

MARINA MARIA LELIS DA SILVA

**PARÂMETROS DE QUALIDADE DE FRITURA
POR IMERSÃO EM ÓLEO DE SOJA E OS EFEITOS
DO CONSUMO EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência da
Nutrição, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

MARINA MARIA LELIS DA SILVA

**PARÂMETROS DE QUALIDADE DE FRITURA
POR IMERSÃO EM ÓLEO DE SOJA E OS EFEITOS
DO CONSUMO EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência da
Nutrição, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 05 de maio de 2008

Prof. Clóvis Andrade Neves
(Co-orientador)

Prof^a. Helena Maria Pinheiro Sant'Ana
(Co-orientador)

Prof^a. Maria Beatriz Abreu Glória

Prof^a. Maria do Carmo Gouveia Peluzio

Prof^a. Céphora Maria Sabarense

*Dedico este trabalho aos meus pais,
pelo apoio incondicional ao longo de todo o caminho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença inquestionável, pelo sustento nos momentos difíceis e pelas maravilhosas graças que me concede. “E em tudo isso glorifica o Senhor que te criou, e que te cumula de todos os teus bens.” (*Eclo 32, 17*)

Aos professores e funcionários do Departamento de Nutrição e Saúde e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição.

À Universidade Federal de Viçosa, pelos anos de estudo aqui conquistados e pela excelência da qual usufruí por dez anos, do Coluni à pós-graduação.

À FAPEMIG, pelo financiamento do projeto de pesquisa e pela concessão da bolsa de estudos.

À Professora Céphora Maria Sabarense, pela orientação, dedicação e atenção, pelo respeito e estímulo e, especialmente, pela confiança.

À Professora Helena Maria Pinheiro Sant’Ana, pela confiança desde a graduação e pelo apoio.

À Professora Ângela Maria Campos Santana, pela atenção e pelos conhecimentos compartilhados.

Ao Professor Clóvis Andrade Neves, pela atenção, paciência e orientação nas análises histológicas.

À Professora Maria Beatriz Abreu Glória, por permitir a realização de uma análise deste estudo em seu laboratório e por participar da banca de avaliação.

Às Professoras Sônia Machado Rocha Ribeiro e Neuza Maria Brunoro Costa, pela gentileza em aceitarem o convite para a participação na banca de avaliação.

À Fátima Ladeira Mendes Duarte, chefe da Divisão de Alimentação da UFV, à nutricionista e Renata Bitencourt Duarte pela gentileza em permitir e auxiliar a realização deste estudo e aos funcionários do RU/UFV, pela boa vontade e carinho de sempre.

À Bárbara Reis, Fernanda Milagre, Lívia Tibiriçá e Mariane Soares, pela companhia, dedicação e auxílio, que foram cruciais para a execução deste trabalho. Sem a ajuda de vocês teria sido muito mais difícil.

Às companheiras de trabalho nos laboratórios, que pela companhia e apoio se tornaram amigas queridas: Damiana, Érica, Franciane, Maria Carol, Sandra e Vânia.

Ao Cassiano, pela solicitude, boa-vontade e companhia em todas as ocasiões.

Aos inúmeros colegas dos Laboratórios de Bioquímica Nutricional, Análise de Alimentos, Nutrição Experimental e Análise de Vitaminas pelas contribuições e pela convivência.

À amiga Angélica, pelos anos de companhia e amizade e pela generosidade de sempre.

Aos meus pais Laurindo e Maria do Carmo, aos meus irmãos Fabrício e Tiago e ao Neimar, que foram o maior estímulo para que eu seguisse em frente. O apoio incondicional que recebi de vocês foi essencial para que esse trabalho se concretizasse.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Marina Maria Lelis da Silva, filha de Laurindo da Silva e de Maria do Carmo Lelis da Silva, nasceu em 14 de fevereiro de 1983, na cidade de Viçosa, Minas Gerais.

Em abril de 2001 iniciou o Curso de Graduação em Nutrição, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em maio de 2006.

Em maio de 2006, iniciou o curso de mestrado, no Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, do Departamento de Nutrição e Saúde, concluindo-o em maio de 2008.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS, QUADROS E FIGURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Fritura por imersão.....	2
2.2. Alterações físico-químicas do óleo de fritura	2
2.2.1. Hidrólise	2
2.2.2. Oxidação	3
2.2.3. Polimerização	5
2.3. Métodos de análise das alterações no óleo de fritura	5
2.4. Limites de utilização para óleos de fritura	7
2.5. Descarte do óleo de fritura: Impactos ambientais	7
2.6. Impactos nutricionais do processo de fritura	9
2.6.1. Impactos nutricionais sobre o óleo de fritura	9
2.6.2. Impactos nutricionais sobre os alimentos	11
2.7. Impactos nutricionais e metabólicos do consumo de óleo de fritura e de alimentos fritos	12
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo Geral	16
3.2. Objetivos Específicos	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1. Acompanhamento do processo de fritura e coleta de amostras	17
4.2. Análise das amostras de óleo de fritura	17
4.2.1. Análises físico-químicas do óleo de fritura	17
4.2.2. Análise do teor de vitamina E no óleo de fritura.....	17
4.2.3. Determinação do perfil de ácidos graxos das amostras de óleo.....	18
4.3. Caracterização das amostras de alimentos.....	18
4.3.1. Determinação da composição centesimal dos alimentos	18
4.3.2. Determinação do perfil de ácidos graxos das amostras de alimentos	19
4.4. Ensaio biológico	19
4.4.1. Animais e condições experimentais.....	19
4.4.2. Cálculo dos coeficientes de eficácia alimentar, absorção aparente de gordura e índice hepato-somático	20
4.4.3. Análise histoquímica e morfométrica do tecido hepático	20
4.4.4. Determinação do perfil de ácidos graxos do tecido hepático	21
4.5. Análise estatística	21

5. ARTIGO I: Qualidade do óleo e perfil de ácidos graxos de alimentos submetidos à fritura por imersão.....	22
5.1 Introdução	23
5.2 Materiais e Métodos	24
5.3 Resultados e Discussão	26
5.4 Conclusões	38
6. ARTIGO II: Perfil de ácidos graxos e análise histológica de tecido hepático de animais alimentados com óleo utilizado em fritura por imersão.....	42
6.1. Introdução	43
6.2. Materiais e Métodos.....	44
6.3. Resultados e Discussão	47
6.4. Conclusões	56
7. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE TABELAS, QUADROS E FIGURAS

	Pag.
Tabela 5.1 – Caracterização do processo de fritura acompanhado em uma Unidade de Alimentação e Nutrição institucional em Viçosa-MG.....	28
Tabela 5.2 – Resultados das análises físico-químicas para caracterização e degradação de óleo de soja utilizado para fritura em uma Unidade de Alimentação e Nutrição institucional em Viçosa-MG.....	29
Tabela 5.3 – Teores de tocoferóis em óleo de soja utilizado em fritura por imersão em uma Unidade de Alimentação e Nutrição institucional em Viçosa-MG.....	33
Tabela 5.4 – Perfil de ácidos graxos de óleo de soja utilizado para fritura em uma Unidade de Alimentação e Nutrição institucional em Viçosa-MG.....	36
Tabela 5.5 – Composição centesimal dos alimentos crus e fritos em uma Unidade de Alimentação e Nutrição institucional em Viçosa-MG.....	38
Tabela 5.6 – Perfil de ácidos graxos dos alimentos crus e fritos.....	40
Tabela 6.1 – Consumo alimentar, absorção de gordura e ganho de peso em animais que consumiram óleo de soja utilizado para fritura.....	48
Tabela 6.2 – Perfil de ácidos graxos e características dos óleos de fritura utilizados nas dietas consumidas pelos animais dos grupos experimentais.....	49
Tabela 6.3 – Perfil de ácidos graxos e contagem de glóbulos de gordura no tecido hepático de ratos <i>Wistar</i> que consumiram óleo de soja utilizado para fritura.....	50
Quadro 2.1 – Métodos de análise de qualidade do óleo utilizado para fritura – Primeira parte	06
Quadro 2.2 – Métodos de análise de qualidade do óleo utilizado para fritura – Segunda parte	07
Quadro 2.3 – Limites de utilização do óleo de fritura em diferentes países.....	08
Quadro 2.4 – Alterações nos nutrientes presentes no alimento em função do processo de fritura.....	11
Quadro 2.5 – Efeito do consumo de óleos de fritura ou óleos termicamente oxidados em animais.....	13
Figura 2.1 – Reações de hidrólise ocorridas no triacilglicerol durante o processo de fritura...	03
Figura 2.2 – Esquema das etapas do processo de auto-oxidação de lipídeos.....	04
Figura 2.3 – Reações de polimerização acíclica do ácido oléico.....	05
Figura 5.1 – Curva do índice de peróxidos em óleo de soja utilizado para fritura em uma Unidade de Alimentação e Nutrição institucional em Viçosa-MG.....	27
Figura 6.1 – Observações histológicas típicas de fígado dos animais dos grupos experimentais.....	53
Figura 6.2 – Fotomicrografias de secções histológicas de fígado de ratos fixadas com tetróxido de ósmio.....	55
Figura 6.3 – Fotomicrografias de secções histológicas de fígado de ratos na região do espaço porta.....	55

RESUMO

SILVA, Marina Maria Lelis da. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, maio de 2008.

Parâmetros de qualidade de fritura por imersão em óleo de soja e os efeitos do consumo em ratos Wistar. Orientadora: Céphora Maria Sabarense. Co-orientadores: Ângela Maria Campos Santana, Helena Maria Pinheiro Sant'Ana e Clóvis Andrade Neves.

O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações sofridas pelo óleo de fritura utilizado em uma Unidade de Alimentação e Nutrição institucional, bem como as conseqüências desta utilização no óleo e nos alimentos fritos e o efeito do consumo deste óleo de fritura no tecido hepático de ratos Wistar. Nas amostras de óleo foram analisados o teor de vitamina E, o perfil de ácidos graxos e as características químicas. Nos alimentos foram determinados a composição centesimal e o perfil de ácidos graxos. Para o ensaio biológico, os animais consumiram, por 8 semanas, dietas contendo óleo fresco e óleo utilizado para fritura por 13h38min e por 23h28min. Após este período os animais sofreram eutanásia e o fígado foi retirado para a análise. O processo de fritura acompanhado durou 23h28min e após este período não houve degradação excessiva do óleo utilizado e o mesmo não atingiu os limites recomendados para descarte. O teor de α -tocoferol no óleo foi reduzido em 20% após a fritura, e a perda dos outros isômeros tocoferóis variou entre 38,4 e 49,9%. O perfil de ácidos graxos dos óleos foi alterado pelas frituras, com aumento do teor de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e *trans* e redução do teor de ácidos graxos poliinsaturados. Após o processo de cocção, houve de forma geral, um aumento do teor de lipídeos nas amostras de alimentos. O perfil de ácidos graxos dos alimentos também se alterou após a cocção, com aumento de ácidos graxos poliinsaturados e *trans*. Na análise dos resultados do ensaio biológico não foram encontradas diferenças significativas no ganho de peso e na quantidade de lipídeos absorvidos pelos animais. O perfil de ácidos graxos do tecido hepático também não apresentou diferenças relevantes entre os grupos. A análise histológica indicou alterações na estrutura hepática dos animais, com presença significativa de esteatose hepática no tecido dos animais que consumiram o óleo utilizado por 23h28min. Os resultados do estudo indicam que, apesar do período de utilização do óleo, os limites máximos de degradação química não foram atingidos. Entretanto, seu consumo em por ratos Wistar em dietas normolipídicas foi suficiente para promover alterações histológicas nos fígados dos animais.

ABSTRACT

SILVA, Marina Maria Lelis da. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, May, 2008. **Quality parameters of deep frying in soybean oil and the effects of consumption in Wistar rats.**
Adviser: Céphora Maria Sabareense. Co-advisers: Ângela Maria Campos Santana, Helena Maria Pinheiro Sant'Ana and Clóvis Andrade Neves.

This study aimed to evaluate the alterations in deep frying oil used at an institutional restaurant, the consequences of this use in the fatty acid profile of the oil and fried foods and the effect of the frying oil consumption in the fatty acid profile and in the cellular structure of Wistar rats' hepatic tissue. Oil samples were chemically characterized and the fatty acid profile and the vitamin E contents were analyzed. In the fried foods the composition and the fatty acid profile were also analyzed. In the biological assay, the animals were fed by 8 weeks with diets containing fresh oil and deep frying oil, used by 13h38min and by 23h28min. After this period the animals were euthanized and the liver were extracted for analysis. The deep frying process lasted 23h28min and the oil was not excessively degraded by the use, and does not reached the recommended limits of discard. The α -tocopherol content in the oil reduced by 20% after the use for frying, and the loss of the other isomeric tocopherols varied between 38,4 and 49,9%. The fatty acid profile of the oils was altered by frying, with increase of the of saturated, monounsaturated and *trans* fatty acids, and reduction polyunsaturated fatty acids. For the fried foods, after the cooking process, there was, generally, an increase of fat content in samples. The fatty acid profile of the foods was altered by frying, with increase of polyunsaturated and *trans* fatty acids. The results of biological assay does not indicate significant differences in weight gain and lipid absorption by the animals. The fatty acid profile of the hepatic tissue did not differ among groups. The histological analysis indicated alterations in the hepatic structure of the animals, with significant amount of esteatosis in the tissue of animals that feed the oil with 23h28min of use. The results indicate that, even though the used oil did not reach the maximum limits of chemical degradation, its consumption by Wistar rats in normolipidical diets was enough to promote histological alterations in animals' livers.

1. INTRODUÇÃO

O processo de fritura por imersão é amplamente utilizado em todo o mundo para a produção de alimentos e as características desenvolvidas pelos produtos fritos são interessantes, tanto para os produtores, como para os consumidores dos alimentos.

As modificações ocorridas na sociedade moderna, como as longas jornadas de trabalho e as grandes distâncias a serem percorridas, modificaram o hábito alimentar, e, atualmente, um grande número de pessoas opta por realizar suas refeições fora do lar, em unidades de alimentação e nutrição. Estes estabelecimentos utilizam o processo de fritura com frequência no preparo dos alimentos.

Durante o processo de fritura, ocorre a exposição do óleo às altas temperaturas, à umidade proveniente do alimento e ao ar, e este óleo sofre várias alterações químicas que prejudicam a sua qualidade. O grau das alterações sofridas pelo óleo varia em função do tempo de aquecimento, da temperatura utilizada, do tipo de gordura e das características do alimento que está sendo processado.

Os compostos de degradação formados pela utilização excessiva do óleo apresentam toxicidade e podem ser prejudiciais à saúde do consumidor. Durante o processo de cocção, os compostos de degradação do óleo são absorvidos pelos alimentos e com isso, são consumidos associados a este. Para que estes compostos de degradação não cheguem ao consumidor dos alimentos fritos, é importante avaliar o ponto de degradação do óleo e correlacionar o grau de degradação atingido aos danos que este pode causar quando consumido.

Para a avaliação destes efeitos tóxicos, grande parte dos estudos realizados utiliza gordura termicamente oxidada em condições de laboratório. Essa avaliação nem sempre reflete a realidade do processo de fritura, pois, muitas vezes, o óleo avaliado é aquecido sem a presença do alimento, ou em condições que não se assemelham à utilização do óleo em uma unidade de alimentação.

A partir disso, torna-se importante acompanhar o processo de fritura de alimentos em uma unidade de alimentação e nutrição e avaliar os efeitos metabólicos desencadeados pelo consumo deste óleo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. FRITURA POR IMERSÃO

O processo de fritura por imersão em óleo é largamente difundido e utilizado para a cocção de alimentos em todo o mundo. Sua ampla utilização na indústria se dá pelo grande apelo comercial, rapidez da cocção e variedade de produtos produzidos. Para os consumidores, os atributos principais são as características sensoriais agradáveis de odor, sabor, cor e textura, que tornam o alimento mais atraente para o consumo (BATTINO et al., 2002; CELLA et al., 2002; SAGUY e DANA, 2003; ROMERO et al., 2006).

Neste tipo de fritura, o alimento é imerso em óleo aquecido, que promove a troca de calor com o alimento. A fritura possui três características principais, que a difere dos outros métodos de cocção (SAGUY e DANA, 2003):

- I. Alta temperatura do óleo de cocção (entre 160 e 180 °C), que permite um curto tempo de cocção pela rápida transferência de calor;
- II. Temperatura moderada no centro do alimento (até 100 °C) e
- III. Perda mínima de componentes hidrossolúveis do alimento.

Como resultado, o alimento adquire algumas características sensoriais desejáveis, em função de reações decorrentes do aquecimento e contato com o óleo: a saída de água do alimento pela formação de vapor; a absorção de óleo, que penetra no alimento pelos canais formados pela passagem do vapor; a desidratação da superfície do alimento, com formação de crosta e o desenvolvimento da coloração dourada como resultado da reação de *Maillard* (SAGUY e DANA, 2003; ORTHOEFER e LIST, 2007a).

2.2. ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO DE FRITURA

Durante a fritura, o óleo sofre diversas reações químicas, que geram uma grande variedade de compostos de diferentes pesos moleculares e polaridade (DOBARGANES e MARQUEZ-RUIZ, 2007). As principais reações de degradação ocorridas no óleo de fritura são a hidrólise, a oxidação e a polimerização, descritas a seguir.

2.2.1. HIDRÓLISE

O vapor de água liberado pelo alimento durante o processo de fritura, ao entrar em contato com o triacilglicerol, ataca a ligação éster entre o glicerol e o ácido graxo, rompendo-a e formando monoacilgliceróis, diacilgliceróis, gliceróis e ácidos graxos livres (**Figura 2.1**). A quebra de ligação ocorre preferencialmente em ácidos graxos de cadeias menores, devido à sua maior polaridade, e conseqüentemente, maior afinidade com a água (CHOE e MIN, 2007). A molécula de glicerol volatiliza a partir de 150°C, com isso o equilíbrio da reação é deslocado em favor da hidrólise, aumentando assim sua ocorrência (NAZ et al., 2005). Os ácidos graxos

liberados fazem parte do *flavor* do óleo de fritura e dos produtos fritos, porém, a maior parte dos ácidos graxos livres e do glicerol é volatilizado e carregado, pela ação do vapor de água (PERKINS, 2007).

O glicerol e os ácidos graxos livres que permanecem no óleo aceleram a hidrólise de outros triacilgliceróis (CHOE e MIN, 2007). Além disso, o glicerol resultante da hidrólise pode ser oxidado a ácido acrílico e reagir com amônia para a formação de acrilamida (MESTDAGH et al., 2007).

A acrilamida é formada durante o processamento térmico de alimentos ricos em carboidratos, e, geralmente, a sua formação está relacionada à reação de Maillard. As moléculas de açúcares redutores e o aminoácido asparagina são os principais precursores da acrilamida. Uma outra via para a sua formação é a oxidação do glicerol (MESTDAGH et al., 2007). A quantidade de acrilamida presente em produtos fritos tem sido estudada devido a sua acumulação nos alimentos, em especial em alimentos ricos em amido e açúcar, como batatas (CARERE, 2006; WICKLUND et al., 2006).

Vários efeitos tóxicos são relacionados à acrilamida, como a carcinogenicidade, genotoxicidade, neurotoxicidade e distúrbios reprodutivos (CARERE, 2006), e não foram estabelecidos ainda limites seguros para o consumo desta substância (WICKLUND et al., 2006). Desta forma, a presença deste composto no óleo de fritura e nos alimentos fritos é preocupante e deve ser evitada.

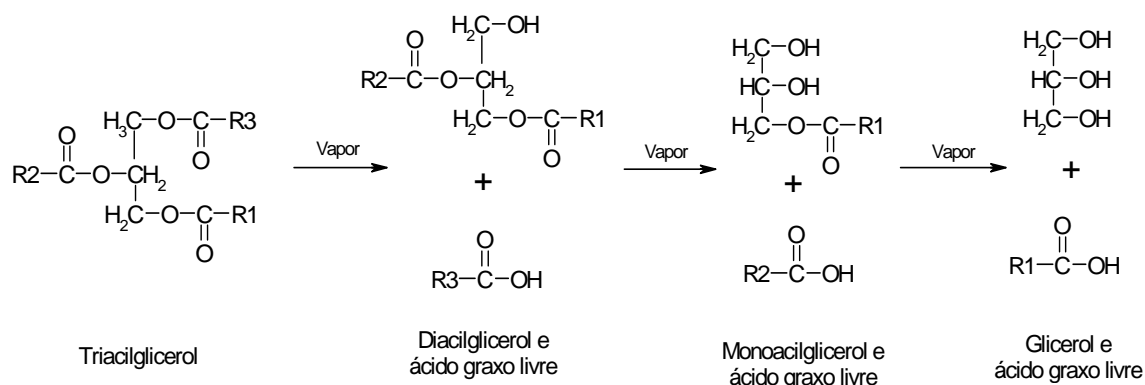


Figura 2.1: Reações de hidrólise ocorridas no triacilglicerol durante o processo de fritura. (Adaptado de PERKINS, 2007).

2.2.2. OXIDAÇÃO

Outra alteração que ocorre no óleo de fritura, que é de extrema importância para a qualidade nutricional dos alimentos, é a oxidação dos lipídeos. O processo de oxidação lipídica se dá em três etapas, iniciação, propagação e terminação, com formação de vários compostos intermediários, conforme ilustrado na **Figura 2.2**.

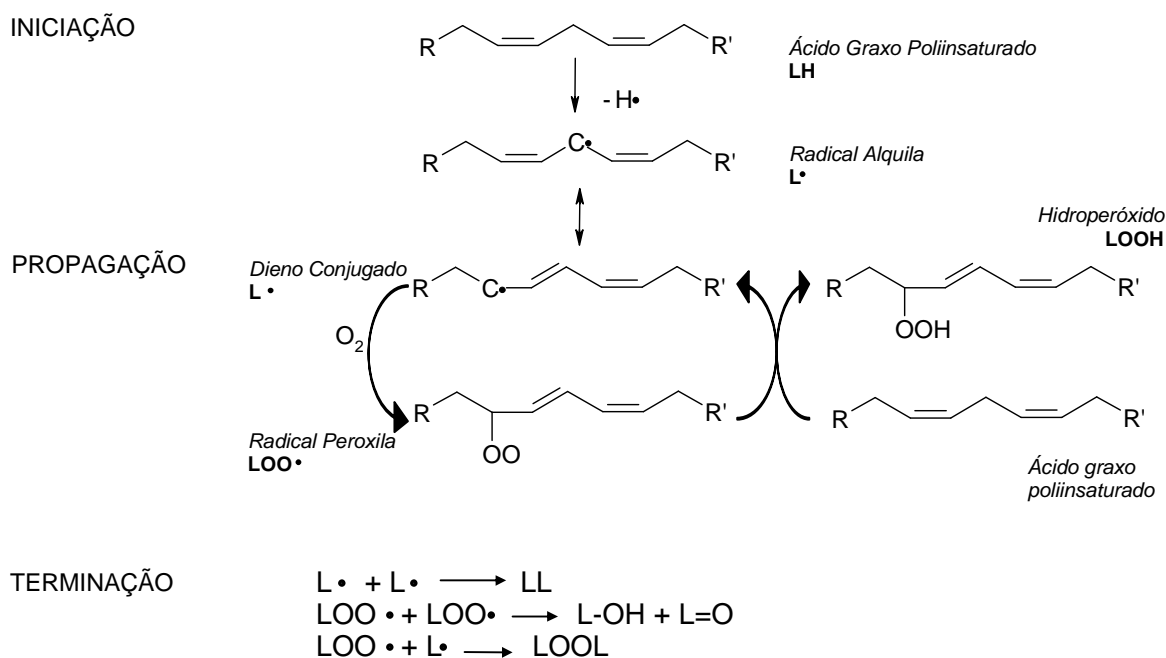


Figura 2.2: Esquema das etapas do processo de auto-oxidação de lipídeos (Adaptado de LIMA e ABDALLA, 2001).

O processo de auto-oxidação e oxidação térmica ocorrem, em sua maior parte, em lipídios poliinsaturados, principalmente o ácido linoléico (C18:2) e o ácido linolênico (C18:3), quando estes são expostos ao oxigênio e altas temperaturas. Além disso, a oxidação catalisada por metais (ferro, manganês, cobre, cobalto, chumbo, níquel e zinco) também pode ocorrer, quando há presença destes no meio de fritura, seja no óleo, no alimento ou no equipamento utilizado (PERKINS, 2007).

O radical *triplet* do oxigênio presente no ar não reage diretamente com o óleo, a não ser que as moléculas de ácidos graxos já estejam também em sua forma radical. Para isso, um átomo de hidrogênio de ligação mais fraca com carbono na cadeia do ácido graxo é removido para a formação do radical. No ácido linoléico, por exemplo, a ligação hidrogênio-carbono que necessita de menos energia para o rompimento está localizada no carbono 11, situado entre os carbonos das duas ligações duplas. Deste carbono, então, é extraído o hidrogênio e formado o radical alquila, que inicia a fase de propagação da oxidação de lipídios. As diferentes forças de ligação entre os átomos de carbono e hidrogênio nas moléculas explicam as velocidades de oxidação dos diferentes ácidos graxos, em função do comprimento da cadeia e da presença ou não de duplas ligações (CHOE e MIN, 2007).

Devido à alta temperatura durante o processo, os hidroperóxidos formados na oxidação dos lipídios em fritura são rapidamente transformados em outros compostos. A decomposição de hidroperóxidos gera alcanos, alquenos, aldeídos (monoinsaturados e di-insaturados), cetonas e metil-cetonas. São formadas também lactonas e pentil-furanos e na fritura de batatas, são formados pirazinas (PERKINS, 2007). Os compostos formados pela quebra dos hidroperóxidos possuem baixo peso molecular, sendo, portanto, voláteis. Por isso, não são o

principal enfoque no estudo do processo de fritura do ponto de vista nutricional, pois não se mantêm no óleo e nem são retidos nos alimentos (MARQUEZ-RUIZ e DOBARGANES, 2007).

2.2.3. POLIMERIZAÇÃO

Apesar da presença dos compostos voláteis formados na oxidação de lipídios ser muito importante para a qualidade e *flavor* de produtos fritos, sua presença nos óleos ocorre em concentrações muito baixas. Os compostos de degradação encontrados em concentrações maiores no óleo são os compostos polares não voláteis e os derivados da polimerização de ácidos graxos livres e triacilgliceróis (CHOE e MIN, 2007) (**Figura 2.3**).

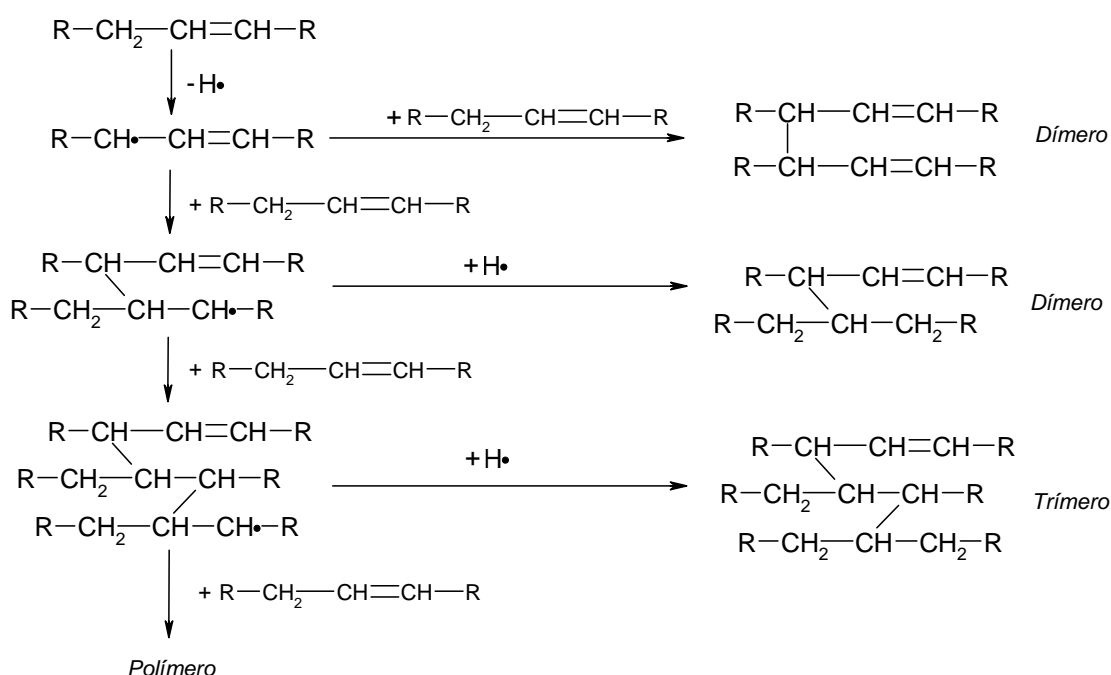


Figura 2.3: Reações de polimerização acíclica do ácido oléico (Adaptado de CHOE e MIN, 2007).

Dependendo da reação ocorrida e do tipo de óleo utilizado, os dímeros e polímeros formados podem ser cíclicos ou acíclicos. A formação de monômeros e polímeros cíclicos está diretamente relacionada à quantidade de ácido linolênico presente no óleo. A ciclização ocorre de forma expressiva em temperaturas entre 200° e 300°C e a quantidade de monômeros cíclicos formada é significativa quando o óleo apresenta mais de 20% de ácido graxo linolênico. A fritura com óleo de soja produz dímeros bicíclicos e tricíclicos do linoleato, bem como monômeros cíclicos (CHOE e MIN, 2007).

2.3. MÉTODOS DE ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES NO ÓLEO DE FRITURA

Cada vez mais os estudos têm indicado os efeitos prejudiciais do consumo de óleo degradado. Algumas alterações podem ser facilmente observadas, como alterações de cor, viscosidade e formação de espuma no óleo, e alterações de cor, textura e sabor dos alimentos

(WHITE, 1991). Entretanto, essas avaliações são subjetivas e as alterações visíveis surgem tardiamente em relação às alterações químicas. Para garantir que o óleo de fritura esteja adequado para consumo, vários testes com maior ou menor complexidade podem ser realizados. Estes testes avaliam a presença de produtos de degradação e as alterações sofridas pelo óleo. Em recente revisão, ORTHOEFER e LIST (2007b) reuniram alguns métodos de avaliação do excesso de utilização do óleo de fritura (**Quadro 2.1**).

Quadro 2.1: Métodos de análise de qualidade do óleo utilizado para fritura – Primeira parte.

Método	Princípios do método e características
Métodos tradicionais	
Cor	O óleo escurece na medida em que é utilizado. Pode ser medido com <i>kits</i> ou através do tintômetro Lovibond. Deve ser associado a outros métodos.
Ácidos graxos livres	Com as reações de hidrólise e oxidação, ácidos graxos livres são liberados no meio de fritura.
Presença de espuma	Óleos degradados formam quantidades excessivas de espuma que quando não dispersam indicam que o óleo deve ser descartado.
Ponto de fumaça	O ponto de queima do óleo diminui na medida em que sofre degradação, pelo aumento da presença de compostos de baixo peso molecular.
Viscosidade	A viscosidade do óleo aumenta com a formação de compostos de alto peso molecular, como os polímeros.
Métodos padrão	
Compostos polares	Avalia a formação de compostos com polaridade mais alta que os triacilgliceróis.
Ácidos graxos oxidados	Mede a presença de ácidos graxos oxidados, que são insolúveis em éter de petróleo.
Dienos conjugados	Mede a formação de intermediários da oxidação do óleo de fritura. Pode ser medido por absorvância em 232 nm, Teor de compostos carbonila e Índice de <i>p</i> -Anisidina.
Perfil de ácidos graxos	Avalia a modificação dos ácidos graxos em decorrência do processo de fritura.
Testes rápidos	
Constante dielétrica	O aumento do teor de compostos polares promove alterações na constante dielétrica do óleo, A constante dielétrica correlaciona-se bem com o teor de ácidos graxos livres, com compostos polares, com o índice de peróxidos e dienos conjugados.
Testes colorimétricos	Utiliza a alteração de cor de uma substância indicadora de pH para indicar a alteração no óleo.
Fitas para testes	Determina ácidos graxos livres. Correlaciona-se em 0,89 com o método titulométrico de análise do teor de ácidos graxos livres (índice de acidez)
Métodos complexos	
Cromatografia gás-liquido	Separa e quantifica dímeros formados por oxidação ou por aquecimento, além de monômeros cíclicos de ácidos graxos.
Cromatografia de exclusão molecular	Os compostos de baixo peso molecular formados no óleo podem ser separados em função da diferença de tamanho molecular entre eles. Sua desvantagem é o longo tempo de análise.

Fonte: ORTHOEFER e LIST, 2007b

Além dos métodos já descritos, existem alguns outros que também são utilizados para determinar a qualidade do óleo utilizado para fritura e que estão descritos no **Quadro 2.2**.

Quadro 2.2: Métodos de análise de qualidade do óleo utilizado para fritura – Segunda parte.

Método	Princípio do método e características
Índice de iodo (Cd 1-25 – AOCS)	É uma medida do grau de insaturação do óleo, pela titulação de iodo ativo. O grau de insaturação do óleo diminui em função da utilização em fritura.
Índice de peróxido (Cd 8-53 – AOCS)	Determina a presença de substâncias capazes de oxidar o iodeto de potássio nas condições do teste. Avalia a formação de compostos primários de oxidação
Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Cd 19-90 – AOCS)	Mede a presença de compostos secundários de oxidação (aldeídos). A reação do aldeído com o ácido tiobarbitúrico forma um composto que absorve luz em 530nm.
Índice de estabilidade do óleo – <i>Rancimat</i> (Cd 12b-92 – AOCS)	Baseia-se no estímulo da oxidação do óleo por um fluxo de ar e a quantificação é feita pela condutividade elétrica dos produtos voláteis de degradação. Estabilidade oxidativa de um óleo: tempo necessário para se atingir um nível detectável de rancidez ou uma drástica mudança na taxa de oxidação (tempo de indução).

Fonte: AOCS, 1994

2.4. LIMITES DE UTILIZAÇÃO PARA ÓLEOS DE FRITURA

Em função dos efeitos indesejados da utilização excessiva de óleos em fritura, existe a necessidade de que limites sejam estipulados para que a saúde dos consumidores seja preservada. No Brasil, apesar da orientação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária para utilização do óleo de fritura de acordo com as Boas Práticas de Fabricação, ainda não existe uma recomendação de limites de utilização ou degradação para óleos de fritura (ANVISA, 2004).

Para a regulação da utilização de óleos de fritura, alguns países determinaram os pontos de descarte dos óleos, a partir da medição de alguns dos índices já apresentados. FIRESTONE (2007) reuniu as informações sobre a regulação de utilização de óleos de fritura em todo o mundo. Em geral as recomendações são para os limites de utilização, porém, Bélgica e França recomendam também que os óleos para fritura contenham menos de 2% de ácido linolênico (C18:3). As informações sobre estes limites são apresentadas no **Quadro 2.3**.

2.5. DESCARTE DO ÓLEO DE FRITURA: IMPACTOS AMBIENTAIS

Como visto, a utilização de óleos e gorduras como meio de fritura promove várias reações químicas, cujos produtos tornam o meio de fritura impróprio, impedindo sua utilização por períodos muito longos. O descarte do meio de fritura torna-se então, uma preocupação para o estabelecimento produtor de alimentos, devido ao impacto ambiental que pode gerar.

Quadro 2.3: Limites de utilização do óleo de fritura em diferentes países.

País	Temperatura de fritura (°C)	Dímeros e polímeros de triacilgliceróis (%)	Índice de acidez (%)	Ponto de fumaça (°C)	Teor de compostos polares (%)	Índice de iodo (% de iodo absorvido)	Ácidos graxos oxidados	Compostos carbonila (µM/g)	Composição do óleo para fritura
Áustria	Abaixo de 180°		2,5	170°	27%		1%		
Bélgica	Abaixo de 180°	10%	2,5	170°	25%				2% de ácido linolênico
Rep. Tcheca		10%			25%				
França					25%				2% de ácido linolênico
Alemanha			2,5	170°	24%		1%		
Hungria	160° a 180°			180	30%				
Itália	Abaixo de 180°				25%				
Japão			2,5	170°				50	
Países baixos		16	4,5						
Finlândia			2	180	25%	16*			
Espanha					25%				
Suíça				170	27%				
EUA	Abaixo de 190°		2						

*Redução de 16 unidades no Índice de iodo entre o óleo fresco e o oxidado.

O descarte inadequado de gorduras acarreta o desperdício de potencial energético do óleo, e quando este é realizado no sistema de esgotamento doméstico ou dos estabelecimentos produtores de alimentos, gera impactos ambientais como a poluição de água, tornando-a imprópria para utilização e consumo e a sobrecarga nas estações de tratamento de esgoto (FELIZARDO et al., 2006).

Frequentemente, os óleos de descarte são utilizados para alimentação animal, porém, os efeitos indesejáveis do consumo de óleo de fritura degradado podem atingir indiretamente o consumidor final pelo consumo de produtos derivados destes animais. Portanto, este é um destino inadequado para o óleo quando os animais ou derivados são destinados ao consumo humano (COSTA-NETO et al., 2000).

No Brasil, não existe regulamentação para o descarte de óleo de fritura. Os esforços para a redução do impacto ambiental do descarte inadequado do óleo são realizados por organizações não-governamentais. Para a redução deste impacto ambiental, existem algumas possibilidades de reaproveitamento do resíduo do processo de fritura, como a produção de sabões, de massa para fixação de vidros, e, em especial, a produção de biocombustíveis. A redução do impacto ambiental pela utilização destes óleos como biocombustível é multiplicado: ocorre a redução da utilização de fontes de energia não renováveis, a substituição por fonte de energia renovável e a redução da contaminação do ambiente com o descarte de um produto poluente.

2.6. IMPACTOS NUTRICIONAIS DO PROCESSO DE FRITURA

As diversas modificações ocorridas no óleo de fritura e nos alimentos nele processados resultam em alterações no teor e na digestibilidade de alguns nutrientes, o que conduz a diferenças importantes no valor nutricional dos mesmos.

2.6.1. IMPACTOS NUTRICIONAIS SOBRE O ÓLEO DE FRITURA

VITAMINA E

Os óleos vegetais são importantes fontes de vitamina E. A ação desta vitamina no organismo é, principalmente, a regeneração de radicais peroxil, transformando-os em hidroperóxidos e impedindo oxidação dos lipídios. A reação do radical peroxil com a vitamina E ocorre cerca de 1.000 vezes mais rápido que sua reação com os ácidos graxos poliinsaturados. Por sua ação antioxidante, a vitamina E impede a oxidação de LDL no organismo humano, prevenindo a aterosclerose, além de outros mecanismos protetores (IOM, 2000).

Os compostos α -, β -, γ - e δ - tocoferóis e tocotrienóis são designados como isômeros da vitamina E, sendo que a atividade desta vitamina era medida em equivalentes de α -tocoferol, em função das diferentes atividades de cada isômero. No ano 2000 foi realizada a atualização das recomendações nutricionais, e a partir desta data, em virtude da dificuldade em se determinar a capacidade vitamínica de cada isômero, convencionou-se considerar somente o conteúdo de α -tocoferol dos alimentos para avaliação do suprimento das necessidades nutricionais de humanos (IOM, 2000). Apesar de somente o α -tocoferol ser considerado para o

suprimento das necessidades nutricionais, as funções dos demais isômeros não devem ser desconsideradas.

O γ -tocoferol é o isômero presente em maior concentração em alguns óleos vegetais, inclusive no óleo de soja (JIANG et al., 2001). Alguns estudos têm encontrado que este isômero é o maior responsável pela proteção de óleos de fritura contra a oxidação, e por isso, são observadas maiores perdas de γ -tocoferol nos óleos de fritura em relação aos demais isômeros. A presença de γ -tocoferol em óleos está relacionada à maior estabilidade durante o processo de fritura e à menor formação de compostos de oxidação durante o armazenamento do produto frito (NORMAND et al., 2001; WARNER et al., 2003).

Para o α -tocoferol, também é observada perda na concentração em função da utilização de óleos para a fritura. Porém é observada uma perda menor deste isômero durante o processo, sendo creditada aos demais isômeros a capacidade de proteger também o α -tocoferol da oxidação pela fritura (ROSSI et al., 2007).

ÁCIDOS GRAXOS

As reações ocorridas no óleo durante o processo de fritura têm como consequência a formação de moléculas diferentes das originais, e que podem exercer efeitos tóxicos. Entretanto, as modificações também resultam em alterações estruturais nas moléculas presentes, o que acarreta alterações no perfil de ácidos graxos do óleo após as frituras.

As alterações ocorridas na composição de ácidos graxos dos óleos de fritura resultam especialmente das reações de oxidação das duplas ligações presentes nos óleos. Com isso, quanto maior o número de insaturações, mais susceptível à degradação o ácido graxo se torna. Da mesma forma, quanto maior o conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados em um óleo, este é mais propenso à degradação durante o processo de fritura (DANIEL et al., 2005). Desta maneira, o perfil de ácidos graxos de um óleo pode ser um indicador de sua estabilidade e performance durante o processo de fritura (XU et al., 1999).

De forma geral, o processo de fritura por imersão resulta em redução do teor de ácidos graxos poliinsaturados e aumento no teor de ácidos graxos saturados. Por sua menor capacidade oxidativa, os ácidos graxos monoinsaturados são mais estáveis durante o processo de fritura, sendo que o teor de monoinsaturados nos óleos utilizados para fritura se mantém ou sofre pequenas reduções após o processo (TYAGI e VASISHTHA, 1996; XU et al., 1999; HOUHOULA et al., 2002; DANIEL et al., 2005).

Os ácidos graxos essenciais, cujas principais fontes são os óleos vegetais (KRIS-ETHERTON et al., 2000), também têm seus teores reduzidos em função do processo de fritura. As reações de oxidação afetam o conteúdo destes ácidos graxos, com redução do seu conteúdo no óleo após o processo de fritura (SANIBAL e MANCINI FILHO, 2004a). Alguns países têm como recomendação, inclusive, que o teor de ácido linolênico no óleo a ser utilizado para fritura seja menor que 2%, devido à sua grande instabilidade, sendo este ácido graxo o que apresenta maiores perdas devido ao processo (HOUHOULA et al., 2002; FIRESTONE, 2007).

Os ácidos graxos *trans* são moléculas derivadas da isomerização de ácidos graxos *cis* em decorrência do aquecimento de óleos e gorduras. Alguns estudos têm evidenciado os efeitos deletérios do consumo destes ácidos graxos na dieta humana. O processo de fritura promove a formação e o aumento significativo destas moléculas no óleo, sendo que seu teor aumenta em função da quantidade de horas de utilização (ROMERO et al., 2000; SANIBAL e MANCINI FILHO, 2004b).

2.6.2. IMPACTOS NUTRICIONAIS SOBRE OS ALIMENTOS:

Como visto anteriormente, o processo de fritura apresenta algumas características que o difere consideravelmente de outros processos de cocção. Essas características resultam em alterações nutricionais importantes no alimento. Os aspectos nutricionais do processo de cocção de alimentos por imersão em óleo já estão esclarecidos e consolidados. Em uma revisão, FILLION e HENRY (1998) reuniram as principais alterações sofridas pelos nutrientes em função do processo de fritura, que estão descritas no **Quadro 2.4**.

Quadro 2.4: Alterações nos nutrientes presentes no alimento em função do processo de fritura.

Nutriente	Alterações
Carboidratos	Em batatas fritas, ocorre a formação de amido resistente, consequentemente, o processo de fritura pode aumentar o teor de fibra alimentar. A formação deste composto pode ser atribuída, em parte, pela formação de complexos entre a amilose e lipídios.
Proteínas	A fritura não traz alterações consideráveis na composição protéica dos alimentos.
Lipídios	Os alimentos fritos absorvem os lipídios do meio de processamento. Consequentemente, a alteração nos alimentos se dá tanto no teor lipídico, como na sua composição, que passa a apresentar também os ácidos graxos provenientes do meio de fritura. Como exceção, os alimentos crus com alto teor lipídico como as carnes, têm menor capacidade de perda de água, o que dificulta a absorção lipídica.
Colesterol	O teor deste nutriente pode variar nos alimentos fritos em função do tipo de gordura utilizada como meio de cocção. No caso de gorduras vegetais, não há aumento no conteúdo de colesterol nos alimentos, pela ausência deste nutriente no meio de fritura. Porém, se o alimento frito contiver colesterol, pode haver perda do conteúdo, com parte do colesterol sendo transferido para o meio de fritura. Quando o meio de cocção for gordura animal, cujo conteúdo de colesterol é considerável, há um aumento deste no alimento após o processo de cocção.
Vitaminas hidrossolúveis	Em comparação aos outros meios de cocção como cocção em forno e por calor úmido, o processo de fritura apresenta menor perda de vitaminas hidrossolúveis, tanto pela temperatura relativamente baixa no alimento como pela baixa polaridade do meio, que impede as perdas de compostos hidrossolúveis por lixiviação.
Vitaminas lipossolúveis	Em relação aos carotenóides, o conteúdo nos alimentos pode diminuir pela ação de lixiviação no meio. Porém, como os óleos vegetais usados em fritura normalmente apresentam alto teor de vitamina E, o alimento, por absorção do óleo de fritura, tem seu conteúdo de vitamina E aumentado.
Minerais	O conteúdo mineral dos alimentos é minimamente afetado pela fritura.

2.7. IMPACTOS NUTRICIONAIS E METABÓLICOS DO CONSUMO DE ÓLEO DE FRITURA E DE ALIMENTOS FRITOS

Vários dos compostos formados no óleo durante o processo de fritura possuem propriedades tóxicas e os efeitos destes compostos são estudados há pelo menos 50 anos.

Para a avaliação da qualidade do óleo após aquecimento e dos efeitos tóxicos dos compostos produzidos, nem sempre os estudos avaliam óleos utilizados para fritura. Em alguns casos os óleos são submetidos somente ao aquecimento (OWU et al., 1998) ou ao aquecimento com borbulhamento de ar (BESBES et al., 2005). No caso do óleo de fritura, o processo pode ser realizado em laboratório (LIU e HUANG, 1995) ou os óleos podem ser coletados em indústrias ou restaurantes (LIAO et al., 2005).

Para avaliar as diferenças entre óleos utilizados para fritura e óleos termicamente oxidados, HOUHOULA e colaboradores (2002) utilizaram vários índices de avaliação de qualidade do óleo para comparar amostras de óleo submetidas a aquecimento e ao processo de fritura em diferentes temperaturas. Dos índices avaliados, somente os valores do Índice de *p*-Anisidina diferiram significativamente entre as amostras de óleo aquecido ou utilizado para fritura. Este índice mede o teor de aldeídos no óleo, e estes são compostos voláteis. A diferença pode ser atribuída à menor possibilidade de volatilização destes componentes durante o aquecimento do óleo em relação ao processo de fritura.

Os estudos para avaliação dos efeitos deletérios do consumo de óleos de fritura, em sua maior parte, são realizados em roedores. Em humanos, são encontrados na literatura estudos epidemiológicos para a associação do consumo de frituras com variáveis antropométricas e de saúde, além de alguns estudos experimentais.

Comumente, o consumo de óleo termicamente degradado ou utilizado para fritura tem sido relacionado às alterações no metabolismo lipídico no fígado, às alterações no metabolismo de lipoproteínas e às alterações histológicas no tecido hepático.

O **Quadro 2.5** resume alguns resultados descritos na literatura sobre os efeitos do consumo de óleo de fritura em animais.

Alguns estudos têm apontado os óleos termicamente oxidados como proliferadores de peroxissomos (PP), que atuam como ligantes de PPAR α (Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos da classe α) (CHAO et al., 2001; SÜLZLE et al., 2004; CHAO et al., 2005; CHAO et al., 2007).

Os peroxissomos são compartimentos celulares envoltos por membrana onde ocorrem as reações da β -oxidação dos ácidos graxos, com formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A formação de peroxissomos pela célula pode ser estimulada por um grupo de compostos chamados PP. Essas substâncias ativam um grupo de proteínas denominadas PPAR (do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor* – em português: receptor ativado por proliferador de peroxissomos), que estimulam a produção de peroxissomos e aumentam a transcrição de várias enzimas responsáveis pela oxidação dos ácidos graxos.

Quadro 2.5: Efeito do consumo de óleos de fritura ou óleos termicamente oxidados em animais.

Tipo de óleo analisado	Tratamento térmico	Modelo animal	Quantidade de óleo na dieta	Tempo de estudo	Resultado encontrado	Referência
Óleo de oliva virgem	Frituras descontínuas em laboratório	Ratos Wistar	8%	8 semanas	O consumo dos óleos alterou a estrutura e a função de mitocôndrias do tecido hepático.	BATTINO et al., 2002.
Óleo de soja	Equivalente ao utilizado para fritura em indústria de alimentos	Ratos SHR/NDmc-cp*	7%	8 semanas	Os animais apresentaram níveis séricos elevados de glicose, triacilgliceróis e ácidos graxos livres. Foram encontrados danos nas células epiteliais do túbulo renal e acúmulo de gordura no tecido hepático.	TOTANI et al., 2006b.
Óleo de girassol	Aquecimento em laboratório por 10h a 220°C e fritura	Ratos Wistar	10%	3 a 5 semanas	Aumento da atividade do sistema da glutathione peroxidase indica a importância deste sistema na eliminação de compostos tóxicos provenientes dos óleos	SAKA et al., 2002.
Mistura de óleo de girassol e banha	Aquecimento em laboratório em diferentes tempos e temperaturas	Ratos Sprague-Dawley	5 a 10%	6 a 8 semanas	O consumo do óleo oxidado suprimiu a expressão gênica de enzimas lipogênicas no fígado	EDER et al., 2003b
Óleo de soja	Frituras descontínuas em laboratório	Ratos Sprague-Dawley	20%	5 a 6 semanas	O consumo de óleo de fritura reduziu a adipogênese e aumentou a intolerância à glicose	CHAO et al., 2007
Óleo de soja	Frituras descontínuas em laboratório	Ratos Sprague-Dawley	5 a 20%	6 semanas	O aumento da expressão de alguns genes no fígado indica que o óleo oxidado causa a ativação de PPAR α ** e altera a expressão de enzimas do metabolismo lipídico em ratos	CHAO et al., 2001
Óleo de girassol	Frituras descontínuas em laboratório	Ratos Wistar	15%	27 dias	Houve aumento de colesterol e fosfolípidos no plasma e aumento na peroxidação das lipoproteínas plasmáticas e no fígado dos animais.	GARRIDO-POLONIO et al., 2004.
Mistura de óleo de girassol e banha	Aquecimento em laboratório em diferentes tempos e temperaturas	Ratos Sprague-Dawley	10%	8 a 9 semanas	Houve aumento na susceptibilidade das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) à oxidação, porém não houve aumento da captação destas lipoproteínas pelos macrófagos.	EDER et al., 2003a

*Modelo animal obeso e espontaneamente hipertenso e diabético. ** PPAR α : Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos da classe α .

O sistema PPAR tem papel importante na regulação de vias metabólicas relativas ao balanço energético (metabolismo lipídico, gliconeogênese e termogênese) e se relaciona com a produção de citocinas envolvidas no processo inflamatório, no controle do crescimento e diferenciação celular normal e na proliferação celular em neoplasias (UAUY et al., 2000).

A denominação de PP é atribuída a um grupo de moléculas como drogas hipolipidêmicas, pesticidas e outros compostos que geram um aumento no número ou no tamanho dos peroxissomos no fígado. Associada a proliferação dos peroxissomos ocorrem também hepatulias, menor peso corporal e aumento da expressão de genes relacionados à oxidação de lipídeos (CHAO et al., 2005).

Devido à variedade de compostos formados durante o processo de fritura, torna-se difícil atribuir esse efeito de ativação de PPAR α especificamente a uma molécula. Entretanto, MARTIN e colaboradores (2000) estudaram a capacidade dos monômeros cíclicos de ácidos graxos formados durante o aquecimento do óleo funcionarem como PP. Foi encontrado que esses compostos são capazes de alterar o metabolismo lipídico e gerar uma resposta fenotípica de proliferação de peroxissomos, sugerindo que monômeros cíclicos de ácidos graxos podem ser responsáveis pela capacidade do óleo termicamente oxidado de ativar PPAR α .

Em humanos, os estudos sobre os efeitos do consumo de óleo degradado são menos freqüentes. Alguns estudos epidemiológicos foram realizados, buscando associações entre o consumo de alimentos fritos com a obesidade. TAVERAS e colaboradores (2005) encontraram, em seu estudo nos EUA, que, entre os indivíduos no final da adolescência, o aumento no consumo fora de casa de alimentos fritos está relacionado ao ganho de peso excessivo. Na Espanha, GUALLAR-CASTILLÓN e colaboradores (2007) observaram que entre os indivíduos que estão no quintil mais alto do consumo de energia proveniente de alimentos fritos, a ingestão destes alimentos está relacionada à presença de obesidade central e abdominal.

Em um interessante estudo, SORIGUER e colaboradores (2003) investigaram a relação entre a qualidade do óleo para fritura doméstica com o risco de hipertensão arterial. Os resultados indicam que a hipertensão arterial está relacionada com o consumo de óleos com altos teores de compostos polares. A correlação deste índice de qualidade do óleo de fritura e o desenvolvimento de uma enfermidade enfatiza ainda mais a importância da avaliação da qualidade do óleo de fritura durante o processamento e do controle da utilização deste meio de cocção.

Em estudos experimentais com humanos, nos quais os pacientes foram avaliados após a ingestão de refeições preparadas com óleos oxidados, já foram encontrados resultados como a redução na dilatação arterial (WILLIAMS et al., 1999), e o aumento da susceptibilidade de lipoproteínas à oxidação (SUTHERLAND et al., 2002). Foi encontrado também que após refeições que continham óleos termicamente tratados, pacientes diabéticos com controle glicêmico inadequado apresentaram níveis elevados de lipídeos oxidados nos quilomícrons, o que pode representar maior risco de doenças cardiovasculares (STAPRANS et al., 1996).

A maior parte dos estudos em humanos relaciona o consumo de óleo de fritura e alimento fritos ao risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, porém, outros efeitos podem também estar relacionados, como a carcinogênese, a teratogênese e a ocorrência de gastropatias (GROOTVELD et al., 2001). Outros estudos são necessários para que os efeitos do consumo destes alimentos sejam esclarecidos.

Além dos efeitos deletérios da ingestão de moléculas tóxicas presentes no óleo de fritura, o consumo deste tipo de óleo nos alimentos fritos também traz conseqüências nutricionais importantes para a ingestão de ácidos graxos.

Como visto anteriormente, em decorrência do processo de fritura ocorrem modificações no perfil de ácidos graxos dos óleos, o que altera também o tipo de ácido graxo presente no alimento frito. Os diferentes tipos de ácidos graxos consumidos na dieta têm reflexos diferentes no metabolismo lipídico e no risco de doenças.

Portanto, os estudos encontrados na literatura indicam que assim como a quantidade, a qualidade da gordura presente na alimentação influencia os efeitos desta na saúde, e com isso, torna-se importante a avaliação da qualidade e dos efeitos decorrentes do consumo de gorduras utilizadas em serviços de alimentação.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o nível de degradação de óleo de soja utilizado para fritura em uma Unidade de Alimentação e Nutrição e investigar os efeitos deletérios do consumo deste óleo em animais.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Acompanhar o processo de fritura por imersão em um estabelecimento produtor de refeições.
- Analisar quimicamente o óleo de fritura após cada utilização buscando avaliar as alterações ocorridas e o grau de degradação.
- Analisar as alterações no perfil de ácidos graxos do óleo após cada utilização.
- Analisar o teor de vitamina E no óleo de fritura e caracterizar a degradação da vitamina durante o processo.
- Investigar as alterações no perfil de ácidos graxos do tecido hepático de ratos alimentados com óleo de fritura.
- Investigar as alterações histológicas nos fígados dos animais em decorrência do consumo de óleo utilizado para fritura.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ACOMPANHAMENTO DO PROCESSO DE FRITURA E COLETA DE AMOSTRAS

O processo de fritura em uma Unidade de Alimentação e Nutrição Institucional foi acompanhado desde o carregamento da fritadeira até o descarte do óleo após a utilização. A temperatura durante os processos de aquecimento e utilização do óleo foi registrada com o auxílio de um termômetro (Testo 735, TestoAG). Foram coletadas amostras de óleo antes da primeira fritura e após cada utilização, em quantidade suficiente, a fim de se proceder as análises. Além disto, a cada fritura foram coletadas amostras dos alimentos crus e fritos. O óleo coletado foi armazenado sob refrigeração, em frascos âmbar, sob atmosfera de nitrogênio até as análises. Os alimentos crus e fritos coletados foram armazenados sob congelamento, em temperatura de -20 °C.

4.2 ANÁLISES DAS AMOSTRAS DE ÓLEO DE FRITURA

4.2.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO DE FRITURA

Foram realizadas as seguintes determinações no óleo coletado fresco e após cada fritura, a fim de caracterizar o seu estado de degradação:

- Índice de acidez (Método Cd 3d-63 – AOCS, 1994).
- Índice de peróxido – Método Ácido acético/Clorofórmio (AOCS Official Method Cd 8-53 – AOCS, 1994).
- Índice de iodo – Método Ciclohexano/Ácido acético (AOCS Official Method Cd 1d-92 – AOCS, 1994).
- Determinação do teor de dienos conjugados, por absorvidade em 232 nm (Ti 1a-64 – AOCS, 1994)
- Determinação do teor de compostos polares (AOCS Official Method Cd 20-91 – AOCS, 1994).
- Determinação do índice de estabilidade do óleo, através da utilização do aparelho Rancimat (*Brinkmann Instruments, USA*) (AOCS Official Method Cd 12b-92 – AOCS, 1994).

4.2.2. ANÁLISE DO TEOR DE VITAMINA E DO ÓLEO DE FRITURA

Os teores dos isômeros tocoferóis e tocotrienóis da vitamina E foram investigados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se as seguintes condições cromatográficas: sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com bomba de alta pressão, modelo LC10AD VP; injetor automático SIL-10AF com alça de amostragem de até 50 µL; coluna LiChrosorb 5 µ Si60 Phenomenex, com 250 mm de

comprimento e 4 mm de diâmetro interno; detector de fluorescência modelo RF-10A-XL programado para detecção em 290 nm de excitação e 330 nm de emissão; fase móvel composta de hexano: isopropanol (99,4:0,6), com pH 2,5 corrigido com ácido acético, em vazão de 1mL/min (GUINAZI, 2004).

As amostras de óleo foram dissolvidas em hexano, na concentração de 0,01g/mL e diretamente injetadas para a análise (GUINAZI, 2004). Para a análise quantitativa foram construídas curvas-padrão utilizando-se padrões dos isômeros da vitamina E (CALBIOCHEM®, Alemanha). Soluções com concentrações conhecidas e crescentes dos isômeros foram analisadas de forma que se obtivessem, após a análise de regressão linear, as curvas-padrão, as equações de linearidade e o coeficiente de correlação de cada curva.

4.2.3. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DAS AMOSTRAS DE ÓLEO

Para a determinação do perfil de ácidos graxos, as amostras de óleo coletadas foram esterificadas para obtenção dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, utilizando o método IUPAC Standard 2.301 (IUPAC, 1987). A identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa, comparando-se os tempos de retenção dos ésteres presentes nas amostras com os dos ésteres de ácidos graxos do padrão FAME mix (SIGMA®, EUA).

Utilizou-se um sistema para cromatografia de fase gasosa GC-17A Shimadzu/Class GC, equipado com detector de ionização de chamas e com coluna cromatográfica de sílica fundida SP-2560 (*Biscyanopropil polysiloxane*) de 100 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. As condições de programação foram: temperatura do detector: 260 °C; temperatura do injetor: 250 °C; temperatura da coluna: início em 140 °C permanecendo nesta temperatura por 5 minutos; aquecimento até 240 °C, a uma taxa de 4 °C por minuto; permanecendo nesta temperatura por 20 minutos.

O gás de arraste utilizado foi nitrogênio, com fluxo da coluna de 1,07 mL/minuto, velocidade linear de 20,01 cm/segundo, *split* de 1:20, fluxo total de 26 mL/minuto e pressão da coluna de 257 Kpa.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS

4.3.1. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS ALIMENTOS

A composição centesimal das amostras de alimentos crus e fritos foi determinada com a utilização das seguintes metodologias, descritas pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL, 2005):

- Teor de umidade: secagem em estufa a 105 °C até peso constante.
- Teor de lipídios: extração por Soxhlet, utilizando-se éter etílico. A extração foi precedida de hidrólise ácida para alimentos protéicos.

- Teor de proteínas: método de Kjeldahl.
- Teor de cinzas: incineração em mufla.
- Teor de carboidratos: obtido por diferença entre a massa de amostra e a massa somada dos demais componentes.

4.3.2. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS

Os lipídios dos alimentos crus e cozidos foram extraídos pelo método de FOLCH et al., (1957). Para a obtenção dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, os extratos lipídicos foram esterificados segundo o método IUPAC Standard 2.301 (IUPAC, 1987). As condições cromatográficas de análise utilizadas foram as mesmas descritas para a análise de ácidos graxos do óleo de fritura.

4.4. ENSAIO BIOLÓGICO

4.4.1. ANIMAIS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 24 ratos machos (*Rattus norvegicus*, var. *Albinus*, Rodentia, MAMMALIA) da linhagem “Wistar”, adultos jovens, com aproximadamente 250 g, procedentes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV e mantidos para experimentação no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável, em ambiente com temperatura controlada (21 ± 1 °C) e fotoperíodo de 12 horas.

Aos animais, foi oferecida a dieta AIN-93M (REEVES et al., 1993), em *pellets*, com 4% de lipídios. Os animais receberam água e dieta *ad libitum*, exceto nas 12 horas anteriores à eutanásia, quando foram mantidos em jejum.

Foram formados 3 grupos experimentais, com 8 animais cada, que receberam alimentação que diferia unicamente em relação ao número de horas de utilização do óleo adicionado:

- Grupo Controle (Grupo CT): os animais foram alimentados com dieta produzida com óleo de soja não utilizado em fritura.
- Grupo Teste 1 (Grupo T13): os animais foram alimentados com dieta produzida com óleo de soja utilizado para fritura por 13h38 min.
- Grupo Teste 2 (Grupo T23): os animais foram alimentados com dieta produzida com óleo de soja utilizado para fritura por 23h28min.

Durante todo o período experimental a dieta oferecida foi pesada, bem como o resto deixado pelos animais. Semanalmente os animais e as fezes produzidas eram pesados.

O tempo de estudo foi de nove semanas, dividido em uma semana de adaptação à dieta e oito semanas de experimento. Após este período foi realizada a eutanásia dos animais, por asfixia com dióxido de carbono. Os fígados foram coletados, pesados e divididos em duas partes. Uma das partes foi armazenada em -80 °C para as análises de perfil de ácidos graxos, e a outra parte foi armazenada em solução de formol tamponado (CARSON, et al., 1973) para fixação e posterior análise histológica.

4.4.2. CÁLCULO DO COEFICIENTE DE EFICÁCIA ALIMENTAR, ABSORÇÃO APARENTE DE GORDURA E ÍNDICE HEPATOSOMÁTICO

O coeficiente de eficácia alimentar (CEA) foi calculado por semana; o índice de absorção aparente de gordura (AAG) foi calculado para dois momentos do experimento, na segunda e na última semana. O índice hepatossomático (IH) foi calculado ao final do experimento. Os cálculos de CEA, AAG e IH foram realizados a partir da aplicação das seguintes fórmulas:

$$\text{CEA} = \frac{\text{ganho de peso (g)}}{\text{consumo de dieta (g)}}$$

$$\text{AAG} = \frac{\text{peso de gordura nas fezes (g)}}{\text{peso ingerido de gordura (g)}}$$

$$\text{IH} = \frac{\text{peso do fígado (g)}}{\text{peso do animal (g)}}$$

4.4.3. ANÁLISE HISTOQUÍMICA E MORFOMÉTRICA DO TECIDO HEPÁTICO

De cada grupo experimental foram escolhidos, aleatoriamente, cinco animais cujos fígados foram processados e analisados histoquímicamente. Fragmentos de tecido hepático foram fixados em solução de formol tamponado (CARSON, 1973) por uma semana após a eutanásia. Ao final desse período os fragmentos foram armazenados em solução de álcool etílico 70% em água.

Os fragmentos hepáticos foram desidratados em série etanólica crescente (70% - absoluto) e incluídos em resina à base de hidroxietilmetacrilato (Historesin[®], Leica). Secções não consecutivas de 3 µm de espessura (distantes entre si em, pelo menos, 30 µm) foram obtidas em micrótomato rotativo (RM2155, Leica) utilizando-se navalhas de vidro.

Os cortes obtidos foram corados com solução de azul de toluidina/borato de sódio 1% (BANCROFT e STEVENS, 1996). As lâminas foram imersas na solução corante por 30 segundos, lavadas em água corrente, secas em placa aquecedora e montadas em resina Entellan[®] (Merck, Alemanha).

Fragmentos de tecido hepático de dois animais aleatoriamente escolhidos nos grupos, foram fixados também com tetróxido de ósmio (OsO₄), buscando a preservação dos lipídios

para a comprovação da presença destes nas vesículas encontradas. Algumas séries histológicas foram coradas com solução de Sulfato de Azul do Nilo adaptada de BANCROFT e STEVENS (1996), para a coloração diferenciada dos lipídios. A coloração com Sulfato de Azul do Nilo foi realizada da seguinte forma:

- Coloração dos cortes em lâmina imersa em solução de Sulfato de Azul do Nilo (recém preparada) em estufa a 60 °C por três horas;
- Diferenciação em ácido acético 1% por um minuto e meio, movimentando a lâmina;
- Lavagem em água corrente e morna por 2 a 4 horas;
- Secagem da lâmina em placa aquecedora e montagem em resina Entellan® (Merck, Alemanha).

As imagens das secções histológicas foram capturadas em microscópio de luz *Olympus BX60* através de uma câmera de vídeo *Olympus Q color III* (Objetiva de 10x, projetiva de 3,3x e imagens com resolução de 1024x768 pixels).

Para a quantificação dos glóbulos de gordura foram analisados dezesseis cortes histológicos de cada animal, sendo que em cada corte foram realizadas dez fotografias em áreas distintas. Com o auxílio do software *Image-Pro Plus*, versão 4.5 (Media Cybernetics) foi aplicada sobre cada fotografia uma máscara que continha 160 pontos localizados aleatoriamente. A partir desta máscara foram contados quantos destes pontos se localizavam sobre regiões com presença de glóbulos de gordura. Os valores resultantes desta contagem foram utilizados para a comparação entre os grupos experimentais.

4.4.4. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO TECIDO HEPÁTICO

Os lipídios do tecido hepático dos animais foram extraídos pelo método de FOLCH et al. (1957). Para a obtenção dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, os extratos lipídicos foram esterificados utilizando-se o método descrito por HARTMAN e LAGO (1973). As condições cromatográficas de análise foram as mesmas utilizadas para a identificação dos ácidos graxos dos óleos.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC). As análises estatísticas foram realizadas através do programa SigmaStat, versão 2.0. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para avaliar a adequação dos dados à distribuição normal. Para comparação entre as amostras foi realizada a Análise de Variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey para a comparação múltipla das médias. Quando os dados não se adequaram à distribuição normal foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido dos testes de Tukey ou Dunn's para comparação entre as médias. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão ou em mediana.

5. ARTIGO ORIGINAL I:

QUALIDADE DO ÓLEO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE ALIMENTOS SUBMETIDOS À FRITURA POR IMERSÃO

5.1. RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações sofridas pelo óleo de fritura utilizado em uma Unidade de Alimentação e Nutrição institucional e suas conseqüências na qualidade e no perfil de ácidos graxos do óleo e dos alimentos. A rotina de fritura do restaurante foi acompanhada e amostras do óleo e dos alimentos foram coletadas a cada fritura. Nas amostras de óleo foram realizadas as seguintes determinações: índice de acidez, índice de iodo, índice de peróxidos, teor de dienos conjugados, teor de compostos polares, estabilidade oxidativa-*Rancimat*, teor de vitamina E e perfil de ácidos graxos. Nos alimentos foram determinados a composição centesimal e o perfil de ácidos graxos. Após 23h28min de fritura, observou-se que o óleo utilizado não atingiu os limites de degradação recomendados internacionalmente para descarte. Os teores dos isômeros tocoferóis apresentaram-se reduzidos entre 20 e 49,9% após a utilização do óleo. O perfil de ácidos graxos dos óleos foi alterado após as frituras, com aumento do teor de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e *trans* e redução do teor de ácidos graxos poliinsaturados. Para os alimentos, após o processo de cocção, houve aumento do teor de lipídeos nas amostras, exceto para o corte de frango, cujo teor de lipídeos reduziu após a fritura. O perfil de ácidos graxos dos alimentos também se alterou após a cocção, com aumento de ácidos graxos poliinsaturados e *trans*. Os resultados indicam que o processo de fritura estudado não foi suficiente para que o óleo atingisse o limite máximo de degradação e que as alterações nos alimentos se deram em decorrência da absorção de lipídeos do meio de fritura.

Palavras chave: óleo de fritura, degradação, perfil de ácidos graxos, vitamina E, alimentos fritos.

5.2. INTRODUÇÃO

As alterações da sociedade moderna fazem com que muitas pessoas optem por realizar suas refeições fora do lar, em unidades de alimentação e nutrição (CARDOSO et al., 2005). Segundo a Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas, em 2007 foram servidos em Unidades de Alimentação e Nutrição no Brasil aproximadamente 12,4 milhões de refeições por dia, com estimativa de 13,7 milhões para 2008 (ABERC, 2008). Pelo grande número de refeições produzidas e consumidas nesses estabelecimentos se torna necessário avaliar as condições reais da matéria prima e da produção de alimentos em restaurantes.

A fritura por imersão é um método de cocção muito utilizado em todo o mundo. Suas características como o apelo comercial, a rapidez e variedade de produtos o tornam economicamente interessante para as indústrias e estabelecimentos produtores de alimentos. Para os consumidores, as características de odor, sabor, cor e textura fazem os alimentos fritos atraentes para o consumo (SAGUY e DANA, 2003).

Durante o processo, o meio de fritura utilizado sofre alterações físico-químicas em decorrência da sua exposição ao calor, à umidade proveniente dos alimentos e ao oxigênio presente no ar, além de outros fatores como a presença de íons metálicos (BHATTACHARYA et al., 2008). Essas alterações resultam em produtos de degradação voláteis e não-voláteis, que podem apresentar toxicidade, como os compostos carbonila, os polímeros de ácidos graxos e ácidos graxos cíclicos (CHOE e MIN, 2007).

A fritura por imersão resulta em absorção do meio de fritura pelo alimento frito. Os produtos de degradação não-voláteis permanecem no óleo de fritura e podem ser ingeridos em conjunto com o alimento ou reagir com os componentes do mesmo, trazendo riscos à saúde do consumidor (SORIGUER et al., 2003).

As alterações no óleo de fritura promovem também modificações no seu valor nutricional. Alterações no perfil de ácidos graxos do óleo ocorrem durante a fritura, com aumento de ácidos graxos saturados e *trans* e redução de ácidos graxos poliinsaturados (LOPES et al., 2004). Essas alterações variam de acordo com o grau de utilização do óleo e alteram também a composição de ácidos graxos dos alimentos.

São encontrados na literatura vários estudos sobre a utilização e degradação do óleo de fritura. Porém, frequentemente, são simulações laboratoriais do processo de fritura, somente com aquecimento do óleo, com frituras de pequenas quantidades de alimentos e em condições controladas de utilização, como nos estudos de LIU e HUANG (1995), de OWU e colaboradores (1998) e de DEL RÉ e JORGE (2006). Poucos estudos avaliam a utilização de óleo de fritura *in loco*, e os estudos em serviços de alimentação são ainda mais escassos. Devido às grandes diferenças no processo, os resultados laboratoriais são de difícil extrapolação.

A avaliação da qualidade do óleo de fritura e das alterações nutricionais ocorridas no óleo e no alimento é importante, pois indica o limite de utilização para o óleo e os possíveis comprometimentos na qualidade do alimento e na saúde do consumidor.

O objetivo deste trabalho foi acompanhar a rotina de fritura por imersão em uma Unidade de Alimentação e Nutrição institucional e avaliar os efeitos deste método de cocção no óleo utilizado e no alimento frito.

5.3. MATERIAIS E MÉTODOS

ACOMPANHAMENTO DO PROCESSO DE FRITURA E COLETA DE AMOSTRAS

O processo de fritura em uma Unidade de Alimentação e Nutrição institucional foi acompanhado desde o carregamento da fritadeira até o descarte do óleo após as dez utilizações. A temperatura durante os processos de aquecimento e utilização do óleo foi registrada com o auxílio de um termômetro (Testo 735, TestoAG). Antes das utilizações, foi coletada uma amostra de óleo fresco. Além disto, após cada utilização para fritura foi coletada também uma amostra. Para cada fritura foram coletadas amostras dos alimentos crus e fritos preparados.

O óleo coletado foi armazenado sob refrigeração, em frascos âmbar, sob atmosfera de nitrogênio até as análises. Os alimentos crus e fritos coletados foram armazenados sob congelamento, em temperatura de -20 °C.

ANÁLISES DAS AMOSTRAS DE ÓLEO DE FRITURA

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO DE FRITURA

Nas amostras de óleo coletadas durante o processo de fritura foram realizadas as seguintes determinações: Índice de acidez (Cd 3d-63 – AOCS, 1994); Índice de peróxido – Método ácido acético/clorofórmio (Cd 8-53 – AOCS, 1994); Índice de iodo – Método ciclohexano/ácido acético (Cd 1d-92 – AOCS, 1994); Determinação do teor de dienos conjugados, por absorvidade em 232 nm (Ti 1a-64 – AOCS, 1994); Determinação do teor de compostos polares (Cd 20-91 – AOCS, 1994); Determinação do índice de estabilidade do óleo - *Rancimat* (*Brinkmann Instruments, USA*) (Cd 12b-92 – AOCS, 1994).

ANÁLISE DO TEOR DE VITAMINA E DO ÓLEO DE FRITURA

Os teores dos isômeros tocoferóis e tocotrienóis da vitamina E foram investigados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se as seguintes condições cromatográficas: sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com bomba de alta pressão, modelo LC10AD VP; injetor automático SIL-10AF com alça de amostragem de até 50 µL; coluna LiChrosorb 5 µ Si60 Phenomenex, com 250 mm de

comprimento e 4 mm de diâmetro interno; detector de fluorescência modelo RF-10A-XL programado para detecção em 290 nm de excitação e 330 nm de emissão; fase móvel composta de hexano: isopropanol (99,4:0,6), com pH 2,5 corrigido com ácido acético, em vazão de 1mL/min (GUINAZI, 2004).

As amostras de óleo foram dissolvidas em hexano, na concentração de 10 g/L e diretamente injetadas para a análise (GUINAZI, 2004). Para a análise quantitativa foram construídas curvas-padrão utilizando-se padrões dos isômeros da vitamina E (CALBIOCHEM®, Alemanha).

DETERMINAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO DAS AMOSTRAS DE ÓLEO

Para a determinação do perfil lipídico, as amostras de óleo coletadas foram esterificadas para obtenção dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, utilizando o método IUPAC Standard 2.301 (IUPAC, 1987). A identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa, comparando-se os tempos de retenção dos ésteres presentes nas amostras com os dos ésteres de ácidos graxos do padrão FAME mix (SIGMA®, EUA).

Utilizou-se sistema de cromatografia gasosa GC-17A Shimadzu/Class GC, equipado com detector de ionização de chamas e com coluna cromatográfica de sílica fundida SP-2560 (*Biscyanopropil polysiloxane*) de 100 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. As condições de programação foram: temperatura do detector: 260 °C; temperatura do injetor: 250 °C; temperatura da coluna: início em 140 °C permanecendo nesta temperatura por 5 minutos; aquecimento até 240 °C, a uma taxa de 4 °C por minuto; permanecendo nesta temperatura por 20 minutos.

CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS

DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS ALIMENTOS

A composição centesimal das amostras de alimentos crus e fritos foi determinada com a utilização dos seguintes metodologias, descritas pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL, 2005) para umidade, proteínas, cinzas e lipídeos. O teor de carboidratos foi obtido por diferença entre a massa de amostra e a soma da massa dos demais componentes.

DETERMINAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO DAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS

Os lipídios dos alimentos crus e fritos foram extraídos pelo método de FOLCH et al. (1957). Para a obtenção dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, os extratos lipídicos foram esterificados segundo o método IUPAC Standard 2.301 (IUPAC, 1987). As condições cromatográficas de análise utilizadas foram as mesmas descritas anteriormente.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas através do programa SigmaStat, versão 2.0. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para avaliar a adequação dos dados à distribuição normal. Para comparação entre as amostras foi realizada a Análise de Variância (ANOVA),

seguido do teste de Tukey para a comparação múltipla das médias. Quando os dados não se adequaram à distribuição normal foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido dos testes de Tukey ou Dunn's para comparação entre as médias. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão ou em mediana.

5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO DE FRITURA:

O processo de fritura acompanhado ocorreu em um Restaurante Universitário, que funciona diariamente em período letivo e servia até cinco mil refeições por dia na época da coleta. O cardápio do restaurante fornece alimentos fritos, geralmente produtos cárneos e batata.

Desde a carga da fritadeira até o descarte final, a utilização do óleo durou doze dias, sendo realizadas dez frituras conforme o cardápio do restaurante, preparando-se alimentos variados (**Tabela 5.1**). Não foram feitas interferências durante o processo, de modo que os dados coletados refletissem a realidade da produção dos alimentos. O equipamento de fritura utilizado foi uma fritadeira de zona fria, em aço inox, com aquecimento elétrico, compartimento para salmoura e capacidade para 180 L de óleo.

Quando necessário, para que o nível adequado de óleo fosse mantido, foram feitas reposições com óleo novo. Após 13h23min de utilização da fritadeira foi realizada uma limpeza, com troca da salmoura, retirada do óleo que continha resíduos, na parte inferior da fritadeira, e reposição de parte do óleo. O restaurante não tem como rotina a filtragem do óleo após as utilizações. Após cada fritura, o óleo esfriava em temperatura ambiente, e se não ocorresse nova utilização, era tampado.

AVALIAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DA QUALIDADE DO ÓLEO

Para avaliar as alterações químicas decorrentes do processo de fritura, as amostras foram submetidas a análises que indicam o grau de degradação do óleo e fornecem parâmetros para sua utilização ou descarte.

Índice de Acidez: Nas amostras analisadas houve um aumento significativo ($p < 0,001$) do teor de ácidos graxos livres, sendo que a hidrólise se acentuou a partir da segunda fritura, com aproximadamente oito horas de utilização do óleo (**Tabela 5.2**). O vapor de água produzido pelo alimento durante o processo de fritura ataca a ligação éster entre o glicerol e o ácido graxo, rompendo-a e formando diacilgliceróis e monoacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos livres (CHOE e MIN, 2007). Vários estudos confirmam o aumento do teor de ácidos graxos livres durante a utilização em frituras (JASWIR, et al., 2005; CELLA et al., 2002; NAZ et al., 2005; YOON e CHOE, 2007). Porém, a formação de ácidos graxos livres varia em função de alguns fatores tais como a temperatura de fritura, o número vezes em que o óleo é reaquecido,

a quantidade de água no alimento a ser frito, entre outros. Desta forma, a comparação dos teores e a velocidade de formação dessas moléculas, entre estudos, é dificultada (JORGE et al., 2005).

Índice de peróxidos: O índice de peróxidos é uma medida utilizada para avaliar a formação dos compostos primários da oxidação. Os hidroperóxidos são formados durante o aquecimento, porém, devido à sua instabilidade, rapidamente se decompõem em outros compostos, com baixo peso molecular. Devido a esta instabilidade, o índice de peróxidos é uma medida limitada para a avaliação da degradação de gorduras (ARAÚJO, 2004).

Os valores obtidos neste estudo, para o Índice de peróxidos, seguem exatamente o comportamento esperado, com drástico aumento inicial do teor de hidroperóxidos, seguido de redução no teor encontrado. Após a redução, a partir de 11h36min de fritura foi observado que o Índice de peróxidos apresenta aumentos e reduções sucessivas (**Tabela 5.2**). A rotina de frituras descontínuas seguidas de um período de resfriamento do óleo, com exposição ao oxigênio e temperatura ainda elevada, permite novamente a formação de peróxidos. Com o reaquecimento do óleo esses peróxidos são decompostos, gerando o comportamento de aumento e diminuição do índice de peróxidos ao longo do período de fritura (CHATZILAZAROU et al., 2005). Esse comportamento foi observado neste estudo (**Figura 5.1**) e está de acordo com os resultados encontrados por outros autores (CHE MAN e WAN HUSSIN, 1998; TYNEK et al., 2001).

Figura 5.1: Curva do índice de peróxidos em óleo de soja utilizado para fritura em uma Unidade de Alimentação e Nutrição institucional em Viçosa-MG.

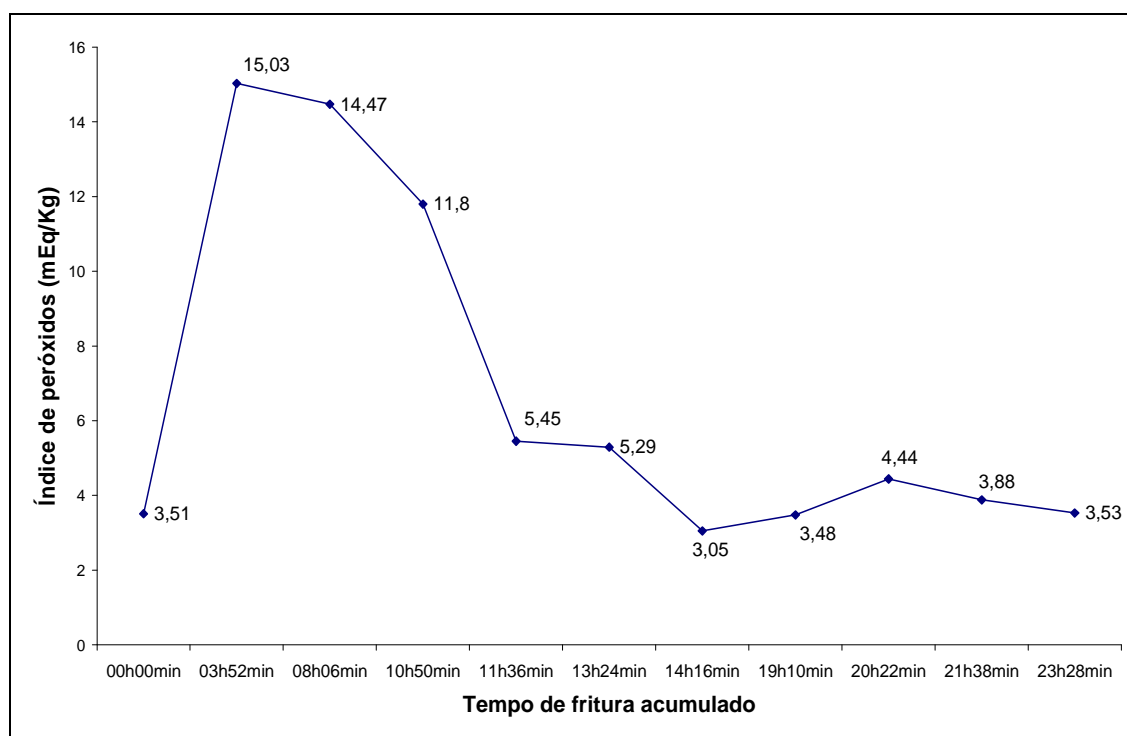


Tabela 5.1: Caracterização do processo de fritura acompanhado em uma Unidade de Alimentação e Nutrição institucional em Viçosa-MG.

Alimento frito	Quant. (Kg)	Descrição do alimento	Tempo de fritura (h)	Tempo de fritura acumulado (h)	Temp. do óleo de fritura (°C)*	Intervalo entre frituras (h)	Temp. durante o intervalo (°C)*	Observação
---	---	Óleo não utilizado	00:00	00:00	---	---	---	
Batata palha	300	Batata Inglesa crua ralada	03:52	03:52	142,53 ± 11,11	19:48	64,67 ± 27,61	
Batata palha	300	Batata Inglesa crua ralada	04:14	08:06	140,24 ± 10,49	11:00	75,28 ± 26,05	Reposição pré-fritura 18litros (10%)
Almôndega	372	Almôndega de carne bovina industrializada.	02:44	10:50	125,45 ± 5,76	03:54	117,89 ± 12,6	Reposição pré-fritura 27 litros (15%)
Steak	96	Empanado de frango pré-cozido industrializado	00:46	11:36	155,57 ± 8,13	17:06	89,8 ± 33,27	
Espetinho de frango	204	Carne de peito de frango congelada.	01:48	13:24	135,03 ± 5,44	04:44	43,97 ± 24,81	
Bife a milanesa	338	Bifes de chã de dentro, empanados com ovo e farinha de trigo e cobertos com farinha de rosca.	00:52	14:16	143,64 ± 14,59	14:24	64,62 ± 25,28	Limpeza da fritadeira, descarte parcial do óleo e reposição de 57 litros pré-fritura (31,7%)
Frango	513	Cortes de coxa e sobre-coxa de frango com pele e com osso.	04:54	19:10	128,99 ± 13,4	03:45	63,77 ± 26,76	
Steak	129	Empanado de frango pré-cozido industrializado	01:12	20:22	140,96 ± 7,4	16:26	55,01 ± 34,38	
Bife a milanesa	435	Bifes de chã de dentro, empanados com ovo e farinha de trigo e cobertos com farinha de rosca.	01:16	21:38	127,15 ± 6,24	23:16	61,43 ± 27,42	
Frango	200	Cortes de coxa e sobre-coxa de frango com pele e com osso.	01:50	23:28	131,03 ± 13,35			

*Dados apresentados em média ± desvio padrão.

Tabela 5.2: Resultados das análises físico-químicas para caracterização e degradação de óleo de soja utilizado para fritura em uma Unidade de Alimentação e Nutrição institucional em Viçosa-MG

Tempo de fritura acumulado	Alimento frito	Tempo de fritura por alimento	Índice de Acidez (%)*	Índice de Peróxidos (mEq/Kg)*	Índice de Iodo (% de iodo absorvido)*	Dienos conjugados(%)*	Rancimat (h)*	Compostos polares (%)*
00h00min	---	00h00min	0,15 ± 0,01 ^a	3,51 ± 0,37 ^{de}	112,14 ± 17,84 ^{ab}	0,4 ± 0,01 ^a	11,06 ± 0,54 ^{cd}	7,38 ± 0,72 ^a
03h52min	Batata palha	03h52min	0,15 ± 0,01 ^a	15,03 ± 0,03 ^a	103,39 ± 0,44 ^a	0,63 ± 0,02 ^f	8,59 ± 0,29 ^{ab}	
08h06min	Batata palha	04h14min	0,17 ± 0,01 ^a	14,47 ± 0,21 ^a	116,22 ± 5,61 ^{ab}	0,67 ± 0,01 ^g	7,4 ± 1,89 ^a	
10h50min	Almôndega	02h44min	0,28 ± 0,02 ^b	11,8 ± 0,79 ^b	128,87 ± 12,06 ^{ab}	0,59 ± 0,01 ^{cde}	9,05 ± 0,18 ^{bc}	
11h36min	Steak	00h46min	0,29 ± 0,01 ^b	5,45 ± 0,5 ^c	117,41 ± 7,82 ^{ab}	0,6 ± 0,01 ^{def}	9,44 ± 0,25 ^{bc}	
13h24min	Espetinho de frango	01h48min	0,36 ± 0,02 ^{bc}	5,29 ± 0,36 ^c	132,64 ± 10,3 ^b	0,62 ± 0,00 ^{ef}	12,19 ± 0,49 ^d	9,91 ± 0,97 ^a
14h16min	Bife a milanesa	00h52min	0,32 ± 0,02 ^c	3,05 ± 0,04 ^d	137,33 ± 6,66 ^b	0,57 ± 0,01 ^{cd}	12,69 ± 0,15 ^d	
19h10min	Frango	04h54min	0,47 ± 0,02 ^d	3,48 ± 0,19 ^{de}	128,9 ± 6,43 ^{ab}	0,53 ± 0,02 ^b	18,21 ± 0,5 ^f	
20h22min	Steak	01h12min	0,47 ± 0,05 ^d	4,44 ± 0,13 ^e	124,97 ± 13,81 ^{ab}	0,55 ± 0,01 ^{bc}	17,03 ± 0,26 ^{ef}	
21h38min	Bife a milanesa	01h16min	0,49 ± 0,02 ^d	3,88 ± 0,42 ^{de}	122,45 ± 8,89 ^{ab}	0,55 ± 0,02 ^{bc}	15,14 ± 0,79 ^e	
23h28min	Frango	01h50min	0,57 ± 0,00 ^e	3,53 ± 0,36 ^{de}	122,38 ± 2,94 ^{ab}	0,52 ± 0,01 ^b	17,75 ± 0,75 ^f	6,06 ± 2,64 ^a

*Dados apresentados em média ± desvio padrão. ^{a, b, c, d, e}: médias seguidas de pelo menos uma letra igual nas colunas não diferem entre si. Análise de Variância complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, com nível de significância de 5%.

Alguns estudos encontrados na literatura estudam a oxidação do óleo pelo seu aquecimento extremo sem a presença de alimento. Quando a fritura é realizada, são utilizadas pequenas quantidades de óleo, e um único tipo de alimento é frito em pequenas porções, com tempos relativamente curtos de utilização do óleo e simulações de frituras descontínuas sem tempo suficiente para resfriamento do óleo entre as frituras. Essas rotinas geram resultados que nem sempre refletem a realidade do processo de fritura em Unidades de Alimentação e Nutrição. Por isso, boa parte dos estudos não apresenta os resultados de decréscimo do teor de peróxidos. Vários estudos observaram somente o aumento inicial do valor de peróxidos em amostras de óleo utilizadas para fritura (CHATZILAZAROU et al., 2005; SMITH et al., 2006, DEL RÉ e JORGE, 2006).

Índice de iodo: O índice de iodo é uma medida para avaliação do grau de insaturação de um determinado óleo pela titulação de iodo ativo (ORTHOEFER e LIST, 2007c). Geralmente, a consequência da utilização de óleos com altos teores de ácidos graxos poliinsaturados para fritura é a redução do valor do índice de iodo, em decorrência das reações de oxidação, hidrólise e polimerização (TAKEOKA et al., 1997). Alguns estudos confirmam este resultado, apresentando decréscimos significantes no índice de iodo após a utilização do óleo (TYNEK et al., 2001, NAZ et al., 2005).

Entretanto, um estudo realizado por CHATZILAZAROU e colaboradores (2005) demonstrou não haver redução significativa do índice de iodo após a utilização de óleo de oliva e mistura de óleo de milho e óleo de oliva para fritura descontínua. Da mesma forma, o óleo por nós avaliado apresentou aumentos significativos do índice de iodo no momento da reposição com óleo novo, porém não apresentou diminuição significativa no índice de iodo após as 23h28min de utilização (**Tabela 5.2**). Este resultado contradiz a avaliação de perfil de ácidos graxos realizada, que indica redução significativa do teor de ácidos graxos poliinsaturados e aumento do teor de ácidos graxos saturados após o final das frituras (**Tabela 5.3**). Com este resultado, sugere-se que o índice de iodo não foi um bom método para avaliar o grau de perda das duplas ligações no nosso estudo.

Dienos conjugados: As modificações oxidativas ocorridas em ácidos graxos poliinsaturados levam à formação de radicais mais estáveis, como dienos conjugados. Essas moléculas apresentam valores máximos de absorvidade na faixa entre 220 e 234 nm e a medição da absorbância de amostras de óleo de fritura nestes comprimentos de onda pode oferecer indicação das alterações no óleo em decorrência do processo oxidativo (CELLA et al., 2002; SMITH et al., 2006). Houve um aumento significativo ($p < 0,001$) na concentração destes compostos, após o processo de fritura, nas amostras analisadas (**Tabela 5.2**).

O valor de 0,52% de dienos conjugados encontrado ao final da fritura foi semelhante ao encontrado por YOON e CHOE (2007) no mesmo tempo de utilização do óleo. O comportamento do teor dos dienos conjugados no óleo por nós analisados está em consonância com o descrito por DEL RÉ e JORGE (2006), que indica que alimentos de origem vegetal promovem um aumento mais rápido no teor de dienos conjugados que os alimentos de origem animal. Nas amostras analisadas houve, inicialmente, um rápido aumento na

concentração de dienos, durante a fritura de batatas. Com a reposição de 15% de óleo, houve um decréscimo no teor de dienos, que se manteve praticamente constante até o descarte do óleo. As pequenas variações podem ser atribuídas às trocas de lipídeos entre o meio e o alimento frito.

Índice de Estabilidade de Óleos – Rancimat: Devido à sua facilidade de uso, reprodutibilidade e baixo custo operacional, o método *Rancimat* tem boa aceitação para a medida de estabilidade oxidativa de óleos e gorduras (FARHOOSH e MOOSAVI, 2007). O método baseia-se no estímulo da oxidação de uma amostra de óleo por um fluxo de ar e a quantificação é feita com base na condutividade elétrica dos produtos voláteis de degradação. Pode-se definir a estabilidade de um óleo como o tempo necessário para se atingir um nível detectável de rancidez ou uma drástica mudança na taxa de oxidação (tempo de indução). (DEL RÉ e JORGE, 2006).

A estabilidade oxidativa está diretamente relacionada ao grau de insaturação dos ácidos graxos presentes no óleo, sendo que os óleos com maiores teores de gordura saturada apresentam maiores tempos de indução e maior resistência oxidativa. Portanto, de maneira geral, ocorre uma redução da estabilidade oxidativa de óleos durante o processo de fritura, com redução do tempo necessário para a detecção da rancidez.

Um estudo realizado com cocção de batata em diferentes óleos comerciais para fritura encontrou reduções no tempo de indução de 70 a 90% após 48h de fritura (FARHOOSH e MOOSAVI, 2007).

Em avaliação realizada por CORSINI e JORGE (2006), o tempo de indução para o óleo de palma fresco apresentou-se elevado, atingindo o tempo de indução aproximadamente quatorze vezes maior que para o óleo de girassol e cinco vezes maior que para o óleo de algodão. Após o processo de fritura de mandioca congelada, houve redução dos tempos de indução para todos os óleos, porém com aumento da diferença entre os tempos de indução, o que indica a maior estabilidade dos óleos com maior teor de ácidos graxos saturados.

Os resultados obtidos apresentam-se de forma contrária a estes, com aumento no tempo de indução após a fritura (**Tabela 5.2**). Avaliando o perfil lipídico dos óleos, pode-se observar o aumento no teor de ácidos graxos saturados (**Tabela 5.3**) durante o processo de fritura, fato que pode acarretar o aumento da estabilidade oxidativa do óleo. Esses ácidos graxos saturados, além de serem formados durante o processo, podem ser provenientes dos alimentos fritos. Além disso, os alimentos podem também ser fornecedores de ácidos graxos insaturados não oxidados para o meio de fritura, visto que, por serem de origem animal, alguns alimentos possuíam conteúdo considerável de gordura.

Essa hipótese é reforçada pela variação do tempo de indução ao longo do processo de fritura. Após as duas primeiras frituras (batata-palha) houve uma redução no tempo de indução, no entanto, após o início das frituras de alimentos de origem animal, ocorreu um aumento significativo do período de indução ($p < 0,05$). Resultados semelhantes foram encontrados por DEL RÉ e JORGE (2006), com aumento do período de indução para óleos de soja, girassol e milho após a fritura de produtos cárneos pré-fritos congelados.

Compostos polares: a medição de compostos polares é considerada um bom índice para a avaliação da degradação, pois é uma medida representativa da alteração total do óleo. Em óleos de fritura, os compostos polares são resultantes das reações de degradação sofridas pelas moléculas lipídicas (QUILES et al., 2002) e sua concentração após a utilização do óleo é diretamente proporcional à quantidade de insaturação inicial do óleo (TAKEOKA et al., 1997). A concentração de compostos polares também se correlaciona fortemente com o teor de monômeros de ácidos graxos cíclicos, moléculas derivadas da degradação de lipídeos, e que possuem grande potencial tóxico (ROMERO et al., 2006).

A determinação de compostos polares é aceita como um dos métodos mais confiáveis para determinação da degradação de óleos e gorduras e pode ser considerada como medida de referência para avaliação de outros métodos (FARHOOSH e MOOSAVI, 2007). Tal medida é tão difundida e aceita que a maioria dos países que possuem legislação de controle de utilização do óleo baseia seus limites de utilização no teor de compostos polares.

Vários estudos têm confirmado que, em geral, os teores de compostos polares aumentam ao longo do processo de fritura (LAKE e SCHOLE, 1997; TYNEK et al., 2001; HOUHOULA et al., 2002; JORGE et al., 2005). Na avaliação realizada, não houve diferença significativa no teor de compostos polares nas amostras com 0h, 13h24min e 23h38min de uso (**Tabela 5.2**). Com esse resultado, acredita-se que o tempo de fritura ao qual o óleo foi submetido não foi suficiente para a geração considerável de compostos polares. Um outro fator que pode ter contribuído para os resultados baixos de teores destes compostos seria o tipo de fritadeira utilizado. A salmoura situada ao fundo da fritadeira proporciona um ambiente altamente polar, que atrai os compostos polares, diminuindo sua concentração no meio de fritura. Além disso, a reposição durante o processo com óleo novo não também é uma hipótese para justificar este resultado.

No Brasil, apesar da orientação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para utilização do óleo de fritura de acordo com as Boas Práticas de Fabricação, ainda não existe uma recomendação de limites de utilização ou degradação para óleos de fritura (ANVISA, 2004).

Alguns países, como Bélgica, Itália, Áustria e outros, têm recomendações de qualidade para óleos utilizados para fritura. Para uma maior vida útil do óleo de fritura são recomendados que o óleo não apresente mais de 2% de ácido linolênico na sua composição e que a temperatura do óleo deve manter-se abaixo de 180 °C. Para a presença de compostos de degradação os limites recomendados são, em geral, teores máximos de compostos polares entre 25% e 27% e índice de acidez abaixo de 2,5% (FIRESTONE, 2007).

Durante o acompanhamento do processo de fritura a média de temperatura do óleo utilizado nas frituras foi 135,5 °C, com desvio padrão de 12,9°C. Com isso, era esperado que o óleo não apresentasse processo avançado de degradação. Confirmou-se, com as análises químicas, que os óleos analisados apresentaram valores abaixo dos limites sugeridos, por isso, é possível que o processo de fritura avaliado não tenha alterado o óleo ao ponto de ser considerado inadequado para consumo.

EFEITOS DO PROCESSO DE FRITURA NO TEOR DE VITAMINA E DOS ÓLEOS

Óleos e gorduras são as principais fontes de vitamina E na dieta ocidental, contribuindo, nos Estados Unidos, com 20% da ingestão de equivalentes de α -tocoferol e 41% na Finlândia (SCHWARTZ, 2008). Não há registro conhecido do papel dos óleos vegetais no consumo desta vitamina no Brasil.

Durante o processo de fritura as reações de oxidação contribuem para a degradação do óleo utilizado. Cada óleo tem um grau de estabilidade à oxidação, que varia em função da sua composição de ácidos graxos e da presença de componentes com capacidade antioxidante. Para a estabilidade dos óleos durante o processo de fritura contribuem como antioxidantes os tocoferóis (em especial o γ -tocoferol), fosfolipídeos, carotenóides, esqualeno e alguns esteróis. A ação antioxidante de tocoferóis e tocotrienóis na presença de lipídeos resulta da sua oxidação a quinonas e dímeros, anterior a ação dos radicais sobre os lipídeos. (ROSSI et al., 2007). Segundo BARRERA-ARELLANO e colaboradores (1999) a presença de tocoferóis em óleos vegetais tem ação protetora contra a oxidação, tanto em temperaturas altas como abaixo de 100°C.

Os teores dos isômeros tocoferóis encontrados no óleo estão apresentados na **Tabela 5.3**. Além da presença dos tocoferóis, foi investigada também a presença dos isômeros tocotrienóis nos óleos, porém, esses não foram encontrados. Segundo EINTENMILLER (1997), os tocotrienóis não são compostos de ocorrência comum em óleo de soja, podendo inclusive ser utilizados como parâmetro de adulteração neste tipo de óleo.

Tabela 5.3: Teores de tocoferóis em óleo de soja utilizado em fritura por imersão em uma Unidade de Alimentação e Nutrição institucional em Viçosa-MG.

<i>Tempo de fritura acumulado</i>	<i>α-tocoferol (mg/100g)</i>	<i>β-tocoferol (mg/100g)</i>	<i>γ-tocoferol (mg/100g)</i>	<i>δ-tocoferol (mg/100g)</i>
00h00min	18,33 \pm 0,74 ^a	2,76 ^a	74,82 ^a	24,58 \pm 1,43 ^{ab}
03h52min	16,56 \pm 0,51 ^{bc}	2,43 ^a	63,28 ^b	23,16 \pm 1,21 ^{abc}
08h06min	18,27 \pm 0,49 ^a	2,76 ^a	65,87 ^b	25,11 \pm 0,64 ^a
10h50min	15,77 \pm 0,09 ^{cd}	2,77 ^a	56,2 ^b	22,63 \pm 0,11 ^{bc}
11h36min	17,64 \pm 0,66 ^a	2,7 ^a	53,46 ^b	21,36 \pm 0,31 ^{cd}
13h24min	11,99 \pm 0,06 ^e	2,24 ^a	48,97 ^b	20,00 \pm 0,27 ^{de}
14h16min	17,05 \pm 0,53 ^{abc}	2,08 ^{cd}	50,61 ^b	18,96 \pm 0,31 ^e
19h10min	14,75 \pm 0,92 ^d	6,49 ^b	35,16 ^c	15,54 \pm 0,85 ^f
20h22min	15,80 \pm 0,16 ^{cd}	3,06 ^{bd}	39,23 ^b	14,68 \pm 0,40 ^f
21h38min	15,79 \pm 0,23 ^{cd}	2,37 ^a	41,53 ^b	15,34 \pm 0,40 ^f
23h28min	14,66 \pm 0,12 ^d	1,7 ^c	37,48 ^c	13,91 \pm 0,22 ^f
Redução após 23h28min de fritura	20,0%	38,4%	49,9%	43,4%

^{a b c d}: Valores seguidos por pelo menos uma letra igual, em cada coluna, não diferem entre si. Valores expressos em média \pm desvio padrão, exceto para valores de β -tocoferol e γ -tocoferol, que não apresentaram distribuição normal, expressos em mediana. Análise de Variância ou Teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, com nível de significância de 5%.

O isômero γ -tocoferol é amplamente consumido por estar presente em altas concentrações nos óleos de soja e de milho. Apesar do α -tocoferol ser o isômero da vitamina E mais estudado, ser encontrado em maiores quantidades nos fluidos corporais (IOM, 2000; JIANG, et al., 2001), o isômero γ -tocoferol desempenha alguns papéis exclusivos na saúde: o combate às espécies reativas de nitrogênio, e ação anti-inflamatória, inibindo a produção de prostaglandina E2 (FRANKE et al., 2007). Além disso, suas concentrações plasmáticas em animais e humanos são inversamente relacionadas à incidência de doenças cardiovasculares e câncer de próstata (JIANG et al., 2001).

Dentre os isômeros encontrados, o γ -tocoferol foi o que apresentou maiores concentrações no óleo. Além disso, foi também o isômero que sofreu maior degradação durante o processo, o que confirma sua importante atividade de proteção contra a oxidação. Essa ação do isômero γ -tocoferol é também confirmada em outros estudos. WARNER et al. (2003) indicaram que este isômero tem ação importante na proteção do óleo contra a deterioração durante o processo de fritura, aumentando sua vida útil, além de inibir a formação de aldeídos voláteis em alimentos fritos. A perda diferenciada dos teores dos isômeros tocoferóis decorrente do processo de fritura já foi identificada por NORMAND e colaboradores (2001), que também observaram perdas maiores de γ -tocoferol em relação aos outros isômeros ao utilizar vários tipos de óleo de canola para fritura.

Verificou-se que o processo de fritura estudado foi responsável pela redução de 20% no conteúdo de α -tocoferol no óleo de fritura. A redução nos teores dos demais isômeros tocoferóis nos óleos de fritura variou entre 38,4% e 49,9%. Apesar da perda no teor dos isômeros tocoferóis no óleo, o processo de fritura não acarretou o desgaste total destas moléculas. Supõe-se que a presença destes isômeros no óleo durante todo o processo de fritura possa ter agido como fator protetor importante, impedindo que o óleo atingisse grau elevado de degradação.

QUILES e colaboradores (2002) também observaram perdas significantes de vitamina E em óleo de girassol, óleo de oliva e óleo de oliva virgem utilizados para fritura. A diminuição do teor de vitamina E foi diferenciada entre os tipos de óleo, sendo que o óleo de girassol apresentou perdas mais rápidas e maiores, indicando a sua menor resistência à fritura e que a vitamina E possa ter sido utilizada na proteção contra a oxidação do óleo.

COMPOSIÇÃO E ALTERAÇÕES NO PERFIL LIPÍDICO DOS ÓLEOS PELO PROCESSO DE FRITURA

As características do processo de fritura como o aquecimento do óleo em altas temperaturas, a presença de água proveniente do alimento e a presença de oxigênio produzem alterações na composição química dos óleos, decorrentes das reações de hidrólise, oxidação e polimerização ocorridas nas moléculas. Essas alterações resultam em modificações no perfil de ácidos graxos, alterando a composição dos óleos (SAGUY e DANA, 2003). Consequentemente, com a absorção de óleo do meio de fritura pelo alimento, essas alterações refletem-se também na composição de ácidos graxos destes.

Os tipos de ácidos graxos consumidos na dieta têm reflexos diferenciados no organismo. O consumo de ácidos graxos saturados e *trans*, de forma geral, promovem alterações no perfil de lipoproteínas plasmáticas e aumentam o risco de doenças cardiovasculares, por essa razão, seu consumo em quantidades excessivas deve ser evitado. Já o consumo de ácidos graxos monoinsaturados, em especial o ácido oléico (C18:1 ω 9), associado a uma baixa ingestão de ácidos graxos saturados está associado a uma menor chance de desenvolvimento de doença cardiovascular (WAHRBURG, 2004).

Em função de seus papéis na saúde e das conseqüências do consumo dos diferentes tipos de ácidos graxos encontrados nos alimentos, as alterações na composição dos lipídios presentes na dieta tem impacto na saúde do consumidor. Com isso, as alterações no perfil lipídico dos óleos e de alimentos fritos causam modificações no valor nutricional destes alimentos.

Análises de óleo de fritura realizadas por HOUHOULA e colaboradores (2002) apresentaram aumento significativo no conteúdo de ácido palmítico (C16:0) e redução no teor de ácido linoléico (C18:2 ω 6) em óleo de algodão, após 12 horas de fritura. Em um estudo com óleo de soja e de óleo de soja hidrogenado utilizados para fritura, a avaliação do perfil lipídico indicou um aumento no percentual de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e *trans* e redução de ácidos poliinsaturados após 50 horas de fritura. Essas alterações contribuíram para a redução do conteúdo dos ácidos graxos essenciais linoléico e ácido α -linolênico nos dois meios de fritura (SANIBAL e MANCINI FILHO, 2004b).

Assim como os resultados encontrados na literatura, no presente estudo, a análise das amostras de óleo por cromatografia gasosa indicou alterações na composição de ácidos graxos produzidas durante o processo de fritura. As alterações nos óleos de fritura aconteceram durante todo o processo, mas intensificaram-se após a terceira fritura, a partir da décima hora de utilização. Foi observado o aumento significativo do conteúdo de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e ácidos graxos *trans* e diminuição no conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados. Houve redução no conteúdo de ácidos graxos essenciais dos óleos analisados, em 21,8% de ácido linoléico e em 54% para o ácido α -linolênico (**Tabela 5.4**).

Os ácidos graxos essenciais linoléico (18:2 ω 6) e α -linolênico (18:3 ω 3) são precursores de famílias de moléculas que possuem papéis importantes no processo inflamatório e na imunidade. Por não serem produzidos pelo organismo humano, seu consumo através da dieta é essencial (TAPIERO et al., 2002).

Tabela 5.4: Perfil de ácidos graxos de óleo de soja utilizado para fritura em uma Unidade de Alimentação e Nutrição institucional em Viçosa-MG.

Tempo de fritura acumulado	00h00min	03h52min	08h06min	10h50min	11h36min	13h24min	14h16min	19h10min	20h22min	21h38min	23h28min
C14.0	n.d.	n.d.	n.d.	0,16±0,00	0,19±0,00	0,18±0,00	0,14±0,00	0,26±0,00	0,26±0,00	0,24±0,00	0,3±0,00
C16.0	10,61±0,03 ^a	10,73±0,02 ^{ab}	10,8±0,00 ^b	11,65±0,01 ^c	12,24±0,06 ^d	12,12±0,00 ^d	11,74±0,03 ^c	14,42±0,05 ^e	14,38±0,04 ^e	13,81±0,09 ^f	15,36±0,04 ^g
C18.0	3,18±0,01	3,22±0,02	3,21±0,02	4,01±0,02	4,11±0,15	3,95±0,01	3,72±0,06	4,19±0,00	4,16±0,03	4,22±0,16	4,34±0,00
C20.0	0,27±0,00	0,27±0,00	0,27±0,00	0,27±0,00	0,27±0,00	0,27±0,00	0,27±0,00	0,22±0,00	0,23±0,00	0,23±0,00	0,20±0,00
C22.0	0,37±0,00	0,37±0,01	0,38±0,00	0,35±0,00	0,35±0,00	0,35±0,00	0,36±0,00	0,28±0,00	0,29±0,00	0,31±0,00	0,17±0,15
C16.1	n.d.	n.d.	n.d.	0,21±0,00	0,24±0,00	0,26±0,00	0,19±0,00	1,17±0,02	0,94±0,01	0,84±0,01	1,46±0,01
C18.1t	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,30±0,12	0,26±0,01	0,09±0,09	0,22±0,00	0,49±0,05	0,18±0,15	0,33±0,04
C18.1c n9	19,26±0,12 ^a	19,38±0,04 ^a	19,44±0,05 ^a	20,3±0,01 ^{bd}	20,41±0,07 ^{cd}	20,48±0,02 ^c	20,13±0,05 ^b	24,30±0,08 ^e	23,79±0,06 ^f	23,13±0,06 ^g	25,63±0,10 ^h
C18.1c n7	1,76±0,2	1,65±0,04	1,67±0,02	1,71±0,08	2,00±0,09	1,89±0,16	1,66±0,06	1,85±0,04	2,18±0,17	2,04±0,28	1,90±0,25
C20.1	0,56±0,00	0,58±0,04	0,56±0,04	0,55±0,04	0,55±0,03	0,53±0,04	0,53±0,04	0,47±0,03	0,46±0,03	0,46±0,00	1,64±2,06
C18.2t	0,28±0,11	0,34±0,00	0,33±0,00	0,32±0,01	0,29±0,11	0,28±0,10	0,32±0,01	0,26±0,00	0,22±0,11	0,22±0,10	0,23±0,09
C18.2c	57,39±0,08 ^a	57,23±0,09 ^a	57,19±0,12 ^a	54,71±0,10 ^b	53,74±0,04 ^c	53,78±0,07 ^c	54,98±0,12 ^b	47,63±0,12 ^d	47,95±0,14 ^e	49,26±0,10 ^f	44,9±0,07 ^g
C18.3w3	5,77±0,06 ^a	5,68±0,04 ^{ab}	5,63±0,02 ^b	5,33±0,01 ^d	4,95±0,02 ^c	5,04±0,03 ^c	5,23±0,04 ^e	4,39±0,04 ^f	4,17±0,04 ^g	4,47±0,01 ^h	2,65±2,29 ⁱ
C20.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,10±0,00
C22.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,03±0,05	0,09±0,00	0,03±0,05
Σ Saturados	14,43±0,02 ^a	14,59±0,04 ^a	14,66±0,05 ^a	16,43±0,03 ^c	17,15±0,10 ^d	16,86±0,01 ^e	16,23±0,04 ^f	19,36±0,04 ^g	19,32±0,07 ^h	18,8±0,12 ⁱ	20,38±0,19 ^j
Σ Monoinsat.	21,56 ^a	21,57 ^a	21,63 ^a	22,77 ^{ab}	23,49 ^{ab}	23,42 ^{ab}	22,53 ^{ab}	28,06 ^{ab}	27,92 ^{ab}	26,72 ^{ab}	29,68 ^b
Σ Poliinsat.	63,87 ^a	63,73 ^{ab}	63,61 ^{ab}	60,79 ^{ab}	59,45 ^{ab}	59,49 ^{ab}	61,07 ^{ab}	52,62 ^{ab}	52,64 ^{ab}	54,25 ^{ab}	49,55 ^b
Σ Trans	0,34 ^{ab}	0,34 ^{ab}	0,33 ^{ab}	0,32 ^a	0,53 ^{ab}	0,59 ^{ab}	0,44 ^{ab}	0,48 ^{ab}	0,64 ^{ab}	0,43 ^{ab}	0,58 ^b

Valores expressos em percentual do total de ácidos graxos. ^{ab cde fgh ij}: Valores seguidos por pelo menos uma letra igual, em cada linha, não diferem entre si. Valores expressos em média ± desvio padrão, exceto para somatório de monoinsaturados, poliinsaturados e trans, que não apresentaram distribuição normal, expressos em mediana. Análise de Variância ou Teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, com nível de significância de 5%. Os somatórios dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados incluem ácidos graxos não apresentados na tabela.

Como os óleos vegetais são as principais fontes de ácidos graxos essenciais na dieta (KRIS-ETHERTON et al., 2000), a redução destes ácidos graxos no óleo pode ter um grande impacto em seu consumo. Além disso, apesar do aumento do percentual de ácidos graxos monoinsaturados após o processo de fritura, o efeito negativo do aumento de ácidos graxos trans e saturados pode resultar na ausência de efeito benéfico dos monoinsaturados. Portanto, pode-se afirmar que o processo de fritura tem impacto negativo no valor nutricional do óleo.

COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ALIMENTOS FRITOS

A absorção do óleo de fritura pelos alimentos fritos é uma das principais características deste processo de cocção. A captação do óleo pelo alimento se dá por dois meios: tanto durante o processo de fritura, pela substituição por óleo da água perdida como vapor, quanto pela absorção do óleo da superfície após a finalização da cocção (SAGUY e DANA, 2003). O óleo absorvido altera a composição e o valor nutricional do alimento consideravelmente, pelo aumento da quantidade de lipídeos e vitamina E, podendo acarretar também a absorção de compostos tóxicos de degradação presentes no óleo.

Na **Tabela 5.5** são apresentados os dados da composição dos alimentos crus e fritos. Todos os alimentos apresentaram teores diferentes ($p < 0,05$) de lipídeos quando crus e cozidos, exceto a segunda fritura de *steak*, cujos teores de lipídios entre as amostras cruas e cozidas não diferiram significativamente. Acredita-se que esta diferença observada no comportamento de absorção de gordura para o *steak* pode ser atribuída ao fato deste alimento ser pré-frito, e com isso já ter sofrido parte da etapa de absorção de gordura durante a cocção na indústria.

Devido ao processo utilizado, os alimentos, de forma geral, apresentaram teores maiores de lipídeos após a cocção. Somente as amostras de frango tiveram comportamento inverso, com teores maiores nas amostras cruas em relação às fritas. As amostras de frango fritas durante o experimento eram cortes de coxa e sobrecoxa com pele. A presença da pele pode justificar a redução do teor de lipídeos após a fritura, pois esta se apresenta como uma barreira física para o contato do meio de fritura com a carne, impedindo que houvesse absorção de lipídeos em grande parte da área de contato com o óleo. Além disso, devido ao seu alto teor de gordura e sua drástica redução de tamanho após a fritura, a pele de frango pode perder lipídeos para o meio, o que ocasionaria a redução da quantidade final de lipídeos no alimento.

Tabela 5.5: Composição centesimal dos alimentos crus e fritos em uma Unidade de Alimentação e Nutrição institucional em Viçosa-MG.

<i>Alimentos</i>	<i>Umidade (%)</i>	<i>Lipídios (%)</i>	<i>Proteínas (%)</i>	<i>Cinzas (%)</i>	<i>Carboidratos (%)</i>
Batata crua (1ª fritura)	86,68 ± 0,12	0,03 ± 0	1,21 ± 0,02	0,41 ± 0,01	11,68 ± 0,12
Batata-frita (1ª fritura)	3,45 ± 1,67	37,18 ± 3,6	3,6 ± 0,11	1,25 ± 0,17	54,53 ± 2,14
Batata crua (2ª fritura)	85,42 ± 0,37	0,03 ± 0	0,95 ± 0,05	0,44 ± 0,01	13,16 ± 0,38
Batata-frita (2ª fritura)	3,45 ± 0,63	40,81 ± 2,45	3,34 ± 0,2	1,63 ± 0,1	50,78 ± 1,81
Almôndega crua (3ª fritura)	66,75 ± 0,32	9,1 ± 0,17	11,09 ± 0,26	2,8 ± 0,06	10,27 ± 0,6
Almôndega frita (3ª fritura)	54,26 ± 1,29	14,26 ± 0,57	16,08 ± 0,33	3,91 ± 0,11	11,5 ± 0,83
Steak cru (4ª fritura)	51,43 ± 0,45	14,84 ± 1,41	11,37 ± 0,92	2,31 ± 0,02	20,06 ± 1,98
Steak frito (4ª fritura)	47,01 ± 0,54	17,56 ± 1,52	13,09 ± 1,1	2,61 ± 0,07	27,56 ± 20,19
Espetinho de frango cru (5ª fritura)	67,12 ± 0,31	1,56 ± 0,35	21,67 ± 0,23	3,38 ± 0,1	6,27 ± 0,51
Espetinho de frango frito (5ª fritura)	50,83 ± 1,41	6,51 ± 1,53	26,03 ± 2,45	3,59 ± 0,56	13,04 ± 3,16
Bife empanado cru (6ª fritura)	67,95 ± 0,12	1,62 ± 0,19	16,67 ± 0,43	2,78 ± 0,05	10,99 ± 0,54
Bife empanado frito (6ª fritura)	42,79 ± 1,47	14,17 ± 0,98	16,81 ± 8,28	2,78 ± 0,45	20,36 ± 2,65
Frango cru (7ª fritura)	67,68 ± 0,8	14,17 ± 0,21	10,71 ± 9,31	1,95 ± 0,01	0,89 ± 0,9
Frango frito (7ª fritura)	55,38 ± 2,5	11,4 ± 1,08	29,42 ± 1,53	2,99 ± 0,61	1,64 ± 1,91
Steak cru (8ª fritura)	53,9 ± 0,26	14,58 ± 1,86	14,16 ± 2,06	2,58 ± 0,03	14,79 ± 0,44
Steak frito (8ª fritura)	48,38 ± 0,15	16,93 ± 2,54	13,88 ± 0,75	2,91 ± 0,32	17,9 ± 2,63
Bife empanado cru (9ª fritura)	64,92 ± 0,07	1,72 ± 0,48	17,05 ± 0,86	1,71 ± 0,01	14,6 ± 1,21
Bife empanado frito (9ª fritura)	44,61 ± 0,24	11,67 ± 1,21	24,26 ± 2,63	2,07 ± 0,22	17,39 ± 1,95
Frango cru (10ª fritura)	63,39 ± 0,37	19,37 ± 0,99	10,83 ± 2,01	1,15 ± 0,02	5,26 ± 1,66
Frango frito (10ª fritura)	57,66 ± 0,5	11,83 ± 0,45	26,3 ± 1,68	2,68 ± 0,07	1,63 ± 1,53

*Dados apresentados em média ± desvio padrão.

Em função da absorção de lipídeos durante o processo de fritura ocorrem modificações na composição de ácidos graxos dos alimentos fritos em relação aos crus. O perfil de ácidos graxos dos alimentos está apresentado na **Tabela 5.6**. Devido ao baixo teor de lipídeos da amostra de batata crua, o perfil de ácidos graxos deste tipo de amostra não foi analisado.

Para as amostras de batatas fritas, observa-se que a composição de ácidos graxos refletiu o conteúdo do óleo, pois praticamente todo o conteúdo lipídico desse tipo de amostra é proveniente do meio de fritura. Em todas as outras amostras foram observadas alterações no perfil de ácidos graxos e essas alterações são atribuídas à absorção do óleo de fritura pelos alimentos. Um resultado a ser destacado é a alteração na quantidade do ácido graxo *trans* linoelaídico (C18:2 ω 6t) nos alimentos após a fritura, indicando incorporação deste proveniente do meio. Os alimentos analisados apresentaram aumento ou manutenção no percentual do ácido linoelaídico após a fritura, e com isto, pode-se dizer que a composição de ácidos graxos de alimentos fritos é prejudicada pelo processo.

5.5. CONCLUSÕES

A avaliação do grau de degradação dos óleos utilizados para fritura, durante o experimento, indicou que o período e a frequência de utilização do óleo e as características dos alimentos nele fritos não foram suficientes para que o descarte do mesmo fosse recomendado. Porém, a análise do perfil de ácidos graxos revelou alterações consideráveis no meio de fritura, que podem resultar em alterações nutricionais importantes no alimento frito, como o aumento

no conteúdo de ácidos graxos saturados e *trans*. As alterações na composição nutricional dos alimentos após a fritura se devem principalmente à incorporação dos lipídeos do meio de fritura.

O teor de tocoferóis do óleo avaliado foi reduzido em função da utilização do óleo como meio de fritura, o que pode ser atribuído à sua utilização como agentes antioxidantes durante o processo. No entanto, não houve o consumo total dos isômeros tocoferóis durante o processo de fritura, o que pode ter evitado a degradação extrema do óleo.

Nas condições descritas neste estudo, como capacidade e tipo de equipamento para fritura, temperatura controlada durante a cocção, tipo de alimento frito e condições de reposição e armazenamento do óleo, admite-se a utilização do óleo de fritura por até 23 horas, não sendo possível fazer inferências sobre as conseqüências da sua utilização após esse período.

Tabela 5.6: Perfil de ácidos graxos dos alimentos crus e fritos.

Alimento	Saturados (%)	Mono-Insat. (%)	Poli-Insat (%)	C12:0 (%)	C14:0 (%)	C16:0 (%)	C18:0 (%)	C20:0 (%)	C22:0 (%)
Batata-frita (1ª fritura)	14,67± 0,06	21,57 ± 0,04	63,65 ± 0,10	n.d.	n.d.	10,77 ± 0,01	3,23 ± 0,01	0,28 ± 0,00	0,37 ± 0,01
Batata-frita (2ª fritura)	14,37± 0,67	21,32 ± 0,27	64,13 ± 0,70	n.d.	n.d.	10,75 ± 0,08	3,06 ± 0,32	0,28 ± 0,13	0,28 ± 0,14
Almôndega crua (3ª fritura)	40,51± 0,74	38,99 ± 0,35	18,42 ± 0,74	n.d.	1,42 ± 0,04	22,71 ± 0,04	15,23 ± 0,64	0,14 ± 0,01	nd
Almôndega frita (3ª fritura)	34,25± 2,04	33,27 ± 0,38	30,71 ± 2,34	n.d.	1,17 ± 0,16	19,67 ± 0,92	12,24 ± 0,91	0,19 ± 0,00	0,17 ± 0,01
Steak cru (4ª fritura)	26,81± 0,17	31,43 ± 0,58	41,35 ± 0,78	0,09 ± 0,00	0,56 ± 0,01	21,69 ± 0,02	4,04 ± 0,07	0,23 ± 0,14	0,10 ± 0,00
Steak frito (4ª fritura)	22,06± 0,38	31,03 ± 0,83	46,47 ± 1,22	n.d.	0,30 ± 0,00	16,63 ± 0,34	4,48 ± 0,04	0,32 ± 0,01	0,21 ± 0,01
Espetinho de frango cru (5ª fritura)	31,46± 0,26	46,70 ± 0,66	20,33 ± 0,42	0,07 ± 0,00	0,50 ± 0,02	23,88 ± 0,35	6,63 ± 0,25	0,15 ± 0,02	0,20 ± 0,01
Espetinho de frango frito (5ª fritura)	20,14± 0,28	28,31 ± 0,83	51,12 ± 0,95	n.d.	0,24 ± 0,01	14,58 ± 0,19	4,58 ± 0,17	0,32 ± 0,10	0,31 ± 0,02
Bife empanado cru (6ª fritura)	36,56± 5,60	43,14 ± 3,98	17,75 ± 9,28	0,23 ± 0,16	0,79 ± 0,15	24,73 ± 3,40	10,00 ± 1,60	n.d.	n.d.
Bife empanado frito (6ª fritura)	22,03± 3,00	30,11 ± 3,43	46,41 ± 6,56	n.d.	0,29 ± 0,03	15,78 ± 2,01	5,59 ± 0,80	n.d.	n.d.
Frango cru (7ª fritura)	29,4± 0,13	43,27 ± 0,27	26,46 ± 0,12	0,20 ± 0,01	0,65 ± 0,00	21,36 ± 0,06	6,91 ± 0,08	0,05 ± 0,00	n.d.
Frango frito (7ª fritura)	24,74± 0,85	36,18 ± 2,74	38,58 ± 3,56	0,13 ± 0,01	0,43 ± 0,02	18,46 ± 1,03	5,28 ± 0,14	0,13 ± 0,01	0,16 ± 0,01
Steak cru (8ª fritura)	26,93± 0,14	32,97 ± 0,25	39,78 ± 0,22	n.d.	0,54 ± 0,00	21,75 ± 0,07	4,18 ± 0,02	0,18 ± 0,08	0,09 ± 0,00
Steak frito (8ª fritura)	23,89± 0,82	35,28 ± 2,34	40,15 ± 3,63	n.d.	0,35 ± 0,01	18,40 ± 0,69	4,62 ± 0,09	0,20 ± 0,10	0,17 ± 0,01
Bife empanado cru (9ª fritura)	33,43± 0,58	42,17 ± 0,69	22,55 ± 1,26	n.d.	0,74 ± 0,10	23,25 ± 0,28	8,71 ± 0,16	0,24 ± 0,00	n.d.
Bife empanado frito (9ª fritura)	22,63± 2,35	30,44 ± 2,66	46,05 ± 4,88	0,07 ± 0,00	0,45 ± 0,07	16,13 ± 1,66	5,74 ± 0,63	0,19 ± 0,00	n.d.
Frango cru (10ª fritura)	29,25± 0,16	43,85 ± 0,25	26,02 ± 0,04	0,20 ± 0,00	0,61 ± 0,00	22,38 ± 0,14	5,79 ± 0,05	0,05 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Frango frito (10ª fritura)	26,16± 2,15	36,38 ± 2,47	36,95 ± 4,59	0,16 ± 0,04	0,52 ± 0,07	19,46 ± 1,48	5,59 ± 0,63	0,12 ± 0,03	0,14 ± 0,05

Dados apresentados em média ± desvio padrão. Valores expressos em percentual do total de ácidos graxos. Os somatórios dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados incluem ácidos graxos não apresentados na tabela.

Tabela 5.6 (continuação): Perfil de ácidos graxos dos alimentos crus e fritos.

Alimento	C14:1 (%)	C16:1 (%)	C18:1c n9 (%)	C18:1c n7 (%)	C20:1 (%)	C18:2 (%)	C18:3w3 (%)	C20:4 (%)	C22:6 (%)	C18:1t (%)	C18:2t (%)
Batata-frita (1ª fritura)	n.d.	0,07 ± 0,00	19,52 ± 0,15	1,46 ± 0,15	0,56 ± 0,00	57,10 ± 0,11	5,77 ± 0,01	n.d.	n.d.	n.d.	0,35 ± 0,00
Batata-frita (2ª fritura)	n.d.	n.d.	19,70 ± 0,36	1,43 ± 0,21	0,56 ± 0,00	57,86 ± 1,22	5,62 ± 0,21	n.d.	n.d.	n.d.	0,34 ± 0,00
Almôndega crua (3ª fritura)	0,13 ± 0,01	2,57 ± 0,06	33,46 ± 0,53	1,42 ± 0,11	1,12 ± 0,05	17,05 ± 0,86	0,30 ± 0,04	0,28 ± 0,02	n.d.	n.d.	0,19 ± 0,04
Almôndega frita (3ª fritura)	0,12 ± 0,01	1,85 ± 0,06	29,48 ± 0,35	1,16 ± 0,03	0,41 ± 0,03	27,47 ± 2,15	2,40 ± 0,20	0,19 ± 0,02	n.d.	n.d.	0,21 ± 0,03
Steak cru (4ª fritura)	0,04 ± 0,00	2,03 ± 0,13	27,11 ± 0,41	1,97 ± 0,02	0,19 ± 0,03	39,95 ± 0,85	0,77 ± 0,06	0,19 ± 0,01	0,15 ± 0,01	n.d.	0,04 ± 0,00
Steak frito (4ª fritura)	0,05 ± 0,01	1,99 ± 0,19	27,38 ± 0,62	1,09 ± 0,03	0,44 ± 0,01	42,19 ± 1,06	3,47 ± 0,10	0,22 ± 0,02	0,05 ± 0,00	n.d.	0,16 ± 0,00
Espetinho de frango cru (5ª fritura)	0,15 ± 0,02	5,62 ± 0,21	37,49 ± 0,14	2,46 ± 0,58	0,77 ± 0,07	17,38 ± 0,45	0,10 ± 0,00	1,82 ± 0,10	0,2 ± 0,02	0,19 ± 0,07	0,13 ± 0,04
Espetinho de frango frito (5ª fritura)	n.d.	1,27 ± 0,11	24,69 ± 0,64	1,81 ± 0,14	0,52 ± 0,06	45,58 ± 0,69	4,24 ± 0,07	0,46 ± 0,14	0,08 ± 0,02	0,16 ± 0,06	0,17 ± 0,13
Bife empanado cru (6ª fritura)	0,16 ± 0,09	2,25 ± 0,19	36,47 ± 3,46	2,39 ± 0,70	1,03 ± 0,70	15,27 ± 7,60	0,20 ± 0,01	2,10 ± 0,13	0,35 ± 0,01	0,25 ± 0,23	0,17 ± 0,03
Bife empanado frito (6ª fritura)	0,10 ± 0,05	0,60 ± 0,12	27,07 ± 2,72	1,57 ± 0,45	0,48 ± 0,09	42,64 ± 5,37	2,99 ± 1,33	0,21 ± 0,07	0,11 ± 0,01	0,17 ± 0,16	0,30 ± 0,03
Frango cru (7ª fritura)	0,12 ± 0,00	3,50 ± 0,00	37,48 ± 0,14	1,55 ± 0,42	0,32 ± 0,00	23,86 ± 0,08	1,71 ± 0,00	0,33 ± 0,01	n.d.	0,13 ± 0,01	0,08 ± 0,03
Frango frito (7ª fritura)	0,09 ± 0,02	3,01 ± 1,11	31,03 ± 1,82	1,59 ± 0,15	0,37 ± 0,02	34,77 ± 3,25	2,79 ± 0,30	0,36 ± 0,02	n.d.	n.d.	0,15 ± 0,04
Steak cru (8ª fritura)	0,05 ± 0,00	2,37 ± 0,06	28,43 ± 0,23	1,84 ± 0,08	0,20 ± 0,01	38,24 ± 0,25	0,87 ± 0,03	0,23 ± 0,02	0,13 ± 0,01	n.d.	0,05 ± 0,00
Steak frito (8ª fritura)	0,07 ± 0,01	2,92 ± 0,68	30,34 ± 1,83	1,49 ± 0,31	0,38 ± 0,06	36,45 ± 3,56	2,79 ± 0,28	0,25 ± 0,01	0,05 ± 0,01	n.d.	0,22 ± 0,21
Bife empanado cru (9ª fritura)	0,14 ± 0,03	2,26 ± 0,14	37,09 ± 0,17	1,61 ± 0,10	1,02 ± 0,05	18,86 ± 1,16	0,18 ± 0,02	2,07 ± 0,04	0,27 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,28 ± 0,05
Bife empanado frito (9ª fritura)	0,06 ± 0,00	1,10 ± 0,14	27,19 ± 2,31	1,70 ± 0,48	0,46 ± 0,01	41,51 ± 3,95	3,37 ± 0,94	0,24 ± 0,15	0,08 ± 0,00	n.d.	0,28 ± 0,02
Frango cru (10ª fritura)	0,13 ± 0,00	4,20 ± 0,02	38,11 ± 0,93	1,42 ± 0,28	0,31 ± 0,00	23,65 ± 0,06	1,67 ± 0,00	0,19 ± 0,01	n.d.	n.d.	0,06 ± 0,04
Frango frito (10ª fritura)	0,10 ± 0,01	2,96 ± 0,38	31,21 ± 2,14	1,64 ± 0,25	0,36 ± 0,05	33,25 ± 4,02	2,65 ± 0,50	0,35 ± 0,03	n.d.	n.d.	0,15 ± 0,09

Dados apresentados em média ± desvio padrão. Valores expressos em percentual do total de ácidos graxos. Os somatórios dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados incluem ácidos graxos não apresentados na tabela.

6. ARTIGO ORIGINAL II:

PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E ANÁLISE HISTOLÓGICA DE TECIDO HEPÁTICO DE ANIMAIS ALIMENTADOS COM ÓLEO UTILIZADO EM FRITURA POR IMERSÃO

6.1. RESUMO

Este estudo avaliou o efeito do consumo de óleo de fritura no perfil de ácidos graxos e na estrutura celular do tecido hepático de ratos wistar. Dietas contendo óleo fresco como controle e óleos de fritura com 13h38min e 23h28min de utilização foram administradas aos animais por 8 semanas. Após este período os animais sofreram eutanásia e o tecido hepático foi retirado para a análise. Não foram encontradas diferenças significativas no ganho de peso e na absorção de nutrientes pelos animais. O perfil de ácidos graxos do tecido hepático também não apresentou diferenças relevantes entre os grupos. A análise histológica indicou alterações na estrutura hepática dos animais, com quantidade significativa de esteatose hepática no tecido dos animais que consumiram o óleo com 23h28min de utilização. Os resultados do estudo indicam que, apesar do óleo utilizado não ter atingido os limites máximos de degradação química recomendados internacionalmente, seu consumo em quantidades normais foi suficiente para promover alterações histológicas em animais.

Palavras chave: óleo de fritura, esteatose hepática, ratos wistar, óleo de soja, perfil de ácidos graxos.

6.2. INTRODUÇÃO

Nas culturas ocidentais e nos países desenvolvidos a alta ingestão de gorduras é um padrão dietético extremamente difundido e está associado ao risco de doenças crônicas, como as doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (LIU e HUANG, 1995; EDER et al., 2003a). O consumo de alimentos fritos integra este padrão alimentar e pode contribuir significativamente para a ingestão diária de gorduras. Além disso, os alimentos fritos, dependendo das condições em que são preparados, podem fornecer também produtos de degradação dos ácidos graxos, decorrentes do processo de fritura.

Durante o processo de fritura, o óleo utilizado sofre alterações físico-químicas em decorrência da sua exposição ao calor, à umidade proveniente dos alimentos e ao oxigênio presente no ar, além de outros fatores como a presença de íons metálicos e resíduos alcalinos (BHATTACHARYA et al., 2008). Essas alterações resultam em produtos de degradação voláteis e não-voláteis, e que podem apresentar toxicidade, como os compostos carbonila, os polímeros de ácidos graxos e ácidos graxos cíclicos (CHOE e MIN, 2007). Uma das premissas do processo de fritura é a absorção, pelo alimento frito, do óleo utilizado. Os produtos de degradação não-voláteis, que permanecem no óleo de fritura, podem reagir com componentes do alimento formando compostos tóxicos ou serem também absorvidos, trazendo riscos à saúde do consumidor (SORIGUER et al., 2003).

A avaliação da extensão dos danos que o consumo de alimentos fritos, e conseqüentemente, dos compostos de degradação que o acompanham, pode causar é de extrema importância. Em animais, os estudos indicam que o consumo de óleos de fritura altera a composição das lipoproteínas plasmáticas (STAPRANS et al., 1996; EDER et al., 2003a), modifica o metabolismo lipídico no fígado (CHAO et al., 2005), diminui a retenção tecidual de α -tocoferol (LIU e HUANG, 1995), induz a intolerância à glicose (CHAO et al., 2007) e altera os níveis circulantes de enzimas hepáticas, indicando danos celulares (OWU et al., 1998). Em humanos, alguns efeitos deste consumo já foram estudados, como as alterações na atuação da enzima paraoxonase (SUTHERLAND, et al., 1999) e na função endotelial (RUEDA CLAUSEN et al., 2005).

Para que os resultados obtidos através destes estudos sejam compatíveis com a realidade do consumo dos alimentos fritos por humanos, é necessário que as condições experimentais se aproximem da forma de consumo real. A avaliação do consumo de gorduras que sofreram processo abusivo de aquecimento não reflete o consumo de óleos utilizados como meio para fritura em condições domésticas ou industriais. Em animais, a avaliação de óleo de fritura excessivamente degradado pode gerar respostas exacerbadas de toxicidade, como diarreia e perda de pêlos (NARASIMHAMURTHY et al., 1998).

Outra característica dos estudos com animais que deve ser cuidadosamente avaliada é a quantidade de gordura adicionada à dieta. A necessidade de lipídeos na dieta de roedores varia entre 4 e 7%, dependendo do estágio de vida do animal (REEVES et al., 1993). Estudos nos quais a quantidade de lipídeos adicionada à dieta ultrapassa este valor (LOPEZ VARELA

et al., 1995; PURUSHOTHAMA et al., 2003) podem ser úteis como amplificadores para o estudo de possíveis efeitos tóxicos, porém seus resultados devem ser analisados com cautela.

Considerando tais premissas, este estudo avaliou os efeitos do consumo de dietas normolipídicas contendo óleos utilizados para fritura em uma Unidade de Alimentação e Nutrição no perfil de ácidos graxos e na estrutura celular do tecido hepático de ratos *wistar*.

6.3. MATERIAIS E MÉTODOS

AMOSTRAS DE ÓLEO DE FRITURA

O processo de fritura em uma Unidade de Alimentação e Nutrição institucional foi acompanhado desde o carregamento da fritadeira até o descarte do óleo após a utilização. Foram coletadas amostras de óleo fresco, na metade das utilizações programadas e no momento do descarte. O óleo coletado foi armazenado sob refrigeração, em frascos âmbar, sob atmosfera de nitrogênio até a utilização para a preparação das dietas experimentais.

ANÁLISES DAS AMOSTRAS DE ÓLEO DE FRITURA

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO DE FRITURA

Para caracterização das amostras de óleo foram realizadas as seguintes determinações: Índice de Acidez (Cd 3d-63 – AOCS, 1994); Índice de Peróxido – Método Ácido acético/Clorofórmio (Cd 8-53 – AOCS, 1994); Determinação do teor de dienos conjugados, por absorvidade em 232nm (Ti 1a-64 – AOCS, 1994); Determinação do teor de compostos polares (Cd 20-91 – AOCS, 1994).

DETERMINAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO DAS AMOSTRAS DE ÓLEO

Para a determinação do perfil lipídico, as amostras de óleo coletadas foram esterificadas para obtenção dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, utilizando o método IUPAC Standard 2.301 (IUPAC, 1987). A identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa, comparando-se os tempos de retenção dos ésteres presentes nas amostras com os dos ésteres de ácidos graxos do padrão FAME mix (SIGMA[®], EUA).

Utilizou-se sistema de cromatografia gasosa GC-17A Shimadzu/Class GC, equipado com detector de ionização de chamas e com coluna cromatográfica de sílica fundida SP-2560 (*Biscyanopropil polysiloxane*) de 100 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. As condições de programação foram: temperatura do detector: 260 °C; temperatura do injetor: 250 °C; temperatura da coluna: início em 140 °C permanecendo nesta temperatura por 5 minutos; aquecimento até 240 °C, a uma taxa de 4 °C por minuto; permanecendo nesta temperatura por 20 minutos.

ENSAIO BIOLÓGICO

ANIMAIS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 24 ratos machos (*Rattus norvegicus*, var. *Albinus*, Rodentia, MAMMALIA) da linhagem “Wistar”, adultos jovens, com aproximadamente 250 g, procedentes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV e mantidos para experimentação no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável, em ambiente com temperatura controlada (21 ± 1 °C) e fotoperíodo de 12 horas.

Aos animais, foi oferecida a dieta AIN-93M (REEVES et al. 1993), em *pellets*, com 4% de lipídios. Os animais receberam água e dieta *ad libitum*, exceto nas 12 horas anteriores ao sacrifício, quando foram mantidos em jejum.

Foram formados 3 grupos experimentais, com 8 animais cada, que receberam alimentação que diferia unicamente em relação ao número de horas de utilização do óleo adicionado:

- Grupo Controle (Grupo CT): os animais foram alimentados com dieta produzida com óleo de soja não utilizado em fritura.
- Grupo Teste 1 (Grupo T13): os animais foram alimentados com dieta produzida com óleo de soja utilizado para fritura por 13h38 min.
- Grupo Teste 2 (Grupo T23): os animais foram alimentados com dieta produzida com óleo de soja utilizado para fritura por 23h28min.

Durante todo o período experimental a dieta oferecida foi pesada, bem como o resto deixado pelos animais. Duas vezes por semana os animais e as fezes eram pesados.

O tempo de estudo foi de nove semanas, dividido em uma semana de adaptação à dieta e oito semanas de experimento. Após este período foi realizado o sacrifício dos animais, por asfixia com dióxido de carbono. Os fígados foram coletados, pesados e divididos em duas partes. Uma das partes foi armazenada em -80 °C para as análises do perfil de ácidos graxos, e a outra parte foi armazenada em solução de formol tamponado (CARSON et al., 1973) para fixação e posterior análise histológica.

CÁLCULO DO COEFICIENTE DE EFICÁCIA ALIMENTAR, ABSORÇÃO APARENTE DE GORDURA E ÍNDICE HEPATOSOMÁTICO

O coeficiente de eficácia alimentar (CEA) foi calculado por semana; o índice de absorção aparente de gordura (AAG) foi calculado para dois momentos do experimento, na segunda e na última semana. O índice hepatosomático (IH) foi calculado ao final do experimento. Os cálculos de CEA, AAG e IH foram realizados a partir da aplicação das seguintes fórmulas:

$$\text{CEA} = \frac{\text{ganho de peso (g)}}{\text{consumo de dieta (g)}}$$

$$\text{AAG} = \frac{\text{peso de gordura nas fezes (g)}}{\text{peso ingerido de gordura (g)}}$$

$$\text{IH} = \frac{\text{peso do fígado (g)}}{\text{peso do animal (g)}}$$

DETERMINAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO DO TECIDO HEPÁTICO

Os lipídios do tecido hepático dos animais foram extraídos pelo método de FOLCH et al. (1957). Para a obtenção dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, os extratos lipídicos foram esterificados utilizando-se o método descrito por HARTMAN e LAGO (1973). As condições cromatográficas de análise foram as mesmas utilizadas para a análise dos óleos.

ANÁLISE HISTOQUÍMICA E MORFOMÉTRICA DO TECIDO HEPÁTICO

De cada grupo experimental foram escolhidos, aleatoriamente, cinco animais cujos fígados foram processados e analisados histologicamente. Fragmentos de tecido hepático foram fixados em solução de formol tamponado (CARSON, 1973) por uma semana após o sacrifício. Ao final desse período os fragmentos foram armazenados em solução de álcool etílico 70% em água.

Os fragmentos hepáticos foram desidratados em série etanólica crescente (70% - absoluto) e incluídos em resina à base de hidroxietilmetacrilato (Historesin[®], Leica). Secções não consecutivas de 3 µm de espessura (distantes entre si em, pelo menos, 30 µm) foram obtidas em micrótomato rotativo (RM2155, Leica) utilizando-se navalhas de vidro.

Os cortes obtidos foram corados com solução de azul de toluidina/borato de sódio 1% (BANCROFT e STEVENS, 1996). As lâminas foram imersas na solução corante por 30 segundos, lavadas em água corrente, secas em placa aquecedora e montadas em resina Entellan[®] (Merck).

Fragmentos de tecido hepático de dois animais aleatoriamente escolhidos nos grupos, foram fixados também com tetróxido de ósmio (OsO₄), buscando a preservação dos lipídios para a comprovação da presença destes nas vesículas encontradas. Algumas séries histológicas foram coradas com solução de Sulfato de Azul do Nilo adaptada de BANCROFT e STEVENS (1996), para a coloração diferenciada dos lipídios. A coloração com Sulfato de Azul do Nilo foi realizada da seguinte forma:

- Coloração dos cortes em lâmina imersa em solução de Sulfato de Azul do Nilo (recém preparada) em estufa a 60 °C por três horas;
- Diferenciação em ácido acético 1% por um minuto e meio, movimentando a lâmina;
- Lavagem em água corrente e morna por duas a quatro horas;
- Secagem da lâmina em placa aquecedora e montagem em resina Entellan[®] (Merck).

As imagens das secções histológicas foram capturadas em microscópio de luz *Olympus BX60* através de uma câmara de vídeo *Olympus Q color III* (Objetiva de 10x, projetiva de 3,3x imagens com resolução de 1024x768 pixels).

Para a quantificação dos glóbulos de gordura foram analisados dezesseis cortes histológicos de cada animal, sendo que em cada corte foram realizadas dez fotografias em áreas distintas. Com o auxílio do software *Image-Pro Plus*, versão 4.5 (Media Cybernetics) foi aplicada sobre cada fotografia uma máscara que continha 160 pontos localizados aleatoriamente. A partir desta máscara foram contados quantos destes pontos se localizavam sobre regiões com presença de glóbulos de gordura. Os valores resultantes desta contagem foram utilizados para a comparação entre os grupos experimentais.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas através do programa SigmaStat, versão 2.0. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para avaliar a adequação dos dados à distribuição normal. Para comparação entre as amostras foi realizada a Análise de Variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey para a comparação múltipla das médias. Quando os dados não se adequaram à distribuição normal foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido dos testes de Tukey ou Dunn's para comparação entre as médias. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão ou em mediana.

6.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

CONSUMO ALIMENTAR, ABSORÇÃO DE LIPÍDEOS E GANHO DE PESO

Durante o experimento foram coletados dados sobre o consumo de dieta, o peso dos animais e a quantidade de fezes, que foram utilizados para o cálculo dos valores de Coeficiente de Eficácia Alimentar e Coeficiente de Absorção Aparente de Lipídeos e do ganho de peso. Após a eutanásia, os fígados dos animais foram pesados e foi realizado o cálculo do índice hepatossomático. Apesar da tendência de menor ganho de peso e menor Coeficiente de absorção aparente de gordura no grupo que consumiu o óleo utilizado por 23h38min para fritura, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos para nenhuma das variáveis estudadas (**Tabela 6.1**). Esses dados indicam que a degradação sofrida pelo óleo não foi suficiente para causar sintomas agudos observados quando do consumo de gorduras oxidadas.

A ocorrência de menor ganho de peso em animais em crescimento que consumiram dietas experimentais com óleos termicamente oxidados está associada à ingestão reduzida de ácidos graxos essenciais perdidos durante o aquecimento (LOPEZ-VARELA et al., 1995). Além disso, a digestibilidade de lipídeos termicamente oxidados é reduzida, pela presença de polímeros de triacilgliceróis, o que poderia comprometer a absorção e o metabolismo dos ácidos graxos (EDER, 1999).

Tabela 6.1: Consumo alimentar, absorção de gordura e ganho de peso em animais que consumiram óleo de soja utilizado para fritura.

	<i>Grupo CT</i>	<i>Grupo T13</i>	<i>Grupo T23</i>
Ganho de peso	161,8 ± 31,7 ^a	156,3 ± 50,7 ^a	144,3 ± 34,8 ^a
IHS	3,4 ± 0,4 ^a	3,5 ± 0,4 ^a	3,5 ± 0,3 ^a
CEA	0,11 ± 0,02 ^a	0,11 ± 0,03 ^a	0,10 ± 0,02 ^a
CAAG			
Início	15,4 ± 1,0 ^a	13,8 ± 1,0 ^a	12,2 ± 0,3 ^a
Semana 8	19,5 ± 4,1 ^a	19,1 ± 2,0 ^a	17,1 ± 2,6 ^a

Grupo CT: grupo controle / Grupo T13: grupo teste com óleo utilizado por 13h28min / Grupo T23: grupo teste com óleo utilizado por 23h38min. **IHS**: índice hepato-somático. **CEA**: Coeficiente de eficácia alimentar. **CAAG**: Coeficiente de absorção aparente de gordura. ^a: Valores seguidos por letras iguais, em cada linha, não diferem entre si. Análise de Variância. Valores expressos em média ± desvio padrão,

TOTANI e colaboradores (2006a) encontraram resultados semelhantes, sem diferenças no peso total e no peso dos órgãos de animais alimentados com dietas contendo 7% de gordura oxidada. Também BATTINO e colaboradores (2002) não observaram diferenças significantes nessas variáveis em animais alimentados com dietas com 8% de lipídeos, provenientes de frituras.

Os diferentes resultados em relação ao consumo de dieta e o ganho de peso entre animais que consumiram ou não gordura oxidada são encontrados em estudos em que as gorduras testadas passaram por tratamentos extremos de temperatura, com alto grau de degradação. Além disso, os animais foram submetidos a dietas com teores lipídicos muito além das recomendações nutricionais para roedores, que variam entre 4 e 7%, e que equivalem às recomendações de ingestão adequada de lipídeos para humanos (TOTANI e OJIRI, 2007a).

NWANGUMA et al., (1999) observaram diferenças no ganho de peso e no índice hepatossomático entre os grupos consumindo óleo de milho fresco ou termicamente oxidado, com 12% de lipídeos na dieta. Em outro estudo, com 15% de lipídeos contendo aproximadamente 27% de compostos polares na dieta, apesar da ingestão semelhante de dieta entre os grupos teste e controle, houve um menor ganho de peso nos animais que receberam gordura oxidada (GARRIDO-POLONIO et al., 2004).

Com isso, ressaltamos a importância da realização de estudos que se aproximem mais da realidade do consumo de gorduras, e que não façam uso de condições extremas para determinar os efeitos metabólicos do consumo de óleos e gorduras termicamente oxidadas.

PERFIL LIPÍDICO DAS DIETAS E DO TECIDO HEPÁTICO DOS ANIMAIS

Os diferentes tipos de ácidos graxos consumidos na dieta têm reflexos diferentes no metabolismo lipídico e no risco de doenças. O consumo excessivo de ácidos graxos saturados e ácidos graxos *trans* têm a capacidade de promover o aumento dos níveis séricos de colesterol, com prejuízo no perfil de lipoproteínas plasmáticas e maior risco de doenças cardiovasculares (WAHRBURG, 2004).

Para o consumo dos ácidos graxos monoinsaturados, em especial o ácido oléico (C18:1 ω9), quando associados a um baixo consumo de ácidos graxos saturados, observa-se a redução dos níveis séricos de LDL-colesterol e a associação a uma menor chance de desenvolvimento de doença cardiovascular (WAHRBURG, 2004).

A análise do perfil de ácidos graxos indicou alterações na composição dos óleos utilizados para fritura. A **Tabela 6.2** mostra os dados de perfil lipídico dos óleos utilizados nas dietas. Houve diferenças significantes entre os três óleos utilizados, sendo que o óleo do Grupo T23 diferiu do óleo do grupo controle em todas as classes de lipídeos (saturados, monoinsaturados, poliinsaturados e *trans*). Já para o óleo do grupo T13, cujo tempo de utilização para fritura foi menor que o do grupo T23, não houve diferenças significantes para todos os ácidos graxos, comparando-se com os outros grupos.

Tabela 6.2: Perfil de ácidos graxos e características dos óleos de fritura utilizados nas dietas consumidas pelos animais dos grupos experimentais.

	Grupo CT	Grupo T13	Grupo T23
Perfil de ácidos graxos (%)			
C14.0	n.d.	0,18 ± 0,00	0,30 ± 0,00
C16.0	10,61 ± 0,03 ^a	12,12 ± 0,00 ^b	15,36 ± 0,04 ^c
C18.0	3,18 ± 0,01	3,95 ± 0,01	4,34 ± 0,00
C20.0	0,27 ± 0,00	0,27 ± 0,00	0,20 ± 0,00
C22.0	0,37 ± 0,00	0,35 ± 0,00	0,17 ± 0,15
C16.1	n.d.	0,26 ± 0,00	1,46 ± 0,01
C18.1t	n.d.	0,26 ± 0,01	0,33 ± 0,04
C18.1c n9	19,26 ± 0,12 ^a	20,48 ± 0,02 ^b	25,63 ± 0,1 ^c
C18.1c n7	1,76 ± 0,20	1,89 ± 0,16	1,90 ± 0,25
C20.1	0,56 ± 0,00	0,53 ± 0,04	1,64 ± 2,06
C18.2t	0,28 ± 0,11	0,28 ± 0,10	0,23 ± 0,09
C18.2c	57,39 ± 0,08 ^a	53,78 ± 0,07 ^b	44,9 ± 0,07 ^c
C18.3w3	5,77 ± 0,06 ^a	5,04 ± 0,03 ^b	2,65 ± 2,29 ^c
C20.4	n.d.	n.d.	0,10 ± 0,00
C22.6	n.d.	n.d.	0,03 ± 0,05
Σ Saturados	14,43 ± 0,02 ^a	16,86 ± 0,01 ^a	20,38 ± 0,19 ^b
Σ Monoinsaturados	21,56 ^a	23,42 ^{ab}	29,68 ^b
Σ Poliinsaturados	63,87 ^a	59,49 ^{ab}	49,55 ^b
Σ Trans	0,28 ± 0,11 ^a	0,54 ± 0,10 ^b	0,56 ± 0,06 ^b
Índice de acidez	0,15 ± 0,01 ^a	0,36 ± 0,02 ^b	0,57 ± 0,00 ^c
Índice de peróxido	3,51 ± 0,37 ^a	5,29 ± 0,36 ^b	3,53 ± 0,36 ^a
Teor de dienos conjugados	0,4 ^a	0,61 ^b	0,52 ^b
Teor de compostos polares	7,38 ± 0,72 ^a	9,91 ± 0,97 ^a	6,06 ± 2,64 ^a

Grupo CT: grupo controle / Grupo T13: grupo com dieta teste com óleo utilizado por 13h38min / Grupo T23: grupo com dieta teste com óleo utilizado por 23h28min. ^{a b c} : Valores seguidos por pelo menos uma letra igual, em cada linha, não diferem entre si. Valores expressos em média ± desvio padrão, exceto para somatório de monoinsaturados, poliinsaturados e teor de dienos conjugados, que não apresentaram distribuição normal, expressos em mediana. Análise de Variância ou Teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, com nível de significância de 5%. Os somatórios dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados incluem ácidos graxos não apresentados na tabela.

As alterações ocorridas nos óleos de fritura, com aumento dos ácidos graxos saturados e trans e redução dos ácidos graxos poliinsaturados indicam que o consumo de óleos utilizados para fritura por imersão pode ter efeito sobre as lipoproteínas plasmáticas, aumentando o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Este efeito não foi avaliado em nosso estudo, mas outros autores fizeram esta avaliação e encontraram correlações positivas.

Seguindo o padrão dos óleos administrados nas dietas, a análise do perfil de ácidos graxos do tecido hepático dos animais indicou pequenos aumentos nos percentuais de ácidos graxos monoinsaturados e de ácidos graxos trans, além de pequena redução no percentual de ácidos poliinsaturados, observados pela comparação entre os grupos. Entretanto, essas alterações não foram significativas. Além disso, comparando-se os percentuais de cada um dos ácidos graxos entre os grupos, não houve diferença significativa para nenhum deles no tecido hepático (**Tabela 6.3**). Este resultado está de acordo com o encontrado por LOPEZ-VARELA (1995), que não indicou alterações significativas no perfil de ácidos graxos, exceto para o aumento no teor de ácido araquidônico e para a redução de ácido linoléico em um estudo de 27 dias com ratos. Entretanto, essas alterações podem ser justificadas pelo alto nível de degradação do óleo utilizado em relação ao avaliado neste estudo.

Tabela 6.3: Perfil de ácidos graxos e contagem de glóbulos de gordura no tecido hepático de ratos *Wistar* que consumiram óleo de soja utilizado para fritura.

	Grupo CT	Grupo T13	Grupo T23
Perfil de ácidos graxos (%)			
C14.0	0,73 ± 0,19 ^a	0,76 ± 0,21 ^a	0,65 ± 0,33 ^a
C16.0	26,49 ± 4,74 ^a	27,41 ± 3,4 ^a	26,51 ± 2,78 ^a
C18.0	8,81 ± 2,22 ^a	8,00 ± 2,50 ^a	7,14 ± 2,35 ^a
C16.1	6,03 ± 2,13 ^a	5,84 ± 1,64 ^a	6,57 ± 1,42 ^a
C18.1t	0,08 ± 0,05 ^a	0,08 ± 0,05 ^a	0,12 ± 0,07 ^a
C18.1c n9	21,52 ± 4,42 ^a	21,99 ± 4,77 ^a	24,54 ± 5,19 ^a
C18.1c n7	3,73 ± 0,62 ^a	3,79 ± 0,65 ^a	4,08 ± 0,65 ^a
C18.2t	0,07 ± 0,05 ^a	0,10 ± 0,05 ^a	0,12 ± 0,06 ^a
C18.2c	13,96 ± 4,03 ^a	13,95 ± 2,32 ^a	12,69 ± 2,11 ^a
C18.3w3	0,38 ± 0,28 ^a	0,53 ± 0,13 ^a	0,45 ± 0,12 ^a
C20.4	12,31 ± 3,89 ^a	11,87 ± 4,35 ^a	11,11 ± 4,38 ^a
C22.6	2,56 ± 0,75 ^a	2,53 ± 0,84 ^a	2,04 ± 0,91 ^a
∑ Saturados	36,03 ± 3,06 ^a	36,17 ± 2,53 ^a	34,29 ± 2,08 ^a
∑ Monoinsaturados	31,36 ± 5,59 ^a	31,71 ± 5,91 ^a	35,31 ± 5,72 ^a
∑ Poliinsaturados	29,29 ± 7,76 ^a	28,99 ± 6,5 ^a	26,41 ± 6,19 ^a
∑ Trans	0,15 ± 0,11 ^a	0,18 ± 0,11 ^a	0,24 ± 0,13 ^a
AGS/AGMI*	1,17 ± 0,15 ^a	1,18 ± 0,30 ^a	0,99 ± 0,18 ^a
C18:2/C20:4	1,18 ± 0,28 ^a	1,31 ± 0,47 ^a	1,34 ± 0,59 ^a
Contagem de glóbulos de gordura – tecido hepático (%)	6,9 ^a	8,12 ^a	11,9 ^b

Grupo CT: grupo controle / Grupo T13: grupo com dieta teste com óleo utilizado por 13h38min / Grupo T23: grupo com dieta teste com óleo utilizado por 23h28min. ^{a,b}: Valores seguidos por pelo menos uma letra igual, em cada linha, não diferem entre si. Valores expressos em média ± desvio padrão, exceto contagem de glóbulos, que não apresentou distribuição normal, expresso em mediana. Análise de Variância ou Teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, com nível de significância de 5%. Os somatórios dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados incluem ácidos graxos não apresentados na tabela. *AGS: Ácidos Graxos Saturados, AGMI: Ácidos Graxos Monoinsaturados.

Um estudo realizado por NARASIMHAMHURTHY e colaboradores (1998) apresentou diferenças importantes no perfil de ácidos graxos de eritrócitos de animais alimentados com óleos termicamente oxidados e utilizados para fritura. Entretanto, o período de estudo elevado (20 semanas) pode ter contribuído para essas diferenças. Como nossos dados apresentaram uma tendência a alterações, acreditamos que um tempo maior de estudo seja mais adequado para elucidar as alterações nos perfis de ácidos graxos no tecido hepático de animais que consumiram óleo de fritura.

A dessaturação de alguns ácidos graxos, como os ácidos graxos essenciais, é uma etapa da formação dos ácidos graxos altamente insaturados, como o ácido araquidônico (C20:4), o ácido eicosapentaenóico-EPA (20:5 ω -3) e o ácido docosahexaenóico-DHA (C22:6 ω -3), que são constituintes de membranas celulares e precursores de eicosanóides. A razão entre as concentrações dos substratos e dos produtos desse metabolismo é usada como medida da ação das enzimas que catalisam as reações de dessaturação. O consumo de óleo termicamente oxidado pode causar alterações na ação das enzimas dessaturases, causando prejuízos no metabolismo lipídico (EDER, 1999).

As enzimas Δ 5-dessaturase e Δ 6-dessaturase fazem parte do metabolismo de conversão do ácido linoléico em ácido araquidônico, além de outras vias metabólicas. O aumento das concentrações de ácido linoléico associado à redução nas concentrações de ácido araquidônico indica diminuição na atividade destas enzimas (NARASIMHAMHURTHY et al., 1998). Já a enzima Δ 9-dessaturase, é responsável pela conversão de ácidos graxos saturados como o ácido palmítico e o ácido esteárico em ácidos graxos monoinsaturados. A atividade desta enzima pode ser avaliada pela alteração da proporção entre ácidos graxos saturados e monoinsaturados, sendo que a presença elevada do substrato indica redução da atividade enzimática (EDER, 1999). Em nosso estudo não foi encontrada diferença significativa entre os grupos para a razão 18:2/20:4, nem para a razão AGS/AGMI, o que indica que as alterações sofridas pelo óleo ou a duração do consumo de óleo utilizado para fritura não foram suficientes para interferir no metabolismo lipídico.

ANÁLISE HISTOQUÍMICA E MORFOMÉTRICA DO TECIDO HEPÁTICO

O consumo de gorduras termicamente oxidadas ou utilizadas para fritura tem sido relacionado a alterações no metabolismo e danos ao tecido hepático em vários estudos. O consumo de óleo de palma utilizado para fritura promove aumentos significantes nos níveis séricos de alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e fosfatase alcalina, enzimas presentes no tecido hepático e que, quando encontradas em níveis aumentados na circulação sanguínea, indicam danos celulares no fígado (OWU et al., 1998). Além disso, o consumo de gorduras termicamente oxidadas aumenta a expressão de genes regulados pelos receptores PPAR α , que são receptores nucleares responsáveis pela expressão de genes do metabolismo lipídico e da homeostase de glicose (SÜLZLE et al., 2004).

Em nosso estudo, a avaliação histológica indicou a ocorrência de esteatose hepática nos animais que consumiram óleo utilizado para fritura (**Figura 6.1**). A quantificação realizada

por amostragem da área do corte histológico mostrou que houve diferença significativa na presença de glóbulos de gordura entre os grupos, sendo que o grupo de animais que consumiu óleo de fritura utilizado por 23h38min apresentou maior nível de esteatose hepática. O grupo controle e o grupo de animais que consumiram óleo com 13h24min de uso para fritura não apresentaram diferenças significantes entre si. Os dados da análise histológica estão apresentados na **Tabela 6.3**. Para a confirmação da presença de gordura nos glóbulos presentes nos cortes, foi realizada a fixação de fragmentos de tecido com tetróxido de ósmio e a coloração dos cortes com sulfato de Azul do Nilo, para diferenciação dos lipídeos. Foi confirmada a presença da gordura nos glóbulos presentes no tecido (**Figura 6.2**).

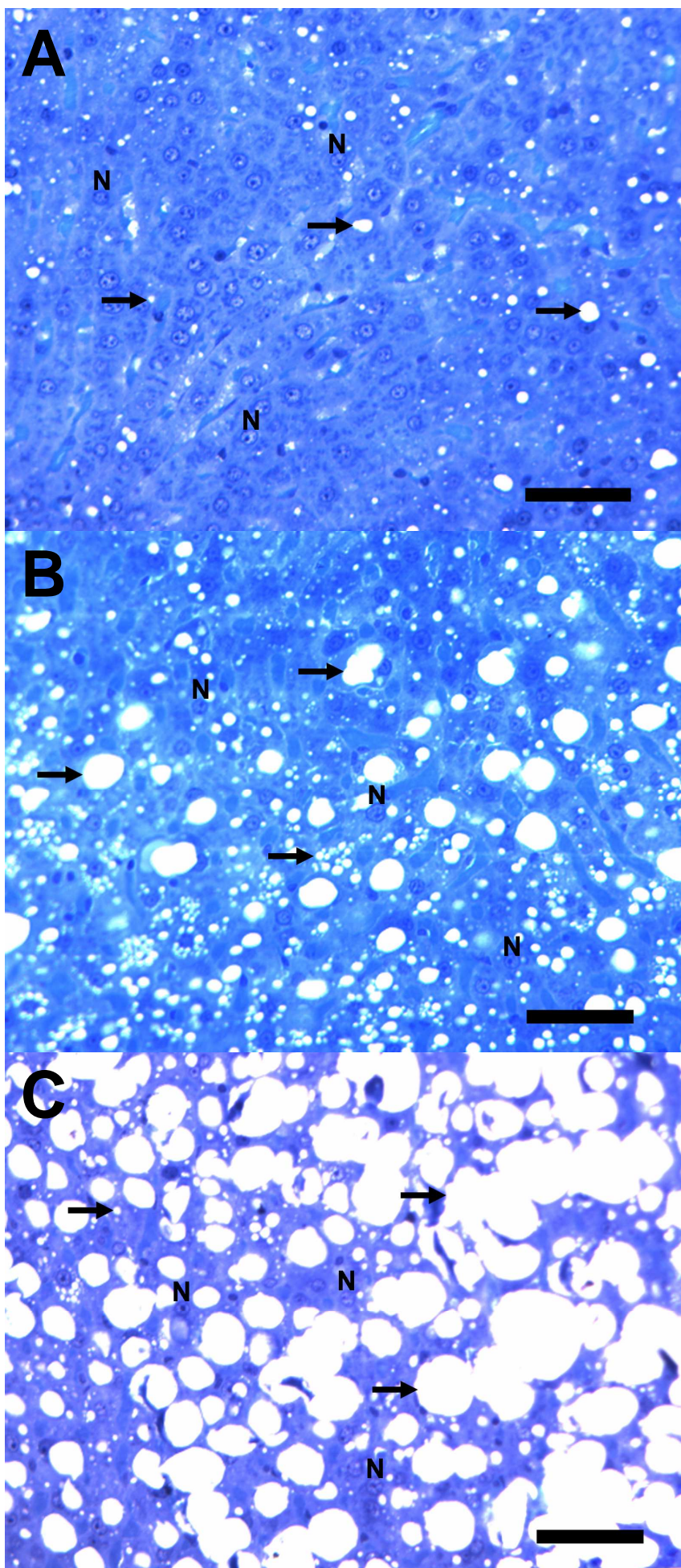
A presença da esteatose hepática nos animais pode ter sido desencadeada por vários fatores. Na análise histológica, foi observado que o dano no tecido hepático ocorre de forma característica, com a distribuição do dano de forma concentrada em torno do espaço porta, sendo que a intensidade da presença de glóbulos de gordura diminuía à medida que as células se distanciavam deste ponto central (**Figura 6.3**).

O espaço porta é uma estrutura do tecido hepático composto predominantemente de uma vênula, uma ateríola derivada da artéria hepática, e de um ducto biliar. A vênula presente neste espaço é derivada da veia porta, que tem a função de trazer até o fígado grande aporte de nutrientes e substâncias absorvidas pelo intestino. Com isso, todo o tipo de substâncias absorvidas, inclusive as tóxicas, são levadas diretamente ao fígado, o que pode causar danos celulares. O comportamento diferenciado entre as células próximas ao espaço porta em relação àquelas próximas ao centro do lóbulo hepático indica a presença de substâncias tóxicas ao hepatócito no sangue proveniente do intestino (JONES e SPRING-MILLS, 1988).

As reações de hidrólise, oxidação e polimerização ocorridas nas moléculas de gordura em decorrência do processo de fritura podem produzir substâncias com efeitos tóxicos para o consumidor de alimentos fritos. Portanto, devido à característica encontrada na formação da esteatose hepática, acreditamos que o dano causado às células seja decorrente da presença de alguma substância tóxica no óleo, formada no processo de fritura.

Em um estudo realizado por 12 semanas, com animais que consumiram óleo utilizado para fritura (mistura de soja e canola) em indústria, também foram encontradas alterações no tecido hepático dos animais. O autor identificou manchas vermelhas na superfície externa do órgão e alterações histológicas como necrose e gotículas de gordura, porém não foi realizada análise quantitativa dos dados (TOTANI e OJIRI, 2007b).

Figura 6.1: Observações histológicas típicas de fígado dos animais dos grupos experimentais. A: aspecto geral dos cortes dos animais do grupo controle (CT). B: aspecto geral das lesões encontradas nos animais do grupo T13. Em C, aspecto da lesão no fígado dos animais do grupo T23. A-C: seta indica glóbulos de gordura, n indica os núcleos celulares, e * indica vasos sanguíneos. Barra = 160µm.



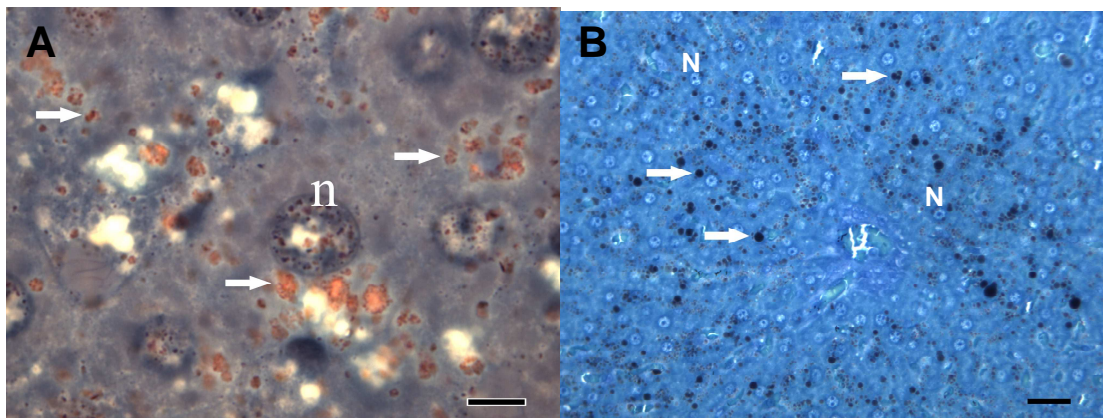


Figura 6.2: Fotomicrografias de secções histológicas de fígado de ratos fixadas com tetróxido de ósmio. A: corte submetido à coloração com Sulfato de Azul do Nilo, n: núcleo do hepatócito e setas: glóbulos com coloração diferenciada devido à presença de gordura. Barra = 20 μ m. B: corte submetido à coloração com azul de toluidina, n: núcleo do hepatócito e setas: glóbulos preenchidos com gordura oxidada pela ação do tetróxido de ósmio. Barra = 80 μ m.

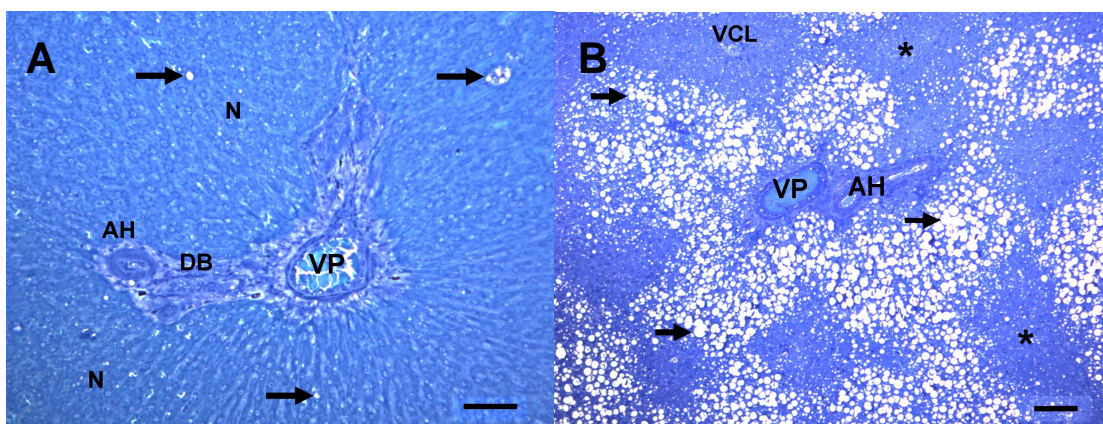


Figura 6.3: Fotomicrografias de secções histológicas de fígado de ratos na região de um espaço porta. A: corte submetido à coloração com azul de toluidina, n: núcleo dos hepatócitos, setas: glóbulos de gordura, VP: ramo da veia porta, AH: ramo da artéria hepática e DB: ducto biliar. Barra = 200 μ m. B: corte submetido à coloração com azul de toluidina, setas: glóbulos de gordura, VP: ramo da veia porta, AH: ramo da artéria hepática, VCL: veia centro-lobular, *: redução do dano ao tecido hepático à medida que se distancia do espaço porta. Barra = 400 μ m.

Em outro estudo, os autores citam ter encontrado manifestações de acúmulo de gordura no entorno de uma veia, no tecido hepático de ratos *wistar*, após o consumo de dietas contendo 7% de óleo utilizado para fritura (mistura de soja e canola), por 8 semanas (TOTANI et al., 2006a). O mesmo grupo de pesquisadores desenvolveu um estudo semelhante ao anterior, porém utilizando ratos SHR/NDmc-cp (modelo animal obeso, espontaneamente hipertenso e diabético). Neste estudo os autores encontraram gotículas de gordura tanto no tecido hepático do grupo controle (óleo de soja fresco) como no grupo teste, porém, a intensidade e o tamanho das lesões eram maiores para o grupo teste, sendo que este também apresentou necrose (TOTANI et al., 2006b).

Da mesma forma, LOPEZ-VARELA e colaboradores (1995) encontraram áreas de fibrose degenerativa e a presença de grande quantidade de hepatócitos binucleados jovens, indicando processo regenerativo no tecido hepático de quase todos os animais estudados. Observaram também a presenças de grandes áreas com vacuolização.

Portanto, os resultados obtidos em nosso estudo, associados aos descritos na literatura, indicam que o consumo de óleo termicamente oxidado ou utilizado para fritura pode causar danos no tecido hepático de animais, e este dano está diretamente relacionado à absorção de substâncias tóxicas pelo intestino e o transporte destas até o fígado.

6.5. CONCLUSÃO

Este estudo indicou que o processo de fritura realizado no óleo foi suficiente para promover alterações na sua composição de ácidos graxos após as frituras, apesar da concentração dos compostos de degradação formados não ter atingido o limite de utilização do óleo.

O consumo do óleo de fritura não causou alterações importantes no perfil de ácidos graxos teciduais nem no ganho de peso dos animais, porém, apesar da degradação do óleo ter sido relativamente pequena e do tempo de exposição ao óleo de fritura não ter sido muito extenso, o consumo do óleo provocou danos consideráveis no tecido hepático dos animais.

Com isso, acredita-se que os limites químicos de degradação para o óleo de fritura, adotados internacionalmente, não são seguros o suficiente para regulamentar o consumo do óleo sem risco de danos à saúde do consumidor. Portanto, novos estudos devem ser realizados para a discussão de métodos e limites mais apropriados para avaliação da qualidade do óleo, além do desenvolvimento de métodos que reduzam a concentração de compostos de degradação do óleo de forma segura e custo acessível.

8. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS:

Os resultados do estudo indicam que, apesar do período de 23h38min de utilização do óleo analisado, não foram atingidos os limites máximos de degradação química de óleo de fritura reconhecidos internacionalmente. Porém, as alterações observadas no perfil lipídico e no teor de vitamina E do óleo de fritura e no perfil lipídico dos alimentos fritos indicam que ocorreram alterações nutricionais importantes após a utilização deste método de cocção nas condições deste estudo. Estas alterações resultaram de forma negativa no valor nutricional dos alimentos. Associado à isto, encontrou-se que o consumo, por ratos *wistar*, de dietas normolipídicas contendo o óleo de fritura analisado foi suficiente para promover alterações histológicas consideráveis no tecido hepático destes animais.

Desta forma, os resultados encontrados indicam que os efeitos deletérios associados ao óleo de soja utilizado para fritura por imersão podem ser observados em animais experimentais mesmo que o óleo não seja excessivamente utilizado e que os limites de degradação não sejam atingidos.

Com isso, outros estudos devem ser realizados para que o mecanismo do dano causado aos animais seja elucidado e para que o composto causador do dano seja identificado. Para isso, sugere-se:

- A avaliação mais completa da atividade hepática, como a avaliação do funcionamento hepático e do metabolismo lipídico no fígado para que seja conhecida a extensão do dano causado pelo consumo do óleo utilizado para a fritura.
- A avaliação do possível dano causado pelo consumo de óleo de fritura em outros órgãos dos animais, como os pertencentes ao trato gastrointestinal, para que se avalie se os compostos presentes no óleo também lesam outros tecidos.
- O estudo dos compostos presentes nos óleos utilizados para fritura e a avaliação da capacidade tóxica de cada composto ou das classes de compostos.
- O estudo e a definição de um método de análise da degradação dos óleos utilizados para fritura que se correlacione bem com os danos provocados pelo consumo do óleo de fritura.

Além da elucidação dos mecanismos causadores do dano aos animais e do estabelecimento de novos padrões de análise para óleos de fritura, é necessária também a ampliação do conhecimento sobre a utilização de óleo de frituras em outros tipos de unidades produtoras de alimentos.

Os resultados aqui encontrados se aplicam somente às condições de utilização e de equipamentos da Unidade de Alimentação e Nutrição avaliada, sendo necessário que mais estudos sejam realizados, avaliando os outros tipos de equipamentos de fritura e outros tipos de serviço, como restaurantes comerciais e lanchonetes, que se utilizam com frequência de fritura em seus cardápios.

Associada a todas estas avaliações, é de extrema importância a realização de estudos para o levantamento do consumo de alimentos fritos na dieta cotidiana da população, para a avaliação do grau de degradação dos óleos comumente utilizados para a fritura e para a elucidação dos efeitos do consumo de óleo de fritura em humanos em condições reais.

Para as Unidades de Alimentação e Nutrição que utilizam condições semelhantes às encontradas neste estudo, a principal indicação é a retirada de alimentos preparados por fritura dos cardápios. Porém, em virtude da dificuldade da implementação desta medida, sugere-se que a quantidade de fritura realizada seja o mínimo possível, de preferência utilizando-se sempre óleo novo. Não é aconselhável o prolongamento do tempo de utilização do óleo para fritura.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERC - Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas. Mercado Real de Refeições. Disponível em: <www.aberc.com.br>. Acesso em 09 de abril de 2008.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe técnico, n.11, 5 out. 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/11_051004.htm>. Acesso em 09 de abril de 2008.
- AOCS. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society. Champaign: AOCS. 1994.
- ARAÚJO, J. M. A. Oxidação de lipídios em alimentos. In: ARAÚJO, J. M. A. Química de alimentos: teoria e prática. Viçosa: UFV, 2004.
- BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. Theory and practice of histological techniques. New York: Churchill Livingstone. 1996.
- BARRERA-ARELLANO, D.; RUIZ-MÉNDEZ, V.; RUIZ, G. M.; DOBARGANES, C. Loss of Tocopherols and formation of degradation compounds in triacylglycerol model systems heated at high temperature. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.79, p.1923-1928, 1999.
- BATTINO M.; QUILES, J. L.; HUERTAS, J. R.; RAMIREZ-TORTOSA, M. C.; CASSINELO, M.; MAÑAS, M.; LOPEZ-FRIAS, M.; MATAIX, J. Feeding fried oil changes antioxidant and fatty acid pattern of rat and affects rat liver mitochondrial respiratory chain components. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v.34, n.2, p.127-134, 2002.
- BESBES, S.; BLECKER, C.; DEROANNE, C.; LOGNAY, G.; DRIRA, N.; ATTIA, H. Heating effects on some quality characteristics of date seed oil. *Food Chemistry*, v. 91, p. 469–476, 2005.
- BHATTACHARYA, A. B.; SAJILATA, M. G.; SINGHAL, R. S. Lipid profile of fried foods in thermally polymerized palm oil. *Food Chemistry*. 2008. doi:10.1016/j.foodchemistry.2008.01.027
- CARDOSO, R. C.; SOUZA, E. V. A.; SANTOS, P. Q. Unidades de alimentação e nutrição nos campi da Universidade Federal da Bahia: um estudo sob a perspectiva do alimento seguro. *Revista de Nutrição*, v.18, n.5, p.669-680, set.-out. 2005.
- CARERE, A. Genotoxicity and carcinogenicity of acrylamide: a critical review. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, v.42, n.02, p.144-155, 2006.
- CARSON, F. L.; MARTIN, J. H.; LYNN, J. A. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *American Journal of Clinical Pathology*, v.59, p.365-373, 1973.
- CELLA, R. C. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. Comportamento do óleo de soja refinado utilizado em fritura por imersão com alimentos de origem vegetal. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.22, n.2, p.111-116, mai.-ago. 2002.

- CHAO, P.; CHAO, C. Y. LIN, F. J.; HUANG C. J. Oxidized frying oil up-regulates hepatic acyl-CoA oxidase and cytochrome P₄₅₀ 4 A1 genes in rats and activates PPAR α . *Journal of Nutrition*, v.131, p.3166-3174, 2001.
- CHAO, P.; HUANG, H.; LIAO, C.; HUANG, S.; HUANG, C. A high oxidised frying oil content diet is less adipogenic, but induces glucose intolerance in rodents. *British Journal of Nutrition*, v.98, p.63–71, 2007.
- CHAO, P.; YANG, M.; TSENG, Y.; CHANG, K.; LU, K.; HUANG, C. Peroxisome proliferation in liver of rats fed oxidizes frying oil. *Journal of Nutrition Science and Vitaminology*, v.51, p.361-368, 2005.
- CHATZILAZAROU, A.; GORTZI, O.; LALAS, S.; ZOIDIS, E.; TSAKNIS, J. Physicochemical changes of olive oil and selected vegetable oils during frying. *Journal of Food Lipids*, v.13, p.37-35, 2005.
- CHE MAN, Y. B.; WAN HUSSIN, W.R. Comparison of the frying performance of refined, bleached and deodorized palm olein and coconut oil. *Journal of Food Lipids*, v.5, p.197-200, 1998.
- CHOE, E.; MIN, D. B. Chemistry of deep-fat frying oils. *Journal of Food Science*, v. 72, n.5, p. R77-R86, 2007.
- CORSINI, M. S.; JORGE, N. Estabilidade oxidativa de óleos vegetais utilizados em frituras de mandioca palito congelada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.1, p.27-32, 2006.
- COSTA-NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*, v.23, n.4, p.531-537, 2000.
- DANIEL, D. R.; THOMPSON, L. D.; SHRIVER, B. J.; WU, C.; HOOVER, L. C. Nonhydrogenated cottonseed oil can be used as a deep fat frying medium to reduce *trans*-fatty acid content in french fries. *Journal of the American Dietetic Association*, v.105, n.12, p.1927-1932, 2005.
- DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Comportamento de óleos vegetais em frituras descontínuas de produtos pré-fritos congelados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.1, p.56-63, 2006.
- DOBARGANES, M. C.; MARQUEZ-RUIZ, G. Formation and analysis of oxidized monomeric dimeric and higher oligomeric triglycerides. In: ERICKSON, M. D. *Deep frying: chemistry, nutrition, and practical applications*. Urbana: AOCS Press, 2007. cap.6.
- EDER, K. The effect of dietary oxidized oil on lipid metabolism in rats. *Lipids*, n.34, p.717-725. 1999.
- EDER, K.; KELLER, U.; HIRCHE, F.; BRANDSCH, C. Thermally oxidized dietary fats increase the susceptibility of rat LDL to lipid peroxidation but not their uptake by macrophages. *Journal of Nutrition*, v. 133, p.2830–2837, 2003a.

- EDER, K.; SÜELZLE, A.; SKUFCA, P.; BRANDSCH, C.; HIRCHE, F. Effects of dietary thermoxidized fats on expressions and activities of hepatic lipogenic enzymes in rats. *Lipids*, v.38, n.1, p.31-38, 2003b.
- EITENMILLER, R. R. Vitamin E content of fats and oils - nutritional implications. *Food Technology*, v.51, n.5, p.78-81, 1997.
- FARHOOSH, R.; MOOSAVI, S. M. R. Rancimat test for the assessment of used frying oils quality. *Journal of Food Lipids*, v.14, p. 263–271, 2007.
- FELIZARDO, P.; CORREIA, M. J. N.; RAPOSO, I.; MENDES, J. F.; BERKEMEIER, R.; BORDADO, J. M. Production of biodiesel from waste frying oils. *Waste Management*, v.26, p. 487–494, 2006.
- FILLION, L.; HENRY, C. J. K. Nutrient losses and gains during frying: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v.49, p.157–168, 1998.
- FIRESTONE, D. Regulations of frying fat and oil. In: ERICKSON, M. D. Deep frying: chemistry, nutrition, and practical applications. Urbana: AOCS Press, 2007. cap. 21.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of the total lipids from animal tissues; *Journal of Biological Chemistry*, v.226, p. 497-509, 1957.
- FRANKE, A. A., MURPHY, S. P., LACEY, R.; CUSTER, L. J. Tocopherol and tocotrienol levels of foods consumed in Hawaii. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 55, p.769-778, 2007.
- GARRIDO-POLONIO, C.; GARCÍA-LINARES, M. C.; GARCÍA-ARIAS, M. T.; LÓPEZ-VARELA, S.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, M. C.; TERPSTRA, A. H. M.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. Thermally oxidised sunflower-seed oil increases liver and serum peroxidation and modifies lipoprotein composition in rats. *British Journal of Nutrition*, v.92, p.257–265, 2004.
- GROOTVELD, M.; SILWOOD, C. J. L.; ADDIS, P.; CLAXSO, A.; SERRA, B. B.; VIANA, M. Health effects of oxidized heated oils. *Foodservice Research International*, v.13, p.41-55, 2001.
- GUALLAR-CASTILLÓN, P. ; RODRÍGUEZ-ARTALEJO, F.; FORNÉS, N. S.; BANEGAS, J. R.; ETXEZARRETA, P. A.; ARDANAZ, E. A.; BARRICARTE, A.; CHIRLAQUE, M. D.; IRAETA, M. D.; LARRAÑAGA, N. L.; LOSADA, A.; MENDEZ, M.; MARTÍNEZ, C.; QUIRÓS, J. R.; NAVARRO, C.; JAKSZYN, P.; SÁNCHEZ, M. J.; TORMO, M. J.; GONZÁLEZ, C. A. Intake of fried foods is associated with obesity in the cohort of Spanish adults from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.86, p.198 –205, 2007.
- GUINAZI, M. Tocoferóis e tocotrienóis em hortaliças, ovos e óleos vegetais utilizados em restaurantes comerciais. Tese de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- HARTMAN, L.; LAGO, B.C.A. Rapid preparation of fatty methyl esters from lipids. *Laboratory Practice* v.22, p.475-477, 1973.

- HOUHOULA, D. P.; OREOPOULOU, V.; TZIA, C. A kinetic study of oil deterioration during frying and a comparison with heating. *Journal of American Oil Chemists Society*, v.79, p.133–137, 2002.
- INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington, DC: National Academy of Press, 2000.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 4 ed., 1018 p
- INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives, 7th. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1987.
- JASWIR, I.; MANA, Y. B. C.; KITTS, D. D. Use of natural antioxidants in refined palm olein during repeated deep-fat frying. *Food Research International*, v. 33, p.501-508, 2000.
- JIANG, Q.; CHRISTEN, S.; SHIGENAGA, M. K.; AMES, B. N. γ -Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 74, p.714-722, 2001.
- JONES, A. L.; SPRING-MILLS, E. The liver and gallbladder. In: WEISS, L. Cell and tissue biology: A textbook of histology. Baltimore: Urban & Schwarzberg, 1988, cap.22.
- JORGE, N.; SOARES, B. B. P.; LUNARDI, V. M.; MALACRIDA, C. R. Alterações físico-químicas dos óleos de girassol, milho e soja em frituras. *Química Nova*, v.28, n.6, p.947-951, 2005.
- KRIS-ETHERTON, P. M.; TAYLOR, D. S.; YU-POTH, S.; HUTH, P.; MORIARTY, K.; FISHELL, V.; HARGROVE, R. L.; ZHAO, G.; ETHERTON, T. D. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 71(suppl), p.179S–88S, 2001.
- LAKE, R. J.; SCHOLE, P. Quality and consumption of oxidized lipids from deep frying fats and oils in New Zealand. *Journal of American Oil Chemists Society*, v.74, n.9, p. 1065-1068, 1997.
- LIAO, L.; HUANG, S.; LU, S. A survey study on frying oil of restaurants in the taipei area. *Foodservice Research International*, v.16, p.60–68, 2005.
- LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.37, n.3, p. 293-303, set./dez., 2001.
- LIU, J.; HUANG, C. Tissue α -tocopherol retention in male rats is compromised by feeding diets containing oxidized frying oil. *Journal of Nutrition*, v.125, p.3071–3080, 1995.
- LOPES, M. R. V.; AUED-PIMENTEL, S.; CARUSO, M. S. F.; JORGE, N.; RUVIERI, V. Composição de ácidos graxos em óleos e gorduras de fritura. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, n.63, v.2, p.168-176, 2004.

- LOPEZ-VARELA, S.; SANCHEZ-MUNIZ, F. J.; CUESTA C. Decreased 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 Chemistry Toxicology*, v. 33, n.3, p.181-189, 1995
- MARTIN, J. C.; JOFFRE, F.; SIESS, M. H.; VERNEVAUT, M. F.; COLLENOT, P.; GENTY, M.; SEBÉDIO, J. L. Cyclic fatty acid monomers from heated oil modify the activities of lipid synthesizing and oxidizing enzymes in rat liver. *Journal of Nutrition*, v.130, p.1524-1530, 2000.
- MESTDAGH, F.; DE-MEULENAER, B.; VAN-PETEGHEM, C. Influence of oil degradation on the amounts of acrylamide generated in a model system and in French fries. *Food Chemistry*, n.100, p.1153–1159, 2007.
- NARASIMHAMURTHY, K.; VISHWANATHA, S.; RAINA, P.L. Long term feeding effects of thermally oxidized oils on the erythrocyte fatty acid composition, haematology and histology in rats. *Nutrition Research*, v.18, n.7, p.1245-1259, 1998.
- NAZ, S.; SIDDIQI, R.; SHEIKH, H.; SAYEED, S. A. Deterioration of olive, corn, and soybean oils due to air, light, heat, and deep-frying. *Food Research International*, v.38, p.127–134, 2005.
- NORMAND, L.; ESKIN, N. A. M.; PRZYBYLSKI, R. Effect of tocopherols on the frying stability of regular and modified canola oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v.78, p.369–373, 2001.
- NWANGUMA, B. C.; ACHEBE, A. C.; EZEANYIKA, L. U. S.; EZE, L. C. Toxicity of oxidized fats II: Tissue levels of lipid peroxides in rats fed a thermally oxidized corn oil diet. *Food and Chemical Toxicology*, n.37 p.413-416, 1999.
- ORTHOEFER, F. T.; LIST, G. R. Dynamics of frying. In: ERICKSON, M. D. *Deep frying: chemistry, nutrition, and practical applications*. Urbana: AOCS Press, 2007a. cap.12.
- ORTHOEFER, F. T.; LIST, G. R. Evaluation of used frying oil. In: ERICKSON, M. D. *Deep frying: chemistry, nutrition, and practical applications*. Urbana: AOCS Press, 2007b. cap.18.
- ORTHOEFER, F. T.; LIST, G. R. Initial quality of frying oil. In: ERICKSON, M. D. *Deep frying: chemistry, nutrition, and practical applications*. Urbana: AOCS Press, 2007c. cap.3.
- OWU, D. U. A.; OSIM, E.E.; EBONG, P.E. Serum liver enzymes profile of Wistar rats following chronic consumption of fresh or oxidized palm oil diets. *Acta Tropica*, v.69, p.65–73, 1998.
- PERKINS, E. Volatile odor and flavor components formed in deep frying. In: ERICKSON, M. D. *Deep frying: chemistry, nutrition, and practical applications*. Urbana: AOCS Press, 2007. cap.4.
- PURUSHOTHAMA, S.; RAMACHANDRAN, H.D.; NARASIMHAMURTHY, K.; RAINA, P.L. Long-term feeding effects of heated and fried oils on hepatic antioxidant enzymes, absorption and excretion of fat in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 247, p.95–99, 2003.

- QUILES, J. L.; RAMÍREZ-TORTOSA, M. C.; GÓMEZ, J. A.; HUERTAS, J.R.; MATAIX, J. Role of vitamin E and phenolic compounds in the antioxidant capacity, measured by ESR, of virgin olive, olive and sunflower oils after frying. *Food Chemistry*, v.76, p.461-468, 2002.
- REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY Jr., G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* writing committee and the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J. Nutr.*, v.123, n.11, p.1939-1951, 1993.
- ROMERO, A.; BASTIDA, S.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. Cyclic fatty acid monomer formation in domestic frying of frozen foods in sunflower oil and high-oleic acid sunflower oil without oil replenishment. *Food and Chemical Toxicology*, n.44 p.1674-1681, 2006.
- ROMERO, A.; CUESTA, C.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F.J. *Trans* fatty acid production in deep fat frying of frozen foods with different oils and frying modalities. *Nutrition Research*, v.20, p.599– 608, 2000.
- ROSSI, M.; ALAMPRESE, C.; RATTI, S. Tocopherols and tocotrienols as free radical-scavengers in refined vegetable oils and their stability during deep-fat frying. *Food Chemistry* v.102, p.812–817, 2007.
- RUEDA-CLAUSEN, C. F.; SILVA, F. A.; LINDARTE, M. A.; VILLA-ROEL, C.; GOMEZ, E.; GUTIERREZ, R.; CURE-CURE, C.; LÓPEZ-JARAMILLO, P. Olive, soybean and palm oils intake have a similar acute detrimental effect over the endothelial function in healthy young subjects. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, v.17, n.1, p.50-57, 2007.
- SAGUY, I. S.; DANA, D. Integrated approach to deep fat frying: engineering, nutrition, health and consumer aspects. *Journal of Food Engineering*, v.56, p. 143-452, 2003.
- SAKA, S.; AOUACHERI, W.; ABDENNOUR, C. The capacity of glutathione reductase in cell protection from the toxic effect of heated oils. *Biochimie*, v.84, p.661–665, 2002.
- SANIBAL, E. A. A.; MANCINI, J. F. Perfil de ácidos graxos *trans* de óleo de gordura hidrogenada de soja no processo de fritura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.24, n.1, p.27-31, 2004.
- SANIBAL, E. A. A.; MANCINI-FILHO, J. Frying oil and fat quality measured by chemical, physical, and test kit analyses. *Journal of American Oil Chemists Society*, n.81, p.847-852, 2004a.
- SCHRADER, M.; FAHIMI, H. D. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta* (2006), doi:10.1016/j.bbamcr.2006.09.006.
- SCHWARTZ, H.; OLLILAINEN, V.; PIIRONEN, V.; LAMPI, N. Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.21, p.152-161, 2008.
- SMITH, S. A.; KING, R. E.; MIN, D. B. Oxidative and thermal stabilities of genetically modified high oleic sunflower oil. *Food Chemistry*, v.102, n.4, p.1208-1213, 2007.

- SORIGUER, F.; ROJO-MARTINEZ, G.; DOBARGANES, M. C.; ALMEIDA, J. M. G.; ESTEVA, I.; BELTRÁN, M.; ADANA, M. S. R.; TINAHONES, F.; GÓMEZ-ZUMAQUERO, J. M.; GARCÍA-FUENTES, E.; GONZÁLEZ-ROMERO, S. Hypertension is related to the degradation of dietary frying oils. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.78, p.1092–1097, 2002.
- STAPRANS, I.; RAPP, J. H. M.; PAN, X.; FEINGOLD, K. R. Oxidized lipids in the diet are incorporated by the liver into very low density lipoprotein in rats. *Journal of Lipid Research*, v.37, p.420–430, 1996.
- SÜLZLE, A.; HIRCHE, F.; EDER, K. Thermally oxidized dietary fat upregulates the expression of target genes of PPAR α in rat liver. *Journal of Nutrition*, n.134, p. 1375-1338. 2004.
- SUTHERLAND, W. H. F.; JONG, S. A.; WALKER, R. J.; WILLIAMS, M. J. A.; SKEAFF, C. M.; DUNCAN, A.; HARPER, M. Effect of meals rich in heated olive and safflower oils on oxidation of postprandial serum in healthy men. *Atherosclerosis*, n.16, p. 195-203, 2002.
- SUTHERLAND, W. H. F.; WALKER, R. J.; DE JONG, S. A.; VAN RIJ, A. M.; PHILLIPS, V.; WALKER, H. L. Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v.19, p.1340–1347, 1999.
- TAKEOKA, G.R.; FULL, G. H.; DAO, L. T. Effect of heating on the characteristics and chemical composition of selected frying oil and fat. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.45, p.3244–3249, 1997.
- TAPIERO, H.; NGUYEN B. A. , G.; COUVREUR, P.; TEW, K. D. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v.56, p.215-222, 2002.
- TAVERAS, E. M.; BERKEY, C. S.; RIFAS-SHIMAN, S. L.; LUDWIG, D. S.; ROCKETT, H. R. H.; FIELD, A. E.; COLDITZ, G. A.; GILLMAN, M. W. Association of consumption of fried food away from home with body mass index and diet quality in older children and adolescents. *Pediatrics*, v.116, p.518 –524, 2005.
- TOTANI, N.; SATOH, K.; TSUJI, S.; YAMAGUCHI, A. Effects of deteriorated frying oil in *wistar* rats. *Journal of Oleo Science*, v.55, n.6, 291-297, 2006a.
- TOTANI, N.; SATOH, K.; TSUJI, S.; YAMAGUCHI, A. Effects of deteriorated frying oil in SHR/NDmc-cp rats. *Journal of Oleo Science*, v.55, n.6, 238-289, 2006b.
- TOTANI, N.; OJIRI, Y. Mild ingestion of used frying oil damages hepatic and renal cells in *wistar* rats. *Journal of Oleo Science*, v.56, n.5, 261-267, 2007a.
- TOTANI, N.; OJIRI, Y. Thermal deterioration of oil and frying foodstuffs. *Journal of Oleo Science*, v.56, n.10, 543-551, 2007b.
- TYAGI, V. K.; VASISHTHA, A. K. Changes in the characteristics and composition of oils during deep-fat frying. *Journal of American Oil Chemists Society*, v.73, p.499–506, 1996.

- TYNEK, M.; HAZUKA, Z.; PAWLOWICZ, R.; DUDEK, M. Changes in the frying medium during deep-frying of food rich in proteins and carbohydrates. *Journal of Food Lipids*, v.8, p.251-261, 2001.
- UAUY, R.; MARTINEZ, J. I.; ROJAS, C. V. Nutrición molecular, papel do sistema PPAR en el metabolismos lipídico y su importancia en obesidad y diabetes. *Revista Médica de Chile*, v.128, n.4, p.437-446, 2000.
- WAHRBURG, U. What are the health effects of fat? *European Journal of Nutrition*, v.43, p.I/6–I/11, Suppl 1, 2004.
- WARNER, K.; NEFF, W. E.; ELLER, F. J. Enhancing quality and oxidative stability of aged fried food with γ -tocopherol. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 51, p.623-627, 2003.
- WHITE, P. J. Methods for measuring changes in deep-fat frying oils. *Food Technology*, v.45, n.2, p.75-80, 1991.
- WICKLUNDA, T.; ØSTLIEA, H.; LOTHEA, O.; KNUTSENB, S. H.; BRÁTHEN, E.; KITAC, A. Acrylamide in potato crisp—the effect of raw material and processing. *LWT-Food Science and Technology*, v.39, p.571–575, 2006.
- WILLIAMS, M. J. A.; SUTHERLAND, W. H. F.; MCCORMICK, M. P.; DE JONG, S. A.; WALKER, R. J.; WILKINS, G. T. Impaired endothelial function following a meal rich in used cooking fat. *Journal of the American College of Cardiology*, v.33, n.4, p.1050-1055, 1999.
- XU, X., TRAN, V. H.; PALMER, M.; WHITE, K.; SALISBURY, P. Chemical and physical analyses and sensory evaluation of six deep-frying oils. *Journal of American Oil Chemists Society*, v.76, p.1091–1099, 1999.
- YOON, Y.; CHOE, E. Oxidation of corn oil during frying of soy–flour-added flour dough. *Journal of Food Science*, v.72, n.6, p. c317-c323, 2007.
- YU, S.; DERR, J.; ETHERTON, T. D.; KRIS-ETHERTON, P. Plasma cholesterol-predictive equations demonstrate that stearic acid is neutral and monounsaturated fatty acids are hypocholesterolemic. *American Journal of Clinical Nutrition*, n. 61, p.1129–1139, 1995.