

Processo de fritura descontínua: alterações nos óleos e gorduras e contribuição às ações de Vigilância Sanitária.

Eliana Rodrigues Machado

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores: Shirley de Mello Pereira Abrantes

María Del Carmen Dobarganes García

Rio de Janeiro

2006

FOLHA DE APROVAÇÃO

Processo de fritura descontínua: alterações nos óleos e gorduras e contribuição às ações de
Vigilância Sanitária.

Eliana Rodrigues Machado.

Tese de Doutorado submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovado:

Prof. _____ (FEA/UNICAMP)

Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves

Prof. _____ (INCQS/FIOCRUZ)

Dra. Helena Pereira da Silva Zamith

Prof. _____ (INCQS/FIOCRUZ)

Dr. Marcio Labastie

Prof. _____ (DTA/UFRRJ)

Dra. Djalva Maria da Nobrega Santana

Orientador: Prof. _____ (INCQS/FIOCRUZ)

Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes

Rio de Janeiro

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Machado, Eliana Rodrigues

Processo de fritura descontínua: alterações nos óleos e gorduras e contribuição às ações de Vigilância Sanitária / Eliana Rodrigues Machado. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2006.

xvi, 92 p., il., tab.

Tese de Doutorado em Vigilância Sanitária, Progr. de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária / INCQS, 2006. Orientadores: Shirley de Mello Pereira Abrantes e María Del Carmen Dobarganes García.

1. Óleos de fritura. 2. Validação de testes rápidos. 3. Monoepoxiácidos. 4. Monocetoácidos. 5. Monohidroxiácidos. 6. Ácido *trans*-9,10-epoxiesteárico. I. Título.

À minha querida filha Luíza Helena.
“Obrigada Lulu, por sua compreensão”.

Pela graça de Deus este trabalho de tese foi realizado. E o que esteve mais presente nesta caminhada foi: o AMOR a Deus, ao próximo e à minha profissão; a PERSEVERANÇA e o DESTEMOR ao mal.

Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei.

(1 Coríntios 13:2)

Justificados, pois, mediante a fé, temos paz com Deus por meio de nosso Senhor Jesus Cristo; por intermédio de quem obtivemos igualmente acesso, pela fé, a esta graça na qual estamos firmes; e gloriamo-nos na esperança da glória de Deus. E, não somente isto, mas também nos gloriamos nas próprias tribulações, sabendo que a tribulação produz perseverança; e a perseverança, experiência; e a experiência, esperança. Ora, a esperança não confunde, porque o amor de Deus é derramado em nosso coração pelo Espírito Santo, que nos foi outorgado.

(Romanos 5: 1-5)

Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal nenhum, porque tu
(Deus) estás comigo; o teu bordão e o teu cajado me consolam.

(Salmos 23:4)

...não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou o teu Deus; eu te
fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a minha destra fiel.

(Isaías 41: 10)

AGRADECIMENTOS

A Deus. “Rendei graças ao Senhor, porque ele é bom e a sua misericórdia dura para sempre” (Salmos 107: 1).

Aos meus pais, por seu Amor e exemplos de humildade, integridade e força.

Às minhas tias Cordélia e Lecy por sua generosidade e solidariedade.

Aos meus avós, irmãos, tios, sobrinhos, primos, cunhados por sua presença em minha vida.

À Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes por sua orientação, ensinamentos, exemplo, confiança e constante presença.

À Dra. María Del Carmen Dobarganes García por ter me recebido em seu laboratório, por sua orientação, ensinamentos, confiança, entusiasmo e constante presença.

À FIOCRUZ, na pessoa do Dr. Paulo Buss, onde iniciei a minha vida profissional, pois me proporcionou a oportunidade de realizar este projeto que culminou em meu crescimento profissional e pessoal.

Ao “Instituto de la Grasa” - “Consejo Superior de Investigaciones Científicas”, Sevilha, Espanha, na pessoa do Dr. Francisco Millán Rodriguez, onde grande parte deste trabalho de tese foi realizado.

Ao Dr. André Gemal, diretor do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS / FIOCRUZ), por sua confiança e apoio ao meu trabalho.

À Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves por sua confiança, sugestões e interesse neste trabalho.

À Dra. Helena da Silva Zamith por seus ensinamentos, sugestões, confiança e interesse neste trabalho.

Ao Dr. Romeu Vianni por seu incentivo em uma das áreas do meu amor profissional, “óleos e gorduras comestíveis e suas implicações na saúde”.

A Dra. Djalva da Nóbrega Santana por seus ensinamentos, reconhecimento e interesse neste trabalho.

Ao Dr. Marcio Labastie por sua contribuição no trabalho estatístico.

À Anna Paula Santilio e Carmen Santilio pela ajuda, amizade e dedicação.

Às amigas Beth, Vera Alice e Marli, por sua amizade e ajuda.

À Rosana Ferreira pelo auxílio no trabalho gráfico desta tese.

Ao Handerson Ferreira e Márcio de Oliveira pelo auxílio na parte gráfica, para a apresentação deste trabalho.

À Mercedes Gimenez e Susana Marmesat, do “Instituto de la Grasa”, pelo aprendizado da prática dos métodos analíticos físico-químicos utilizados neste trabalho de tese, obrigada pela boa-vontade e disposição em auxiliar.

Aos colegas do INCQS, em especial, Rosana, Heloísa e Reginelena pela amizade e incentivo.

Aos irmãos do Ministério Apostólico Grande Colheita por suas orações, amizade, carinho e presença sempre.

Aos irmãos da Igreja Evangélica “Prosperidad”, em especial, Loli, Melania e Juan Manuel, por suas orações, acolhida, carinho e amizade.

Aos funcionários da biblioteca do INCQS, em especial à Maria Luiza, Marta e Carla pelo auxílio no trabalho de bibliografia.

Aos funcionários da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária pela atenção dispensada.

Aos funcionários do INCQS e a todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho de tese.

Aos funcionários do “Instituto de la Grasa” pelo agradável convívio e auxílio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estágio de doutorando no exterior.

RESUMO

Nos óleos e gorduras usados em frituras são formadas substâncias relacionadas a um grande número de patologias. Os grupos dos monoepoxiácidos (EPOXI), monocetoácidos (CETO) e monohidroxiácidos (HIDROXI) produzidos na fritura são relevantes sob o ponto de vista quantitativo. A toxicidade dos EPOXI e de seus metabólitos tem sido demonstrada. O Brasil não possui legislação federal para uso destes óleos e gorduras e as legislações internacionais estabelecem parâmetros obtidos através de análises laboratoriais. Porém, os serviços de fiscalização nesta área requerem testes rápidos aplicáveis *in situ*. No entanto, não há teste rápido cuja confiabilidade tenha sido comprovada. Pelo exposto, para contribuir com estudos de avaliação de risco de alimentos fritos e com uma fiscalização efetiva e eficiente nesta área, os objetivos deste estudo foram obter dados de teor de EPOXI, CETO e HIDROXI e avaliar a citotoxicidade de monoepóxido formado significativamente; como também validar os testes rápidos. Os óleos refinados de palma e de soja e a gordura de soja parcialmente hidrogenada provenientes de experimentos de fritura descontínua de batatas foram analisados. Foram utilizados os testes rápidos *Viscofrit* (VF) e *Food oil sensor* (FOS) e os métodos analíticos de determinação de ácidos graxos, polímeros, EPOXI, CETO e HIDROXI, através de técnicas cromatográficas a líquido de partição por tamanho de partículas, de adsorção em fase sólida, e a gás de alta resolução. Também foi avaliada a citotoxicidade *in vitro* do ácido *trans*-9,10-epoxiesteárico (EPO), monoepoxiácido formado em quantidades relevantes a partir de óleos e gorduras oriundos de fritura de batatas, em células de hepatoma de ratos, HTC (*Hepatoma Tissue Culture*), através do ensaio de viabilidade celular mediado pelo diacetato de fluoresceína e brometo de etídio. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram: que o óleo de palma e a gordura hidrogenada apresentam maior tendência à formação de EPOXI, CETO e HIDROXI, e menor tendência à degradação do que o óleo de soja. Os grupos mencionados acima constituem quantitativamente uma fração muito importante das substâncias de degradação. O teste rápido FOS foi o de escolha para decidir o momento de descarte de óleos e gorduras não conformes. O EPO foi citotóxico em células hepáticas HTC.

ABSTRACT

Substances related to a high number of diseases can be present in used frying fats and oils. Among the new groups of compounds originated at frying temperatures, monoepoxyacids, monocetoacids and monohydroxyacids are quantitatively important. Toxicity of monoepoxyacids and its metabolites has been demonstrated. Brazil does not have Federal Laws regulating these oils and fats. However, international legislations in many countries have established parameters obtained from laboratorial analyses to limit the degradation of used frying fats and oils for human consumption. In this respect, inspections in this area require rapid tests to be applied *in situ*. There isn't rapid test which reliability has been confirmed. Contributing with risk assessment of the frying foods and the effective inspection, the targets of this work were to obtain data of monoepoxyacids, monocetoacids and monohydroxyacids contents and evaluate the cytotoxicity of the significantly formed monoepoxyde, as well as validate the rapid tests. Soybean oil, palm oil and partially hydrogenated vegetable fat used in frying to prepare chips were analyzed. Rapid tests based on physical properties Viscofrit (VF) and Food oil sensor (FOS) were evaluated to determine the point at which frying fats and oils should be discarded. Also, chromatographic techniques based on molecular size distribution, solid phase adsorption and high-resolution gas were applied for quantitative determination of fatty acids, polar compounds, polymers, polar fatty acids, monoepoxyacids, monocetoacids and monohydroxyacids. Cytotoxicity *in vitro* of *trans*-9, 10-epoxystearic acid in HTC cells through out phluorescein *di*-acetate and ethidium bromide was also evaluated. The results showed that palm oil and partially hydrogenated vegetable fat present higher tendency to the formation of monoepoxyacids, monocetoacids and monohydroxyacids, than soybean oil. The groups mentioned above are very important from a quantitative point of view among the fatty acids undergoing degradation. Rapid test FOS was the choice to decide the moment of discarding used frying oils and fats according to the present international regulations. *Trans*-9, 10-epoxystearic acid was cytotoxic in hepatic HTC cells.

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*

AGPI - Ácido graxo polinsaturado

AGMI - Ácido graxo monoinsaturado

BIBRA - *British Industrial Biological Research Association*

CETO - Monocetoácidos

CIS EPO - Ácido *cis*-9,10-epoxiesteárico

CP - Composto polar

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDTA dissódico - Sal dissódico do ácido etileno diamino tetra acético

EMAG - Éster metílico de ácido graxo

EPA - *Environmental Protection Agency*

EPO - Ácido *trans*-9,10-epoxiesteárico

EPOXI - Monoepoxiácidos

FN - Falsos negativos

FOS - *Food oil sensor*

FP - Falsos positivos

FT - *Fritest*

HIDROXI - Monohidroxiácidos

HTC - *Hepatoma Tissue Culture*

IDA - Ingestão diária aceitável

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

MEM - Meio Essencial Mínimo com sais de Eagle

MUFA - *Monounsaturated fatty acids*

NADPH - fosfato de dinucleotídeo de adenina nicotinamida, forma reduzida

NOAEL - nível sem efeito adverso observado

OSE - Óleo de soja epoxidado

OT - *Oxifritest*

PBS – Solução salina tamponada de fosfato

PUFA - *Polyunsaturated fatty acids*

PVC - Poli-(cloreto de vinila)

SFC - *Scientific Committee on Food*

UE - União Européia

VF - *Viscofrit*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Alterações em óleos e gorduras em processo de fritura.....	2
Figura 2. Parte dos gráficos das análises cromatográficas a gás dos EMAG polares.....	76
Figura 3. Prováveis destinos e metabolismo do EPO após exposição oral.....	78
Figura 4. Gráficos das análises, cromatográficas a líquido, de determinação do teor de polímeros.....	81

SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xv
SUMÁRIO.....	xvi
1 - Introdução.....	1
2 - Objetivos.....	6
2.1- Objetivos gerais.....	6
2.2 - Objetivos específicos.....	6
3 - Resultados.....	7
3.1 - MANUSCRITO 1 - Avaliação quantitativa de monoepoxiácidos, monocetoácidos e monohidroxiácidos em óleos e gorduras provenientes de fritura descontínua de batatas.....	8
3.2 - MANUSCRITO 2 - Avaliação da citotoxicidade do ácido <i>trans</i> -9,10-epoxiesteárico, um produto da termoxidação de óleos e gorduras usados em frituras.....	24
3.3 - MANUSCRITO 3 - <i>Quality of used frying fats and oils: comparison of rapid tests based on chemical and physical oil properties</i>	32
3.4 - MANUSCRITO 4 - Alterações da gordura vegetal parcialmente hidrogenada em fritura de batatas.....	41
3.5 - MANUSCRITO 5 - Alterações dos óleos de palma e de soja em fritura descontínua de batatas.....	50
3.6 - MANUSCRITO 6 - Estudos preliminares de validação de testes rápidos para avaliação de óleos e gorduras usados em frituras - contribuição para a Saúde Pública.....	62
4 - Discussão.....	74
5 - Conclusões.....	86
6 - Referências bibliográficas.....	87

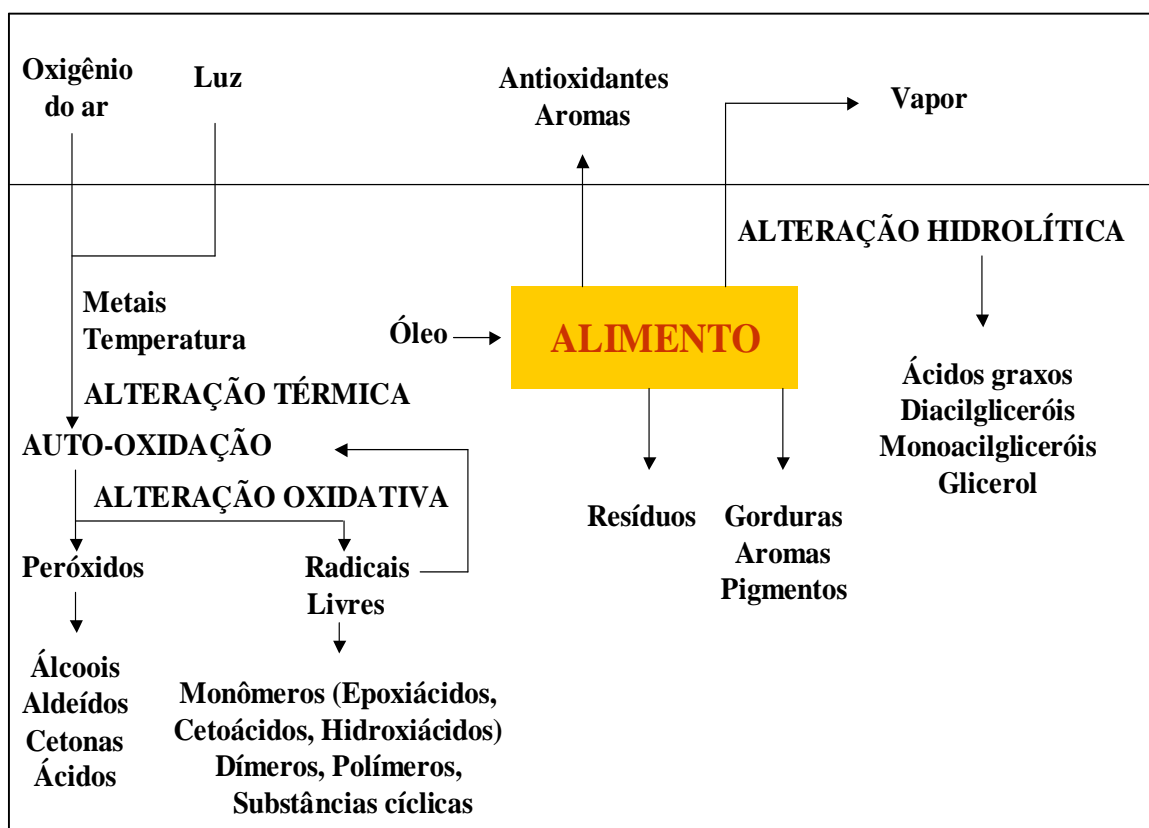
1 - INTRODUÇÃO

A principal característica de qualidade do alimento é a sua segurança. O consumo de alimentos preparados em processos de fritura deve ser considerado um problema relevante de Vigilância Sanitária no Brasil, pois os alimentos fritos são altamente consumidos pela nossa população e as substâncias provenientes da degradação dos óleos e gorduras em uso nestes processos estão relacionadas a uma série de doenças no homem e em animais (COHN, 2002; DOBARGANES; MÁRQUEZ-RUIZ, 2003; KOSAKA et al., 1994; MÁRQUEZ-RUIZ; DOBARGANES, 1996; TOTANI et al., 2000; ZHENG et al., 2001). Vários estudos também têm demonstrado que estas substâncias apresentam: toxicidade reprodutiva e em outros órgãos; citotoxicidade e mutagenicidade *in vitro*; citotoxicidade e genotoxicidade em animais de laboratório; possíveis mutagenicidade e carcinogenicidade em humanos (BILLEK, 2000; CHAO et al., 2001; CLARCK; SERBIA, 1991; COHN, 2002; EBONG et al., 1999; ESTERBAUER, 1993; ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991; GAO et al., 1987; GREENE et al., 2000; KANAZAWA; ASHIDA, 1991; LOPEZ-VARELA; SANCHEZ-MUNIZ; CUESTA, 1995; MITCHELL; MORAN; GRANT, 2002; MORAN et al., 2000; ZHONG et al., 1999).

Além disto, estudos realizados em diversos países, inclusive no Brasil, mostraram a necessidade de se promover a melhoria da qualidade dos óleos e gorduras em uso em frituras, pois foram encontradas porcentagens acima de 30 % de amostras com alto teor de substâncias de degradação (SAM SAGUY; DANA, 2003).

Na fritura, os óleos e gorduras são submetidos a altas temperaturas, a recomendada é de 180° C, em presença de ar e água. Esta condição propicia à formação de um número considerável de substâncias oriundas de reações térmicas, oxidativas e hidrolíticas (CHANG; PETERSON; HO, 1978; DOBARGANES; PÉREZ-CAMINO, 1988; GASPAROLI, 1998; JORGE et al., 1996; MÁRQUEZ-RUIZ; TASIOULA-MARGARI; DOBARGANES, 1995; NAWAR, 1998; SCHWARTZ; RADY; CASTAÑEDA, 1994; VELASCO et al., 2004b). As reações hidrolíticas liberam os mono e diacilgliceróis, e ácidos graxos livres; e as reações térmicas e oxidativas formam os triacilgliceróis dimerizados e polimerizados, e as substâncias do grupo dos monômeros de triacilgliceróis oxidados (FRITSCH, 1981). Estes grupos de substâncias são determinados quantitativamente como “compostos polares” (CP) (AOAC, 2003).

A Figura 1 ilustra as alterações que podem ocorrer nos óleos e gorduras em uso em frituras.



Fonte: Jorge, N. (1996).

Figura 1. Alterações em óleos e gorduras em processo de fritura.

Nestes óleos/gorduras, em níveis significativos de alteração, o grupo dos triacilgliceróis dimerizados e os polimerizados são formados em maiores proporções (MÁRQUEZ-RUÍZ; TASIOLA-MARGARI; DOBARGANES, 1995). Porém, o grupo dos monômeros de triacilgliceróis oxidados é o de maior importância do ponto de vista fisiológico e nutricional, pois é facilmente hidrolisável pela lipase pancreática liberando ácidos graxos oxidados que têm alta absorção em ratos; e também por sua presença em níveis consideráveis em óleos e gorduras de fritura (MÁRQUEZ-RUÍZ; DOBARGANES, 1995; MÁRQUEZ-RUÍZ; GUELVEL; DOBARGANES, 1998; MÁRQUEZ-RUÍZ; PÉREZ-CAMINO; DOBARGANES, 1992; MÁRQUEZ-RUIZ; TASIOLA-MARGARI; DOBARGANES, 1995). Dos grupos de substâncias que compõem esta fração, os epoxiácidos, cetoácidos e hidroxiácidos, são os principais produtos em termos quantitativos (CHANG; PETERSON; HO, 1978).

Os EPOXI têm sido determinados quantitativamente e considerados como principal grupo da fração dos monômeros oxidados em sistemas modelo de triacilgliceróis; em óleos de oliva e de girassol termoxidados; e em óleos usados em frituras na Espanha (BERDEAUX; MÁRQUEZ-RUÍZ; DOBARGANES, 1999; VELASCO et al., 2002; VELASCO et al., 2004a).

Dados obtidos de estudos relatados em artigo de Dobarganes; Márquez-Ruiz e Velasco (2000) demonstraram que os CP migram em quantidades similares, do óleo da fritadeira para batatas que estão sendo preparadas na fritura.

Os epóxidos de ácidos graxos também podem ser ingeridos como óleo de soja epoxidado (OSE), em alimentos gordurosos, que é utilizado como plastificante no polímero de poli-(cloreto de vinila) (PVC) que tem aplicação como material vedante em tampas de recipientes de vidro e como filmes flexíveis (FRANKHAUSER-NOTI et al., 2006).

Teores de cetoácidos e de hidróxi e polihidroxiácidos foram determinados nos óleos de oliva e de açafrão, e em gordura animal, termoxidados a 180° C por até 72 h (SCHWARTZ; RADY; CASTAÑEDA, 1994).

Com relação aos efeitos tóxicos dos epóxidos e hidróxidos de ácidos graxos, estudos demonstraram que os monoepóxidos do ácido linoléico e seus metabólitos (dióis) estão relacionados a importantes processos patológicos no homem (KOSAKA et al., 1994; TOTANI et al., 2000); apresentaram relevante citotoxicidade em sistema teste de túbulo renal de coelho (MORAN et al., 2000); e, em estudos com camundongos, sugeriu-se o 9,10-epoxi-12-octadecenoato de metila como mediador na síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) (ZHENG et al., 2001). Em estudo realizado com células Sf-21, células do inseto *Spodoptera frugiperda*, Mitchell; Moran e Grant (2002) demonstraram a citotoxicidade do *cis*-monoepóxido e do dihidróxido do ácido linoléico na ausência de albumina, e a citotoxicidade do dihidróxido na presença de albumina. Em estudo *in vitro*, Greene et al. (2000) verificaram que os monoepóxidos de ácidos graxos de cadeia longa, incluindo os ácidos *cis* e *trans*-9,10-epoxiesteárico, e seus metabólitos dióis apresentaram toxicidade em células Sf-21.

A administração oral e repetida do OSE afetou rins, fígado, testículos e útero de ratos; o que levou ao estabelecimento de uma ingestão diária aceitável (IDA) de 1 mg/kg de peso corpóreo, especificada pelo Comitê Científico sobre Alimentos (*Scientific Committee on Food* - SFC) da União Européia (UE) (SFC apud FRANKHAUSER-NOTI et al., 2006), baseado no nível sem efeito adverso (NOAEL) de 140 mg/kg de peso corpóreo especificado pela Associação Industrial Britânica de Pesquisas Biológicas (*British Industrial Biological Research Association* - BIBRA) (BIBRA, 1988 apud FRANKHAUSER-NOTI et al., 2006, p. 1279).

A absorção de epóxidos e de hidróxidos de ácidos graxos, na forma de triacilgliceróis comuns da dieta, foi recentemente relatada em humanos (WILSON et al., 2002a; WILSON et al., 2002b). Foi verificado que os monoepóxidos e os monohidróxidos foram mais absorvidos do que os diepóxidos e dihidróxidos.

Os estudos sobre a absorção, metabolismo, determinação de teor em óleos e gorduras e em alimentos fritos, e avaliação de toxicidade dos grupos dos EPOXI, CETO e HIDROXI são escassos. Por isso, pela sua relevância pesquisas adicionais nesta área são requeridas para contribuir com estudos de avaliação de risco para o consumo seguro de alimentos fritos.

A alteração tanto quantitativa quanto qualitativa, dos óleos e gorduras em uso em frituras, está relacionada a vários fatores intrínsecos ao processo como presença de água, ar, alta temperatura; e a tantos outros fatores extrínsecos como a composição do óleo/gordura, tipo de alimento, relação entre a superfície da fritadeira e o volume do óleo (DOBARGANES; MÁRQUEZ-RUÍZ, 1998). Porém, é importante ressaltar que a má prática nestes processos, como a utilização de temperaturas excessivas e de tempo prolongado do óleo/gordura, também contribui de modo relevante na formação das substâncias de degradação. Outro fato que influencia na alteração é a adição de óleo novo para compensar o absorvido pelo alimento (JORGE, 1996; ROMERO et al., 1998). O tempo determinado para se adicionar óleo novo para repor o que foi perdido é denominado período de *turnover*. Períodos de *turnover* elevados, característicos de frituras descontínuas, que são mais utilizados em restaurantes e lanchonetes permitem uma alteração maior do que nas frituras contínuas. As frituras contínuas são usadas em indústrias alimentícias e apresentam períodos de *turnover* curtos (JORGE, 1996; JORGE et al., 1996).

Em conformidade com estudos recentes nesta área, vários países têm estabelecido como parâmetros e seus respectivos limites máximos, para uso de óleos e gorduras em fritura, a porcentagem de CP de 24 a 30 %, sendo que a maioria dos países estabelece o valor de 25 %; e apenas dois países estabelecem a porcentagem de polímeros de 10 % (Bélgica) e 16 % (Holanda) (DANA; SAM SAGUY, 2001). A Sociedade Alemã de Pesquisa em Gorduras (DGF) recomenda dois parâmetros e seus limites para verificação da qualidade de óleos e gorduras de fritura que são: compostos polares (24 %) e polímeros (12 %); também recomenda o uso de testes rápidos para monitoramento da qualidade destes óleos e gorduras (INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DEEP-FAT FRYING, 2004). O Brasil, no entanto, não possui legislação federal que estabeleça parâmetros decisórios para garantir a qualidade de óleos e gorduras de fritura.

Os parâmetros mencionados acima são verificados através de métodos analíticos físico-químicos normalizados (IUPAC, 1992). Por serem estes métodos aplicáveis apenas em laboratório não são viáveis para a fiscalização que deve evitar o uso do óleo/gordura não conforme, no momento que o mesmo está sendo usado. Por isso, a utilização de teste aplicável *in situ*, de operacionalização rápida e simples, é necessária.

Entretanto, não há teste rápido, que avalie a qualidade e determine o momento de descarte de óleos e gorduras em uso em frituras, cuja confiabilidade tenha sido comprovada.

A *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) dispõe de um programa específico de verificação de desempenho de testes em kits em geral (AOAC® *Performance Tested Methods*SM – *performance de kits*) (AOAC, 2000). Este programa estabelece parâmetros requeridos para a submissão de kits com vistas à certificação de validação por este organismo.

Pelo exposto, verifica-se a importância de se dispor de testes rápidos validados para uma fiscalização efetiva e eficiente nesta área, e assim contribuir com o consumo de alimentos fritos seguros.

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVOS GERAIS

Obter dados que possam contribuir com estudos envolvendo a avaliação toxicológica dos alimentos fritos;

Contribuir com a Vigilância Sanitária para uma fiscalização efetiva e eficiente de óleos e gorduras em uso em frituras;

Contribuir para a promoção do consumo de alimentos fritos seguros.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter dados decorrentes de alterações termoxidativas, dos óleos refinados de palma e de soja, e da gordura de soja parcialmente hidrogenada provenientes de fritura descontínua de batatas, através da perda de ácidos graxos e da formação de polímeros, CP, EPOXI, CETO e HIDROXI;

Avaliar a citotoxicidade *in vitro* de monoepoxiácido formado significativamente em óleos e gorduras em uso em frituras;

Avaliar o desempenho e validar testes rápidos, aplicáveis *in situ*, de avaliação de óleos e gorduras em uso em frituras.

3 - RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho de tese estão apresentados em formato de coletânea de artigos científicos, com a apresentação de seis manuscritos. O primeiro (Manuscrito 1): **Avaliação quantitativa de monoepoxiácidos, monocetoácidos e monohidroxiácidos em óleos e gorduras provenientes de fritura descontínua de batatas** (MACHADO et al., 2007a) (elaborado)¹; o segundo (Manuscrito 2): **Avaliação da citotoxicidade do ácido *trans*-9,10-epoxiesteárico, um produto da termoxidação de óleos e gorduras usados em frituras** (MACHADO et al., 2007b) (em fase de elaboração)²; o terceiro (Manuscrito 3): *Quality of used frying fats and oils: comparison of rapid tests based on chemical and physical oil properties* (MARMESAT et al., 2007) (no prelo)³; o quarto (Manuscrito 4): **Alterações da gordura vegetal parcialmente hidrogenada em fritura de batatas** (MACHADO; ABRANTES; DOBARGANES, 2007a) (no prelo)⁴; o quinto (Manuscrito 5): **Alterações dos óleos de palma e de soja em fritura descontínua de batatas** (MACHADO; ABRANTES; DOBARGANES, 2007b) (elaborado)⁵; o sexto (Manuscrito 6): **Estudos preliminares de validação de testes rápidos para avaliação de óleos e gorduras usados em frituras - contribuição para a Saúde Pública** (MACHADO; ABRANTES; DOBARGANES, 2007c) (no prelo)⁶.

¹ Artigo científico de autoria de Eliana Rodrigues Machado et al., elaborado e a ser submetido à publicação em periódico em 2007.

² Artigo científico de autoria de Eliana Rodrigues Machado et al., em fase de elaboração e a ser submetido à publicação em periódico em 2007.

³ Artigo científico de autoria de Susana Marmesat et al., aprovado para publicação no periódico “*International Journal of Food Science and Technology*”, a ser publicado até dezembro de 2007. No prelo.

⁴ Artigo científico de autoria de Eliana Rodrigues Machado, Shirley de Mello Pereira Abrantes e María Del Carmen Dobarganes, aprovado para publicação no periódico “*Revista Higiene Alimentar*”, a ser publicado no ano de 2007. No prelo.

⁵ Artigo científico de autoria de Eliana Rodrigues Machado, Shirley de Mello Pereira Abrantes e María Del Carmen Dobarganes, elaborado e a ser submetido à publicação em periódico em 2007.

⁶ Artigo científico de autoria de Eliana Rodrigues Machado, Shirley de Mello Pereira Abrantes e María Del Carmen Dobarganes, aprovado para publicação no periódico “*Revista Higiene Alimentar*”, a ser publicado no ano de 2007. No prelo.

3.1 - **MANUSCRITO 1** - Avaliação quantitativa de monoepoxiácidos, monocetoácidos e monohidroxiácidos em óleos e gorduras provenientes de fritura descontínua de batatas.

AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE MONOEPSOXIÁCIDOS, MONOCETOÁCIDOS E MONOHIDROXIÁCIDOS EM ÓLEOS E GORDURAS PROVENIENTES DE FRITURA DESCONTÍNUA DE BATATAS

Eliana Rodrigues Machado^{1*}, Susana Marmesat³, Shirley Abrantes², María del Carmen Dobarganes³

1: Aluna de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) / FIOCRUZ

*Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 21040-900, Brasil.

Tel.: (21) 38655124, correio eletrônico: eliana.machado@incqs.fiocruz.br

2: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) / FIOCRUZ

3: Instituto de la Grasa / CSIC – Sevilha – Espanha

RESUMO

Na fritura, os óleos e gorduras sofrem degradação com a formação de compostos polares. Dentre as substâncias que fazem parte dos compostos polares, estão as frações dos triacilgliceróis dimerizados e polimerizados e dos monômeros dos triacilgliceróis oxidados. Este último grupo é de grande importância por ser suspeito de provocar danos à saúde. Fazem parte desta fração os grupos dos monoepoxiácidos, monocetoácidos e monohidroxiácidos que são considerados as principais substâncias sob o ponto de vista quantitativo. Foram determinados neste estudo os teores destes três grupos de substâncias em gordura de soja parcialmente hidrogenada, óleo de soja e óleo de palma, aquecidos a 180° C por 25 h, provenientes de experimentos de fritura descontínua de batatas. Estes teores foram obtidos através da análise cromatográfica a gás dos ésteres metílicos de ácidos graxos após derivação a frio das amostras e concentração posterior das substâncias de interesse mediante extração em fase sólida. Dados quantitativos dos ácidos graxos polares foram obtidos utilizando a combinação das técnicas cromatográficas de adsorção em coluna e a líquido de partição por tamanho de partículas. Para os três tipos de amostras estudados, nas condições do estudo, houve predominância da formação de polímeros. Foram encontradas quantidades nas faixas de 3,30 a 8,24; 1,51 a 4,32 e 3,42 a 8,71 mg/g de monoepoxiácidos, monocetoácidos e monohidroxiácidos, respectivamente, nas amostras com níveis de compostos polares na faixa de 20,8 a 44,1 % (m/m). Os resultados sugerem que óleos e gorduras monoinsaturados, como a gordura de soja parcialmente hidrogenada e o óleo de palma, apresentam maior tendência à formação de monômeros oxidados e menor tendência à formação de polímeros ao contrário dos óleos e gorduras polinsaturados, como o óleo de soja.

Palavras-chave: Ácidos graxos polares - Batatas Fritas - Compostos polares - Monocetoácidos - Monoepoxiácidos - Monohidroxiácidos - Monômeros oxidados - Óleos de fritura - Polímeros

SUMMARY

During frying, fats and oils undergo degradation with formation of polar compounds. Among these new compounds, dimeric and polymeric triglycerides as well as oxidized monomeric triglycerides stand out. The group of oxidized monomers has been related to several diseases and contains oxygenated fatty acyl groups including epoxy, keto and hydroxy groups of importance from a quantitative point of view. In this study, mono epoxyacids, monoketoacids and monohydroxyacids were quantified in partially hydrogenated soybean oil, soybean oil and palm oil after heating for 25 hours at 180 °C in experiments of discontinuous frying of potatoes. The determination was carried out by gas chromatography after fat derivatization to fatty acid methyl esters at room temperature and later concentration of the compounds of interest by solid phase extraction on silica cartridges. Quantitative analyses of polar fatty acids were also obtained by combination of adsorption and size exclusion chromatography. In the conditions applied, the major content corresponded to polymeric compounds. Amounts ranging from 3.30 to 8.24; from 1.51 to 4.32 and from 3.42 to 8.71 mg/g were found for monoepoxyacids, monoketoacids and monohydroxyacids, respectively for samples containing between 20.8 and 44.1 %. The results suggest that monounsaturated oils, i.e. partially hydrogenated soybean oils and palm oils have a higher tendency to the formation of oxidized monomers while polyunsaturated oils, i.e. soybean oils have a higher tendency to the formation of polymers.

Key-words: Epoxy fatty acids - French fries - Frying oils - Hydroxy fatty acids - Keto fatty acids - Polar compounds - Polar fatty acids - Polymers

INTRODUÇÃO

A fritura é um meio de preparo de alimentos bastante utilizada em todo o mundo. Neste processo o óleo ou gordura é submetido a altas temperaturas na presença de ar e de água. Esta condição propicia à formação de um número considerável de substâncias oriundas de reações térmicas, oxidativas e hidrolíticas (CHANG; PETERSON; HO, 1978; DOBARGANES; PÉREZ-CAMINO, 1988; GASPAROLI, 1998; JORGE et al., 1996; MÁRQUEZ-RUIZ; TASIOULA-MARGARI; DOBARGANES, 1995; NAWAR, 1998; SCHWARTZ; RADY; CASTAÑEDA, 1994; VELASCO et al., 2004b). As reações hidrolíticas liberam substâncias como diacilgliceróis e ácidos graxos livres, e as reações térmicas e oxidativas formam um grande número de substâncias como triacilgliceróis dimerizados e polimerizados e monômeros de triacilgliceróis oxidados (VELASCO et al., 2004b). Estes grupos de substâncias constituem os compostos polares (AOAC, 2003). Legislações de muitos países preconizam para óleos e gorduras usados em frituras o valor máximo de 25 %, m/m do óleo, em compostos polares (DANA; SAM SAGUY, 2001).

A alteração tanto quantitativa quanto qualitativa destes óleos ou gorduras depende de um número elevado de variáveis entre elas, a que está relacionada com a adição de óleo novo para compensar o absorvido pelo alimento (JORGE, 1996; ROMERO et al., 1998). O tempo determinado para se adicionar óleo novo para repor o que foi perdido, é denominado período de *turnover*. Períodos de *turnover* elevados, característicos de frituras descontínuas, são mais utilizados em restaurantes e lanchonetes e permitem uma alteração maior do que as frituras contínuas, mais

utilizadas em indústrias alimentícias, que apresentam períodos de *turnover* curtos (JORGE, 1996; JORGE et al., 1996).

Em análises de amostras de óleos/gorduras em uso em frituras coletadas nos setores de restaurantes e lanchonetes pelos serviços de inspeção de diversos países, foram encontradas porcentagens acima de 30 % de amostras fora do limite permitido para uso, segundo leis internacionais (SAM SAGUY; DANA, 2003).

A determinação quantitativa de ácidos graxos polares e suas frações em óleos e gorduras usados em frituras em torno do limite de rejeição (25 %) mostraram que os triacilgliceróis dimerizados e polimerizados foram predominantemente formados em relação aos monômeros de triacilgliceróis oxidados, e que quantidades destes foram formadas em torno de 30 mg/g do óleo (MÁRQUEZ-RUIZ; TASIOULA-MARGARI; DOBARGANES, 1995). Outros estudos também demonstraram maior formação de dímeros e polímeros em relação aos monômeros oxidados, quando consideráveis níveis de degradação das amostras estavam presentes, em sistemas modelo de ésteres metílicos dos ácidos oléico e linoléico termoxidados a 180° C (BERDEAUX; MÁRQUEZ-RUIZ; DOBARGANES, 1999); em óleos de oliva e de girassol termoxidados a 180° C, e em óleos e gorduras usados em fritura (VELASCO et al., 2004a).

Das substâncias provenientes da oxidação de óleos e gorduras, o grupo dos monômeros dos triacilgliceróis oxidados é de grande importância do ponto de vista nutricional pelo seu alto grau de hidrólise pela lipase pancreática; alta absorção em ratos dos ácidos graxos oxidados liberados por esta enzima; e presença em níveis consideráveis em óleos e gorduras de fritura (MÁRQUEZ-RUIZ; DOBARGANES, 1995; MÁRQUEZ-RUIZ; GUEVEL; DOBARGANES, 1998; MÁRQUEZ-RUIZ; PÉREZ-CAMINO; DOBARGANES, 1992; MÁRQUEZ-RUIZ; TASIOULA-MARGARI; DOBARGANES, 1995). Fazem parte desta fração, triacilgliceróis com diferentes grupos funcionais contendo oxigênio como: hidroperóxido, aldeído, cetona, hidróxido e epóxido (FRANKEL, 1998).

Os monoepoxiácidos têm sido determinados quantitativamente e considerados como principal grupo da fração dos monômeros oxidados, em termos quantitativos, em sistemas modelo de triacilgliceróis; em óleos de oliva e de girassol termoxidados; e em óleos usados em frituras (BERDEAUX; MÁRQUEZ-RUIZ; DOBARGANES, 1999; VELASCO et al., 2002; VELASCO et al., 2004a).

Teores em níveis até 260 µmoles/g do óleo foram obtidos, nos óleos de oliva e de açafrão, e em gordura animal, termoxidados a 180° C por até 72 h, de cetoácidos determinados como 2,4-dinitrofenilhidrazonas; e de hidroxí e polihidroxíácidos, determinados como derivados da 2,6-dinitrofenilhidrazona do éster do ácido pirúvico (SCHWARTZ; RADY; CASTAÑEDA, 1994).

Com relação aos efeitos tóxicos dos epóxidos e hidróxidos de ácidos graxos, estudos demonstraram que os monoepóxidos do ácido linoléico e seus metabólitos (dióis): estão relacionados à necrose tissular em pacientes com queimaduras severas (KOSAKA et al., 1994), e ao mecanismo de lesão aguda do pulmão em humanos (TOTANI et al., 2000); também apresentaram citotoxicidade em sistema teste de túbulo renal de coelho (MORAN et al., 2000); e, em camundongos, sugeriu-se o 9,10-epoxi-12-octadecenoato como mediador tóxico na síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) (ZHENG et al., 2001). Em estudos *in vitro*, Greene et al. (2000) verificaram em células Sf-21, células do inseto *Spodoptera frugiperda*, que os ésteres metílicos de monoepóxidos de ácidos graxos de cadeia longa e seus metabólitos dióis foram potentes pró-toxinas. Em outro estudo de citotoxicidade realizado com células Sf-21 Mitchell; Moran e Grant (2002) demonstraram a citotoxicidade do *cis*-monoepóxido e do

dihidróxido do ácido linoléico na ausência de albumina, e citotoxicidade do dihidróxido na presença de albumina.

A absorção, de epóxidos e de hidróxidos de ácidos graxos marcados, na forma de triacilgliceróis, foi recentemente relatada em humanos (WILSON et al., 2002a; WILSON et al., 2002b) verificando que os monoepóxidos e os monohidróxidos foram mais absorvidos do que os diepóxidos e dihidróxidos.

Portanto, estudos adicionais de absorção; de obtenção de teores e de avaliação de toxicidade dos grupos dos epoxiácidos, cetoácidos e hidroxiácidos em óleos e gorduras usados em frituras, são requeridos para contribuir com estudos futuros de avaliação de risco dos alimentos fritos.

O objetivo deste trabalho foi determinar quantitativamente os grupos de monoepoxiácidos, monocetoácidos e monohidroxiácidos e avaliar seus resultados em gordura vegetal de soja parcialmente hidrogenada, óleo de soja e óleo de palma, provenientes de fritura descontínua de batatas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras iniciais - não aquecidas

A gordura de soja parcialmente hidrogenada e o óleo de soja, utilizados para fins culinários, foram obtidos do comércio da cidade do Rio de Janeiro, e se encontravam dentro do prazo de validade.

O óleo de palma refinado comercializado para fritura, foi obtido por doação da indústria “Grupo Agropalma” da cidade de Tailândia, Pará, com certificado de análise e data de validade adequada.

Amostras provenientes dos experimentos de fritura descontínua de batatas

Foram utilizadas seis amostras, duas de cada óleo/gordura referidas acima, provenientes dos experimentos de fritura, como a seguir:

Cada experimento foi realizado no laboratório, de acordo com Jorge et al. (1996), e consistiu de operações de fritura: (100 ± 0,01 g) de batatas frescas descascadas, cortadas em palito, lavadas e secas, foram fritas em (550 ± 0,01) g de óleo na temperatura de (183,1 ± 1,7)° C, por 3 minutos. Foram utilizadas três fritadeiras elétricas domésticas semelhantes de 1 L com relação inicial, superfície da fritadeira sobre volume do meio de fritura, de 0,3 cm⁻¹. Cada experimento foi realizado em cinco dias seguidos, e o óleo foi submetido, por dia, a 5 horas de aquecimento ocorrendo neste período, a operação de fritura. Não houve reposição ou substituição do meio de fritura. Ao final de cada experimento, com 25 h de aquecimento, as amostras foram coletadas e estocadas à temperatura de -20° C, até o momento das análises. Os experimentos foram feitos em duplicata para cada óleo/gordura.

Reagentes

Foram utilizados solventes e reagentes de grau P. A. (para análise), com exceção dos solventes: éter etílico, hexano e tetrahidrofurano, de qualidade para análise de resíduos.

Gel de sílica 60, para cromatografia em coluna, com tamanho de partícula de 0,063-0,200 mm, foi adquirido da Merck.

Colunas Sep Pak®-Vac de sílica 6 cc, 1,0 g, da Waters.

Substâncias padrão

Os ésteres metílicos dos ácidos graxos: *cis*-9,10-epoxiesteárico; *trans*-9,10-epoxiesteárico, foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemie GmbH; 12-cetoesteárico e 12-hidroxiesteárico, foram obtidos da Nu-Chek Inc.. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos: láurico, mirístico, palmítico, esteárico, oléico, linoléico, linolênico, araquídico, behênico, lignocérico e heneicosanóico (C21:0), foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemie GmbH.

Métodos Analíticos

As seguintes determinações foram efetuadas, em duplicata, para cada amostra inicial, de acordo com o método da *International Union of Pure and Applied Chemistry-IUPAC* (IUPAC, 1992): **acidez em ácido oléico**, %, m/m, método 2.201; **índice de peróxidos**, meq O₂ / kg, método 2.501; **matéria insaponificável**, %, m/m, método 2.401 e **determinação da composição percentual**, m/m, dos ácidos graxos, métodos 2.301 e 2.302 da IUPAC. O primeiro e o segundo método utilizam a técnica de volumetria; o terceiro método utiliza extração por solvente orgânico e gravimetria.

A **determinação da composição percentual**, m/m, dos ácidos graxos foi realizada, através da análise cromatográfica a gás dos ésteres metílicos, destes ácidos, obtidos a partir da dissolução de (50 ± 0,0001) mg da amostra em 1 mL de hexano e posterior derivação com adição de duas gotas da solução de KOH 2 N em metanol. Utilizou-se um cromatógrafo da Hewlett-Packard, modelo 6890, equipado com detector por ionização em chama; injetor automático marca Agilent, modelo 6890, com divisão de fluxo; e coluna cromatográfica, de alta resolução de sílica fundida, com fase estacionária de poli (etileno glicol), nas dimensões de 60 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de fase estacionária. As seguintes condições cromatográficas foram adotadas: temperatura da coluna: 200° C (2 min.) / 2° C /min. / 240 °C (30 min.); temperatura do detector e do injetor: 250°C; fluxo do gás carreador (H₂): 1,0 mL/ min; razão de divisão de fluxo: 40,0:1; fluxo do gás auxiliar (N₂): 45,0 mL/min; fluxo do H₂: 40,0 mL/min; fluxo do ar sintético: 450,0 mL/min; volume injetado da amostra: 1,0 µL.

A identificação dos picos realizou-se através da comparação dos tempos de retenção dos padrões dos ésteres metílicos dos ácidos graxos de interesse.

A porcentagem de cada ácido graxo presente na amostra foi obtida a partir da divisão da área do pico cromatográfico do ácido graxo pela soma das áreas de todos os ácidos graxos da amostra multiplicada por 100.

A **determinação quantitativa de compostos polares** foi realizada através da cromatografia de adsorção em coluna, segundo o método oficial da IUPAC 2.507 (IUPAC, 1992), utilizando a mistura éter de petróleo : éter etílico (90:10), como solvente de eluição da fração não polar.

A **determinação quantitativa dos ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) polares e das suas frações, monômeros oxidados e polímeros**, foi obtida, segundo Márquez-Ruíz; Pérez-Camino e Dobarganes (1990), através das etapas:

Transmetilação de $(500 \pm 0,0001)$ mg da amostra com metóxido de sódio metanólico 0,2 M e neutralização com metanol sulfúrico 1 M.

Separação dos ésteres metílicos obtidos em duas frações de diferentes polaridades, por cromatografia de adsorção em coluna. A fração não polar foi eluída com a mistura hexano : éter etílico (95:5), e a fração polar foi eluída com éter etílico.

A fração polar obtida foi evaporada e dissolvida em hexano à concentração de 20-25 mg/mL, e a seguir foi analisada por cromatografia a líquido de exclusão por tamanho de partículas. Foram utilizados: um injetor Rheodyne 7725i com *loop* de 20 μ L; uma bomba Waters 510; duas colunas cromatográficas de 100 e 500 Å, conectadas em série, com dimensões de 30 cm de comprimento e 0,77 cm de diâmetro interno, empacotadas com o copolímero, com ligações cruzadas, de estireno divinilbenzeno, com tamanho de partícula de 5 μ m, da Waters Associates; e detector de índice de refração modelo L-7490 da Merck-La Chrom. Foram injetados, em condições isocráticas, 10 μ L da amostra em um fluxo de 1,5 mL/min de tetrahydrofurano utilizado como fase móvel.

A identificação dos picos dos ésteres metílicos de monômeros oxidados e de polímeros foi realizada através da comparação do cromatograma obtido com o perfil cromatográfico padronizado pelo método analítico utilizado (MÁRQUEZ-RUIZ; PÉREZ-CAMINO; DOBARGANES, 1990).

O teor, em porcentagem, dos picos de interesse, foi calculado pela razão entre a área de cada pico e a soma das áreas de todos os picos apresentados, multiplicada por 100.

A determinação quantitativa dos ésteres metílicos de monoepoxiácidos, monocetoácidos e monohidroxiácidos, foi realizada por análise cromatográfica a gás de alta resolução de acordo com Marmesat (2007) (em fase de elaboração)², como a seguir:

Procedimento de transmetilação: a temperatura ambiente, $(100 \pm 0,0001)$ mg da amostra foram pesados em um tubo com tampa de rosca. Foram adicionados 3 mL de éter tert-butil metílico e 1,5 mL de solução de metóxido de sódio em metanol a 0,2 M. O tubo foi agitado em agitador mecânico por 1 minuto, e a seguir, deixado em repouso por 2 minutos. Adicionaram-se 2 gotas de solução alcoólica a 1 % de fenolftaleína, e se neutralizou com solução de metanol sulfúrico 0,1 M. O tubo foi agitado mecanicamente. A seguir, foram adicionados 3 mL de água destilada e a solução foi centrifugada a 5000 rpm por 1 minuto. A fase orgânica foi separada e evaporada à secura em banho a temperatura inferior a 40° C, e sob leve corrente de nitrogênio.

Separação em duas frações de diferentes polaridades: $(50 \pm 0,0001)$ mg dos ésteres metílicos obtidos acima, foram dissolvidos em 2 mL da mistura de hexano : éter etílico (98:2). E então, submetidos à separação em coluna Sep-Pak®, previamente acondicionada com 10 mL da mistura acima mencionada de solventes utilizando, para a eluição da fração não polar, 25 mL da mesma mistura de solventes, e para a eluição da fração polar, 25 mL de éter etílico. À fração polar, que contém as substâncias de interesse, se adicionou 1 mL de solução do padrão interno, éster metílico do ácido heneicosanóico, a 0,3 mg/mL de hexano. Esta fração foi evaporada à secura, em evaporador rotatório a vácuo a temperatura inferior a 40° C. A seguir, o resíduo foi dissolvido em 2 mL de metanol, e mantido sob corrente de hidrogênio a temperatura

² Aceites de girasol modificados geneticamente: comportamiento a elevada temperatura y formación de nuevos compuestos, de autoria de Susana Marmesat (Tese de doutorado) - Universidad de Sevilla, Sevilla, Espanha, a ser defendida até dezembro de 2007.

ambiente por 10 minutos em presença de óxido de platino como catalizador. A amostra hidrogenada foi filtrada com poros de 0,2 µm e lavada com 5 mL de éter etílico, e então evaporada à secura sob leve corrente de nitrogênio em banho a temperatura inferior a 40° C. O resíduo obtido foi re-dissolvido em 500 µL de éter etílico, e 2 µL da solução foram injetados no cromatógrafo a gás. As condições de análises cromatográficas foram as mesmas utilizadas para a determinação da composição de ácidos graxos, descrita acima.

Os grupos dos ésteres metílicos oxidados (monoepoxiácidos, monocetoácidos e monohidroxiácidos) foram identificados mediante cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas com a ajuda dos padrões disponíveis (BERDEAUX; MÁRQUEZ-RUÍZ; DOBARGANES, 1999; MARMESAT, 2007 (em fase de elaboração)¹; VELASCO et al., 2002; VELASCO et al., 2004a).

Os teores (mg/g do óleo/gordura) dos ésteres metílicos dos monoepoxiácidos (EPOXI), monocetoácidos (CETO) e monohidroxiácidos (HIDROXI) foram obtidos através das fórmulas:

$$\text{Teor de EPOXI (mg / g)} = \sum A_{\text{EPOXI}} \times \text{PI} \times \text{Fc} / A_{\text{PI}} \times \text{M}$$

$$\text{Teor de HIDROXI (mg / g)} = \sum A_{\text{HIDROXI}} \times \text{PI} \times \text{Fc} / A_{\text{PI}} \times \text{M}$$

$$\text{Teor de CETO (mg / g)} = \sum A_{\text{CETO}} \times \text{PI} \times \text{Fc} / A_{\text{PI}} \times \text{M}$$

Onde:

$\sum A_{\text{EPOXI}}$ - somatório das áreas dos picos das substâncias do grupo dos EPOXI;

$\sum A_{\text{HIDROXI}}$ - somatório das áreas dos picos das substâncias do grupo dos HIDROXI;

$\sum A_{\text{CETO}}$ - somatório das áreas dos picos das substâncias do grupo dos CETO;

PI - concentração em mg/g do padrão interno;

A_{PI} - área do padrão interno;

Fc - fator de correção, para os monoepoxiácidos = 1,21; para os monocetoácidos = 1,20 e para os monohidroxiácidos = 1,18. Os fatores de correção foram calculados previamente de soluções com concentrações conhecidas do padrão interno e dos ésteres metílicos de *cis*-9,10-epoxiesteárico, 12-cetoesteárico e 12-hidroxiesteárico.

M - massa em g da amostra.

A eficiência de cada etapa de separação em cromatografia em coluna, utilizada nos métodos analíticos deste estudo, foi verificada através da cromatografia em camada delgada utilizando a mistura hexano : éter etílico : ácido acético (80:20:1, v/v/v) como solvente de desenvolvimento da placa. E para a revelação das manchas, a

¹ Aceites de girasol modificados geneticamente: comportamiento a elevada temperatura y formación de nuevos compuestos, de autoria de Susana Marmesat (Tese de doutorado) - Universidad de Sevilla, Sevilla, Espanha, a ser defendida até dezembro de 2007.

placa foi exposta a vapores de iodo (MÁRQUEZ-RUÍZ; PÉREZ-CAMINO; DOBARGANES, 1990).

O teor, %, m/m, de lipídios da batata frita foi obtido a partir da trituração de $(20 \pm 0,01)$ g da batata seca através de liofilização, e posterior extração dos lipídios com três alíquotas de 60 mL da mistura éter etílico : hexano (1:1). A mistura foi submetida à agitação por 10 minutos a cada adição do dissolvente. O extrato lipídico obtido foi filtrado com sulfato de sódio anidro para balão. Evaporou-se a mistura de dissolventes em evaporador rotatório a vácuo. O resíduo foi transferido quantitativamente para tubo de 10 mL anteriormente pesado. Este resíduo foi evaporado à secura em banho a temperatura inferior a 40° C sob leve corrente de nitrogênio, e a seguir resfriado e pesado. Repetiram-se as operações de evaporação, resfriamento e pesagem, até peso constante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras iniciais apresentaram, conforme as análises específicas, características de identidade e qualidade adequadas ao estudo (BRASIL, 2005).

A tabela 1 mostra os resultados encontrados para a fração dos EMAG polares, grupo dos ésteres metílicos dos ácidos graxos com cadeias acil alteradas; e sua distribuição em polímeros e monômeros oxidados, em gordura de soja parcialmente hidrogenada, óleo de soja e óleo de palma, aquecidos a 180° C por 25 h, provenientes de experimentos de frituras descontínuas de batatas. Pode-se observar que em todos os experimentos do estudo houve predominância da formação de polímeros em relação aos monômeros oxidados. Estes resultados estão de acordo com Márquez-Ruíz; Tasioula-Margari e Dobarganes (1995), que encontraram maior concentração de polímeros, em relação a outros grupos de substâncias, na fração dos compostos polares, formadas em óleos e gorduras usados em frituras com limite de rejeição em torno de 25 % de compostos polares. Velasco et al. (2004a) também encontraram teores significativos de polímeros em maiores quantidades do que os monômeros oxidados em óleos e gorduras usados em frituras em restaurantes e lanchonetes da Espanha, com valores consideráveis de degradação.

Na tabela 1 também se verifica, para níveis similares de ácidos graxos polares, que a gordura vegetal e o óleo de palma, óleo/gordura do grupo de ácidos graxos monoinsaturados, apresentaram conteúdos mais baixos de polímeros do que o óleo de soja, que apresenta predominância de ácidos graxos polinsaturados. Estes resultados estão de acordo com Velasco et al. (2004a), que em estudo com óleos termoxidados, de oliva, do grupo dos monoinsaturados e de girassol, do grupo dos polinsaturados, e com óleos e gorduras usados em frituras descontínuas do comércio, concluíram que óleos do grupo de ácidos graxos monoinsaturados apresentam menor tendência à polimerização do que óleos do grupo de ácidos graxos polinsaturados. Berdeaux; Márquez-Ruíz e Dobarganes (1999) também verificaram maior formação de polímeros a partir dos ésteres metílicos do ácido linoléico (polinsaturado) do que a partir dos ésteres metílicos do ácido oléico (monoinsaturado).

Também se observa, na tabela 1, como o esperado, que a formação de ácidos graxos das frações dos monômeros oxidados e dos polímeros aumentou com o aumento do nível da degradação (nível de ácidos graxos polares totais).

Tabela 1. Ésteres metílicos de ácidos graxos polares e suas frações, polímeros e monômeros oxidados, em gordura vegetal de soja parcialmente hidrogenada, óleo de soja e óleo de palma, aquecidos a 180° C por 25 h, provenientes de experimentos de frituras de batatas.

	Ácidos graxos polares (%), m/m		
	Total	Frações	
		Polímeros	Monômeros oxidados
Gordura vegetal			
1° experimento	18,6	11,2	7,4
2° experimento	10,0	5,8	4,2
Óleo de soja			
1° experimento	7,4	4,2	3,2
2° experimento	13,9	9,2	4,7
Óleo de palma			
1° experimento	11,5	6,1	5,4
2° experimento	13,3	7,3	6,0

A figura 1 mostra a parte significativa do gráfico da análise cromatográfica a gás, com o pico do padrão interno, éster metílico do ácido heneicosanóico (C21:0) adicionado e os grupos dos monoepoxiácidos, monocetoácidos e monohidroxiácidos.

Foram determinados como monoepoxiácidos, monocetoácidos e monohidroxiácidos a soma dos picos cromatográficos que aparecem nas regiões definidas.

A hidrogenação da amostra na última etapa do procedimento analítico origina a concentração dos ácidos oxidados presentes (monoinsaturados, di-insaturados, nos óleos/gordura; e tri-insaturados, na gordura vegetal e no óleo de soja), pois são formados os correspondentes ácidos saturados que são claramente diferenciados por sua polaridade. Por conseqüência, os cromatogramas das amostras analisadas foram muito similares e só se diferenciaram pelas quantidades relativas dos distintos picos (substâncias) em relação ao padrão interno.

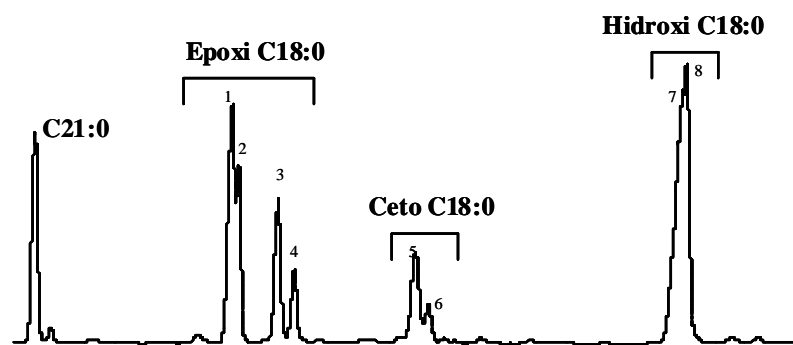


Figura 1. Parte significativa do gráfico da análise cromatográfica a gás dos EMAG polares, incluindo o pico do padrão interno, éster metílico do ácido heneicosanóico (C21:0), com a região dos grupos: monoepoxiácidos (Epoxi C18:0), monocetoácidos (Ceto C18:0) e monohidroxiácidos (Hidroxi C18:0) provenientes da gordura de soja parcialmente hidrogenada aquecida a 180° C por 25 h, oriunda de experimentos de fritura descontínua de batatas. 1, *trans* 9,10-epoxiestearato de metila; 2, *trans* 12,13-epoxiestearato de metila; 3, *cis* 9,10-epoxiestearato de metila; 4, *cis* 12,13-epoxiestearato de metila; 5, 9 cetoestearato de metila; 6, 13-cetoestearato de metila; 7, 9-hidroxiestearato de metila; 8, 13-hidroxiestearato de metila.

A tabela 2 apresenta os valores obtidos de compostos polares (CP) e de ésteres metílicos de monômeros oxidados (g/100 g do óleo/gordura); e os valores de ésteres metílicos dos ácidos graxos dos grupos dos monoepoxiácidos, monocetoácidos e monohidroxiácidos (mg/g do óleo/gordura) nas três amostras estudadas. Observa-se que a formação dos monômeros oxidados e dos três grupos, monoepoxiácidos, monocetoácidos e monohidroxiácidos, aumentaram com o aumento do nível de degradação (compostos polares) dos óleos/gordura. Também se observa que, para todas as amostras, os níveis de monoepoxiácidos e de monohidroxiácidos foram encontrados em maiores concentrações, e similares entre si, do que os níveis de monocetoácidos; e para as amostras com o mesmo nível de degradação, a gordura vegetal e o óleo de palma apresentaram maiores concentrações de monoepoxiácidos, monocetoácidos e monohidroxiácidos, do que o óleo de soja. Estes resultados estão de acordo, para os teores de monoepoxiácidos, aos de Velasco et al. (2004a) que encontraram de 4,29 a 14,24 mg/g em óleo de oliva, e de 5,10 a 9,44 mg/g em óleo de girassol, termoxidados a 180° C por 5, 10 e 15 h; e de 3,37 a 14,42 mg/g em óleos e gorduras usados em frituras de restaurantes e lanchonetes da Espanha. Também verificaram que maiores quantidades de monoepoxiácidos foram formadas nos óleos/gorduras monoinsaturados do que nos polinsaturados.

Em nosso estudo, para as amostras com níveis de compostos polares similares e acima do valor de rejeição, foram obtidos valores que correspondem à porcentagem na fração dos ácidos graxos de monômeros oxidados, de monoepoxiácidos: 10,8; 8,8 e 13,7, respectivamente, em gordura vegetal, óleo de soja e óleo de palma; de monocetoácidos: 5,8; 4,1 e 6,3, respectivamente, em gordura vegetal, óleo de soja e óleo de palma; de monohidroxiácidos: 11,8; 8,8 e 13,7, respectivamente, em gordura vegetal, óleo de soja e óleo de palma.

Tabela 2. Compostos polares e ésteres metílicos de monômeros oxidados (g/100 g do óleo); e ésteres metílicos de monoepoxiácidos (EPOXI), monocetoácidos (CETO) e monohidroxiácidos (HIDROXI) (mg/g do óleo), em gordura vegetal de soja parcialmente hidrogenada, óleo de soja e óleo de palma, aquecidos a 180° C por 25 h, provenientes de fritura descontínua de batatas.

	Compostos polares (%)	Ésteres metílicos de monômeros oxidados (%)	EPOXI ¹ (mg/g)	CETO ¹ (mg/g)	HIDROXI ¹ (mg/g)
Gordura vegetal					
1º experimento	44,1	7,4	7,99 ± 0,18	4,32 ± 0,22	8,71 ± 1,53
2º experimento	32,5	4,2	4,14 ± 0,48	2,35 ± 0,35	5,28 ± 0,45
Óleo de soja					
1º experimento	20,8	3,2	3,30 ± 0,16	1,51 ± 0,01	3,42 ± 0,24
2º experimento	42,6	4,7	4,12 ± 1,68	1,93 ± 0,54	4,12 ± 0,73
Óleo de palma					
1º experimento	34,8	5,4	5,96 ± 0,66	1,93 ± 0,18	5,54 ± 0,41
2º experimento	41,0	6,0	8,24 ± 0,40	3,77 ± 0,42	8,19 ± 0,18

1: média de 2 determinações e desvio padrão.

Com o objetivo de se obter uma estimativa do teor dos monoepoxiácidos, monocetoácidos e monohidroxiácidos em batatas fritas preparadas nos óleos/gordura do estudo, as seguintes etapas foram realizadas:

A fração de lipídios das batatas fritas preparadas nos óleos/gordura do estudo, foi extraída e seu teor determinado. Os valores obtidos (g/100 g de batata) são apresentados na tabela 3;

Para saber se os monômeros oxidados presentes no meio de fritura migraram para a batata frita e em que quantidades, o teor deste grupo de substâncias foi determinado nestes óleos/gordura, utilizados nos 1º experimentos de fritura, provenientes da fritadeira e das batatas fritas. Os valores obtidos (g/100 g do óleo/gordura) foram, nos óleos/gordura da fritadeira e das batatas fritas, respectivamente, 14,9 e 15,8, para a gordura vegetal; 6,8 e 7,4, para o óleo de soja; e 11,4 e 11,7, para o óleo de palma. Estes resultados mostraram que os monômeros oxidados formados nos óleos/gordura da fritadeira migraram em quantidades similares para as batatas. Dados obtidos de estudos, relatados em artigo de Dobarganes; Márquez-Ruiz e Velasco (2000), demonstraram que os compostos polares migram em quantidades similares do óleo da fritadeira para batatas fritas.

Finalmente, através de cálculos, a partir de resultados de teores de lipídios extraídos das batatas fritas (tabela 3) e de concentrações dos ésteres metílicos dos epoxiácidos, cetoácidos e hidroxiácidos dos óleos/gordura das fritadeiras (tabela 2), foram obtidos teores em mg, que são apresentados na tabela 3, nas faixas de 27,06 a 67,57; 12,38 a 30,91 e 28,04 a 67,16, respectivamente, de epoxiácidos, cetoácidos e hidroxiácidos, em 100 g de batatas fritas, que foram preparadas nos óleos/gordura do estudo com níveis de compostos polares, na faixa de 20,8 a 44,1 %.

Tabela 3. Compostos polares (CP) (g/100 g do óleo); lipídios (g/100 g de batata frita) e ésteres metílicos de monoepoxiácidos (EPOXI), monocetoácidos (CETO) e monohidroxiácidos (HIDROXI) (mg) por 100 g de batatas fritas preparadas em gordura vegetal de soja parcialmente hidrogenada, óleo de soja e óleo de palma, aquecidos a 180° C por 25 h, provenientes de fritura descontínua de batatas.

	CP (g/100 g do óleo)	Lipídios ¹ (g/100 g de batata)	EPOXI ³ (mg/100 g de batata)	CETO ³ (mg/100 g de batata)	HIDROXI ³ (mg/100 g de batata)
Gordura vegetal					
1º experimento	44,1	6,6 ± 1,3	52,73	28,51	57,49
2º experimento	32,5	6,6 ²	27,32	15,51	34,85
Óleo de soja					
1º experimento	20,8	8,2 ± 1,3	27,06	12,38	28,04
2º experimento	42,6	8,2 ²	33,78	15,83	33,78
Óleo de palma					
1º experimento	34,8	8,2 ± 0,9	48,87	15,83	45,43
2º experimento	41,0	8,2 ²	67,57	30,91	67,16

1: média de 2 determinações e desvio padrão; 2: não analisado, considerado o teor de lipídios do 1º experimento; 3: valores obtidos através de cálculos, a partir de dados de análises do estudo.

CONCLUSÕES

Conclui-se que nas condições deste estudo:

Óleos e gorduras monoinsaturados apresentam maior tendência à formação de monoepoxiácidos, monocetoácidos e monohidroxiácidos e menor tendência à formação de polímeros, do que óleos e gorduras polinsaturados;

Para os três tipos de amostras estudados, os polímeros são formados em maior quantidade do que os monômeros oxidados;

Os grupos de monoepoxiácidos, monocetoácidos e monohidroxiácidos constituem quantitativamente uma fração muito importante dos monômeros oxidados, sendo os monoepoxiácidos e os monohidroxiácidos as principais substâncias.

AGRADECIMENTOS

Eliana Rodrigues Machado agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estágio de doutorando recebida; e ao “Instituto de la Grasa” do “Consejo Superior de Investigaciones Científicas”, Sevilha, Espanha, onde o trabalho foi realizado;

Os autores agradecem à Sra. Mercedes Gimenez pela assistência; e ao Grupo Agropalma pela doação do óleo de palma.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 17. ed. Maryland, USA: AOAC International, 2003. 2v.
- BERDEAUX, O.; MÁRQUEZ-RUÍZ, G.; DOBARGANES, M. C. Characterization, quantitation and evolution of monoepoxy compounds formed in model systems of fatty acid methyl esters and monoacid triglycerides heated at high temperature. **Grasas y Aceites**, v. 50, n. 1, p. 53-59, 1999.
- BRASIL. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Aprova o “Regulamento Técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal”. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 set. 2005. ANVISA-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>> Acesso em: 14 mai. 2006.
- CHANG, S. S.; PETERSON, R. J.; HO, C. Chemical reactions involved in the deep-fat frying of foods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 55, n. 10, p. 718-727, 1978.
- DANA, D.; SAM SAGUY, I. Frying of nutritious foods: obstacles and feasibility. **Food Science Technology Research**, v. 7, n. 4, p. 265-279, 2001.
- DOBARGANES, M. C.; MÁRQUEZ-RUÍZ, G.; VELASCO, J. Interactions between fat and food during deep-frying. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 8-9, p. 521-528, 2000.
- DOBARGANES, M. C.; PÉREZ-CAMINO; M. C. Fatty acid composition: a useful tool for the determination of alteration level in heated fats. **Revue Française des Corps Gras**, v. 35, n. 2, p. 67-70, 1988.
- FRANKEL, E. N. Frying fats. In: **LIPID Oxidation: oil**. Dundee, U.K., 1998, p. 227-248.
- GASPAROLI, A. The formation of new compounds. **Grasas y Aceites**, v. 49, n. 3-4, p. 303-309, 1998.
- GREENE, J. F. et al. Toxicity of epoxy fatty acids and related compounds to cells expressing human soluble epoxide hydrolase. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, n. 4, p. 217-226, 2000.
- INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives**. 7. ed. Oxford: Pergamon Press, 1992, supl. 1.
- JORGE, N. **Estudo do comportamento do óleo de girassol e do efeito do dimetil polisiloxano em termo oxidação e frituras** (Tese de doutorado) - Universidade de Campinas - Unicamp, Campinas, SP, 1996.
- JORGE, N. et al. Influence of dimethylpolysiloxane addition to edible oils: performance of sunflower oil in discontinuous and continuous laboratory frying. **Grasas y Aceites**, v. 47, n. 1-2, p. 20-25, 1996.
- KOSAKA, K. et al. Leukotoxin, a linoleate epoxide: its implication in the late death of patients with extensive burns. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 139, n. 2, p. 141-148, 1994.

MARMESAT, S. **Aceites de girasol modificados genéticamente: comportamiento a elevada temperatura y formación de nuevos compuestos** (Tese de doutorado) - Universidad de Sevilla, Sevilla, Espanha. A ser defendida até dezembro de 2007.

MÁRQUEZ-RUIZ, G.; DOBARGANES, M. C. Assessments on digestibility of oxidized compounds from [1- ¹⁴C]linoleic acid using a combination of chromatographic techniques. **Journal of Chromatography B: Biomedical applications**, v. 675, n. 1, p. 1-8, 1995.

MÁRQUEZ-RUIZ, G.; GUEVEL, G.; DOBARGANES, M.C. Applications of chromatographic techniques to evaluate enzymatic hydrolysis of oxidized and polymeric triglycerides by pancreatic lipase "in vitro". **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 2, p. 119-126, 1998.

MÁRQUEZ-RUIZ, G.; PÉREZ-CAMINO, M. C.; DOBARGANES, M. C. Combination of adsorption and size-exclusion chromatography for the determination of fatty acid monomers, dimers and polymers. **Journal of Chromatography A**, v. 514, p. 37-44, 1990.

MÁRQUEZ-RUIZ, G.; PÉREZ-CAMINO, M. C.; DOBARGANES, M. C. Digestibility of fatty acid monomers, dimers and polymers in the rat. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 69, n. 9, p. 930-934, 1992.

MÁRQUEZ-RUIZ, G.; TASIOULA-MARGARI, M.; DOBARGANES, M. C. Quantitation and distribution of altered fatty acids in frying fats. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 10, p. 1171-1176, 1995.

MITCHELL, L. A.; MORAN, J. H.; GRANT, D. F. Linoleic acid, *cis*-epoxyoctadecenoic acids, and dihydroxyoctadecadienoic acids are toxic to Sf-21 cells in the absence of albumin. **Toxicology Letters**, v. 126, n. 3, p.187-196, 2002.

MORAN, J. H. et al. Analysis of the cytotoxic properties of linoleic acid metabolites produced by renal and hepatic P450s. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 168, n. 3, p. 268-272, 2000.

NAWAR, W. W. Volatile components of the frying process. **Grasas y Aceites**, v. 49, n. 3-4, p. 271-274, 1998.

ROMERO, A. et al. Effect of oil replenishment during deep fat frying of frozen foods in sunflower oil and high-oleic acid sunflower oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.75, n. 2, p. 161-167, 1998.

SAM SAGUY, I.; DANA, D. Integrated approach to deep fat frying: engineering, nutrition, health and consumer aspects. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n. 2-3, p. 143-152, 2003.

SCHWARTZ, D. P.; RADY, A. H.; CASTAÑEDA, S. The formation of oxo- and hydroxy-fatty acids in heated fats and oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.71, n. 4, p. 441-444, 1994.

TOTANI, Y. et al. Leukotoxin and its diol induce neutrophil chemotaxis through signal transduction different from that of fMLP. **European Respiratory Journal**, v. 15, n. 1, p.75-79, 2000.

VELASCO, J. et al. Formation and evolution of monoepoxy fatty acids in thermoxidized olive and sunflower oils and quantitation in used frying oils from restaurants and freid-food outlets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 14, p. 4438-4443, 2004a.

VELASCO, J. et al. Formation of short-chain glycerol-bound oxidation products and oxidised monomeric triacylglycerols during deep-frying and occurrence in used frying fats. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 106, n. 11, p. 728-735, 2004b.

VELASCO, J. et al. Sensitive and accurate quantitation of monoepoxy fatty acids in thermoxidized oils by gas-liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 982, n. 1, p. 145-152, 2002.

WILSON, R. et al. Dietary epoxy fatty acids are absorbed in healthy women. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 32, n. 2, p.79-83, 2002a.

WILSON, R. et al. Dietary hydroxy fatty acids are absorbed in humans: implications for the measurement of “oxidative stress” in vivo. **Free Radical Biological & Medicine**, v. 32, n. 2, p. 162-168, 2002b.

ZHENG, J. et al. Leukotoxin-Diol a putative toxic mediator involved in acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 25, n. 4, p. 434-438, 2001.

3.2 - **MANUSCRITO 2** - Avaliação da citotoxicidade do ácido *trans*-9,10-epoxiesteárico, um produto da termoxidação de óleos e gorduras usados em frituras.

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO ÁCIDO *TRANS*-9,10-EPOXIESTEÁRICO, UM PRODUTO DA TERMOXIDAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS USADOS EM FRITURAS

Eliana Rodrigues Machado^{1*}, Denise Bispo², Shirley Abrantes², María del Carmen Dobarganes³, Helena Pereira da Silva Zamith²

1: Aluna de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) / FIOCRUZ

*Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 21040-900, Brasil.

Tel.: (21) 38655124, correio eletrônico: eliana.machado@incqs.fiocruz.br

2: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) / FIOCRUZ

3: Instituto de la Grasa / CSIC – Sevilha – Espanha

RESUMO

Na fritura, o óleo/gordura está sujeito à oxidação. Dentre as substâncias provenientes da oxidação, o grupo dos monoepóxidos é de grande importância sob o ponto de vista nutricional por sua alta absorção e sua presença em níveis consideráveis em óleos e gorduras usados em fritura. A toxicidade dos monoepóxidos de ácidos graxos e de seus metabólitos tem sido demonstrada. Então, estudos adicionais são necessários para a determinação da toxicidade de substâncias produzidas em óleos e gorduras durante o uso em frituras para avaliação de risco dos alimentos fritos. O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade *in vitro* do ácido *trans*-9,10-epoxiesteárico (EPO) em cultura de células hepáticas HTC (hepatoma de rato) através do ensaio de viabilidade celular, mediado pelo diacetato de fluoresceína e brometo de etídio. Vinte e quatro horas após o estabelecimento das culturas (210×10^3 células em meio MEM / placa de 35 mm), as células HTC foram tratadas durante 2 h a 37° C e em atmosfera de 5 % de CO₂, com DMSO 2,5 % (controle solvente) e com sete concentrações de EPO em DMSO 2,5 %, na faixa de 2,5 a 125 µM. O EPO, na faixa de concentrações de 2,5 a 10 µM não foi citotóxico quando comparado ao controle, diferentemente do EPO na faixa de 15 a 125 µM com decréscimo significativo de viabilidade celular de 20 a 100 %. O EPO e/ou seus metabólitos formados apresentaram um grau significativo de citotoxicidade *in vitro* em células HTC metabolicamente competentes.

1. INTRODUÇÃO

O consumo de alimentos fritos vem crescendo a cada dia em todo o mundo, por isso, a qualidade destes alimentos deve ser garantida. Estudos têm relatado que várias substâncias de oxidação lipídica são suspeitas de prejudicar o valor nutricional dos óleos e gorduras e estão relacionadas com um grande número de doenças (COHN, 2002; DOBARGANES; MÁRQUEZ-RUÍZ, 2003). Além disto, os alimentos preparados nestes processos absorvem consideravelmente o óleo, onde o mesmo está sendo preparado, e as substâncias de degradação dissolvidas nele (DOBARGANES; MÁRQUEZ-RUÍZ; VELASCO, 2000). Avaliações da qualidade destes óleos e gorduras (SAM SAGUY; DANA, 2003) também têm demonstrado a necessidade de mais estudos sobre este processo, pois foram encontradas porcentagens altas de amostras insatisfatórias, em relação a legislações internacionais (DANA; SAM SAGUY, 2001).

Na fritura, o óleo/gordura é alterado por ação de altas temperaturas, ar e água que propiciam à formação de um número considerável de substâncias (CHANG; PETERSON;

HO, 1978; DOBARGANES; PÉREZ-CAMINO, 1988; GASPAROLI, 1998; JORGE et al., 1996; MÁRQUEZ-RUIZ; TASIOULA-MARGARI; DOBARGANES, 1995; NAWAR, 1998; SCHWARTZ; RADY; CASTAÑEDA, 1994; VELASCO et al., 2004b).

Das substâncias provenientes desta alteração, o grupo dos monômeros de triacilgliceróis oxidados é de grande importância do ponto de vista nutricional por seu alto grau de hidrólise pela lipase pancreática, sua alta absorção em cobaias dos ácidos graxos oxidados liberados por esta enzima e sua presença nestes óleos/gorduras em níveis significativos (MÁRQUEZ-RUIZ; DOBARGANES, 1995; MÁRQUEZ-RUIZ; GUELVEL; DOBARGANES, 1998; MÁRQUEZ-RUIZ; PÉREZ-CAMINO; DOBARGANES, 1992; MÁRQUEZ-RUIZ; TASIOULA-MARGARI; DOBARGANES, 1995). Fazem parte desta fração, os monoepoxiácidos, um dos principais produtos em termos quantitativos (FRANKEL, 1998).

Consideráveis quantidades de monoepoxiácidos foram encontradas em óleo de oliva e em óleo de girassol termoxidados a 180° C por 5, 10 e 15 h; e em óleos usados em frituras de restaurantes e lanchonetes da Espanha mostrando que estas substâncias constituem o principal grupo dentre os monômeros de ácidos graxos oxidados formados a altas temperaturas (VELASCO et al., 2004a). Os mesmos autores verificaram que o grupo dos óleos/gorduras monoinsaturados, como o óleo de oliva, apresentou maiores quantidades do ácido 9,10-epoxiesteárico do que o óleo de girassol; e que os isômeros *trans* foram formados em quantidades maiores que os isômeros *cis* nos óleos monoinsaturados ao contrário dos óleos polinsaturados.

A absorção de epóxidos de ácidos graxos, normalmente consumidos na dieta na forma de triacilgliceróis, foi recentemente relatada em humanos. Foi verificado que os monoepóxidos foram mais absorvidos do que os diepóxidos (WILSON et al., 2002).

Com relação aos efeitos tóxicos dos epóxidos e hidróxidos de ácidos graxos, estudos demonstraram que os monoepóxidos do ácido linoléico e seus metabólitos (dióis) estão relacionados à necrose tissular em pacientes com queimaduras severas (KOSAKA et al., 1994) e ao mecanismo de lesão aguda do pulmão em humanos (TOTANI et al., 2000). Também apresentou relevante citotoxicidade em sistema teste de túbulo renal de coelho (MORAN et al., 2000); e em estudos com camundongos, sugeriu-se o 9,10-epoxi-12-octadecenoato de metila como mediador tóxico na síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) (ZHENG et al., 2001). Em estudo *in vitro* em células Sf-21, células do inseto *Spodoptera frugiperda*, verificou-se que os ésteres metílicos de monoepóxidos de ácidos graxos de cadeia longa e seus metabólitos dióis foram potentes pró-toxinas (GREENE et al., 2000). Também em células Sf-21 a citotoxicidade do *cis*-monoepóxido e do dihidróxido do ácido linoléico na ausência de albumina, e a citotoxicidade do dihidróxido deste ácido na presença de albumina, foi demonstrada (MITCHELL; MORAN; GRANT, 2002).

O objetivo deste trabalho foi obter dados de citotoxicidade *in vitro* do ácido *trans*-9,10-epoxiesteárico (EPO) em cultura de células hepáticas HTC (hepatoma de rato).

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1 Material

2.1.1 Células HTC

As células HTC (*hepatoma tissue culture*) de fígado de rato (*Rattus norvegicus*) foram provenientes do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro. São células epiteliais estabelecidas a partir do líquido ascítico de hepatoma de Morris originariamente induzido em rato *inbred* macho da cepa Buffalo por carcinogênese química (THOMPSON, 1979; THOMPSON; TOMKINS; CURRAN, 1966). Estas células apresentam alta atividade

metabólica, por isso são largamente utilizadas em pesquisas para verificar *in vitro* a influência da metabolização do fígado na toxicidade de substâncias (GAD, 2000).

2.1.2 Soluções

Meio de cultura MEM (Meio Essencial Mínimo com sais de Eagle) completo: MEM suplementado com soro fetal bovino (10 %, v/v); glutamina (2 mM); penicilina G potássica (100 UI/mL) e sulfato de estreptomicina (100 µg/mL).

Solução PBS (salina tamponada de fosfato): cloreto de sódio (32 %); cloreto de potássio (0,8 %); fosfato de sódio dibásico (4,6 %) e fosfato de sódio monobásico (0,8 %) em água desionizada.

Solução corante: acetato de fluoresceína (30 µg/mL) e brometo de etídio (8 µg/mL) em PBS. Deve ser preparada no dia do ensaio.

Solução de tripsina 0,15 % com EDTA, sal dissódico, a 0,08 % em PBS.

Os reagentes utilizados foram de grau P. A. O ácido *trans*-9,10-epoxiesteárico, meio MEM, acetato de fluoresceína e brometo de etídio foram obtidos da Sigma. A tripsina (1:250) foi obtida da Difco.

2.1.3 Equipamentos e outros itens

Estufa de CO₂;

Fluxo laminar vertical;

Microscópio de fluorescência equipado com filtro de excitação (515 a 560 nm), filtro de barreira de 590 nm, objetiva (aumento de 20x) e ocular (aumento 10x).

2.2 Ensaio de viabilidade celular mediado pelo acetato de fluoresceína e brometo de etídio (ENSAIO, 2001)

As células HTC foram mantidas em meio MEM completo ajustado ao pH 7,3, em estufa à temperatura de 37° C e em atmosfera de 5 % de CO₂ e 99 % de umidade. Vinte e quatro horas anteriores ao tratamento, as culturas celulares foram estabelecidas a partir de 210 x 10³ células/orifício de 35 mm em placa Costar® e mantidas nas condições experimentais descritas acima. Nestas condições experimentais as culturas celulares foram tratadas durante 2 h como a seguir: com o solvente DMSO a 2,5 % (controle-solvente), e com sete soluções de distintas concentrações do ácido *trans*-9,10-epoxiesteárico (EPO) em DMSO a 2,5 %, resultando na faixa de concentrações finais de 2,5 a 125 µM, por cultura celular, como mostrado na Tabela 1. Adicionalmente uma cultura foi empregada como controle, sem a adição do solvente e da substância em estudo.

Tabela 1. Concentrações do ácido *trans*-9,10-epoxiesteárico (EPO) por cultura celular.

Volumes (μL) de MEM completo e de soluções* do EPO por cultura	Concentração (μM) do EPO
2.925 μL de MEM + 75 μL de EPO (100 μM)	2,5
2.925 μL de MEM + 75 μL de EPO (200 μM)	5,0
2.925 μL de MEM + 75 μL de EPO (400 μM)	10,0
2.925 μL de MEM + 75 μL de EPO (600 μM)	15,0
2.925 μL de MEM + 75 μL de EPO (800 μM)	20,0
2.925 μL de MEM + 75 μL de EPO (2.500 μM)	62,4
2.925 μL de MEM + 75 μL de EPO (5.000 μM)	125,0

Após o tratamento, o meio de cada cultura foi removido e as culturas foram lavadas, duas vezes, com 3 mL da solução de PBS sem Ca^{++} e Mg^{++} . Após a remoção do PBS, as culturas foram tratadas com 200 μL da solução de tripsina. Após a tripsinização, ocorrida em 4 minutos, as células foram suspensas em 100 μL de MEM completo.

Para o ensaio de viabilidade celular 100 μL de cada suspensão de células obtida foi transferida para um frasco contendo 100 μL da solução corante. Após homogeneização, 100 μL da suspensão foram adicionados por lâmina microscópica seguida de colocação de lamínula para observação ao microscópio. O percentual de citotoxicidade (% de letalidade) foi obtido através da análise de duzentas células por grupo experimental.

As células viáveis mostram fluorescência verde enquanto núcleos corados em laranja indicam células mortas (STRAUSS, 1991).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os percentuais de citotoxicidade obtidos para as culturas controle-solvente e controle foram, 10 e 4 %, respectivamente.

A Tabela 2 mostra os percentuais de citotoxicidade obtidos do EPO na faixa de 2,5 a 125 μM no ensaio de viabilidade celular mediado pelo acetato de fluoresceína e brometo de etídio. Na faixa de 2,5 a 10,0 μM o EPO não foi citotóxico quando comparado ao controle-solvente, e o EPO na faixa de 15 a 125 μM foi citotóxico, com decréscimo significativo de viabilidade celular de 20 a 100 %.

Tabela 2. Ensaio de viabilidade celular do ácido *trans*-9,10-epoxiesteárico (EPO) em células HTC.

Tratamento das culturas	Percentual de citotoxicidade
Controle*	4
Controle-solvente**	10
Concentrações finais (μM) de EPO	
2,5	5
5,0	7
10,0	10
15,0	24
20,0	20
62,4	60
125,0	100

*: Cultura empregada como controle, sem a adição do solvente e da substância em estudo.

** : Cultura tratada com DMSO com concentração de 2,5 %.

4. CONCLUSÕES

O EPO e/ou seus metabólitos formados apresentaram um grau significativo de citotoxicidade *in vitro* em células HTC.

Com os dados obtidos verifica-se a importância de estudos adicionais para verificar possível toxicidade dos monômeros de triacilgliceróis oxidados formados em óleos/gorduras provenientes de frituras.

5. AGRADECIMENTOS

Eliana Rodrigues Machado agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estágio de doutorando recebida; e ao “Instituto de la Grasa” do “Consejo Superior de Investigaciones Científicas”, Sevilha, Espanha, onde o trabalho foi realizado;

Denise Bispo agradece a bolsa recebida através do convênio FIOCRUZ/FAPERJ;

Os autores agradecem à Sra. Mercedes Gimenez pela assistência; e ao Grupo Agropalma pela doação do óleo de palma.

6. REFERÊNCIAS

CHANG, S. S.; PETERSON, R. J.; HO, C. Chemical reactions involved in the deep-fat frying of foods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 55, n. 10, p. 718-727, 1978.

COHN, J. S. Oxidized fat in the diet, postprandial lipaemia and cardiovascular disease - nutrition and metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, v. 13, n. 1, p. 19-24, 2002.

DANA, D.; SAM SAGUY, I. Frying of nutritious foods: obstacles and feasibility. **Food Science Technology Research**, v. 7, n. 4, p. 265-279, 2001.

DOBARGANES, M. C.; MÁRQUEZ-RUIZ, G. Oxidized fats in foods. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 6, n. 2, p. 157-163, 2003.

- DOBARGANES, M. C.; MÁRQUEZ-RUIZ, G.; VELASCO, J. Interactions between fat and food during deep-frying. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 8-9, p. 521-528, 2000.
- DOBARGANES, M. C.; PÉREZ-CAMINO, M. C. Fatty acid composition: a useful tool for the determination of alteration level in heated fats. **Revue Française des Corps Gras**, v. 35, n. 2, p. 67-70, 1988.
- ENSAIO Cometa. Rev. 02. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2001. Seção 10. 62 p. (65.3330.011).
- FRANKEL, E. N. Frying fats. In: LIPID Oxidation: oil. Dundee, U.K., 1998. p. 227-248.
- GAD, S. C. Primary hepatocyte culture as an *in vitro* toxicologic system for the liver. In: GAD, S. C. **In Vitro Toxicology**. 2 ed., New York: Taylor & Francis, 2000. 410 p. cap. 11.
- GASPAROLI, A. The formation of new compounds. **Grasas y Aceites**, v. 49, n. 3-4, p. 303-309, 1998.
- GIOVANNUCCI, E.; GOLDIN, B. The Role of fat, fatty acids and total energy intake in the etiology of human colon cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, n. 6, p. 1564S-1571S, 1997.
- GREENE, J. F. et al. Toxicity of epoxy fatty acids and related compounds to cells expressing human soluble epoxide hydrolase. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, n. 4, p. 217-226, 2000.
- JORGE, N. et al. Influence of dimethylpolysiloxane addition to edible oils: performance of sunflower oil in discontinuous and continuous laboratory frying. **Grasas y Aceites**, v. 47, n. 1-2, p. 20-25, 1996.
- KOSAKA, K. et al. Leukotoxin, a linoleate epoxide: its implication in the late death of patients with extensive burns. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 139, n. 2, p. 141-148, 1994.
- MÁRQUEZ-RUIZ, G.; DOBARGANES, M. C. Assessments on digestibility of oxidized compounds from [1-¹⁴C]linoleic acid using a combination of chromatographic techniques. **Journal of Chromatography B: Biomedical applications**, v. 675, n. 1, p. 1-8, 1995.
- MÁRQUEZ-RUIZ, G.; GUEVEL, G.; DOBARGANES, M.C. Applications of chromatographic techniques to evaluate enzymatic hydrolysis of oxidized and polymeric triglycerides by pancreatic lipase "*in vitro*". **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n.2, p. 119-126, 1998.
- MÁRQUEZ-RUIZ, G.; PÉREZ-CAMINO, M. C.; DOBARGANES, M. C. Digestibility of fatty acid monomers, dimers and polymers in the rat. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 69, n. 9, p. 930-934, 1992.
- MÁRQUEZ-RUIZ, G.; TASIOULA-MARGARI, M.; DOBARGANES, M. C. Quantitation and distribution of altered fatty acids in frying fats. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 10, p. 1171-1176, 1995.
- MITCHELL, L. A.; MORAN, J. H.; GRANT, D. F. Linoleic acid, *cis*-epoxyoctadecenoic acids, and dihydroxyoctadecadienoic acids are toxic to Sf – 21 cells in the absence of albumin. **Toxicology Letters**, v. 126, n. 3, p.187-196, 2002.
- MORAN, J. H. et al. Analysis of the cytotoxic properties of linoleic acid metabolites produced by renal and hepatic P450_s. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 168, n. 3, p. 268-272, 2000.

- NAWAR, W. W. Volatile components of the frying process. **Grasas y Aceites**, v. 49, n. 3-4, p. 271-274, 1998.
- SAM SAGUY, I.; DANA, D. Integrated approach to deep fat frying: engineering, nutrition, health and consumer aspects. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n. 2-3, p. 143-152, 2003.
- SCHWARTZ, D. P.; RADY, A. H.; CASTAÑEDA, S. The formation of oxo- and hydroxy-fatty acids in heated fats and oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.71, n. 4, p. 441-444, 1994.
- STRAUSS, G. H. Non-random cell killing in cryopreservation: implications for performance of the battery of leucocyte tests (BLT). 1. Toxic and immunotoxic effects. **Mutation Research**, v. 252, n. 1, p. 1-15, 1991.
- THOMPSON, E. B. Liver Cells (HTC). **Methods in enzymology**, v. 58, p. 544-552, 1979.
- THOMPSON, E. B.; TOMKINS, G. M.; CURRAN, J. F. Induction of tyrosine α -ketoglutarate transaminase by steroid hormones in a newly established tissue culture cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 56, p. 296-303, 1966.
- TOTANI, Y. et al. Leukotoxin and its diol induce neutrophil chemotaxis through signal transduction different from that of fMLP. **European Respiratory Journal**, v. 15, n. 1, p.75-79, 2000.
- VELASCO, J. et al. Formation and evolution of monoepoxy fatty acids in thermoxidized olive and sunflower oils and quantitation in used frying oils from restaurants and freid-food outlets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 14, p. 4438-4443, 2004a.
- VELASCO, J. et al. Formation of short-chain glycerol-bound oxidation products and oxidised monomeric triacylglycerols during deep-frying and occurrence in used frying fats. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 106, n. 11, p. 728-735, 2004b.
- WILSON, R. et al. Dietary epoxy fatty acids are absorbed in healthy women. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 32, n. 2, p.79-83, 2002.
- ZHENG, J. et al. Leukotoxin-Diol a putative toxic mediator involved in acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 25, n. 4, p. 434-438, 2001.

3.3 - **MANUSCRITO 3** - *Quality of used frying fats and oils: comparison of rapid tests based on chemical and physical oil properties.*

	I	F	S	1	2	8	4	B	Dispatch: 10.7.06	Journal: IFS	CE: Naps
	Journal Name			Manuscript No.					Author Received	No. of pages: 8	PE Pongud

International Journal of Food Science and Technology 2006, 41, 1–8

Original Article

Quality of used frying fats and oils: comparison of rapid tests based on chemical and physical oil properties

Susana Marmesat, Eliana Rodrigues, Joaquín Velasco & Carmen Dobarganes*

Instituto de la Grasa (CSIC), Avda. Padre García Tejero, 4, 41012 Seville, Spain

(Received 30 May 2005; Accepted in revised form 20 April 2006)

Summary Most of the present regulations or guidelines on used frying fats and oils for human consumption establish that the content of polar compounds should not be higher than 25% of the oil weight. The standard method for the determination of polar compounds, which is based on adsorption chromatography, is time-consuming and needs laboratory facilities. Thus, rapid and simple methods are necessary to evaluate the quality of frying oils in fried food outlets. In this study, rapid tests based on chemical reactions (Fritest and Oxifritest) and on physical properties (Viscofrit and food oil sensor) have been evaluated in a set of 105 used frying oils as alternative methods to the determination of polar compounds. The results demonstrated that any of the rapid tests assayed are of great utility to determine the point at which frying fats and oils should be discarded. The tests based on physical properties showed better results than those based on chemical reactions, as the number of false results was lower. Furthermore, they can be useful to gain information on the changes in the frying oil quality, as their results showed high correlation coefficients with the determination of polar compounds.

Keywords Food oil sensor, fritest, oxifritest, polar compounds, rapid tests, used frying fats, viscofrit.

Introduction

Frying is one of the most popular procedures for food preparation worldwide. Hence, the use and abuse of frying oils have become of great concern for Health Administrations and consumers, especially since compounds originated at high temperatures are suspicious to impair the nutritional value of fats (Dobarganes & Márquez-Ruiz, 2003). As quality of fried foods is affected by that of the frying oil, regulations or guidelines have been established in many countries to guarantee high quality foods. The most extended limitation establishes that the used frying oil should be replaced when the total content of polar compounds, representative of the new compounds formed during frying, is higher than 25% expressed on oil weight (Firestone, 1996).

Studies carried out in different countries show the need for improving the quality of frying oils to produce more nutritious fried foods (Croon *et al.*, 1986; Gertz, 1986; Sebedio *et al.*, 1987; Dobarganes & Márquez-Ruiz, 1995; Skrókki, 1995; Lake & Scholes, 1997; Vahcic & Hruskar, 1999). Practical deep-fat frying can

be divided into industrial and fast-food segments, characterised by the use of continuous and discontinuous fryers, respectively. From the analysis of a high number of samples it is deduced that the situation is very different in these two segments and that the main problem is to determine when the fat or oil has to be replaced where there are no laboratory facilities (Dobarganes & Márquez-Ruiz, 1998). Hence, analytical tests simpler and more rapid than the official methods are necessary to monitor oil quality in restaurants and fried food outlets.

In a previous study, validation data for rapid tests were reported with emphasis on the utility of commercialised kits based on chemical reactions (Dobarganes & Márquez-Ruiz, 1995). The main conclusion was that the application of any of the chemical tests studied would contribute to improve the quality of used frying fats and oils. However, rapid tests are not still widely extended probably because they are expensive for quality control in small fryers.

Among the rapid tests based on oil physical properties, the food oil sensor (FOS), measuring changes in the dielectric constant, was introduced in the 1970s. Different studies have shown a high linear correlation with the total content of polar compounds when the initial oil was used to establish the zero of the

*Correspondent: Fax: +34 95 4616790;
e-mail: cdobar@cica.es

instrument (Croon *et al.*, 1986; Wegmueller, 1994, 1998). New systems based on the same property have been commercialised recently (Stier, 2004).

In the last years, efforts have been made in developing instruments based on the increase in viscosity and density occurring in parallel to oil degradation. In this respect, two devices are of interest: Fri-Chek (Gertz, 2000) and Viscofrit (VF) (Castellón-Amau, 1999).

The objective of this study was to compare the performance of physical and chemical rapid tests in a significant number of samples of unknown history. Two chemical tests based on carbonyl (Fritest) and oxidation compounds (Oxifritest), and two physical tests based on viscosity (VF) and dielectric constant (FOS) were evaluated in a set of 105 used frying oils. The utility of the rapid tests was established by comparing their results with those obtained for the total content of polar compounds and the content of polymers, as they are the most accepted determinations for the evaluation of the quality of frying oils.

Materials and methods

Samples

A total of 105 samples of used frying fats and oils from different origins, including domestic fryers, restaurants and catering services, and industrial continuous fryers, were used in this study. With the exception of the supplier, the history of the samples in terms of the frying variables was unknown. All the samples were filtered before the analyses.

Analytical methods

Polar compounds were determined by adsorption chromatography according to IUPAC Standard Method 2.507 (IUPAC, 1992). Polymerised triglycerides were determined directly in the oil samples by high performance size-exclusion chromatography according to IUPAC Standard Method 2.508 (IUPAC, 1992).

Fatty acid composition was determined by gas chromatography after derivatisation to fatty acid methyl esters with KOH 2N in methanol according to IUPAC Standard Methods 2.301 and 2.302 (IUPAC, 1992).

Rapid tests based on chemical properties

Fritest

Fritest is a colorimetric kit-test commercialised by Merck that is sensitive to carbonyl compounds (Von Zeddelmann, 1973). The colour of a mixture of the sample and a reagent is compared with a four-colour scale from 1 (pale-yellow) representing good, 2 (yellow) still good, 3 (yellow-orange) fat to be replaced and 4 (orange) abused fat.

Oxifritest

Oxifritest, also commercialised by Merck, is a colorimetric kit-test based on redox indicators that give response to the total amount of oxidised compounds in the sample (Meyer, 1979). After mixing two reagents, the oil is added and the developed colour of the mixture is compared with a four-colour scale with 1 (blue) representing good, 2 (blue-green) still good, 3 (green) fat to be replaced, and 4 (olive green) abused fat.

Rapid tests based on physical properties

Viscofrit

The VF test is based on the time necessary to empty a standard funnel-like cone filled with the frying oil. The cone is emptied by gravity through a small calibrated hole at its bottom. The test gives response to the increase of viscosity due to the formation of polymerisation compounds. The VF is supplied with two thermometers that are used for monounsaturated and polyunsaturated frying oils, i.e. oils with prevailing amount of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids, respectively. The thermometers are calibrated between 15 °C and 50 °C and give for each temperature the maximum time in seconds to empty the cone containing the used frying oil. Times longer than those established indicate that the used frying oil has to be discarded (Castellón-Arnau, 1999). General information on the apparatus can be found at <http://www.viscofrit.com>.

Food oil sensor

The FOS is a portable electronic instrument, commercialised by Northern Instruments Corp., measuring the change of the dielectric constant in the frying fat relative to the fresh oil. The instrument is calibrated with fresh fat of the same type as the frying fat and the range of measurement is from 0 to 10. It has been indicated that an FOS reading of four should be the limit beyond which the frying fat should be discarded (Graziano, 1979).

Statistical analysis

Linear correlation analysis was performed by using Microcal Origin 5.0 (Microcal Software, Inc., MA, USA).

Results and discussion

Tables 1–3 show the general results obtained for all the determinations. The results have been ordered by increasing levels of polar compounds and it can be observed that the samples selected cover a wide range of oil degradation. Thus, forty-three samples had levels of polar compounds <20% (Table 1), thirty samples had levels of polar compounds between 20% and 30%

Table 1 Analytical results for samples containing levels of polar compounds lower than 20%

Polar compounds (wt %)	Polymers (wt%)	Major fatty acids (wt %)				Rapid tests*			
		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	FT	OFT	VF (22 °C)	FOS
4.0	1.0	7.8	3.8	28.7	57.5	1	1	56	2.2
5.9	0.6	9.7	4.2	63.2	21.9	3	3	70	3.6
6.9	1.4	5.8	3.9	58.8	29.9	1	1	56	3.1
8.1	3.0	9.6	3.0	37.6	40.8	1	1	57	2.8
8.5	3.5	8.2	3.7	71.6	16.0	1	1	73	4.8
9.4	3.7	7.4	3.6	61.3	26.7	1	2	58	2.9
9.6	3.5	5.1	3.7	66.2	23.9	1	2	57	2.3
9.7	2.8	5.8	4.1	72.4	14.8	2	2	62	2.7
9.7	2.8	21.7	3.1	48.6	21.1	2	2	60	2.3
10.1	3.4	10.0	3.4	53.5	28.5	3	2	60	2.8
10.2	3.8	7.9	3.7	70.6	16.4	2	2	71	3.1
10.6	3.5	9.2	4.2	62.9	23.6	1	1	68	3.0
11.2	4.6	7.1	4.3	26.4	61.6	1	1	57	2.9
12.3	7.1	7.2	3.9	34.1	53.2	1	1	57	3.0
12.8	4.5	12.2	3.8	69.3	13.9	3	3	72	1.8
12.8	4.4	9.4	3.6	49.4	34.9	2	2	60	4.0
12.8	7.8	8.7	4.0	47.0	39.1	3	3	66	2.8
12.9	8.0	7.2	3.8	37.3	50.4	2	2	58	3.1
13.4	5.4	7.6	4.1	38.0	50.0	2	2	58	3.6
13.6	5.0	10.8	3.2	73.4	10.5	1	1	65	2.4
13.9	4.5	11.8	3.6	72.6	9.3	3	3	68	3.7
14.3	1.9	43.5	4.2	40.7	10.9	1	2	65	3.5
14.3	5.9	7.5	4.0	68.6	18.9	2	2	67	4.0
14.7	6.9	7.9	3.9	26.8	60.7	3	2	60	4.1
15.0	6.3	9.5	3.0	59.7	15.0	3	2	65	3.5
15.0	5.8	13.0	3.7	58.6	21.4	3	3	71	2.8
15.6	7.1	8.6	3.8	45.5	38.0	2	2	60	3.6
16.0	3.5	23.5	3.8	33.7	35.3	2	1	62	4.3
16.3	6.7	12.9	2.7	71.7	9.9	2	3	75	3.8
16.5	7.4	9.3	3.4	62.6	20.5	2	2	64	3.6
17.3	9.3	13.3	3.6	47.1	35.6	2	2	68	4.0
17.4	11.3	4.3	3.9	70.8	19.2	2	2	73	3.3
17.7	10.3	9.7	4.2	29.7	53.6	2	2	67	3.8
17.7	11.5	7.2	4.2	30.2	56.6	2	2	62	4.2
18.1	6.7	11.1	3.4	59.8	22.1	2	2	63	3.8
18.2	6.8	11.9	4.1	54.7	28.2	2	2	68	3.0
18.2	8.0	8.9	4.5	27.5	57.5	2	2	63	3.1
18.3	3.9	5.5	3.8	66.5	21.9	2	2	60	2.8
18.4	11.5	7.6	4.2	28.9	58.1	1	1	61	3.5
19.0	4.0	5.4	3.7	66.9	22.8	3	3	58	3.3
19.0	10.2	9.7	4.4	52.0	28.0	3	3	72	4.3
19.0	11.4	8.2	4.2	31.5	53.9	2	1	62	4.0
19.1	7.4	11.7	3.9	71.6	10.3	3	3	71	4.2

FT, Fritest; OF, Oxifritest; VF, Viscofrit; FOS, Food oil sensor. Grey cells correspond to false results.

(Table 2), and thirty-two samples had levels of polar compounds > 30% (Table 3). Major fatty acids have also been included as in one of the method assayed (VF) the result can be improved by considering the fatty acid composition of the oil, as it will be discussed later.

All the rapid tests were performed following the instructions given in their respective user's guides. However, those based on physical properties need some specific comments. The VF can be performed at any

temperature between 15 °C and 50 °C, but has to be applied to liquid samples. Most of the samples were liquid at room temperature and the tests were performed at 22 °C. In the case of solid samples, temperatures higher than 22 °C had to be applied. However, the results are expressed as the time corresponding to the evaluation at 22 °C, by following the exponential relationship between temperature and time given in the scales. Moreover, as commented in the experimental

Table 2 Analytical results for samples containing levels of polar compounds between 20% and 30%

Polar compounds (wt %)	Polymers (wt %)	Major fatty acids (wt %)				Rapid tests			
		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	FT	OFT	VF (22 °C)	FOS
20.1	4.7	8.1	4.0	63.7	22.7	4	3	71	3.1
20.1	11.1	10.0	3.6	35.2	49.6	2	1	82	3.9
20.5	13.4	7.1	4.1	30.3	55.6	2	3	64	4.0
21.0	8.6	6.3	3.9	55.2	33.2	2	2	80	3.2
21.2	10.9	11.9	4.2	70.9	12.2	3	3	77	4.9
21.3	11.7	8.0	4.1	32.1	55.0	2	1	88	4.7
22.2	10.5	12.2	3.2	75.3	6.7	3	2	74	4.1
22.2	13.9	12.0	2.5	29.6	55.9	3	3	86	4.5
22.3	11.7	6.5	4.3	76.6	12.6	2	2	79	5.4
22.7	7.7	9.8	3.6	51.6	32.8	3	2	86	5.2
23.3	15.1	4.5	3.9	69.5	18.9	3	2	80	3.9
23.3	10.6	8.5	3.7	55.8	30.2	2	3	71	4.2
23.5	15.1	9.0	3.2	35.5	50.2	3	3	72	4.7
23.6	16.1	7.5	4.4	29.6	57.5	2	2	69	4.5
23.7	15.2	7.5	4.3	30.3	57.8	2	2	69	5.1
23.8	14.0	11.8	4.3	37.4	43.9	4	4	70	5.0
24.1	7.4	45.7	6.4	41.6	5.3	4	3	78	4.6
24.4	12.0	10.9	3.7	75.5	6.4	3	3	79	4.3
24.8	16.1	9.0	4.9	25.2	60.9	4	4	86	4.7
25.0	13.9	8.9	4.4	29.7	56.5	2	2	76	5.2
25.3	13.9	11.1	4.8	71.3	10.4	4	4	82	4.5
25.6	15.8	5.8	3.4	65.1	23.7	3	3	85	5.1
27.1	9.2	10.3	3.9	74.0	10.7	3	2	81	4.5
27.7	17.9	13.7	3.8	31.8	50.0	3	3	75	5.8
28.3	19.3	8.1	4.2	29.5	50.4	2	2	72	4.6
28.9	20.5	8.4	4.3	31.8	53.8	3	3	85	5.0
29.1	12.0	12.0	3.5	75.8	5.8	4	4	81	4.9
29.3	16.1	8.3	4.4	48.2	37.9	4	4	80	6.1
29.4	20.4	8.4	4.2	30.4	55.8	2	2	77	5.1
29.8	18.7	11.7	4.2	33.0	50.0	3	3	86	5.5

For abbreviations see Table 1.

part, the device is supplied with two thermometers for monounsaturated and polyunsaturated oils, respectively. Thus, when the percentage of C18:1 was higher than that of C18:2 the limit time corresponds to that read on the thermometer used for monounsaturated oils. On the contrary, when the percentage of C18:2 was higher than that of C18:1 the limit time in the tables corresponds to that read on the thermometer used for polyunsaturated oils. The maximum times at 22 °C were 78 and 71 s for mono and polyunsaturated oils, respectively.

In the case of the FOS, the zero was calibrated with the reference solution supplied with the apparatus, as a calibration with the initial oils was not possible because of the unknown history of the samples. Furthermore, the increasing number of prefried foods in the market contributes to modify the composition of the frying oil in the final frying operation before consumption (Pérez-Camino *et al.*, 1991). In this respect, it is difficult to select the same type of oil for the calibration as a significant number of the oil samples had a contamin-

ation with hydrogenated oils, typical of the dilution of fat from prefried foods into the oil in the fryer.

Table 4 shows the matrix of linear correlation coefficients for all the methods applied. Given the number of samples evaluated, all the coefficients were highly significant ($P < 0.0001$), although the highest correlation coefficients between rapid tests and reference methods were found for those based on physical oil properties (VF and FOS). However, this difference is not strange as in the chemical tests the results correspond to a discontinuous variable with only four possible values, while the scales for physical tests are continuous. In the case of VF, the correlation coefficients increased when two groups of samples were considered. Thus, the correlation coefficient found was 0.9349 for monounsaturated oils (sixty-seven samples) and 0.9119 for polyunsaturated oils (thirty-eight samples). Table 4 also shows that the highest correlation coefficient was found between the two reference methods, i.e. between the content of polar compounds and the content of polymers. Thus, the correlation coefficients found for the

Table 3 Analytical results for samples containing levels of polar compounds higher than 30%

Polar compounds (wt %)	Polymers (wt %)	Major fatty acids (wt %)				Rapid tests			
		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	FT	OFT	VF (22 °C)	FOS
30.5	17.0	13.9	4.4	37.5	43.0	1	1	83	5.9
31.2	13.1	5.9	4.6	78.7	9.9	2	2	97	7.1
31.3	18.6	7.8	4.2	31.5	55.3	3	3	80	6.5
33.2	18.8	14.8	3.8	57.7	21.7	3	3	90	6.4
34.2	17.7	6.6	5.0	74.1	13.5	3	3	103	6.3
34.6	17.5	7.2	2.8	55.2	30.1	4	4	95	7.2
34.7	16.6	15.7	3.5	69.8	7.1	4	3	98	5.7
34.8	12.6	46.5	4.7	39.6	7.4	4	4	90	6.4
36.0	21.0	7.5	3.8	63.9	21.7	3	3	95	6.1
36.2	22.0	9.0	3.9	70.4	15.9	4	3	120	7.1
36.4	17.7	8.3	3.9	34.6	51.5	2	2	76	5.1
37.3	26.5	7.9	4.3	31.6	54.0	3	3	91	6.4
37.8	22.3	9.9	16.0	70.2	2.6	2	2	105	7.4
37.9	25.3	7.8	4.2	31.9	54.3	3	3	92	6.9
38.2	21.7	8.5	4.5	71.8	13.6	4	3	106	7.6
38.6	25.1	9.0	4.4	35.8	49.8	4	4	105	6.7
38.8	25.9	8.7	2.8	54.0	27.1	4	4	107	7.6
39.2	25.4	11.2	5.0	30.1	51.1	3	3	102	6.5
39.3	26.0	7.5	3.2	56.9	28.8	4	4	105	7.8
39.5	25.2	9.7	2.7	55.0	26.4	4	4	115	7.7
39.8	25.5	10.1	4.5	34.9	49.6	3	3	103	7.4
40.1	26.3	9.3	3.0	54.5	25.9	4	4	120	8.7
40.2	24.6	12.7	3.7	40.3	36.4	4	4	100	6.4
41.7	25.8	9.3	4.1	33.9	51.2	4	4	114	6.9
42.2	27.3	11.9	4.7	35.1	47.1	4	4	108	8.1
43.0	24.3	15.7	3.6	72.8	5.8	4	4	118	8.0
43.5	30.0	9.1	3.0	55.2	25.7	4	4	120	8.6
43.6	32.0	12.2	4.9	30.9	49.4	3	3	135	8.5
44.1	29.5	9.0	3.0	56.0	25.1	4	4	123	9.2
47.8	28.8	8.0	3.1	57.7	27.3	4	4	134	8.7
48.2	30.1	8.1	3.3	57.8	27.4	4	4	135	8.6
50.3	29.7	24.2	12.5	58.1	2.8	3	3	125	10.0

For abbreviations see Table 1.

	Polar compounds	Polymers	Fritest	Oxifritest	Viscofrit	Food oil sensor
Polar compounds	1.0000	0.9536	0.6732	0.6456	0.9117	0.9363
Polymers	0.9536	1.0000	0.6034	0.6059	0.8836	0.9123
Fritest	0.6732	0.6034	1.0000	0.8873	0.6581	0.6240
Oxifritest	0.6456	0.6059	0.8873	1.0000	0.6415	0.5974
Viscofrit	0.9117	0.8836	0.6581	0.6415	1.0000	0.9228
Food oil sensor	0.9363	0.9123	0.6240	0.5974	0.9228	1.0000

Table 4 Linear correlation coefficients between polar compounds, polymers, and the rapid methods based on chemical and physical properties of frying oils

rapid tests with the content of polar compounds and polymers were very similar. Hence, the rapid tests can replace both reference methods in a similar way.

Figure 1 illustrates the linear regression found between the two reference methods. From the linear equation, the level of 25% of polar compounds corresponded to a level of 13.7% of polymerisation com-

pounds. Now, only two countries have included the level of polymers in their regulations. The level found for the set of samples analysed in this study was between those established in Belgium (10%) and the Netherlands (16%) for rejecting used frying oils (Firestone, 1996).

Correlation coefficients between the percentage of polar compounds and the results of different rapid tests

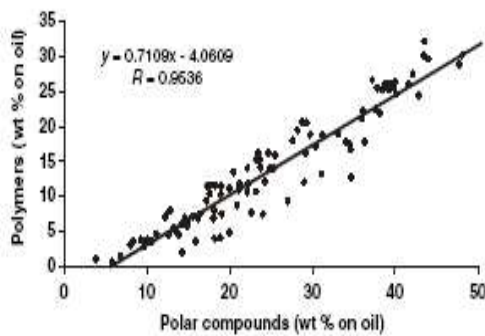


Figure 1 Linear regression analysis between the two reference methods: polar compounds and polymers.

have been reported to be 0.75 and 0.74 for Fritest and Oxifritest, respectively (Croon *et al.*, 1986) and 0.894 for FOS (Gertz, 2000), similar to those in Table 4. However, with respect to the value of correlation coefficients, the main objectives of the rapid tests should be taken into account. If the main objective is to give information on the moment in which the oil has to be replaced according to regulations, a high correlation in the complete range of polar compounds is not essential, being much more important what happens around the point of rejection. On the contrary, if the main objective is to gain information on the loss of quality of the frying fat or oil, a high correlation between the total content of polar compounds and the results provided by the rapid tests should be a necessary condition. Moreover, continuous scales for both measurements are needed.

In the present situation, where a significant number of used frying fats do not fulfil the regulations, it is important to know the capability of the test for establishing whether the fat has to be replaced. Thus, the main objective should be to minimise the number of false results given by the tests. Furthermore, the type of false results, either positive or negative, has to be considered. In this regard, positive false results are obtained when the rapid test indicates that the fat should be rejected in samples with contents of polar compounds lower than the limit established in the regulation. On the contrary, negative false results are obtained when the rapid test indicates that the fat can be further used in samples with contents of polar compounds higher than the limit established in the regulation.

Figures 2–4 show the possibilities of the rapid tests selected to replace the determination of polar compounds. The two lines in the middle of the figures correspond to the limit of the reference method (25% of polar compounds) and to the limit of the rapid test. Thus, four zones can be observed. In the upper part of Fig. 2, the main four zones have been numbered to facilitate the discussion. Zones 2 and 3 correspond to correct results for the rapid test, i.e. the rapid test

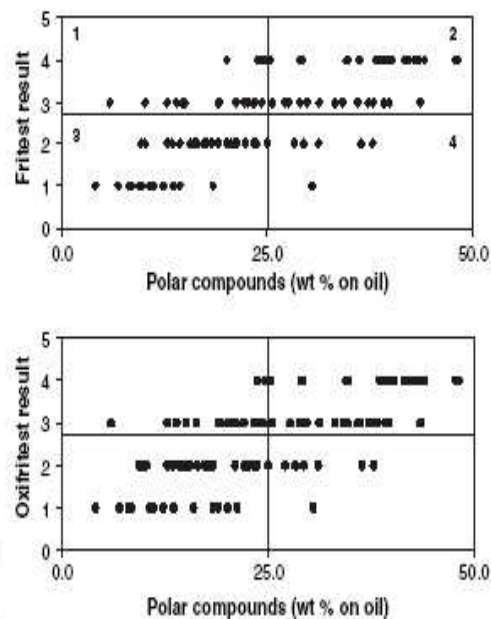


Figure 2 Results obtained for the rapid tests based on chemical reactions of used frying fats and oils: Fritest and Oxifritest.

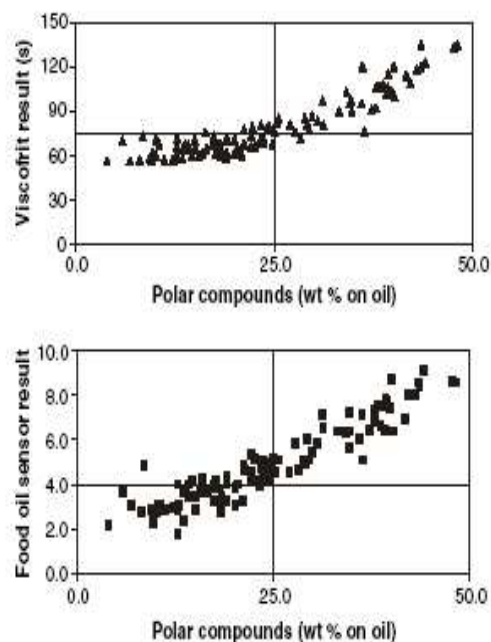


Figure 3 Results obtained for the rapid tests based on physical properties of used frying fats and oils: Viscofrit at 22 °C and food oil sensor.

indicates that the oil can be further used when the level of polar compounds is <25% (zone 3) or should be rejected when the level of polar compounds is >25% (zone 2). On the contrary, zones 1 and 4 correspond to

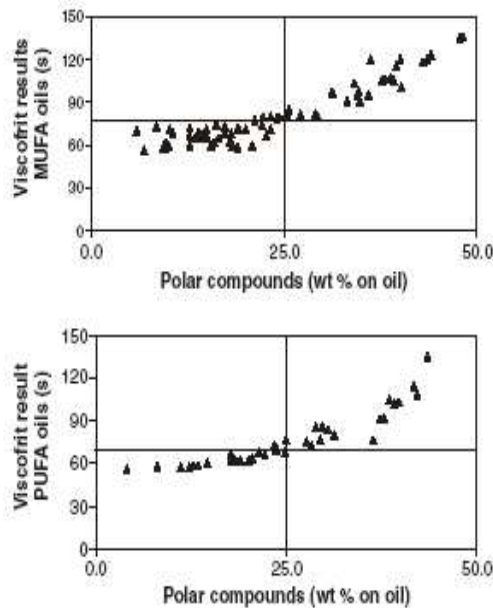


Figure 4 Differentiation of the results for oils with prevailing amount of monounsaturated fatty acids (MUFA oils) and oils with prevailing amount of polyunsaturated fatty acids (PUFA oils) obtained with Viscofrit at 22 °C.

positive and negative false results, respectively, as defined above.

Figure 2 shows the results of the rapid tests based on chemical reactions. As can be observed, the results were very similar for Fritest and Oxifritest. In parallel, the correlation coefficient between the two rapid tests was very high (Table 4).

Figure 3 shows the results of the rapid tests based on physical properties. As opposed to the rapid tests based on chemical reactions, the measure parameters of the tests based on physical properties are continuous. Thus, apart from the point of oil rejection, it is possible to obtain information on the loss of quality of the frying oil. Also, the number of false results was very low and concentrated around the intersection of the lines. In the case of FOS, a value of 4 has been suggested to reject the oil, although the results indicated that, under the conditions used in this study, a value of 5 would minimise the number of false results. In the case of VF, the type of oil was not considered and the time established in Fig. 3 for rejecting the oil was the mean value of those established on both thermometers (71 and 78 s). In Fig. 4, monounsaturated and polyunsaturated oils have been evaluated with their respective thermometers. As can be observed, the results were excellent and the number of false results extremely low.

It is worthy of remark that even if we have some positive and negative false results, the samples in zone

Table 5 Evaluation of fake results obtained by the rapid tests

Rapid test	Limit for the test	Number of samples	Number of total false results	Number of positive false results	Number of negative false results
Fritest	3	105	27	21	6
Oxifritest	3	105	26	19	7
Viscofrit					
Total	75 s	105	7	5	2
MUFA	78 s	67	4	3	1
PUFA	71 s	38	1	1	0
Food oil sensor	>4	105	20	20	0
	>5	105	8	3	5

2 (Figs 2-4) would have been rejected at lower percentage of polar compounds if a rapid test had been routinely applied. Consequently, application of any of the tests assayed would significantly contribute to improve the quality of the used frying fats and oils, considering the present situation characterised by a significant number of used frying oils overpassing the limits of degradation established in the official regulations.

Table 5 summarises the number and type of false results for the four tests and also the possibilities commented above for the two physical tests, i.e. the separation of oils as a function of the fatty acid composition for VF measurements and the change of the limit of rejection for FOS measurements to 5. As can be observed, the tests based on physical properties provided very good results to replace the determination of polar compounds.

The following comments can be of interest for better performance of the tests:

1. All the results were obtained on filtered samples. Although filtration is not necessary, the presence of solid particles of foods in the frying oil could increase the oil fall time in VF, and the oil moisture could increase the dielectric constant. Thus, special attention should be paid to these circumstances, which are much more important in the tests based on physical properties.
2. The calibration of the instrument in physical tests is essential. For example, a small change in the diameter of the VF hole would change the oil fall time.
3. The tests have been applied to a set of 105 samples. Unfortunately, it is difficult to know the reasons of the false results because we could not find any explanation based on fatty acid composition, melting point or physical aspect. Nevertheless, whatever the test considered, its performance in a specific restaurant, fried food outlet or industry would be improved as soon as the fryer operator becomes accustomed to its use.

Conclusions

From the results obtained in this study the following conclusions can be deduced:

1. Any of the analytical rapid tests studied are of great utility to determine the point at which frying fats and oils should be discarded. They would contribute to improve the present situation of the discontinuous frying sector, characterised by a significant number of fats and oils overpassing the limits of degradation established in official regulations.
2. The tests based on physical properties showed better results than those based on chemical reactions, as the number of false results was lower. Furthermore, they can be useful to gain information on the changes in the frying oil quality, as their results showed high correlation coefficients with the determination of polar compounds.
3. The four tests assayed are rapid, safe and can be performed by untrained personnel. Thus, their use is strongly recommended.

Acknowledgments

This research work was supported by Junta de Andalucía and MCYT (Project AGL 2004-00148). Eliana Rodrigues from the Institute National de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ was supported by a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior do Brasil (CAPES). The authors thanks Ms Mercedes Giménez for assistance.

References

Castellón-Arnau, A. (1999). Dispositivo medidor de la alteración de aceites comestibles recalentados. Patent ES 1 043 160U.

Croon, L.B., Rogstad, A., Leth, T. & Kiutamo, T. (1986). A comparative study of analytical methods for quality evaluation of frying fat. *Fette Seifen Anstrichmittel*, 88, 87–91.

Dobarganes, M.C. & Márquez-Ruiz, G. (1995). Control de calidad de las grasas de fritura. Validez de los métodos de ensayos rápidos en

sustitución de la determinación de compuestos polares. *Grasas y Aceites*, 46, 196–201.

Dobarganes, M.C. & Márquez-Ruiz, G. (1998). Regulation of used frying fats and validity of quick tests for discarding the fats. *Grasas y Aceites*, 49, 331–335.

Dobarganes, M.C. & Márquez-Ruiz, G. (2003). Oxidized fats in foods. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 6, 157–163.

Firestone, D. (1996). Regulation of frying fats and oils. In: *Deep Frying: Chemistry, Nutrition and Practical Applications* (edited by E.G. Perkins & M.D. Erickson). Pp. 323–334. Champaign, IL, USA: AOCS Press.

Gertz, C. (1986). Chromatographische Methoden bei der Untersuchung von Fritierfetten. *Fette Seifen Anstrichmittel*, 88, 475–480.

Gertz, C. (2000). Chemical and physical parameters as a quality indicator of used frying fats. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102, 566–572.

Graziano, V.J. (1979). Portable instrument rapidly measures quality of frying fat in food service operations. *Food Technology*, 33, 50–56.

IUPAC (1992). *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*. 1st Supplement to 7th edn. Oxford: Pergamon Press.

Lake, R.J. & Scholes, P. (1997). Quality and consumption of oxidized lipids from deep-frying fats and oils in New Zealand. *Journal of The American Oil Chemists Society*, 74, 1065–1068.

Meyer, H. (1979). Eine neue und einfache Schnellmethode zur Erfassung des oxidativen Zersetzungsgrades thermisch belasteter Fette. *Fette Seifen Anstrichmittel*, 81, 539–542.

Pérez-Camino, M.C., Márquez-Ruiz, G., Ruiz-Méndez, M.V. & Dobarganes, M.C. (1991). Lipid Changes During Frying of Frozen Prefried Foods. *Journal of Food Science*, 56, 1644–1650.

Sebedio, J.L., Grandgirard, A., Septier, C. & Prevost, J. (1987). Etat d'altération de quelques huiles de friture prélevées en restauration. *Revue Française des Corps Gras*, 34, 15–18.

Skröckki, A. (1995). Test used for examining the quality of frying oils. *Fat Science Technology*, 97, 384–386.

Stier, R.F. (2004). Tests to monitor quality of deep-frying fats and oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106, 766–771.

Vahcic, N. & Hruskar, M. (1999). Quality and sensory evaluation of used frying oil from restaurants. *Food Technology and Biotechnology*, 37, 107–112.

Von Zeddelmann, H.V. (1973). Probleme bei der beurteilung von fritierfetten. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 69, 81–86.

Wegmueller, F. (1994). Polar components of frying fats derived from data of dielectric measurements. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 199, 51–54.

Wegmueller, F. (1998). Frying fats: data of food oil sensors vs. polar components. Calibration curve and its application range. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 89, 301–307.

3.4 - **MANUSCRITO 4** - Alterações da gordura vegetal parcialmente hidrogenada em fritura de batatas.

ALTERAÇÕES DA GORDURA VEGETAL PARCIALMENTE HIDROGENADA EM FRITURA DE BATATAS

Eliana Rodrigues Machado^{1*}, Shirley de Mello Pereira Abrantes², María del Carmen Dobarganes García³

1: Aluna de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) / FIOCRUZ

*Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 21040-900 Brasil.

Tel.: (21) 38655124, correio eletrônico: eliana.machado@incqs.fiocruz.br

2: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) / FIOCRUZ

3: Instituto de la Grasa / CSIC – Sevilha – Espanha

RESUMO

Foi avaliado, neste estudo, o comportamento da gordura vegetal parcialmente hidrogenada proveniente de dois procedimentos, em semelhantes condições, de fritura de batatas a 180° C. Foram utilizadas duas fritadeiras domésticas semelhantes de 1 L. As mudanças nos teores de ácidos graxos, como também a formação de compostos polares e de polímeros, foram determinadas. Valores, em porcentagem, das perdas após período de 25 horas de aquecimento no primeiro e segundo procedimento de fritura, respectivamente, foram 47,6 e 30,8, para o ácido linoléico, e 58,3 e 50,0, para o ácido linolênico. A formação de polímeros após período de 25 horas de aquecimento foi de 0,8 a 29,7 % e de 0,8 a 21,3 %, no primeiro e segundo procedimento, respectivamente. Foi verificada alta correlação entre a perda do ácido linoléico e a formação de polímeros, com coeficiente de correlação de 0,9792, considerando os dois procedimentos de fritura.

Palavras-chave: Ácidos graxos - Compostos polares - Gordura vegetal parcialmente hidrogenada - Óleos de fritura - Polímeros

SUMMARY

In this study, the performance of partially hydrogenated vegetable fat in the frying of potatoes was evaluated in duplicate experiments at 180 °C. Two identical domestic fryers were used and changes in fatty acids as well as formation of polar compounds and polymers were determined. Losses of linoleic acid in percentages on the initial value at the end of the heating period (25 hours) were 47,6 and 30,8 %, for the first and second experiment respectively. As for linolenic acid, the parallel percentual losses were 58,3 and 50,0 %, respectively. On other hand, polymers increased from 0,8 to 29,7 % and from 0,8 to 21,3 %, respectively, after 25 hour heating in both experiments. High correlation was found between the loss of linoleic acid and polymer formation, the correlation coefficient being 0,9792 when all the data from both frying experiments were considered.

Key-words: *Fatty acids - Frying oils - Partially hydrogenated vegetable fat - Polar compounds - Polymers*

INTRODUÇÃO

Têm-se verificado um crescente interesse no estudo de alterações ocorridas em óleos e gorduras usados em frituras (ALMEIDA et al., 2006; DOBARGANES; MÁRQUEZ-RUÍZ, 2003). Esta preocupação é justificada já que diversos estudos concluem que substâncias, que podem ser formadas neste processo, podem ser prejudiciais à saúde humana (DOBARGANES; MÁRQUEZ-RUÍZ, 2003). Além disto, avaliações da qualidade destes óleos e gorduras (CROON et al., 1986; DOBARGANES; MÁRQUEZ-RUÍZ, 1995; GERTZ, 1986; LAKE; SCHOLE, 1997; MATTOS; ANS; JORGE, 2000; SEBEDIO et al., 1987; SKRÖKKI, 1995; VAHCIC; HRUSKAR, 1999) demonstram a necessidade de mais estudos e melhor controle sobre este processo, pois foram encontradas nestas amostras porcentagens de substâncias de degradação acima do limite permitido pelas legislações internacionais (DANA; SAM SAGUY, 2001).

A principal alteração, em termos quantitativos, é a oriunda da degradação dos ácidos graxos, componente importante e majoritário do óleo ou gordura.

A degradação dos ácidos graxos dos óleos e gorduras em uso em frituras ocorre, principalmente, através do contato destes com o ar, água e alta temperatura, que propiciam reações hidrolíticas, oxidativas e térmicas. Destas reações se originam substâncias como ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis, monômeros oxidados, polímeros (FRITSCH, 1981). Este grupo de substâncias é determinado analiticamente como “compostos polares” (AOAC, 2003).

Com o objetivo de fornecer dados para avaliar alterações da gordura vegetal parcialmente hidrogenada submetida a frituras de batatas, nas condições do estudo, foram realizados as determinações quantitativas dos principais ácidos graxos, compostos polares e polímeros.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra inicial - não tratada

A amostra de gordura vegetal parcialmente hidrogenada, utilizada para fins culinários, foi obtida do comércio da cidade do Rio de Janeiro, e se encontrava dentro do prazo de validade.

Amostras obtidas a partir de dois procedimentos de fritura de batatas

Foram utilizadas dez amostras, provenientes de dois procedimentos de fritura de batatas com a gordura vegetal parcialmente hidrogenada acima mencionada.

Foram realizados no laboratório, dois procedimentos de fritura, em semelhantes condições, de acordo com Jorge, et al. (1996): em cada operação de fritura, (100 ± 0,01) g de batatas frescas, descascadas, cortadas em palito, lavadas e secas foram fritas por 3 minutos. Foram utilizadas (550 ± 0,01) g da gordura à temperatura média de 180° C. Para cada procedimento foi utilizada uma fritadeira doméstica de 1 L, com relação inicial, superfície da fritadeira sobre volume do meio de fritura, de 0,3 cm⁻¹. Em cada procedimento, durante cinco dias a gordura foi submetida, por dia, a 5 horas de aquecimento ocorrendo neste período, a operação de fritura, que resultou na seguinte seqüência de tempo: 5, 10, 15, 20 e 25 h. Em cada procedimento, não houve reposição do meio de fritura.

Métodos Analíticos

As seguintes determinações foram efetuadas, em duplicata, de acordo com o método da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC): acidez em ácido oléico, %, m/m, método 2.201; índice de peróxidos, meq O₂ / kg, método 2.501; matéria insaponificável, %, m/m, método 2.401. O primeiro e o segundo método utilizam a técnica de volumetria; o terceiro método utiliza extração por solvente orgânico e gravimetria (IUPAC, 1992).

A determinação da composição percentual, m/m, dos principais ácidos graxos foi realizada através da análise cromatográfica a gás dos ésteres metílicos destes ácidos, obtidos por derivação com solução de KOH 2N em metanol, de acordo com os métodos 2.301 e 2.302 da IUPAC (IUPAC, 1992). Esta determinação foi realizada em todas as amostras do estudo;

O teor de polímeros foi obtido por dissolução direta das amostras em solvente, e posterior análise cromatográfica a líquido de exclusão por tamanho de partículas, de acordo com o método 2.508 da IUPAC (IUPAC, 1992). Foi realizado em todas as amostras do estudo;

A determinação quantitativa dos compostos polares foi efetuada segundo o método 2.507 da IUPAC (IUPAC, 1992), que utiliza a técnica de cromatografia de adsorção em coluna. Esta determinação foi efetuada em cinco amostras: uma inicial, e quatro que foram submetidas aos dois procedimentos de fritura, acima mencionados, com tempos de aquecimento de 10, 15 e 25 h para o primeiro procedimento, e 25 h para o segundo procedimento.

Análises estatísticas

Foi utilizado o programa da Microsoft Excel para o tratamento dos dados.

Foram avaliadas as correlações entre os valores obtidos, nos dois procedimentos de fritura, da formação de polímeros e da perda do ácido linoléico; e das determinações de compostos polares e de polímeros.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Análise da amostra inicial

A tabela 1 apresenta as características de qualidade e identidade da gordura vegetal parcialmente hidrogenada. Os resultados das análises demonstraram que a amostra estava adequada, para ser utilizada no estudo. Também se verificou que, a amostra é uma gordura proveniente de óleo de soja (BRASIL, 2005).

Tabela 1. Características de identidade e qualidade da gordura vegetal parcialmente hidrogenada.

Acidez em ácido oléico ¹ (%, m/m)	Índice de peróxidos ¹ (meq O ₂ / kg)	Matéria Insaponificável ¹ (%, m/m)	Ácidos Graxos ¹ (%, m/m)				
			C 16:0 (palmítico)	C 18:0 (esteárico)	C 18:1 (oléico)	C 18:2 (linoléico)	C 18:3 (linolênico)
0,09 ± 0,03	0,56 ± 0,07	0,75 ± 0,04	11,3 ± 0,4	9,5 ± 0,4	48,6 ± 0,6	27,3 ± 2,1	2,4 ± 0,4

1: média de 2 determinações e desvio padrão.

2. Análises das amostras obtidas a partir dos dois procedimentos de fritura

A tabela 2 resume a determinação quantitativa, em g por 100 g de gordura, calculada a partir da composição percentual dos principais ácidos graxos das amostras do estudo.

Uma vez que os ácidos graxos saturados não sofrem alteração, a composição quantitativa dos ácidos graxos foi obtida, de acordo com Dobarganes e Pérez-Camino, 1988, assumindo que a concentração do ácido saturado majoritário (C16:0) se mantém, ao longo do procedimento, igual à concentração na amostra inicial. No nosso estudo esta concentração foi de 11,3 %. Então, as porcentagens dos outros ácidos graxos foram obtidas por normalização em relação à concentração inicial do ácido palmítico

Como se pode observar na tabela 2, a quantidade do outro ácido saturado (C18:0) se mantém também em níveis iniciais, o que justifica a aplicação de cálculos matemáticos para se deduzir, a perda de cada ácido, diretamente dos valores da tabela. A última coluna da tabela indica a quantidade total de ácidos graxos que permanecem inalterados.

As perdas, expressas em porcentagens, sobre a quantidade inicial, dos principais ácidos graxos insaturados, ao final do primeiro e do segundo procedimento de fritura foram, respectivamente, 58,3 e 50,0, para o ácido linolênico; 47,6 e 30,8, para o ácido linoléico; e 14,6 e 7,0, para o ácido oléico. Como esperado, a perda do ácido graxo aumenta com o seu grau de insaturação. Porém, do ponto de vista quantitativo, o ácido linoléico foi o mais afetado pelo processo devido à baixa quantidade do ácido linolênico.

Tabela 2. Composição quantitativa (g/100 g de gordura), dos principais ácidos graxos em amostras, de gordura vegetal parcialmente hidrogenada, iniciais e provenientes dos dois procedimentos, de fritura de batatas, com distintos períodos de tempo de aquecimento.

TEMPO DE AQUECIMENTO	ÁCIDOS GRAXOS						A G ³ (%)
	C 16: 0	C 18: 0	C 18: 1	C18: 2	C18: 3	Outros ²	
0 h¹	11,3 ± 0,4	9,5 ± 0,4	48,6 ± 0,8	27,3 ± 2,1	2,4 ± 0,4	0,9 ± 0,4	100
1º procedimento							
5 h	11,3	9,5	47,0	23,0	2,1	1,3	94,2
10 h	11,3	9,8	45,7	20,5	1,9	1,3	90,5
15 h	11,3	9,6	44,3	18,4	1,5	1,8	86,9
20 h	11,3	9,8	43,0	16,2	1,3	2,1	83,7
25 h	11,3	9,5	41,5	14,3	1,0	2,6	80,2
2º procedimento							
5h	11,3	8,7	46,3	25,5	2,2	0,9	94,9
10 h	11,3	9,5	48,1	24,0	1,9	1,0	95,8
15 h	11,3	9,5	47,1	22,2	1,8	1,5	93,4
20 h	11,3	9,4	45,1	19,2	1,5	1,8	88,3
25 h	11,3	9,6	45,2	18,9	1,2	1,9	88,1

1: amostra inicial, e média de 2 determinações e desvio padrão; 2: menor que 0,4 %; 3: total de ácidos graxos não alterados.

Na tabela 3 estão os resultados das análises de determinação de polímeros em todas as amostras do estudo. A amostra de número “zero” é a inicial, e as de número 5 a 25, são as oriundas dos dois procedimentos de fritura de batatas, (1) e (2), aquecidas por 5; 10; 15; 20 e 25 h, respectivamente, como mencionado na parte de material e métodos.

Verificou-se que, como esperado, nos dois procedimentos de fritura nas condições do estudo, os polímeros foram formados; também se verificou que houve aumento de polímeros com o aumento do tempo de aquecimento.

Tabela 3. Resultados analíticos da determinação de polímeros em amostras, de gordura vegetal parcialmente hidrogenada, inicial e provenientes dos dois procedimentos de frituras de batatas.

Polímeros (%, m/m)	G0	G5 (1)	G10 (1)	G15 (1)	G20 (1)	G25 (1)	G5 (2)	G10 (2)	G15 (2)	G20 (2)	G25 (2)
	0,8	5,5	11,9	18,7	24,3	29,7	2,9	6,4	9,7	15,4	21,3

G0: amostra inicial; G5 (1) a G25 (1) e G5 (2) e G25 (2): amostras usadas nos dois procedimentos de fritura, (1) e (2), aquecidas por 5, 10, 15, 20 e 25 h, respectivamente.

A figura 1 ilustra a relação linear entre a perda do ácido linoléico e a formação de polímeros, nos dois procedimentos de fritura. A perda do ácido linoléico está expressa como a diferença entre a quantidade inicial (27,3 %) e as obtidas para as diferentes amostras apresentadas na tabela 2, e corresponde à perda real do ácido graxo.

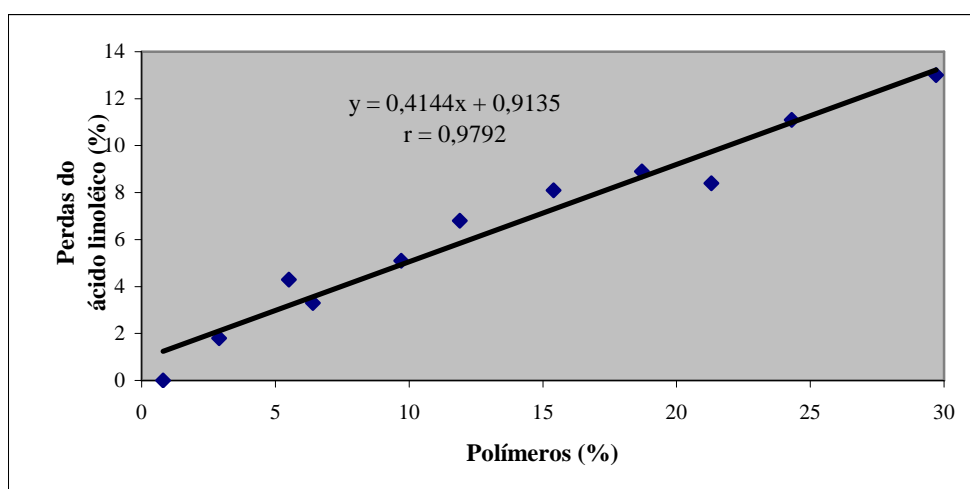


Figura 1. Perda do ácido linoléico e formação de polímeros, nos dois procedimentos de fritura.

O coeficiente de correlação entre a perda do ácido linoléico e a formação de polímeros, foi muito elevado ($r = 0,9792$), para todos os dados dos dois procedimentos de fritura, o que demonstrou que a perda de ácidos graxos pode ser diretamente relacionada à formação de polímeros, nas condições do estudo.

Na tabela 4 são mostrados os resultados de compostos polares para as amostras, inicial e provenientes de frituras de batatas com tempos de aquecimento de 10, 15 e 25 h no primeiro procedimento, e 25 h no segundo procedimento.

Tabela 4. Compostos polares em amostras, de gordura vegetal parcialmente hidrogenada, inicial e proveniente dos dois procedimentos, de fritura de batatas, com distintos períodos de tempo de aquecimento.

Tempo de aquecimento (h)	Compostos Polares (%)
0 ¹	4,4 ± 0,4
1º procedimento	
10	22,2
15	30,8
25	44,1
2º procedimento	
25	32,5

1: amostra inicial, e média de 3 determinações e desvio padrão.

Verificou-se que, nos dois procedimentos de fritura nas condições do estudo, também como esperado, os compostos polares foram formados; verificou-se também que houve aumento destas substâncias com o aumento do tempo de aquecimento.

A figura 2 ilustra a regressão linear entre os resultados das determinações de polímeros e de compostos polares, nas análises da amostra inicial e das amostras provenientes de procedimentos, de frituras de batatas, com tempos de aquecimento de 10, 15 e 25 h no primeiro procedimento e 25 h no segundo procedimento. Embora o parâmetro mais estabelecido pelas leis internacionais para a verificação da qualidade de óleos e gorduras usados em frituras seja a porcentagem de compostos polares (DANA; SAM SAGUY, 2001), a alta correlação encontrada, $r = 0,9966$, demonstra que a verificação da degradação, em amostras de gordura vegetal parcialmente hidrogenada de soja submetida a procedimentos de fritura de batatas, pode ser realizada utilizando também a determinação quantitativa de polímeros.

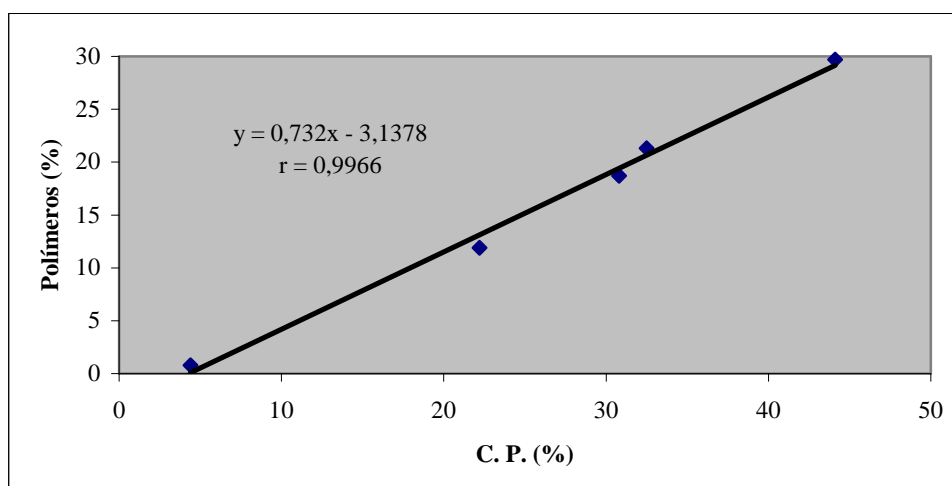


Figura 2. Regressão linear entre os resultados das determinações de compostos polares (C. P.) e de polímeros, nas análises de amostras, de gordura vegetal parcialmente

hidrogenada, inicial e proveniente dos dois procedimentos, de fritura de batatas, com distintos períodos de tempo de aquecimento.

CONCLUSÕES

Os dados obtidos de alteração da gordura vegetal parcialmente hidrogenada de soja em frituras de batatas, nas condições do estudo, demonstraram que:

Maiores graus de alteração ocorreram em ácidos graxos mais insaturados;

O ácido linoléico foi o mais afetado quantitativamente pelo processo devido à baixa quantidade do ácido linolênico.

Foi encontrada uma excelente correlação entre os dois principais métodos analíticos, determinação de compostos polares e determinação de polímeros, utilizados na avaliação dos óleos e gorduras de fritura.

AGRADECIMENTOS

Eliana Rodrigues Machado agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estágio de doutorando recebida; e ao “Instituto de la Grasa” do “Consejo Superior de Investigaciones Científicas”, Sevilha, Espanha, onde o trabalho foi realizado.

Os autores agradecem à Sra. Mercedes Gimenez pela assistência.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, D. T. et al. Revisão de literatura: aspectos gerais do processo de fritura de imersão. **Higiene Alimentar**, v. 20, n. 138, p.42-47, 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 17. ed. Maryland, USA: AOAC International, 2003. 2v.

BRASIL. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Aprova o “Regulamento Técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal”. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 set. 2005. ANVISA-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>> Acesso em: 14 mai. 2006.

CROON, L. B. et al. A Comparative study of analytical methods for quality evaluation of frying fat. **Fette, Seifen, Anstrichmittel**, v. 88, n. 3, p. 87-91, 1986.

DANA, D.; SAM SAGUY, I. Frying of nutritious foods: obstacles and feasibility. **Food Science Technology Research**, v. 7, n. 4, p. 265-279, 2001.

DOBARGANES, M. C.; MÁRQUEZ-RUÍZ, G. Calidad de las grasas de fritura en el sector de restauración de Andalucía. **Grasas y Aceites**, v. 46, n. 2, p. 115-120, 1995.

DOBARGANES, M. C.; MÁRQUEZ-RUÍZ, G. Oxidized fats in foods. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 6, n. 2, p. 157-163, 2003.

DOBARGANES, M. C.; PÉREZ-CAMINO, M. C. Fatty acid composition: a useful tool for the determination of alteration level in heated fats. **Revue Française des Corps Gras**, v. 35, n. 2, p. 1352-1363, 1988.

FRITSCH, C.W. Measurements of frying fat deterioration: a brief review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 58, n. 3, p. 272-274, 1981.

GERTZ, C. Chromatographic methods in the investigations of deep-frying fats. **Fette, Seifen, Anstrichmittel**, v. 88, n. 12, p. 475-488, 1986.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives**. 7. ed. Oxford: Pergamon Press, 1992, supl. 1.

JORGE, N. et al. Influence of dimethylpolysiloxane addition to edible oils: performance of sunflower oil in discontinuous and continuous laboratory frying. **Grasas y Aceites**, v. 47, n. 1-2, p. 20-25, 1996.

LAKE, R. J.; SCHOLE, P. Quality and consumption of oxidized lipids from deep-frying fats and oils in New Zealand. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 9, p.1065-1068, 1997.

MATTOS, E. S.; ANS, V. G.; JORGE, N. Utilização do kit oil test para avaliação da alteração dos óleos de fritura. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 75, p. 40-47, 2000.

SEBEDIO, J. L. et al. State of degradation of some frying oils from restaurants. **Revue Française des Corps Gras**, v. 34, n. 1, p. 15-20, 1987.

SKRÖKKI, A. Test used for examining the quality of frying oils. **Fat Science Technology**, v. 97, n. 10, p. 384-386, 1995.

VAHCIC, N.; HRUSKAR, M. Quality and sensory evaluation of used frying oil from restaurants. **Food Technology and Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 107-112, 1999.

3.5 - **MANUSCRITO 5** - Alterações dos óleos de palma e de soja em fritura descontínua de batatas.

ALTERAÇÕES DOS ÓLEOS DE PALMA E DE SOJA EM FRITURA DESCONTÍNUA DE BATATAS

Eliana Rodrigues Machado^{1*}, Shirley Abrantes², María del Carmen Dobarganes³

1: Aluna de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) / FIOCRUZ

*Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 21040-900, Brasil.

Tel.: (21) 38655124, correio eletrônico: eliana.machado@incqs.fiocruz.br

2: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) / FIOCRUZ

3: Instituto de la Grasa / CSIC – Sevilha – Espanha

RESUMO

Óleos refinados de palma e de soja foram utilizados em quatro experimentos de fritura de batatas em fritadeiras elétricas domésticas de 1 L, com relação inicial, superfície da fritadeira sobre volume do meio de fritura, de $0,3 \text{ cm}^{-1}$. Foram realizados quatro experimentos, dois para cada óleo. Em cinco dias consecutivos cada óleo foi submetido, sem reposição ou substituição do óleo, por um período de 5 h por dia, à temperatura de $(183,1 \pm 1,7)^\circ \text{C}$. Com o objetivo de conhecer a perda de ácidos graxos em relação à formação de polímeros nos óleos de palma e de soja, as seguintes determinações foram realizadas nos dois óleos: composição de ácidos graxos e teor de polímeros. Valores de percentual de perda da composição inicial de ácidos graxos, nos segundos experimentos de fritura nos óleos aquecidos após período de 25 h, foram de 15,0 e 62,2 %, respectivamente, para os ácidos oléico e linoléico, no óleo de palma; e de 6,5, 24,9 e 39,7 %, respectivamente, para os ácidos, oléico, linoléico e linolênico, no óleo de soja. A formação de polímeros foi de 0,4 a 23,7 % e de 0,5 a 30,7 % nos óleos de palma e de soja, respectivamente, durante os experimentos. A correlação entre a perda dos principais ácidos graxos insaturados e os teores de polímeros mostrou-se linear com as equações das retas, $y = -0,5074x + 51,364$ e $y = -0,5535x + 82,713$, e com os coeficientes de correlação, 0,9951 e 0,9740, para o óleo de palma e o óleo de soja, respectivamente. Concluiu-se que, nas condições do estudo, maiores graus de alteração ocorreram em ácidos graxos mais insaturados; e a alteração, dos óleos estudados, pode ser eficazmente verificada através da determinação quantitativa de polímeros.

Palavras-chave: Ácidos graxos - Óleos de fritura - Óleo de palma - Óleo de soja - Polímeros

SUMMARY

Palm and soybean oils were used in duplicate experiments of frying of potatoes in 1L domestic fryers with a surface-to-volume ratio of $0,3 \text{ cm}^{-1}$. The oils were heated during five hours each day for five consecutive days at a temperature of $183.1 \pm 1.7^\circ \text{C}$. The evaluation of oil degradation was followed by the increase of polymer contents and changes in fatty acid composition. The losses of fatty acids in percentages on the initial value at the end of the heating period (25 hours) were 15.0 and 62.2% for oleic and

linoleic acid respectively in palm oil and 6.5, 24.9 e 39.7 % for oleic, linoleic and linolenic acid, respectively in the case of soybean oil. The content of polymers ranged from 0.4 to 23.7% and from 0.5 to 30.7% for palm and soybean oils, respectively. Linear regressions between the loss of total unsaturated fatty acids and polymer formation fitted to the equations $y = -0,5074x + 51,364$ (palm oil) and $y = -0,5535x + 82,713$ (soybean oil) with high correlation coefficients (0.9951 and 0.9740 for palm and soybean oils, respectively). The results obtained clearly indicate that the higher the degree of fatty acid unsaturation, the higher its degradation and also that quantitative determination of polymers would be a very useful analysis to evaluate oil degradation.

Key - words: *Fatty acids - Frying oils - Palm oil – Polymers - Soybean oil*

INTRODUÇÃO

Diversos estudos têm concluído que substâncias, que podem ser formadas em óleos e gorduras usados em frituras, podem ser prejudiciais à saúde humana (DOBARGANES; MÁRQUEZ-RUÍZ, 2003). Avaliações da qualidade destes óleos e gorduras (CROON et al., 1986; DOBARGANES; MÁRQUEZ-RUÍZ, 1995; GERTZ, 1986; LAKE; SCHOLE, 1997; MATTOS; ANS; JORGE, 2000; SEBEDIO et al., 1987; SKRÖKKI, 1995; VAHCIC; HRUSKAR, 1999) também têm demonstrado a necessidade de mais estudos sobre este processo, pois foram encontradas porcentagens altas de amostras insatisfatórias, em relação a legislações internacionais (DANA; SAM SAGUY, 2001).

Os óleos e gorduras submetidos a processos de fritura sofrem alterações hidrolíticas e termoxidativas que resultam na formação de uma mistura complexa de substâncias conhecida como “compostos polares” (DOBARGANES; PÉREZ-CAMINO; MÁRQUEZ-RUÍZ, 1988). Das reações hidrolíticas e termoxidativas se originam substâncias como ácidos graxos livres, mono e diglicerídeos, monômeros oxidados, polímeros (FRITSCH, 1981). O grau de alterações, que ocorre nos principais constituintes do óleo ou gordura, depende de muitas variáveis, entre elas: temperatura, tempo, aquecimento descontínuo ou contínuo, grau de mudança do meio de fritura, etc... Nos processos descontínuos de fritura, utilizados em residências, restaurantes, lanchonetes, a alteração do óleo ou gordura é geralmente devido à ocorrência de ciclos de aquecimento e resfriamento. O grau de mudança, reposição ou substituição por óleo novo, neste processo, é muito baixo e por isso, a alteração é alta (DOBARGANES; MÁRQUEZ-RUÍZ, 1998).

O grau de insaturação do óleo ou gordura é também uma variável importante no processo de fritura (DOBARGANES; MÁRQUEZ-RUÍZ, 1998). Por esta razão, foram escolhidos, para este estudo, dois óleos com distintos graus de insaturação: o óleo de palma e o óleo de soja. No primeiro predomina o ácido graxo que pertence ao grupo dos monoinsaturados, e no segundo predomina o ácido graxo que pertence ao grupo dos polinsaturados (BRASIL, 2005).

O objetivo deste estudo foi conhecer alterações termoxidativas, através da perda de ácidos graxos e da formação de polímeros, nos óleos de palma e de soja, em frituras descontínuas de batatas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra inicial - não aquecida

O óleo de palma refinado comercializado para fritura, foi obtido por doação da indústria “Grupo Agropalma” da cidade de Tailândia, Pará, com certificado de análise e data de validade.

O óleo de soja refinado, utilizado para fins culinários, foi obtido do comércio da cidade do Rio de Janeiro, e se encontrava dentro do prazo de validade.

As características de identidade e qualidade destas amostras foram garantidas através de análises, com seus resultados apresentados na tabela 1, tópico resultados e discussão, deste trabalho.

Amostras provenientes de experimentos de frituras de batatas

Foram utilizadas vinte amostras, dez de cada óleo, provenientes de quatro experimentos de fritura.

Cada experimento foi realizado no laboratório, de acordo com Jorge et al. (1996), e consistiu de operações de fritura, como a seguir: (100 ± 0,01) g de batatas frescas descascadas, cortadas em palito, lavadas e secas, foram fritas em (550 ± 0,01) g de óleo na temperatura de (183,1 ± 1,7)° C, por 3 minutos. Foram utilizadas quatro fritadeiras elétricas domésticas de 1 L, uma para cada experimento, com relação inicial, superfície da fritadeira sobre volume do meio de fritura, de 0,3 cm⁻¹. Cada experimento foi realizado em cinco dias seguidos, e o óleo foi submetido, por dia, a 5 horas de aquecimento ocorrendo neste período, a operação de fritura. Não houve reposição ou substituição do meio de fritura.

As amostras foram estocadas à temperatura de -20° C, até o momento de seu uso.

Reagentes

Foram utilizados solventes e reagentes de grau P. A. (para análise), com exceção dos solventes, hexano e tetrahydrofurano, para as análises cromatográficas que foram de grau para análise de resíduos.

Métodos Analíticos

As seguintes determinações foram efetuadas, em duplicata, de acordo com o método da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC): acidez em ácido oléico, %, m/m, método 2.201; índice de peróxidos, meq O₂ / kg, método 2.501; matéria insaponificável, %, m/m, método 2.401. O primeiro e o segundo método utilizam a técnica de volumetria; o terceiro método utiliza extração por solvente orgânico e gravimetria (IUPAC, 1992).

A composição percentual, m/m, da fração dos ácidos graxos foi realizada, em todas as amostras do estudo, através da análise cromatográfica a gás dos ésteres metílicos, destes ácidos, obtidos a partir da dissolução de (50 ± 0,0001) mg da amostra em 1 mL de hexano e posterior derivação com adição de duas gotas da solução de KOH 2 N em metanol, de acordo com os métodos 2.301 e 2.302 da IUPAC (IUPAC, 1992). Utilizou-se um cromatógrafo da Hewlett-Packard, modelo 6890, equipado com detector por ionização em chama; injetor automático marca Agilent,

modelo 6890, com divisão de fluxo; e coluna cromatográfica, de alta resolução de sílica fundida, com fase estacionária de poli (etileno glicol), nas dimensões de 60 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de fase estacionária. As seguintes condições cromatográficas foram adotadas: temperatura da coluna: 200° C (2 min.) / 2°C /min. / 240 °C (30 min.); temperatura do detector e do injetor: 250°C; fluxo do gás carreador (N₂): 1,0 mL/ min; razão de divisão de fluxo: 40,0:1; fluxo do gás auxiliar (N₂): 45,0 mL/min; fluxo do H₂: 40,0 mL/min; fluxo do ar sintético: 450,0 mL/min; volume injetado da amostra: 1,0 µL.

A identificação dos picos realizou-se através da comparação dos tempos de retenção dos padrões dos ésteres metílicos dos ácidos graxos de interesse.

A composição percentual de ácidos graxos presentes em cada amostra foi obtida a partir da área dos picos cromatográficos, do cromatograma, de cada ácido graxo em relação à soma das áreas de todos os ácidos graxos da amostra.

A determinação quantitativa dos triacilgliceróis polimerizados (polímeros) foi obtida em todas as amostras do estudo, de acordo com o método 2.508 da IUPAC (IUPAC, 1992), como a seguir: (50 ± 0,0001) mg da amostra foram dissolvidas em 1 mL de tetrahidrofurano, a seguir foi submetida à análise cromatográfica a líquido de exclusão por tamanho de partículas. Foram utilizados: um injetor Rheodyne 7725i com *loop* de 20 µL; uma bomba Waters 510; duas colunas cromatográficas, conectadas em série, de 100 e 500 Å, com dimensões de 30 cm de comprimento e 0,77 cm de diâmetro interno, cada uma, empacotada com copolímero, com ligações cruzadas, de estireno divinilbenzeno, com tamanho de partícula de 5 µm, da Waters Associates; e detector de índice de refração modelo L-7490 da Merck-La Chrom. Foram injetados, em condições isocráticas, 10 µL da amostra em um fluxo de 1,5 mL/min de tetrahidrofurano utilizado como fase móvel.

A identificação dos picos dos polímeros foi realizada através da comparação do cromatograma obtido com o perfil cromatográfico padronizado pelo método analítico utilizado.

O teor, em porcentagem, de polímeros foi calculado pela razão entre a soma das áreas dos picos de interesse e a soma das áreas de todos os picos apresentados, multiplicada por 100.

Análises estatísticas

Foi utilizado o programa da Microsoft Excel para o tratamento dos dados.

Foram avaliadas as correlações entre os valores de formação de polímeros e de perda de ácidos graxos obtidos nos quatro experimentos de fritura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Análise da amostra inicial

A tabela 1 apresenta as características de qualidade e identidade dos óleos de palma e de soja. Os resultados das análises demonstraram que as amostras estavam adequadas, para serem utilizadas no estudo (BRASIL, 2005).

Tabela 1. Características de qualidade e identidade dos óleos de palma e de soja.

		Óleo de Soja	Óleo de Palma
Acidez em ácido oleico ¹ (%, m/m)		0,07 ± 0,0	0,08 ± 0,01
Índice de peróxidos ¹ (meq O ₂ / kg)		0,67 ± 0,01	2,70 ± 0,09
Matéria insaponificável ¹ (%, m/m)		0,63 ± 0,01	0,49 ± 0,09
Ácidos Graxos ¹ (%, m/m)	C 16:0	11,3 ± 0,1	42,3 ± 0,5
	C 18:0	3,5 ± 0,1	4,8 ± 0,2
	C 18:1	23,1 ± 0,1	41,9 ± 1,0
	C 18:2	54,2 ± 0,1	9,0 ± 0
	C 18:3	6,8 ± 0,1	< 0,4

1: média de 2 determinações e desvio padrão.

2. Análises das amostras obtidas dos experimentos de fritura

Nas tabelas 2 e 3 estão os resultados analíticos da determinação de polímeros em todas as amostras dos óleos de palma e de soja, respectivamente. Em cada tabela, a amostra de número “zero” é a inicial, e as de número 5 a 25, são as provenientes dos dois experimentos de fritura de batatas, (1) e (2), com o óleo aquecido por 5; 10; 15; 20 e 25 h, respectivamente, como mencionado na parte de material e métodos.

Verificou-se, como esperado, nas duas tabelas, nos dois experimentos nas condições do estudo, que os polímeros foram formados, e também se verificou que houve crescente aumento destas substâncias com o aumento do tempo de aquecimento.

Tabela 2. Resultados analíticos da determinação de polímeros em amostras, de óleo de palma, inicial e provenientes de frituras de batatas.

Amostras	P0	P5 (1)	P10 (1)	P15 (1)	P20 (1)	P25 (1)	P5 (2)	P10 (2)	P15 (2)	P20 (2)	P25 (2)
Polímeros (%, m/m)	0,4	1,1	2,4	6,3	12,2	19,0	2,7	8,0	13,6	18,6	23,7

P0: amostra inicial; P5 (1) a P25 (1) e P5 (2) e P25 (2): amostras provenientes de dois experimentos de fritura, (1) e (2), com o óleo aquecido por 5, 10, 15, 20 e 25 h, respectivamente.

Tabela 3. Resultados analíticos da determinação de polímeros em amostras, de óleo de soja, inicial e provenientes de frituras de batatas.

Amostras	S0	S5 (1)	S10 (1)	S15 (1)	S20 (1)	S25 (1)	S5 (2)	S10 (2)	S15 (2)	S20 (2)	S25 (2)
Polímeros (%, m/m)	0,5	2,0	3,8	7,3	8,8	12,0	4,2	10,6	16,9	23,6	30,7

S0: amostra inicial; S5 (1) a S25 (1) e S5 (2) e S25 (2): amostras provenientes de dois experimentos de fritura, (1) e (2), com o óleo aquecido por 5, 10, 15, 20 e 25 h, respectivamente.

As tabelas 4 e 5 mostram a composição real, expressa em g/100 g do óleo, dos ácidos graxos das amostras dos óleos de palma e de soja, respectivamente. A última coluna de cada tabela indica a porcentagem total de ácidos graxos em 100 g do óleo.

Tabela 4. Composição, g/100 g do óleo, dos ácidos graxos em amostras de óleo de palma, inicial e provenientes de experimentos de fritura de batatas com o óleo aquecido por distintos períodos de tempo.

TEMPO DE AQUECIMENTO	ÁCIDOS GRAXOS					A G ³ (%)
	C 16: 0	C 18: 0	C 18: 1	C18: 2	Outros ²	
0 h¹	42,3 ± 0,5	4,8 ± 0,2	41,9 ± 1,0	9,0 ± 0	2,0 ± 0,3	100
1º experimento						
5 h	42,3	4,7	41,8	8,8	2,2	99,8
10 h	42,3	5,0	41,6	8,2	2,2	99,3
15 h	42,3	4,8	41,7	7,2	2,6	98,6
20 h	42,3	4,9	39,6	5,9	2,1	94,8
25 h	42,3	5,1	37,6	4,7	2,3	92,0
2º experimento						
5 h	42,3	4,7	41,8	8,2	1,8	98,8
10 h	42,3	4,6	40,9	6,6	1,9	96,3
15 h	42,3	4,8	38,8	5,5	2,6	94,0
20 h	42,3	4,7	37,2	4,2	1,8	90,2
25 h	42,3	4,7	35,6	3,4	1,8	87,8

1: amostra inicial, e média de 2 determinações e desvio padrão; 2: menor que 0,4 %; 3: porcentagem total de ácidos graxos.

Tabela 5. Composição, g/100 g do óleo, dos ácidos graxos em amostras de óleo de soja, inicial e provenientes de experimentos de fritura de batatas com óleo aquecido por distintos períodos de tempo.

TEMPO DE AQUECIMENTO	ÁCIDOS GRAXOS						A G ³ (%)
	C 16: 0	C 18: 0	C 18: 1	C18: 2	C18: 3	Outros ²	
0 h¹	11,3 ± 0,1	3,5 ± 0,1	23,1 ± 0	54,2 ± 0,2	6,8 ± 0,1	1,1 ± 0,1	100
1º experimento							
5 h	11,3	3,5	22,8	52,9	6,7	1,1	98,3
10 h	11,3	3,5	22,4	51,0	6,2	1,2	95,6
15 h	11,3	3,5	22,2	49,5	6,0	0,9	93,4
20 h	11,3	3,5	22,1	48,3	5,7	0,9	91,8
25 h	11,3	3,4	22,1	46,7	5,3	1,4	90,2
2º experimento							
5h	11,3	3,4	22,8	52,3	6,4	1,2	97,4
10 h	11,3	3,5	22,4	49,5	5,6	1,1	93,4
15 h	11,3	3,4	22,1	46,6	5,2	1,1	89,7
20 h	11,3	3,4	21,7	43,6	4,6	1,0	85,6
25 h	11,3	3,5	21,6	40,7	4,1	1,2	82,4

1: amostra inicial, e média de 2 determinações e desvio padrão; 2: menor que 0,4 %; 3: porcentagem total de ácidos graxos.

Como os ácidos graxos saturados não sofrem alteração, para se obter a composição real, expressa em g/100 g do óleo, a partir da composição porcentual, da fração dos ácidos graxos, que foi obtida através da análise cromatográfica, considerou-se que a concentração do ácido saturado majoritário (C16:0) não se altera, ao longo da fritura, permanecendo com a concentração igual à concentração das amostras iniciais, ou seja, 42,3 e 11,3 %, para os óleos de palma e de soja, respectivamente. Então, as porcentagens dos outros ácidos graxos foram obtidas por normalização em relação à concentração inicial do ácido palmítico (DOBARGANES; PÉREZ-CAMINO, 1988).

Observa-se, nestas tabelas, que as porcentagens do outro ácido saturado (C18:0) se mantém com valores próximos aos valores de cada amostra inicial, por isso foram aplicados cálculos matemáticos para se deduzir a perda de cada ácido diretamente dos valores da tabela.

As perdas expressas em porcentagens, sobre a quantidade inicial dos principais ácidos graxos insaturados no óleo de palma, ao final do primeiro e do segundo experimento de fritura foram, respectivamente, 47,8 e 62,2, para o ácido linoléico e 10,3 e 15,0, para o ácido oléico. Como esperado, a perda destes ácidos graxos aumentou com o seu grau de insaturação.

As perdas expressas em porcentagens, sobre a quantidade inicial dos principais ácidos graxos insaturados no óleo de soja, ao final do primeiro e do segundo experimento de fritura foram, respectivamente, 39,7 e 22,1, para o ácido linolênico; 24,9 e 13,8, para o ácido linoléico e 6,5 e 4,3, para o ácido oléico. Da mesma forma, como no óleo de palma, como esperado, a perda dos ácidos graxos aumentou com o seu grau de insaturação.

As figuras 1 e 2 ilustram a correlação linear entre o percentual de perda dos principais ácidos graxos insaturados e a formação de polímeros nos experimentos de fritura utilizando os óleos de palma e de soja, respectivamente.

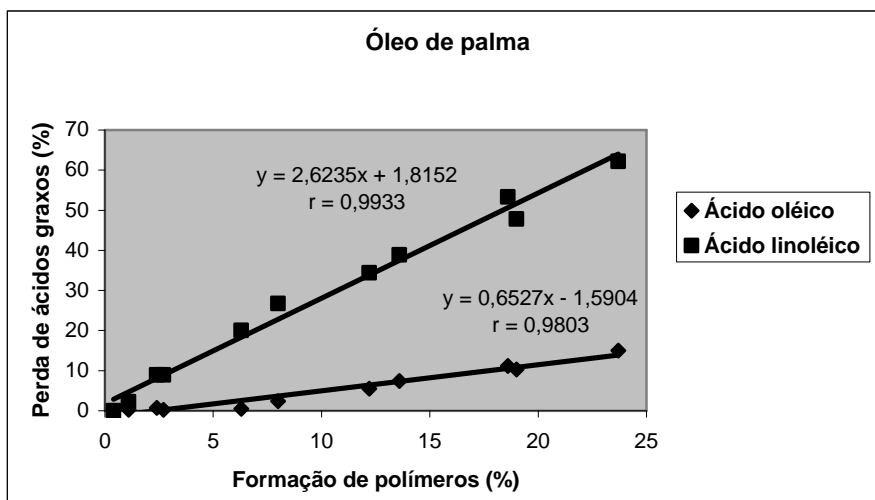


Figura 1. Percentual de perda dos principais ácidos graxos insaturados na composição de ácidos graxos em relação à formação de polímeros, nos experimentos de fritura de batatas utilizando o óleo de palma.

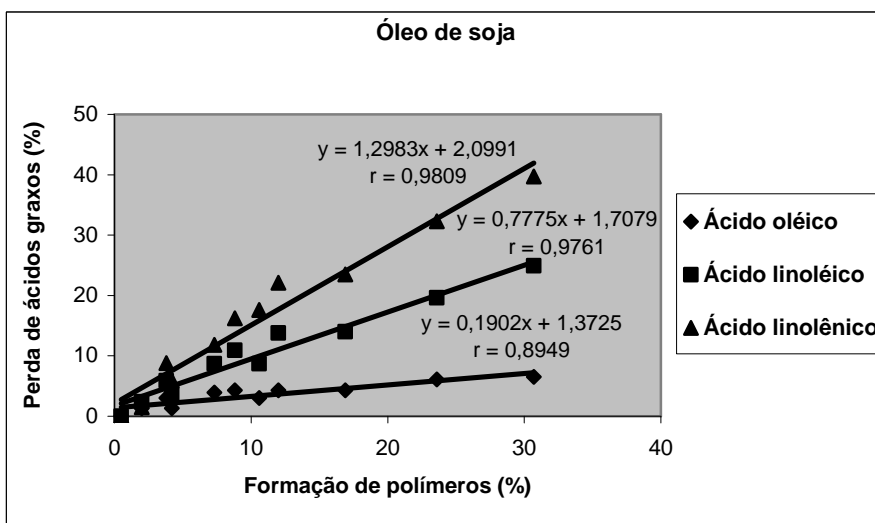


Figura 2. Percentual de perda dos principais ácidos graxos insaturados em relação à formação de polímeros, nos experimentos de fritura de batatas utilizando o óleo de soja.

Os coeficientes de correlação obtidos demonstraram a excelente relação entre a formação de polímeros e a perda por degradação dos ácidos graxos insaturados.

A figura 3 ilustra as correlações lineares entre a concentração dos principais ácidos graxos insaturados e o teor de polímeros, nos experimentos de fritura de batatas utilizando os óleos de palma e de soja.

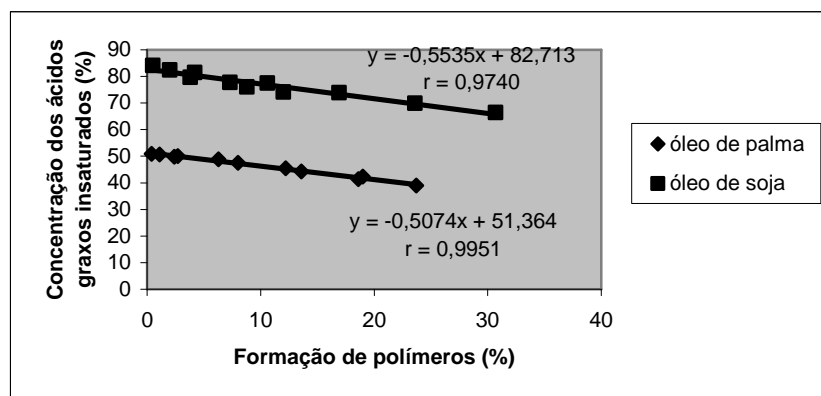


Figura 3. Concentração dos principais ácidos graxos insaturados em relação à formação de polímeros, nos experimentos de fritura de batatas utilizando os óleos de palma e de soja.

Como se pode observar, os valores das ordenadas na origem (82,7 e 51,4) são similares aos valores iniciais do total de ácidos insaturados (84,1 e 50,9) para os óleos de soja e palma, respectivamente, com conteúdo muito baixo em polímeros, o que indica a excelência do ajuste linear.

Os altos coeficientes de correlação obtidos, 0,9951 e 0,9740, para os óleos de palma e de soja, respectivamente, demonstraram que a alteração, destes óleos submetidos a frituras descontínuas de batatas, pode ser eficazmente verificada através da determinação quantitativa de polímeros. Estes dados confirmam a determinação de polímeros como mais um parâmetro de verificação da alteração destes óleos em frituras de batatas, além do parâmetro mais estabelecido pelas leis internacionais para uso de óleos e gorduras em frituras, que é a porcentagem de compostos polares (DANA; SAM SAGUY, 2001).

CONCLUSÕES

Os dados obtidos dos experimentos de frituras descontínuas de batatas utilizando os óleos refinados, de palma e de soja, nas condições do estudo, demonstraram que:

Maiores graus de alteração ocorreram em ácidos graxos mais insaturados;

A alteração, destes óleos, pode ser eficazmente verificada através da determinação quantitativa de polímeros, dada a sua excelente correlação com a perda de ácidos graxos insaturados.

AGRADECIMENTOS

Eliana Rodrigues Machado agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estágio de doutorando recebida; e ao “Instituto de la Grasa” do “Consejo Superior de Investigaciones Científicas”, Sevilha, Espanha, onde o trabalho foi realizado;

Os autores agradecem à Sra. Mercedes Gimenez pela assistência; e ao Grupo Agropalma pela doação do óleo de palma.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Aprova o “Regulamento Técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal”. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 set. 2005. ANVISA-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>> Acesso em: 14 mai. 2006.

CROON, L. B. et al. A Comparative study of analytical methods for quality evaluation or frying fat. **Fette, Seifen, Anstrichmittel**, v. 88, n. 3, p. 87-91, 1986.

DANA, D.; SAM SAGUY, I. Frying of nutritious foods: obstacles and feasibility. **Food Science Technology Research**, v. 7, n. 4, p. 265-279, 2001.

DOBARGANES, M. C.; MÁRQUEZ-RUIZ, G. Calidad de las grasas de fritura en el sector de restauración de Andalucía. **Grasas y Aceites**, v. 46, n. 2, p. 115-120, 1995.

DOBARGANES, M. C.; MÁRQUEZ-RUIZ, G. Oxidized fats in foods. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 6, n. 2, p. 157-163, 2003.

DOBARGANES, M. C.; MÁRQUEZ-RUIZ, G. Regulation of used frying fats and validity of quick tests for discarding the fats. **Grasas y Aceites**, v. 49, n. 3-4, p. 331-335, 1998.

DOBARGANES, M. C.; PÉREZ-CAMINO, M. C. Fatty acid composition: a useful tool for the determination of alteration level in heated fats. **Revue Française des Corps Gras**, v. 35, n. 2, p. 67-70, 1988.

DOBARGANES, M. C.; PÉREZ-CAMINO, M. C.; MÁRQUEZ-RUIZ, G. High performance size exclusion chromatography of polar compounds in heated and non-heated fats. **Fat Science and Technology**, v. 90, n.8, p. 308- 311,1988.

FRITSCH, C.W. Measurements of frying fat deterioration: a brief review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 58, n. 3, p. 272-274, 1981.

GERTZ, C. Chromatography methods in the investigations of deep-frying fats. **Fette, Seifen, Anstrichmittel**, v. 88, n. 12, p. 475-488, 1986.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives**. 7. ed. Oxford: Pergamon Press, 1992, supl. 1.

JORGE, N. et al. Influence of dimethylpolysiloxane addition to edible oils: performance of sunflower oil in discontinuous and continuous laboratory frying. **Grasas y Aceites**, v. 47, n. 1-2, p. 20-25, 1996.

LAKE, R. J.; SCHOLLES, P. Quality and consumption of oxidized lipids from deep-frying fats and oils in New Zealand. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 9, p.1065-1068, 1997.

MATTOS, E. S.; ANS, V. G.; JORGE, N. Utilização do kit oil test para avaliação da alteração dos óleos de fritura. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 75, p. 40-47, 2000.

SEBEDIO, J. L. et al. State of degradation of some frying oils from restaurants. **Revue Française des Corps Gras**, v. 34, n. 1, p. 15-20, 1987.

SKRÖKKI, A. Test used for examining the quality of frying oils. **Fat Science Technology**, v. 97, n. 10, p. 384-386, 1995.

VAHCIC, N.; HRUSKAR, M. Quality and sensory evaluation of used frying oil from restaurants. **Food Technology and Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 107-112, 1999.

3.6 - **MANUSCRITO 6** - Estudos preliminares de validação de testes rápidos para avaliação de óleos e gorduras usados em frituras - contribuição para a Saúde Pública.

ESTUDOS PRELIMINARES DE VALIDAÇÃO DE TESTES RÁPIDOS PARA AVALIAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS USADOS EM FRITURAS - CONTRIBUIÇÃO PARA A SAÚDE PÚBLICA

Eliana Rodrigues Machado^{1*}, Shirley de Mello Pereira Abrantes², María del Carmen Dobarganes García³

1: Aluna de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) / FIOCRUZ

*Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 21040-900, Brasil.

Tel.: (21) 38655124, e-mail: eliana.machado@incqs.fiocruz.br

2: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) / FIOCRUZ

3: Instituto de la Grasa / CSIC – Sevilha – Espanha

RESUMO

Muitos estudos têm apontado para a necessidade de avaliação da qualidade dos óleos e gorduras usados em frituras. As legislações internacionais estabelecem como parâmetros, para uso destes produtos, as porcentagens de compostos polares e de polímeros que são determinados por métodos analíticos realizados em laboratório. Esta verificação é inviável tanto para os serviços de fiscalização quanto para os estabelecimentos comerciais, sendo necessário a utilização de testes rápidos aplicáveis *in situ*. No entanto, os testes disponíveis não são validados. Neste estudo foram avaliados, com o objetivo de verificar a sua adequação para determinar o momento de descarte de óleos e gorduras usados em frituras, testes rápidos baseados em propriedades físicas, Viscofrit® (VF) e Food Oil Sensor® (FOS). As respostas destes testes foram comparadas com os resultados analíticos do método validado de determinação do teor de polímeros em análises de trinta e três amostras de óleo de soja; óleo de palma e gordura vegetal parcialmente hidrogenada; sendo elas não tratadas e usadas em frituras de batatas. Foram obtidos valores, para os testes estudados, de porcentagem de falso negativo em resultados positivos e porcentagem de falso positivo em resultados negativos (precisão), respectivamente: 20,0 e 33,0, para o VF; e zero e 33,0, para o FOS. O teste FOS seria o método rápido de escolha para a tomada de decisão do descarte das amostras não conformes, uma vez que apresentou resultado zero de falsos negativos em amostras positivas.

Palavras-chave: Compostos polares - Food oil sensor - Óleos de fritura - Polímeros - Testes rápidos - Validação - Viscofrit

SUMMARY

Many studies have reported the need for quality evaluation of used frying fats and oils. In this respect, international regulations have established limitations to the oil degradation based on analytical methods to be carried out in the laboratory. Among them, determination of polar compounds and determination of polymers stand out. These methods cannot be applied in fried food outlets without laboratory facilities and, consequently, rapid tests to be applied in situ are necessary. However, these rapid tests have to be validated to fulfill the present regulations. In this study rapid tests based on physical properties [Viscofrit (VF) and Food oil sensor (FOS)] were evaluated to determine the point at which frying fats and oils should be discarded. Results from these tests obtained from thirty-three samples of soybean oil,

palm oil and partially hydrogenated vegetable fat used in frying to prepare chips. The results obtained were compared with those obtained for polymers. Percentage of negative false in positive results and percentage of positive false in negative results (precision), were, respectively, 20.0 and 33.0, for VF; and zero and 33.0, for FOS.

Key-words: Polar compounds – Food oil sensor – Frying oils – Polymers – Rapid tests – Validation - Viscofrit

INTRODUÇÃO

A fritura é uma operação de cozimento e preparo de alimentos largamente utilizada em residências, lanchonetes, restaurantes e indústrias alimentícias, em todo o mundo. Por estar em contato com o ar, água e alta temperatura, o óleo ou a gordura de fritura é suscetível a reações hidrolíticas, oxidativas e térmicas. Destas reações se originam substâncias de degradação: ácidos graxos livres, mono e diglicerídeos, monômeros oxidados, polímeros (FRITSCH, 1981). Este grupo de substâncias é determinado quantitativamente como “compostos polares” (AOAC, 2003).

A má prática em frituras, como a utilização de altas temperaturas e/ou de tempo prolongado, deve ser considerada um problema de Saúde Pública, pois algumas substâncias, que podem ser formadas a partir das alterações destes óleos/gorduras, apresentam absorção em cobaias (GROOTVELD et al., 1998) e alto grau de hidrólise pela lipase pancreática (MÁRQUEZ-RUIZ; GUELVEL; DOBARGANES, 1998); e podem produzir efeitos deletérios à saúde humana (DOBARGANES; MÁRQUEZ-RUIZ, 2003).

A verificação da qualidade de óleos e gorduras em uso em frituras em diversos países, inclusive no Brasil, mostrou grande porcentagem de resultados insatisfatórios segundo legislações internacionais (CROON et al., 1986; DOBARGANES; MÁRQUEZ-RUIZ, 1995; GERTZ, 1986; LAKE; SCHOLLES, 1997; MATTOS; ANS; JORGE, 2000; SEBEDIO, et al., 1987; SKRÖKKI, 1995; VAHCIC; HRUSKAR, 1999).

Muitos países têm estabelecido, como parâmetros e seus respectivos limites máximos, para uso destes produtos, a porcentagem de compostos polares e a porcentagem de triglicerídeos polimerizados (polímeros), de 24 a 30 %; e 10 e 16 %, respectivamente (DANA; SAM SAGUY, 2001). O Brasil não possui legislação federal que estabeleça parâmetros decisórios para garantir a qualidade de óleos e gorduras de fritura.

Os parâmetros mencionados acima são verificados através de métodos analíticos físico-químicos validados (IUPAC, 1992), que por serem aplicáveis apenas em laboratório não são viáveis para a fiscalização que deve evitar, quando necessário, o uso do óleo/gordura no momento que o mesmo está sendo usado. A mesma situação acontece nos estabelecimentos comerciais. Por isso, a utilização de teste aplicável *in situ*, de operacionalização rápida e simples, é necessária. No entanto, verifica-se que os testes rápidos disponíveis no mercado não são validados.

Foram utilizados neste estudo dois testes rápidos que se baseiam em propriedades físicas do óleo: Food Oil Sensor® e o Viscofrit®. O primeiro teste que mede a constante dielétrica, começou a ser utilizado em 1970 e mostrou alta correlação linear desta medida com o teor de compostos polares (CROON et al., 1986, WEGMUELLER, 1994, 1998). Outros sistemas baseados nesta mesma

propriedade estão sendo comercializados atualmente (STIER, 2004). O outro teste relaciona o aumento da viscosidade relacionada à formação de substâncias de polimerização com a degradação do óleo/gordura (CASTELLÓN-ARNAU, 1999).

O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho destes dois testes rápidos aplicáveis *in situ*, para se obter dados iniciais de validação dos mesmos, ou seja, verificar preliminarmente a sua adequação para determinar, com confiabilidade, o momento de descarte de óleos e gorduras usados em frituras.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras não tratadas - iniciais

O óleo de palma comercializado para fritura foi obtido por doação da indústria “Grupo Agropalma” da cidade de Tailândia, Pará, com certificado de análise e data de validade, adequados ao uso.

O óleo de soja e a gordura vegetal parcialmente hidrogenada, ambos utilizados para fins culinários, foram obtidos do comércio da cidade do Rio de Janeiro, e se encontravam dentro do prazo de validade.

Amostras obtidas a partir de frituras de batatas a 180 ° C

Trinta amostras, provenientes de dois procedimentos de fritura de batatas com os dois óleos e a gordura, que estão mencionados acima, foram utilizadas. Estes procedimentos foram realizados no laboratório de acordo com Jorge et al. (1996). Durante cinco dias cada produto foi submetido, por dia, a 5 horas de aquecimento ocorrendo neste período a operação de fritura, que resultou na seguinte seqüência de tempo: 5, 10, 15, 20 e 25 h.

Métodos Analíticos

A determinação das porcentagens, m/m, dos principais ácidos graxos foi realizada através da análise cromatográfica a gás dos ésteres metílicos destes ácidos, obtidos por derivação com solução de KOH 2N em metanol, de acordo com os métodos validados da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) 2.301 e 2.302 (IUPAC, 1992);

O teor de polímeros foi obtido por dissolução direta das amostras em solvente e posterior análise cromatográfica a líquido de exclusão por tamanho de partículas, de acordo com o método validado da IUPAC 2.508 (IUPAC, 1992). Este método foi considerado como método de referência;

A determinação quantitativa dos compostos polares foi efetuada segundo o método validado da IUPAC 2.507 (IUPAC, 1992), que utiliza a técnica de cromatografia de adsorção em coluna.

Testes Rápidos

Viscofrit (VF)

O teste verifica o tempo necessário, medido em segundos, para se esvaziar um funil, na forma de cone, cheio com o óleo a ser analisado. O cone é esvaziado por gravidade através de um pequeno orifício calibrado na parte inferior deste. Este instrumento é equipado com dois termômetros, um para óleos e gorduras que apresentam maior porcentagem de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e outro

para óleos e gorduras que apresentam maior porcentagem de ácidos graxos polinsaturados (AGPI), que são calibrados entre 15 e 50° C e fornecem para cada temperatura o tempo máximo requerido, em segundos, para esvaziar o cone. Tempo maior do que o estabelecido indica que a amostra deve ser descartada (CASTELLÓN-ARNAU, 1999). Quando não se conhece o grupo de ácidos graxos a que pertence a amostra, a média aritmética entre os dois tempos máximos deve ser utilizada. Para mais informações sobre o instrumento acessar: <http://www.viscofrit.com>.

Food Oil Sensor (FOS)

O Food Oil Sensor é um aparelho eletrônico portátil, comercializado pela Northern Instruments Corp., que mede a mudança da constante dielétrica no óleo/gordura relativa a amostra inicial. O aparelho é zerado com a amostra inicial do mesmo tipo da que será analisada. A medida é realizada através da adição de 1 a 2 gotas da amostra diretamente no aparelho. A faixa de medida está entre 0 a 10, e a leitura acima do valor 4 indica que a amostra deve ser descartada (GRAZIANO, 1979).

Análises estatísticas

Foi utilizado o programa Statística® 6.0 (Stat Soft, Inc., 1984-1995) para o tratamento dos dados.

Validação dos testes rápidos

Foi avaliada a correlação linear paramétrica de Pearson entre a determinação de compostos polares e a determinação de polímeros.

Foram avaliados os coeficientes de correlação não paramétrica de Spearman entre os resultados analíticos do método de determinação de polímeros e as respostas dos testes rápidos e entre os resultados analíticos do método de determinação de polímeros e os resultados analíticos do método de determinação de compostos polares.

Todas as amostras do estudo foram analisadas através dos testes rápidos e do método de referência e os seus resultados foram comparados.

Os parâmetros de desempenho estudados foram os seguintes: faixa inteira de respostas; porcentagem de falso negativo em resultados positivos e porcentagem de falso positivo em resultados negativos (precisão); conforme *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (AOAC, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Análise das amostras iniciais

A tabela 1 apresenta a porcentagem dos principais ácidos graxos de cada amostra inicial. Com esta determinação foi confirmado a identidade e conseqüentemente, o grupo de ácidos graxos de cada amostra (BRASIL, 2005). Este dado foi importante para a avaliação do teste Viscofrit, como será discutido mais adiante.

Tabela 1. Porcentagem, m/m, dos principais ácidos graxos da gordura vegetal parcialmente hidrogenada, óleo de soja e óleo de palma.

Ácidos Graxos ¹ (%, m/m)	Amostras		
	Gordura Hidrogenada	Óleo de Soja	Óleo de Palma
C 16:0	11,3 ± 0,4	11,3 ± 0,1	42,3 ± 0,5
C 18:0	9,5 ± 0,4	3,5 ± 0,1	4,8 ± 0,2
C 18:1	48,6 ± 0,6	23,1 ± 0,1	41,9 ± 1,0
C 18:2	27,3 ± 2,1	54,2 ± 0,1	9,0 ± 0
C 18:3	2,4 ± 0,4	6,8 ± 0,1	< 0,4

1: média de 2 determinações e desvio padrão.

2. Dados de validação dos testes rápidos

Os parâmetros de desempenho estudados foram obtidos após as seguintes considerações: a alegação, de utilidade para a Vigilância Sanitária, dos testes estudados é determinar o momento de descarte do óleo ou gordura em uso em frituras; estes testes não determinam qualitativamente um analito alvo e nem determinam diretamente o teor deste analito, porém medem indiretamente um grupo de substâncias, compostos polares e polímeros. Por isso, com base nas definições da AOAC (AOAC, 1998) para métodos analíticos os testes estudados foram classificados, para efeito de validação, como testes qualitativos. As respostas destes testes podem ser consideradas, através da comparação com valores obtidos por um método de referência, como ausência ou presença do analito conforme estes valores estejam abaixo e igual ou acima, respectivamente, do valor de restrição ou de descarte. Por isso, os parâmetros de desempenho obtidos foram escolhidos com base em recomendações da AOAC (AOAC, 2000) para validação de métodos qualitativos.

Embora o parâmetro mais estabelecido pelas leis internacionais para a verificação da qualidade de óleos e gorduras usados em frituras seja a porcentagem de compostos polares (DANA; SAM SAGUY, 2001), a determinação do teor de polímeros foi o método analítico escolhido como referência no nosso estudo por ser de operacionalização muito mais rápida do que o método utilizado para compostos polares e porque apresenta alta correlação linear com este método, $r = 0,9849$. Então, o analito deste estudo foi a fração de polímeros determinada quantitativamente pelo método de referência.

Os testes foram utilizados seguindo as instruções dos seus fabricantes, com a particularidade mencionada a seguir:

Para o teste VF, a temperatura da amostra deve estar acima do seu ponto de fusão. As análises foram realizadas a temperaturas: para o óleo de soja, acima de 38° C; para o óleo de palma acima de 39° C; e para a gordura hidrogenada acima de 43° C. Todos os resultados foram expressos com o tempo correspondendo à avaliação a 38° C, seguindo uma relação exponencial entre temperatura e tempo dado nas escalas. Os tempos mínimos, em segundos, que indicam que a amostra deve ser descartada foram 47 e 44, para amostras dos grupos AGMI e AGPI, respectivamente.

2.1 Comparação dos resultados das análises

Na tabela 2 estão os resultados obtidos das análises através dos testes rápidos estudados e das determinações de polímeros e de compostos polares realizadas nas amostras. As amostras de número “zero” são as iniciais, e as de número 5 a 25, são as

oriundas dos dois procedimentos de fritura de batatas, aquecidas por 5; 10; 15; 20 e 25 h, respectivamente, como mencionado na parte de materiais e métodos.

Tabela 2. Resultados analíticos das determinações de polímeros e de compostos polares totais, e dos testes rápidos em gordura vegetal parcialmente hidrogenada, óleo de palma e óleo de soja; não tratados (iniciais) e usados em frituras de batatas.

Amostras ¹	Testes rápidos			
	Compostos Polares (% m/m)	Polímeros (% m/m)	VF (38° C) (segundos)	FOS
G0	4,4	0,8	39	0,53
G5 (1)	-	5,5	42	2,38
G10 (1)	22,2	11,9	45	4,00
G15 (1)	30,8*	18,7*	48*	5,85*
G20 (1)	-	24,3*	53*	7,24*
G25 (1)	44,1*	29,7*	60*	9,07*
G5 (2)	-	2,9	40	1,27
G10 (2)	-	6,4	42	1,97
G15 (2)	-	9,7	43	2,78
G20 (2)	-	15,4*	47*	4,98*
G25 (2)	32,5*	21,3*	52*	6,02*
P0	6,1	0,4	39	0,87
P5 (1)	-	1,1	39	1,47
P10 (1)	-	2,4	42	1,79
P15 (1)	-	6,3	45	3,09
P20 (1)	25,5*	12,2	47*	4,70*
P25 (1)	34,8*	19,0*	53*	6,32*
P5 (2)	-	2,7	40	1,99
P10 (2)	-	8,0	43	3,36
P15 (2)	-	13,6	47*	5,67*
P20 (2)	-	18,6*	52*	6,81*
P25 (2)	41,0*	23,7*	54*	8,44*
S0	5,1	0,5	36	1,37
S5 (1)	-	2,0	36	1,79
S10 (1)	-	3,8	37	2,02
S15 (1)	-	7,3	38	2,57
S20 (1)	-	8,8	39	3,08
S25 (1)	20,8	12,0	42	3,38
S5 (2)	-	4,2	37	2,07
S10 (2)	-	10,6	39	2,72
S15 (2)	-	16,9*	43	4,23*
S20 (2)	-	23,6*	46*	5,75*
S25 (2)	42,6*	30,7*	55*	7,15*

G0, P0 e S0: amostras iniciais de gordura hidrogenada, óleo de palma e óleo de soja respectivamente; G5 (1) a G25 (1) e G5 (2) e G25 (2), P5 (1) a P25 (1) e P5 (2) e P25 (2); S5 (1) a S25 (1) e S5 (2) e S25 (2): amostras de gordura hidrogenada, óleo de palma e óleo de soja, usadas em dois procedimentos de fritura (1) e (2), aquecidas por 5, 10, 15, 20 e 25 h, respectivamente; *: a amostra deve ser descartada: para polímeros > 14,4 %; para VF: ≥ 47 e ≥ 44 para monoinsaturados e polinsaturados, respectivamente; e para FOS > 4.

2.1.1 Faixa inteira de respostas

Valores para polímeros foram obtidos na faixa de 0,4 a 30,7 %. Observa-se que o valor médio desta faixa está próximo ao valor máximo permitido para polímeros, 14,4 %. Então, esta faixa foi considerada adequada ao estudo.

2.1.2 Faixa de trabalho

Foi observado, na faixa obtida acima, que há uma região de respostas dos testes próxima ao valor de 14 % de polímeros, valor considerado de restrição como será visto adiante, onde se encontrou uma predominância de valores falsos do teste, ou seja, valores que não estavam de acordo com os resultados do método de referência. Esta faixa foi estabelecida para valores de polímeros entre 9 e 19 %.

2.1.3 Correlação paramétrica entre os resultados da determinação de compostos polares e da determinação de polímeros

De acordo com a equação linear da reta obtida, $y = 5,706 + 1,335 x$, o valor de 25 %, valor máximo fixado pela maioria das leis internacionais para os compostos polares (DANA; SAM SAGUY, 2001), corresponde ao valor de 14 %, para os polímeros, que foi considerado no nosso estudo como limite máximo para polímeros, valor de restrição.

O alto valor do coeficiente de correlação, $r = 0,9849$, permitiu a utilização da determinação de polímeros como método de referência alternativo à determinação de compostos polares.

2.1.4 Coeficientes de correlação não paramétrica

A tabela 3 apresenta os coeficientes de correlação não paramétrica entre os resultados analíticos do método de determinação de polímeros e as respostas dos testes rápidos, e entre os resultados analíticos do método de determinação de polímeros e os resultados analíticos da determinação de compostos polares.

Utilizou-se a correlação não paramétrica, pois uma das variáveis relacionadas, as respostas do teste FOS, apresentam valores finitos.

Tabela 3. Coeficientes de correlação não paramétrica entre os resultados da determinação de polímeros e as respostas dos testes rápidos, e entre os resultados da determinação de polímeros e os resultados da determinação de compostos polares.

Testes rápidos/ Compostos Polares	Nº de amostras	Polímeros
Viscofritest (MI) ¹	22	0,9742
Viscofritest (PI) ²	11	0,9932
Food oil sensor	33	0,9685
Compostos polares	12	0,9580

1: MI - monoinsaturados; 2: PI - polinsaturados.

Os testes rápidos apresentaram altos coeficientes desta correlação, sugerindo que os mesmos podem substituir o método de determinação de polímeros.

Como se observa também nesta tabela, a correlação entre os métodos de determinação de polímeros e de determinação de compostos polares foi alta, sugerindo, da mesma forma, que estes métodos são equiparáveis.

2.1.5 Porcentagem de resultados falsos negativos em resultados positivos e porcentagem de resultados falsos positivos em resultados negativos (precisão) (AOAC, 1998, 2000)

A *Environmental Protection Agency*-EPA (EPA, 1995) estabelece o valor máximo de 5 % de resultado falso negativo para aceitação de métodos físicos e químicos de determinação de resíduos sólidos, em solo, água, etc. E para porcentagem de falso positivo não estabelece limite, porém requer que este valor seja conhecido. A EPA também determina, que para cada medida, de falso positivo e de falso negativo, para estes métodos, sejam realizadas análises de 20 a 50 amostras com faixa de

porcentagens, do analito, próxima e igual ao valor de restrição. No nosso estudo foram obtidos 6 amostras com valores de polímeros abaixo e próximos ao valor de restrição, consideradas amostras negativas; e 5 amostras com valores acima e igual a este valor, consideradas amostras positivas. Este número de amostras analisadas, de acordo com o critério estabelecido pela EPA, foi considerado insuficiente para a validação dos testes estudados por isso, este estudo foi caracterizado como preliminar.

Na tabela 4 são mostradas as porcentagens dos resultados falsos positivos e de resultados falsos negativos. O resultado falso positivo indica que o óleo/gordura deve ser descartado em amostras conformes. Ao contrário, resultado falso negativo indica que o óleo/gordura pode ser usado em amostras não conformes.

Os valores, em porcentagem, encontrados de falso negativo e de falso positivo foram: 20,0 e 33,0, para VF; e zero e 33,0, para FOS, respectivamente.

Tabela 4. Porcentagens de resultados falsos negativos em resultados positivos e de falsos positivos em resultados negativos, obtidos dos testes rápidos estudados.

Testes rápidos	Falsos negativos (%)	Falsos positivos (%)
Viscofritest	20	33
Food oil sensor	Zero	33

É relevante evidenciar que os resultados deste parâmetro não estão relacionados à população total das amostras analisadas e sim a populações de amostras positivas ou de amostras negativas, por isso a significância quantitativa destes resultados não corresponde ao total de amostras analisadas.

2.2 Considerações com relação ao desempenho dos testes estudados e recomendações para a validação destes testes:

Baseando-se na recomendação da EPA (EPA, 1995), consideramos que para a validação dos testes estudados devem ser realizadas análises, de 20 a 50 amostras, com faixa de porcentagens do analito próxima e igual ao valor de restrição, faixa de trabalho, para cada medida de falso positivo e de falso negativo;

A obtenção de falsos positivos para o teste FOS pode ser em decorrência da presença de umidade no óleo, que aumenta a constante dielétrica deste. Como a umidade geralmente é proveniente do alimento, na finalização da validação deste teste utilizaremos um número significativo de amostras de óleos e gorduras usados em frituras de diversos tipos de alimentos;

Como já mencionado, o grupo de ácidos graxos que pertence o óleo ou a gordura é importante na medida do VF. Porém, se o alimento apresentar em sua composição um alto teor de gordura, e se esta for transferida para o meio de fritura, o grupo de ácido graxo a que pertence o meio de fritura possivelmente não será afetado, no entanto o valor da viscosidade pode ser afetado. Por isso, na complementação da validação deste teste usaremos também um número significativo de amostras, dos dois grupos de ácidos graxos: monoinsaturados e polinsaturados.

CONCLUSÕES

Os dois métodos analíticos de determinação de compostos polares e de determinação de polímeros podem ser utilizados para estudos de comparação com os testes rápidos estudados para validação dos mesmos;

Pelos os resultados obtidos até o momento o teste FOS seria então o teste de escolha para a tomada de decisão do descarte das amostras não conformes, uma vez que apresentou resultado zero de falsos negativos em amostras positivas. É importante ressaltar que, para a saúde pública, valores baixos para resultados falsos negativos são mais requeridos do que para os falsos positivos; e valores altos para resultados falsos positivos não são tão indesejáveis.

AGRADECIMENTOS

Eliana Rodrigues Machado agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estágio de doutorando recebida; e ao “Instituto de la Grasa” do “Consejo Superior de Investigaciones Científicas”, Sevilha, Espanha, onde o trabalho foi realizado;

Os autores agradecem à Sra. Mercedes Gimenez pela assistência; e ao Grupo Agropalma pela doação do óleo de palma.

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **AOAC® Peer-verified methods program**: manual on policies and procedures. (1998). Disponível em: <<http://www.aoac.org/Vmeth/PVM.pdf>>. Acesso em: 04 abr. 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Data submission requirements**. (2000). Disponível em: <<http://www.aoac.org/testkits/datasubmission.htm>>. Acesso em: 04 abr. 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 17. ed. Maryland, USA: AOAC International, 2003. 2v.

BRASIL. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Aprova o “Regulamento Técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal”. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 set. 2005. ANVISA-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>> Acesso em: 14 mai. 2006.

CASTELLÓN-ARNAU, A. **Dispositivo medidor de la alteración de aceites comestibles recalentados**. Patente ES 1 043 160U, 1999.

CROON, L. B. et al. A Comparative study of analytical methods for quality evaluation of frying fat. **Fette, Seifen, Anstrichmittel**, v. 88, n. 3, p. 87-91, 1986.

DANA, D.; SAM SAGUY, I. Frying of nutritious foods: obstacles and feasibility. **Food Science Technology Research**, v. 7, n. 4, p. 265-279, 2001.

DOBARGANES, M. C.; MÁRQUEZ-RUÍZ, G. Calidad de las grasas de fritura en el sector de restauración de Andalucía. **Grasas y Aceites**, v. 46, n. 2, p. 115-120, 1995.

DOBARGANES, M. C.; MÁRQUEZ-RUÍZ, G. Oxidized fats in foods. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 6, n. 2, p. 157-163, 2003.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Immunoassay methods in SW-846**: recommended format and content for documentation supporting new submittals.

(Rev. 0, jul. 1995). Disponível em: <<http://www.epa.gov/sw-846/pdf/assay.pdf>>. Acesso em: 04 abr. 2006.

FRITSCH, C.W. Measurements of frying fat deterioration: a brief review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 58, n. 3, p. 272-274, 1981.

GERTZ, C. Chromatographic methods in the investigations of deep-frying fats. **Fette, Seifen, Anstrichmittel**, v. 88, n. 12, p. 475-488, 1986.

GRAZIANO, V. J. Portable instrument rapidly measures quality of frying fat in food service operations. **Food Technology**, v. 33, n. 9, p. 50-56, 1979.

GROOTVELD, M. et al. In vivo absorption, metabolism, and urinary excretion of saturated and P-unsaturated aldehydes in experimental animals – relevance to the development of cardiovascular diseases by the dietary ingestion of thermally stressed polyunsaturated-rich culinary oils. **Journal of Clinical Investigation**, v. 6, n. 101, p. 1210-1218, 1998.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives**. 7. ed. Oxford: Pergamon Press, 1992, supl. 1.

JORGE, N., et al. Influence of dimethylpolysiloxane addition to edible oils: performance of sunflower oil in discontinuous and continuous laboratory frying. **Grasas y Aceites**, v. 47, n. 1-2, p. 20-25, 1996.

LAKE, R. J.; SCHOLLES, P. Quality and consumption of oxidized lipids from deep-frying fats and oils in New Zealand. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 9, p. 1065-1068, 1997.

MÁRQUEZ-RUIZ, G.; GUEVEL, G.; DOBARGANES, M.C. Applications of chromatographic techniques to evaluate enzymatic hydrolysis of oxidized and polymeric triglycerides by pancreatic lipase "in vitro". **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 2, p. 119-126, 1998.

MATTOS, E. S.; ANS, V. G.; JORGE, N. Utilização do kit oil test para avaliação da alteração dos óleos de fritura. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 75, p. 40-47, 2000.

SEBEDIO, J. L. et al. State of degradation of some frying oils from restaurants. **Revue Française des Corps Gras**, v. 34, n. 1, p. 15-20, 1987.

SKRÖKKI, A. Test used for examining the quality of frying oils. **Fat Science Technology**, v. 97, n. 10, p. 384-386, 1995.

STATISTICA® 6.0. Tulsa, USA: Stat Soft, Inc. 1984-1995. 1 CD-ROM.

STIER, R. F. Tests to monitor quality of deep-frying fats and oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 106, n. 11, p. 766-771, 2004.

VAHCIC, N.; HRUSKAR, M. Quality and sensory evaluation of used frying oil from restaurants. **Food Technology and Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 107-112, 1999.

WEGMUELLER, F. Frying fats: data of food oil sensors vs. polar components. Calibration curve and its application range. **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, v. 89, n. 3, p. 301-307, 1998.

WEGMUELLER, F. Polar components of frying fats derived from data of dielectric measurements. **Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, v. 199, n. 1, p. 51-54, 1994.

4 - DISCUSSÃO

Para contribuir com as ações de Vigilância Sanitária, com relação ao consumo de alimentos, que visa prevenir, eliminar e diminuir riscos à saúde, este trabalho de tese foi realizado. O trabalho está apresentado em seis manuscritos, e suas principais discussões estão expostas abaixo.

1. No artigo “**Avaliação quantitativa de monoepoxiácidos, monocetoácidos e monohidroxiácidos em óleos e gorduras provenientes de fritura descontínua de batatas**”, os resultados obtidos nas três amostras estudadas: óleo de soja, óleo de palma e gordura de soja parcialmente hidrogenada provenientes de frituras mostraram que os grupos de EPOXI, CETO e HIDROXI constituem quantitativamente uma fração muito importante dos monômeros oxidados, sendo os EPOXI e os HIDROXI os principais grupos.

Estes três grupos são considerados relevantes nutricionalmente e fisiologicamente (MÁRQUEZ-RUÍZ; DOBARGANES, 1995; MÁRQUEZ-RUÍZ; GUELVEL; DOBARGANES, 1998; MÁRQUEZ-RUÍZ; PÉREZ-CAMINO; DOBARGANES, 1992; MÁRQUEZ-RUIZ; TASIOULA-MARGARI; DOBARGANES, 1995).

Neste estudo também foi demonstrado que os óleos e gorduras monoinsaturados, como a gordura de soja parcialmente hidrogenada e o óleo de palma, apresentam maior tendência à formação dos EPOXI, CETO e HIDROXI e menor tendência à formação de polímeros do que os óleos e gorduras polinsaturados, como o óleo de soja.

Velasco et al. (2004a) encontraram níveis similares aos do nosso estudo, para os EPOXI, em óleos de oliva e de girassol termoxidados a 180° C por 5, 10 e 15 h, e em óleos e gorduras usados em frituras de restaurantes e lanchonetes da Espanha. Também encontraram, como em nosso estudo, maiores quantidades de EPOXI nos óleos/gorduras monoinsaturados do que nos polinsaturados.

No nosso estudo verificou-se que a fração dos ácidos graxos oxidados migrou em quantidades similares do óleo da fritadeira para a batata preparada na fritura. Cálculos para obtenção de teores destas substâncias nas batatas fritas foram realizados. Foram obtidos em mg por 100 g da batata frita na gordura hidrogenada, no óleo de soja e no óleo de palma, com níveis de CP de 44,1; 42,6 e 41,0 % (m/m), respectivamente, teores de EPOXI: 52,73; 33,78 e 67,57; de CETO: 28,51; 15,83 e 30,91; e de HIDROXI: 57,49; 33,78 e 67,16, respectivamente. Conclui-se que quantidades significativas destes três grupos de substâncias podem estar presentes em 100 g de batata frita em óleos/gorduras com alto teor de degradação.

Também foi verificado que o EPO foi o principal EPOXI formado, em termos quantitativos, uma vez que foram encontradas porcentagens deste ácido na fração dos EPOXI, no óleo de palma (cerca de 52 %) e na gordura hidrogenada (cerca de 35 %), provenientes de fritura de batatas. A porcentagem total dos EPOXI com isomeria *trans*, na fração dos EPOXI, foi em torno de 61 % no óleo de palma e de 54 % na gordura hidrogenada. Com relação ao óleo de soja, a porcentagem obtida do EPO na fração dos EPOXI foi de aproximadamente 10 %; e dos EPOXI de isomeria *trans* foi de 37 %. Com estes dados foram obtidas estimativas do teor, em mg, do EPO em 100 g de batata frita em óleo de palma (28,5), na gordura hidrogenada (18,08), e no óleo de soja (4,18), com valores de degradação em torno de 40 %, m/m de CP.

A Figura 2 mostra parte dos cromatogramas da gordura de soja parcialmente hidrogenada, do óleo de soja e do óleo de palma, provenientes de experimentos de fritura descontínua de batatas com a região dos EPOXI formados.

Velasco et al. (2004a) também encontraram, como em nosso estudo, em óleo de oliva e em óleo de girassol termoxidados a 180° C por 5, 10 e 15 h; e em óleos e gorduras usados em frituras de restaurantes e lanchonetes da Espanha, maiores quantidades dos EPOXI de isomeria *trans* do que a isomeria *cis* nos óleos monoinsaturados ao contrário dos óleos polinsaturados.

Por ser o EPO formado em quantidades significativas em óleos e gorduras em frituras, a citotoxicidade desta substância foi avaliada. Este estudo é apresentado a seguir (item 2 desta discussão).

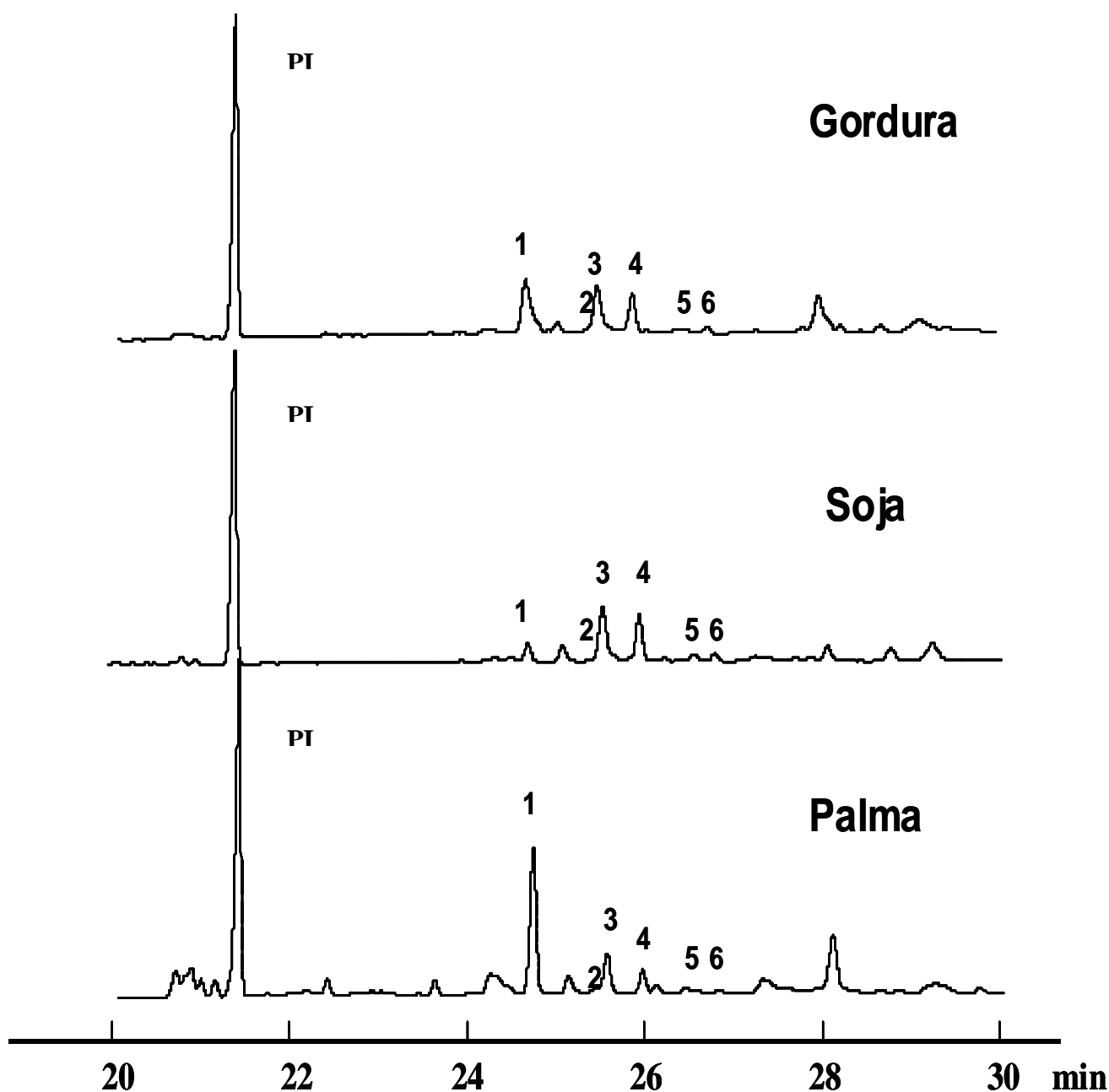


Figura 2. Parte dos gráficos das análises cromatográficas a gás dos EMAG polares, incluindo o pico do padrão interno (PI), éster metílico do ácido heneicosanóico (C21:0), com a região dos EPOXI provenientes da gordura de soja parcialmente hidrogenada, óleo de soja e óleo de palma, aquecidos a 180° C por 25 h, oriundos de experimentos de fritura descontínua de batatas. **1**, *trans*-9,10-epoxiestearato de metila; **2**, *trans*-12,13 epoxioleato de metila; **3**, *cis*-9,10-epoxiestearato de metila; **4**, *trans*-9,10-epoxioleato de metila; **5**, *cis*-12,13-epoxioleato de metila; **6**, *cis*-9,10-epoxioleato de metila.

2. “Avaliação da citotoxicidade do ácido *trans*-9,10-epoxiesteárico, um produto da termoxidação de óleos e gorduras usados em frituras”.

Este estudo teve como objetivo obter dados de citotoxicidade *in vitro* do EPO em células HTC de hepatoma de rato.

Nosso estudo mostrou que o EPO, na faixa de concentrações de 2,5 a 10 μM não foi citotóxico, quando comparado ao controle-solvente, diferentemente do EPO na faixa de 15 a 125 μM que foi citotóxico induzindo letalidade celular de 20 a 100 %. Com estes resultados concluímos que o EPO e/ou seus metabólitos formados apresentaram um grau significativo de citotoxicidade *in vitro* em células HTC metabolicamente competentes.

A absorção do monoepóxido do ácido esteárico foi constatada, através de estudo de Wilson et al. (2002a) envolvendo treze mulheres aparentemente saudáveis que consumiram com a alimentação normal o ácido 9,10-epoxiesteárico marcado, obtido a partir da reação do ácido oléico com o perácido *m*-cloro peroxibenzóico, administrado na forma de triacilglicerol habitual da dieta. Como a epoxidação do ácido oléico por perácidos forma o ácido *cis*-9,10-epoxiesteárico (*CIS* EPO) (FANKHAUSER-NOTI et al., 2006), concluímos que o monoepóxido estudado por Wilson et al. (2002a) foi o *CIS* EPO. Neste estudo, este ácido foi recuperado no plasma na proporção de 17 %. Embora este valor de porcentagem possa não representar risco à saúde, uma baixa absorção significa níveis altos desta substância no cólon (WILSON et al., 2002a). Como o consumo de carne vermelha tem sido relacionado ao câncer de cólon (VAN DER MEER et al., 1997), cujo mecanismo acredita-se estar relacionado à peroxidação lipídica e à formação de epóxidos de ácidos graxos (BABBS, 1999; GIOVANNUCCI; GOLDIN, 1997), podemos supor que estes epóxidos também representam risco a esta doença.

Os ácidos graxos depois de ingeridos são absorvidos no intestino delgado, e a partir da corrente sanguínea podem seguir três destinos: o tecido muscular, o tecido adiposo e o fígado (LIPÍDIOS, 2002). Considerando as etapas da digestão do EPO similar às dos ácidos graxos, a figura 3 sugere, com base em dados da bibliografia (BABBS, 1999; GIOVANNUCCI; GOLDIN, 1997; GREENE et al., 2000; LIPÍDIOS, 2002; VAN DER MEER et al., 1997), o que ocorre no organismo quando consumimos alimentos fritos em óleos/gorduras impróprios para o uso. No fígado, esta substância seria metabolizada a seu respectivo diol (GREENE et al., 2000). O mesmo ocorreria com o *CIS* EPO.

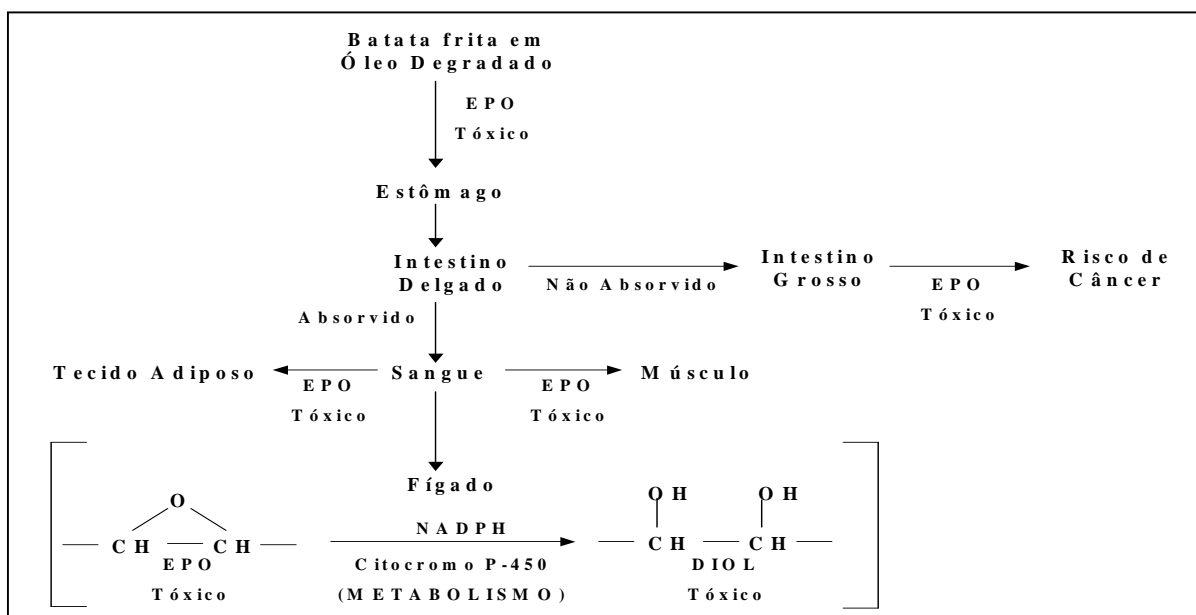


Figura 3. Prováveis destinos e metabolismo do EPO após exposição oral, suposição feita com base em dados da bibliografia (BABBS, 1999; GIOVANNUCCI; GOLDIN, 1997; GREENE et al., 2000; LIPÍDIOS, 2002; VAN DER MEER et al., 1997).

Um dado relevante para a discussão sobre a toxicidade dos epóxidos de ácidos graxos, é que o OSE apresenta uma ingestão diária aceitável (IDA) de 1 mg/kg de peso corpóreo (SFC apud FANKHAUSER-NOTI et al., 2006, p. 1279). Sabendo-se que o OSE é composto de 53 % de diepóxido do ácido linoléico, 25 % de monoepóxido do ácido oléico (*CIS* EPO) e 7 % de triepóxido do ácido linolênico e dos ácidos palmítico e esteárico não alterados (FRANKHAUSER-NOTI et al., 2006), podemos considerar a IDA do *CIS* EPO de 0,25 mg/kg de peso corpóreo. Então, a IDA desta substância para um adulto de 60 kg seria de 15 mg.

Com os dados obtidos a partir do nosso estudo, item 1 dessa discussão, os seguintes teores (em mg) do EPO foram estimados em 100 g de batata frita em óleo de palma: 28,50; na gordura hidrogenada: 18,08; e no óleo de soja: 4,18, com valores de degradação em torno de 40 %, m/m, de CP. Como se pode observar na figura 2, apresentada no item 1 desta discussão, não foi possível obter-se o teor do *CIS* EPO (pico 3) nas amostras do estudo, devido não ter havido uma adequada separação do pico desta substância com o pico do ácido *trans*-12,13-epoxioléico (pico 2). Porém, como também se pode observar nesta figura, foi verificado que a área do pico do *CIS* EPO foi consideravelmente maior do que a do ácido *trans*-12,13-epoxioléico, sugerindo que o teor do *CIS* EPO foi maior do que o do ácido *trans*-12,13-epoxioléico, nas três amostras. As áreas, destas substâncias, apresentadas nos cromatogramas da figura 2 também sugerem que o *CIS* EPO foi formado, em relação ao EPO, em níveis: levemente abaixo na gordura hidrogenada; consideravelmente acima no óleo de soja; e consideravelmente abaixo no óleo de palma. Logo, podemos supor que na gordura

hidrogenada e no óleo de soja com alto nível de degradação em uso em frituras, o CIS EPO é formado em quantidades próximas à sua IDA. Também podemos afirmar que teores significativos do EPO e do CIS EPO podem ser encontrados nas três amostras do nosso estudo em uso em frituras e com alto grau de degradação.

Conseqüentemente, estudos adicionais são requeridos para se determinar o teor e avaliar a toxicidade dos EPOXI, CETO e HIDROXI em alimentos preparados em fritura utilizando diversos tipos de óleos/gorduras, para contribuir com estudos futuros de avaliação de risco dos alimentos fritos para o consumo seguro destes alimentos.

3. No artigo “*Quality of used frying fats and oils: comparison of rapid tests based on chemical and physical oil properties*”, foram avaliados quatro testes rápidos de verificação da alteração e de determinação do momento de descarte dos óleos/gorduras em uso em frituras, quando o óleo/gordura está impróprio para o uso, segundo legislações internacionais. Foram avaliados dois testes baseados em reações químicas entre o óleo/gordura e o reagente dos testes, *Oxifritest*® (OT) (MEYER, 1979) e *Fritest*® (FT) (VON ZEDDELMANN, 1973), e dois testes baseados em propriedades físicas do óleo, *Viscofrit*® (VF) (CASTELLÓN-ARNAU, 1999) e *Food Oil Sensor*® (FOS) (GRAZIANO, 1979). A avaliação foi realizada através das análises de cento e cinco amostras, de óleos e gorduras usados em frituras de diferentes origens, incluindo fritadeiras domésticas, restaurantes, lanchonetes e fritadeiras contínuas industriais. Os testes foram comparados ao método analítico normalizado de determinação quantitativa de CP (IUPAC, 1992), parâmetro estabelecido na maioria das normas internacionais para óleos e gorduras em uso em frituras (DANA; SAM SAGUY, 2001). A determinação quantitativa de polímeros (IUPAC, 1992) também foi realizada e comparada com a determinação de CP e com a utilização dos testes rápidos.

Para a comparação dos testes rápidos com os métodos de CP e de polímeros realizou-se análise de correlação linear paramétrica entre as respostas obtidas dos testes rápidos e os resultados dos métodos, e determinou-se o número de respostas falsas, destes testes, que são respostas em desacordo com os resultados do método de CP.

Dado o número de amostras analisadas, todos os coeficientes de correlação obtidos foram altamente significativos ($P < 0,0001$). Porém, os mais altos coeficientes entre os testes rápidos e os métodos de CP e de polímeros foram encontrados para os testes baseados em propriedades físicas do óleo (testes físicos).

Os coeficientes de correlação encontrados entre, a porcentagem de CP e os resultados de diferentes testes rápidos foram de 0,75 e 0,74 para FT e OT, respectivamente (CROON et

al., 1986), e 0,894 para FOS (GERTZ, 2000), similar àqueles obtidos no nosso estudo: 0,67; 0,65; 0,936, para FT, OT e FOS, respectivamente.

Com relação ao número de respostas falsas, os testes físicos apresentaram melhores resultados do que os testes químicos. Ou seja, os testes físicos são mais equiparáveis com os métodos analíticos utilizados do que os testes químicos.

De imprescindível relevância para o estudo destes testes é considerar o seu objetivo. Se o objetivo é conhecer o momento no qual o óleo/gordura deve ser descartado, de acordo com a legislação, é necessária uma alta correlação entre o conteúdo de CP e os resultados dos testes rápidos, como também um baixo número de resultados falsos dos testes rápidos, na faixa de resultados de CP próxima ao ponto de descarte. E se o objetivo é obter informação sobre o nível de alteração do óleo/gordura, uma satisfatória correlação entre o conteúdo de CP e os resultados dos testes rápidos, e baixo número de resultados falsos dos testes rápidos deve ser uma condição necessária, na faixa inteira de resultados de CP.

No entanto, para os serviços de fiscalização é necessária a utilização de testes rápidos validados que permitam determinar o momento do descarte de óleos/gorduras não conformes segundo a legislação. Então, a obtenção de duas faixas de trabalho, próximas e acima, e próximas e abaixo do ponto de descarte, é necessário.

Considerando o número significativo de amostras analisadas que ultrapassaram o limite de 25 %, m/m de CP, o número de resultados falsos obtidos a partir dos testes rápidos, e as correlações obtidas entre as respostas destes testes e os resultados da determinação de CP, na faixa inteira do estudo; concluímos que os quatro testes estudados contribuem significativamente para a melhoria da qualidade dos óleos/gorduras em uso em fritura, ou seja, estes testes são úteis para se conhecer o nível de alteração do óleo/gordura. E para conhecer o momento de descarte do óleo/gordura, melhores resultados foram obtidos para os testes físicos. Portanto, para nossos estudos iniciais de validação dos testes rápidos para a determinação do momento de descarte de óleos e gorduras em uso em frituras, os testes físicos foram escolhidos. Este estudo está apresentado no item 6 desta discussão.

O mais alto coeficiente de correlação encontrado no estudo foi entre os métodos de determinação de CP e de determinação de polímeros. Conseqüentemente, os coeficientes de correlação encontrados entre os testes rápidos e estes dois métodos foram similares. Então, concluiu-se que os testes rápidos estudados podem substituir estes dois métodos para os objetivos alegados.

O método de determinação de CP é um método trabalhoso e extenso, ao contrário do método de determinação de polímeros que é rápido e simples. A figura 4 mostra os cromatogramas obtidos das análises cromatográficas a líquido para a determinação de polímeros nas amostras de gordura de soja parcialmente hidrogenada não aquecida e aquecida por 25 h, proveniente de experimento de fritura de batatas, respectivamente.

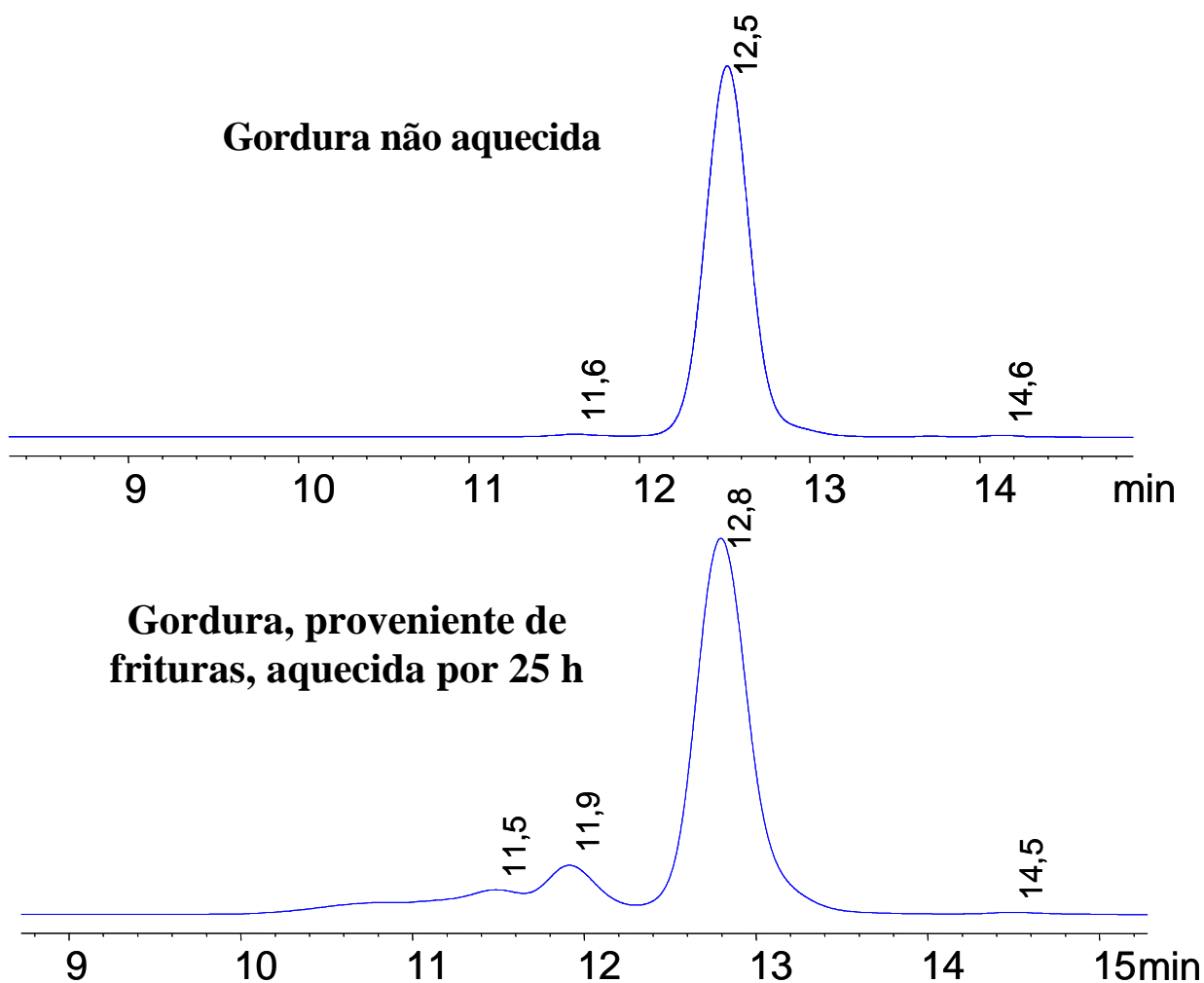


Figura 4. Gráficos obtidos das análises, cromatográficas a líquido, de determinação do teor de polímeros nas amostras de gordura de soja parcialmente hidrogenada não aquecida e aquecida por 25 h, proveniente de frituras de batatas, respectivamente. Os picos correspondem a: polímeros (11,6 e 11,5 min.); dímeros (11,9 min.); triacilgliceróis (12,5 e 12,8 min.) e ácidos graxos (14,6 e 14,5 min.).

Com o objetivo de verificar se o método de determinação de polímeros seria adequado como alternativa ao método de CP para a validação destes testes rápidos, foram realizados os dois estudos que correspondem aos dois artigos citados a seguir.

4. No artigo, “**Alterações da gordura vegetal parcialmente hidrogenada em fritura de batatas**”, o comportamento da gordura de soja parcialmente hidrogenada proveniente de dois procedimentos de fritura descontínua de batatas a 180° C foi avaliado, através das perdas dos principais ácidos graxos presentes e da formação de CP e de polímeros, com o objetivo de fornecer dados das alterações ocorridas no meio de fritura.

Verificou-se que a perda do ácido graxo aumentou com o seu grau de insaturação.

Também foi verificado que, nos dois procedimentos de fritura nas condições do estudo, houve aumento do teor de polímeros com o aumento do tempo de aquecimento.

O coeficiente de correlação (r) obtido entre a perda do ácido linoléico, ácido graxo presente em maiores proporções, e a formação de polímeros, para todos os dados dos dois procedimentos de fritura, foi de 0,9792, demonstrando que a perda de ácidos graxos pode ser diretamente relacionada à formação de polímeros, nas condições do estudo, já que este valor de “ r ”, segundo Shikamura (2006), representa uma correlação muito forte entre duas variáveis.

O “ r ” obtido entre os resultados das determinações de polímeros e de CP, para todos os dados dos dois procedimentos de fritura, foi de 0,9966. Este valor de “ r ” corresponde à uma correlação muito forte entre duas variáveis (SHIKAMURA, 2006). Deste modo, podemos afirmar que a verificação da degradação, em amostras de gordura de soja parcialmente hidrogenada submetida a procedimentos de fritura de batatas, pode ser realizada utilizando também a determinação quantitativa de polímeros, como alternativa à determinação de CP.

5. No artigo, “**Alterações dos óleos de palma e de soja em fritura descontínua de batatas**”, o comportamento destes óleos provenientes de dois procedimentos de frituras descontínuas de batatas a 180° C foi avaliado, através das perdas dos principais ácidos graxos presentes e da formação de polímeros, com o objetivo de fornecer dados das alterações ocorridas no meio de fritura.

No óleo de soja assim como no óleo de palma a perda dos ácidos graxos aumentou com o seu grau de insaturação.

Também foi verificado nos dois procedimentos de fritura que houve aumento do teor de polímeros com o aumento do tempo de aquecimento.

Os coeficientes de correlação (r) obtidos entre a perda dos ácidos graxos insaturados e a formação de polímeros foram: 0,9951 e 0,9740, para os óleos de palma e de soja, respectivamente. Uma vez que estes valores de “ r ” indicam forte correlação entre variáveis

(SHIKAMURA, 2006), então concluímos que a degradação destes óleos submetidos à fritura descontínua de batatas pode ser eficazmente verificada através da determinação quantitativa de polímeros. Assim, estes dados confirmam a determinação de polímeros como mais um parâmetro de verificação da alteração destes óleos em frituras de batatas.

Outro dado importante encontrado nos dois estudos acima, itens 4 e 5 destes discussões, é que quantidades significativas de polímeros foram encontradas nos óleos/gordura analisados, confirmando que o método de determinação de polímeros pode ser utilizado como método de referência na validação dos testes rápidos e por isso, foi o método utilizado no nosso estudo (item 6). Estes dados estão de acordo com Márquez-Ruíz; Tasioula-Margari e Dobarganes (1995) que verificaram que os polímeros são formados em consideráveis proporções em óleos/gorduras com níveis consideráveis de degradação.

6. No artigo “**Estudos preliminares de validação de testes rápidos para avaliação de óleos e gorduras usados em frituras - contribuição para a Saúde Pública**”, dois testes rápidos baseados em propriedades físicas do óleo, VF e FOS, foram avaliados. O objetivo deste estudo foi verificar a adequação destes testes para determinar o momento de descarte de óleos e gorduras, não conformes, em uso em frituras, e se obter dados iniciais de validação dos mesmos. A determinação do teor de polímeros (IUPAC, 1992) foi o método analítico escolhido como referência neste estudo. O valor de “r”, entre os resultados deste método e os de determinação de CP (IUPAC, 1992), foi de 0,9849. De acordo com Shikamura (2006), este valor de “r” representa uma correlação muito forte entre duas variáveis, então consideramos que o método de determinação de polímeros apresentou correlação linear paramétrica muito forte com o método de determinação de CP.

Baseado na regressão linear encontrada entre os resultados dos dois métodos (de determinação de CP e de determinação de polímeros), o nível de 25 %, m/m de CP correspondeu ao nível de 14 %, m/m de polímeros, que foi considerado neste estudo como valor de restrição. Este valor está entre aqueles estabelecidos na Bélgica (10 %) e na Holanda (16 %) como valores limites para polímeros nestes óleos/gorduras (DANA; SAM SAGUY, 2001).

O teste rápido FOS apresenta uma escala limitada de respostas, de zero a 10, então para comparar este teste com outros métodos e testes, a correlação linear não paramétrica é a recomendada, por isso, esta foi a correlação utilizada para verificar a equiparação entre os resultados analíticos dos métodos e as respostas dos testes rápidos utilizados no estudo. Foram obtidos, no nosso estudo, coeficientes de correlação acima de 0,9580. Destes resultados se conclui que os testes rápidos estudados podem ser recomendados para

substituir o método de determinação de polímeros, e que este método pode substituir o de determinação de CP, pois os valores de “r” encontrados representam, de acordo com Shikamura (2006), correlações muito fortes entre duas variáveis.

Para a validação de um método ou teste analítico é necessário, como primeiro passo, estabelecer o (s) objetivo (s) (alegação) e a aplicação do método (INMETRO, 2003), e a seguir, classificá-lo. O objetivo e a aplicação dos testes rápidos estudados estão estabelecidos acima. Com base nas definições da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (AOAC, 1998) para métodos analíticos qualitativos e quantitativos, os testes rápidos estudados foram classificados como testes qualitativos, assim, os parâmetros de validação utilizados foram escolhidos de acordo com as recomendações da AOAC (AOAC, 2000) para métodos qualitativos.

Os parâmetros de validação dos testes foram os seguintes: faixa inteira de respostas; faixas de trabalho; e porcentagem de falso negativo em resultados positivos e porcentagem de falso positivo em resultados negativos (precisão) (AOAC, 2000), nas duas faixas de trabalho. Estes parâmetros foram obtidos através da comparação das respostas dos testes com os resultados obtidos do método de determinação de teor de polímeros.

A faixa inteira de respostas, que foi obtida com valores de polímeros de 0,4 a 30,7 %, foi considerada adequada ao estudo, pois o valor médio desta (15 %) está próximo ao valor de restrição (14 %).

Foram obtidas duas faixas de trabalho: uma com valores abaixo ou igual, e próximos ao valor de restrição, considerada faixa de amostras com resultados negativos. Foram obtidas seis amostras desta faixa. A outra faixa, com valores acima e próximos ao valor de restrição, considerada faixa de amostras com resultados positivos. Foram obtidas cinco amostras desta faixa. Para a validação de testes rápidos, o guia de validação da EPA estabelece, para cada uma destas faixas, o número mínimo de vinte amostras (EPA, 1995). Então, para validar os testes rápidos, o número de amostras no nosso estudo foi considerado insuficiente por isso, o estudo foi caracterizado como preliminar.

A porcentagem de falso negativo em resultados positivos (% FN) e a porcentagem de falso positivo em resultados negativos (% FP) (precisão) foram, respectivamente, 20,0 e 33,0, para o VF; e zero e 33,0, para o FOS.

Pelos resultados obtidos até o momento, o teste FOS seria adequado para a tomada de decisão de descarte de óleos e gorduras não conformes, pois apresentou valor zero para % de

FN, uma vez que para a Saúde Pública, valores baixos para % de FN são mais requeridos do que para os FP, e valores altos para o FP, não são tão indesejáveis.

5 - CONCLUSÕES

1. Óleos e gorduras monoinsaturados apresentam maior tendência à formação de EPOXI, CETO e HIDROXI e menor tendência à formação de polímeros, do que óleos e gorduras poliinsaturados;

2. O EPO, de possível formação em óleos e gorduras em uso em frituras, e/ou seus metabólitos são citotóxicos em células HTC metabolicamente competentes;

3. Os grupos de EPOXI, CETO e HIDROXI constituem quantitativamente uma fração muito importante dos monômeros oxidados, sendo os EPOXI e os HIDROXI as principais substâncias;

4. A alteração, dos óleos e gordura estudados, pode ser eficazmente verificada através da determinação quantitativa de polímeros, dada a sua excelente correlação com a perda de ácidos graxos insaturados e com a determinação de CP, e sua formação significativa na alteração;

5. Os quatro testes rápidos estudados são úteis para se conhecer o nível de degradação dos óleos/gorduras em uso em frituras;

6. Dos testes rápidos estudados, os baseados em propriedades físicas foram mais eficazes do que os baseados em reações químicas para a avaliação da alteração e para determinar o momento de descarte de óleos e gorduras em uso em frituras;

7. O teste rápido FOS foi o de escolha para decidir o momento de descarte de óleos e gorduras em uso em frituras;

8. Com os dados obtidos verifica-se a importância de estudos adicionais de determinação quantitativa, estudos de metabolismo e de toxicidade dos monômeros de triacilgliceróis oxidados formados em óleos/gorduras provenientes de frituras.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **AOAC® Peer-verified methods program**: manual on policies and procedures. (1998). Disponível em: <<http://www.aoac.org/Vmeth/PVM.pdf>>. Acesso em: 04 abr. 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Data submission requirements**. (2000). Disponível em: <<http://www.aoac.org/testkits/datasubmission.htm>>. Acesso em: 04 abr. 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. **Official methods of analysis of AOAC International**. 17. ed. Maryland, USA: AOAC International, 2003. 2v.

BABBS, C. F. Free radicals and the etiology of colon cancer. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 8, n. 2, p. 191-200, 1999.

BERDEAUX, O.; MÁRQUEZ-RUIZ, G.; DOBARGANES, M. C. Characterization, quantitation and evolution of monoepoxy compounds formed in model systems of fatty acid methyl esters and monoacid triglycerides heated at high temperature. **Grasas y Aceites**, v. 50, n. 1, p. 53-59, 1999.

BILLEK, G. Health aspects of thermoxidized oils and fats. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 8-9, p. 587-593, 2000.

CASTELLÓN-ARNAU, A. Dispositivo medidor de la alteración de aceites comestibles recalentados. Patente ES 1 043 160U, 1999.

COHN, J. S. Oxidized fat in the diet, postprandial lipaemia and cardiovascular disease - nutrition and metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, v. 13, n. 1, p. 19-24, 2002.

CHANG, S. S.; PETERSON, R. J.; HO, C. Chemical reactions involved in the deep-fat frying of foods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 55, n. 10, p. 718-727, 1978.

CHAO, P. et al. Oxidized frying oil up regulates hepatic acyl-CoA oxidase and cytochrome P450 4 A 1 genes in rats and activates PPARalpha. **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 12, p. 3166-3174, 2001.

CLARK, W. L.; SERBIA, G. W. Aspectos de seguridad en las grasas y aceites de fritura. **Alimentaria**, v. 9, n. 225, p. 89-95, 1991.

CROON, L. B. et al. A comparative study of analytical methods for quality evaluation of frying fat. **Fette, Seifen, Anstrichmittel**, v. 88, n. 3, p. 87-91, 1986.

- DANA, D.; SAM SAGUY, I. Frying of nutritious foods: obstacles and feasibility. **Food Science Technology Research**, v. 7, n. 4, p. 265-279, 2001.
- DOBARGANES, M. C.; MÁRQUEZ-RUÍZ, G. Oxidized fats in foods. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 6, n. 2, p. 157-163, 2003.
- DOBARGANES, M. C.; MÁRQUEZ-RUÍZ, G. Regulation of used frying fats and validity of quick tests for discarding the fats. **Grasas y Aceites**, v. 49, n. 3-4, p. 331- 335, 1998.
- DOBARGANES, M. C.; MÁRQUEZ-RUÍZ, G.; VELASCO, J. Interactions between fat and food during deep-frying. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 8-9, p. 521-528, 2000.
- DOBARGANES, M. C.; PÉREZ-CAMINO; M. C. Fatty acid composition: a useful tool for the determination of alteration level in heated fats. **Revue Française des Corps Gras**, v. 35, n. 2, p. 67-70, 1988.
- DOBARGANES, M. C.; PÉREZ-CAMINO, M. C.; MÁRQUEZ-RUÍZ, G. High performance size exclusion chromatography of polar compounds in heated and non-heated fats. **Fat Science and Technology**, v. 90, n. 8, p. 308- 311, 1988.
- EBONG, P. E. et al. Influence of palm oil (*Elaeis guineensis*) on health. **Plant Foods and Human Nutrition**, v. 53, n. 3, p. 209-222, 1999.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Immunoassay methods in SW-846**: recommended format and content for documentation supporting new submittals. (Rev. 0, jul. 1995). Disponível em: <<http://www.epa.gov/sw-846/pdf/assay.pdf>>. Acesso em: 04 abr. 2006.
- ESTERBAUER, H. Citotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 779S-786S, 1993.
- ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehydes. **Free Radical Biology & Medical**, v. 11, p. 81-128, 1991.
- FRANKHAUSER-NOTI, A. et al. Assessment of epoxidized soybean oil (ESBO) migrating into foods: comparison with ESBO-like epoxy fatty acids in our normal diet. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 8, p. 1279-1286, 2006.
- FRITSCH, C.W. Measurements of frying fat deterioration: a brief review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 58, n. 3, p. 272-274, 1981.

- GAO, Y. T. et al. Lung cancer among chinese women. **International Journal of Cancer**, v. 40, n. 5, p. 604-609, 1987.
- GASPAROLI, A. The formation of new compounds. **Grasas y Aceites**, v. 49, n. 3-4, p.303-309, 1998.
- GERTZ, C. Chemical and physical parameters as a quality indicator of used frying fats. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 8-9, p. 566-572, 2000.
- GIOVANNUCCI, E.; GOLDIN, B. The Role of fat, fatty acids and total energy intake in the etiology of human colon cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, n. 6, p. 1564S-1571S, 1997.
- GRAZIANO, V. J. Portable instrument rapidly measures quality of frying fat in food service operations. **Food Technology**, v. 33, n. 9, p. 50-56, 1979.
- GREENE, J. F. et al. Toxicity of epoxy fatty acids and related compounds to cells expressing human soluble epoxide hydrolase. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, n. 4, p. 217-226, 2000.
- INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos: DOQ-CGCRE-008**. [S. l], [s. n.], 2003. Revisão: 01-Março /2003.
- INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives**. 7. ed. Oxford: Pergamon Press, 1992, supl. 1.
- INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DEEP-FAT FRYING, 4., 2004, Hagen/Westphalia, Germany. Disponível em: <<http://www.dgfett.de/material/recomm.htm>>. Acesso em: 28 fev. 2006.
- JORGE, N. **Estudo do comportamento do óleo de girassol e do efeito do dimetil polisiloxano em termoxidação e frituras** (Tese de doutorado) - Universidade de Campinas - Unicamp, Campinas, SP, 1996.
- JORGE, N. et al. Influence of dimethylpolysiloxane addition to edible oils: performance of sunflower oil in discontinuous and continuous laboratory frying. **Grasas y Aceites**, v. 47, n. 1-2, p. 20-25, 1996.
- KANAZAWA, K.; ASHIDA, H. Target enzymes on hepatic dysfunction caused by dietary products of lipid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 288, n. 1, p. 71-78, 1991.

KOSAKA, K. et al. Leukotoxin, a linoleate epoxide: its implication in the late death of patients with extensive burns. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 139, n. 2, p. 141-148, 1994.

LIPÍDIOS. In: LEHNINGER, A. L. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3 ed., São Paulo: Savier, 2002. 975 p. cap. 11.

LOPEZ-VARELA, S.; SANCHEZ-MUNIZ, F. J.; CUESTA, C. Decrease food efficiency ratio, growth retardation and changes in liver fatty acid composition in rats consuming thermally oxidized and polymerized sunflower oil used for frying. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 3, p. 181-189, 1995.

MACHADO, E. R. et al. Avaliação da citotoxicidade do ácido *trans*-9,10-epoxiesteárico, um produto da termoxidação de óleos e gorduras usados em frituras. Artigo em fase de elaboração e a ser submetido à publicação em 2007a.

MACHADO, E. R. et al. Avaliação quantitativa de monoepoxiácidos, monocetoácidos e monohidroxiácidos em óleos e gorduras provenientes de fritura descontínua de batatas. Artigo elaborado e a ser submetido à publicação em 2007b.

MACHADO, E. R.; ABRANTES, S. M. P.; DOBARGANES, M. C. Alterações da gordura vegetal parcialmente hidrogenada em fritura de batatas. **Revista Higiene Alimentar**. Artigo aprovado e a ser publicado em 2007a. No prelo.

MACHADO, E. R.; ABRANTES, S. M. P.; DOBARGANES, M. C. Alterações dos óleos de palma e de soja em fritura descontínua de batatas. Artigo elaborado e a ser submetido à publicação em 2007b.

MACHADO, E. R.; ABRANTES, S. M. P.; DOBARGANES, M. C. Estudos preliminares de validação de testes rápidos para avaliação de óleos e gorduras usados em frituras - contribuição para a Saúde Pública. **Revista Higiene Alimentar**. Artigo aprovado e a ser publicado em 2007c. No prelo.

MARMESAT, S. et al. Quality of used frying fats and oils: comparison of rapid tests based on chemical and physical oil properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 1-8. Artigo aprovado para publicação e a ser publicado em 2007. No prelo.

MÁRQUEZ-RUÍZ, G.; DOBARGANES, M. C. Assessments on digestibility of oxidized compounds from [1- ¹⁴C]linoleic acid using a combination of chromatographic techniques. **Journal of Chromatography B: Biomedical applications**, v. 675, n. 1, p. 1-8, 1995.

- MÁRQUEZ-RUIZ, G.; DOBARGANES, M. C. "Nutritional and physiological effects of used frying fats". In: PERKINS, E.G.; ERICKSON, M.D. **Deep frying: chemistry, nutrition and practical applications**. Champaign, IL: AOCS Press, p. 160-182, 1996.
- MÁRQUEZ-RUIZ, G.; GUEVEL, G.; DOBARGANES, M.C. Applications of chromatographic techniques to evaluate enzymatic hydrolysis of oxidized and polymeric triglycerides by pancreatic lipase "*in vitro*". **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 2, p. 119-126, 1998.
- MÁRQUEZ-RUIZ, G.; PÉREZ-CAMINO, M. C.; DOBARGANES, M. C. Digestibility of fatty acid monomers, dimers and polymers in the rat. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 69, n. 9, p. 930-934, 1992.
- MÁRQUEZ-RUIZ, G.; TASIOULA-MARGARI, M.; DOBARGANES, M. C. Quantitation and distribution of altered fatty acids in frying fats. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 10, p. 1171-1176, 1995.
- MEYER, H. A new and simple rapid method for detecting the degree of oxidative decomposition of heated fats. **Fette, Seifen, Anstrichmittel**, v. 81, p. 524-533, 1979.
- MITCHELL, L. A.; MORAN, J. H.; GRANT, D. F. Linoleic acid, *cis*-epoxyoctadecenoic acids, and dihydroxyoctadecadienoic acids are toxic to Sf – 21 cells in the absence of albumin. **Toxicology Letters**, v. 126, n. 3, p. 187-196, 2002.
- MORAN, J. H. et al. Analysis of the cytotoxic properties of linoleic acid metabolites produced by renal and hepatic P450s. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 168, n. 3, p. 268-272, 2000.
- NAWAR, W. W. Volatile components of the frying process. **Grasas y Aceites**, v. 49, n. 3-4, p. 271-274, 1998.
- ROMERO, A. et al. Effect of oil replenishment during deep fat frying of frozen foods in sunflower oil and high-oleic acid sunflower oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.75, n. 2, p. 161-167, 1998.
- SAM SAGUY, I.; DANA, D. Integrated approach to deep fat frying: engineering, nutrition, health and consumer aspects. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n. 2-3, p. 143-152, 2003.
- SCHWARTZ, D. P.; RADY, A. H.; CASTAÑEDA, S. The formation of oxo- and hydroxy-fatty acids in heated fats and oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.71, n. 4, p. 441-444, 1994.

TOTANI, Y. et al. Leukotoxin and its diol induce neutrophil chemotaxis through signal transduction different from that of fMLP. **European Respiratory Journal**, v. 15, n.1, p.75-79, 2000.

SHIKAMURA, S. Interpretação do coeficiente de correlação. In: Aula da matéria CE003-Estatística II, 30-08-2006. Departamento de Estatística - UFPR. Disponível em <<http://www.est.ufpr.br/~silvia/CE003/node74.html>>. Acesso em: 06 nov. de 2006.

VAN DER MEER, R. et al. Mechanisms of the intestinal effects of dietary fats and milk products on colon carcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 114, n. 1-2, p. 75-83, 1997.

VELASCO, J. et al. Formation and evolution of monoepoxy fatty acids in thermoxidized olive and sunflower oils and quantitation in used frying oils from restaurants and fried-food outlets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 14, p. 4438-4443, 2004a.

VELASCO, J. et al. Formation of short-chain glycerol-bound oxidation products and oxidised monomeric triacylglycerols during deep-frying and occurrence in used frying fats. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 106, n. 11, p. 728-735, 2004b.

VELASCO, J. et al. Sensitive and accurate quantitation of monoepoxy fatty acids in thermoxidized oils by gas-liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 982, n. 1, p. 145-152, 2002.

VON ZEDDELMANN, H. V. Probleme bei der beurteilung von fritierfetten. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v. 69, p. 81-86, 1973.

WILSON, R. et al. Dietary epoxy fatty acids are absorbed in healthy women. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 32, n. 2, p.79-83, 2002a.

WILSON, R. et al. Dietary hydroxy fatty acids are absorbed in humans: implications for the measurement of “oxidative stress” in vivo. **Free Radical Biological & Medicine**, v. 32, n. 2, p. 162-168, 2002b.

ZHENG, J. et al. Leukotoxin-Diol a putative toxic mediator involved in acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 25, n. 4, p. 434-438, 2001.

ZHONG, L. et al. Lung cancer and indoor air pollution arising from chinese-style cooking among nonsmoking women living in Shanghai, China. **Epidemiology**, v. 10, n. 6, p. 488-94, 1999.