxos, saturados, mono e polinsaturados.

Tabela 10. Composição dos ácidos graxos de hambúrgueres de frango expressa em % de área.

Ácido Graxo		OC	O3	VC	V3
14:0	Mirístico	0,49 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,48 ± 0,03	0,53 ± 0,00
14:1(n-5)	Miristoléico	0,05 ± 0,07	0,06 ± 0,08	0,06 ± 0,08	0,14 ± 0,01
16:0	Palmitico	20,43 ± 0,65	17,21 ± 1,07	20,55 ± 1,46	22,13 ± 0,07
16:1(n-7)	Palmitoléico	3,50 ± 0,09	3,70 ± 0,23	3,99 ± 0,28	4,53 ± 0,02
17:0	Margárico	0,14 ± 0,01	-	0,07 ± 0,09	0,13 ± 0,00
18:0	Estearico	6,71 ± 0,23	5,22 ± 0,31	7,03 ± 0,51	7,21 ± 0,02
18:1(n-9)	Oléico	28,90 ± 0,90	24,92 ± 1,63	29,26 ± 2,08	31,09 ± 0,13
18:1(n-7)	Vacênico	1,64 ± 0,04	1,38 ± 0,09	1,80 ± 0,11	1,86 ± 0,01
18:2(n-6)	Linoléico	25,11 ± 0,75	18,21 ± 1,29	23,11 ± 1,51	23,29 ± 0,28
18:3(n-3)	α -linolênico	1,75 ± 0,05	1,15 ± 0,07	1,43 ± 0,10	0,16 ± 0,00
20:1(n-9)	Eicosenóico	0,21 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,21 ± 0,01	0,23 ± 0,02
20:2(n-6)	Eicosadienóico	0,24 ± 0,03	0,07 ± 0,10	0,23 ± 0,02	0,25 ± 0,02
20:3(n-6)	Eicosatrienóico	0,26 ± 0,01	-	-	0,32 ± 0,01
20:4(n-6)	Araquidônico	1,48 ± 0,05	1,23 ± 0,07	2,10 ± 0,16	2,00 ± 0,02
22:5(n-3)	Docosapentaenóico	0,23 ± 0,00	0,17 ± 0,01	-	0,28 ± 0,01
22:6(n-3)	Docosahexaenóico	0,15 ± 0,02	-	0,19 ± 0,01	0,21 ± 0,01
N.I.	Não identificados	8,75 ± 2,79	26,13 ± 4,78	9,31 ± 6,45	4,23 ± 0,51
Saturados		27,8 ± 0,9	22,8 ± 1,4	28,1 ± 2,1	30,0 ± 0,1
Total	Monoinsaturados	34,3 ± 1,0	30,2 ± 2,0	35,3 ± 2,6	37,8 ± 0,1
	Polinsaturados	29,2 ± 0,9	20,8 ± 1,3	27,3 ± 1,8	27,9 ± 0,3

Onde OC = amostra controle mantida sob aerobiose, O3 = amostra irradiada mantida sob aerobiose, VC = amostra controle mantida sob vácuo e V3 = amostra irradiada mantida sob vácuo

Tabela 11. Composição de ácidos graxos dos hambúrgueres bovinos embalados sob aerobiose expressa em % de área.

Ácido Graxo		OC	O3	O7
10:0	Cáprico	0,07 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,08 ± 0,00
12:0	Láurico	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,01
14:0	Mirístico	3,22 ± 0,08	3,01 ± 0,02	2,99 ± 0,10
14:1(n-5)	Miristoléico	0,84 ± 0,04	0,75 ± 0,01	0,72 ± 0,04
15:0	Pentadecanóico	0,67 ± 0,01	0,65 ± 0,01	0,65 ± 0,01
16:0	Palmitico	23,90 ± 0,10	24,46 ± 0,17	24,27 ± 0,08
16:1(n-7)	Palmitoléico	3,02 ± 0,05	3,09 ± 0,01	3,05 ± 0,04
17:0	Margárico	1,24 ± 0,01	1,20 ± 0,01	1,24 ± 0,01
17:1(n-9)	Heptadecenóico	0,78 ± 0,02	0,75 ± 0,02	0,77 ± 0,02
18:0	Estearico	17,52 ± 0,09	17,85 ± 0,17	18,38 ± 0,10
18:1(n-9)	Oléico	35,65 ± 0,11	35,23 ± 0,24	35,31 ± 0,15
18:1(n-7)	Vacênico	3,76 ± 0,01	4,03 ± 0,04	4,11 ± 0,05
18:2(n-6)	Linoléico	1,44 ± 0,02	1,35 ± 0,03	1,11 ± 0,04
18:3(n-3)	α-Linolênico	0,40 ± 0,01	0,48 ± 0,00	0,45 ± 0,01
18:4(n-3)	Octatetraenóico	0,65 ± 0,01	0,68 ± 0,01	0,67 ± 0,01
20:0	Eicosanóico	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,00	0,12 ± 0,02
20:1(n-9)	Eicosenóico	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01
20:4(n-6)	Araquidônico	0,19 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,12 ± 0,03
22:5(n-3)	Docosapentaenóico	0,17 ± 0,00	0,13 ± 0,02	0,07 ± 0,06
N.I.	Não identificados	6,17 ± 0,27	5,77 ± 0,53	5,68 ± 0,02
Saturados		46,8 ± 0,1	47,5 ± 0,3	47,8 ± 0,1
Total Monoinsaturados		44,2 ± 0,2	44,0 ± 0,2	44,1 ± 0,1
Polinsaturados		2,84 ± 0,02	2,79 ± 0,04	2,42 ± 0,05

Tabela 12. Composição de ácidos graxos dos hambúrgueres bovinos embalados sob vácuo expressa em % de área.

Ácido Graxo		VC	V3	V7
10:0	Cáprico	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,08 ± 0,01
12:0	Láurico	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,00
14:0	Mirístico	3,01 ± 0,04	3,09 ± 0,03	3,10 ± 0,02
14:1(n-5)	Miristoléico	0,74 ± 0,02	0,82 ± 0,01	0,76 ± 0,01
15:0	Pentadecanóico	0,65 ± 0,01	0,66 ± 0,01	0,65 ± 0,00
16:0	Palmítico	24,42 ± 0,12	24,49 ± 0,14	24,53 ± 0,06
16:1(n-7)	Palmitoléico	3,09 ± 0,02	3,17 ± 0,03	3,11 ± 0,01
17:0	Margárico	1,23 ± 0,01	1,23 ± 0,01	1,24 ± 0,01
17:1(n-9)	Heptadecenóico	0,76 ± 0,01	0,78 ± 0,01	0,78 ± 0,00
18:0	Estearíco	18,09 ± 0,15	18,07 ± 0,09	18,04 ± 0,03
18:1(n-9)	Oléico	35,20 ± 0,15	34,91 ± 0,25	35,13 ± 0,03
18:1(n-7)	Vacênico	4,11 ± 0,01	3,98 ± 0,03	4,00 ± 0,01
18:2(n-6)	Linoléico	1,10 ± 0,01	1,12 ± 0,04	1,12 ± 0,04
18:3(n-3)	α-linolênico	0,50 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,49 ± 0,00
18:4(n-3)	Octatetraenóico	0,74 ± 0,00	0,71 ± 0,00	0,71 ± 0,01
20:0	Eicosanóico	0,12 ± 0,02	0,11 ± 0,00	0,11 ± 0,00
20:1(n-9)	Eicosenóico	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,10 ± 0,01
20:4(n-6)	Araquidônico	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,07 ± 0,06
22:5(n-3)	Docosapentaenóico	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,00
N.I.	Não identificados	5,76 ± 0,37	5,90 ± 0,60	5,78 ± 0,17
Saturados		47,7 ± 0,3	47,8 ± 0,3	47,8 ± 0,1
Total	Monoinsaturados	44,0 ± 0,1	43,8 ± 0,3	43,9 ± 0,0
Polinsaturados		2,58 ± 0,01	2,55 ± 0,03	2,52 ± 0,09

Onde VC = amostra controle, V3 = amostra irradiada com dose de 3KGy e V7 = amostra irradiada com dose de 7KGy

Alguns estudos relataram alterações na proporção de ácidos graxos provocados pela irradiação. Gruis e Kiss (1987), avaliando o efeito da irradiação em carne de frango congelada, relataram que apenas doses extremas de irradiação provocaram mudanças significativas no perfil de ácidos graxos. Segundo estes autores, doses de 50KGy aumentaram as concentrações do ácido oléico e reduziram as concentrações dos ácidos

graxos saturados, principalmente dos ácidos palmítico e esteárico (Gruiz e Kiss, 1987). Doses mais baixas, da ordem de 4KGy, não provocaram alteração no perfil de ácidos graxos da carne de frango. Mais recentemente, o estudo desenvolvido por Brito e colaboradores (2002), utilizando doses crescentes, de 1 a 8 KGy, demonstrou diminuição no total de ácidos graxos e maior formação de isômeros trans em carne moída irradiada, em comparação ao controle não irradiado. Essas alterações foram relacionadas a mudanças na estrutura molecular dos ácidos graxos, quebrando as ligações duplas e gerando radicais livres e ácidos graxos trans (Brito *et al.*, 2002).

Uma vez que as carnes de diferentes espécies animais apresentam graus variáveis de insaturação de sua gordura, a expectativa é que a oxidação lipídica e a oxidação do colesterol também ocorram de forma diferenciada nestes produtos (Du *et al.*, 2001). 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, portanto, a presença de lípidos insaturados próximo ao colesterol poderia aumentar a sua susceptibilidade à oxidação. Entretanto, no presente estudo, a expectativa de que houvesse maior formação de óxidos de colesterol no hambúrguer de frango, devido ao maior grau de insaturação de seus ácidos graxos, não se confirmou. O que se pode observar pela Figura 13 é que não houve diferença significativa entre os valores de óxidos de colesterol apresentados pelo hambúrguer de frango em relação ao hambúrguer bovino.

Nam e seus colaboradores (2001) avaliaram a oxidação do colesterol em diferentes tipos cárneos e observaram que a formação de óxidos ao longo da estocagem, sob refrigeração, aconteceu de forma muito mais evidente para o músculo de peru, seguido pelo suíno e bovino. Os autores concluíram que na carne bovina, o colesterol foi oxidado sem prévia oxidação de ácidos graxos, enquanto para a carne suína e de peru, a

oxidação dos ácidos graxos acelerou a oxidação do colesterol. Da mesma forma, a irradiação com doses de 4,5KGy produziu maior formação de óxidos de colesterol em carne de peru, seguido pela carne suína e bovina.

Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Figura 13. Concentração total dos quatro óxidos de colesterol avaliados segundo o tipo de hambúguer.

No presente trabalho, quando se comparou o efeito da irradiação na dose de 3KGy, comum aos dois hambúrgueres pesquisados, não se observou diferença significativa entre os níveis de óxidos de colesterol apresentados pelos dois tipos de hambúrgueres (Figura 14). O mesmo comportamento também foi percebido para as condições de embalagem (Figura 15).

Apenas ao longo da estocagem (Figura 16) foi possível observar diferença nas concentrações de óxidos de colesterol em função do tipo de hambúrguer pesquisado. Os dados indicam que, tanto do dia 0 para o dia 60, quanto deste para o dia 120, as concentrações de óxidos de colesterol

foram maiores para o hambúrguer de frango em relação ao hambúrguer de carne bovina (Tabela 13).

Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$)

Figura 14. Concentração total dos quatro óxidos de colesterol avaliados segundo a dose de Irradiação e tipo de carne do hambúrguer.

Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Figura 15. Concentração total dos quatro óxidos de colesterol avaliados segundo tipo de Embalagem e tipo de carne do hambúrguer

Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Figura 16. Concentração total dos quatro óxidos de colesterol avaliados segundo tempo de Estocagem e tipo de carne do hambúrguer.

Tabela 13. Concentração de Óxidos de Colesterol (ppm) segundo tempo de Estocagem (dias) e tipo de carne do hambúrguer.

Hambúrguer	Estocagem	Média	DP
Frango	0	21,30 ^a	1,59
	60	24,00 ^b	2,14
	120	28,24 ^c	2,92
Bovino	0	22,62 ^a	2,28
	60	23,92 ^a	1,96
	120	26,12 ^b	1,70

Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Os níveis de malonaldeído observados nos hambúrgueres de frango foram maiores do que aqueles apresentados pelo hambúrguer bovino, tanto para as amostras controle quanto para as amostras irradiadas. Este fato provavelmente está relacionado ao maior grau de insaturação dos ácidos

graxos que compõem a fração lipídica da carne de frango. Segundo Kanatt e colaboradores (1997), o uso da irradiação em carne refrigerada de três diferentes espécies provocou maiores valores de TBARS na carne de frango, seguida pelas carnes de búfalo e carneiro. Du e sua equipe (2001) também observaram maiores concentrações de TBARS para hambúrgueres elaborados com carne de peru em comparação àqueles confeccionados com carne suína ou bovina. Em alguns casos, o aumento nas concentrações de malonaldeído só ocorreu em determinados tipos musculares. Por exemplo, no estudo de Nam e seus colegas (2001) foi relatado aumento no número de TBARS apenas para a carne suína e de peru, enquanto para a carne bovina nenhum efeito foi observado durante a estocagem sob refrigeração.

Mas se a irradiação foi capaz de promover a oxidação lipídica no hambúrguer de frango, por quê a oxidação do colesterol não se deu na mesma proporção?

A oxidação do colesterol é dependente das condições do sistema em que ele se encontra. Os óxidos de colesterol formados e sua quantidade relativa variam dependendo da temperatura, tempo de exposição, presença de água, pH, tipo de tampão e forma do substrato (Kim e Nawar, 1991). Mesmo para a oxidação lipídica, a relação entre maior taxa oxidativa e o grau de insaturação da gordura muscular nem sempre é observada, pois existem outros fatores envolvidos no processo de oxidação. Conteúdo lipídico, presença de substâncias pró-oxidantes, tipo e concentração de antioxidantes naturais, assim como a concentração de lípidos de membrana são fatores que poderiam ser responsáveis por muitas das diferenças observadas na taxa de oxidação dos hambúrgueres elaborados com tipos musculares diversos (Ahn, *et al*, 1998b). Dentre estes, o conteúdo lipídico, assim como sua composição, assume uma grande importância no processo oxidativo. Os triglicérides contribuem com menor fração, enquanto os fosfolípidos são responsáveis por cerca de 90% da oxidação lipídica da carne (Pikul, 1984). Os hambúrgueres de frango apresentaram teor de

gordura entre 4 e 6%, enquanto nos hambúrgueres de carne bovina os valores oscilavam entre 15 e 24%. Já os níveis de colesterol foram muito similares, cerca de 50 mg/100g de amostra para os dois tipos de hambúrgueres. Desta forma, apesar dos hambúrgueres de frango apresentarem maior susceptibilidade à oxidação, seu baixo conteúdo lipídico poderia limitar o desenvolvimento deste processo. Além disso, Zulak e Maerker (1989) sugeriram que os ácidos graxos polinsaturados poderiam ser preferencialmente oxidados em detrimento do colesterol, exercendo ao final do processo um efeito preventivo e não promotor de sua oxidação.

No estudo de Hampson e colaboradores (1996), diferentes tipos musculares foram submetidos a quatro doses de irradiação. Foi observado aumento nas concentrações de malonaldeído, em função da dose de irradiação empregada, mas nenhuma alteração em função do tipo muscular. Um outro estudo avaliando o potencial oxidativo das carnes bovina, suína e de ave congeladas demonstrou maior concentração de malonaldeído na carne bovina, seguida pela suína e pela carne de ave (Rhee *et al.*, 1996). Os autores associaram estes resultados ao maior conteúdo de pigmento heme nos músculos vermelhos e uma atividade moderada da enzima catalase, que promoveria a formação de peróxido de hidrogênio, favorecendo as reações de oxidação no músculo (Rhee *et al.*, 1996).

5.5. CORRELAÇÃO ENTRE A OXIDAÇÃO LIPÍDICA E A OXIDAÇÃO DO COLESTEROL

Para avaliar a existência de correlação linear entre a oxidação lipídica e a formação de óxidos de colesterol foi ajustado um modelo de análise de variância para a variável oxidação lipídica. Pelo gráfico de dispersão não houve evidência de associação linear entre os resíduos das variáveis óxidos de colesterol e número de TBARS, sendo que o coeficiente de correlação

linear de Pearson destes resíduos foi de 0,397 para hambúrgueres de frango e 0,111 para hambúrguer bovino.

Em estudo realizado por De Vore (1988) foi observado a correlação positiva entre a formação de malonaldeído e 7-cetocolesterol, tanto em carne bovina crua ($r^2 = 0,82$) quanto em carne bovina cozida ($r^2 = 0,98$). Em carne de frango, TBARS e óxidos de colesterol apresentaram índice de correlação linear de $r^2 = 0,68$ para peito e $r^2 = 0,75$ para coxa, durante a estocagem sob refrigeração (Galvin *et al.*, 1998a). Du e colaboradores (2001) encontraram elevados coeficientes de correlação entre a formação de óxidos de colesterol e os níveis de TBARS, com valores de 0,93, 0,90 e 0,98 para carne de peru, carne suína e carne bovina, respectivamente. A partir destes resultados os autores sugeriram que os valores de TBARS poderiam ser utilizados como análise preditiva da oxidação do colesterol durante o processamento e a estocagem de carnes (Du *et al.*, 2000).

Entretanto Engeseth e Gray (1994) questionam a relação entre TBARS e óxidos de colesterol. Uma vez que o malonaldeído é um produto de decomposição oriundo da oxidação de ácidos graxos e não do colesterol, o desenvolvimento de TBARS não poderia ser um bom indicador da oxidação deste composto. Já outros autores, como Nam e colaboradores (2001) observaram esta correlação apenas em alguns tipos musculares. Neste estudo, uma forte correlação positiva foi observada na carne suína e de peru (coxa), mas não em carne bovina, todas submetidas à irradiação e subsequente estocagem sob refrigeração.

5.6. ANÁLISE SENSORIAL DOS HAMBÚRGUERES IRRADIADOS

Os resultados obtidos a partir da análise sensorial dos hambúrgueres de frango e bovino estão demonstrados nas Tabelas 14 e 15, respectivamente, expressos como graus médios de diferença entre os hambúrgueres irradiados e estocados sob congelamento, em relação à amostra padrão. Com exceção dos hambúrgueres de frango mantidos sob aerobiose no início do período de estocagem, todos os demais hambúrgueres irradiados, tanto de frango, quanto bovinos, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) no sabor em relação às amostras controle, durante todo o período de estocagem.

Tabela 14. Diferença no sabor observado entre as amostras de hambúrguer de frango irradiadas e congeladas e a amostra padrão

Amostras	Tempos de estocagem (dias)		
	0	60	120
Padrão	1,8	1,5	1,5
Aerobiose controle	2,0	2,7*	2,0
Aerobiose irradiado 3kG	2,6	3,5*	3,2*
Vácuo controle	3,2*	2,6*	1,8
Vácuo irradiado 3kG	3,6*	3,1*	3,3*

* diferença estatística significativa em comparação ao padrão ($p < 0,05$)

Embora o grau de diferença das amostras sob vácuo tenha sido ligeiramente menor que o das amostras sob aerobiose, nos hambúrgueres bovinos, o eventual efeito protetor da embalagem não foi suficiente para minimizar as alterações sensoriais provocadas pelo processo de irradiação (Tabela 15). No hambúrguer de frango, todas as amostras embaladas sob

vácuo, mesmo as não irradiadas, demonstraram alteração de sabor em relação ao padrão. Possivelmente a embalagem contribuiu na incorporação do “sabor estranho” percebido pelos provadores, uma vez que o referencial era uma amostra recém fabricada e mantida na embalagem original de fábrica, sob aerobiose.

A estocagem, isoladamente, não exerceu efeitos significativos sobre a produção de “off flavor” nos hambúrgueres.

Os relatos na literatura relativos aos efeitos da irradiação sobre as características sensoriais dos alimentos são controversos. Kregel e colaboradores (1996) não observaram diferença nos atributos sensoriais pesquisados entre os hambúrgueres irradiados e não irradiados. Da mesma forma, Murano e sua equipe (1998) também não observaram alteração em hambúrgueres congelados e irradiados com doses de 2kGy. Mais recentemente, Montgomery e colegas (2003), com esta mesma dose de irradiação, observaram a formação de “off flavor” em todos os hambúrgueres irradiados em relação aos hambúrgueres controle.

Tabela 15. Diferença no sabor observado entre as amostras de hambúrguer bovino irradiadas e congeladas e a amostra padrão

Amostras	Dias de estocagem		
	0	60	120
Padrão	-	0,9	0,6
Aerobiose controle	1,2	1,8	1,3
Aerobiose irradiado 3kGy	3,8*	4,6*	4,2*
Aerobiose irradiado 7kGy	4,2*	4,9*	5,3*
Vácuo controle	2,2	1,9	2,5*
Vácuo 3kGy	2,5*	3,7*	3,6*
Vácuo / 7kGy	3,5*	4,4*	3,9*

* diferença estatística significativa em comparação ao padrão ($p < 0,05$)

Os efeitos provocados pela irradiação sobre os atributos sensoriais dos alimentos ainda não estão bem esclarecidos. Sabe-se que os compostos radiolíticos formados interagem com os constituintes dos alimentos levando à oxidação lipídica e à formação de compostos que alteram as características do produto, principalmente no que diz respeito à sua cor, odor e ao sabor. Participantes de painéis sensoriais têm atribuído aos alimentos irradiados diversos sabores estranhos ao produto como doce, ácido, metálico e de ranço (Montgomery *et al.*, 2003).

A cor é um atributo primário da carne fresca que interfere muito na decisão de compra do consumidor. O consumidor espera uma coloração típica para o produto e uniforme em toda a sua extensão, associando qualquer desvio fora da normalidade com deficiência na qualidade do produto (Hood, 1980). A irradiação geralmente promove o escurecimento da carne que é, muitas vezes, associado a um processo de deterioração, depreciando o produto. A formação do pigmento marrom se dá pela oxidação da mioglobina e alteração na estrutura do ferro heme (Clarke e Richards, 1971). Segundo Nanke e colaboradores (1999), a irradiação pode ainda promover a formação de um novo pigmento superficial com características semelhantes às da mioglobina e metamioglobina.

No presente trabalho foi verificada a possível alteração de cor dos hambúrgueres bovinos (Tabela 16) medindo o grau de diferença das amostras teste em comparação com um padrão não tratado e de fabricação recente. Os resultados demonstraram que todos os hambúrgueres apresentaram variações de cor perceptíveis pelo painel sensorial durante o período de estocagem. As amostras irradiadas obtiveram notas maiores, demonstrando maior diferença de cor em relação ao padrão do que as amostras controle. As alterações de cor observadas se faziam perceber pela presença de um pigmento escuro nas carnes irradiadas.

Não foi observada diferença entre os hambúrgueres mantidos sob aerobiose e os hambúrgueres embalados a vácuo, sugerindo que a embalagem não exerceu influência sobre a cor das carnes. Resultado semelhante também foi observado por Montgomery e colaboradores (2003) avaliando o efeito da embalagem de hambúrgueres irradiados em polietileno de baixa e alta permeabilidades ao oxigênio. Neste estudo nenhum dos atributos sensoriais verificados foi alterado em função da embalagem.

Tabela 16. Graus médios de diferença entre a cor das amostras de hambúrguer bovino irradiadas e congeladas e da amostra padrão

Tratamentos	Dias de estocagem		
	0	60	120
Padrão	-	0,4	0,4
Aerobiose controle	0,7	2,2*	1,9*
Aerobiose/ 3kGy	4,0*	4,9*	3,9*
Aerobiose/ 7kGy	4,2*	5,3*	4,9*
Vácuo controle	0,8	3,0*	3,2*
Vácuo / 3kGy	4,8*	5,1*	5,0*
Vácuo / 7kGy	4,0*	4,0*	4,5*

* diferença estatística significativa em comparação ao padrão ($p < 0,05$)

A proposta da análise sensorial era estabelecer uma correlação entre os valores de TBARS apresentados pelos hambúrgueres e as alterações percebidas pelos provadores. Foi obtido um coeficiente de correlação linear de $r^2=0,58$ para frango e $r^2=0,71$ para hambúrguer bovino, que apresentou maior correspondência entre as amostras com sabor mais acentuado de ranço e aquelas que apresentaram maiores valores de TBARS. Apesar de ter sido estabelecida esta correlação entre os dados da análise química e a avaliação sensorial, não foi possível estabelecer um valor de TBARS a partir do qual seja possível perceber alteração sensorial nos hambúrgueres. Tomando como base os hambúrgueres bovinos, que apresentaram maior

coeficiente de correlação, observamos que valores de TBARS menores que 1mg malonaldeído/Kg não promoveram alteração sensorial significativa nos hambúrgueres. Este talvez seja um ponto de partida para pesquisas posteriores que possam avaliar de forma mais específica a relação entre os valores de TBARS e as alterações sensoriais percebidas na carne .

6. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos, foi possível concluir que:

- ✓ a irradiação promoveu elevação, da ordem de 11%, nas concentrações de óxidos de colesterol nos hambúrgueres de carne de frango e de carne bovina congelados, sendo que neste último, não foi observada diferença entre as duas doses de irradiação empregadas;
- ✓ as condições de embalagem, individualmente, não exerceram efeito significativo sobre as concentrações de óxidos de colesterol nos dois tipos de hambúrgueres pesquisados; entretanto apresentou interação significativa com a irradiação, em que o uso de vácuo preveniu a formação de óxidos de colesterol nos hambúrgueres bovinos irradiados;
- ✓ a estocagem levou ao aumento dos níveis de óxidos de colesterol durante todo o período, para os hambúrgueres de frango, e somente no final da estocagem para os hambúrgueres bovinos;
- ✓ o efeito da composição lipídica dos hambúrgueres sobre os níveis de óxidos de colesterol manifestou-se apenas durante a estocagem, sendo que os hambúrgueres de frango apresentaram concentrações maiores de óxidos de colesterol em relação aos hambúrgueres bovinos mantidos nas mesmas condições;
- ✓ não foram observadas evidências de associação linear entre a oxidação do colesterol e a oxidação lipídica; desta forma, não se aconselha a determinação de TBARS para previsões da concentração de óxidos de colesterol nos hambúrgueres congelados submetidos à irradiação nas doses de 3 e 7 KGy.

Diante das respostas obtidas frente aos questionamentos propostos nestes estudo, pode-se concluir que a formação de óxidos de colesterol durante a irradiação não pode ser considerado um problema inerente a esta forma de processamento específica, pois o aumento na concentração destes compostos provocado pela irradiação foi similar aos relatados para outros tipos de processamento empregados na indústria de carnes. Como o vácuo mostrou-se efetivo na prevenção da oxidação durante a irradiação, se recomenda o emprego do mesmo durante a irradiação de hambúrgueres.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹AHN, D.U.; OLSON, D.G.; LEE, J.I.; JO, C.; WU, C.; CHEN, X. Packaging and irradiation effects on lipid oxidation and volatiles in pork patties. **J. Food Sci.**, Chicago, v.63, n.1, p.15-19, 1998a.
- AHN, D.U.; OLSON, D.G.; JO, C.; CHEN, X.; WU, C.; LEE, J.I. Effect of muscle type, packaging, and irradiation on lipid oxidation, volatile production, and color in raw pork patties. **Meat Sci.**, Amsterdam, v.49, n.1, p.27-39, 1998b.
- AHN, D.U.; JO, C.; DU, M.; OLSON, D.G.; NAM, K.C. Quality characteristics of pork patties irradiated and stored in different packaging and storage conditions. **Meat Sci.**, Amsterdam, v.56, p.203-209, 2000.
- AHN, D.U.; NAM, K.C.; DU, M.; JO, C. Effect of irradiation and packaging conditions after cooking on the formation of cholesterol and lipid oxidation products in meat during storage. **Meat Sci.**, Amsterdam, v.57, n.1, p.413-418, 2001.
- BOSINGER, S.; LUF, W.; BRANDL, E. Oxysterols: their occurrence and biological effects. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.3, p.1-33, 1993.
- BRASIL. Resolução - RDC n.21, de 26 de janeiro de 2001. Agência Nacional de Vigilância aprova o Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.20-E, 29 jan. 2001. Seção 1, p.35.
- BRITO, M.S.; VILLAVICENCIO, C.H.; MANCINI FILHO, J. Effects of irradiation on *trans* fatty acids formation in ground beef. **Radiat. Phys. Chem.**, Amsterdam, n.63, p.337-340, 2002.
- CARERI, M.; MANGIA, A.; MUSCI, M.; PAROLARI, G. Development of gas chromatographic method for determination of cholesterol oxides in meat products. **Chromatographia**, Wiesbaden, v.47, n.1/2, p.42-48, 1998.
- CHEN, B.H.; CHEN, Y.C. Evaluation of the analysis of cholesterol oxides by liquid chromatography. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.661, n.1/2, p.127-136, 1994.

¹ De acordo com a NBR6023/2000, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI), 2002.

- CHEN, X.; JO, C.; LEE, J.I.; AHN, D.U. Lipid oxidation, volatiles and color changes of irradiated pork patties as affected by antioxidants. **J. Food Sci.**, Chicago, v.64, n.1, p.16-19, 1999.
- CHEN, J., YEN, G. Cholesterol oxidation products in small sun-dried fish. **Food Chem.**, Oxford, v.50, p.167-170, 1994.
- CLARKE, R., RICHARDS, J.F. Effect of gamma irradiation on beef myoglobin. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.19, p.170-174, 1971.
- CSALLANY, A.S.; KINDOM, S.E.; ADDIS, P.B.; LEE, J. HPLC method for quantitation of cholesterol and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues. **Lipids**, Champaign, v.24, n.7, p.645-651, 1989.
- DEL-MASTRO, N.L. Development of food irradiation in Brazil. **Prog. Nucl. Energy**, Amsterdam, v.35, n.3, p.229-248, 1999.
- DEMPSTER, J.F. Radiation preservation of meat and meat products: a review. **Meat Sci.**, Barking, v.12, p.61-89, 1985.
- DE VORE, V.R. TBA values and 7-ketocholesterol in refrigerated raw and cooked ground beef. **J. Food Sci.**, Chicago, v.53, n.4, p.1058-1061, 1988.
- DIEHL, J.F. **Safety of irradiated foods**. New York: Marcel Dekker, 1990. 345p. (Food Science and Technology, 36).
- DU, M.; AHN, D.U.; NAM, K.C.; SELL, J.L. Influence of dietary conjugated linoleic acid and volatile profiles, color and lipid oxidation of irradiated raw chicken meat. **Meat Sci.**, Amsterdam, v.56, p.387-395, 2000.
- ENGSETH, N.J. and GRAY, J.I. Cholesterol oxidation in muscle tissue. **Meat Sci.**, Amsterdam, v.36, p.309-320, 1994.
- FARKAS, J. Irradiation as a method for decontaminating food: a review. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.44, p.189-204, 1998.
- FINOCCHIARO, E.T.; LEE, K.; RICHARDSON, T. Identification and quantification of cholesterol oxides in grated cheese and bleached butteroil. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.61, n.5, p.877-883, 1984.
- FERNÁNDEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. **Food Chem.**, Amsterdam, v.59, n.3, p.345-353, 1997.

- FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. United States Department of Agriculture, Washington, D.C. Federal Register. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov>. Acesso em: 15 maio 2000.
- FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of the total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, Birmingham, v.226, p.497-509, 1957.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Food Irradiation**. Disponível em: <http://www.fda.gov/fdac/features>. Acesso em: 26 mar. 2000.
- GALVIN, K.; MORRISSEY, P.A.; BUCKLEY, D.J. Cholesterol oxides in processed chicken muscle as influenced by dietary alfa-tocopherol supplementation. **Meat Sci.**, Amsterdam, v.48, n.1, p.1-9, 1998a.
- GIROUX, M.; LACROIX, M. Nutritional adequacy of irradiated meat: a review. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v.31, n.4, p.257-264, 1998.
- GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; RAFECAS, M.; GRAU, A.; JORDAN, A.; BOATELLA, J. Oxysterol formation in egg powder and relationship with other quality parameters. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.43, p.1903-1907, 1995b.
- GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; ADDIS, P.B.; RAFECAS, M.; BOATELLA, J. Biological effects of oxysterols: current status. **Food Chem. Toxicol.**, Amsterdam, v.34, n.2, p.193-211, 1996.
- GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; RAFECAS, M.; GRAU, A.; JORDAN, A.; BOATELLA, J. Oxysterols formation in spray-dried egg processed and stored under various conditions: prevention and relationship with other quality parameters. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.45, p.2229-2243, 1997.
- GREENBERG, R.A. **Irradiated foods**. 4.ed. New York: American Council on Science and Health, 1996. 32p.
- GRUIZ, K.; KISS, I. Effect of ionizing radiation on the lipid in frozen poultry. **Acta Aliment.**, Budapest, v.16, n.2, p. 111-127, 1987.
- HAMPSON, J.; FOX, J.B.; LAKRITZ, L.; THAYER, D.W. Effect of low dose gamma irradiation on five different meats. **Meat Sci.**, Amsterdam, v.42, n.3, p.271-276, 1996.
- HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. **Lab. Pract.**, London, v.22, p.475-476, 1973.

- HEATH, J.L.; OWENS, S.L.; TESCH, S.; HANNAH, K.W. Effect of high energy electron irradiation of chicken meat on thiobarbituric acid values, shear values, odor and cooked yield. **Poult. Sci.**, Savoy, v.69, n.2, p.313-319, 1990.
- HIGLEY, N.A.; TAYLOR, S.L. Cholesterol oxides in processed meats. **Meat Sci.**, Amsterdam, v.16, p.175-188, 1986.
- HOOD, D.E. Factors affecting the rate of metmyoglobin accumulation in prepackaged beef. **Meat Sci.**, Amsterdam, v.4, p.247-265, 1980.
- HWANG, K.T.; MAERKER, G. Quantitation of cholesterol oxidation products in unirradiated and irradiated meats. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.70, n.4, p.371-375, 1993a.
- HWANG, K.T.; MAERKER, G. Determination of 6-ketocholesterol in unirradiated and irradiated chicken meats. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.70, n.8, p.789-792, 1993b.
- IGENE, J.O.; PEARSON, A.M.; MERKEL, R.A.; COLEMAN, T.H. Effect of frozen storage time, cooking and holding temperature upon extractable lipids and TBA value of beef and chicken. **J. Anim. Sci.**, Savoy, v.49, p.701, 1979.
- KANATT, S.R.; PAUL, P.; D'SOUZA, S.F.; THOMAS, P. Effect of gamma irradiation on the lipid peroxidation in chicken, lamb and buffalo meat during chilled storage. **J. Food Saf.**, Trumbull, v.17, p.283-294, 1997.
- KANATT, S.R.; PAUL, P.; D'SOUZA, S.F.; THOMAS, P. Lipid peroxidation in chicken meat during chilled storage as affected by antioxidants combined with low-dose gamma irradiation. **J. Food Sci.**, Chicago, v.63, n.2, p.198-200, 1998.
- KEITH, L.H. Principles of environmental analysis. **Anal. Chem.**, Washington, v.55, n.14, p.2211-2218, 1983.
- KENDALL, C.W.; KOO, M.; SOKOLOFF, E.; KESAVA-RAO, V. Effects of dietary oxidized cholesterol on azoxymethane-induced colonic preneoplasia in mice. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v.66, p.241-248, 1992.
- KESAVA-RAO, V.; KOWALE, B.N.; BABU, N.P.; BISHT, G.S. Effect of cooking and storage on lipid oxidation and development of cholesterol oxidation products in water buffalo meat. **Meat Sci.**, Amsterdam, v.43, n.2, p.179-185, 1996.

- KIM, S.K.; NAWAR, W.W. Oxidative interactions of cholesterol with triacylglycerols. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.68, n.12, p.931-934, 1991.
- KREGEL, K.K.; PRUSA, K.J.; HUGLES, K.V. Cholesterol content and sensory analysis of ground beef as influenced by fat level, heating and storage. **J. Food Sci**, Chicago, v.51, n.5, p.1162-1165, 1986.
- KUMAR, N.; SINGHAL, O.P. Cholesterol oxides and atherosclerosis: a review. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.55, p.497-510, 1991.
- JO, C.; AHN, D.U.; LEE, J.I. Lipid and cholesterol oxidation, color changes, and volatile production in irradiated raw pork batters with different fat content. **J. Food Qual.**, Trumbull, v.22, p.641-651, 1999.
- LAGUNAS-SOLAR, M.C. Radiation processing of foods: an overview of scientific principles and current status. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.58, n.2, p.186-192, 1995.
- LEFEBVRE, N.; THIBAUT, C.; CHARBONNEAU, R.; PIETTE, J.P.G. Improvement of shelf-life and wholesomeness of ground beef by irradiation. 2. Chemical analysis and sensory evaluation. **Meat Sci.**, Amsterdam, v.36, N.3, p.371-380, 1994.
- LEBOVICS, V.K.; GAAL, O. Cholesterol oxides in γ -irradiated spray-dried egg powder. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.60, p.251-254, 1992.
- LEBOVICS, V.K.; GAAL, O. Influence of packaging atmosphere on the formation of cholesterol oxides in γ -irradiated egg powder. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.66, p.71-73, 1994.
- LEE, M.; SEBRANEK, J.G.; OLSON, D.G.; DICKSON, J.S. Irradiation and packaging of fresh meat and poultry. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.59, n.1, p.62-72, 1995.
- LEE, J.I.; KANG, S.; AHN, D.U.; LEE, M. Influences of electron-beam irradiation, cooking and packaging conditions on cholesterol oxidation products of pork meat. **Korean J. An. Sci.**, Cheju, v.40, n.5, p.517-528, 1999a.
- LEE, J.I.; KANG, S.; AHN, D.U.; LEE, M. Effects of electron-beam irradiation and storage on cholesterol oxides products of beef meat. **Korean J. Food Sci. Technol.**, Seoul, v.6, p.1312-1320, 1999b.

- LEE, J.I.; KANG, S.; AHN, D.U.; LEE, M. Formation of cholesterol oxides in irradiated raw and cooked chicken meat during storage. **Poult. Sci.**, Savoy, v.80, p.105-108, 2001.
- LINSEISEN, J.; WOLFRAM, G. Origin, metabolism, and adverse health effects of cholesterol oxidation products. **Fett/Lipid**, Weinheim, v.100, n.6, p.211-218, 1998.
- LOAHARANU, P. International trade in irradiated foods: regional status and outlook. **Food Technol.**, Chicago, v.43, n.7, p.77-80, 1989.
- LONG, G.L.; WINEFORDNER, J.D. Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. **Anal. Chem.**, Columbus, v.55, n.7, p.712A-724A, 1983.
- MAERKER, G. Cholesterol autoxidation - current status. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.64, n.3, p.388-392, 1987.
- MAERKER, G.; JONES, K.C. Unusual product ratios resulting from the gamma-irradiation of cholesterol liposomes. **Lipids**, Champaign, v.26, n.2, p.139-144, 1991.
- MAERKER, G.; JONES, K.C. Gamma irradiation of individual cholesterol oxidation products. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.69, n.5, p.451-453, 1992.
- MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. Boca Raton: CRC Press, 1987. 302p.
- MONTGOMERY, J.L.; PARRISH JR, F.C.; OLSON, D.G.; DICKSON, J.S.; NIEBUHR, S. Storage and packaging effects on sensory and color characteristics of ground beef. **Meat Sci.**, Amsterdam, v.64, p.357-363, 2003.
- MORALES-AIZPURUA, I.C.; TENUTA-FILHO, A. Óxidos de colesterol: ocorrência em alimentos, formação e efeitos biológicos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v.38, n.4, p.431-442, 2002.
- MORGAN, J.N.; ARMSTRONG, D.J. Quantification of cholesterol oxidation products in egg yolk powder spray-dried with direct heating. **J. Food Sci.**, Chicago, v.57, n.1, p.43-45, 1992.
- MOURA, A.F.P.; TENUTA-FILHO, A. Efeito do processamento sobre os níveis de colesterol e 7-cetocolesterol em camarão-rosa. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.22, n.2, p.117-121, 2002.

- MURANO, P.S.; MURANO, E.A.; OLSON, D.G. Irradiated ground beef: sensory and quality changes during storage under various packaging conditions. **J. Food Sci**, Chicago, v.63, n.3, p.548-551, 1998.
- NAM, K.C.; DU, M.; JO, C.; AHN, D.U. Cholesterol oxidation products in irradiated raw meat with different packaging storage time. **Meat Sci.**, Amsterdam, v.58, p.431-435, 2001.
- NAWAR, W.W. Radiolysis of nonaqueous components of foods In: JOSEPHSON, E.S., PETERSON, M.S., eds. **Preservation of food by ionizing radiation**. Boca Raton: CRC Press, 1983. v.2, p. 75-124.
- NIELSEN, J.H.; OLSEN, C.E.; JENSEN, C.; SKIBSTED, L.H. Cholesterol oxidation in butter and dairy spread during storage. **J. Dairy Res.**, Cambridge, v.63, p.159-167, 1996a.
- OHSHIMA, T.; SHOZEN, K.; USHIO, H.; KOIZUMI, C. Effects of grilling on formation of cholesterol oxides in seafoods products rich in polyunsaturated fatty acids. **Lebensm.-Wiss. Technol.**, Amsterdam, v.29, n.1/2, p.94-99, 1996.
- OHTANI, K.; MIYABARA, K.; OKAMOTO, E.; KAMEI, M.; MATSUI-YUASA, I. Cytotoxicity of 7-ketocholesterol toward cultured rat hepatocytes and the effect of vitamin E. **Biosci., Biotechnol., Biochem.**, Tokyo, v.60, n.12, p.1989-1993, 1996.
- OHTANI, K.; TERADA, T.; KAMEI, M.; MATSUI-YUASA, I. Cytotoxicity of cholestane 3 β ,5 α ,6 β -triol on cultured intestinal epithelial crypt cells (IEC-6). **Biosci., Biotechnol., Biochem.**, Tokyo, v.61, n.4, p.573-576, 1997.
- OLIVEIRA, L.C. Present situation of food irradiation in South America and the regulatory perspectives for Brazil. **Radiat. Phys. Chem.**, Amsterdam, v.57, p.249-252, 2000.
- OLSON, D.G. Irradiation of food. **Food Technol.**, Chicago, v.52, n.1, p.56-62, 1998.
- OSADA, K.; KODAMA, T.; CUI, L.; YAMADA, K.; SUGANO, M. Levels and formation of oxidized cholesterols in processed marine foods. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.41, p.1893-1898, 1993b.
- PANIANGVAIT, P.; KING, A.J.; JONES, A.D.; GERMAN, B.G. Cholesterol oxides in foods of animal origin: a critical review. **J. Food Sci.**, Chicago, v.60, n.6, p.1159-1174, 1995.

- PARK, P.W.; GUARDIOLA, F.; PARK, S.H.; ADDIS, P.B. Kinetic evaluation of 3 β -hydroxycholesterol-5-en-7-one (7-ketocholesterol) stability during saponification. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.73, n.5, p.623-629, 1996.
- PENG, S.; HU, B.; MORIN, R.J. Angiotoxicity and atherogenicity of cholesterol oxides. **J. Clin. Lab. Anal.**, Hoboken, v.5, p.144-152, 1991.
- PIE, J.E.; SPAHIS, K.; SEILLAN, C. Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: identification and quantification of cholesterol oxides. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.38, p.973-979, 1990.
- PIE, J.E.; SPAHIS, K.; SEILLAN, C. Cholesterol oxidation in meat products during cooking and frozen storage. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.39, p.250-254, 1991.
- PIKUL, J.; LESZCZYNSKI, D.E.; KUMMEROW, F.A. Relative role of phospholipids, triacylglycerols, and cholesterol esters on malonaldehyde formation in fat extracted from chicken meat. **J. Food Sci.**, Chicago, v.49, p.704-708, 1984.
- PREGNOLATTO, W.; PREGNOLATTO, N.P. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. 533p.
- PSZCZOLA, D. Irradiated poultry makes U.S. Debut in MidWest and Florida markets. **Food Technol.**, Chicago, p.89-96, 1993.
- RANKIN, S.A.; PIKE, O.A. Cholesterol autoxidation inhibition varies among several natural antioxidants in a aqueous model system. **J. Food Sci.**, Chicago, v.58, n.3, p.653-655, 1993.
- RHEE, K.S.; ANDERSON, L.M.; SAMS, A.R. Lipid oxidation potential of beef, chicken and pork. **J. Food Sci.**, Chicago, v.61, n.1, p.8-12, 1996.
- ROBERTS, W.T.; WEESE, J.O. Shelf life of ground beef patties treated by gamma radiation. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.61, n.10, p.1387-1389, 1998.
- ROSE-SALLIN, C.; HUGGETT, A.C.; BOSSET, J.O.; TABACCHI, R.; FAY, L.B. Quantification of cholesterol oxidation products in milk powders using [²H₇]Cholesterol to monitor cholesterol autoxidation artifacts. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.43, p.935-941, 1995.

- SANDER, B.D.; ADDIS, P.B.; PARK, S.W.; SMITH, D.E. Quantification of cholesterol products in a variety of foods. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.52, n.2, p.109-114, 1989.
- SEVANIAN, A.; PETERSON, A.R. The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. **Food Chem. Toxicol.**, Amsterdam, v.24, p.1103-1110, 1986.
- SHOZEN, K.; OHSHIMA, T.; USHIO, H.; KOIZUMI, C. Formation of cholesterol oxides in marine fish products induced by grilling. **Fish. Sci.**, Carlton, v.61, n.5, p.817-821, 1995.
- SMITH, L.L. Cholesterol autoxidation. **Chem. Phys. Lipids**, Amsterdam, v.44, p.87-125, 1987.
- SMITH, L.L.; JOHNSON, H. Biological activities of oxysterols. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.7, p.285-332, 1989.
- SMITH, L.L. Mechanisms of formation of oxysterols: a general survey. In: CRASTES DE PAULET, A.; DOUSTE-BLAZY, L.; PAOLETTI, R., eds. **Free radicals lipoproteins, and membrane lipids**. New York: Plenum Press, 1990. p.115-132.
- SOUZA, P.H. **Brazilian meat can now be processed for "longer life"**. Disponível em: <http://www.techion.com/techion.htm>. Acesso em: 23 mar. 2000.
- STONE, H.S.; SIDEL J.L. **Sensory evaluation practices**. San Diego: Academic Press, 1993. 338p.
- TAI, C.Y.; CHEN, Y.C.; CHEN, B.H. Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods: an overview (Part I). **J. Food. Drug Anal.**, Taipei, v.7, n.4, p.243-257, 1999.
- TARLADGIS, B.G.; WATTS, B.M. Malonaldehyde production during the controlled oxidation of pure unsaturated fatty acids. **J. Am. Chem. Soc.**, Columbus, v.37, p-44-49, 1960.
- TENUTA-FILHO, A.; MORALES-AIZPURÚA, I.C.; MOURA, A.F.P.; KITAHARA, S.E. Óxidos de colesterol em alimentos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v.39, n.3, p.319-325, 2003.
- THAKUR, B.R.; SINGH, R.K. Food irradiation: chemistry and applications. **Food Rev. Int.**, Monticello, v.10, n.4, p.437-473, 1994.

URBAIN, W. M. **Food irradiation**. Orlando: Academic Press, 1986. 351p.

VESTERGAARD, C.S.; PAROLARI, G. Lipid and cholesterol oxidation products in dry-cured ham. **Meat Sci.**, Amsterdam, v.52, p.397-401, 1999.

VYNCKE, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette, Seifen, Anstrichm.**, Leinfelden, v.72, n.12, p.1084-1087, 1970.

ZUBILLAGA, M.P.; MAERKER, G. Quantification of three cholesterol oxidation products in raw meat and chicken. **J. Food Sci.**, Chicago, v.56, n.5, p.1194-1197, 1991.

ZULAK, I.M.; MAERKER, G. Cholesterol Oxides III. Autoxidation of cholesterol in sodium stearate and sodium linoleate dispersions. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.66, p.1499-1503, 1989.

ZUNIN, P. Cholesterol oxidation in baked foods containing fresh and powdered eggs. **J. Food Sci.**, Chicago, v.60, n.5, p.913-916, 1995.

8. ANEXOS

ANEXO 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 66

São Paulo, 24 de junho de 2003.

Ilmo(a) Sr(a).
Alfredo Tenuta Filho

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 23 de junho p.passado, **APROVOU** o projeto "Avaliação sensorial de hambúrgueres de carne bovina e de frango irradiados" (Protocolo nº 189) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 - item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Tit. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP

ANEXO 2**Avaliação sensorial
Distinção dos quatro gostos básicos**

Nome: _____

Por favor, prove cada amostra codificada e marque com um X a qualidade do gosto percebido: amargo, ácido, doce ou salgado. Caso não perceba nenhum gosto (como "água pura"), assinale a opção "outros".

Amostra	Doce	Salgado	Ácido	Amargo	Outros
321					
987					
840					
519					
652					
134					

Comentários: _____

Soluções:

Gosto doce: solução de sacarose 3g/100mL

Gosto salgado: solução de NaCl 1g/100mL

Gosto ácido: solução de ácido cítrico 0,15g/100mL

Gosto amargo: solução de cafeína ou quinino 0,05g/100mL

Água destilada

Material:

Copos descartáveis para café

4 Balões volumétricos 500mL

Caneta para retroprojeto

Fichas do teste

Procedimento:

Montar um conjunto de 6 amostras, de acordo com a codificação da ficha:

- 15mL de cada solução
- repetição de uma das soluções
- 15ml de água pura

Critério de seleção dos voluntários: 100% de acerto

ANEXO 3

Teste de Reconhecimento de Odores

Nome: _____

Procedimento:

- 1) Leve seu nariz próximo a cada copo codificado. Retire cuidadosamente a capa de papel alumínio aspirando o odor ali presente. Descreva o odor percebido no espaço em frente ao número da amostra.
- 2) Avalie o segundo conjunto de amostras e relacione cada aroma deste segundo conjunto ao seu correspondente no primeiro conjunto.

Primeiro conjunto de aromas	Descritor	Segundo conjunto de aromas	Escreva o número da amostra correspondente no primeiro conjunto
271		107	
513		830	
298		052	
357		960	
171		814	
769		374	
392		090	
805		786	
629		579	
441		243	
903		477	
255		611	
310		139	
028		523	

Comentários:

Respostas:

Primeiro conjunto de aromas	Descritor	Segundo conjunto de aromas	Escreva o número da amostra correspondente no primeiro conjunto
271	Cebola	107	310
513	Café	830	629
298	Vinagre	052	805
357	Baunilha	960	769
171	Azeite de oliva	814	392
769	Queijo parmesão ralado	374	255
392	Cravo da Índia	090	903
805	Casca de laranja	786	171
629	Hortelã	579	357
441	Louro	243	513
903	Essência de eucalipto	477	028
255	Chocolate em pó	611	298
310	Cerveja	139	374
028	Essência de morango	523	271

Material:

Copos descartáveis para água
Papel alumínio
Fichas dos testes

Atribuição de pontos:

Respostas corretas: 2 pontos
Associação: 1 ponto. Exemplo: amostra é orégano e candidato descreve "pizza".
Respostas erradas: 0

Critério de aprovação:

23 a 28 pontos: aprovado
17 a 22 pontos: depende do resultado dos demais testes
menos de 17 pontos: reprovado

ANEXO 4**CADASTRO DE PROVADORES
ANÁLISE SENSORIAL DE ALIMENTOS**

Estamos recrutando pessoas interessadas em compor uma equipe para avaliação sensorial de hambúrgueres de carne bovina e de frango. Os indivíduos serão previamente selecionados e treinados de acordo com o cronograma proposto abaixo. Por favor, avalie a sua disponibilidade em participar do nosso estudo e, se estiver interessado, preencha o questionário abaixo.

Nome: _____

Telefone para contato/ramal: _____

E-mail: _____

1. Veja o cronograma abaixo e diga se existe algum dia ou horário durante o qual você não poderá participar das avaliações sensoriais? Quais? (Vide cronograma).

Dias	2002		2003					
	Nov.	Dez.	Jan.	Fev.	Mar.	Abril	Maio	Jun.
	21	04 11 18	08 15 22 29	05 12 26	05 12 19	02 09 16 23	07 14 21	25

2. Indique os períodos em que você pretende tirar férias entre novembro de 2002 e julho de 2003.

3 Indique nas escalas abaixo o quanto você gosta ou desgosta de:

HAMBÚRGUER BOVINO:

- () 9.gosto muitíssimo
- () 8.gosto muito
- () 7.gosto moderadamente
- () 6.gosto ligeiramente
- () 5.não gosto/ nem desgosto
- () 4.desgosto ligeiramente
- () 3.desgosto moderadamente
- () 2.desgosto muito
- () 1.desgosto muitíssimo

HAMBÚRGUER DE FRANGO:

- () 9.gosto muitíssimo
- () 8.gosto muito
- () 7.gosto moderadamente
- () 6.gosto ligeiramente
- () 5.não gosto/ nem desgosto
- () 4.desgosto ligeiramente
- () 3.desgosto moderadamente
- () 2.desgosto muito
- () 1.desgosto muitíssimo

4. Com que frequência você consome HAMBÚRGUERES em suas refeições:

- ☐ diariamente
☐ de 2 a 5 vezes por semana
☐ 1 vez por semana
☐ ocasionalmente (menos de 1 vez por semana, na média)
☐ raramente

5. Você tem algum problema de saúde que restrinja o consumo de qualquer tipo de carne?
☐ sim ☐ não

Em caso positivo, especifique: _____

6. Está fazendo uso de algum tipo de medicamento?

- ☐ sim ☐ não

Em caso positivo, especifique: _____

7. Possui algum tipo de alergia?

- ☐ sim ☐ não

8. É fumante:

- ☐ sim ☐ não

9. Marque na linha à direita de cada figura, um trecho que indique a proporção da figura que foi coberta de preto. Não use régua, apenas sua capacidade visual de avaliar!

Exemplo:

nenhuma toda

nenhuma toda

nenhuma toda

nenhuma toda

9. Caso deseje fazer algum comentário, use o espaço abaixo.

Termo de responsabilidade:

Estou ciente dos objetivos da referida avaliação sensorial, sou responsável pela veracidade das informações apresentadas nesta ficha e autorizo os responsáveis pela condução dos testes a utilizar as informações na seleção de candidatos a provadores.

São Paulo, ____/____/ 2002.

Assinatura
RG.

ANEXO 5

Nome: _____ Data: __/__/__

Avaliação Sensorial de Hambúrguer de Frango

1) Você está recebendo uma amostra padrão (P) e cinco amostras codificadas de hambúrguer de frango. Por favor, prove a amostra padrão e em seguida prove cada uma das amostras codificadas e avalie, utilizando a escala abaixo, o quanto cada amostra difere, em relação ao SABOR, da amostra padrão.

0 = nenhuma diferença

1

2

3

4

5

6

7 = extremamente diferente**Amostra Grau de diferença**

710

128

932

429

356

Caso perceba algum sabor ou gosto estranho nas amostras diferentes da padrão (P), descreva-o: