



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA DE NUTRIÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS, NUTRIÇÃO E SAÚDE**

**SABRINA FEITOSA**

**CARACTERIZAÇÃO DO AZEITE DE DENDÊ (*Elaeis guineensis*) E DO ACARAJÉ:  
CONTRIBUIÇÃO PARA O CONTROLE DA QUALIDADE**

**SALVADOR**

**2014**

**SABRINA FEITOSA**

**CARACTERIZAÇÃO DO AZEITE DE DENDÊ (*Elaeis guineensis*) E DO ACARAJÉ:  
CONTRIBUIÇÃO PARA O CONTROLE DA QUALIDADE**

Trabalho de conclusão apresentado, sob a forma de artigos científicos, ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos Nutrição e Saúde, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Nutricional

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Deusdélia Teixeira de Almeida

SALVADOR

2014

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde, SIBI - UFBA.

F311 Feitosa, Sabrina

Caracterização do azeite de dendê (*Elaeis guineensis*) e do acarajé: contribuição para o controle da qualidade / Sabrina Feitosa. – Salvador, 2014.

151 f.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Deusdélia Teixeira de Almeida.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Escola de Nutrição, 2014.

1. Óleo de Palma Bruto. 2. Fritura de Acarajés. 3. Toxicidade. 4. Minerais. 5. Fatores Antinutricionais I. Almeida, Deusdélia Teixeira de. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 641.522.2

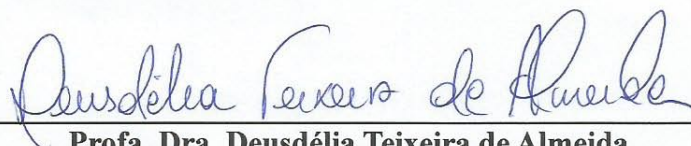
## TERMO DE APROVAÇÃO

**SABRINA FEITOSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde da Escola de Nutrição, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Alimentos, Nutrição e Saúde.

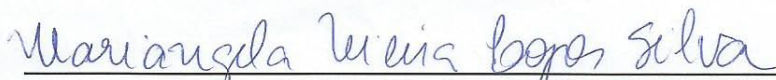
### **CARACTERIZAÇÃO DO AZEITE DE DENDÊ (*Elaeisguineensis*) E DO ACARAJÉ: CONTRIBUIÇÃO PARA O CONTROLE DA QUALIDADE**

#### **BANCA EXAMINADORA:**



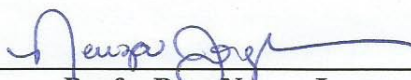
**Prof. Dra. Deusdélia Teixeira de Almeida**

Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos pela Universitat de Valencia  
Professora da Universidade Federal da Bahia



**Prof. Dra. Mariangela Vieira Lopes Silva**

Doutora em Química pela Universidade Federal da Bahia  
Professora da Universidade do Estado da Bahia



**Prof. Dra. Neuza Jorge**

Doutora em Engenharia de Alimentos pelo Instituto de La Grasa e  
Universidade Estadual de Campinas  
Professora da Universidade Estadual Paulista

Salvador – Bahia, 23 de abril de 2014

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus e a minha família (Marciana, Leon, Daniel, Bruno), pois são meu esteio e minha força para a vida, iluminando e dando-me constante apoio. Ao meu pai Joaquim Duarte Feitosa (*in memoriam*).

A minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Délia, por todos os ensinamentos, pela orientação e sapiência, pela confiança e perseverança, por elucidar os caminhos trilhados, e por todo estímulo e companheirismo nesta jornada. E ao governo brasileiro pela concessão da bolsa de estudo através da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e pelo financiamento através do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do projeto de processo nº482790/2010-5, no qual este se insere.

À Escola de Nutrição e Instituto de Química pelo espaço de trabalho e de aprendizagem. Aos professores do Programa de Pós-Graduação e Nutrição pelos ensinamentos e pela orientação:

Prof.<sup>a</sup> Ana Marlúcia, Prof.<sup>a</sup> Sandra Chaves, Prof.<sup>a</sup> Lígia Amparo, Prof.<sup>a</sup> Rita Ribeiro, Prof.<sup>a</sup> Jairza, Prof.<sup>a</sup> Lílian Ramos, Prof.<sup>a</sup> Itaciara assim como aos professores

Dalva, Ivaldo, Ryzia, Rogéria, Maria do Carmo, Marilena, Rosângela, que colaboraram indiretamente com nosso trabalho, mas tão importante quanto os demais.

Aos funcionários Dona Nice, Luis, Ayse, Sr. Ademário e Sr. Bahia, Ana, Selma, Sr. Vivaldo e demais pela solicitude. Ao Sr. José Carlos pela completa prestimosidade, simpatia e tantas palavras de estímulo que foram sempre muito além de sua função.

À Rita da xerox, Carlos e Sobral pelo apoio e suporte prestados.

Aos companheiros de morada Juliana, Magnum, Evelin, Iracema, Roberta, Indira que foram e são como parte da minha família.

Aos professores da UFBA Lafaiete, Maria das Graças e sua aluna Milena, Elisângela Boffo, ao Dr. Ralf Greiner do Instituto Max Rubner (Alemanha), e Claudia Aiub (UERJ-RJ), assim como a baiana de acarajé Eliene e Associação das Baianas de Acarajé e Mingau (ABAM), por toda colaboração com a nossa equipe e projeto de pesquisa.

Às alunas Thais, Leilah, Joana, Talita, Letícia, Laís, Mariana, Maiara e Caroline por todo trabalho em equipe e dedicação; e a MSc. Luciana e Renata; a Sidione, Amanda e Débora.

Aos meus colegas de curso e aos meus amigos pelo companheirismo e compreensão.

Obrigada!

**“Nenhum de nós é tão inteligente quanto todos nós juntos”.**

*Warren Bennis*

## APRESENTAÇÃO

O azeite de dendê, ou óleo de palma como é conhecido internacionalmente, consiste em um óleo vegetal, extraído do mesocarpo do fruto da palmeira *Elaeis guineensis*. O referido óleo é empregado na sua forma bruta apenas no Brasil e na África, é matéria-prima típica da culinária baiana, conferindo identidade a sua cozinha, com destaque na fritura por imersão do acarajé, bolinho elaborado com feijão caupi (*Vigna unguiculata*), patrimônio imaterial do Brasil e a principal comida de rua da cidade de Salvador, Bahia.

O acarajé é comercializado nas ruas da cidade de Salvador-BA por mulheres (em sua maioria) com vestimentas típicas, as *baianas de acarajé*, e, na Bahia, é elaborado a partir de diversas variedades de feijão-caupi ou feijão-de-corda, como é popularmente conhecido: *fradinho*, *macassar*, *olho de pombo*, *costela de vaca*, *boca preta*, dentre outros. É um alimento de elevado valor nutricional, existindo extensa bibliografia sobre essa iguaria no que concerne aos aspectos antropológico, higiênico sanitário e composição centesimal, carecendo, porém, de uma abordagem relativa à qualidade do azeite de dendê empregado na elaboração dos acarajés, aos fatores antinutricionais e aos minerais inerentes a sua composição.

A partir dessas premissas, desenvolveu-se este trabalho, com um experimento de fritura no qual se buscou reproduzir o mais fielmente possível as condições em que são fritos os acarajés nas ruas de Salvador, tendo como objetivo avaliar a qualidade do azeite de dendê, seu potencial mutagênico e comportamento na fritura de acarajés, além de quantificar os fatores antinutricionais e minerais desta iguaria, dentre outros parâmetros. Dessa forma, poder-se-á contribuir para uma produção e distribuição de alimentos seguros e saudáveis, a partir dos conhecimentos adquiridos, o que seria imprescindível e decisório para o estabelecimento de um padrão de qualidade dos azeites e do acarajé, lacuna ainda existente na legislação vigente.

## RESUMO

**Objetivo:** avaliar a qualidade físico-química e toxicológica do azeite de dendê bruto empregado na fritura de acarajés, além de quantificar os fatores antinutricionais e minerais desta iguaria. **Metodologia:** uma *baiana de acarajé* conduziu a fritura por imersão de acarajés durante 5 dias consecutivos, totalizando 25 horas de fritura. As análises realizadas para avaliar a qualidade dos azeites foram: índices de acidez (AGL; %), peróxidos (IP; meq/kg), refração (40 °C), tempo de indução (h), perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa (mg/100g) e ressonância magnética nuclear-RMN (%), compostos polares totais (CP; %), temperatura do azeite (°C), cor (CIELab), carotenoides totais (CT; µg/g) e atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS. A citotoxicidade e mutagenicidade dos azeites de dendê foram avaliadas em tempo 0 e 25 h através do teste de Ames. Nas amostras de acarajé (AK) e massa crua (CM) foram determinadas: frações do ácido fitico (InsP<sub>3</sub>, InsP<sub>4</sub>, InsP<sub>5</sub>, InsP<sub>6</sub>; µmol/g), taninos condensados (mg eq. CE/g), polifenóis (mg/g), atividade de inibidor de tripsina (TIU/mg), atividade de hemaglutinina (HU/Kg); minerais (Ca, K, Mg, Na, P (mg/100g); Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se e Zn (µg/g)); e apenas nos acarajés: peso (g), temperatura interna (°C), lipídeos totais (%), umidade (%) e cor (CIELab). **Resultados e conclusões.** ARTIGO 1: *Toxicological assessment of crude palm oil (Elaeis guineensis Jacq.) used in deep frying of akara (cowpea paste finger food)*. Os compostos polares totais variaram de 14,08-29,81%, excedendo o limite máximo permitido de 25%, no entanto, não foi observada atividade citotóxica ou mutagênica nos azeites de dendê usados no processo tradicional de fritura. ARTIGO 2: *Effects of deep frying on mineral contents and antinutritional factors in akara (fried cowpea food)*. Potássio e fósforo foram os elementos predominantes no acarajé (545-719 mg/100g e 210-375 mg/100g, respectivamente), enquanto sódio apresentou os maiores teores (699-1.869 mg/100g), devido a adição de sal na CM. Os fatores antinutricionais em AK e CM foram: 0,0 µmol/g (InsP<sub>3</sub> e InsP<sub>4</sub>); 11,27 ± 0,17 e 9,9 ± 0,14 µmol/g (InsP<sub>5</sub>); 2,92 ± 0,03 e 3,75 ± 0,11 µmol/g (InsP<sub>6</sub>); 1,73 ± 0,16 e 1,68 ± 0,02 mg eq. CE/g (taninos); 6,35 ± 0,03 e 6,27 ± 0,03 mg/g (polifenóis); 3,19 ± 0,03 e 0,0 TIU/mg (inibidores de tripsina); 0,50 ± 0,00 e 0,0 HU/Kg (hemaglutininas). A fritura ocasionou uma redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) da maioria dos minerais e dos fatores antinutricionais. O acarajé representa fonte de K, P, Mg, Mn, Mo, Cr, Fe e Zn, porém com baixa biodisponibilidade dos dois últimos. ARTIGO 3: **Características físico-químicas do azeite de dendê bruto submetido a 25 horas de fritura de acarajés** e ARTIGO 4: **Avaliação de características físico-químicas de acarajés submetidos de 5 a 25 horas de fritura por imersão** (AMBOS EM FASE DE ELABORAÇÃO).

**Palavras Chave:** óleo de palma bruto, fritura de acarajés, toxicidade, minerais, fatores antinutricionais.



## ABSTRACT

**Objective:** the aim of this work was assessing toxicological, chemical and physical quality of crude palm oil used in akara frying, and quantifying minerals and antinutritional factors of the last one. **Methodology:** a *baiana de acarajé* performed deep-frying during 5 consecutive days (25 hours in total). The crude palm oil analyses evaluation were: free fatty acids (FFA; %), peroxide value (PV; mEq/Kg), p-anisidine, refraction index (40 °C), induction time (IT; h), fatty acids profile by gas chromatography (mg/g) and nuclear magnetic resonance-NMR (%), total polar compounds (TPC; %), temperature (°C), colour (CIELab), total carotenoids (µg/g) and antioxidant activity by DPPH and ABTS methods. Cytotoxicity and mutagenicity were evaluated in the oils 0 and 25 hour time by the Ames test. Akara (AK) and crude mass (CM) samples: phytic acid fractions (InsP<sub>3</sub>, InsP<sub>4</sub>, InsP<sub>5</sub>, InsP<sub>6</sub>; µmol/g), condensed tannins (mg eq. CE/g), polyphenols (mg/g), trypsin inhibitor activity (TIU/mg), haemagglutinating activity (HU/Kg); minerals (Ca, K, Mg, Na, P (mg/100g); Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se and Zn (µg/g)); and just in akara samples: weight (g), intern temperature (°C), total fats (%), moisture (%) and colour (CIELab). **Results and conclusions.** ARTICLE 1: **Toxicological assessment of crude palm oil (*Elaeis guineensis* Jacq.) used in deep frying of akara (cowpea paste finger food).** TPC ranged 14.08 to 29.81%, exceeding the maximum level permitted in frying oils (25%). However, no cytotoxic or mutagenic activity was detected in CPO used in the traditional akara frying process. ARTICLE 2: **Effects of deep frying on mineral contents and antinutritional factors in akara (fried cowpea food).** K and P were the most abundant elements naturally presented in akaras (545-719 mg/100g and 210-375 mg/100g, respectively), while Na presented the highest contents (699-1,869 mg/100g) because of salt addition in CM. Antinutritional factors (ANF) in AK and CM samples were: 0.0 µmol/g (InsP<sub>3</sub> and InsP<sub>4</sub>); 11.27 ± 0.17 e 9.9 ± 0.14 µmol/g (InsP<sub>5</sub>); 2.92 ± 0.03 e 3.75 ± 0.11 µmol/g (InsP<sub>6</sub>); 1.73 ± 0.16 e 1.68 ± 0.02 mg eq. CE/g (tannins); 6.35 ± 0.03 e 6.27 ± 0.03 mg/g (polyphenols); 3.19 ± 0.03 e 0.0 TIU/mg (trypsin inhibitors); 0.50 ± 0.00 e 0.0 HU/Kg (hemagglutinins). Deep frying led to significant reduction ( $p \leq 0.05$ ) of most of minerals and antinutritional factors. Furthermore, AK showed itself as a good source of K, P, Mg, Mn, Mo, Cr, Fe and Zn, but with low bioavailability of the last two elements. ARTICLE 3: **Chemical and physical properties of crude palm oil (*Elaeis guineensis*) used in 25 hours deep-frying of akara (cowpea food).** ARTICLE 4: **Assessment of physical and chemical properties of akaras (fried cowpea food) submitted to 5 to 25 hours of deep frying.** (Those last two articles are still being drafted).

**Keywords:** crude palm oil, akara frying, toxicology, minerals, antinutritional factors.

## LISTA DE QUADROS E FIGURAS

### PARTE I

#### ARTIGO 2

**Figure 1.** Loadings (a) and scores (b) plots (PC1 x PC2) of akaras (AK) and its crudes mass (CM) in deep-frying (5h to 25h) ..... 69

**Figure 2.** HCA of akara (AK) and its crude masses (CM) in deep-frying (5h to 25h) ..... 69

#### ARTIGO 3

**Quadro 1.** Perfil de ácidos graxos (%) por cromatografia gasosa do óleo de palma bruto submetido a 25 horas de fritura de acarajés ..... 76

### PARTE II

#### PROJETO DE PESQUISA

**Quadro 1.** Dados do sistema teste: linhagens de *Salmonella typhimurium* que foram utilizadas ..... 105

**Figura 1.** Esquema demonstrando o ensaio de mutagenicidade ..... 108

**Figura 2.** Esquema demonstrando o ensaio de sobrevivência ..... 109

**Figura 3.** Esquema demonstrando o ensaio de micronúcleo com macrófagos ..... 111

#### ARTIGO 5

**Figure 1.** Cromatogramas, obtidos por CLAE a 450nm, de extratos de carotenoides de óleo de palma bruto nos tempos 0, 10 e 25 h. Condições cromatográficas: coluna de fase reversa YMC C<sub>30</sub> (250 x 4,6mm d.i, 3µm), gradiente linear de metanol (0,1% trietilamina)/éter *tert* metil butílico de 95:5 para 70:30 em 30 minutos, para 50:50 em 20 minutos e mantendo essa proporção até o final da corrida, com fluxo de 0,9mL/min., temperatura da coluna de 22°C e solvente de injeção éter *tert* metil butílico ..... 144

**Figura 2.** Alterações na concentração de all-*trans*-α-caroteno (●) e de all-*trans*-β-caroteno (◆) no óleo de palma no decorrer das 25 horas de fritura ..... 145

## LISTA DE TABELAS

### PARTE I

#### ARTIGO 1

<b>Table 1.</b> Mutagenic evaluation of CPO before akara frying in strains TA97, TA98, TA100 and TA102 of <i>Salmonella typhimurium</i> in the presence and absence of metabolic activation (S9) .....	40
<b>Table 2.</b> Mutagenic evaluation of CPO after akara frying (FPO) in strains TA97, TA98, TA100 and TA102 of <i>Salmonella typhimurium</i> in the presence and absence of metabolic activation (S9) .....	41
<b>Table 3.</b> Micronucleus induction assay in macrophages using CPO and FPO .....	42
<b>Table 4.</b> Total polar compounds (TPC) content (% w/w) of crude palm oil during 25 h of akara frying, 5 days, 5h/day .....	42

#### ARTIGO 2

<b>Table 1.</b> Minerals content (macro, micro, trace and ultra-trace element) in crude mass (CM) and akara (AK) (cowpea food) from 25h deep-frying (5h/day) in crude palm oil .....	66
<b>Table 2.</b> Antinutritional factors content of crude mass (CM) and akara (AK) (cowpea food) from 25h deep-frying (5h/day) in crude palm oil .....	67
<b>Table 3.</b> The molar ratios of phytic acid (PA) to calcium (Ca), iron (Fe) and zinc (Zn), calcium to phosphorus (Ca/P) and sodium to potassium (Na/K) in akara (AK) and crude mass (CM) samples .....	68

#### ARTIGO 3

<b>Tabela 1.</b> Estatística descritiva (média $\pm$ desvio padrão) dos parâmetros físico-químicos do óleo de palma bruto submetido a 25 horas de fritura de acarajés .....	75
<b>Tabela 2.</b> Perfil de ácidos graxos (%) por RMN do óleo de palma bruto submetido a 25 horas de fritura de acarajés .....	76
<b>Tabela 3.</b> Quantificação dos compostos polares totais (%) pelos métodos (IUPAC, 2000), <i>Fri-Check</i> e Testo 270 das amostras de óleo de palma bruto submetidos a 25 horas fritura de acarajés .....	77

## ARTIGO 4

<b>Tabela 1.</b> Estatística descritiva da temperatura interna, peso, teor de umidade e de lipídeos totais das amostras de acarajé submetidos à fritura por imersão no azeite de dendê bruto por 25 horas .....	85
---	----

## PARTE II

### PROJETO DE PESQUISA

<b>Tabela 1.</b> Características do equipamento ICP OES empregado para determinação dos elementos nas amostras de acarajé e massa crua .....	116
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros operacionais do ICP-MS para determinação dos elementos nas amostras de acarajé e massa crua .....	117

## ARTIGO 5

<b>Tabela 1.</b> Alterações no teor de carotenoides, nas coordenadas CIELab de cor e na atividade antioxidante (DPPH e ABTS) do óleo de palma bruto submetido à fritura de acarajés por imersão.....	142
<b>Tabela 2.</b> Características cromatográficas e UV-Vis dos principais carotenoides de óleo de palma bruto .....	143

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABAM	Associação das Baianas de Acarajé e Mingau do estado da Bahia
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABTS	<i>2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)</i>
AC	Massa atômica do carbono (12,01)
ADB	Azeite de dendê bruto
AGL	Ácidos graxos livres. Uma das frações dos compostos polares (CP)
AK	Do inglês: <i>akara</i> . Acarajé em inglês; denominação utilizada na África
AK 5h	Do inglês: <i>akara five hour</i> . Amostra de acarajé do tempo de fritura de cinco horas (vide métodos ou <i>methods</i> como foi realizada amostragem). Assim como as demais amostras: AK 10h, AK 15h, AK 20h e AK 25h que são referentes, respectivamente, aos tempos de dez, quinze, vinte e vinte e cinco horas de fritura. AKs plural
ANF	Do inglês: <i>antinutritional factors (ANF)</i> . Fatores antinutricionais (FAN)
AOAC	Do inglês: <i>American Association of Official Analytical Chemists</i>
API	Área do padrão interno no cromatograma da amostra
Ax	Área do ácido graxo no cromatograma da amostra
CaF <sub>2</sub>	Fluoreto de cálcio
CAG	Concentração de ácido graxo na amostra em mg/g de óleo ou gordura
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCD	Dispositivo de carga acoplada
CCT	Do inglês: <i>Collision Cell Technology</i> . Célula de colisão que utiliza 8,0% (v/v) gás hidrogênio e hélio como gás da colisão (vide fabricante)
CDCl <sub>3</sub>	Do inglês: <i>Deuterated chloroform</i>
CE	Do inglês: <i>catechin equivalent</i> . Equivalente de catequina
CG	Cromatógrafo gasoso, cromatografia gasosa

CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CM	Do inglês: <i>crude mass</i> . Massa crua de acarajé, referente à massa de feijão caupi cru, utilizado na fritura de acarajé. CMs plural
CM 5h	Do inglês: <i>crude mass five hour</i> . Amostra de massa crua de acarajé que foi utilizada para fritura de acarajés do tempo de cinco horas (vide métodos ou <i>methods</i> como foi realizada amostragem). Assim como as demais amostras: CM 10h, CM 15h, CM 20h e CM 25h que são referentes, respectivamente, aos tempos de dez, quinze, vinte e vinte e cinco horas do experimento
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
CP	Componente principal (estatística; PCA); compostos polares (quando referente ao processo de fritura); Controle positivo (para os ensaios de mutagenicidade)
CPO	Do inglês: <i>crude palm oil (Elaeis guineensis Jacq.)</i> . Óleo de palma bruto (OPB)
CT	Carotenoides totais
DAD	Detector de arranjo de diodos
DAPI	Do inglês: <i>4'-6-Diamidino-2-fenilindol</i>
DG	Do inglês: <i>diglycerides</i> . Diglicerídeos, uma das frações dos compostos polares (CP)
DIC	Detector de ionização de chama
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio-padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila (C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> )
DRI	Do inglês: <i>Dietary Reference Intakes (DRIs)</i> . Quantidades referenciais de ingestão pela dieta ou recomendações diárias nutricionais, para indivíduos saudáveis
EFSA	Do inglês: <i>European Food Safety Agency</i>

FAN	Fatores antinutricionais
FAPESB	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia
FC	Fator de correção teórico de resposta do DIC com relação ao padrão interno tricosenoato de metila (C23:0)
FCEA	Fator de conversão de éster metílico para ácido graxo
FDICag	Fator teórico de resposta do DIC para o ácido graxo
FDICpi	Fator teórico de resposta do DIC para o padrão interno
FFA	Do inglês: <i>free fatty acids</i> . Ácidos graxos livres (AGL), uma das frações dos compostos polares (CP)
FPO	Do inglês: <i>frying palm oil</i> . Óleo de palma frito; o azeite de dendê que passou por processo de fritura
GC	Do Inglês: <i>Gas Chromatography</i> . Cromatógrafo gasoso, cromatografia gasosa (CG)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de nitrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HCA	Do inglês: <i>Hierarchical Cluster Analysis</i> . Análise de grupamento hierárquico
HNO <sub>3</sub>	Ácido nítrico
HPLC	Do inglês: <i>High-performance liquid chromatography</i> . Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)
HU	Do inglês: <i>haemagglutinating units</i> . Unidade de hemaglutinina
ICP OES	Do inglês: <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> . Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado
ICP-MS	Do inglês: <i>Inductively Coupled Plasma - Mass Spectroscopy</i> . Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado
IM	Índice de mutagenicidade
InsP <sub>3</sub>	Do inglês: <i>myo-inositol 3-phosphate</i> . Mio-inositol 3-fosfato ou trifosfato de mio-inositol

InsP <sub>4</sub>	Do inglês: <i>myo-inositol 4-phosphate</i> . Mio-inositol 4-fosfato ou tetrafosfato de mio-inositol
InsP <sub>5</sub>	Do inglês: <i>myo-inositol 5-phosphate</i> . Mio-inositol 5-fosfato ou pentafofato de mio-inositol
InsP <sub>6</sub>	Do inglês: <i>myo-inositol 6-phosphate</i> . Mio-inositol 6-fosfato ou hexafofato de mio-inositol
IP	Índice de peróxido
IPHAN	Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional
IT	Do inglês: <i>induction time</i> . Tempo de indução (TI)
IUPAC	Do inglês: <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
KED	Do inglês: <i>Kinetics Energy Discrimination</i> . Discriminação por Energia Cinética
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LB	Do inglês: <i>Line Broadening</i> . Fator de alargamento de linha
LD	Limite de detecção
LPS	Lipopolissacarídeo
LQ	Do inglês: <i>limit of quantification</i> . Limite de quantificação
MA	Massa da amostra de OPB usada para análise de perfil de ácidos graxos por CG
MDA	Ministério de Desenvolvimento Agrícola
MEM	Do inglês: <i>Minimum Essential Medium</i> . Um meio de cultura
M.I	Do inglês: <i>Mutagenic index</i> . Índice de mutagenicidade (IM): número de <i>His</i> <sup>+</sup> induzidas na amostra/número de <i>His</i> <sup>+</sup> espontâneos no controle negativo
MI	Do inglês: <i>McIlvaine</i> . Uma solução tampão
MMag	Massa molecular do éster metílico do ácido graxo
MNNG	Do inglês: <i>N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine</i>
MPI	Massa do padrão interno em gramas adicionadas na amostra



N <sub>2</sub>	Gás nitrogênio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NC	Número de átomos de carbono do éster metílico do ácido graxo
NH <sub>4</sub> Cl	Cloreto de amônio
NMR	Do inglês: <i>nuclear magnetic resonance</i> . Ressonância magnética nuclear (RMN)
OP	Óleo de palma
OPB	Óleo de palma bruto. O azeite de dendê na sua forma bruta
oxTGM	Do inglês: <i>oxidized triglyceride monomers</i> . Monômeros oxidados de triglicerídeos ou monômeros de triacilgliceróis oxidados, uma das frações dos compostos polares (CP)
PA	Do inglês: <i>phytic acid</i> . Ácido fítico
PC	Do inglês: <i>polar compounds / positive control / principal component</i> . Respectivamente: compostos polares (CP); controle positivo (CP); componente principal (CP)
PCA	Do inglês: <i>Principal Components Analysis</i> . Análise de componentes principais
PV	Do inglês: <i>peroxide value</i> . Índice de peróxido (IP)
RDA	Do inglês: <i>Recommended Dietary Allowances</i> (RDAs). Quantidades médias de ingestão diária, suficientes para alcançar os requerimentos diários dos nutrientes em aproximadamente 97-98%, em indivíduos saudáveis
RMN	Ressonância magnética nuclear
RSD	Do inglês: <i>relative standard error</i> (RSD %). Desvio-padrão relativo
SARA	Síndrome da angústia respiratória aguda
SD	Do inglês: <i>standard deviation</i> . Desvio padrão da média

SE	Do inglês: <i>standard error</i> . Erro padrão da média
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TFM	Material do copolímero do tetrafluor etileno
TGD	Do inglês: <i>triglyceride dimers</i> . Dímeros de triglicerídeos ou triacilgliceróis dimerizados, uma das frações dos compostos polares (CP)
TGP	Do inglês: <i>triglyceride polymers</i> . Polímeros de triglicerídeos ou triacilgliceróis polimerizados, uma das frações dos compostos polares (CP)
TI	Tempo de indução
TIU	Do inglês: <i>trypsin inhibitor unit</i> . Unidade de inibidor de tripsina
TLC	Do inglês: <i>Thin Layer Chromatography</i> . Cromatografia em camada delgada
TPC	Do inglês: <i>total polar compounds</i> . Compostos polares totais
Tr	Tempo de retenção
TWI	Do inglês: <i>tolerable weekly intake</i> . Ingestão semanal tolerável

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO .....	05
RESUMO .....	06
ABSTRACT .....	07

### PARTE I: ARTIGOS CIENTÍFICOS

#### ARTIGO 1

<b>Toxicological assessment of crude palm oil (<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.) used in deep frying of akara (cowpea paste finger food) .....</b>	<b>24</b>
SUMMARY / RESUMEN .....	25
1. INTRODUCTION .....	26
2. MATERIALS AND METHODS .....	28
2.1. CPO sample and frying process .....	28
2.2. Total polar compounds .....	30
2.3. <i>Salmonella</i> /microsome assay .....	30
2.4. Survival experiments .....	31
2.5. RAW 264,7 cell culture .....	32
2.6. Micronucleus assay .....	32
3. RESULTS AND DISCUSSION .....	33
3.1. Mutagenic activity .....	33
3.2. Micronucleus evaluation .....	33
3.3. Total polar compounds .....	33
4. CONCLUSIONS .....	35
ACKNOWLEDGMENTS .....	36
REFERENCES .....	36

#### ARTIGO 2

<b>Effects of deep frying on mineral contents and antinutritional factors in akara (fried cowpea food) .....</b>	<b>44</b>
Abstract .....	45
1. Introduction .....	46
2. Materials and methods .....	46
2.1 <i>Samples collection and frying experiment</i> .....	46
2.2 <i>Sample preparation</i> .....	48

2.3 Antinutritional factors .....	48
2.3.1 Condensed tannins .....	48
2.3.2 Polyphenols .....	48
2.3.3 Trypsin inhibitor .....	48
2.3.4 Haemagglutinating activity .....	49
2.3.5 Myo-inositol phosphate analysis .....	49
2.4 Minerals .....	49
2.4.1 Digestion procedure .....	49
2.4.2 ICP OES and ICP-MS analysis .....	50
2.5 Phytate to zinc, iron, calcium mole ratios .....	51
2.6 Statistical analysis .....	51
3. Results and discussion .....	52
3.1 Minerals .....	52
3.2 Minerals & Antinutritional Factors (ANF) .....	56
3.3 Antinutritional Factors (ANF).....	57
3.4 Multivariate analysis .....	59
4. Conclusions .....	60
5. Acknowledgements .....	61
6. References .....	61

## ARTIGO 3

(EM FASE DE ELABORAÇÃO)

<b>Características físico-químicas do azeite de dendê bruto (<i>Elaeis guineensis</i>) submetido a 25 horas de fritura de acarajés .....</b>	<b>71</b>
1. INTRODUÇÃO .....	72
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	73
2.1 Obtenção das amostras .....	73
2.2 Determinações analíticas .....	74
2.2.1 Ácidos graxos livres (acidez), índice de peróxido e refração .....	74
2.2.2 Compostos polares totais .....	74
2.2.3 Composição em ácidos graxos .....	74
2.2.4 Estudo da estabilidade .....	75
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	75
REFERÊNCIAS .....	77

## ARTIGO 4

(EM FASE DE ELABORAÇÃO)

<b>Avaliação de características físico-químicas de acarajés submetidos de 5 a 25 horas de fritura por imersão</b> .....	80
1. INTRODUÇÃO .....	80
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	81
2.1 Obtenção das amostras e o experimento de fritura .....	82
2.2 Determinações analíticas .....	83
2.2.1 Peso (g) e temperatura (°C) .....	83
2.2.2 Cor (CIELab) .....	83
2.2.3 Teor de umidade (%) .....	83
2.2.4 Lipídeos totais .....	83
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	83
4. CONCLUSÕES .....	86
REFERÊNCIAS .....	86

## PARTE II: APÊNDICES

### PROJETO DE PESQUISA

<b>CARACTERIZAÇÃO DO AZEITE DE DENDÊ (<i>Elaeis guineensis</i>) E DO ACARAJÉ: CONTRIBUIÇÃO PARA O CONTROLE DA QUALIDADE</b> .....	90
1 INTRODUÇÃO .....	91
2 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA .....	92
2.1 Azeite de dendê ou óleo de palma ( <i>Elaeis guineensis</i> ) .....	92
2.2 O acarajé .....	94
2.3 Fritura por imersão e toxicidade .....	96
3 OBJETIVOS .....	99
3.1 Geral .....	99
3.2 Específicos .....	99
4 CONSIDERAÇÕES TEÓRICO-METODOLÓGICA .....	100
4.1 Experimento de fritura e coleta das amostras .....	100
4.2 Preparo das amostras de massa crua e acarajé .....	102
4.3 Análises no azeite de dendê .....	103

4.3.1	Ácidos graxos livres (acidez), índice de peróxido e refração .....	103
4.3.2	Compostos polares totais .....	103
4.3.3	Composição em ácidos graxos .....	103
4.3.4	Ressonância magnética nuclear (RMN) .....	105
4.3.4.1	Espectroscopia de RMN .....	105
4.3.4.2	Aquisição dos espectros de RMN de <sup>1</sup> H .....	105
4.3.5	Atividade mutagênica .....	105
4.3.5.1	Teste Ames .....	105
4.3.5.2	Características genéticas .....	106
4.3.5.3	Teste de mutagenicidade .....	108
4.3.5.4	Teste de sobrevivência .....	109
4.3.5.5	Cultura de células RAW 264.7 .....	110
4.3.5.6	Ensaio do micronúcleo .....	110
4.3.5.7	Expressão dos resultados .....	111
4.3.6	Estudo da estabilidade com Rancimat .....	111
4.3.7	Cor dos óleos .....	111
4.3.8	Carotenoides totais .....	112
4.3.9	Análise dos carotenoides por CLAE .....	112
4.3.10	Ensaio da atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS .....	112
4.4	Análises no acarajé e em sua massa crua .....	112
4.4.1	Fatores antinutricionais dos acarajés e de sua massa crua .....	112
4.4.1.1	Fosfato mio-inositol .....	112
4.4.1.2	Taninos condensados .....	113
4.4.1.3	Polifenóis .....	113
4.4.1.4	Atividade de inibidor de tripsina .....	113
4.4.1.5	Atividade de hemaglutinina .....	113
4.4.2	Cor dos acarajés .....	113
4.4.3	Lipídeos totais dos acarajés .....	113
4.4.4	Teor de umidade dos acarajés .....	114
4.4.5	Determinação dos minerais dos acarajés e massas cruas .....	114
4.4.5.1	Reagentes e soluções .....	114
4.4.5.2	Procedimento de digestão das amostras .....	114
4.4.5.3	Instrumentação e análises por ICP OES e ICP-MS .....	115
4.5	Análises estatísticas .....	117
	CRONOGRAMA .....	118
	FINANCIAMENTO .....	119
	REFERÊNCIAS .....	120

ARTIGO 5

<b>Efeito da fritura de acarajés nos carotenoides e atividade antioxidante de óleo de palma bruto</b> .....	130
<b>RESUMO / ABSTRACT</b> .....	131
1. Introdução .....	132
2. Materiais e métodos .....	133
2.1. Amostra .....	133
2.2. Experimento de fritura de acarajés em OPB .....	133
2.3. Carotenoides totais .....	134
2.4. Extração dos carotenoides .....	134
2.5. Análise por CLAE .....	134
2.6. Ensaio da atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS .....	134
2.7. Cor .....	135
2.8. Análise estatística .....	135
3. Resultados e discussão .....	135
4. Conclusão .....	139
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	139
<b>Certificados de trabalhos apresentados em eventos científicos</b> .....	146

## **PARTE I**

### **ARTIGOS CIENTÍFICOS**



**ARTIGO 1**

GRASAS Y ACEITES 65 (2)

**Aceito: 23 de dezembro de 2013; Publicação: Abril–Junho de 2014**

ISSN-L: 0017-3495

DOI: <http://dx.doi.org/10.3989/gya.086913>

**Toxicological assessment of crude palm oil (*Elaeis guineensis* Jacq.) used in deep frying of akara (cowpea paste finger food)**

1 **Toxicological assessment of crude palm oil (*Elaeis guineensis* Jacq.) used in deep frying**  
2 **of akara (cowpea paste finger food)**

3

4 I. Felzenszwalb<sup>1</sup>, J.L. da Costa Mazzei<sup>2</sup>, S. Feitosa<sup>3</sup>, C.A. Fortes Aiub<sup>4</sup> and D.T. de Almeida<sup>3</sup>.

5

6 <sup>1</sup>Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

7 Av 28 de Setembro, 87 fds. 4º andar, Vila Isabel 20551-030 - Rio de Janeiro, RJ – Brasil

8 <sup>2</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Far-Manguinhos - Instituto de Tecnologia em Fármacos. Rua

9 Sizenando Nabuco, 100, Manguinhos, 21041-250 - Rio de Janeiro, RJ – Brasil

10 <sup>3</sup>Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, Av. Araújo Pinho, 32, Canela, Salvador-

11 Bahia, CEP: 40110-150, Brazil

12 <sup>4</sup>Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Genética e Biologia

13 Molecular, Rua Frei caneca 94 Centro, 20211040 - Rio de Janeiro, RJ – Brasil.

14

15 \*\*Corresponding author. Tel.: + 55 71 3283 7700; fax: + 55 71 3283 7705

16 E-mail address: [deliata@uol.com.br](mailto:deliata@uol.com.br) or [delia@ufba.br](mailto:delia@ufba.br) (D.T. Almeida).

17

18 **SUMMARY:** Akara is cowpea paste which is deep-fried in crude palm oil (CPO; *Elaeis*  
19 *guineensis* Jacq.) and sold as a street finger food in Brazil and Africa. During the food frying,  
20 oils can form toxic decomposition products as total polar compounds (TPC), which can  
21 determinate oil degradation. The aim of this study was to assess the toxicity of CPO used in  
22 akara frying for 25 hours. Changes in the oil were determined by TPC quantification and  
23 mutagenicity using a *Salmonella*/microsome assay with *Salmonella Typhimurium* strains  
24 TA97, TA98, TA100 and TA102 with and without exogenous metabolic activation. Assuming  
25 that 25% TPC is the maximum level permitted in frying oils and it ranged from 14.08 to  
26 29.81%, frying palm oil exceeded the limit. Nonetheless, no cytotoxic, mutagenic or  
27 genotoxic activity were detected in CPO used in the traditional akara frying process.

28 **KEYWORDS:** Micronucleus; Mutagenicity; Palm oil; Repeatedly fried cooking; Toxicology

29

30 **RESUMEN:** *Evaluación toxicológica de aceite crudo de palma (Elaeis guineensis Jacq.)*  
31 *usado en fritura de akara (tapa de pasta de frijol).* Akara es un tapa hecho de pasta de frijol  
32 frito en aceite de palma crudo (CPO; *Elaeis guineensis* Jacq.), que se vende en las calles de  
33 Brasil y África. Durante la fritura de alimentos, los aceites pueden formar productos de  
34 descomposición tóxicos como los compuestos polares totales (TPC), que determinan la  
35 degradación del aceite. El objetivo de este estudio fue evaluar la toxicidad de CPO utilizado  
36 en 25 horas de frituras de akara. Los cambios en el aceite se determinaron mediante la  
37 cuantificación de TPC y ensayos de mutagenicidad en *Salmonella*/microsomas usando cepas  
38 de *Salmonella Typhimurium* TA97, TA98, TA100 y TA102 con y sin activación metabólica  
39 exógena. Se asume que el 25% de TPC es el nivel máximo permitido, los aceites de fritura  
40 oscilaron desde 14,08 hasta 29,81%. Ningún CPO utilizado en el proceso de akara tradicional  
41 mostró ser citotóxico, ni tener actividad mutagénica o genotóxica.

42 **PALABRAS CLAVE:** Aceite de palma; Fritura repetida; Micronúcleos; Mutagenicidad;  
43 Toxicología

44

45 **Citation/Cómo citar este artículo:** Felzenszwalb I, da Costa Mazzei JL, Feitosa S, Fortes  
46 Aiub CA, de Almeida DT. 2014. Toxicological assessment of crude palm oil (*Elaeis*  
47 *guineensis*) used in deep frying of akara (cowpea paste finger food). *Grasas Aceites* 65 (2):  
48 e020. doi: <http://dx.doi.org/10.3989/gya.086913>.

49

50 **Copyright:** © 2014 CSIC. This is an open-access article distributed under the terms of the  
51 Creative Commons Attribution-Non Commercial (by-nc) Spain 3.0 Licence.

52

### 53 **1. INTRODUCTION**

54 Palm oil is derived from the fruit of the palm tree *Elaeis Guineensis* Jacq. and is  
55 consumed as crude palm oil (CPO) in Africa, Southeast Asia and Brazil. Unrefined palm oil is  
56 orange-red in color and contains triglycerides with approximately 50% saturated fatty acids,  
57 40% monounsaturated and 10% polyunsaturated fatty acids, along with carotenoids and  
58 vitamin E (Norhaizan *et al.*, 2013; Sampaio *et al.*, 2013). By fractionation, a liquid fraction  
59 (palm olein, rich in unsaturated compounds) and a solid fraction (palm stearin, rich in  
60 saturated compounds) can be obtained and used for different purposes in the food industry  
61 (Lin, 2011).

62 In Brazil, crude palm oil is known as *azeite de dendê* and it is an ingredient in most  
63 dishes from Bahia, such as *moqueca*, *vatapá*, *xinxin de galinha*, *caruru* and *acarajé* (akara)  
64 (Almeida *et al.*, 2013; Oliveira, 2009). Akara is a paste of cowpea (*Vigna unguiculata* L.  
65 Walp) sold as a street finger food and it has been described as the most common food product  
66 containing cowpeas in Africa (Reber *et al.*, 1983) and Brazil. It's also a cultural and touristic

67 Brazilian icon made and sold by typically clothed women called *baianas de acarajé* (IPHAN,  
68 2005). In the process of making akara, cowpea is split, decorticated and macerated into a  
69 paste. After seasoning with grated onions and salt, akara paste is whipped, shaped into balls  
70 with a wooden spoon and deep-fried in CPO.

71 During the frying process, the oil undergoes hydrolysis, oxidation and polymerization  
72 reactions leading to changes in flavor stability and quality, color and texture of the fried food  
73 and its nutritional quality (Dobarganes, 2000a; Saguy and Dana, 2003; Velasco *et al.*, 2008).  
74 The frying temperature and time, type of heating, frying oil composition, oil turnover rate,  
75 oxygen content, antioxidants and type of fryer affect the deterioration of oil during deep-fat  
76 frying (Soriano *et al.*, 2002).

77 These chemical reactions in frying oil originate volatile products, which are partially  
78 eliminated during frying and new non-volatile compounds are also formed (Saguy and Dana,  
79 2003). These new compounds have higher polarity and constitute the so-called total polar  
80 compounds (TPC), which include triglyceride polymers (TGP), triglyceride dimers (TGD),  
81 oxidized triglyceride monomers (oxTGM), diglycerides (DG) and free fatty acids (FFA)  
82 (Dobarganes *et al.*, 2000b). In general, fresh refined oils contain total polar compounds  
83 ranging from 3.2% to 3.8%. It is recommended that frying oils which contain more than 24–  
84 27% TPC should be discarded (Berger, 2005; Saguy and Dana, 2003).

85 Several studies were performed to evaluate the mutagenic potential in vegetable oils  
86 used in deep frying (Fong *et al.*, 1980; Scheutwinkel-Reich *et al.*, 1981; Taylor *et al.*, 1982;  
87 Van Gastel *et al.*, 1984), the effects of repeated ingestion of heated palm oil by rats (Adam *et al.*,  
88 2009; Farag *et al.*, 2010; Isong *et al.*, 1997), and they showed that the fraction of polar  
89 compounds isolated from the oxidized oils is toxic to laboratory animals (Pantzaris, 1998).  
90 Besides that, the Ames test (*Salmonella*/microsome assay) is a rapid, safe and predictive test  
91 for mutagenicity in mammals (Claxton *et al.*, 1987; Maron and Ames, 1983; Carpes *et al.*,

92 2013), in which Hageman *et al.* (1988) have detected mutagenic activity in polar material  
93 obtained from deep-frying fats.

94 The Ames test is a widely used methodology to detect mutagenic chemicals (Claxton  
95 *et al.*, 1987; Maron and Ames, 1983; Carpes *et al.*, 2013), however, bacteria is less able to  
96 repair DNA damage than mammal. A macrophage lineage is used due to its ability to promote  
97 responses involving oxidative stress. In this way, RAW 264,7 is one of the most commonly  
98 used for giving the clearest results and being extremely sensitive to lipopolysaccharide  
99 endotoxin from gram-negative bacteria such as *Salmonella* (Claxton *et al.*, 1987; Maron and  
100 Ames, 1983).

101 Changes in oil quality during deep frying are still a major issue from the health  
102 perspective. Nevertheless, there are few studies in the literature regarding the consequences of  
103 consuming CPO deep fried foods. It has been observed that the *baianas de acarajé* sell akara  
104 daily for 5h hours and continuously reuse the fried palm oil, hence this frying oil may have  
105 toxic compounds present. Therefore, the aim of this work was to evaluate CPO mutagenic and  
106 genotoxic activities before and after 25 hours of frying akara, and to quantify its TPC (%)  
107 contents.

108

## 109 **2. MATERIALS AND METHODS**

### 110 **2.1. CPO sample and frying process**

111 30 L of integral CPO (a mixture of liquid and solid phases) industrialized at Nazaré  
112 city (state of Bahia, Brazil) and conditioned in two tinplate cans with a capacity of 15 L each  
113 were purchased at São Joaquim Fair, in Salvador (Bahia). This oil was placed in a stainless  
114 steel recipient and heated up to 45 °C, allowing oil fusion and homogenization to be used in  
115 frying. At first, 20 mL (time 0) of it were filtered in a glass wool filter, inerted with nitrogen

116 gas and stored in an amber bottle at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Jorge and Gonçalves, 1998) and thawed for  
117 analysis (**initial sample, CPO**).

118 The preparation of akara was performed by a *baiana de acarajé* according to her  
119 traditional practice. 5 kg of crude mass of akara were bought daily from her traditional source  
120 at the same fair. Frying was always performed outdoors. First the raw mass was placed in an  
121 aluminum pan and seasoned with grated onions and salt, then whipped and shaped into balls  
122 (60–80 g each) with a wooden spoon. Then, 5 L of CPO in an enameled pan were heated for  
123 12 minutes in the presence of an onion (*baiana's* traditional practice – an intention of making  
124 the oil quality lasts longer during frying). Subsequently, 5 of those balls were successively  
125 added to the oil and deep-fried during approximately 6 minutes, with some intervals in which  
126 the oil remained with only the onion, while the *baiana* whipped the mass again, and a total of  
127 110 akaras/day was obtained – simulating akara average quantity at the *baiana's* point of sale  
128 (Rogerio, 2010).

129 The total frying time per day was 5 intermittent hours and the frying process was  
130 performed on 5 consecutive days – totaling 25 hours. The temperature ranged from 143 to 188  
131  $^{\circ}\text{C}$  in the beginning (day 1) and 159–178  $^{\circ}\text{C}$  in the end (day 5).

132 Every frying day began with 5 L in the enameled pan. On day 1, only fresh oil was  
133 used, and on subsequent days a mixture of the previous day's oil (used oil) was made with  
134 fresh oil. The oil turnover was performed daily with 2 L at the most. On days 1 and 2 only  
135 fresh CPO was added, and on the other days, the replacement was made with a mixture of  
136 fresh plus used oil, according to the *baiana's* techniques.

137 Then, at the end of each frying day, the oil was left undisturbed in a pan with a lid, at  
138 room temperature, until the food waste settled, and was filtered afterwards, stored until the  
139 next frying day and the same procedure was repeated over four subsequent days, for a total  
140 time of 25 hours. At the end of each day and the frying process (25 hours), a new aliquot of

141 20 mL was filtered in a glass wool filter, obtaining the last sample (**FPO of frying**) and the  
142 others for TPC (%) content analysis.

143

## 144 **2.2. Total polar compounds**

145 Total polar compound (TPC) content was determined gravimetrically according to a  
146 mini column method described previously, with slight modifications (Dobarganes *et al.*,  
147 2000b). In brief, approximately 0.5 g of crude palm oil were dissolved in the elution solvent  
148 and introduced into a glass column filled with a silica gel slurry and elution solvent. This  
149 elution solvent was a mixture of light petroleum (b.p. 40–60 °C) and diethyl ether 94:6 (v:v).  
150 A chromatographic glass column with an internal diameter of 1 mm and a length of 15 mm,  
151 containing 5 g of silica gel (with a particle size 0.063–0.200 mm and 70–230 mesh) adjusted  
152 to a water content of 5% was used. Non-polar compounds were eluted with 60 mL of elution  
153 solvent and the polar compound fraction was eluted with 50 mL diethyl ether. A dropping  
154 funnel was used and the flow rate was adjusted to approximately 1.5 mL·min<sup>-1</sup>. Solvent was  
155 removed by rotary evaporation and the flask was flushed with a stream of nitrogen to ensure  
156 dryness. The completeness of fractionation was evaluated by analytical thin-layer  
157 chromatography (TLC) with an elution system of petroleum ether:diethyl ether:acetic acid  
158 (70:40:1; v:v:v).

159 The reported data of TPC were obtained from duplicate measurements of each sample  
160 and expressed in terms of the mean and standard error (SE). A regression analysis was also  
161 applied to these data.

162

## 163 **2.3. *Salmonella*/microsome assay**

164 The mutagenic evaluation of CPO and FPO was performed by the pre-incubation  
165 method of *Salmonella*/microsome assay as described by Maron and Ames (1983), with slight



166 modifications (Mortelmans and Zeiger, 2000). Briefly, 100  $\mu\text{L}$  of different concentrations of  
167 CPO or FPO (all dilutions were in DMSO) and 100  $\mu\text{L}$  of stationary growth cultures of  
168 *Salmonella Typhimurium* strains TA97, TA98, TA100, and TA102 were added to 500  $\mu\text{L}$  of  
169 0.2 M of a sodium phosphate buffer (pH 7.4) or to 500  $\mu\text{L}$  of an S9 mix. After pre-incubation  
170 of the mixture at 37 °C for 30 min, 2 mL of top agar were added to it and the contents poured  
171 onto a minimal glucose agar plate. The plates were incubated at 37 °C and the numbers of  
172 *His*<sup>+</sup> were scored after 72 h. Each assay (in triplicate) was repeated twice to confirm the  
173 results.

174 Aroclor 1254-induced rat liver S9 fraction was purchased from Molecular Toxicology  
175 Inc. (Moltox™, USA). The metabolic activation mixture (S9 mix) was prepared according to  
176 Maron and Ames (1983) and used as described earlier (Aiub *et al.*, 2003). The criterion for a  
177 positive mutagenic response was the number of reverting colonies in the test assay amounting  
178 to at least twice the number of spontaneous reverting (Mutagenic Index,  $\text{MI} \geq 2$ ) (Maron and  
179 Ames, 1983).

180 The mutagenic response was considered positive when the number of revertant  
181 colonies in the test was at least twice the number of spontaneous revertants and no  
182 cytotoxicity was detected (survival rates <70%). Significant statistical differences between  
183 negative and tested concentrations under the same experimental conditions were verified by  
184 statistical analysis (Student t-test,  $p \leq 0.05$ ) (Stankevicius *et al.*, 2008).

185

#### 186 **2.4. Survival experiments**

187 To determine the cytotoxic effect of CPO and FPO, samples from the pre-incubation  
188 assay mixture in the *Salmonella*/microsome assay were diluted in 0.9% NaCl (w/v) to obtain  
189 a suspension containing  $2 \times 10^2$  cells·mL<sup>-1</sup>. An aliquot of 100  $\mu\text{L}$  of this suspension was  
190 poured onto a nutrient agar plate. The plates were incubated at 37 °C for 24 h and colonies

191 were counted. Cytotoxicity was considered positive when the cell survival rate was <70% of  
192 the rate observed for the negative control (Aiub *et al.*, 2003).

193

#### 194 **2.5. RAW 264,7 cell culture**

195 A murine macrophage cell line was used from a culture at confluence and was  
196 incubated in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, at a temperature of 37 °C. Cell detachment was  
197 carried out mechanically by scraping. After that the suspension was centrifuged at 5000 rpm  
198 for 5 min and cells were re-suspended in Modified Eagle Medium (MEM) Ca<sup>2+</sup>, 1.8 mM  
199 (Gibco®) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1.76 g·L<sup>-1</sup> of NaHCO<sub>3</sub>, 0.88 g·L<sup>-1</sup> of  
200 pyruvate, 22 mg·L<sup>-1</sup> of aspartic acid and 17 mg·L<sup>-1</sup> of L-serine. Cell viability was determined  
201 after trypan blue staining and the cells were plated on 24-well plates at a density of 2×10<sup>5</sup>  
202 cells/well and then incubated for 24 h.

203

#### 204 **2.6. Micronucleus assay**

205 The micronucleus assay was performed as previously described (Aiub *et al.*, 2011),  
206 with modifications. Cells were treated with 100 µL of various dilutions of CPO or FPO in  
207 DMSO, corresponding to 10% of the total volume of each well and then the plates were  
208 incubated for 24 h. After this period, the medium was removed from the wells, cells were  
209 washed with 1 mL of MEM Ca<sup>2+</sup>, 1.8 mM and reincubated, and after that with 1 mL of MEM  
210 Ca<sup>2+</sup>, 1.8 mM, supplemented with fetal bovine serum for 24 h in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>.  
211 N-methyl-N-nitro- N-nitrosoguanidine (MNNG) 0.5 µM was used as positive control. The  
212 medium was then replaced with cold Carnoy's fixative (3 parts methanol to 1 of part glacial  
213 acetic acid) for 15 min. Fixed cells were washed with McIlvaine buffer (21 g·L<sup>-1</sup> of citric acid  
214 and 36 g·L<sup>-1</sup> of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.0) for 2 minutes and left to dry at room temperature.  
215 Afterwards, the cells were stained with 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0.2 µg mL<sup>-1</sup>),

216 dissolved in McIlvaine buffer for 40 min. Then, the cells were washed twice with McIlvaine  
217 buffer and left to dry again at room temperature.

218 To determine the mitotic index and number of micronucleated cells, as well as  
219 percentages of necrotic and apoptotic cells, 1,000 cells per concentration were analyzed in a  
220 fluorescence microscope (Reichert Univar) at an excitation wavelength of 350 nm. This  
221 experiment was conducted in quintuplicate. The data were analyzed using a one-way ANOVA  
222 and the Tukey-Kramer multiple comparison test. Results were considered to be statistically  
223 significant at  $p \leq 0.05$  (Aiub *et al.*, 2011, Carpes *et al.*, 2013). GraphPad InStat® software,  
224 version 3.01 (GraphPad Software, Inc., USA) was used for all analyses.

225

## 226 **3. RESULTS AND DISCUSSION**

### 227 **3.1. Mutagenic activity**

228 There was no significant ( $p > 0.05$ ) increase in the number of reverting colonies at any of  
229 the tested concentrations of CPO and FPO over the respective negative control plates in all  
230 four tested strains, both with or without the S9 mix (Tables 1 and 2).

231

### 232 **3.2. Micronucleus evaluation**

233 The results from the assay with CPO and FPO are presented in Table 3. Both samples  
234 did not induce micronuclei formation, apoptosis or necrosis on macrophage cells. Moreover,  
235 they did not induce an increase in mitotic division. There was no significant difference  
236 between the results obtained with the oils sampled before and after frying ( $p \leq 0.05$ ).

237

### 238 **3.3. Total polar compounds**

239 TPC contents increased linearly with frying time with high correlation coefficients  
240 ( $R^2 = 0.96$ ;  $TPC = 15.24 + 0.6 \cdot \text{time}$ ) (Table 4). After 25 hours of heating, the oil showed around

241 29% polar compounds, above the established limit in most of the current regulation regarding  
242 the discharging of frying oils and fats for human consumption (Berger, 2005; Saguy and  
243 Dana, 2003). It was observed that the values were higher from 15 h of frying (Table 4), due to  
244 the greater heating time and replenishment with reused oil.

245 Crude palm oil is largely used in Brazilian cuisine and it is essential in akara deep  
246 frying. The latter is now regarded as one of Brazil's immaterial national treasures (IPHAN,  
247 2005) and a cultural and touristic icon in the city of Salvador (Bahia, Brazil). During deep-  
248 frying, the high temperatures used in the presence of oxygen and water induced important  
249 chemical changes in the palm oil, inevitably reducing its shelf life and directly affecting its  
250 nutritional characteristics (Matthäus, 2007). Therefore, it is necessary to carry out  
251 toxicological studies to determine the security of the CPO used in this process.

252 No mutagenic or citotoxic activity were detected in the CPO used in the traditional  
253 akara frying process, in all tested strains (Tables 1 and 2). Furthermore, it was observed that  
254 CPO did not induce genotoxic potential in the micronucleus assay in macrophages (Table 3).  
255 These findings were contrary to the expected results since the TPC content in the analyzed  
256 frying oil sample (25 h) exceeded the considered safe limit for health (Table 4) (Berger,  
257 2005). Nevertheless, some researches had found no mutagenic activity in deep-frying oils  
258 (Scheutwinkel-Reich *et al.*, 1981; Taylor *et al.*, 1982; Van Gastel *et al.*, 1984), and only Fong  
259 *et al.* (1980) had observed mutagenicity in peanut oil, however it had been correlated to an  
260 aflatoxin B1 contamination in the oil.

261 As already mentioned, TPC include TGP, TGD, oxTGM, DG, and FFA (Dobarganes  
262 *et al.*, 2000b). As DG are measured as a fraction of TPC, it may be misleading to use TPC in  
263 judging oil quality. The higher amounts of total polar compounds in palm oils are mainly due  
264 to a higher level of DG contents (4.0–7.5%) compared to other vegetable oils (2–3%) (Berger,  
265 2005; DeMarco *et al.*, 2007). Otherwise, the CPO processing in Bahia displays high FFA %, a

266 consequence of the poor condition of the oil extraction (Almeida *et al.*, 2013). Thus TPC  
267 elevation in samples (CPO and FPO) may be due to the predominance of such fractions which  
268 are not associated with the toxicity of heated oils (González-Munõz *et al.*, 1998; Morita *et al.*,  
269 2008).

270 One unique characteristic of crude palm oil is its high content of carotenoids and  
271 tocopherols. Carotenoids, which impart to CPO its distinctive orange-red color, together with  
272 tocopherols and tocotrienols contribute to stability. A research made by our group  
273 demonstrated that the mean of carotenes in the industrial CPO processed in Bahia were  
274  $526.77 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (Almeida *et al.*, 2013) and this carotenoid value is extremely high when  
275 compared to other oils: sunflower ( $8.5\pm 0.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and extra virgin olive oil ( $11.0\pm 0.3$   
276  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Andreu-Sevilla *et al.*, 2008). On the other hand, CPO contains unusually high levels  
277 of tocotrienols (Norhaizan *et al.*, 2013; Berger, 2005). Most other common vegetable oils  
278 have negligible contents of tocotrienols (Lin, 2011). In CPO, the presence of these  
279 antioxidants seems to offer some oxidative protection to the oil through a mechanism in  
280 which they are oxidized prior to triglycerides (Lin, 2011). Together with CPO constitution  
281 factors, the *baiana de acarajé* practice of heating oil in the presence of a whole onion  
282 considerably preserves the oil quality with a significant reduction in the levels of lipid  
283 peroxidation indicators as well as a reduction in tocoferol loss (Oyewole and Olayinka, 2007).

284

#### 285 **4. CONCLUSIONS**

286 In despite of its high TPC levels, no cytotoxic, mutagenic or genotoxic activities were  
287 detected in the crude palm oil used in the traditional akara frying process. This may be due to  
288 the CPO natural antioxidant content and akara frying practices such as the addition of an  
289 onion to the frying oil, and fresh oil replacement at the beginning. Therefore, the CPO used in  
290 akara deep-frying do not offer toxicological risks to consumers.

291

292 **ACKNOWLEDGMENTS**

293 The authors were supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
294 Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq,  
295 Process n° 482790/2010-5, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de  
296 Janeiro (FAPERJ) and SR2/UERJ, FAPESB (Termo N°: BOL1784/2010, Brazil), Associação  
297 das Baianas de Acarajés e Mingau da Cidade de Salvador-Bahia-Brazil and Alessandra  
298 Quirino for technical assistance.

299

300 **REFERENCES**

- 301 Adam SK, Das S, Jaarin K. 2009. A detailed microscopic study of the changes in the aorta of  
302 experimental model of postmenopausal rats fed with repeatedly heated palm oil. *Int J Exp*  
303 *Path* **90**, 321–327.
- 304 Aiub C, Pinto LFR, Felzenszwalb I. 2003. N-Nitrosodiethylamine mutagenicity at low  
305 concentrations. *Toxicol Lett* **145**, 36–45.
- 306 Aiub C, Gadermaier G, Oliveira, I, Felzenszwalb I, Ferreira F, Pinto LFR, Eckl P. 2011. N-  
307 Nitrosodiethylamine genotoxicity in primary rat hepatocytes: effects of cytochrome P450  
308 induction by phenobarbital. *Toxicol Lett* **206**, 2, 139–143.
- 309 Almeida DT, Nunes IL, Conde PL, Rosa RPS, Rogério WF, Machado ER. 2013. A quality  
310 assessment of crude palm oil marketed in Bahia, Brazil. *Grasas y Aceites* **64**, 4, 384–394.
- 311 Andreu-Sevilla A, Hartmann A, Sayas E, Burló-Carbonell F, Delgado-Estrell P, Valverde J.  
312 2008. Mathematical quantification of total carotenoids in Sioma oil using color coordinates  
313 and multiple linear regression during deep-frying simulations. *Eur Food Res Technol* **226**,  
314 1283–1291.

- 315 Berger KG. 2005. The use of palm oil in frying. Frying oil series. *Malaysian Palm Oil*  
316 *Promotion Council* (MPOPC) [Online]. Available: <http://www.mpoc.org> [19 Jun 2013].
- 317 Carpes RM, Fleury BG, Lages BG, Pinto AC, Aiub CA, Felzenszwalb I. 2013. Mutagenicity,  
318 genotoxicity, and scavenging activities of extracts from the soft coral *Chromonephthea*  
319 *braziliensis*: a possibility of new bioactive compounds. *Genet Mol Res* **12**, 3, 3575–3587.
- 320 Claxton LD, Allen J, Auletta A, Mortelmans K, Nestmann E, Zeiger E. 1987. Guide for the  
321 *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity. *Mutat Res*  
322 **189**, 83–91.
- 323 DeMarco E, Saravese M, Parisini C, Battimo I, Falco S, Sacchi, R. 2007. Frying performance  
324 of a sunflower/palm oil blend in comparison with pure palm oil. *Eur J Lipids Sci Technol* **109**,  
325 237–246.
- 326 Dobarganes MC, Márquez-Ruiz G, Velasco J. 2000a. Interactions between fat and food deep-  
327 frying. *Eur J Lipid Sci Technol* **102**, 8-9, 521–528.
- 328 Dobarganes MC, Velasco J, Dieffenbacher A. 2000b. Determination of polar compounds  
329 polymerized and oxidized triacylglycerols, and diacylglycerols in oils and fats. *Pure Appl*  
330 *Chem* **72**, 1563–1575.
- 331 González-Muñoz MJ, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ. 1998. Short-Term in Vivo Digestibility  
332 of Triglyceride Polymers, Dimers, and Monomers of Thermoxidized Palm Olein Used in  
333 Deep-Frying. *J Agric Food Chem* **46**, 5188–5193.
- 334 Farag RS, Abdel-Latif MS, Basuny AMM, Hakeem BSAE. 2010. Effect of non-fried and  
335 fried oils of varied fatty acid composition on rat organs. *Agric Biol J N Am* **1**, 4, 501–509.
- 336 Fong LYY, Ton CCT, Koonanwatchaidet P, Huang DP. 1980. Mutagenicity of peanut oils  
337 and effect of repeated cooking. *Food Cosmet Toxicol* **18**, 467–470.
- 338 Hageman G, Kikken R, Ten Hoor F, Kleinjans J. 1988. Assessment of mutagenic activity of  
339 repeatedly used deep-frying fats. *Mutat Res* **204**, 595–604.

- 340 IPHAN - Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional, DOSSIÊ IPHAN 6, Ofício  
341 das Baianas do Acarajé. 2005. *Ministério da Cultura*, DF, Brasil [Online]. Available:  
342 <http://portal.iphan.gov.br/portal/baixaFcdAnexo.do?id=919> [30 Apr 2013].
- 343 Isong EU, Ebong PE, Ifon ET, Umoh IB, Eka OU. 1997. Thermoxidized palm oil induces  
344 reproductive toxicity in healthy and malnourished rats. *Plant Foods Hum Nutr* **51**, 159–166.
- 345 Jorge N, Gonçalves AG. 1998. Comportamento do óleo de girassol, com alto teor de ácido  
346 oléico em termoxidação e fritura. *Ciência Tecnol Alim* **18**, 3, 335–342.
- 347 Lin SW. 2011. Palm oil. In Gunstone FD (Ed.). *Vegetable oils in food technology, composition,*  
348 *properties and use*, 1<sup>th</sup> edition, Iowa, Blackwell Publishing, 59–93.
- 349 Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat*  
350 *Res* **113**, 173–215.
- 351 Matthäus B, 2007. Use of palm oil for frying in comparison with other high-stability oils. *Eur*  
352 *J Lipids Sci Technol* **109**, 400–409.
- 353 Morita O, Tamaki Y, Kirkpatrick JB, Chengelisb CP. 2008. Safety assessment of heated  
354 diacylglycerol oil, Subchronic toxicity study in rats. *Food Chem Toxicol* **46**, 8, 2748–2757.
- 355 Mortelmans K, Zeiger E. 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat*  
356 *Res* **455**, 29–60.
- 357 Norhaizan ME, Hosseini S, Gangadaran S, Lee ST, Kapourchali FR, MoghadasianMH. 2013.  
358 Palm oil, Features and applications. *Lipid Technol* **25**, 2, 39–42.
- 359 Oliveira HP. 2009. Dendê, aspectos botânicos, agrônômicos, ecológicos e econômicos. In  
360 Loddy R (Ed). *Dendê símbolo e sabor*, São Paulo, Editora SENAC, 52–82.
- 361 Oyewole OI, Olayinka ET. 2007. Protective role of onion and garlic on physicochemical  
362 alterations and toxicity of heated soybean oil. *Afr J Biotechnol* **6**, 18, 2158–2161.
- 363 Pantzaris TP. 1998. Comparison of monounsaturated and polyunsaturated oils in continuous  
364 frying. *Grasas y Aceites* **49**, 319–352.



- 365 Reber EF, Eboh L, Aladeselu A, Brown WA, Marshall DD. 1983. Development of high-  
366 protein low-cost Nigerian foods. *J Food Sci* **48**, 217.
- 367 Rogério WF. 2010. *Uma imersão no tabuleiro da baiana: o acarajé*. Master's thesis (MSc),  
368 Federal University of Bahia, School of Nutrition, Salvador-BA. [Online]. 82 f. Available:  
369 <http://www.repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/10491>.
- 370 Saguy IS, Dana D. 2003. Integrated approach to deep fat frying, engineering, nutrition, health  
371 and consumer aspects. *J Food Eng* **56**, 143–152.
- 372 Sampaio KA, Ayala JV, Silva SM, Ceriani R, Verhe R, Meirelles AJA. 2013. Thermal  
373 Degradation Kinetics of Carotenoids in Palm Oil. *J Am Chem Soc* **90**, 191–198.
- 374 Scheutwinkel-Reich M, Ingerowski G, Stan HJ. 1981. Microbiological studies investigating  
375 mutagenicity of deep frying fat fractions and some of their components. *Lipids* **15**, 849–852.
- 376 Soriano JM, Moltó, JC, Mañes J. 2002. Hazard analysis and critical control points in deep-fat  
377 frying. *Eur J Lipid Sci Technol* **104**, 174–177.
- 378 Stankevics L, Aiub C, Santa Maria LC, Lobo-Hajdu G, Felzenszwalb I. 2008. Genotoxic  
379 and antigenotoxic evaluation of extracts from *Arenosclera brasiliensis*, a Brazilian marine  
380 sponge. *Toxicol in Vitro* **22**, 1869–1877.
- 381 Taylor SL, Berg CM, Shoptaugh NH, Scott VN. 1982. Lack of mutagens in deep-fat-fried  
382 foods obtained at the retail level. *Food Chem Toxic* **20**, 209–212.
- 383 Van Gastel A, Mathur R, Roy VV, Rukmirfi C. 1984. Ames mutagenicity test of repeatedly  
384 heated edible oils. *Food Chem Toxic* **22**, 403–405.
- 385 Velasco J, Marmesat S, Dobarganes MC. 2008. Chemistry of frying. In Sahin S, Sumnu SG  
386 (Ed). *Advances in deep-fat frying of foods*, London (NY), CRC Press, Taylor & Francis  
387 Group, Boca Raton, 33–56.
- 388

**Table 1** – Mutagenic evaluation of crude palm oil before akara frying (CPO) in strains TA97, TA98, TA100 and TA102 of *S. Typhimurium* in the presence and absence of metabolic activation (S9).

Strain	CPO	- S9			+ S9		
		Mean $\pm$ SD <sup>a</sup>	M.I. <sup>b</sup>	% Survival <sup>c</sup>	Mean $\pm$ SD <sup>a</sup>	M.I. <sup>b</sup>	% Survival <sup>c</sup>
TA97	0	132 $\pm$ 22	1.0	100	107 $\pm$ 14	1.0	100
	1:128	138 $\pm$ 38	1.0	97	130 $\pm$ 19	1.2	100
	1:64	134 $\pm$ 11	1.0	90	114 $\pm$ 9	1.1	100
	1:32	115 $\pm$ 14	0.9	91	119 $\pm$ 15	1.1	100
	1:16	123 $\pm$ 28	0.9	90	134 $\pm$ 11	1.2	100
	1:8	158 $\pm$ 66	1.2	89	118 $\pm$ 6	1.1	100
	PC	483 $\pm$ 62	3.7	100	1016 $\pm$ 418	9.5	100
TA98	0	27 $\pm$ 4	1.0	100	42 $\pm$ 3	1.0	100
	1:128	22 $\pm$ 2	0.8	100	42 $\pm$ 4	1.0	92
	1:64	21 $\pm$ 3	0.8	100	45 $\pm$ 8	1.1	100
	1:32	20 $\pm$ 3	0.8	100	37 $\pm$ 4	0.9	90
	1:16	22 $\pm$ 12	0.8	100	56 $\pm$ 5	1.3	100
	1:8	31 $\pm$ 11	1.1	100	64 $\pm$ 6	1.5	100
	PC	145 $\pm$ 5	5.4	90	224 $\pm$ 16	5.3	86
TA100	0	70 $\pm$ 8	1.0	100	186 $\pm$ 25	1.0	100
	1:128	68 $\pm$ 40	1.0	100	189 $\pm$ 17	1.0	100
	1:64	68 $\pm$ 47	1.0	100	190 $\pm$ 12	1.0	100
	1:32	86 $\pm$ 4	1.2	100	216 $\pm$ 5	1.2	99
	1:16	99 $\pm$ 13	1.4	100	221 $\pm$ 1	1.2	100
	1:8	65 $\pm$ 9	0.9	99	231 $\pm$ 11	1.2	100
	PC	444 $\pm$ 6	6.0	100	2304 $\pm$ 153	12.4	100
TA102	0	345 $\pm$ 64	1.0	100	315 $\pm$ 31	1.0	100
	1:128	356 $\pm$ 45	1.0	83	431 $\pm$ 88	1.4	100
	1:64	301 $\pm$ 15	0.9	84	374 $\pm$ 23	1.2	100
	1:32	337 $\pm$ 18	1.0	79	332 $\pm$ 74	1.1	100
	1:16	312 $\pm$ 10	0.9	88	297 $\pm$ 4	0.9	92
	1:8	295 $\pm$ 39	0.9	87	416 $\pm$ 23	1.3	87
	PC	2207 $\pm$ 286	6.4	89	1016 $\pm$ 103	3.2	100

<sup>a</sup> Number of revertant colonies per plate: mean values and standard deviation (SD) of at least three experiments;

<sup>b</sup> MI: Mutagenic index: number of *His*<sup>+</sup> induced in the sample/ number of spontaneous *His*<sup>+</sup> in the negative

control; <sup>c</sup> Survival calculated in relation to the negative control. Concentration 0 refers to the negative control

(solvent): 100  $\mu$ L of DMSO. The doses of the positive controls (PC) per plate in the absence of S9 mix were 0.5  $\mu$ g of 4-nitroquinoline-1-oxide to TA97 and TA98; 1.0  $\mu$ g of Sodic Azide to TA100 and 0.5  $\mu$ g of Mitomicin C

to TA102. The doses per plate of the positive controls in the presence of S9 mix were 1 $\mu$ g of 2-Aminoantracen to

TA97 and TA100 and 20  $\mu$ g of Benzo[ $\alpha$ ]piren to TA98 and TA102. Cytotoxicity was detected when survival rates < 70%.

**Table 2** - Mutagenic evaluation of crude palm oil after akara frying (FPO) in strains TA97, TA98, TA100 and TA102 of *S. Typhimurium* in the presence and absence of metabolic activation (S9).

Strain	FPO	- S9			+ S9		
		Mean $\pm$ SD <sup>a</sup>	M.I. <sup>b</sup>	% Survival <sup>c</sup>	Mean $\pm$ SD <sup>a</sup>	M.I. <sup>b</sup>	% Survival <sup>c</sup>
TA97	0	341 $\pm$ 41	1,0	100	202 $\pm$ 8	1,0	100
	1:128	321 $\pm$ 91	0,9	100	238 $\pm$ 7	1,2	100
	1:64	319 $\pm$ 42	0,9	100	116 $\pm$ 22	0,6	100
	1:32	335 $\pm$ 15	1,0	100	265 $\pm$ 37	1,3	100
	1:16	238 $\pm$ 47	0,7	100	287 $\pm$ 22	1,4	100
	1:8	233 $\pm$ 59	0,7	95	240 $\pm$ 6	1,2	100
	PC	2162 $\pm$ 499	6,3	70	2388 $\pm$ 399	11,8	78
	TA98	0	19 $\pm$ 3	1,0	100	51 $\pm$ 4	1,0
1:128	25 $\pm$ 4	1,3	100	59 $\pm$ 5	1,1	100	
1:64	35 $\pm$ 5	1,9	100	52 $\pm$ 0	1,0	100	
1:32	29 $\pm$ 2	1,5	97	65 $\pm$ 3	1,3	100	
1:16	31 $\pm$ 8	1,6	76	53 $\pm$ 6	1,0	100	
1:8	13 $\pm$ 3	0,7	100	69 $\pm$ 1	1,3	100	
PC	322 $\pm$ 146	17,3	94	239 $\pm$ 12	4,7	82	
TA100	0	115 $\pm$ 15	1,0	100	221 $\pm$ 9	1,0	100
	1:128	109 $\pm$ 8	1,0	100	228 $\pm$ 14	1,0	100
	1:64	137 $\pm$ 13	1,2	100	242 $\pm$ 31	1,1	100
	1:32	118 $\pm$ 15	1,0	100	266 $\pm$ 20	1,2	100
	1:16	108 $\pm$ 1	0,9	100	281 $\pm$ 30	1,3	100
	1:8	111 $\pm$ 12	1,0	100	260 $\pm$ 0	1,2	100
	PC	593 $\pm$ 214	5,2	86	986 $\pm$ 61	4,5	85
	TA102	0	341 $\pm$ 41	1,0	100	483 $\pm$ 87	1,0
1:128		374 $\pm$ 7	1,1	88	599 $\pm$ 63	1,2	100
1:64		336 $\pm$ 30	1,0	90	639 $\pm$ 26	1,3	100
1:32		287 $\pm$ 18	0,8	90	383 $\pm$ 49	0,8	100
1:16		264 $\pm$ 9	0,8	100	911 $\pm$ 64	1,9	100
1:8		267 $\pm$ 4	0,8	100	859 $\pm$ 33	1,8	100
PC		2163 $\pm$ 499	6,3	75	1747 $\pm$ 260	3,6	81

<sup>a</sup> Number of revertant colonies per plate: mean values and standard deviation (SD) of at least three experiments;

<sup>b</sup> MI: Mutagenic index: number of *His*<sup>+</sup> induced in the sample/ number of spontaneous *His*<sup>+</sup> in the negative

control; <sup>c</sup> Survival calculated in relation to the negative control. Concentration 0 refers to the negative control

(solvent): 100  $\mu$ L of DMSO. The doses of the positive controls (PC) per plate in the absence of S9 mix were 0.5

$\mu$ g of 4-nitroquinoline-1-oxide to TA97 and TA98; 1.0  $\mu$ g of Sodic Azide to TA100 and 0.5  $\mu$ g of Mitomicin C

to TA102. The doses per plate of the positive controls in the presence of S9 mix were 1 $\mu$ g of 2-Aminoantracen to

TA97 and TA100 and 20  $\mu$ g of Benzo[ $\alpha$ ]piren to TA98 and TA102. Cytotoxicity was detected when survival

rates < 70%.

**Table 3** - Micronucleus induction assay in macrophages using CPO and FPO.

Samples	Concentration	% Mi.I.± SD <sup>1</sup>	% Apoptosis	%Necrosis	% Micronucleus ± SD
CPO	NC	7.9 ± 2.8	3.6 ± 1.2	1.0 ± 0.3	3.8 ± 1.2
	1:128	4.4 ± 1.4	1.7 ± 0.9	1.0 ± 0.2	3.2 ± 0.3
	1:64	4.5 ± 0.8	1.4 ± 0.5	0.8 ± 0.3	3.0 ± 1.5
	1:32	11.6 ± 0.4	2.7 ± 2.8	0.6 ± 0.5	2.9 ± 1.3
	1:16	8.4 ± 0.8	3.5 ± 0.2	1.2 ± 0.3	4.4 ± 0.6
	1:8	8.9 ± 1.5	2.8 ± 0.5	0.8 ± 0.2	4.1 ± 1.3
	PC	6.7 ± 1.9	4.7 ± 0.8	1.2 ± 0.1	7.9 ± 1.1
FPO	NC	7.9 ± 2.8	3.6 ± 1.2	1.0 ± 0.3	3.8 ± 1.2
	1:128	5.0 ± 0.9	1.9 ± 0.3	0.9 ± 0.4	3.0 ± 0.6
	1:64	6.4 ± 0.1	1.9 ± 1.8	0.6 ± 0.4	2.8 ± 1.2
	1:32	6.0 ± 3.2	1.7 ± 0.9	0.7 ± 0.2	2.6 ± 0.3
	1:16	5.4 ± 3.4	1.5 ± 0.5	1.0 ± 0.2	1.9 ± 0.6
	1:8	6.4 ± 3.1	1.5 ± 0.2	0.9 ± 0.4	2.8 ± 1.4
	PC	6.7 ± 1.9	4.7 ± 0.8	1.2 ± 0.1	7.9 ± 1.1

<sup>1</sup> Mitotic index per thousand. The doses of the negative and positive controls were 10% of DMSO and 0.5 µM of MNNG, respectively. The experiment was performed in quintuplicate.

**Table 4** - Total polar compounds (TPC) content (%w/w) of crude palm oil during 25 h of akara frying, 5 days, 5h/day.

Time (h)	Mean	Std. Error	% <sup>a</sup>
<b>0<sup>b</sup></b>	14.08	0.04	—
5	20.25	1.09	44.12
10	20.09	0.40	42.68
15	24.73	0.17	75.63
20	27.51	0.22	95.38
<b>25<sup>c</sup></b>	29.81	0.48	111.71

<sup>a</sup>The percentage of increase TPC after 25 h of frying; <sup>b</sup>CPO (crude palm oil), initial sample; <sup>c</sup>FPO (frying palm oil), final sample.

**ARTIGO 2**

FOOD CHEMISTRY

**Enviado: 26 de março de 2014**

ISSN-L: 0308-8146

**Effects of deep frying on mineral contents and antinutritional factors in akara (fried cowpea food)**

1 **Effects of deep frying on mineral contents and antinutritional factors in akara (fried**  
2 **cowpea food).**

3

4 Sabrina Feitosa <sup>a,\*</sup>, Maria das Graças A. Korn <sup>b</sup>, Milena S. Pinelli <sup>b</sup>, Talita R. S. Oliveira <sup>a</sup>,  
5 Elisângela Boffo <sup>c</sup>, Ralf Greiner <sup>d</sup>, Deusdélia T. Almeida <sup>a</sup>.

6

7 <sup>a</sup> School of Nutrition, Federal University of Bahia - UFBA, Av. Araújo Pinho 32, 40110-150,  
8 Salvador, Bahia, Brazil. E-mail address: [sabrinafeitosa0@gmail.com](mailto:sabrinafeitosa0@gmail.com), [deliata@uol.com.br](mailto:deliata@uol.com.br),  
9 [talitarsoliveira@hotmail.com](mailto:talitarsoliveira@hotmail.com).

10 <sup>b</sup> NQA-PRONEX — GPQA, Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemistry,  
11 Federal University of Bahia – UFBA, 40170-290, Salvador, Bahia, Brazil. E-mail address:  
12 [milanelly@hotmail.com](mailto:milanelly@hotmail.com), [korn@ufba.br](mailto:korn@ufba.br).

13 <sup>c</sup> Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, Federal University of Bahia –  
14 UFBA, 40170-290, Salvador, Bahia, Brazil. E-mail address: [eboffo@ufba.br](mailto:eboffo@ufba.br).

15 <sup>d</sup> Max Rubner-Institut, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Department of Food  
16 Technology and Bioprocess Engineering, Haid-und-Neu-Strasse 9, D-76131 Karlsruhe,  
17 Germany. E-mail address: [ralf.greiner@mri.bund.de](mailto:ralf.greiner@mri.bund.de).

18

19 \* Corresponding author. Tel.: +55 71 32837700; fax: +55 71 32837705.

20 E-mail address: [sabrinafeitosa0@gmail.com](mailto:sabrinafeitosa0@gmail.com) (S. Feitosa).

21

**22 Abstract**

23           The aim was to quantify minerals and antinutritional factors in akara (AK) and its  
24 crude mass (CM). Deep-frying was performed on 5 consecutive days. Potassium and  
25 phosphorus were the most abundant elements naturally presented (545-719 mg/100 g and  
26 210-375 mg/100g, respectively), while sodium presented the highest contents (699-1,869  
27 mg/100g) because of salt addition in CM. Antinutritional factors in AK and CM were:  $11.27 \pm$   
28  $0.17$  and  $9.9 \pm 0.14$   $\mu\text{mol/g}$  (InsP<sub>5</sub>);  $2.92 \pm 0.03$  and  $3.75 \pm 0.11$   $\mu\text{mol/g}$  (InsP<sub>6</sub>);  $1.73 \pm 0.16$   
29 and  $1.68 \pm 0.02$  mg eq. CE/g (tannins);  $6.35 \pm 0.03$  and  $6.27 \pm 0.03$  mg/g (polyphenols);  $3.19$   
30  $\pm 0.03$  and  $0.0$  TIU/mg (trypsin inhibitors);  $0.50 \pm 0.00$  and  $0.0$  HU/Kg, (hemagglutinins).  
31 Deep frying led to significant reduction ( $p \leq 0.05$ ) of most of minerals and antinutritional  
32 factors. Nonetheless, AK showed itself as a good source of K, P, Mg, Mn, Mo, Cr, Fe and Zn,  
33 but with low bioavailability of the last two elements.

34

**35 Keywords**

36 Akara; antinutritional factors; deep-frying; minerals.

**37**

## 38 **1. Introduction**

39 Akara is a cultural and touristic icon in the city of Salvador (Bahia, Brazil) sold in the  
40 streets as a finger food by typically clothed women called *baianas de acarajé*. It is made from  
41 several cultivars of cowpea bean (*Vigna unguiculata* L.Walp), as follows: *fradinho*,  
42 *macassar*, *olho de pombo*, *costela de vaca*, *bocapreta* and others. In akara making process,  
43 beans are splitted, decorticated and macerated into a paste. After being seasoned with grated  
44 onions and salt, the crude mass is shaped into balls by a wooden spoon and deep-fried in  
45 crude palm oil (CPO) (Rogério, 2010).

46 Functional, sensory and nutritional characteristics of akaras are directly related to the  
47 variety of beans and CPO. Cowpea legumes have a relatively low-cost and it is a source of  
48 proteins, vitamins and minerals such as calcium, iron and zinc (Almeida, Greiner, Furtunado,  
49 Trigueiro, & Araújo, 2008; Carvalho et al., 2012). However, its nutritional value is usually  
50 reduced by the presence of antinutrients such as phytates, fibers, trypsin inhibitors, lectins,  
51 tannins and polyphenols that affect minerals bioavailability (Almeida, Greiner, Furtunado,  
52 Trigueiro, & Araújo, 2008; Santos, Santos, Fernandes, Castro, & Korn, 2013).

53 Brazilian economically underprivileged population, especially the Northeast, are feed  
54 from cowpea as a major source of proteins and minerals (Almeida, Greiner, Furtunado,  
55 Trigueiro, & Araújo, 2008; Carvalho et al., 2012), in which akara may play an important role  
56 as food. Nonetheless, there are only a few studies regarding this finger food and its content of  
57 minerals and antinutritional factors. Therefore, the aim of this study was to quantify minerals  
58 and antinutritional factors in akara samples and their crude mass fried in crude palm oil.

59

## 60 **2. Materials and methods**

### 61 *2.1 Samples collection and frying experiment*



62 Preparation of akara was performed by a *baiana de acarajé* according to her  
63 traditional practice. 5 kg of crude mass (CM) of akara (AK) were bought daily (day 1, 2, 3, 4,  
64 5) from her traditional source at São Joaquim Fair, in Salvador (BA).

65 30 L of integral CPO (a mixture of liquid and solid phases) industrialized at Nazaré  
66 city (state of Bahia, Brazil) and conditioned in two tinplate cans with a capacity of 15 L each  
67 were purchased at the same fair. This oil was placed in a stainless recipient and heated up to  
68 45 °C, allowing oil fusion and homogenization, to be used in frying.

69 Frying was always performed outdoors. First CM was placed in an aluminum pan and  
70 seasoned with grated onions and salt, then whipped and shaped into balls (80-110 g each) by a  
71 wooden spoon. Then, 5 L of CPO in an enameled pan was heated for 12 minutes in the  
72 presence of an onion (*baiana's* traditional practice □ an intention of keeping for longer oil  
73 quality during frying). Subsequently, 5 of those balls were successively added and deep-fried  
74 for approximately 6 minutes, with some time intervals in which oil remained with only just  
75 the onion, whilst the *baiana* whipped the mass again. Thereafter, they were removed and  
76 drained on absorbent paper until reaching ambient temperature. Total frying time per day was  
77 5 hours and the frying process was performed on 5 consecutive days. A total of 110 AK/day  
78 was obtained – simulating akara average quantity market in *baiana's* point of sale (Rogério,  
79 2010).

80 Every frying day was started with a total of 5 L of CPO in the enameled pan. On day 1  
81 and 2, only fresh oil was used, whereas on the subsequent days a mixture of oil from the  
82 previous day and fresh oil was used. The maximum daily oil turnover was 2 L.

83 Each day 10 CM samples were randomly collected as well as 10 AK close to the end  
84 of the daily frying process. It was stored in *Ziploc* bags at -20 °C and, during sample  
85 preparation, each batch of 10 were joined and applied the quarter method on them (until  
86 obtaining 50 g each) (ABNT, 2004). Then, samples were identified in accordance with frying

87 time of each day: CM 5h, AK 5h (day 1); CM 10h, AK 10h (day 2); CM 15h, AK 15h (day  
88 3); CM 20h, AK 20h (day 4); CM 25h, AK 25h (day 5).

89

## 90 *2.2 Sample preparation*

91 Akara and its crude mass were stored for 24 hours at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  before freeze-drying  
92 (Freeze-dryer LS 3000 D, Terroni Equipamentos Científicos Ltda., Brazil). Then, they were  
93 ground in a domestic stainless steel food processor (Cuisinart Coffee Grinder, Model DCG-  
94 20). The ground material was stored in amber bottles at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  for subsequent analysis.

95

## 96 *2.3 Antinutritional factors*

### 97 *2.3.1 Condensed tannins*

98 Condensed tannins were extracted with HCl:methanol (1:100 v/v) for 2 h with  
99 mechanical shaking at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  and centrifuged at  $5000\text{ g}$  at  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 15 min. Aliquots were  
100 immediately analyzed for tannins using the 0.5 % vanillin assay (Broadhurst & Jones, 1978).

101

### 102 *2.3.2 Polyphenols*

103 Total phenols were extracted with water. An internal standard curve was prepared by  
104 adding 10 mL of 0–0.01 % tannic acid to the flasks. The flasks were heated for 30 min at  $70$   
105  $^{\circ}\text{C}$  with constant shaking. Clear supernatants were collected after centrifugation at  $2500\text{ g}$  for  
106 15 min followed by filtration. Polyphenols were determined using the Folin–Denis reagent  
107 (King & Health, 1967).

108

### 109 *2.3.3 Trypsin inhibitor*

110 Trypsin inhibitor activity was determined as described by Kakade, Rackis, McGhee,  
111 & Puski (1974), using alpha-N-benzoyl-d/l-arginine-p-nitroanilide hydrochloride as  
112 substrate. One trypsin unit was defined as the increase by 0.01 absorbance units at 410 nm.

113

#### 114 *2.3.4 Haemagglutinating activity*

115 Haemagglutination assays, using trypsin-treated rabbit erythrocytes, were carried out  
116 by a serial dilution method as described by Grant, More, McKenzie, Stewart, & Pusztai  
117 (1983). One unit of haemagglutinating activity (HU) was defined as that contained in the  
118 amount of sample in the last dilution which caused 50 % agglutination of the red blood cells.

119

#### 120 *2.3.5 Myo-inositol phosphate analysis*

121 Quantification of *myo*-inositol phosphates was performed in freeze-dried samples, by  
122 High-performance liquid chromatography (HPLC) ion-pair chromatography using an Ultrasep  
123 ES 100 RP18 column (2 x 250 mm) as described by Greiner & Konietzny (1998). A mixture  
124 of the individual *myo*-inositol phosphate esters (InsP<sub>3</sub>–InsP<sub>6</sub>) was used as the standard.

125

#### 126 *2.4 Minerals*

127 At first, all glassware and polypropylene flasks were washed with neutral soap, soaked  
128 in 10 % (v/v) nitric acid (Merck) and rinsed with deionized water prior to use. High purity  
129 analytical stock solutions of 1,000 mg L<sup>-1</sup> (Titrisol®, Merck) of each element were daily used  
130 to prepare multi-element reference analytical solutions.

131

#### 132 *2.4.1 Digestion procedure*

133 Approximately 500 mg of each sample was digested via a microwave-assisted  
134 procedure. 7 mL of concentrated HNO<sub>3</sub> (65 % (w/w)) and 1 mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 % (v/v)) in

135 closed TFM vessels were used for digestion. Heating was performed in four successive steps:  
136 linear temperature increased up to 90 °C in 4 min (maximum power of 500 W); 3 min at 90  
137 °C (maximum power of 500 W); linear temperature increased up to 180 °C in 10 min  
138 (maximum power of 1,000 W); 15 min at 180 °C (maximum power of 1,000 W). All samples  
139 were analyzed in triplicate and a set of digestion blanks were prepared together with each  
140 sample batch. The analytes in the final solution were determined by inductively coupled  
141 plasma optical emission spectrometry (ICP OES) and inductively coupled plasma - mass  
142 spectroscopy (ICP-MS) (Santos, Santos, Fernandes, Castro, & Korn, 2013).

143

#### 144 *2.4.2 ICP OES and ICP-MS analysis*

145 Quantification of minerals (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P and Zn) was performed  
146 by ICP OES with axially viewed configuration (VISTAPRO, Varian, Mulgrave, Australia)  
147 equipped with a solid-state detector, cyclonic spray chamber and concentric nebulizer. The  
148 used instrumental parameters conditions were: RF generator (40 MHz), power (1.2 kW),  
149 plasma flow (15.0 L min<sup>-1</sup>), auxiliary flow (1.5 L min<sup>-1</sup>), nebulizer flow (0.7 L min<sup>-1</sup>),  
150 sample flow (0.7 L min<sup>-1</sup>) and dwell time (1 min). V-groove nebulizer and Sturman–Masters  
151 chamber were used to put system solutions in the spectrometer, while Ca, 396.847 nm; Cu II,  
152 324.754 nm; Fe II, 238.204 nm; K, 766.491 nm; Mg II, 280.270 nm; Mn II, 257.610 nm; Mo  
153 II, 202.032 nm; Na, 568.821 nm; P, 213.618 nm; and Zn II, 213.857 nm were used as atomic  
154 emission line (I) and ionic emission line (II). The emission lines were selected in order to  
155 include the most interesting elements for this food analysis. Trace element (Mo)  
156 determination by ICP OES was performed with external calibration. Acidity of the standard  
157 solutions at different concentration levels were matched to the acidity of the final solution  
158 obtained after digestion. Comparison among the calibration curves was obtained using both  
159 external calibration and analyte addition methods. There were no significant differences at the

160 95 % confidence level, suggesting that there is no detectable matrix effects for Ca, Cu, Fe, K,  
161 Mg, Mn, Mo, Na, P and Zn determination.

162 ICP-MS (Thermo Scientific, 2008) has been applied to the quantification of Al, As,  
163 Cd, Co, Cr, Ni and Se. The used instrumental parameters conditions were: power (1.35 kW),  
164 plasma argon flow (13.0 L min<sup>-1</sup>), auxiliary argon flow (0.7 L min<sup>-1</sup>), nebulizer argon flow  
165 (0.87 L min<sup>-1</sup>), sweeps (100), dwell time (10 ms) and CCT gas flow (6.5 L min<sup>-1</sup>). The  
166 following isotopes determined: <sup>27</sup>Al, <sup>75</sup>As, <sup>111</sup>Cd, <sup>59</sup>Co, <sup>53</sup>Cr, <sup>60</sup>Ni and <sup>82</sup>Se; <sup>72</sup>Ge (internal  
167 standard) in peak jump analysis mode.

168

### 169 *2.5 Phytate to zinc, iron, calcium molar ratios*

170 To calculate the phytate to mineral ratios the following molecular masses were used:  
171 phytate: 660 g mol<sup>-1</sup>; Fe: 56 g mol<sup>-1</sup>; Zn: 65 g mol<sup>-1</sup>; Ca: 40 g mol<sup>-1</sup> (Ma et al., 2007).

172

### 173 *2.6 Statistical analysis*

174 Data analysis was performed using Statistica 6.0 (Statistica for Windows, 2006). Each  
175 sample was analyzed in triplicate (and *myo*-inositol phosphates in duplicate). All values were  
176 given as mean ± standard error (SE), and relative standard error (RSD %) were calculated.  
177 Correlations between minerals and antinutritional factors were assessed by Spearman's rank  
178 correlation test. Data were subjected to multivariate analysis by Principal Components  
179 Analyze (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA). PCA and HCA were applied in a  
180 data matrix (10 x 15) generated with mean values of mineral content (Table 1). Samples were  
181 arranged in rows (scores) and mineral contents (variables) in columns (loadings). All data  
182 were processed by standardization before analysis, the factor loadings were rotated  
183 orthogonally using the Varimax Normalized method, and the quantified elements  
184 concentrations were expressed in 95 % confidence intervals. Once Cd presented null values

185 for all samples and Ni was not detected in any of them, both elements were removed from  
186 PCA and HCA.

187

### 188 **3. Results and discussion**

#### 189 *3.1 Minerals*

190 The mineral results obtained using ICP OES and ICP-MS were presented by a  
191 distinction between macroelements (Ca, K, Mg, Na and P), microelements (Cu, Fe, Mn and  
192 Zn), trace elements (Al, Co, Cr and Se) and ultra-trace elements (As, Cd, Ni and Mo) (Table  
193 1). Mineral contents in the CM samples showed considerable differences, especially mineral  
194 contents of the CM 5h sample which differed significantly from those of the other CMs  
195 samples (Table 1). The only elements that did not present significant difference ( $p \geq 0.05$ )  
196 between CMs (10, 15, 20, 25 hours) were As, Co, K, Fe (Table 1). Furthermore, Se differed  
197 ( $p \leq 0.05$ ) only between CM 10h and CM 15h, and Zn between CM 10h and CM 25h (Table  
198 1). These differences in mineral contents between CMs could be explained by different  
199 methods used for its preparation, with variations in time and temperature of seed maceration  
200 and a mixing of different beans varieties (Rogério, 2010), as well as a mixture with others  
201 legumes (Onwuliri & Obu, 2002).

202 In general, deep frying resulted in a significant reduction ( $p \leq 0.05$ ) in the content of  
203 most of the minerals studied, especially in the content of Ca, K, Mg, P, Zn, Mo and Mn  
204 (Table 1). Furthermore a significant reduction ( $p \leq 0.05$ ) in Fe content in AK 10, 15 and 25h  
205 was observed in relation to the corresponding CM samples, whereas the Fe content in the AK  
206 5 and 20h ( $p > 0.05$ ) was increased compared to the corresponding CM samples. Compared to  
207 the corresponding CM samples, Cu contents were also reduced ( $p \leq 0.05$ ) in all AK samples  
208 with the exception of AK 20h. Nevertheless, Cr values were increased ( $p \leq 0.05$ ) in the AK  
209 samples compared to the corresponding CM samples with the exception at AK 5h. Al and Co

210 content were also increased in AK 20h and AK 25h compared to those in the corresponding  
211 CM samples (Table 1). Minerals are heat-stable and will not be destroyed during the  
212 treatment. However, if wet heating is performed, leaching of minerals can occur in the  
213 cooking liquid, and thus indirectly affect the mineral content and bioaccessibility. According  
214 to Vaquero (1998) the cooking process (especially frying) can result possible increase in a cell  
215 separation of the cooked tissues or to the leaching of minerals into fat medium. In addition, it  
216 seems that food with low fat content and high water content are more susceptible to lose  
217 minerals than fatty food, as in the case of akara crude mass in deep-frying, which may lead to  
218 a variation in their mineral composition.

219 Potassium (K) is the most abundant element present in raw beans and it was the most  
220 abundant element naturally presented in the CM as well as AK samples (652-719 mg/100 g  
221 and 545-613 mg/100 g, respectively). Furthermore, the potassium content was significantly  
222 lower than those found in the literature (957 to 2,899 mg/100g) (Onwuliri & Obu, 2002;  
223 Santos, 2008; TACO, 2006). Na/K molar ratio in CM and AK samples were determined to be  
224 higher than 1.0 (Table 3), a value that is significantly higher than the value reported for raw  
225 cowpeas (0.16-0.31) (Aremu, Olaofe, & Akintayo, 2006). It is worth highlighting that the  
226 heterogeneity in sodium levels observed (Table 1) and, consequently, the high Na/K molar  
227 ratio (Table 3) reflects the random addition of salt to the crude mass according to the *baiana*  
228 *de acarajé* practice (Rogério, 2010). The sodium content of 704 to 1,517 mg/100g determined  
229 in this study greatly exceeds literature values for cowpea beans (6.1 to 102.0 mg/100g)  
230 (Carvalho et al., 2012; Santos, Santos, Fernandes, Castro, & Korn, 2013) and akara (305  
231 mg/100g) (TACO, 2006). Therefore, an average sized akara (80 g) contains 37.5-80.9 % and  
232 9.3-10.4 % of the recommended daily intake for Na and K, respectively (DRIs, 2005).

233 Phosphorus (P) was the second most abundant mineral naturally presented in the CM  
234 and AK samples (225-375 mg/100g and 210-354 mg/100 g, respectively). The range of P

235 contents in crude mass and akara were within the range commonly found in beans (266  
236 mg/100g) (Santos, Santos, Fernandes, Castro, & Korn, 2013). The Dietary Reference Intake  
237 (DRI) (1997) of this element is 700 mg/day. Hence, a medium sized akara (80 g) would  
238 provide 24.0-40.4 % of the daily recommendation. In addition, magnesium (Mg) content in  
239 the crude mass and the akara is remarkable (Table 1). The values were in accordance with the  
240 reported values in the literatures for Brazilian cowpea that are in the range of 131–169  
241 mg/100 g (Carvalho et al., 2012), except for AK 5h (107 mg/100g). The DRI (1997) for Mg is  
242 320 mg for a female and 420 mg for a male adult, therefore, a medium sized akara (80 g)  
243 would supply 26.7–31.4 % (for female) and 20.4–24.0 % (for male) of the recommendation  
244 for this mineral.

245         Of all microelements evaluated, iron (Fe) was detected in the concentration 38.28-  
246 50.64 µg/g in akara, with major values in CM and AK 20h. The composition of legumes  
247 depends not only on the species or varieties, but also on the growing conditions such as soil,  
248 rain fall and other conditions. Iron concentrations of cowpeas have been reported to vary  
249 between 6.1 and 7.5 mg/100 g seed flour (Carvalho et al., 2012), significantly higher than the  
250 values determined in this study (Table 1). DRI (2001) of Fe is 8 and 18 mg/day for male and  
251 female respectively, therefore a medium sized akara (80 g) supplies 38.0-50.6 % and 16.9-  
252 24.5 % of the daily needs.

253         On the other hand, calcium levels were relatively lower in the CM and AK samples  
254 (Table 1) compared to those already reported for cowpea varieties (91-161 mg/100g)  
255 (Onwuliri & Obu, 2002). By dehulling of cowpea grains at the beginning of akara preparation  
256 may have significantly reduced calcium content, probably due to the removal of the seed coat  
257 (testa). Mamiro, Mbwaga, Mamiro, Mwanri, & Kinabo (2011) showed that cowpea grains had  
258 higher levels of calcium varying between 958.1 and 992.4 mg/kg than dehulled cowpea (360  
259 to 364 mg/kg) and cowpea flour (303 to 311 mg/kg). The low Ca contents in the CM and AK



260 samples resulted in a low molar ratio Ca/P (0.09-0.20 %) (Table 3). It might not be less than  
261 1.0, because the excess of one element take an antagonistic effect on absorption and  
262 metabolism of the other (Santos, 2008). Therefore, consumption of a medium size akara do  
263 not significantly contribute to the daily recommendation for calcium which is 1,000 mg/day  
264 for adults ages 19 to 50 (DRIs, 2011).

265 The results for Zn and Mn contents obtained in this study are comparable to those  
266 already reported for cowpeas (Aremu, Olaofe, & Akintayo, 2006; Mamiro, Mbwaga, Mamiro,  
267 Mwanri, & Kinabo, 2011; Onwuliri & Obu, 2002). According to the dietary reference intakes  
268 (DRIs, 2001), the daily adequate intake of Zn and Mn are 8 mg/day and 1.8 mg/day (for  
269 female) and 11 mg/day and 2.3 mg/day (for male), respectively. Therefore, 80 g of akara  
270 would supply about 24.0-30.0 % and 17.5-21.8 % of the Zn requirement for the average  
271 female and male, respectively, and 48.9-66.7 % of the DRI of Mn for female and 38.3-52.2 %  
272 for male.

273 Average copper levels in legumes was reported to be between 0.08 and 1.04 mg/100 g  
274 (Santos, 2008), 1.5 to 5.0 µg/g (Cabrera, Lloris, Giménez, Olalla, & López, 2003) and in  
275 cowpea flour 0.2 % (Aremu, Olaofe, & Akintayo, 2006). These values are close to those  
276 obtained in this study (2.05-2.99 µg/g and 1.79-3.21 µg/g for CM and AK, respectively), and  
277 would supply up to 28.4 % of Cu daily needs (DRIs, 2001).

278 Chromium levels in foods are generally estimated to be low, about 10–1,300 µg/kg  
279 (Kamerud, Hobbie, & Anderson, 2013). In CM samples, Cr content was between 2.64 and  
280 0.73 µg/g, and 0.99-1.85 µg/g were obtained in AK samples (Table 1). Its contents would  
281 supplies more than 100 % of Cr adults daily requirements (DRIs, 2001) with a medium sized  
282 akara (80 g) – as well as molybdenum overtakes human needs too (DRIs, 2001). Nonetheless,  
283 Cabrera, Lloris, Giménez, Olalla, & López (2003) reported chromium levels of pulses to be in  
284 the range of 0.08-0.31 ppm. In the study of Aremu, Olaofe, & Akintayo (2006), this element

285 was found to be below the threshold of the detection system used .Therefore, the Cr levels of  
286 the CM samples obtained in this study are higher than those reported in the literature and this  
287 might be due to the high chromium content in Brazilian soils (Kamerud, Hobbie, & Anderson,  
288 2013). On the other hand,the scientific literature indicates that vegetable oils have relatively  
289 high chromium contents (Deeba, Abbas, Shafique, Rehman, & Hussain, 2010). This could  
290 explain the relatively high Cr levels in the AK samples.

291 The low Se content in the CM and AK samples (Table 1) are similar to those reported  
292 in the literature for legumes (0.02-0.44  $\mu\text{g/g}$ ) (Navarro-Alarcon & Cabrera-Vique, 2008). It  
293 was observed that CM 5h sample presented the highest values (0.12  $\mu\text{g/g}$ ) and, in general, Se  
294 reduced during deep-frying. The recommended dietary allowance (RDA) for Se for both men  
295 and woman is 55  $\mu\text{g/day}$  (0.7  $\mu\text{mol/day}$ ) (DRIs, 2000), and a medium sized akara (80 g)  
296 would supplies up to 14.5 % of adults needs.

297

### 298 *3.2 Minerals & Antinutritional Factors (ANF)*

299 Di-and trivalent cations, as  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , use to form water insoluble  
300 salts with  $\text{InsP}_6$  and  $\text{InsP}_5$ , and Zn or Fe could tightly bind to phytate-calcium complexes with  
301 the result of a even lower solubility (Greiner & Konietzny, 1998; Mittal et al., 2013;  
302 Onwuliri & Obu, 2002). In this regard, some critical values of the phytate/mineral molar ratio,  
303 as a measure of potential mineral availability for iron, calcium and zinc have been proposed  
304 (Ma et al., 2007). In all akaras analyzed, the phytate/iron molar ratio was above the proposed  
305 critical value (1.0) (Table 3) (Ma et al., 2007). Thus, iron bioavailability in the akara under  
306 investigation might be pretty low. The molar ratio of calcium to phytate was determined to be  
307 below the critical value of 0.24 (Ma et al., 2007). Thus calcium absorption from akara should  
308 be high to be sufficient. Based on absorption studies in humans, phytate/zinc molar ratios  $<5$ ,  
309 between 5 and 15 and  $>15$  have been associated with high, moderate and low zinc

310 bioavailability, corresponding to approximately 50 %, 30 % and 15 % of total zinc,  
311 respectively (Gibson, Perlas, & Hotz, 2006). According to Ma et al. (2007) and Mittal,  
312 Gupta, Singh, Yadav, & Aggarwal (2013), zinc forms the most stable complex with phytate,  
313 and thus it is the most affected mineral in terms of bioavailability. In the akara samples, the  
314 calculated mean molar ratio was determined to be 29.68-36.20 (Table 3). This suggests that  
315 the phytate present in akara will significantly reduce the absorption of zinc.

316 Aluminum levels in the samples under investigation ranged from 26 to 66  $\mu\text{g/g}$  in the  
317 CM and from 23 to 63  $\mu\text{g/g}$  in the AK samples. This variation may be explained by the  
318 addition of water to soak bean grains, chopping in aluminum processors and mass whipping  
319 in aluminum pan. Since the 50ths, the interaction between aluminum household utensils and  
320 foods prepared in them is well known (Mohammad, Al Zubaidy, Bassioni, 2011). European  
321 Food Safety Agency (EFSA, 2008) has recently given a scientific opinion on safety of  
322 aluminum from dietary intake, defining as tolerable weekly intake (TWI) 1 mg Al/kg of body  
323 weight per week. Therefore, the weekly tolerable intakes of Al, for a person weighing 70 kg  
324 would be 0.014 mg/week. If a person consumes one medium sized akara (80 g) every day for  
325 one week, 37 mg of Al will be taken up per week. Although there are not conclusive studies  
326 for human beings, high levels of exposure have potential to produce neurotoxicity and to  
327 affect the male reproductive system. Aluminum has shown neurotoxicity in patients  
328 undergoing dialysis and implicated to aetiology of Alzheimer's disease and associated with  
329 other neurodegenerative diseases in humans (EFSA, 2008).

330

### 331 *3.3 Antinutritional Factors (ANF)*

332 Phytate, salts of phytic acid are the storage form of both phosphate and inositol in  
333 plants product especially in seeds and grains (Mittal, Gupta, Singh, Yadav, & Aggarwal,  
334 2013). No  $\text{InsP}_3$  or  $\text{InsP}_4$  were detected in CMs or AKs samples (Table 2). It is in accordance

335 to the literature, because relative percentages of InsP<sub>3</sub> and InsP<sub>4</sub> are low and never higher than  
336 3 % (Almeida, Greiner, Furtunado, Trigueiro, & Araújo, 2008). The values reported for InsP<sub>6</sub>  
337 in the CM and AK samples were between 10.99 and 11.45 µmol/g, and 9.79 and 10.15  
338 µmol/g, respectively. These results are consistent to those found for InsP<sub>6</sub> in varieties of  
339 Brazilian cowpeas (8.7-12.6 µmol/g) (Carvalho et al., 2012). The content of InsP<sub>5</sub> in CM  
340 samples were determined to be between 2.89 and 2.97 µmol/g, values similar to those  
341 reported for Brazilian cowpeas and slightly than in the AK samples (3.57-3.87µmol/g)  
342 (Almeida, Greiner, Furtunado, Trigueiro, & Araújo, 2008; Carvalho et al., 2012). Studies  
343 indicated that the phytate contents varied considerably because of different preparation and  
344 cooking methods (Mittal, Gupta, Singh, Yadav, & Aggarwal, 2013). The stability and  
345 solubility of these complexes depends on the type of binding mineral, the pH, the molar ratio  
346 phytate/mineral and the presence of other compounds in solution. It was observed in this  
347 study that frying results in a reduction in InsP<sub>6</sub> and a 30% increase in InsP<sub>5</sub>. Phytate  
348 hydrolysis can occur during food preparation and production, either by phytase from plants or  
349 by microorganisms. This is very likely due to a partial dephosphorylation of the  
350 hexaphosphate (InsP<sub>6</sub>) to pentaphosphate (InsP<sub>5</sub>) (Mittal, Gupta, Singh, Yadav, & Aggarwal,  
351 2013) (r= -0.947).

352 In respect to the contents of trypsin inhibitor and haemagglutinating activity, the CM  
353 samples presented 3.17-3.23 TIU/mg and 0.5 HU/Kg, respectively. No trypsin inhibitors or  
354 haemagglutinating activity was determined in the akara samples (Table 2). The decrease is very  
355 likely due the trypsin inhibitors and haemagglutinating heat labile and they can be partially or  
356 completely denatured when exposed to elevated temperature (Pedrosa et al., 2012).

357 The content of condensed tannins ranged from 1.72 to 1.74 mg eq. CE/g in the CM  
358 samples and from 1.67 to 1.69 mg eq. CE/g in the AK samples (Table 2). That tannins content  
359 reduction (Table 2) is very likely due to the soaking process involved, once its molecules are

360 water soluble (Kumar, Sinha, Makkar, & Becker, 2010). These observed levels of tannin  
361 might not affect the nutritional potential of the cultivars since the values were less than 10%  
362 of the total dry weight of the samples (Onwuliri & Obu, 2002). The content of polyphenol  
363 ranged between 6.34 and 6.38 mg/g in the CM samples and 6.26 to 6.30 mg/g in the AK  
364 samples (Table 2) and there were not significant statistical difference ( $p \leq 0.05$ ) between  
365 samples. These values are in concordance with the range reported to dry bean content of 5.87-  
366 6.62 mg/g (Almeida, Greiner, Furtunado, Trigueiro, & Araújo, 2008). Furthermore,  
367 polyphenols have been associated with metal chelating activities (Almeida, Greiner,  
368 Furtunado, Trigueiro, & Araújo, 2008; Petry, Egli, Zeder, Walczyk, & Hurrell, 2010),  
369 although Petry, Egli, Zeder, Walczyk, & Hurrell (2010) did not found reduction in iron  
370 absorption with polyphenols concentrations up to 20 mg, and just from 50 mg (Fe lowered by  
371 14 %), about ten times higher of the sample contents of this study.

372

### 373 *3.4 Multivariate analysis*

374 PCA was applied to observe any possible groups within the analyzed crude mass and  
375 akara. A set of three orthogonal variables (PCs) was generated by PCA (Figure 1). The first  
376 principal component (PC1), second (PC2) and third (PC3) presented eigenvalues and  
377 accounted for 6.33 and 42.20 %; 5.34 and 35.60 %; and 1.69 and 11.30 % respectively of  
378 variability in the data sets. Calculated results suggested that PC1 correlated with variables Al  
379 (0.920), As (0.847), Co (0.876), Cr (0.879), Na (0.866), Se (0.867), whereas PC2 was  
380 contributes highly to the values for Ca (0.735), Cu (0.957), Fe (0.937), Mo (0.920), P (0,771)  
381 and Zn (0.782) e PC3, K (0.837), Mn (0.877).

382 Scores chat biplot (Figure 1b) showed that CM 10, 15 and 20 h, and AK 20h presented  
383 higher levels of Mg, P, Fe, Cu, Zn, Mo and Ca and they are located at positive PC2, whereas  
384 CM 5h was apart from others because of the higher levels of Al, Na, As, Cr, Co and Se, being

385 located at positive PC1. AK 10, 15 and 25h samples, which had lower minerals contents, were  
386 clustered in negative PC2 (Figures 1a and 1b).

387 The applied HCA (Figure 2) confirms, through the cluster, separations of the  
388 following groups: CM 5h; AK 5h; AK 10, 15 and 25h; AK 20h and CM 10, 15, 20, 25h  
389 (Figure 1b and 2). PCA and clustering showed differences among the mineral content of crude  
390 masses, reflecting CM and AK 5h separation from others and AK 20h clustering with CMs,  
391 whereas its crude mass (CM 20h) still has high levels of Ca, Fe and P (Table 1). Those  
392 differences probably occurred due to the practice of mixing different beans varieties as well as  
393 other legumes and different crude mass preparation techniques, as explained above. In other  
394 respects, frying had a significant effect in AK and CM group separation, due to most of  
395 minerals reduction.

396

#### 397 **4. Conclusions**

398 Mineral content variations found in crude mass probably are due to mixing different  
399 beans varieties commonly employed in akara making. The deep-frying process resulted in a  
400 significant reduction in the content of most of minerals studied, especially in the content of  
401 Ca, K, Mg, P, Zn, Mo and Mn. Potassium (K), phosphorus (P), magnesium (Mg), zinc (Zn)  
402 and manganese (Mn) were the most abundant minerals presented in akara. However, it needs to  
403 be mention that mineral bioavailability, especially of iron and zinc, might be reduced in akara  
404 due to antinutrients content of such as  $\text{InsP}_6$  and  $\text{InsP}_5$ . It is worth highlighting that the  
405 heterogeneity observed in sodium levels reflects the random addition of salt to the CM, and  
406 the akara Na content could be very high, and so it might be harmful to health. In addition, the  
407 higher content of Al and Cr in akaras compared to the corresponding crude masses might be  
408 due to migration of these elements from the aluminum cookware or palm oil used in deep-

409 frying. Furthermore, a reduction in InsP<sub>6</sub> and an increase in InsP<sub>5</sub> as well as a loss in trypsin  
410 inhibitor and haemagglutinating activity were observed during the deep frying process.

411 Akara, an inexpensive street food, is an integral part of the diet of Salvador population  
412 and it is accessible to economically underprivileged people which often eat it as a main meal.  
413 Data obtained from this study showed that akara could partially or totally meet the daily  
414 dietary recommendation for chromium, potassium, phosphorus, magnesium, manganese,  
415 molybdenum and sodium in this population.

416

## 417 **5. Acknowledgements**

418 The authors are grateful for the financial support received from *Conselho Nacional de*  
419 *Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for financing the Project “*Características*  
420 *de qualidade do azeite de dendê antes e após fritura de acarajés*” (Process nº482790/2010-5),  
421 *Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia* (FAPESB), *Petróleo Brasileiro S. A.*  
422 (PETROBRAS) and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*  
423 (CAPES), and *Associação das Baianas de Acarajé e Mingau* (ABAM) Salvador-Bahia for all  
424 cooperation.

425

## 426 **6. References**

427 ABNT – *Associação Brasileira de Normas Técnicas* (2004). ABNT NBR 10007:2004 –  
428 Normas Brasileiras, Projeto 10007, Amostragem de resíduos sólidos: Quarteamento (pp. 21).

429 URL [http://patriciamirotti.files.wordpress.com/2012/04/nbr-10007-amostragem-de-](http://patriciamirotti.files.wordpress.com/2012/04/nbr-10007-amostragem-de-resc3adduos-sc3b3lidos.pdf)  
430 [resc3adduos-sc3b3lidos.pdf](http://patriciamirotti.files.wordpress.com/2012/04/nbr-10007-amostragem-de-resc3adduos-sc3b3lidos.pdf).

431 Almeida, D. T., Greiner, R., Furtunado, D. M. N., Trigueiro, I. N. S., & Araújo, M. P. N.  
432 (2008). Content of some antinutritional factors in bean cultivars frequently consumed in  
433 Brazil. *International Journal of Food Science & Technology*, 43, 243–249.

- 434 Aremu, M. O., Olaofe, O., & Akintayo, T. E. (2006). A Comparative Study on the Chemical  
435 and Amino Acid Composition of Some Nigerian Under-Utilized Legume Flours. *Pakistan*  
436 *Journal of Nutrition*, 5(1), 34–38.
- 437 Broadhurst, R. B., & Jones, W. J. (1978). Analysis of condensed tannins using acidified  
438 vanillin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29, 788–792.
- 439 Cabrera, C., Lloris, F., Giménez, R., Olalla, M., & López, M. C. (2003). Mineral content in  
440 legumes and nuts: contribution to the Spanish dietary intake. *Science of The Total*  
441 *Environment*, 308(1–3), 1–14.
- 442 Carvalho, A. F. U., Souza, N. M., Farias, D. F., Rocha-Bezerra, L. C. B., Silva, R. M. P.,  
443 Viana, M. P., et al. (2012). Nutritional ranking of 30 Brazilian genotypes of cowpeas  
444 including determination of antioxidant capacity and vitamins. *Journal of Food*  
445 *Composition and Analysis*, 26, 81–88.
- 446 Deeba, F., Abbas, N., Shafique, T., Rehman, S., & Hussain, N. (2010). Chromium in various  
447 food items as regulators of different metabolic activities. *Pakistan Journal of Biochemistry*  
448 *and Molecular Biology*, 43(1), 15–18.
- 449 DRIs – Dietary Reference Intakes. (1997). Dietary Reference Intakes for Calcium,  
450 Phosphorous, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. *Food and Nutrition Board –*  
451 *USA. Institute of Medicine. National Academy Press*, Washington. URL [www.nap.edu](http://www.nap.edu);  
452 <http://www.iom.edu/Activities/Nutrition/SummaryDRIs/DRI-Tables.aspx>.
- 453 DRIs – Dietary Reference Intakes. (2000). Dietary Reference Intakes for Vitamin C,  
454 Vitamin E, Selenium and Carotenoids. *Food and Nutrition Board – USA. Institute of*  
455 *Medicine. National Academy Press*, Washington. URL [www.nap.edu](http://www.nap.edu);  
456 <http://www.iom.edu/Activities/Nutrition/SummaryDRIs/DRI-Tables.aspx>.
- 457 DRIs – Dietary Reference Intakes. (2001). Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin  
458 K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel,



459 Silicon, Vanadium, and Zinc. *Food and Nutrition Board – USA. Institute of*  
460 *Medicine. National Academy of Sciences.* URL [www.nap.edu](http://www.nap.edu);  
461 <http://www.iom.edu/Activities/Nutrition/SummaryDRIs/DRI-Tables.aspx>.

462 DRIs – Dietary Reference Intakes. (2005). Dietary Reference Intakes for Water, Potassium,  
463 Sodium, Chloride, and Sulfate. *Food and Nutrition Board – USA. Institute of*  
464 *Medicine. National Academy of Sciences.* URL [www.nap.edu](http://www.nap.edu);  
465 <http://www.iom.edu/Activities/Nutrition/SummaryDRIs/DRI-Tables.aspx>.

466 DRIs – Dietary Reference Intakes. (2011). Reference Intakes for Calcium and Vitamin D.  
467 *Food and Nutrition Board – USA. Institute of Medicine. National Academy of Sciences.*  
468 URL [www.nap.edu](http://www.nap.edu); <http://www.iom.edu/Activities/Nutrition/SummaryDRIs/DRI->  
469 [Tables.aspx](http://www.iom.edu/Activities/Nutrition/SummaryDRIs/DRI-Tables.aspx).

470 EFSA – European Food Safety Agency. (2008). Scientific Opinion of the Panel on Food  
471 Additives, Flavourings, Processing Aids and Food Contact Materials (AFC). Safety of  
472 aluminum from dietary intake. *The EFSA Journal*, 6(7), 754, 1–34.

473 Gibson, R. S., Perlas, L., & Hotz, C. (2006). Improving the bioavailability of nutrients in  
474 plant foods at the household level. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 65, 160–168.

475 Grant, G., More, L., McKenzie, N. H., Stewart, J. C., & Pusztai, A. (1983). A survey of  
476 the nutritional and haemagglutination properties of legume seeds generally available in  
477 the UK. *The British Journal of Nutrition*, 50, 207–214.

478 Greiner, R., & Konietzny, U. (1998). Endogenous phytate-degrading enzymes are  
479 responsible for phytate reduction while preparing beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of*  
480 *Food Processing and Preservation*, 22, 321–331.

481 Kakade, M. L., Rackis, J. L., McGhee, J. E., & Puski, G. (1974). Determination of trypsin  
482 inhibitor activity of soy bean products: a collaborative analysis of an improved procedure.  
483 *Cereal Chemistry*, 51, 376–382.

- 484 Kamerud, K. L., Hobbie, K. A., & Anderson, K. A. (2013).Stainless Steel Leaches Nickel and  
485 Chromium into Foods during Cooking.*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(39),  
486 9495–9501.
- 487 King, H. G., & Health, G. W. (1967). The chemical analysis of small samples of leaf  
488 material and the relationship between disappearance and composition of  
489 leaves.*Pedobiologia*, 7, 192–197.
- 490 Kumar, V., Sinha, A. K., Makkar, H. P. S., & Becker K. (2010). Dietary roles of phytate  
491 and phytase in human nutrition: a review. *Food chemistry*, 120(4), 945–959.
- 492 Ma, G., Li, Y., Jin, Y., Zhai, F., Kok, F. J., & Yang, X. (2007).Phytate intake and molar ratios  
493 of phytate to zinc, iron and calcium in the diets of people in China.*European Journal of*  
494 *Clinical Nutrition*, 61(3), 368–374.
- 495 Mamiro, P. S., Mbwaga, A. M., Mamiro, D. P., Mwanri, A. W., & Kinabo, J. L. (2011).  
496 Nutritional quality and utilization of local and improved cowpea varieties in some regions in  
497 Tanzania. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 11(1), 4490–  
498 4506.
- 499 Mohammad, F. S., Al Zubaidy, E. A. H., & Bassioni, G. (2011). Effect of Aluminum  
500 Leaching Process of Cooking Wares on Food.*International Journal of Electrochemical*  
501 *Science*, 6, 222–230.
- 502 Mittal, A., Gupta, V., Singh, G., Yadav, A., & Aggarwal, N. K. (2013). Phytase: A Boom in  
503 Food Industry. *Octa Journal of Biosciences*, 1(2), 158–169.
- 504 Navarro-Alarcon, M., & Cabrera-Vique, C. (2008). Selenium in food and the human body: A  
505 review. *Science of The Total Environment*, 400(1–3), 115–141.
- 506 Onwuliri, V. A., & Obu, J. A. (2002).Lipids and other constituents of *Vigna unguiculata* and  
507 *Phaseolus vulgaris* grown in northern Nigeria.*Food Chemistry*, 78, 1–7.

- 508 Pedrosa, M. M., Cuadrado, C., Burbano, C., Allaf, K., Haddad, J., Gelencsér, E., et al. (2012).  
509 Effect of instant controlled pressure drop on the oligosaccharides, inositol phosphates, trypsin  
510 inhibitors and lectins contents of different legumes. *Food Chemistry*, 131, 862–868.
- 511 Petry, N., Egli, I., Zeder, C., Walczyk, T., & Hurrell, R. (2010). Polyphenols and Phytic Acid  
512 Contribute to the Low Iron Bioavailability from Common Beans in Young Women. *The*  
513 *Journal of Nutrition: Nutrient Physiology, Metabolism, and Nutrient-Nutrient Interactions*,  
514 140, 1977–1982.
- 515 Rogério, W. F. (2010). *Uma imersão no tabuleiro da baiana: o acarajé* [thesis]. Salvador  
516 (BA), Brasil: Universidade Federal da Bahia. URL  
517 <http://www.repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/10491>.
- 518 Santos, W. P. C. (2008). *Estratégias para avaliação da composição mineral de leguminosas*  
519 *produzidas e comercializadas no estado da Bahia* [thesis]. Salvador (BA), Brasil:  
520 Universidade Federal da Bahia.
- 521 Santos, W. P. C., Santos, D. C. M. B., Fernandes, A. P., Castro, J. T., & Korn, M. G. A.  
522 (2013). Geographical Characterization of Beans Based on Trace Elements After  
523 Microwave-Assisted Digestion Using Diluted Nitric Acid. *Food Analytical Methods*, 6,  
524 1133-1143.
- 525 TACO – *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos*. (2006). 2nd ed. Campinas (SP):  
526 NEPA-UNICAMP.
- 527 Vaquero, M. P. (1998). Minerals. *Grasas y Aceites*, 49 (3-4), 352–358.

## Tables

**Table 1.** Minerals content (macro, micro, trace and ultra-trace element) in crude mass (CM) and akara (AK) (cowpea food) from 25h deep-frying (5h/day) in crude palm oil.

Mineral	Sample	5h	10h	15h	20h	25h
<b>MACROELEMENTS (mg/100g)</b>						
<b>Ca</b>	CM	44.31 ± 1.06 <sup>a,z</sup>	32.64 ± 1.68 <sup>a,y</sup>	36.61 ± 0.64 <sup>a,x</sup>	46.13 ± 2.19 <sup>a,z</sup>	38.45 ± 1.89 <sup>a,w</sup>
	AK	38.30 ± 0.88 <sup>b</sup>	27.40 ± 0.33 <sup>b</sup>	25.05 ± 0.33 <sup>b</sup>	39.15 ± 1.24 <sup>b</sup>	28.10 ± 0.49 <sup>b</sup>
<b>K</b>	CM	719.91 ± 45.40 <sup>a,z</sup>	708.26 ± 58.99 <sup>a,y,z</sup>	652.68 ± 7.62 <sup>a,y</sup>	649.47 ± 17.60 <sup>a,w,y</sup>	659.55 ± 20.73 <sup>a,w,y,z</sup>
	AK	613.01 ± 3.85 <sup>b</sup>	602.87 ± 26.11 <sup>b</sup>	545.31 ± 6.34 <sup>b</sup>	612.64 ± 12.21 <sup>b</sup>	566.94 ± 2.10 <sup>b</sup>
<b>Mg</b>	CM	115.27 ± 3.95 <sup>a,z</sup>	145.72 ± 8.59 <sup>a,y</sup>	136.13 ± 2.17 <sup>a,x</sup>	145.76 ± 6.14 <sup>a,y</sup>	154.59 ± 1.74 <sup>a,y</sup>
	AK	106.98 ± 2.01 <sup>b</sup>	125.74 ± 4.09 <sup>b</sup>	116.16 ± 1.51 <sup>b</sup>	125.71 ± 1.51 <sup>b</sup>	117.66 ± 0.61 <sup>b</sup>
<b>Na</b>	CM	1.869.56 ± 71.82 <sup>a,z</sup>	924.83 ± 51.23 <sup>a,y</sup>	1.187.05 ± 17.81 <sup>a,x</sup>	1.043.52 ± 37.56 <sup>a,w</sup>	699.16 ± 27.58 <sup>a,v</sup>
	AK	1.019.69 ± 12.72 <sup>b</sup>	703.63 ± 25.61 <sup>b</sup>	818.98 ± 6.74 <sup>b</sup>	1.180.03 ± 24.68 <sup>b</sup>	1.517.00 ± 3.09 <sup>b</sup>
<b>P</b>	CM	225.20 ± 6.90 <sup>a,z</sup>	334.66 ± 15.40 <sup>a,y</sup>	323.59 ± 6.23 <sup>a,y</sup>	375.40 ± 15.88 <sup>a,x</sup>	366.91 ± 4.35 <sup>a,x</sup>
	AK	210.55 ± 5.28 <sup>b</sup>	285.12 ± 5.17 <sup>b</sup>	269.00 ± 4.56 <sup>b</sup>	353.90 ± 4.33 <sup>b</sup>	271.19 ± 2.49 <sup>b</sup>
<b>MICROELEMENTS (µg/g)</b>						
<b>Cu</b>	CM	2.05 ± 0.03 <sup>a,z</sup>	2.49 ± 0.04 <sup>a,y</sup>	2.44 ± 0.08 <sup>a,y</sup>	2.99 ± 0.19 <sup>a,x</sup>	2.39 ± 0.03 <sup>a,w</sup>
	AK	1.82 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.99 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.90 ± 0.10 <sup>b</sup>	3.21 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.79 ± 0.16 <sup>b</sup>
<b>Fe</b>	CM	38.88 ± 1.20 <sup>a,z</sup>	43.83 ± 2.46 <sup>a,y</sup>	41.96 ± 0.59 <sup>a,y</sup>	48.75 ± 2.93 <sup>a,x,y</sup>	46.09 ± 1.27 <sup>a,x,y</sup>
	AK	39.51 ± 1.61 <sup>a</sup>	39.66 ± 0.13 <sup>b</sup>	38.28 ± 0.07 <sup>b</sup>	50.64 ± 2.00 <sup>a</sup>	39.61 ± 1.28 <sup>b</sup>
<b>Mn</b>	CM	15.89 ± 0.48 <sup>a,z</sup>	13.97 ± 0.65 <sup>a,y</sup>	12.60 ± 0.21 <sup>a,x</sup>	12.92 ± 0.67 <sup>a,y</sup>	14.20 ± 0.26 <sup>a,y</sup>
	AK	14.84 ± 0.39 <sup>b</sup>	11.46 ± 0.23 <sup>b</sup>	10.72 ± 0.26 <sup>b</sup>	11.20 ± 0.15 <sup>b</sup>	14.32 ± 0.14 <sup>b</sup>
<b>Zn</b>	CM	29.12 ± 0.93 <sup>a,z</sup>	30.70 ± 1.57 <sup>a,y,z</sup>	29.14 ± 0.72 <sup>a,y,z</sup>	31.90 ± 1.59 <sup>a,y</sup>	33.90 ± 0.67 <sup>a,x</sup>
	AK	26.83 ± 0.56 <sup>b</sup>	25.28 ± 0.51 <sup>b</sup>	23.79 ± 0.32 <sup>b</sup>	29.82 ± 0.59 <sup>b</sup>	26.19 ± 0.13 <sup>b</sup>
<b>TRACE ELEMENTS (µg/g)</b>						
<b>Al</b>	CM	66.36 ± 2.66 <sup>a,z</sup>	26.36 ± 0.85 <sup>a,y</sup>	53.06 ± 4.41 <sup>a,x</sup>	45.53 ± 10.76 <sup>a,w</sup>	32.38 ± 5.59 <sup>a,w</sup>
	AK	62.84 ± 1.51 <sup>a</sup>	23.47 ± 5.01 <sup>a</sup>	42.74 ± 0.41 <sup>b</sup>	49.92 ± 0.12 <sup>a</sup>	46.00 ± 9.30 <sup>b</sup>
<b>Co</b>	CM	0.09 ± 0.01 <sup>a,z</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>a,y</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>a,y</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>a,x,y</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>a,x,y</sup>
	AK	0.08 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.08 ± 0.00 <sup>a</sup>
<b>Cr</b>	CM	2.64 ± 0.10 <sup>a,z</sup>	0.73 ± 0.03 <sup>a,y</sup>	0.98 ± 0.07 <sup>a,x</sup>	1.03 ± 0.05 <sup>a,w</sup>	0.90 ± 0.12 <sup>a,y</sup>
	AK	1.27 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.99 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.18 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.71 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.85 ± 0.11 <sup>b</sup>
<b>Se</b>	CM	0.12 ± 0.02 <sup>a,z</sup>	0.04 ± 0.00 <sup>a,y</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>a,x</sup>	0.04 ± 0.01 <sup>a,w,y</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>a,w,y</sup>
	AK	0.06 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.04 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.04 ± 0.01 <sup>a</sup>

ULTRA-TRACE ELEMENTS* ( $\mu\text{g/g}$ )						
<b>As</b>	CM	$0.03 \pm 0.00^{\text{a,z}}$	$0.01 \pm 0.00^{\text{a,y}}$	$0.01 \pm 0.00^{\text{a,y,z}}$	$0.01 \pm 0.00^{\text{a,x,y}}$	$0.01 \pm 0.00^{\text{a,x,y}}$
	AK	$0.01 \pm 0.00^{\text{b}}$	$0.00 \pm 0.00^{\text{a}}$	$0.01 \pm 0.00^{\text{a}}$	$0.00 \pm 0.00^{\text{a}}$	$0.01 \pm 0.00^{\text{a}}$
<b>Mo</b>	CM	$1.12 \pm 0.05^{\text{a,z}}$	$0.90 \pm 0.08^{\text{a,y}}$	$1.31 \pm 0.13^{\text{a,x}}$	$1.98 \pm 0.14^{\text{a,w}}$	$1.06 \pm 0.03^{\text{a,y,z}}$
	AK	$0.85 \pm 0.06^{\text{b}}$	$0.83 \pm 0.05^{\text{b}}$	$0.91 \pm 0.05^{\text{b}}$	$1.50 \pm 0.07^{\text{b}}$	$0.83 \pm 0.01^{\text{b}}$

\* Ultra-trace elements: Cadmium (**Cd**) = zero, for all samples; Nickel (**Ni**) < LQ (limit of quantification). Different letters (a–b) within the same column indicate significant differences between mineral contents determined in CM and AK; Different letters (v–z) within the same row for each mineral content in CM – Mann Whitney ( $p \leq 0.05$ ).

**Table 2.** Antinutritional factors content of crude mass (CM) and akara (AK) (cowpea food) from 25h deep-frying (5h/day) in crude palm oil.

Antinutritional factor	Sample	5h	10h	15h	20h	25h
<b>InsP<sub>6</sub></b> ( $\mu\text{mol/g}$ )	CM	$11.45 \pm 0.04$	$11.39 \pm 0.02$	$11.34 \pm 0.02$	$11.17 \pm 0.02$	$10.99 \pm 0.04$
	AK	$10.15 \pm 0.02$	$9.95 \pm 0.04$	$9.86 \pm 0.01$	$9.79 \pm 0.04$	$9.79 \pm 0.08$
<b>InsP<sub>5</sub></b> ( $\mu\text{mol/g}$ )	CM	$2.90 \pm 0.01$	$2.89 \pm 0.02$	$2.90 \pm 0.01$	$2.93 \pm 0.01$	$2.97 \pm 0.01$
	AK	$3.57 \pm 0.03$	$3.73 \pm 0.05$	$3.77 \pm 0.07$	$3.83 \pm 0.03$	$3.87 \pm 0.01$
<b>InsP<sub>4</sub></b> ( $\mu\text{mol/g}$ )	CM	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$
	AK	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$
<b>InsP<sub>3</sub></b> ( $\mu\text{mol/g}$ )	CM	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$
	AK	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$
<b>Condensed tannins</b> (mg eq. CE/g)	CM	$1.74 \pm 0.01$	$1.73 \pm 0.01$	$1.74 \pm 0.01$	$1.73 \pm 0.04$	$1.72 \pm 0.00$
	AK	$1.69 \pm 0.01$	$1.69 \pm 0.01$	$1.71 \pm 0.01$	$1.67 \pm 0.03$	$1.67 \pm 0.05$
<b>Polyphenols</b> (mg/g)	CM	$6.38 \pm 0.04$	$6.34 \pm 0.06$	$6.36 \pm 0.06$	$6.34 \pm 0.01$	$6.34 \pm 0.02$
	AK	$6.28 \pm 0.04$	$6.30 \pm 0.03$	$6.27 \pm 0.02$	$6.27 \pm 0.02$	$6.26 \pm 0.06$
<b>Trypsin inhibitor</b> (TIU/mg)	CM	$3.23 \pm 0.03$	$3.19 \pm 0.01$	$3.17 \pm 0.02$	$3.19 \pm 0.01$	$3.20 \pm 0.03$
	AK	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$
<b>Haemagglutinating activity</b> (HU/Kg)	CM	$0.50 \pm 0.00$	$0.50 \pm 0.00$	$0.50 \pm 0.00$	$0.50 \pm 0.00$	$0.50 \pm 0.00$
	AK	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$

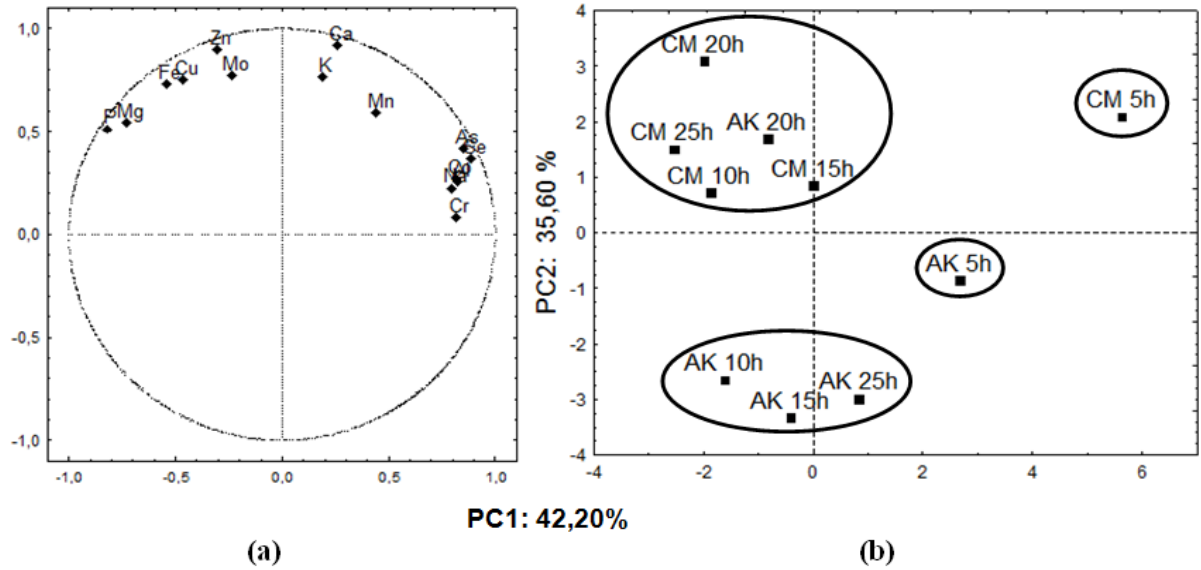
All samples were significantly equal (Mann Whitney,  $p \leq 0.05$ ) within the same column and row between antinutritional factors contents determined in CM and AK.

**Table 3.** The molar ratios of phytic acid (PA) to calcium (Ca), iron (Fe) and zinc (Zn), calcium to phosphorus (Ca/P) and sodium to potassium (Na/K) in akara (AK) and crude mass (CM) samples.

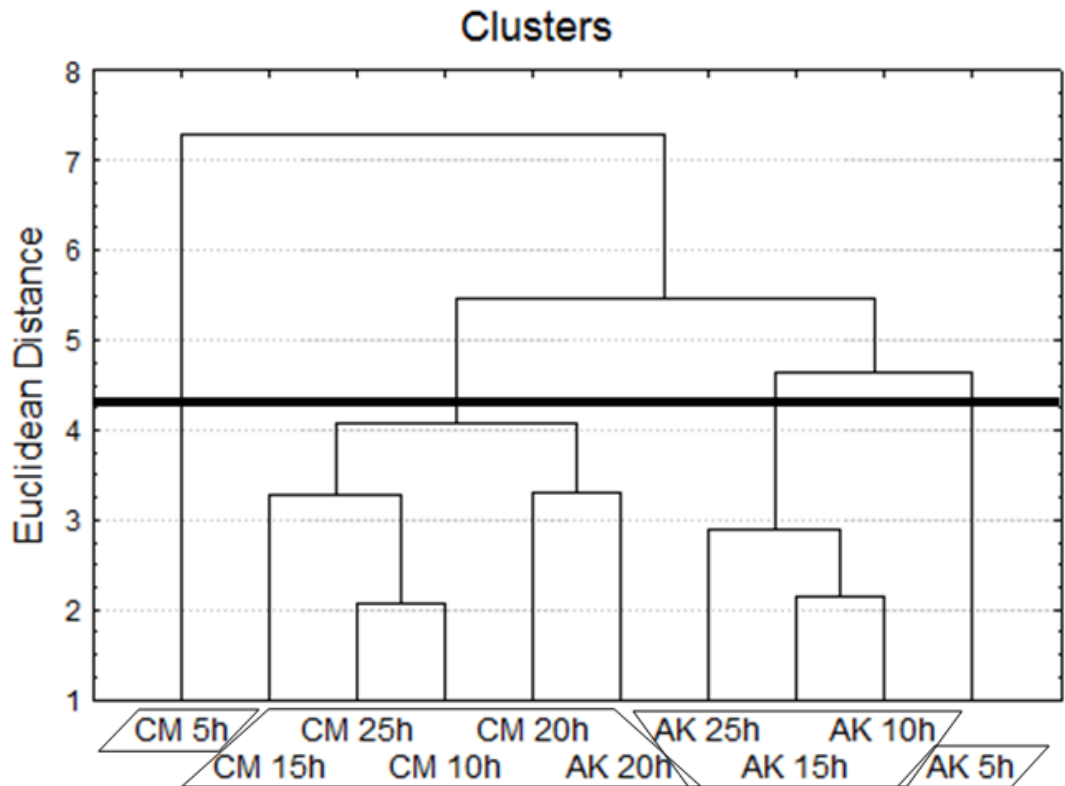
Parameters Samples	PA/Ca	PA/Fe	PA/Zn	Ca/P	Na/K
CM 5h	1.30	20.67	32.03	0.20	2.60
CM 10h	1.75	18.23	30.21	0.10	1.31
CM 15h	1.56	19.00	31.75	0.11	1.82
CM 20h	1.22	16.19	28.72	0.12	1.61
CM 25h	1.45	16.96	26.77	0.10	1.06
<b>CM (mean)</b>	<b>1.45</b>	<b>18.21</b>	<b>29.90</b>	<b>0.13</b>	<b>1.68</b>
AK 5h	1.43	19.44	33.23	0.18	1.66
AK 10h	2.00	19.31	35.16	0.10	1.17
AK 15h	2.18	19.94	37.24	0.09	1.50
AK 20h	1.39	15.06	29.69	0.11	1.93
AK 25h	1.94	20.42	36.20	0.10	2.68
<b>AK (mean)</b>	<b>1.79</b>	<b>18.83</b>	<b>34.30</b>	<b>0.12</b>	<b>1.79</b>
<i>Critical value</i>	<i>0.24<sup>a</sup></i>	<i>1.00<sup>a</sup></i>	<i>15.00<sup>b*</sup></i>	<i>1.00<sup>c</sup></i>	<i>0.16-0.3<sup>d</sup></i>

Source: **a**= Ma *et al.*, 2007; **b**= Gibson, Perlas, & Hotz, 2006 / \*PA/Zn molar ratios <5, between 5 and 15 and >15 have been associated with high, moderate and low zinc bioavailability, corresponding to approximately 50 %, 30 % and 15 % of total zinc, respectively; **c**= Santos, 2008; **d**= Aremu, Olaofe, & Akintayo, 2006.

## Figures



**Figure 1.** Loadings (a) and scores (b) plots (PC1 x PC2) of akaras (AK) and its crudes mass (CM) in deep-frying (5h to 25h).



**Figure 2.** HCA of akara (AK) and its crude masses (CM) in deep-frying (5h to 25h).

**ARTIGO 3****EM FASE DE ELABORAÇÃO**

**Características físico-químicas do azeite de dendê bruto  
(*Elaeis guineensis*) submetido a 25 horas de fritura de acarajés**



**Características físico-químicas do azeite de dendê bruto (*Elaeis guineensis*) submetido a 25 horas de fritura de acarajés.**

*Chemical and physical properties of crude palm oil (*Elaeis guineensis*) used in 25 hours deep-frying of akara (cowpea food).*

**FEITOSA, S.<sup>a</sup>; CORREIA, L.C.A.<sup>b</sup>; VIANA, T.V.<sup>a</sup>; COSTA, M.M.<sup>a</sup>; BOFFO, E<sup>c</sup>;  
ALMEIDA, D.T.<sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup> School of Nutrition, Federal University of Bahia - UFBA, Av. Araújo Pinho 32, 40110-150, Salvador, Bahia, Brazil. E-mail address: [sabrinafeitosa0@gmail.com](mailto:sabrinafeitosa0@gmail.com), [thais.vieiraviana@gmail.com](mailto:thais.vieiraviana@gmail.com), [marianamelocosta@yahoo.com.br](mailto:marianamelocosta@yahoo.com.br), [deliata@uol.com.br](mailto:deliata@uol.com.br).

<sup>b</sup> Pharmacy Faculty, Federal University of Bahia - UFBA, R. Barão do Jeremoabo 147, Ondina, 40170-115, Salvador, Bahia, Brazil. E-mail address: [luengal@bol.com.br](mailto:luengal@bol.com.br).

<sup>c</sup> Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, Federal University of Bahia – UFBA, 40170-290, Salvador, Bahia, Brazil. E-mail address: [eboffo@ufba.br](mailto:eboffo@ufba.br).

\* Corresponding author. Tel.: +55 71 32837700; fax: +55 71 32837705.

E-mail address: [deliata@uol.com.br](mailto:deliata@uol.com.br)(D.T. Almeida).

## 1. INTRODUÇÃO

O azeite de dendê bruto (ADB), ou óleo de palma (*palm oil*) como é conhecido internacionalmente, é o óleo extraído do mesocarpo do fruto da palmeira *Elaeis guineensis*. Trata-se de um símbolo da cozinha baiana e ingrediente imprescindível em preparações de destaque, como moquecas, vatapá, xinxim, caruru e acarajé. Este último é uma iguaria largamente comercializada por *baianas de acarajé*, nas ruas da cidade de Salvador, Bahia e bastante consumido pela população (IPHAN, 2005; MESQUITA, 2002).

O acarajé é patrimônio imaterial do país, elaborado com feijão caupi descortiado, cebola ralada e sal, e frito por imersão em ADB. Diferente de outros óleos vegetais, o ADB contém aproximadamente a mesma proporção entre os ácidos graxos saturados, sobretudo o palmítico (44%), e os insaturados, primordialmente o oléico (41%) e o linoléico (10%) e traços de linolênico. Esta composição permite fracionar o óleo em oleina (fração líquida) e estearina (fração sólida), além de promover uma elevada estabilidade oxidativa, que também está associada a presença de antioxidantes naturais como carotenóides, tocoferóis e tocotrienóis (BERGER, 2005; BAHARIN, *et al.*, 2001, EDEM, 2002).

A fritura por imersão caracteriza-se pelo emprego de elevadas temperaturas que ocasionam processos de degradação nos óleos decorrentes de reações de oxidação, hidrólise e polimerização, podendo originar mudanças em sua estrutura físico-química, como o aumento na formação de compostos polares, ácidos graxos livres, aldeídos, cetonas, peróxidos entre outras substâncias prejudiciais à saúde humana (CORSINI & JORGE, 2006; O'DONNELL, 1995). Também, à medida que se aumenta o uso do óleo na fritura, estas reações se intensificam, gerando a produção de moléculas complexas e compostos voláteis que liberam aroma desagradável (ALADEDUNYE & PRZYBYLSKI, 2013).

No caso específico da fritura de acarajés, a maioria das *baianas de acarajés*, produzem o bolinho em um sistema de fritura descontínua, com aquecimento e resfriamento do ADB, conforme a comercialização do produto, que é consumido preferencialmente aquecido. Além disso, é prática das baianas realizar a reposição do óleo com ADB já utilizado, situações que incrementam a degradação dos óleos.

Muitos estudos sobre as alterações termoxidativas do óleo de palma são realizados em todo o mundo. Entretanto, estes se concentram em experimentos com óleo de palma refinado e em frituras de batatas. Diante do exposto, faz-se necessário o melhor entendimento das mudanças e alterações sofridas pelo óleo de palma bruto durante o processo de fritura de acarajés, a fim de garantir uma maior qualidade tanto no processo de fritura quanto no alimento. Desse modo, este trabalho tem por objetivo, avaliar as características físico-químicas de ADB submetido a 25 horas de fritura de acarajé.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção das amostras**

O ADB foi adicionado em um recipiente inox, aquecido a 45 °C e homogeneizado, sendo coletados 20mL (tempo 0), filtrados em lã de vidro, e armazenados em frasco âmbar inertizado com nitrogênio à -20 °C, sendo descongelado apenas no momento das análises (JORGE & GONÇALVES, 1998). O processo de fritura foi realizado respeitando a prática das *baianas de acarajé*, sendo utilizado tacho esmaltado com 5 litros de ADB contendo uma cebola submersa. Após 12 minutos de aquecimento do óleo, iniciou-se a fritura até completar 5 horas de processo intermitente, obtendo-se aproximadamente 110 acarajés fritos/dia. O óleo foi decantado, filtrado e armazenado no tacho com tampa, em temperatura ambiente, até a próxima fritura, sendo esses procedimentos seguidos nos 4 dias subsequentes, totalizando 25

horas de fritura. Ao final de cada dia (nos tempos 5h, 10h, 15h, 20h e 25h), foram coletados 20mL de cada azeite de dendê da fritura de acarajés da mesma forma que a do tempo zero. Foi realizada a reposição do óleo (aproximadamente 2L) durante o processo, sendo utilizado para isso mistura de óleo novo com o óleo usado do dia anterior, a partir do segundo dia de fritura. A temperatura do óleo foi aferida no início do processo (aos 12 minutos) e a cada hora com termômetro tipo espeto (Incoterm).

## 2.2 Determinações analíticas

**2.2.1 Ácidos graxos livres (acidez), índice de peróxido e refração** - determinados em triplicata segundo a AOCS Ca 5a-40, AOCS, Cd 8b-90 (2003), em % de ácido oléico e mEq/Kg, respectivamente; índice de refração (40 °C) (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

**2.2.2 Compostos polares totais** - a medida de compostos polares totais foi realizada através do equipamento Testo 270, *Fri-Check*® (sendo os resultados multiplicados por um fator de 1,25 (OSAWA *et al.*, 2005)); e de cromatografia de adsorção em minicoluna conforme metodologia proposta por Dobarganes *et al.* (2000).

**2.2.3 Composição em ácidos graxos** - os ácidos graxos dos azeites foram transformados em ésteres metílicos de ácidos graxos, seguindo, em linhas gerais, a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2005). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram analisados em cromatógrafo gasoso (Clarus 600, Perkin Elmer), equipado com detector de ionização de chama (DIC), coluna capilar de sílica fundida ELITE-WAX (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm), com temperatura variando de 150 °C a 200 °C. Os parâmetros de análises foram: temperatura do injetor 250 °C; temperatura do detector 250 °C; temperatura da coluna programada inicial 45 °C por 2 minutos; aumentando 20 °C por minuto até 165 °C e permanecendo nessa temperatura por 15 minutos; e aumentando 4 °C até 220 °C e permanecendo nessa temperatura por 35 minutos.

Também foi realizada determinação de ácidos graxos por meio de ressonância magnética nuclear (RMN), os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram adquiridos no equipamento Varian Inova 500 de 11,7 Tesla (500 MHz para a frequência do hidrogênio), equipado com sonda direta de 5 mm, a temperatura de 298 K. As amostras foram preparadas em triplicata, diluindo-se 30 mg de ADBem 600  $\mu\text{L}$  de  $\text{CDCl}_3$ . Em seguida, os espectros foram processados aplicando-se uma transformada de *Fourier* utilizando-se 32768 pontos e uma multiplicação exponencial, com fator de alargamento de linha (*Line Broadening* ou LB), de 0,3 Hz. A fase foi ajustada manualmente e foi feita a correção automática da linha de base

**2.2.4 Estudo da estabilidade** - Metrohm Rancimat modelo 743 (Metrohm CH-9101, Herisau, Suíça) foi utilizado neste estudo. Foram pesados 3 g de OPB diretamente nos frascos de reação e submetido a 120 °C e um fluxo de ar de 20 L/h. Em cada tempo, duplicatas destas amostras foram acomodadas no equipamento e analisadas simultaneamente, sendo a capacidade do mesmo de oito frascos / análises por rodada de leitura. A resistência à oxidação foi expressa em termos de horas (h).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO (Em fase de elaboração).

**Tabela 1.** Estatística descritiva (média  $\pm$  desvio padrão) dos parâmetros físico-químicos do óleo de palma bruto submetido a 25 horas de fritura de acarajés.

Parâmetros	Tempo	OPB					Média $\pm$ DP <sup>1</sup>	
		0h	5h	10h	15h	20h		25h
<b>Temperatura</b> (°C)		45,00	160,00	149,40	164,20	155,40	171,60	<b>160,12 <math>\pm</math> 8,45</b>
<b>Tempo de indução</b> (h)		4,80	3,06	2,16	2,01	1,64	1,78	<b>2,13 <math>\pm</math> 0,56</b>
<b>Índice de refração</b> (40 °C)		1,4600	1,4600	1,4600	1,4600	1,4600	1,4600	<b>1,4600 <math>\pm</math> 0,00</b>
<b>Índice de acidez</b> (% ácido oléico)		2,42	2,42	2,39	2,58	2,62	2,54	<b>2,51 <math>\pm</math> 0,10</b>
<b>Índice de peróxidos</b> (mEq/Kg)		4,76	10,56	10,48	5,31	3,54	0,82	<b>6,14 <math>\pm</math> 4,30</b>

1 - Média  $\pm$  desvio padrão das amostras submetidas à fritura (5h, 10h, 15h, 20h e 25h).

**Tabela 2.** Perfil de ácidos graxos (%) por RMN do óleo de palma bruto submetido a 25 horas de fritura de acarajés.

Ácido graxo	Experimental						Literatura*
	0 h	5 h	10 h	15 h	20 h	25 h	
Linolênico	---	---	---	---	---	---	0,4
Linoléico	9,1	8,6	8,3	7,6	7,5	6,9	9,9
Oléico	40,5	40,2	39,6	39,3	38,9	38,7	40,4
Saturado	50,4	51,2	52,1	53,1	53,6	54,4	49,3

\*SAMBANTHAMURTHI, SUDRAM, TAN (2000)

**Quadro 1.** Perfil de ácidos graxos (%) por cromatografia gasosa do óleo de palma bruto submetido a 25 horas de fritura de acarajés.

Substância identificada	Média das concentrações (g/100g)					
	0h	5h	10h	15h	20h	25h
C <sub>8:0</sub>	0,05	0,04	0,05	0,05	0,06	0,07
C <sub>10:0</sub>	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
C <sub>12:0</sub>	0,25	0,25	0,25	0,24	0,25	0,24
C <sub>14:0</sub>	0,84	0,85	0,85	0,85	0,87	0,86
C <sub>16:0</sub>	41,01	41,64	41,92	42,38	42,79	43,14
C <sub>16:1</sub>	0,13	0,13	0,13	0,12	0,12	0,12
C <sub>17:0</sub>	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,11
C <sub>18:0</sub>	5,49	5,58	5,62	5,72	5,74	5,85
C <sub>18:1n9</sub>	40,38	40,32	40,31	40,20	40,10	40,13
C <sub>18:2t</sub>	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56
C <sub>18:2c</sub>	10,41	9,78	9,47	9,06	8,69	8,23
C <sub>20:0</sub>	0,26	0,23	0,21	0,20	0,19	0,17
C <sub>18:3c</sub>	0,36	0,37	0,37	0,38	0,38	0,39
C <sub>20:1</sub>	0,13	0,13	0,14	0,12	0,12	0,12
<b>Saturados</b>	48,03	48,71	49,03	49,55	50,03	50,45

**Tabela 3.** Quantificação dos compostos polares totais (%) pelos métodos (IUPAC, 2000), *Fri-Check* e Testo 270 das amostras de óleo de palma bruto submetidos a 25 horas fritura de acarajés.

Tempo (h)	IUPAC	Testo 270	<i>Fri-Check</i>
	Média ± DP (%)		
0	14,08 ± 0,06	9,50 ± 0,50	5,17 ± 0,67
5	20,25 ± 1,54	11,50 ± 0,00	6,53 ± 0,59
10	20,09 ± 0,56	14,67 ± 0,29	7,03 ± 0,70
15	24,72 ± 0,25	17,50 ± 0,00	6,23 ± 0,58
20	27,51 ± 0,31	19,50 ± 0,50	7,87 ± 0,35
25	29,80 ± 0,67	22,17 ± 0,29	16,70 ± 1,39

## REFERÊNCIAS

ALADEDUNYE, F.; PRZYBYLSKI, R. Frying stability of high oleic sunflower oils as affected by composition of tocopherol isomers and linoleic acid content. **Food Chemistry**, v.141(3), n.1, p.2373–2378, 2013.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (AOCS). **Official methods of recommended practices of the American Oil Chemists' Society**, Methods Ca 5a-40, AOCS, Cd 8b-90. Champaign, 5. ed., 2003.

BAHARIN, B. S.; LATIP, R. A.; CHE MAN, Y. B.; RAHMAN, A. The effect of carotene extraction system on crude palm oil quality, carotene composition, and carotene stability during storage. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.78, n.8, p.851–855, 2001.

BERGER, K. G. Malaysian Palm Oil Promotion Council (MPOPC). **The use of palm oil in frying. Frying oil series**. Malaysia, 2005. Disponível em: <http://www.mpoc.org>. Acesso em: 12 out. 2011.

CORSINI, M. S.; JORGE, N. Estabilidade oxidativa de óleos vegetais utilizados em frituras de mandioca palito congelada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.2, p.27-32, 2006.

DOBARGANES, M. C; VELASCO, J.; DIEFFENBACHER, A. Determination of polar compounds, polymerized and oxidized triacylglycerols, and diacylglycerols in oils and fats. **Pure and Applied Chemistry**, v.72, n.8, p.1563–1575, 2000.

EDEM, D. O. Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological, and toxicological aspects: A review. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v.57, p.319-341, 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 4. ed. São Paulo: O Instituto, 2005.

IPHAN - Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional: **DOSSIÊ IPHAN 6: Ofício das Baianas do Acarajé**. Ministério da Cultura, DF, Brasil, 2005.

JORGE, N.; GONÇALVES, L. A. G. Comportamento do óleo de girassol, com alto teor de ácido oléico em termoxidação e fritura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v.18, n.3, p.335-342, 1998.

MESQUITA, A. S. Do azeite de dendê de ogum ao *palm oil commodity*: uma oportunidade que a Bahia não pode perder. **Bahia Agrícola**, v.5, n.1, p.22-27, 2002.

O'DONNELL, C. D. Fats and oils: forces in fried food quality. **Prepared Foods**, p. 77-78, 1995.

OSAWA, C. C.; GONÇALVES, M. L. A.; GRIMALDI, R. Nova ferramenta destinada ao monitoramento e à inspeção do descarte “*in situ*” de óleos e gorduras de fritura. **Revista Brasileira de Vigilância Sanitária**, São Paulo, v.2, n.1, p.102-107, 2005.

SAMBANTHAMURTHI, R.; SUDRAM, K.; TAN, Y. Chemistry and biochemistry of palm oil. **Progress in Lipid Research**, v.39, p.507-558, 2000.



**ARTIGO 4**

EM FASE DE ELABORAÇÃO

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

**Avaliação de características físico-químicas de acarajés  
submetidos de 5 a 25 horas de fritura por imersão**

## COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

### **Avaliação de características físico-químicas de acarajés submetidos de 5 a 25 horas de fritura por imersão**

**FEITOSA F., ALMEIDA D.T.**

Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador, Bahia, Brasil, Av. Araújo Pinho 32, 40110-150.

#### **1. INTRODUÇÃO**

Em Salvador, encontram-se registrados aproximadamente dois mil pontos de venda de acarajés (Associação das Baianas de Acarajé e Mingau do estado da Bahia – ABAM), porém é estimado que, só na capital, existam cerca de cinco mil baianas de acarajé. Isto faz do comércio de acarajé a principal comida de rua de Salvador/BA, além de ser uma das marcas símbolo do turismo.

O acarajé é um alimento à base de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) originário da África Ocidental (DOVLO, WILLIAMS, & ZOAKA, 1976). É um ícone cultural e turístico da metrópole baiana, vendido nas ruas por mulheres tipicamente vestidas chamadas baianas de acarajé (IPHAN, 2005). Na Bahia, o acarajé é feito a partir de diversas variedades de feijão-caupi: fradinho, macassar, olho de pombo, costela de vaca, boca preta, dentre outros (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2003; ROGÉRIO, 2010).

No processo de fabricação dos bolinhos de acarajé, os grãos do feijão são descorticados, partidos em um moedor manual ou processador de alimentos, macerados até formar uma pasta, a massa crua do acarajé. Depois de ser temperada com cebola ralada e sal, a pasta é batida até adquirir características de espuma, conferindo-lhe maciez, sendo moldada em bolas por uma colher de pau e frita em óleo de palma bruto (OPB) ou azeite de dendê bruto, como é conhecido no Brasil (IPHAN, 2005; PATTERSON *et al.*, 2004; ROGÉRIO, 2010; SINGH *et al.*, 2004). Na Bahia, o acarajé é servido com camarão seco, vatapá, caruru e salada vinagrete (CURVELO, 2010; SILVA *et al.*, 2003).

O feijão caupi possui atributos nutricionais superiores ao das outras espécies de leguminosas, desempenhando um papel importante na agricultura e dieta de muitos países em

desenvolvimento, incluindo o Brasil (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2003; AYKROYD, DOUGHTY, WALKER, 1982; EHLERS & HALL, 1997). É importante fonte de nutrientes da dieta, de custo relativamente baixo, acessível, fonte de proteínas, vitaminas e alguns minerais como o cálcio, ferro, zinco (CARVALHO *et al.*, 2012; LANGYINTUO *et al.*, 2003; SINGH *et al.*, 2004). Os grãos do feijão caupi podem variar consideravelmente de tamanho, forma e cor o que implica em diferenças na sua composição química e propriedades sensoriais (ENWERE, MCWATTERS, PHILLIPS, 1998; OLAPADE *et al.*, 2002).

Além disso, a cor de um alimento é um parâmetro importante para aceitação do mesmo. Por meio do sistema de cor CIELab, parâmetros de cor podem ser avaliados, em que valores de  $L^*$  igual a 0 (zero) representa a cor preta e, 100 representa a cor branca, mostrando ao observador se o objeto em estudo é claro ou escuro, por exemplo, e que podem estar relacionados ao tempo de fritura dos acarajés. Enquanto os valores de  $h_{ab}$  (tonalidade) são representados por  $-a^*$  para a cor verde e  $+a^*$  para a cor vermelha, e valores de  $-b^*$  para a cor azul e  $+b^*$  para a cor amarela. Ainda existe a saturação da cor, definida pelo Croma ( $C^*$ ), e que independe da tonalidade ou da luminosidade.

Nesse sentido é que o objetivo deste trabalho foi avaliar as características físico-químicas de acarajés submetidos de 5 a 25 horas de fritura por imersão, de um tradicional processo de elaboração dessa iguaria na Bahia.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

Foi realizado um experimento de fritura por imersão de acarajés no qual se reproduziu o mais fielmente possível as condições em que são fritos os acarajés nas ruas de Salvador, Bahia. Para tal, foi contratada uma baiana de acarajé que montou um tabuleiro típico dos pontos de venda de acarajés, utilizou seus próprios utensílios e técnicas empregados na fabricação e comercialização dessa iguaria.

O preparo do acarajé foi realizado por essa baiana de acordo com suas práticas tradicionais (CURVELO, 2010). 5 kg de massa crua de acarajé (previamente moída) foram adquiridas diariamente (dias 1, 2, 3, 4, 5) pela baiana, de um mesmo vendedor, na Feira de São Joaquim, em Salvador (BA).

## 2.1 Obtenção das amostras e o experimento de fritura

O processo de fritura por imersão ocorreu sempre a céu aberto, em um tempo total de 25 horas de experimento, tendo sido realizado em 5 dias consecutivos, com 5 horas de fritura intermitentes por dia. Adicionou-se a massa crua de acarajé dentro de uma panela de alumínio, temperou-se com cebola ralada e sal. A seguir, bateu-se a massa com auxílio de uma colher de pau e, com este mesmo utensílio e uma outra colher de alumínio, moldou-se a massa em forma bolinhos (60–110 g cada).

Realizou-se o aquecimento de 5 L de óleo de palma bruto (OPB) (industrializado e uma das marcas mais utilizadas pelas baianas de acarajé; integral, ou seja, com ambas frações, oleína e estearina), em um tacho esmaltado, por 12 minutos (tempo médio em que elas iniciam a fritura), na presença de uma cebola (prática tradicional das baianas de acarajé, cuja intenção é prolongar a qualidade do óleo durante a fritura). Em seguida, 5 daqueles bolinhos de massa crua de acarajé foram sucessivamente adicionados ao azeite de dendê e fritos por imersão, durante aproximadamente 6 minutos.

Em alguns intervalos de tempo, o OPB permaneceu apenas com a cebola, enquanto a baiana batia novamente a massa. Depois disso, os bolinhos fritos (acarajé) foram retirados, aferiu-se a temperatura de imediato, com um termômetro tipo espeto (Incoterm), enquanto o azeite de dendê foi drenado em papel absorvente (prática das baianas) e, quando atingiram a temperatura ambiente (cerca de 40 minutos), foram aferidos os pesos – para aqueles da amostragem, temperatura e peso. Um total de 110 acarajés/dia foi obtido – simulando a quantidade média comercializada em um dia nos pontos de vendas de acarajé (ROGÉRIO, 2010). Após o término de cada dia de fritura, esperou-se decantar os resíduos de alimentos no óleo e procedeu-se a filtração do mesmo em peneira de alumínio, sendo então armazenado no próprio tacho com uma tampa, em temperatura ambiente, até a fritura do próximo dia, de acordo com as práticas das baianas de acarajés, assim como, a reposição do azeite de dendê no decorrer da fritura por imersão (com um máximo de, aproximadamente, 2 L por dia).

A temperatura do azeite de dendê foi aferida com termômetro tipo espeto (Incoterm) aos 12 minutos iniciais e a cada hora completada de fritura. Observou-se uma variação da mesma entre 143 a 188 °C no início (dia 1) e de 159 a 178 °C no final (dia 5). Ao passo que a cebola foi repostada sempre que apresentava aspecto de queimada (de acordo com a prática da baiana), utilizando-se em média 3 cebolas/dia.

Em cada dia, 10 amostras de acarajés foram coletadas dos últimos lotes produzidos no dia, e identificadas de acordo com o tempo de fritura de cada dia: **5h** (dia 1); **10h** (dia 2); **15h** (dia 3); **20h** (dia 4); e **25h** (dia 5).

## 2.2 Determinações analíticas

**2.2.1 Peso (g) e temperatura (°C)** – conforme descrito acima no experimento, a aferição do peso (em balança analítica, Sartorius Ag Gottiengen, Alemanha) e temperatura (com termômetro (tipo espeto, Incoterm) foram realizadas em todas 10 amostras e calculadas a média e o desvio-padrão para cada tempo de fritura (5h, 10h, 15h, 20h e 25h).

**2.2.2 Cor (CIELab)** – em cada uma das 10 unidades coletadas, foi realizada a leitura da cor empregando-se um colorímetro Chroma CR-400 (Konica Minolta Sensing Inc., Japão), com o iluminante D<sub>65</sub>, o ângulo de observação de 2 ° e expresso em termos de luminosidade (L\*), características de vermelho-verde (a\*), características azul-amarelo (b\*), ângulo de tonalidade (h<sub>ab</sub>) e croma (C\*) com o ângulo de matiz e croma calculado da seguinte forma:  $h_{ab} = \tan^{-1} (b^*/a^*)$  e  $C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$  (ANDREU-SEVILLA et al., 2008). A leitura da cor em cada unidade de acarajé foram seis sobre sua superfície, sendo três em pontos diferentes de cada face, à 22-24 °C, sendo calculadas a média e o desvio-padrão para cada unidade, e depois, calculada a média e desvio-padrão para cada tempo de fritura (5h, 10h, 15h, 20h e 25h), obtendo-se, assim, o resultado final.

**2.2.3 Teor de umidade (%)** – uma unidade (das 10 coletadas) foi aleatoriamente retirada para análise de umidade (em triplicata), que foi realizada por perda por secagem conforme Pregnotatto & Pregnotatto (IAL, 1985).

**2.2.4 Lipídeos totais (%)** - as amostras de acarajés, após as demais análises, foram armazenadas a -80 °C e liofilizadas (Liofilizador LS 3000 D, Terroni Equipamentos Científicos Ltda., Brasil). Então, foram extraídos os lipídeos totais por método Soxhlet (Tecnal, TE 044-8/50), utilizando éter de petróleo (30-70 °C) como solvente extrator. 3,0 g de amostra foram pesadas e colocadas no Soxhlet a 65 °C por 3 horas. Então, os frascos com os lipídeos extraídos foram levados a uma estufa a 105 °C por 1,5 horas (AOAC, 1990). Depois, colocados em um dessecador para resfriar e, por gravimetria, foi encontrado o peso desses lipídeos, calculando-se a porcentagem para cada.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na **Tabela 1** demonstram que a massa média de um acarajé foi de  $54,29 \pm 5,66$  g. Os valores dos pesos dos acarajés neste estudo estão dentro do intervalo (42,61 - 155,73 g) encontrado para os acarajés da cidade de Salvador, Bahia (ROGÉRIO, 2010), conforme esperado, visto que se pretendeu reproduzir o mais fielmente possível as condições nas quais os bolinhos são fritos nas ruas nos pontos de comercialização. A massa

dos bolinhos é moldada com uma colher de pau, em forma de bolinhos, não existindo padronização do produto, o que explica a variação de quase 15 g observada (**Tabela 1**). De acordo com as *baianas*, o acarajé tem hoje o dobro do tamanho tradicional (SANTOS *et al.*, 2010), sendo que os menores e sem recheios são produzidos em três ocasiões: para oferenda aos orixás, “limpeza do ponto” e em hotéis e restaurantes (XAVIER *et al.*, 2007).

Em relação à temperatura interna do produto, os dados da **Tabela 1**, demonstram um valor médio de  $81,66 \pm 2,94$  °C e mínimo de 78,20 °C, estando em acordo com as recomendações da RDC n°216 (BRASIL, 2004), a qual determina que todas as partes do alimento devem atingir a temperatura de, no mínimo, 74 °C, suficiente para assegurar a qualidade higiênico-sanitária do alimento.

Quanto ao teor de umidade, o valor médio encontrado foi de  $45,84 \pm 2,25$  % (Tabela 1). Foi observada uma redução do percentual nas amostras dos tempos finais (20h e 25h) de fritura em relação aos tempos iniciais (5 a 15h) que apresentaram em torno de 47% de umidade. Esses resultados estão em acordo com o percentual encontrado nos estudos de Santos (2004) e Silva *et al.* (2003), os quais também foram de 47%, e com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (2006), de 50,5%.

O teor de lipídeos totais dos acarajés desse estudo apresentou um valor médio de 22,02%, o que está próximo ao encontrado por Rogério (2010), de 23,71%, que analisou 149 amostras de acarajés de toda Salvador-BA. Isso indica que as condições desse experimento reproduziram àquelas dos pontos de venda de acarajés. Entretanto, esse percentual (mínimo de 19% e máximo de 27%) foi maior do que o encontrado em outros estudos na literatura, de aproximadamente 13% (SANTOS, 2004; SILVA *et al.*, 2003) e mais próximo ao da TACO (2006), 19,9%. Essa diferença em até mais de 10% pode ser explicada em função das diferentes técnicas de frituras utilizadas tais como: emprego pelas baianas de diferentes proporções das frações do azeite de dendê (oleína e estearina), adição de uma cebola com casca ao óleo inicial (ROGÉRIO, 2010) e diferentes modos de reposição do óleo durante o processo de fritura, e em momentos aleatórios, de acordo apenas com a redução do nível do mesmo no tacho (CURVELO, 2010).

A cor dos acarajés é definida pelo azeite de dendê, o qual se apresenta amarelo claro a laranja-avermelhado, coloração atribuída à quantidade de carotenóides do fruto, sendo o  $\alpha$ - e o  $\beta$ -caroteno os majoritários presentes no OPB (EDEM, 2002; SUDRAM *et al.*, 2003; BAHARIN *et al.*, 2001). A **Tabela 1** demonstra os valores das coordenadas no espaço CIELab da cor de acarajés do presente estudo e que eles praticamente não variaram ao longo do processo de fritura (de 5h a 25h). Tais coordenadas estão no quadrante correspondente a

valores positivos para  $a^*$ ,  $b^*$  e  $L^*$ , com predomínio de pigmento amarelo-alaranjado demonstrado por ângulo médio de tonalidade de  $55^\circ$ .

Entretanto, comparando-se esses resultados (**Tabela 1**) com a cor do OPB utilizado durante a fritura desses acarajés, observa-se um aumento da coordenada  $a^*$  em relação aos acarajés, de -0,55 para 22,21, ou seja, ganho da cor vermelha, quanto mais quando comparado ao OPB inicial (0h) ( $a^* = 12,39$ ). O mesmo pôde ser observado em relação à coordenada  $b^*$  que aumentou nos acarajés (32,93) em relação ao OPB utilizado em sua fritura (19,77) ou ao OPB inicial (22,06). Isto pode ser explicado pela reposição de OPB durante o processo de fritura (provavelmente próximo do momento de fritura dos bolinhos), o qual levava alguma proporção de óleo novo. Porque, naturalmente, ocorre o oposto, a perda da predominância da cor vermelha do óleo de palma basicamente em função da degradação dos carotenóides durante o processo de fritura (ANDREU-SEVILLA *et al.*, 2008). Portanto, neste caso, uma parcela importante destes pigmentos foi absorvida pelos acarajés, antes de uma degradação importante dos carotenóides em função do calor.

**Tabela 1.** Estatística descritiva da temperatura interna, peso, teor de umidade e de lipídeos totais das amostras de acarajé submetidos à fritura por imersão no azeite de dendê bruto por 25 horas.

Parâmetros	Tempo	Acarajés					Média $\pm$ DP
	5h	10h	15h	20h	25h		
<b>Peso (g)</b>	61,71	52,80	57,52	52,79	46,65	<b>54,29 <math>\pm</math> 5,66</b>	
<b>Temperatura (<math>^\circ\text{C}</math>)</b>	79,11	78,20	84,80	84,10	82,10	<b>81,66 <math>\pm</math> 2,94</b>	
<b>Umidade (%)</b>	47,97	47,20	47,03	42,64	44,37	<b>45,84 <math>\pm</math> 2,25</b>	
<b>Lipídeos (%)</b>	19,81	21,08	27,02	19,20	23,33	<b>22,09 <math>\pm</math> 3,34</b>	
<b>C</b>	L*	37,98	37,18	41,54	37,47	39,31	<b>38,69 <math>\pm</math> 1,79</b>
	a*	20,78	27,49	20,32	22,13	20,33	<b>22,21 <math>\pm</math> 3,04</b>
	b*	33,17	32,67	34,93	31,30	32,59	<b>32,93 <math>\pm</math> 1,32</b>
<b>R</b>	C*	39,23	35,87	40,16	38,40	38,56	<b>38,45 <math>\pm</math> 1,60</b>
	h <sub>ab</sub>	57,61	46,82	59,56	54,59	56,29	<b>55,17 <math>\pm</math> 4,99</b>

#### 4. CONCLUSÕES

O processo de fritura por imersão de 25 horas não alterou significativamente os parâmetros estudados nos acarajés e a reposição de OPB durante o mesmo se apresentou um aspecto favorável nutricionalmente devido a uma provável maior absorção de pigmentos de carotenos pelos acarajés.

#### REFERÊNCIAS

- ANDRADE JÚNIOR, A. S.; SANTOS, A. A.; SOBRINHOS, C. A.; BASTOS, E. A.; MELO, F. B.; VIANA, F. M. P.; FREIRE FILHO, F. R.; CARNEIRO, J. S.; ROCHA, M. M.; CARDOSO, M. J.; SILVA, P. H. S.; RIBEIRO, V. Q. Cultivo de Feijão-Caupi. **Embrapa**. Sistema de Produções 2. Versão eletrônica, 2003. Disponível em: <http://www.cpamn.embrapa.br/pesquisa/graos/FeijaoCaupi/index.htm>. Acesso em: 15 abr. 2014.
- ANDREU-SEVILLA, A.; HARTMANN, A.; SAYAS, E.; BURLÓ-CARBONELL, F.; DELGADO-ESTRELL, P.; VALVERDE, J. Mathematical quantification of total carotenoids in Sioma oil using color coordinates and multiple linear regression during deep-frying simulations. **European Food Research and Technology**, v.226, p.1283–1291, 2008.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15. ed. Washington, D.C.: AOAC International, 1990. p. 800-801; 1105-1106.
- AYKROYD, W. R.; DOUGHTY, J.; WALKER, A. F. **Legumes in Human Nutrition, FAO Nutritional Studies**. 2. ed. n.19. Rome, Italy: FAO, 1982.
- BAHARIN, B. S.; LATIP, R. A.; CHE MAN, Y. B.; RAHMAN, A. The effect of carotene extraction system on crude palm oil quality, carotene composition, and carotene stability during storage. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.78, n.8, p.851–855, 2001.
- CARVALHO, A. F. U. *et al.* Nutritional ranking of 30 Brazilian genotypes of cowpeas including determination of antioxidant capacity and vitamins. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.26, p.81–88, 2012.
- CURVELO, F. M. **Uma imersão no tabuleiro da baiana: o estudo do óleo de palma bruto (*Elaeis guineensis*)**. 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos, Nutrição e Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde, Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- DOVLO, F. E.; WILLIAMS, C. E.; ZOAKA, L. Cowpeas: Home Preparation and Use in West Africa. **International Development Research Centre, IRDC-055e**, Ottawa, Canada, p.29–30, 1976.



EDEM, D. O. Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological, and toxicological aspects: A review. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v.57, p.319-341, 2002.

EHLERS, J. D.; HALL, A. E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Field Crops Research**, v.53, p.187–204, 1997.

ENWERE, N. J.; MCWATTERS, K. H.; PHILLIPS, R. D. Effect of processing on some properties of cowpea (*Vigna unguiculata*), seed, protein, starch, flour and akara. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v.49, p.365-373, 1998.

INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO NACIONAL (IPHAN): **DOSSIÊ IPHAN 6: Ofício das Baianas do Acarajé**. Ministério da Cultura, DF, Brasil, 2005.

LANGYINTUO, A. S.; LOWENBERG-DE BOER, J.; FAYEC, M.; LAMBERTB, D.; IBROD, G.; MOUSSAD, B.; KERGAE, A.; KUSHWAHAF, S.; MUSA, S.; NTOUKAMG, G. Cowpea supply and demand in West and Central Africa. **Field Crops Research**, v.82, p.215–231, 2003.

OLAPADE, A. A.; OKAFOR, G. I.; OZUMBA, A. U.; OLATUNJI, O. Characterization of Common Nigerian Cowpea (*Vigna unguiculata* L. walp) Varieties. **Journal of Food Engineering**, v.55, p.101-105, 2002.

PATTERSON, S. P.; PHILLIPS, R. D.; MCWATTERS, K. H.; HUNG, Y.-C.; CHINNAN, M. S. Fat reduction affects quality of akara (fried cowpea paste). **International Journal of Food Science and Technology**, v.39, p.681–689, 2004.

PREGNOLATTO, W.; PREGNOLATTO, N. P. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, SP). **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, v.1, n.3. São Paulo: O Instituto, 1985. p.21-22.

ROGÉRIO, W. F. **Uma imersão no tabuleiro da baiana: o acarajé**. 2010. 82 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos, Nutrição e Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde, Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, Salvador. Disponível em: <http://www.repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/10491>.

SANTOS, L. A. S., *et al.* **O Acarajé e a Modernidade em Salvador: um estudo sócio-antropológico sobre os discursos e as práticas de consumo do acarajé na cidade de Salvador nos tempos da alimentação saudável**. Relatório final do apresentado ao CNPq Edital Universal 2007-2010. Núcleo de Estudos em Alimentação e Cultura, Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, 2010.

SANTOS, M. A. F. **Composição química e valor nutritivo de acarajé e abará – comercializados em Salvador-BA**. 2004. 84 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos, Nutrição e Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde, Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

SILVA, J. N.; MIRANDA, K. E. S.; ALMEIDA, V. F.; BENEVIDES, C. M. J. Avaliação da composição centesimal e valor calórico de acarajés comercializados na cidade de Salvador,BA. **Revista Higiene Alimentar**, v.17, n.113, p.43-45, 2003.

SINGH, A.; HUNG, Y.; PHILLIPS, R. D.; CHINNAN, M. S.; MCWATTERS, K. H. Particle-size Distribution of Cowpea Flours Affects Quality of Akara (Fried Cowpea Paste). **Journal of Food Science**, v.69, n.7, p.243–249, 2004.

SUNDRAM, K.; SAMBANTHAMURTHI, R.; TAN, Y-A. Palm fruit chemistry and nutrition. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.12, n.3, p.355–362, 2003.

TACO – **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 2. ed. Campinas (SP): NEPA-UNICAMP, 2006.

XAVIER, N. M. P. **A Baiana-de-Acarajé como Símbolo Identitário da Bahia e sua Apropriação pelo Turismo**. 2007. 84 f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós Graduação em Cultura e Turismo, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 2007.

## **PARTE II**

## **APÊNDICES**

**PROJETO DE PESQUISA**

**CARACTERIZAÇÃO DO AZEITE DE DENDÊ (*Elaeis guineensis*) E DO ACARAJÉ:  
CONTRIBUIÇÃO PARA O CONTROLE DA QUALIDADE**

## 1 INTRODUÇÃO

O azeite de dendê, ou óleo de palma como é conhecido internacionalmente, é um óleo vegetal, extraído do mesocarpo do fruto da palmeira *Elaeis guineensis*. Possui importante participação na indústria de alimentos em âmbito internacional, sendo atualmente o óleo mais produzido e consumido no mundo (ABRAPALMA, 2013; OIL WORLD, 2012, MPOC, 2013). O azeite de dendê bruto é matéria-prima típica da culinária baiana, conferindo identidade a sua cozinha, com destaque na fritura por imersão do acarajé, bolinho elaborado com feijão caupi (*Vigna unguiculata*), o qual é patrimônio imaterial do Brasil e a principal comida de rua da cidade de Salvador, Bahia (IPHAN, 2005).

A fritura por imersão é amplamente empregada por ser um processo rápido e econômico de preparação dos alimentos, entretanto, quando mal conduzida, pode levar à produção de substâncias tóxicas à saúde humana (ALMEIDA *et al.*, 2013; CORSINI & JORGE, 2006; O'DONNELL, 1995), e não existe regulamentação brasileira que defina legalmente os aspectos concernentes a esse processo, havendo apenas um informe técnico (BRASIL, 2011). As conseqüências nutricionais da ingestão de óleos de fritura incluem uma variedade de sintomas tais como reações alérgicas do trato digestivo, retardo do crescimento, aumento do peso do fígado e rins, ação mutagênica ou carcinogênica, dentre outros (ADAM, DAS, JAARIN, 2009; FARAG *et al.*, 2010; MASSON, 1999; MEHTA & SWINBURN, 2001; QI *et al.*, 2002). Portanto, é imprescindível conhecer a qualidade do azeite de dendê e seu comportamento na fritura de acarajés, visando a obtenção de produtos com qualidade (LIMA & GONÇALVES, 1995; STEVENSON, VAISEY-GENSER, ESKIN, 1984).

Por outro lado, o acarajé, é um alimento básico da culinária baiana, e sua matéria prima, o feijão caupi, é importante fonte de nutrientes da dieta, de custo relativamente baixo, acessível, fonte de proteínas, vitaminas e alguns minerais como o cálcio, ferro, zinco (CARVALHO *et al.*, 2012; LÓPEZ-AMORÓS, HERNÁNDEZ, & ESTRELLA, 2006; SANTOS *et al.*, 2013). Estas propriedades conferem ao feijão atributos nutricionais superiores a outras espécies leguminosas, desempenhando um papel importante na agricultura e na dieta de muitos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2003; AYKROYD, DOUGHTY, WALKER, 1982; DESHPANDE & DAMODARAN, 1990; EHLERS & HALL, 1997). No entanto, seu valor nutricional é geralmente reduzido pelo conteúdo de antinutrientes, tais como fitatos, fibras, inibidores de tripsina, lectinas, taninos e polifenóis (ALMEIDA *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 1997).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade do azeite de dendê, seu potencial mutagênico e comportamento na fritura de acarajés, além de quantificar os fatores antinutricionais e minerais desta iguaria. Desse modo, poder-se-á contribuir para uma produção e distribuição de alimentos seguros e saudáveis, a partir dos conhecimentos adquiridos, o que seria imprescindível e decisivo para o estabelecimento de um padrão de qualidade dos azeites e do acarajé, lacuna existente na legislação vigente.

## **2 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA**

### **2.1 Azeite de dendê ou óleo de palma (*Elaeis guineensis*)**

Segundo o Banco Mundial, mais de 28 milhões de toneladas de óleos vegetais deverão ser produzidos a cada ano até 2020, em razão do crescimento demográfico e da demanda alimentar, sem contar o uso de oleaginosas na produção de biocombustíveis (BRASIL, 2009). Em 2012, a produção de óleo de palma (OP) foi estimada 18,8 milhões de toneladas. (MPOC, 2013). De acordo com a Associação Brasileira de Produtores de Óleo de Palma (Abrapalma), criada em setembro de 2012, a produção brasileira vem crescendo de forma sustentável. Em 2013, a produção de OP no Brasil foi estimada em 350 mil toneladas, das quais 90% foram produzidas no Pará, principal produtor, e o restante, na Bahia; em 2012, foi de 260 mil toneladas, sendo 171 mil em 2008 e 162 mil em 2007. Embora, no Brasil, existam condições agrícolas inigualáveis para a produção de palma, esta representa apenas 0,5% do volume produzido no mundo (ABRAPALMA, 2013; BRASIL, 2009).

O Ministério de Desenvolvimento Agrícola (MDA) ressalta que seu amplo uso fez o consumo mundial passar de 17 para 45 milhões de toneladas entre 1998 e 2009, correspondendo a mais de um terço do total de óleo vegetal consumido no planeta com 39% de um mercado em plena expansão e bem à frente da soja, da canola e do girassol (BRASIL, 2010; OIL WORLD, 2012).

Atualmente, o óleo de palma é o mais utilizado pela indústria alimentícia em todo o mundo, por ser considerado bastante versátil, rico nas vitaminas A (na forma de carotenóides) e E (tocoferóis e tocotrienóis), além de ser recomendado como suplemento nutritivo para populações de baixa renda (ALMEIDA, 2009; BRASIL, 2010). Sua composição em ácidos graxos, antioxidantes naturais, permite seu fracionamento e emprego em uma diversidade de produtos, representando uma excelente alternativa na substituição da gordura *trans* (ALMEIDA, 2009).

No Brasil, o óleo de palma (*Elaeis guineensis*) é conhecido como azeite de dendê, sendo empregado na sua forma bruta e consumido assim apenas no Brasil e na África (LODY, 2009). O azeite de dendê bruto participa de muitos pratos da culinária baiana, sendo o mais popular deles a fritura de acarajés, patrimônio imaterial do Brasil (IPHAN, 2005; OLIVEIRA, 2009). De origem africana e vinda com os escravos na colonização do Brasil, seu preparo é à base de feijão caupi (*Vigna unguiculata*), cebola ralada e sal, comercializado nas ruas da cidade de Salvador/BA por mulheres com vestimentas típicas, as *baianas de acarajé* (MESQUITA, 2002), além de ser oferenda aos “santos” em terreiros de Candomblé (CORRÊA *et al.* 2003; LODY, 2009).

Uma das características de maior destaque na produção do OPB é o modo rústico de extração, por meio de prensagem, nos chamados “rodões” de pedra. Este consiste em um processo rudimentar, envolvendo todo um grupo familiar, onde não se observam cuidados com os frutos do momento da colheita ao transporte, o que culmina em importante acidificação do óleo a ser consumido (EBONGUE *et al.*, 2008; LODY, 2009; MESQUITA, 2002) e em uma ampla variedade de apresentações na composição desse produto no mercado formal e informal (CURVELO, 2010; TAVARES & BARBÉRIO, 1989). Segundo Mesquita (2002), a sua comercialização na Bahia é realizada por cinco principais usinas de beneficiamento que embalam, rotulam e distribuem o óleo.

As principais frações do azeite de dendê são a oleína (fração líquida) e a estearina (fração sólida) (CODEX, 2003; LIN, 2011). A maior diferença entre o óleo de palma e os outros óleos vegetais é a sua maior proporção de ácido palmítico (C<sub>16</sub>) que, por ser saturado, confere ao azeite de dendê maior estabilidade térmica, tonando-o um dos mais estáveis à oxidação (ALMEIDA *et al.*, 2013; ECONOMIC PLANNING UNIT, 2010). Também por conter pequenas quantidades de ácido linoléico (10%) e traços de linolênico, os quais são muito susceptíveis a oxidação; e alto teor ácidos graxos monoinsaturados e de antioxidantes naturais: carotenoides, tocoferóis e tocotrienóis, o que faz com que ele resista por mais tempo a elevadas temperaturas (BAHARIN *et al.*, 2001; BERGER, 2005; EDEM, 2002). No entanto, Almeida (2009; 2013) e Edem (2002) ressaltam que a exemplo de outros óleos vegetais, a sua qualidade inicial é determinante para a boa condução do processo de fritura, e o azeite de dendê da Bahia tem apresentado acidez inicial média de 18% quando deveria, em condições normais, registrar 5% (BRASIL, 2011).

## 2.2 O acarajé

Em Salvador, encontram-se registrados aproximadamente dois mil pontos de venda de acarajés (Associação das Baianas de Acarajé e Mingau do estado da Bahia – ABAM), porém é estimado que, só na capital, existam cerca de cinco mil *baianas de acarajé*. Isto faz do comércio de acarajé a principal comida de rua de Salvador/BA, além de ser uma das marcas símbolo do turismo.

O acarajé é um alimento à base de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) originário da África Ocidental (DOVLO, WILLIAMS, & ZOAKA, 1976; GIAMI, 2005; REBER *et al.*, 1983). É um ícone cultural e turístico da metrópole baiana, vendido nas ruas por mulheres tipicamente vestidas chamadas *baianas de acarajé* (IPHAN, 2005). Na Bahia, o acarajé é feito a partir de diversas variedades de feijão-caupi: *fradinho*, *macassar*, *olho de pombo*, *costela de vaca*, *boca preta*, dentre outros (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2003; ROGÉRIO, 2010). No processo de fabricação dos bolinhos, os grãos do feijão são descorticados, partidos em um moedor manual ou processador de alimentos, macerados até formar uma pasta, a massa crua do acarajé. Depois de ser temperada com cebola ralada e sal, a pasta é batida até adquirir características de espuma, conferindo-lhe maciez, sendo moldada em bolas por uma colher de pau e frita em azeite de dendê bruto (IPHAN, 2005; MCWATTERS, HITCHCOCK, RESURRECCION, 1991; MISRA, FLETCHER, MCWATTERS, 1996; PATTERSON *et al.*, 2004; ROGÉRIO, 2010; SINGH *et al.*, 2004). Na Bahia, o acarajé é servido com camarão seco, vatapá, caruru e salada vinagrete (CURVELO, 2010; SILVA *et al.*, 2003).

O feijão caupi possui atributos nutricionais superiores ao das outras espécies de leguminosas, desempenhando um papel importante na agricultura e dieta de muitos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2003; AYKROYD, DOUGHTY, WALKER, 1982; DESHPANDE & DAMODARAN, 1990; EHLERS & HALL, 1997). É importante fonte de nutrientes da dieta, de custo relativamente baixo, acessível, fonte de proteínas, vitaminas e alguns minerais como o cálcio, ferro, zinco (BATISTA, PRUDÊNCIO, FERNANDES, 2010; CARVALHO *et al.*, 2012; LANGYINTUO *et al.*, 2003; LÓPEZ-AMORÓS, HERNÁNDEZ, ESTRELLA, 2006; SINGH *et al.*, 2004; SORAL-ŚMIETANA, KRUPA, MARKIEWICZ, 2002). Os grãos do feijão caupi podem variar consideravelmente de tamanho, forma e cor o que implica em diferenças na sua composição química e propriedades sensoriais (ENWERE, MCWATTERS, PHILLIPS, 1998; OLAPADE *et al.*, 2002; VILLAVICENCIO *et al.*, 2000).



No entanto, seu valor nutricional é geralmente reduzido pelo conteúdo de antinutrientes, tais como fitatos, fibras, inibidores de tripsina, lectinas, taninos e polifenóis (ALMEIDA *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 1997), além de contribuir para baixa biodisponibilidade de minerais (GIBSON, PERLAS, HOTZ, 2006; RAO & PRABHAVATHI 1982; SANDBERG, 2002).

As lectinas são glicoproteínas capazes de se ligar e aglutinar às células vermelhas do sangue. A sua toxicidade é caracterizada pela inibição de crescimento em animais e sintomas de diarreia, náuseas, vômitos e inchaço em humanos (LIENER, 1982). Os inibidores de tripsina têm natureza protéica e inibem a atividade proteolítica da tripsina protease digestiva, resultando em uma redução da disponibilidade de aminoácidos (LIENER & KAKADE, 1980). Além disso, os inibidores de protease tem sido associados com a inibição do crescimento e a hipertrofia do pâncreas em alguns animais experimentais (HATHCOCK, 1991). Compostos polifenólicos e fitatos têm sido associados a redução da biodisponibilidade de minerais e elementos traço, bem como a digestão e / ou utilização de proteínas digeridas e absorvidas (BUTLER, 1989; CHERYAN, 1980; KONIETZNY & GREINER, 2003; SALUNKHE *et al.*, 1990; SANDBERG, 2002). Em baixas concentrações, o ácido fítico e compostos fenólicos exibem efeitos benéficos para a saúde, especialmente em doenças cardiovasculares e câncer (KRIS *et al.*, 2002; SHAHIDI, 1997).

Muitas estratégias de processamento aplicadas às leguminosas podem afetar significativamente o desempenho nutricional desses alimentos. Pesquisadores tem investigado os efeitos do processamento do feijão caupi (AVANZA *et al.*, 2013; DOBLADO, FRÍAS, VIDAL-VALVERDE, 2007; RIVAS-VEGA *et al.*, 2006; SANGRONIS & MACHADO, 2007; SREERAMA *et al.*, 2012), mostrando variações nos valores nutricionais dos grãos secos, descascados, macerados, cozidos, germinados e extrudados. A germinação, fermentação, remolho e descascamento reduzem alguns fatores antinutricionais presentes nos feijões (OBIZOBA, 1998). Tratamento térmico de proteínas do caupi não tem apresentado atividade hemaglutinante e de inibidor de tripsina detectáveis (RANGEL *et al.*, 2004).

### 2.3 Fritura por imersão e toxicidade

A fritura por imersão é amplamente empregada por ser um processo rápido e econômico de preparação dos alimentos, sendo influenciado por diversos fatores: tipo de alimento e do óleo empregado, do equipamento utilizado, temperatura e tempo, das condições do processamento, quantidade de alimento frito entre outros (LIMA & GONÇALVES, 1995; ALMEIDA *et al.*, 2006). Entretanto, durante as frituras, o óleo é exposto à ação de cinco agentes: água do alimento, o temperatura/tempo de cocção, luz e o oxigênio do ar. Tais fatores provocam uma série de reações químicas (hidrolíticas, térmicas e oxidativas, respectivamente), que produzem compostos polares e alterações na cor do azeite (DOBARGANES, PÉREZ-CAMINO & MÁRQUEZ-RUIZ, 1988). As reações hidrolíticas liberam os mono e diacilgliceróis, ácidos graxos livres; as térmicas e oxidativas formam os triacilgliceróis dimerizados e polimerizados, enquanto as substâncias do grupo dos monômeros de triacilgliceróis oxidados são os compostos polares (polímeros, dímeros, ácidos graxos livres, epoxiácidos, diglicerídeos e ácidos graxos livres oxidados) que vão se acumulando no óleo depois de repetidas frituras (DOBARGANES *et al.*, 2000; GERTZ, 2000).

Vale ressaltar, ainda, o impacto da oxidação sobre a saúde do consumidor, uma vez que a mesma reduz não somente as características sensoriais do produto como também pode apresentar toxicidade. As gorduras que tenham sofrido processo de oxidação tendem a escurecer, aumentar a viscosidade, incrementar a formação de espumas e desenvolver sabor e aromas indesejáveis (MACHADO, DOBARGANES & ABRANTES, 2008; TRIGUEIRO & PENTEADO, 1993). Segundo Edem (2002) e Sundram (2003), as alterações de cor são resultado dos processos oxidativos, com destaque para oxidação dos carotenoides, antioxidantes que dão ao OPB sua coloração vermelho-alaranjada.

Trabalhos com óleos e gorduras aquecidas por longos períodos, sob temperaturas extremamente altas e/ou na presença de oxigênio, demonstraram que os produtos resultantes contêm quantidades elevadas de compostos polares (maiores que 50%) (MÁRQUEZ-RUIZ *et al.*, 1990). Quando estas amostras são administradas a animais observam-se severas irritações do trato gastrointestinal, diarreia, redução no crescimento em alguns casos morte (CELLA *et al.*, 2002). Edem (2002) observou que o OPB submetido a elevadas temperaturas formaram compostos tóxicos causadores de trombocitopenia, agregação plaquetária, elevação da taxa de metabolismo basal e dano tissular.

Outros fatores tais como ao emprego de fritura descontínua e a baixa reposição de óleo de fritura intensifica ainda mais os processos termoxidativos, favorecendo a produção de substâncias tóxicas à saúde humana (MACHADO, DOBARGANES, ABRANTES, 2008) – e esses procedimentos configuram hábitos das *baianas de acarajé*. Segundo Curvelo (2010), aliado a estes fatores, deve-se destacar que os OPB empregados em fritura de acarajés são comercializados, na sua maioria, em feiras livres, exposto a luz natural e armazenados em garrafas de plástico transparente que provavelmente intensificam sua degradação (CURVELO, 2010; TRIGUEIRO & PENTEADO, 1993).

Estudos *in vitro* para avaliação do potencial genotóxico de óleos de fritura utilizando o ensaio de Ames em *Salmonelas* demonstrou mutagenicidade para a fração polar dos óleos estudados (HAGEMAN *et al.*, 1988). Os monoepóxidos do ácido linoléico e seus metabólitos (dióis) estão relacionados à necrose tissular em pacientes com queimaduras severas (KOSAKA *et al.*, 1994) e ao mecanismo de lesão aguda do pulmão em humanos (TOTANI *et al.*, 2000). Também apresentou relevante citotoxicidade em sistema teste de túbulo renal de coelho (MORAN *et al.*, 2000) e em estudos com camundongos, sugeriu-se o 9,10-epoxi-12-octadecenoato de metila como mediador tóxico na síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) (ZHENG *et al.*, 2001). Em estudo *in vitro* em células Sf-21, células do inseto *Spodoptera frugiperda*, verificou-se que os ésteres metílicos de monoepóxidos de ácidos graxos de cadeia longa e seus metabólitos dióis foram potentes pró-toxinas (GREENE *et al.*, 2000). Também em células Sf-21 a citotoxicidade do cis-monoepóxido e do dihidróxido do ácido linoléico na ausência de albumina, e a citotoxicidade do dihidróxido deste ácido na presença de albumina foi demonstrada (MITCHELL, MORAN, GRANT, 2002).

Esses estudos na realidade geram muita especulação, pois os dados obtidos originam-se de uma grande variedade de compostos incomuns formados sob condições extremas de uso dos óleos e, em alguns casos, de completa destruição de nutrientes essenciais, tal como ácido linolênico (LIMA & GONÇALVES, 1995). Por outro lado, muitos estudos também tem avaliado o potencial mutagênico dos óleos vegetais utilizados na fritura por imersão (FONG *et al.*, 1980; SCHEUTWINKEL-REICH *et al.*, 1981; TAYLOR *et al.*, 1982; VAN GASTEL *et al.*, 1984), os efeitos em ratos causados pela ingestão repetida de OPB (ADAM, DAS, JAARIN, 2009; FARAG *et al.*, 2010; ISONG *et al.*, 1997), e eles tem demonstrado que a fração dos compostos polares isolada a partir de óleos oxidados é tóxica em animais de laboratório (PANTZARIS, 1998). Além disso, o teste Ames (*Salmonella/microsome assay*) é rápido, seguro e um teste preditivo para mutagenicidade em mamíferos (CLAXTON *et al.*,

1987; MARON & AMES, 1983; CARPES *et al.*, 2013), em que Hageman *et al.* (1988), usando este teste, detectou atividade mutagênica em materiais polares obtidos de gorduras de fritura por imersão.

O teste Ames é uma metodologia amplamente utilizada para detectar substâncias químicas mutagênicas (CLAXTON *et al.*, 1987; MARON & AMES, 1983; CARPES *et al.*, 2013), entretanto, bactérias possuem menor capacidade de reparação de danos no DNA comparado à habilidade dos mamíferos. Portanto, essa é a razão pela qual se utiliza também uma linhagem de macrófagos, devido à habilidade deles em fagocitar e promover respostas envolvendo estresse oxidativo. É neste sentido, que RAW 264.7 é uma das mais utilizadas, por fornecer resultados mais claros e serem extremamente sensíveis a endotoxinas lipopolissacarídicas (LPS) de bactérias gram-negativas como a *Salmonella* (CLAXTON *et al.*, 1987; MARON & AMES, 1983).

As mudanças ocorridas na qualidade dos óleos durante a fritura por imersão ainda são uma questão importante na perspectiva da saúde. No entanto, existem poucos estudos na literatura científica a respeito das conseqüências da ingestão de alimentos fritos por imersão em OPB. Além disso, tem-se observado que as *baianas de acarajé* geralmente comercializam diariamente acarajés por cinco horas, cinco dias por semana e reutilizam continuamente OPB reaquecido (CURVELO, 2010; ROGÉRIO, 2010) e, portanto, ele pode conter compostos tóxicos à saúde humana.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar a qualidade físico-química e toxicológica do azeite de dendê bruto empregado na fritura de acarajés, além de quantificar os fatores antinutricionais e minerais desta iguaria.

#### 3.2 Específicos

- Avaliar a qualidade do azeite de dendê bruto empregado na fritura dos acarajés por um período de 25 horas (0h, 5h, 10h, 15h, 20h, 25h), utilizando os seguintes parâmetros: índices de acidez (% ácido oléico), peróxido (meq/kg), refração (40 °C), tempo de indução (h), perfil de ácidos graxospor cromatografia gasosa (mg/100 g) e ressonância magnética nuclear (%), carotenoides totais (µg/g) e atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS, compostos polares (%), cor (CIElab) e temperatura do azeite (°C) durante o processo;
- Avaliar a atividade mutagênica e citotóxica do azeite de dendê bruto empregado na fritura de acarajés (0h e 25h), por meio do teste de Ames;
- Contrastar o nível oxidativo do óleo com a cor do mesmo e do produto;
- Determinar os teores de fatores antinutricionais nos acarajés e em suas massas: frações do ácido fitico (InsP<sub>3</sub>, InsP<sub>4</sub>, InsP<sub>5</sub>, InsP<sub>6</sub>; µmol/g), taninos condensados (mg eq. CE/g), polifenóis (mg/g), atividade de inibidor de tripsina (TIU/mg), atividade de hemaglutinina (HU/Kg);
- Determinar lipídeos totais (%), umidade (%), peso (g) e temperatura interna (°C) nas amostras de acarajés submetidas à 5h, 10h, 15h, 20h, 25h;
- Quantificar na massa e no acarajé os seguintes minerais: cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio (mg/100g); alumínio, arsênio, cádmio, cobalto, cobre, cromo, ferro, manganês, molibdênio, níquel, selênio, zinco (µg/g);
- Modelar as provas físico-químicas em função de variáveis preditoras relacionadas ao processo e ao produto.

## 4 CONSIDERAÇÕES TEÓRICO-METODOLÓGICA

Este foi um estudo de desenho experimental, realizado na Escola de Nutrição da Universidade Federal da Bahia (ENUFBA), cujo processo de fritura foi realizado em março de 2012, no qual foram reproduzidas o mais fielmente possível as condições em que são fritos os acarajés nas ruas de Salvador. Para tal, foi contratada uma *baiana de acarajé* que montou um tabuleiro típico dos pontos de venda de acarajés, utilizou seus próprios utensílios e técnicas empregados na fabricação e comercialização dessa iguaria.

### 4.1 Experimento de fritura e coleta das amostras

Para este estudo, empregou-se como critério de escolha do azeite de dendê bruto (ou óleo de palma bruto – OPB): ser industrializado e uma das marcas mais utilizadas na fritura de acarajés (CURVELO, 2010).

O preparo do acarajé foi realizado por uma *baiana de acarajé* de acordo com suas práticas tradicionais (CURVELO, 2010). 5 kg de **massa crua (CM - crude mass)** de **acarajé (AK - akara)** foram adquiridas diariamente (dia 1, 2, 3, 4, 5) pela *baiana*, de um mesmo vendedor, na Feira de São Joaquim, em Salvador (BA). As características da CM foram: massa previamente moída; da variedade olho de pombo; acondicionada em saco plástico transparente; e armazenada sob refrigeração em panela de alumínio até o momento do preparo dos acarajés pela *baiana*.

Foram adquiridos 30 L de OPB integral – uma mistura das fases líquida (oleína) e sólida (estearina) – na mesma feira, advindos da cidade de Nazaré (Bahia) e acondicionados em dois latões de flandres de 15 L de capacidade cada. Todo esse OPB foi adicionado em um recipiente de aço inoxidável e aquecido até 45 °C para sua completa homogeneização e para ser empregado na fritura. Primeiramente, foi retirada uma alíquota de 250 mL, filtrada em lã de vidro e distribuída em 4 frascos âmbar de 20 mL e 1 de 170 mL, sendo então, inertizados com nitrogênio e armazenados à temperatura de –20 °C, para minimizar posteriores alterações oxidativas indesejáveis, e descongeladas apenas no momento das análises (JORGE & GONÇALVES, 1998). Esta foi identificada como **0h** (amostra do tempo zero).

Enviou-se um frasco de 20 mL (identificado como **CPO** – *crude palm oil* ou OPB, relativo ao tempo zero – 0h) para a Dr.<sup>a</sup> Cláudia Aiub da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) - Instituto Biomédico/CCBS, Departamento de Genética e Biologia Molecular, Laboratório de Genotoxicidade, Rio de Janeiro/RJ, para análise toxicológica.

Outra alíquota (20 mL) (0h) foi encaminhada a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisangela F. Boffo, do Departamento de Química Orgânica, do Instituto de Química (IQ) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) para análise de ácidos graxos por ressonância magnética nuclear (RMN).

O processo de fritura ocorreu sempre a céu aberto. Adicionou-se a CM dentro de uma panela de alumínio, temperou-se com cebola ralada e sal. A seguir, bateu-se a massa com auxílio de uma colher de pau e, com este mesmo utensílio e uma outra colher de alumínio, moldou-se a massa em forma de bolinhos (60–110 g cada). Realizou o aquecimento de 5 L de OPB, em um tacho esmaltado, por 12 minutos na presença de uma cebola inteira (prática tradicional das *baianas de acarajé*, cuja intenção é prolongar a qualidade do óleo durante a fritura) – tempo médio usado pelas baianas, que é quando a cebola se abre. Em seguida, 5 desses bolinhos de CM foram sucessivamente adicionadas ao OPB e fritos por imersão, durante aproximadamente 6 minutos. Em alguns intervalos de tempo, o óleo permaneceu apenas com a cebola, enquanto a *baiana* batia novamente a massa. Depois disso, os bolinhos fritos (acarajé) foram retirados, aferiu-se a temperatura de imediato, com um termômetro tipo espeto (Incoterm), enquanto o OPB foi drenado em papel absorvente (prática das *baianas*) e, quando atingiram a temperatura ambiente (cerca de 40 minutos), foram aferidos os pesos – para aqueles da amostragem, temperatura e peso. Um total de 110 AK/dia foi obtido – simulando a quantidade média comercializada em um dia nos pontos de vendas de acarajé (ROGÉRIO, 2010).

Ao final de cada dia de fritura, foi coletada uma nova alíquota de 250 mL de OPB e procedida da mesma forma que a alíquota inicial, obtendo-se, então, as amostras: **5h, 10h, 15h, 20h, 25h**. Assim como também foi enviado um frasco de 20 mL dessa última (identificada como **FPO** – *frying palm oil*, relativo ao óleo do tempo final – 25h) para a Dr.<sup>a</sup> Cláudia Aiub da UERJ para análise toxicológica, e uma alíquota (20 mL) de cada (5h, 10h, 15h, 20h, 25h) para Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisangela F. Boffo do IQ-UFBA para análise por RMN.

Após o término de cada dia de fritura, esperou-se decantar os resíduos de alimentos no óleo e procedeu-se a filtragem do mesmo em peneira de alumínio, sendo então armazenado no próprio tacho com uma tampa, em temperatura ambiente, até a fritura do próximo dia.

O total de tempo de fritura por dia foi de 5 horas intermitentes, e o processo de fritura foi realizado em 5 dias consecutivos, da mesma forma descrita acima, totalizando 25 horas de experimento. A temperatura do OPB foi aferida com termômetro tipo espeto (Incoterm) aos 12 minutos iniciais e a cada hora completada de fritura. Observou-se uma variação deste item entre 143 a 188 °C no início (dia 1) e de 159 a 178 °C no final (dia 5). Ao passo que a cebola

foi reposta sempre que apresentava aspecto de queimada (de acordo com a prática da *baiana*), utilizando-se em média 3 cebolas/dia.

Todos os dias de fritura começaram com 5 L de OPB no tacho. No dia 1, apenas óleo novo foi empregado e, nos dias subsequentes, utilizou-se uma mistura do óleo restante do dia anterior (óleo usado) com óleo novo. Ocorreu a reposição diária de OPB (máximo 2 L/dia), sendo que nos dias 1 e 2 tal reposição foi apenas com OPB novo; nos dias subsequentes, este procedimento foi realizado com uma mistura aleatória de OPB novo com usado, de acordo com a prática da *baiana*.

Em cada dia, 10 CMs (quantidades relativas aos bolinhos moldados para fritura) foram aleatoriamente coletadas antes do processo de fritura. As amostras de acarajés (10 AK) foram coletadas dos últimos lotes produzidos/dia. Para obtenção das alíquotas para análises, lotes de 10 (CM e AK separadamente) foram reunidos e aplicada a técnica de quarteamento, até obtenção de 50 g de cada lote (ABNT, 2004), e identificadas de acordo com o tempo de fritura de cada dia: **CM 5h, AK 5h** (dia 1); **CM 10h, AK 10h** (dia 2); **CM 15h, AK 15h** (dia 3); **CM 20h, AK 20h** (dia 4); **CM 25h, AK 25h** (dia 5). Tais amostras foram armazenadas em sacos tipo Ziploc a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2 Preparo das amostras de massa crua e acarajé**

As amostras de AK e de suas respectivas CMs foram, então, armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  foram liofilizadas (Liofilizador LS 3000 D, Terroni Equipamentos Científicos Ltda., Brasil). Em seguida, elas foram trituradas em um processador de alimentos de aço inoxidável (Cuisinart moedor de café, modelo DCG-20), resultando em um pó homogêneo que foi armazenado em frascos âmbar, à temperatura ambiente ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para posterior análise. Cerca de 10 g de cada amostra foram enviadas ao Dr. Ralf Greneir, Senior Researcher do *Max Rubner-Institute, Federal Research Institute of Nutrition and Food*, Alemanha e à Dr.<sup>a</sup> Maria das Graças Korn do NQA-PRONEX — GPQA, do Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador, Bahia, Brasil, 40170-290, para quantificação dos fatores antinutricionais e minerais, respectivamente.



### 4.3 Análises do azeite de dendê

**4.3.1 Ácidos graxos livres (acidez), índice de peróxido e refração-** determinados em triplicata segundo a AOCS Ca 5a-40, AOCS, Cd 8b-90 (2003), em % de ácido oléico e mEq/Kg, respectivamente; índice de refração (40 °C) (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

**4.3.2 Compostos polares totais** - ou, em inglês, *total polar compounds* (TPC) (%) foi determinado por 3 métodos: 2 testes rápidos (equipamento *Fri-Check*®, sendo os resultados multiplicados por um fator de 1,25 (OSAWA *et al.*, 2005); e Testo 270); e 1 a metodologia oficial por cromatografia, método gravimétrico com mini-coluna e ligeiras modificações (DOBARGANES *et al.*, 2000). Cerca de 0,5 g do OPB foi dissolvido no solvente de eluição e introduzido em uma coluna cromatográfica de vidro cheia de uma pasta de sílica gel e este mesmo solvente. O solvente de eluição é uma mistura de éter de petróleo (40-60 °C) e éter dietílico 94:6 (v:v). A mini-coluna foi com um diâmetro interno de 1 mm e 15 mm de comprimento, contendo 5 g de sílica gel 60 (Merck), com 0,063-0,200 mm de tamanho de partícula e 70-230 *mesh*, ajustada a um teor de 5% de água. Os compostos não-polares foram eluídos com 60 mL do solvente de eluição e, a fração polar, em seguida, em 50 mL de éter dietílico. Um funil de separação foi utilizado, e a taxa de fluxo foi ajustado para cerca de 1,5 mL/min. O solvente foi removido por evaporação rotativa (Rotavapor R-II, BÜCHI Labortechnik) e o balão foi purgado com uma corrente de nitrogênio gasoso para garantir a secagem. A integralidade do fracionamento foi avaliada por análise de cromatografia em camada fina (TLC) com um sistema de eluição de éter de petróleo: éter etílico: ácido acético (70:40:1, v:v:v) em cuba cromatográfica e revelação em iodo.

**4.3.3 Composição em ácidos graxos** - os ácidos graxos dos óleos foram transformados em ésteres metílicos de ácidos graxos, seguindo, em linhas gerais, a metodologia Adolfo Lutz (2005). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram analisados em cromatógrafo gasoso (Clarus 600 GC, *Gas Chromatography*, Perkin Elmer), equipado com detector de ionização de chama (DIC), coluna capilar de sílica fundida ELITE-WAX (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm), com temperatura variando de 150 °C a 200 °C.

Os **parâmetros de análise** foram: temperatura do injetor 250 °C; temperatura do detector 250 °C; temperatura da coluna programada inicial 45 °C por 2 minutos; aumentando 20 °C por minuto até 165 °C e permanecendo nessa temperatura por 15 minutos; e aumentando 4 °C até 220 °C e permanecendo nessa temperatura por 35 minutos. Pressão da coluna: 195 kPa. O gás hélio (He) foi utilizado como gás de arraste a 1,0mL/minuto (pressão de 195 kPa). Fluxo do gás hidrogênio (H<sub>2</sub>) a 40 mL/minuto (pressão de 50 kPa); ar sintético a 400 mL/minuto (pressão de 50 kPa); sendo que a técnica de injeção foi *split* na razão 1:40. As injeções foram realizadas em duplicatas: cada amostra com duas extrações e com duas injeções cada uma (com total de quatro injeções/amostra). O volume de injeção (automática) foi de 1µL – adaptado do método 2.302 da IUPAC (IUPAC, 1992). Fluxo do gás carreador He: 1,0mL/min. A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com o tempo de retenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos de padrão mix (189-19, C4-C24, Sigma, EUA), corrigidos relativos ao padrão interno dos respectivos padrões de ésteres metílicos. As injeções foram realizadas com padrão interno tricosanoato de metila (23:0Me) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda), a 0,025 g/10 mL de n-hexano ultrapuro (Mallinckrodt Chemicals). **Procedimento:** pesou-se entre 30 e 100 mg do OPB em tubo de centrífuga de 30 mL com tampa; adicionou-se 2 mL de padrão interno C23:0 para solubilizar a amostra; adicionou-se 4 mL de solução 0,5M de NaOH; o tubo foi bem fechado e aquecido em banho de água com temperatura entre 65–70 °C até dissolver os glóbulos de gordura e a solução ficar transparente (3-5 minutos); o tubo foi resfriado sob água corrente; adicionou-se 5 mL da solução esterificante (10 g de NH<sub>4</sub>Cl + 300 mL de metanol seguido de 15 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), o tubo foi fechado e agitado por 30 segundos; procedeu-se ao aquecimento em banho de água com temperatura entre 65 e 70 °C por 5 minutos; o tubo foi novamente resfriado sob água corrente o mais rápido possível; adicionou-se 4 mL de solução saturada de NaCl; o tubo foi agitado vigorosamente por 30 segundos em agitador tipo vórtex; adicionou-se 2 mL de n-hexano; agitou-se vigorosamente por 30 segundos no vórtex; deixou-se separar as fases e a fase superior (sobrenadante) foi utilizada para a análise por CG; analisaram-se os ésteres metílicos no mesmo dia, o mais rápido possível, para evitar a perda dos mais voláteis.

Após a identificação dos picos por comparação com os tempos de retenção corrigidos dos padrões de ésteres metílicos com os componentes separados das amostras, determinou-se a concentração de cada ácido graxo utilizando a equação:  $CAG \text{ (g/100g da amostra)} = MPI \times Ax \times FC / MA \times API \times FCEA$ .

Onde: MPI = massa do padrão interno em gramas adicionadas na amostra; Ax = área do ácido graxo no cromatograma da amostra; FC = fator de correção teórico do DIC do ácido graxo com relação ao padrão interno; CAG = concentração de ácido graxo na amostra em mg/g de óleo ou gordura; MA = massa da amostra; API = área do padrão interno no cromatograma da amostra; FCEA = fator de conversão de éster metílico para ácido graxo. Obs.: Os valores de FCEA foram consultados no método 996.06 da AOAC (AOAC, 2005).

#### 4.3.4 Ressonância magnética nuclear (RMN)

**4.3.4.1 Espectroscopia de RMN** - é uma técnica muito empregada na análise de alimentos, apresenta a vantagem de mostrar em um único espectro todas as possíveis classes de substâncias presentes e em quantidades detectáveis. Nessa pesquisa, quantificou-se o percentual de ácidos graxos nas amostras de OPB (GIL *et al.*, 2003; LOLLI *et al.*, 2008).

**4.3.4.2 Aquisição dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$**  - os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram adquiridos no equipamento Varian Inova 500 de 11,7 Tesla (500 MHz para a frequência do hidrogênio), equipado com sonda direta de 5 mm, a temperatura de 298 K. As amostras foram preparadas em triplicata, diluindo-se 30 mg de OPB em 600  $\mu\text{L}$  de  $\text{CDCl}_3$ . Em seguida, os espectros foram processados aplicando-se uma transformada de *Fourier* utilizando-se 32768 pontos e uma multiplicação exponencial, com fator de alargamento de linha (*Line Broadening* ou LB), de 0,3 Hz. A fase foi ajustada manualmente e foi feita a correção automática da linha de base.

#### 4.3.5 Atividade mutagênica

##### 4.3.5.1 Teste Ames

**Quadro 1.** Dados do sistema teste: linhagens de *Salmonella typhimurium* que foram utilizadas.

Cepas	Mutação <i>his</i> <sup>1</sup>	Tipo de mutação/alvo de mutação	<i>bio</i> / <i>uvrB</i>	Plasmídio
TA97	<i>hisD6610</i>	Deslocamento do quadro de leitura / GC	<i>bio</i> <sup>-</sup> / $\Delta$ <i>uvrB</i>	pKM101 (Ap <sup>r</sup> )
TA98	<i>hisD3052</i>	Deslocamento do quadro de leitura / GC	<i>bio</i> <sup>-</sup> / $\Delta$ <i>uvrB</i>	pKM101 (Ap <sup>r</sup> )
TA100	<i>hisG46</i>	Substituição de pares de bases / GC:TA	<i>bio</i> <sup>-</sup> / $\Delta$ <i>uvrB</i>	pKM101 (Ap <sup>r</sup> )
TA102	<i>hisG428</i>	Substituição de pares de bases / AT:GC	+	pKM101 (Ap <sup>r</sup> ) pAQ1 (Tt <sup>r</sup> )

<sup>1</sup>mutação responsável pela síntese de histidina; Todas possuem mutação *rfa*: permeabilidade da membrana de lipossacarídeos; Ap<sup>r</sup> ampicilina resistente; Tt<sup>r</sup> tetraciclina resistente.

As linhagens auxotróficas para histidina são derivadas da linhagem parental LT2 de *Salmonella typhimurium* apresentando diferentes mutações no operon da histidina. A mutação *rfa* causa perda parcial da barreira de lipossacarídeos que envolve a superfície da bacteriana e aumenta a permeabilidade da parede celular a moléculas maiores. A mutação *uvrB* é causada pela deleção de um dos genes responsáveis pelo reparo de excisão, levando a uma maior sensibilidade a agentes mutagênicos. A deleção do gene *uvrB* se estendeu até o gene *bio* e as cepas se tornaram auxotróficas para biotina. A cepa TA102 não possui a mutação *uvrB* pois foi construída para detectar agentes mutagênicos aos quais o sistema de reparo por excisão é necessário. As linhagens TA97, TA98, TA100 e TA102 apresentam o plasmídeo fator R, PKM101, que aumenta a mutagênese química e espontânea por aprimorar o sistema de reparo do DNA presente na cepa. A cepa TA102 também possui o plasmídeo em multicópia pAQ1 que apresenta a mutação *hisG428* e o gene de resistência à tetraciclina.

**4.3.5.2 Características genéticas** - os genótipos das cepas foram verificados com o objetivo de assegurar as características descritas acima que são originais das bactérias. Através do crescimento em meios seletivos, analisou-se a sensibilidade à radiação UV e ao cristal violeta, resistência à ampicilina e à tetraciclina. Os números de colônias revertentes espontâneos por placa para cada cepa foram dentro da faixa aceitável descrita na literatura por Maron & Ames (1983) e também estavam de acordo com o histórico do laboratório. Os genótipos das linhagens foram confirmados antes dos ensaios por meio dos seguintes testes (MARON & AMES, 1983):

- Auxotrofia para histidina (*his<sup>-</sup>*): foi confirmado pela ausência de crescimento em placas contendo ágar mínimo sem histidina. Uma alíquota de 100 µL das culturas de célula pernoite e 500 µL de tampão fosfato de sódio pH 7,4 com 2 mL de top ágar são semeados em placas de meio mínimo contendo apenas biotina (placas-teste) ou histidina (0,1 M) e biotina (0,5 mM) (placa controle). Após incubação a 37 °C por uma noite, observou-se ausência de crescimento nas placas-teste;

- Mutação *rfa*: uma alíquota de 100 µL das culturas de célula pernoite em gelose a 45 °C foi semeado em placas de meio nutriente. Um pequeno disco de papel filtro estéril foi colocado no centro da placa e adicionado 10 µL de solução de cristal violeta. Após 12 horas de incubação a 37 °C, observou-se um halo de inibição do crescimento ao redor do disco;

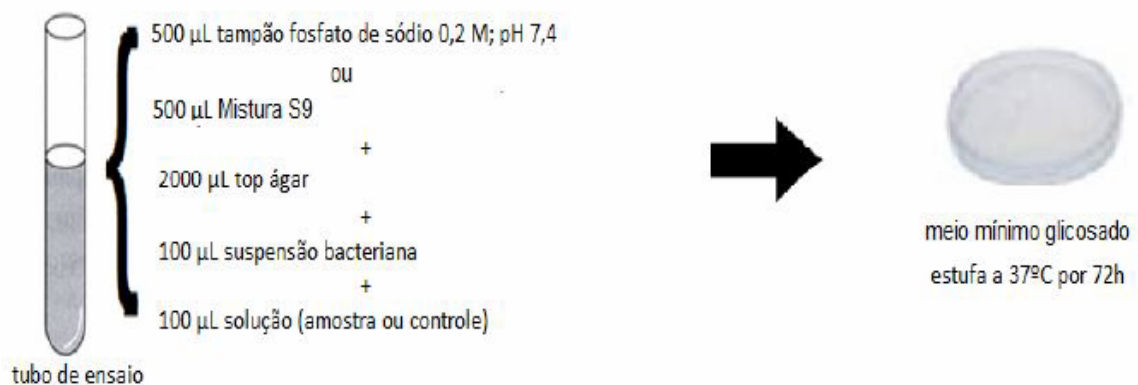
- Mutação *uvrB*: estrias paralelas das culturas de célula pernoite são realizadas em placas de meio nutriente. Metades das placas são recobertas e as outras metades são irradiadas com luz UV em lâmpada germicida de 15 W a distância de 33 cm, por 8 segundos. Após incubação de 24 horas a 37 °C, observaram-se crescimento de células bacterianas na metade das placas não irradiadas para as linhagens sensíveis ou em ambos os lados, para a cepa proficiente na reparação por excisão (TA102);

- Presença do plasmídeo pKM101: estrias das culturas de célula pernoite são realizadas em placas de meio nutriente contendo ampicilina (20 µg/mL). Após incubação a 37 °C, observou-se o crescimento das linhagens portadoras do plasmídeo de resistência;

- Presença do plasmídeo pAQ1: estrias da cultura de célula pernoite (TA102) são realizadas em placas de meio nutriente contendo ampicilina (20 µg/mL) e tetraciclina (20 µg/mL). Após incubação a 37 °C, observou-se o crescimento na linhagem portadora do plasmídeo de resistência.

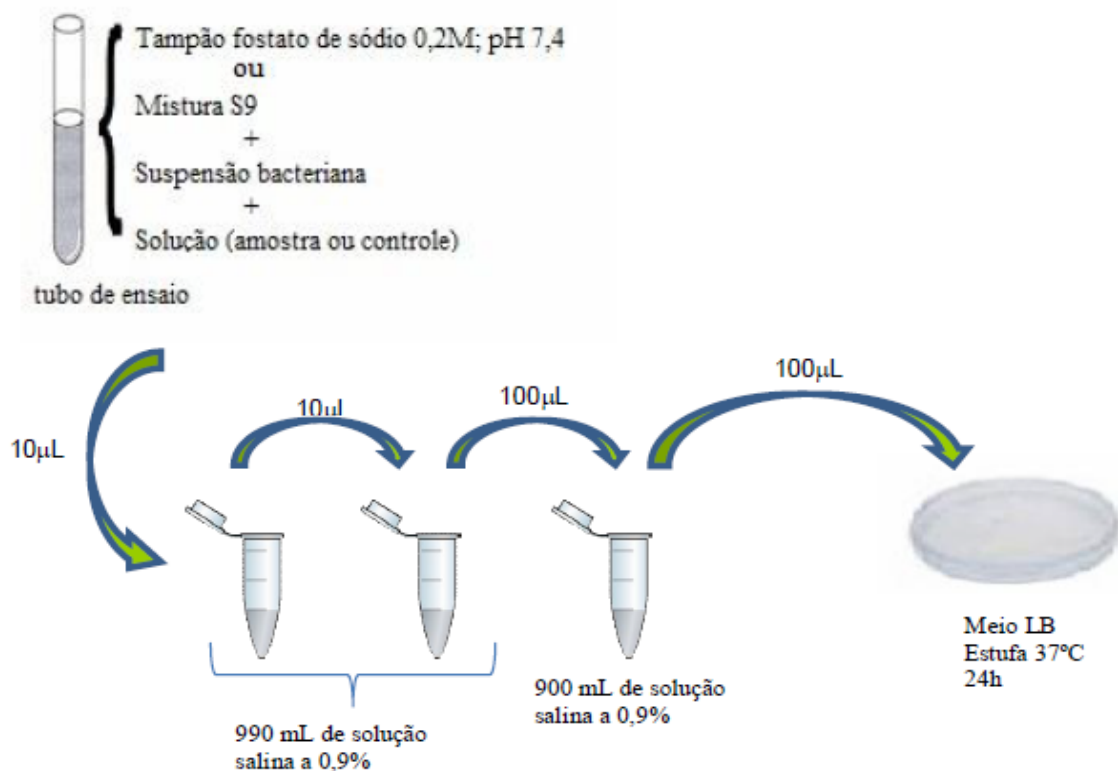
- Metabolização exógena (S9 MIX): existe a necessidade de que os testes sejam realizados na presença e ausência de um sistema de ativação metabólica *in vitro*, visto que algumas substâncias precisam ser metabolizadas para que seus derivados apresentem atividade mutagênica. O mais comumente utilizado é a fração microsomal (S9). A fração S9 é composta por um homogenato de células de fígado de ratos *Sprague-Dawley*, pré-tratados com a mistura bifenil policlorinada (Aroclor 1254), que induz um aumento de enzimas (P450) que são envolvidas na biotransformação de vários compostos neste órgão. A fração S9 acrescida de co-fatores conforme descritos a seguir: a preparação da solução de S9 mix (4%) foi realizada de acordo com Mortelmans e Zeiger (2000) em condições de esterilidade e em banho de gelo: 19,75 mL de água destilada; 25,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,4; 2,0 mL de solução NADP 0,1M; 0,25 mL de glicose-6-fosfato 1M, 1 mL de sais MgCl<sub>2</sub>-KCl e 2,1 mL de água destilada reconstituída com fração S9 liofilizada.

**4.3.5.3 Teste de mutagenicidade** - a avaliação mutagênica do OPB antes (amostra CPO) e após (amostra FPO) a fritura foi realizada pelo método de pré-incubação do ensaio *Salmonella*/microsoma como descrito por Maron e Ames (1983) e em triplicata, com pequenas modificações (MORTELMANS & ZEIGER, 2000; STANKEVICINS *et al.*, 2008). Aliquotas de 100  $\mu\text{L}$  de cultura bacteriana ( $2 \times 10^8$  células/mL) em fase estacionária de cepas *S. typhimurium* TA97, TA98, TA100 e TA102 e 500  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 7,4) foram incubados por 30 minutos a 150 rpm a 37 °C com 100  $\mu\text{L}$  das amostras diluídas em diferentes concentrações. O óleo de palma foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) nas seguintes proporções: 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128. Ágar de superfície (2 mL) a 45 °C foi adicionada e a mistura foi vertida em placa de meio mínimo. As placas foram incubadas a 37 °C por 72h e então o número de colônias revertentes *His*<sup>+</sup> foram contadas. Os controles positivos por placa foram: 0,5  $\mu\text{g}$  de 4-nitroquinolina-1-óxido para TA97 e TA98, 1,0  $\mu\text{g}$  de Azida Sódica e 0,5  $\mu\text{g}$  de Mitomicina C para TA102. O critério utilizado para que a mutagenicidade fosse considerada positiva foi o índice de mutagenicidade ser igual ou superior a dois ( $\text{IM} \geq 2$ ) (MORTELMANS & ZEIGER, 2000) e para confirmação do resultado positivo, a análise de variância apresentar valores de pANOVA < 5% e as concentrações testadas apresentarem uma clara relação concentração-resposta. A figura abaixo esquematiza o ensaio de mutagenicidade:



**Figura 1.** Esquema demonstrando o ensaio de mutagenicidade.

**4.3.5.4 Teste de sobrevivência** - para a determinação de efeito citotóxico do OPB, amostras da suspensão do protocolo de pré-incubação do teste de mutação gênica reversa foram diluídas em 0,9% de NaCl (m/v) para obter-se uma suspensão contendo  $2 \times 10^2$  células/mL. Uma alíquota de 100  $\mu$ L da suspensão foi incorporada a uma placa contendo meio ágar nutriente. As placas foram então incubadas a 37 °C por 24 horas e as colônias foram contadas (AIUB, RIBEIRO PINTO, FELZENSZWALB, 2003). Todos os experimentos foram feitos em triplicata. Os resultados referentes foram expressos em porcentagem em relação ao controle negativo e, para que esses resultados observados em cada concentração testada fossem considerados positivos, a porcentagem de sobrevivência das células expostas ao óleo deve corresponder a menos de 70% (AIUB, RIBEIRO PINTO, FELZENSZWALB, 2003). Abaixo, a figura demonstra o ensaio de sobrevivência:

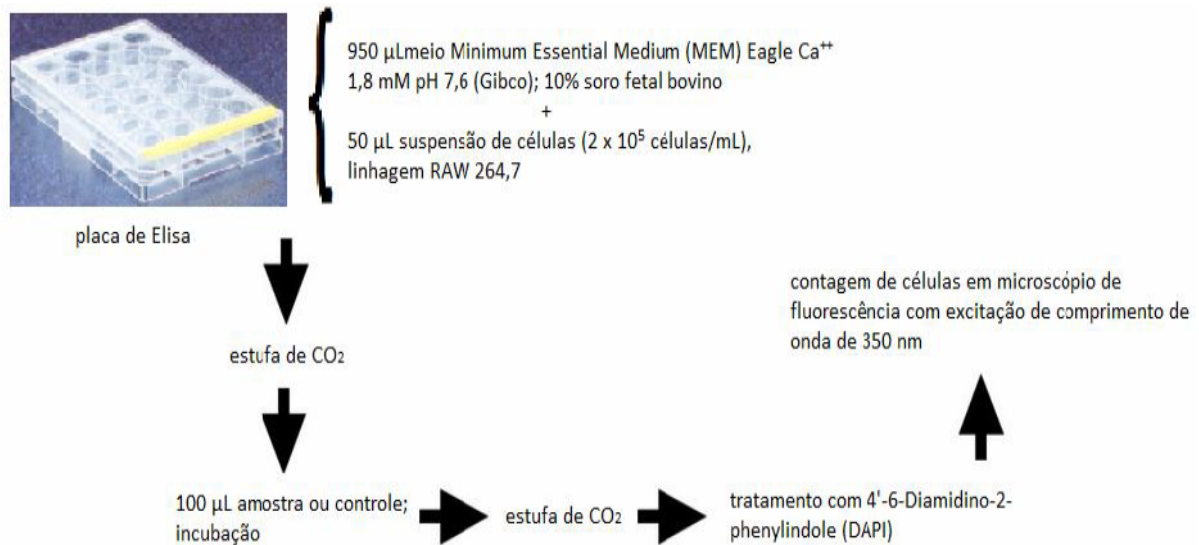


**Figura 2.** Esquema demonstrando o ensaio de sobrevivência.

**4.3.5.5 Cultura de células RAW 264.7** - A linhagem de macrófagos de camundongo RAW 264.7 foi utilizada a partir de uma cultura em boa confluência e mantidas em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, à temperatura de 37 °C. A disjunção celular foi realizada mecanicamente com um *scrap*, em seguida, a suspensão foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos e as células foram ressuspensas em meio *Minimum Essential Medium* (MEM) *Eagle* Ca<sup>++</sup> 1,8 mM (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1,76 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 0,88 g/L de piruvato, 21,6 mg/L de ácido aspártico e 16,8 mg/L de L-serina. A viabilidade celular foi determinada após coloração com azul de tripan e as células foram adicionadas a placas de microtitulação de 24 poços na densidade de 2 x 10<sup>5</sup> células/poço e mantidas em cultura por 24 horas.

**4.3.5.6 Ensaio do micronúcleo** - O ensaio foi realizado conforme descrito anteriormente (AIUB *et al.*, 2011), com modificações. As células foram tratadas com 100 µL das diluições das amostras em DMSO, equivalente a 10% do volume total e as placas foram incubadas por 24h. Após esse período, o meio foi retirado e a placa foi rinsada com 1 mL de meio MEM *Eagle* Ca<sup>++</sup> 1,8mM. Adicionou-se 1 mL de meio MEM *Eagle* Ca<sup>++</sup> 1,8 mM com soro e incubou-se por 24h em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O ensaio utilizou como controle positivo Nmetil-N-nitro-N-nitrosoguanosina (MNNG) na concentração de 0,5 µM. O meio MEM *Eagle* Ca<sup>++</sup> 1,8 mM foi substituído pela solução gelada de *Carnoy* (fixador metanol 3:1 ácido acético glacial) por 15 minutos. As células fixadas foram rinsadas com tampão *McIlvaine* (MI) (21,01 g/L de ácido cítrico e 35,60 g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,5) por 2 minutos e postos para secar a temperatura ambiente. As células fixadas foram coradas com 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (0,2 µg/mL), dissolvido em tampão MI, por 40 minutos. Após isso, foram lavadas com tampão MI por 2 minutos, brevemente lavadas com água destilada e postas para secar novamente, a temperatura ambiente. Para determinar-se o índice mitótico e o número de células com micronúcleos, assim como as percentagens de necrose e apoptose, as células por concentração foram analisadas em microscópio de fluorescência (*Reichert Univar*) com excitação de comprimento de onda de 350 nm. O experimento foi realizado em quintuplicata. Os resultados obtidos no ensaio de micronúcleo foram expostos em valores percentuais após a análise de 1000 células em cada réplica das cinco concentrações, além dos controles positivos e negativos. Para ser considerado positivo, o resultado observado no ensaio deve apresentar a aumento estatisticamente significativo na frequência de micronúcleos em relação ao controle negativo. Abaixo, a figura demonstra o esquema do ensaio de micronúcleo com macrófagos.





**Figura 3.** Esquema demonstrando o ensaio de micronúcleo com macrófagos.

**4.3.5.7 Expressão dos resultados** - os resultados do teste de Ames foram expressos em números de colônias revertentes por placa e pelo índice de mutagenicidade (IM), que corresponde à razão entre o número de colônias revertentes nas placas-teste e o número de colônias revertentes nas placas do controle negativo. O número de colônias revertentes espontâneos de cada cepa foi comparado ao histórico do nosso laboratório e à faixa normal aceitável descrita na literatura (MARON & AMES, 1983). Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle negativo.

**4.3.6 Estudo da estabilidade com Rancimat** – o equipamento Metrohm Rancimat modelo 743 (Metrohm CH-9101, Herisau, Suíça) foi utilizado neste estudo. Foram pesados 3g de OPB diretamente nos frascos de reação e submetido a 120 °C e um fluxo de ar de 20 L/h. Em cada tempo, duplicatas destas amostras foram acomodadas no equipamento e analisadas simultaneamente, sendo a capacidade do mesmo de oito frascos / análises por rodada de leitura. A resistência à oxidação foi expressa em termos de horas (h).

**4.3.7 Cor dos óleos** – foi realizada em triplicata, empregando-se um colorímetro Chroma CR-400 (Konica Minolta Sensing Inc., Japão), com o iluminante D<sub>65</sub>, o ângulo de observação de 2 ° e expresso em termos de luminosidade (L\*), características de vermelho-verde (a\*), características azul-amarelo (b\*), ângulo de tonalidade (h<sub>ab</sub>) e croma (C\*) com o ângulo de matiz e croma calculado da seguinte forma:  $h_{ab} = \tan^{-1} (b^*/a^*)$  e  $C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$ . OPB foi aquecido em banho-maria à 45 °C, depositado em uma cubeta de 2 mm de espessura e fixada para leitura, à 22-24 °C (ANDREU-SEVILLA *et al.*, 2008).

#### 4.3.8 Carotenoides totais

As amostras de OPB foram dissolvidas em éter de petróleo e os carotenoides totais quantificados em espectrofotômetro UV-Vis (Perkin Elmer, Lambda 25) a 450nm e coeficiente de absorção ( $A^{1\%}_{1\text{cm}}$ ) de 2592 (RODRIGUEZ-AMAYA & KIMURA, 2004).

#### 4.3.9 Análise dos carotenoides por CLAE

Primeiro foi realizada a extração dos carotenóides das amostras de OPB, conforme Zeb & Murkovic (2011), com etapa prévia de remoção da gordura por congelamento à -20 °C por 24 horas. Os extratos em acetona foram filtrados e os carotenoides transferidos para éter de petróleo/éter etílico (1:1), secos com N<sub>2</sub> e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Em seguida as análises foram realizadas em cromatógrafo líquido (Waters, 2695) com detector de arranjo de diodos (DAD) (Waters, 2998), sendo as separações dos carotenoides realizadas em coluna de fase reversa C<sub>30</sub>marca YMC (Waters) com eluição por gradiente. O método para a quantificação de  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno foi validado quanto à linearidade, Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ) e precisão (intra e inter-dias) segundo Ribani *et al.* (2004).

#### 4.3.10 Ensaio da atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS

A atividade antioxidante das amostras de óleo foi determinada pelos métodos DPPH (KALANTZAKIS *et al.*, 2006) e ABTS (RE *et al.*, 1999) em espectrofotômetro UV-Vis (Perkin Elmer, Lambda 25) com leitura das absorbâncias realizada após 30 minutos de reação a 515nm e 6 minutos de reação a 734nm, respectivamente, sendo os resultados expressos como % de inibição.

### 4.4 Análises no acarajé e em sua massa crua

#### 4.4.1 Fatores antinutricionais dos acarajés e de sua massa crua

**4.4.1.1 Fosfato mio-inositol** - foi realizada por cromatografia de par iônico em HPLC (*High-performance liquid chromatography*; cromatografia líquida de alta eficiência), utilizando uma Ultrasep ES 100 RP-18 (2 x 250 mm), conforme descrito por Greiner & Konietzny (1998). Uma mistura de ésteres de fosfato de mio-inositol (InsP<sub>3</sub>-InsP<sub>6</sub>) foi utilizado como padrão para quantificação de: mio-inositol 3-fosfato (InsP<sub>3</sub>), mio-inositol 4-fosfato (InsP<sub>4</sub>), mio-inositol 5-fosfato (InsP<sub>5</sub>), mio-inositol 6-fosfato (InsP<sub>6</sub>) ( $\mu\text{mol/g}$ ).

**4.4.1.2 Taninos condensados** - foram extraídos com HCl:metanol (1:100 v/v) durante 2 h, com agitação mecânica à temperatura ambiente e centrifugada a 5000 x g a 15 °C durante 15 min. As alíquotas foram imediatamente analisadas para taninos (mg eq. CE/g), utilizando *vanillin assay* 0,5% (BROADHURST & JONES, 1978).

**4.4.1.3 Polifenóis** - fenóis totais foram extraídos com água. Uma curva interna padrão foi preparada por adição de 10 mL de 0-0,01% de ácido tânico. O conteúdo foi aquecido durante 30 min. a 70 °C com agitação constante. Os sobrenadantes límpidos foram recolhidos após centrifugação a 2500 xg durante 15 min. seguido de filtração. Os polifenóis (mg/g) foram determinadas usando o reagente de *Folin-Denis* (KING & HEALTH, 1967).

**4.4.1.4 Atividade de inibidor de tripsina** (TIU/mg) - foi determinada como descrito por Kakade *et al.* (1974), utilizando cloridrato de *alpha-N-benzoyl-d/larginine-p-nitroanilide* como substrato para tripsina. Uma unidade de tripsina foi definida como o aumento de 0,01 por unidade de absorbância a 410 nm.

**4.4.1.5 Atividade de hemaglutinina** (HU/Kg) - os ensaios de hemaglutinação, utilizando eritrócitos de coelho tratados com tripsina, foram realizadas por meio de um método de diluição em série, tal como descrito por Grant *et al.* (1983). Uma unidade de atividade hemaglutinante (HU) foi definida como aquela contida na quantidade de amostra na última diluição que causou 50% de aglutinação dos glóbulos.

**4.4.2 Cor dos acarajés** - foi realizada empregando-se um colorímetro Chroma CR-400 (Konica Minolta Sensing Inc., Japão), com o iluminante D<sub>65</sub>, o ângulo de observação de 2 ° e expresso em termos de luminosidade (L\*), características de vermelho-verde (a\*), características azul-amarelo (b\*), ângulo de tonalidade (h<sub>ab</sub>) e croma (C\*) com o ângulo de matiz e croma calculado da seguinte forma:  $h_{ab} = \tan^{-1} (b^*/a^*)$  e  $C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$ . A leitura nos carajés foram seis sobre sua superfície, sendo três em postos diferentes de cada face, à 22-24 °C (ANDREU-SEVILLA *et al.*, 2008).

**4.4.3 Lipídeos totais dos acarajés** - das amostras liofilizadas foram extraídos os lipídeos totais por meio do Soxhlet (Tecnal, TE 044-8/50), utilizando éter de petróleo (30-70 °C) como solvente extrator. 3,0 g de amostra foram pesadas e colocadas no Soxhlet a 65 °C por 3 horas. Então, os frascos com os lipídeos extraídos foram levados a uma estufa a 105 °C por 1,5 horas (AOAC, 1990). Depois, colocados em um dessecador para resfriar, por gravimetria, foi encontrado o peso desses lipídeos, calculando-se a porcentagem para cada.

**4.4.4 Teor de umidade dos acarajés** - teor de umidade (%) foi realizado por perda por secagem conforme Pregnotatto & Pregnotatto (IAL, 1985).

**4.4.5 Determinação dos minerais dos acarajés e massas cruas** – cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), potássio (K), sódio (Na) (mg/100g); alumínio (Al), arsênio (As), cádmio (Cd), cobalto (Co), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), molibdênio (Mo), níquel (Ni), selênio (Se), zinco (Zn) ( $\mu\text{g/g}$ ).

**4.4.5.1 Reagentes e soluções** - ácido nítrico de 65% w/w e peróxido de hidrogênio (30% w/w, da Merck, Darmstadt, Alemanha) foram utilizados. Todas as soluções foram preparadas utilizando reagentes de grau analítico e água deionizada (água Milli-Q, 18,2 M $\Omega$  cm; Millipore, Bedford, MA, EUA). Todas as vidrarias e frascos de polipropileno foram lavados com sabão de neutro, embebidos em 10% v/v de ácido nítrico (Merck) e ambientado com água deionizada antes do uso. Foram utilizadas diariamente soluções analíticas de alta pureza de 1000 mg/L (Titrisol<sup>®</sup>, Merck) de cada elemento usado para o preparo das soluções analíticas multielementares de referência. Determinação de elementos traço por ICP OES foi realizada com calibração externa.

**4.4.5.2 Procedimento de digestão das amostras** - aproximadamente 500 mg de cada uma das amostras foi digerida por meio de um procedimento assistido por micro-ondas. Ácido concentrado, HNO<sub>3</sub> a 65% (w/w) (7,0 mL) e 1,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% (v/v) em recipientes de TFM fechados foram utilizados para a digestão. O programa de aquecimento foi realizado em quatro fases sucessivas. Na primeira, a temperatura foi linearmente aumentada até 90 °C em 4 minutos, com uma potência máxima de 500 W; e na segunda, a temperatura foi mantida a 90 °C durante 3 minutos com uma potência máxima de 500 W; na terceira etapa a temperatura foi aumentada linearmente até 180 °C em 10 minutos, enquanto que, no quarto passo, a temperatura foi mantida a 180 °C durante 15 minutos e ambas com uma potência máxima de 1000 W. Triplicatas foram feitas de cada amostra em todas as análises e um branco foi preparado em conjunto com cada lote de amostras. Todos eles foram diluídos para 15 mL e os analitos na solução final foram determinados por ICP OES e ICP-MS (SANTOS *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2013).

**4.4.5.3 Instrumentação e análises por ICP OES e ICP-MS** - uma balança analítica (Sartorius Ag Gottiengen, Alemanha) foi usada para pesagem das amostras e um forno de micro-ondas (modelo Ethos EZ; Milestone, Sorisole, Itália) equipado com vasos Teflon TFM de 120 mL foi utilizado para a digestão. Para a determinação dos elementos Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Pe Zn foi empregado um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) com configuração de visão axial (VISTAPRO, Varian, Mulgrave, Austrália) equipado com detector de estado sólido com arranjo CCD (dispositivo de carga acoplada), câmara de nebulização ciclônica e nebulizador concêntrico. Comparada a outras fontes de excitação atômica, ICP OES exibe como vantagens a possibilidade de determinação multielementar e simultânea, com alta frequência analítica e sua seletividade em espectrometria analítica a torna uma técnica aplicável à análise elementar em diferentes matrizes.

Condições dos parâmetros instrumentais utilizados foram (**Tabela 1**): gerador de RF (40 MHz), a potência (1,2 kW), o fluxo do plasma (15 L/min), fluxo do gás auxiliar (1,5 L/min), o fluxo de nebulizador (0,7 L/min). O nebulizador *V-groove* e a câmara *Sturman-Masters* foram usadas para apresentar as soluções do sistema no espectrômetro, enquanto Ca, 396,847 nm; Cu, II, 324,754 nm; Fe, II, 238,204 nm; K, 766,491 nm; Mg II, 280,270 nm; Mn II, 257,610 nm; Mo II, 202,032 nm; Na, 568,821 nm; P, 213,618 nm; e Zn, 213,857 nm foram utilizados como linha de emissão atômica (I) e linha de emissão de iônica (II). As linhas espectrais foram selecionadas considerando-se as intensidades dos sinais de emissão dos analitos e do sinal de fundo, o desvio padrão das medidas, a sensibilidade adequada para a determinação dos elementos presentes em altas e baixas concentrações nas matrizes, bem como o perfil dos espectros e a possibilidade de interferências. Antes do início da leitura das amostras, alguns ajustes foram aplicados no equipamento ICP OES, a fim de obter um bom desempenho: alinhamento horizontal e vertical da tocha com uma solução de manganês 5,0 mg/L e o sistema óptico do ICP OES foi calibrado com solução de referência multielementar (SANTOS *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2013). Além disso, não houve diferenças significantes a 95% de nível de confiança, sugerindo que não houve efeitos detectáveis na matriz para determinação dos elementos Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P e Zn.

**Tabela 1.** Características do equipamento ICP OES empregado para determinação dos elementos nas amostras de acarajé e massa crua.

PARÂMETROS	CARACTERÍSTICAS	ICP OES Varian Vista PRO
	Policromador	Grade de difração <i>Echelle</i> e prisma de dispersão de CaF <sub>2</sub>
<b>Sistema óptico</b>	Densidade da grade de difração (linhas m/m)	95
	Faixa de comprimento de onda (nm)	167 – 785
	Distância focal (nm)	400
	Fenda de entrada (mm)	Altura = 0,029; Largura = 0,051
	Câmara de nebulização Nebulizador	<i>Struman-Masters</i> <i>V-Groove</i>
<b>Sistema de introdução de amostras</b>	Potência de medida (W)	1200
	Tempo de integração do sinal (s)	2,0
	Vazão do gás auxiliar (L/min)	1,5
	Vazão do gás do plasma (L/min)	15
	Vazão do gás de nebulização (L/min)	0,80
<b>Operacionais</b>	Vazão de bombeamento da amostra (L/min)	0,70
	Vazão do gás de nebulização (L/min)	0,70
	Tempo de estabilização (s)	15
	Tempo total da medida (min)	1

Espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (Thermo Scientific, 2008) foi utilizado para a determinação de Al, As, Cd, Co, Cr, Ni e Se (os elementos que não forem passíveis de quantificação pelo ICP OES, seja pelo muito baixo teor ou não exatidão nas suas linhas de emissão mais adequadas à leitura). O equipamento foi operado nos modos padrão usando argônio com uma pureza de 99,98% e modo CCT (*Collision Cell Technology*, célula de colisão que utiliza 8,0% (v/v) H<sub>2</sub> em He como gás da colisão, conforme orientação do fabricante), para separação dos íons dos interferentes utilizando Discriminação por Energia Cinética – KED (*Kinetics Energy Discrimination*), com comutação automática. As condições utilizadas foram (**Tabela 2**): potência (1,35 kW), fluxo de plasma de argônio (13,0 L/min), fluxo auxiliar de argônio (0,7 L/min), fluxo do nebulizador de argônio (0,87 L/min), *sweeps* (100), *dwell time*(10 ms) e fluxo de gás CCT (6,5 mL/min). Isótopos medidos: <sup>27</sup>Al, <sup>75</sup>As, <sup>111</sup>Cd, <sup>59</sup>Co, <sup>53</sup>Cr, <sup>60</sup>Ni e <sup>82</sup>Se; <sup>72</sup>Ge (padrão interno); *peak jump* foi o modo de análise, e três repetições por amostra, sendo cinco para o branco (SANTOS, 2008).

**Tabela 2.** Parâmetros operacionais do ICP-MS para determinação dos elementos nas amostras de acarajé e massa crua.

CARACTERÍSTICA	CONDIÇÃO
Potência incidente (W)	1350
Vazão argônio nebulizador (L/min)	0,87
Vazão argônio plasma (L/min)	13,00
Vazão argônio auxiliar (L/min)	0,70
Modo de análise	<i>Peak Jump</i>
<i>Sweeps</i>	100
<i>Dwell time</i> (ms)	10
Vazão de gás CCT (mL/min)	6,50

#### 4.5 Análises estatísticas

A análise dos dados foi realizada utilizando o software SPSS versão 13.0 (*Statistical Product and Service Solutions*) e Statistica 6.0 (Statistica para Windows, 2006). As amostras foram analisadas em triplicatas e duplicatas, apresentando-se a estatística descritiva para estimativa pontual (média e desvio-padrão) e foi também calculado desvio-padrão relativo (RSD%). Análises quimiométricas foram aplicadas para fatores antinutricionais e minerais do acarajé e massa crua, sendo submetidos à análise multivariada, os seguintes métodos: Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA) e Análise de Componentes Principais (PCA) para os minerais das amostras de acarajé e massa crua. Seguido pelo teste de *Mann Whitney* para determinar as diferenças entre os grupos. A diferença estatisticamente significativa foi definida como  $p \leq 0,05$ . A correlação existente foi avaliada pelo teste de correlação de *Spearman*.





## FINANCIAMENTO

O presente estudo se insere em um projeto mais abrangente intitulado: “CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DO AZEITE DE DENDÊ (*Elaeis guineensis*) ANTES E APÓS A FRITURA DE ACARAJÉS” número do processo 482790-2010-5; edital MCT/CNPq 14/2010 - Universal - Faixa B - De R\$ 20.000,01 a R\$ 50.000,00; coordenadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Deusdélia Teixeira de Almeida. Além disto, conta com a participação de colaboradores (seus núcleos de pesquisa e laboratórios) para as determinações analíticas:

- Dr.<sup>a</sup> Claudia A. F. Aiub, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro-UERJ, Instituto Biomédico/CCBS, Departamento de Genética e Biologia Molecular, Laboratório de Genotoxicidade, Rua Frei Caneca n. 94, Centro, CEP: 20211-040, Rio de Janeiro-RJ.

- Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisangela F. Boffo, do Departamento de Química Orgânica, da Universidade Federal da Bahia.

- Dr.<sup>a</sup> Maria das Graças Korn, Mestre Milena S. Pinelli e NQA-PRONEX — GPQA, do Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador, Bahia, Brasil, 40170-290.

- Dr. Ralf Greneir, Senior Researcher do Max Rubner-Institute, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Alemanha.

## REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR 10007:2004 – **Normas Brasileiras**, Projeto 10007, Amostragem de resíduos sólidos: Quarteamento. 21 p., 2004. Disponível em: <http://patriciamirotti.files.wordpress.com/2012/04/nbr-10007-amostragem-de-resc3adduos-sc3b3lidos.pdf>. Acesso em: 1 fev. 2012.
- ADAM, S. K.; DAS, S.; JAARIN, K. A detailed microscopic study of the changes in the aorta of experimental model of postmenopausal rats fed with repeatedly heated palm oil. **International Journal of Experimental Pathology**, v.90, p.321–327, 2009.
- AIUB, C.; RIBEIRO PINTO, L. F.; FELZENSZWALB, I. N-Nitrosodiethylamine mutagenicity at low concentrations. **Toxicology Letters**, v.145, p.36–45, 2003.
- AIUB, C. *et al.* N-Nitrosodiethylamine genotoxicity in primary rat hepatocytes: effects of cytochrome P450 induction by phenobarbital. **Toxicology Letters**, v.206, n.2, p.139–143, 2011.
- ALMEIDA, D. T. de *et al.* A quality assessment of crude palm oil marketed in Bahia, Brazil. **Grasas y Aceites**, v.64, n.4, p.384–394, 2013.
- ALMEIDA, D. T. de. Aspectos tecnológicos e nutricionais do dendê ou óleo de palma (*Elaeis guineensis*). In: LODY, R. **Dendê símbolo e sabor da Bahia**. São Paulo: SENAC, 2009. p.53-79.
- ALMEIDA, D. T. de; ARAÚJO, M. P. N.; FORTUNATO, D. M. N.; SOUZA, J. C.; MORAES, T. M. Revisão de literatura: aspectos gerais do processo de fritura de imersão. **Higiene Alimentar**, v.20, n.138, p.42-47, 2006.
- ALMEIDA, D. T. de; GREINER, R.; FURTUNADO, D. M. N.; TRIGUEIRO, I. N. S.; ARAÚJO, M. P. N. Content of some antinutritional factors in bean cultivars frequently consumed in Brazil. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, p.243–249, 2008.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (AOCS). **Official methods of recommended practices of the American Oil Chemists' Society**, Methods Ca 5a-40, AOCS, Cd 8b-90. Champaign, 5. ed., 2003.
- ANDRADE JÚNIOR, A. S.; SANTOS, A. A.; SOBRINHOS, C. A.; BASTOS, E. A.; MELO, F. B.; VIANA, F. M. P.; FREIRE FILHO, F. R.; CARNEIRO, J. S.; ROCHA, M. M.; CARDOSO, M. J.; SILVA, P. H. S.; RIBEIRO, V. Q. Cultivo de Feijão-Caupi. **Embrapa**. Sistema de Produções 2. Versão eletrônica, 2003. Disponível em: <http://www.cpamn.embrapa.br/pesquisa/graos/FeijaoCaupi/index.htm>. Acesso em: 30 ago. 2012.
- ANDREU-SEVILLA, A.; HARTMANN, A.; SAYAS, E.; BURLÓ-CARBONELL, F.; DELGADO-ESTRELL, P.; VALVERDE, J. Mathematical quantification of total carotenoids in Sioma oil using color coordinates and multiple linear regression during deep-frying simulations. **European Food Research and Technology**, v.226, p.1283–1291, 2008.
- ASSOCIAÇÃO DE PRODUTORES DE ÓLEO DE PALMA (Abrapalma). Óleo de Palma, Dendê, Óleo, Associação, Palma. **I Workshop do Programa de Produção Sustentável de Palma de Óleo no Brasil**. 2013. Disponível em: <http://www.abrapalma.com> e <http://palmadeoleo.cpatu.embrapa.br/menu/o%20evento>. Acesso em: 13 jan. 2014.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15. ed. Washington, D.C.: AOAC International, 1990. p. 800-801; 1105-1106.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST (AOAC). **Official methods of analysis of AOAC international**, Maryland, 17.ed., v.2, 2005.

AVANZA, M.; ACEVEDO, B.; CHAVES, M.; AÑÓN, M. Nutritional and anti-nutritional components of four cowpea varieties under thermal treatments: Principal component analysis. **LWT - Food Science and Technology**, v.51, p.148–157, 2013.

AYKROYD, W. R.; DOUGHTY, J.; WALKER, A. F. **Legumes in Human Nutrition**, FAO **Nutritional Studies**. 2. ed. n.19. Rome, Italy: FAO, 1982.

BAHARIN, B. S.; LATIP, R. A.; CHE MAN, Y. B.; RAHMAN, A. The effect of carotene extraction system on crude palm oil quality, carotene composition, and carotene stability during storage. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.78, n.8, p.851–855, 2001.

BATISTA, K. A.; PRUDÊNCIO, S. H.; FERNANDES, K. F. Changes in the biochemical and functional properties of the extruded hard-to-cook cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). **International Journal of Food Science and Technology**, v.45, p.794–799, 2010.

BERGER, K. G. Malaysian Palm Oil Promotion Council (MPOPC). **The use of palm oil in frying. Frying oil series**. Malaysia, 2005. Disponível em: <http://www.mpopc.org>. Acesso em: 12 out. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Companhia Nacional de Abastecimento. **Dendeicultura da Bahia**. Documento Técnico, p. 1-10, agosto, 2009. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2009/11/brasil-participa-de-reuniao-internacional-sobre-oleo-de-palma>. Acesso em: 10 out. 2011.

—. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC. **DENDÊ: Dia de Campo de produção de óleo de dendê foi bem avaliado**. Novembro, 2011. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/restrito/lerNoticia.asp?id=1894>. Acesso em: 05 out. 2012.

—. Ministério do Desenvolvimento Agrário – MDA. **Programa de Produção Sustentável de Óleo de Palma no Brasil**. Maio, 2010. Disponível em: <http://www.mda.gov.br>. Acesso em: 05 out. 2012.

—. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n° 270 de 22 setembro de 2005. **Aprova o Regulamento Técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 12 out. 2011.

BROADHURST, R. B.; JONES, W. J. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.29, p.788–792, 1978.

BUTLER, L. G. New perspectives on the antinutritional effects of tannins. In: KINSELLA, J. E.; SOUCIE, W. G. (ed.). **Food Proteins**. Champaign, IL: American Oil Chemists' Society, 1989. p.402–409.

CARPES, R. M.; FLEURY, B. G.; LAGES, B. G.; PINTO, A. C.; AIUB, C. A.; FELZENSZWALB, I. Mutagenicity, genotoxicity, and scavenging activities of extracts from the soft coral *Chromonephthea braziliensis*: a possibility of new bioactive compounds. **Genetics and Molecular Research**, v.12, n.3, p.3575–3587, 2013.

CARVALHO, A. F. U. *et al.* Nutritional ranking of 30 Brazilian genotypes of cowpeas including determination of antioxidant capacity and vitamins. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.26, p.81–88, 2012.

- 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**, Campinas, v.22, n.2, p.111-116, 2002.
- CHERYAN, M. Phytic acid interactions in food systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.13, p.297-335, 1980.
- CLAXTON, L. D.; ALLEN, J.; AULETTA, A.; MORTELMANS, K.; NESTMANN, E.; ZEIGER, E. Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity. **Mutation Research**, v.189, p.83-91, 1987.
- CODEX ALIMENTARIUS (FAO/WHO). **Codex standart for named vegetable oils**. CODEX STAN 210 (Amended 2003 – 2005). Roma, 2003.
- CORRÊA, R. H. M. A.; COSTA, E. G.; TAILLEFER, R. J. F.; ZORZO, V. Bahia com pimenta: um estudo comparado da tradução da culinária de dona flor para o francês, o inglês e o espanhol. Terra roxa e outras terras. **Revista de Estudos Literários**, Londrina, v.3, p.52-68, 2003.
- CORSINI, M. S.; JORGE, N. Estabilidade oxidativa de óleos vegetais utilizados em frituras de mandioca palito congelada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.2, p.27-32, 2006.
- CURVELO, F. M. **Uma imersão no tabuleiro da baiana: o estudo do óleo de palma bruto (*Elaeis guineensis*)**. 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos, Nutrição e Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde, Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- DESHPANDE, S. S.; DAMODARAN, S. Food legumes: chemistry and technology. In: POMERANZ, X. Y. (Ed.). **Advances in cereal science and technology**. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists, 1990. p.147-241.
- DOBARGANES, M. C.; PÉREZ-CAMINO, M. C.; MÁRQUEZ-RUIZ, G. Fatty acid composition: a useful tool for the determination of alteration level in heated fats. **Revue Française des Corps Gras**, v.35, n.2, p.67-70, 1988.
- DOBARGANES, M. C.; MÁRQUEZ-RUIZ, G.; VELASCO, J. Interactions between fat and food during deep-frying. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.102, p.521-528, 2000.
- DOBARGANES, M. C.; VELASCO, J.; DIEFFENBACHER, A. Determination of polar compounds, polymerized and oxidized triacylglycerols, and diacylglycerols in oils and fats. **Pure and Applied Chemistry**, v.72, n.8, p.1563-1575, 2000.
- DOBLADO, R.; FRIAS, J.; VIDAL-VALVERDE, C. Changes in vitamin C and antioxidant capacity of raw and germinated cowpea (*Vigna sinensis* var. Carilla) induced by high-pressure process. **Food Chemistry**, v.101, p.918-923.
- DOVLO, F. E.; WILLIAMS, C. E.; ZOAKA, L. Cowpeas: Home Preparation and Use in West Africa. **International Development Research Centre**, IRDC-055e, Ottawa, Canada, p.29-30, 1976.
- EBONGUE, G. F. N. *et al.* Identification of palm breeding lines producing oils with low acid values. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.110, n.6, p.505-509, 2008.
- ECONOMIC PLANNING UNIT. Rancangan Malaysia ke 10. **Prime Minister's Office**. 2010. Disponível em: [http://www.pmo.gov.my/dokumenattached/RMK/RMK10\\_Mds.pdf](http://www.pmo.gov.my/dokumenattached/RMK/RMK10_Mds.pdf) Acesso em: 13 jan. 2013.

- EDEM, D. O. Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological, and toxicological aspects: A review. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v.57, p.319-341, 2002.
- EHLERS, J. D.; HALL, A. E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Field Crops Research**, v.53, p.187–204, 1997.
- ENWERE, N. J.; MCWATTERS, K. H.; PHILLIPS, R. D. Effect of processing on some properties of cowpea (*Vigna unguiculata*), seed, protein, starch, flour and akara. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v.49, p.365-373, 1998.
- FARAG, R. S.; ABDEL-LATIF, M. S.; BASUNY, A. M. M.; HAKEEM, B. S. A. E. Effect of non-fried and fried oils of varied fatty acid composition on rat organs. **Agriculture and Biology Journal of North America**, v.1, n.4, p.501–509, 2010.
- FONG, L. Y. Y.; TON, C. C. T.; KOONAUNWATCHAIDET, P.; HUANG, D. P. Mutagenicity of peanut oils and effect of repeated cooking. **Food and Cosmetics Toxicology**, v.18, p.467–470, 1980.
- GERTZ, C. Chemical and physical parameters as quality indicators of used frying fats. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.102, p.566-572, 2000.
- GIAMI, S. Influence of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) variety on protein quality and sensory properties of akara, a popular West African cowpea-based food.. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.85, p.261–264, 2005.
- GIBSON, R. S.; PERLAS, L.; HOTZ, C. Improving the bioavailability of nutrients in plant foods at the household level. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v.65, p.160–168, 2006.
- GIL, A. M.; DUARTE, I. F.; GODEJOHANN, M.; BRAUMANN, U.; MARASCHIN, M.; SPRAUL, M. Characterization of the aromatic composition of some liquid foods by nuclear magnetic resonance spectrometry and liquid chromatography with nuclear magnetic resonance and mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v.488, p.35-51, 2003.
- GRANT, G.; MORE, L.; MCKENZIE, N. H.; STEWART, J. C.; PUSZTAI, A. A survey of the nutritional and haemagglutination properties of legume seeds generally available in the UK. **The British Journal of Nutrition**, v.50, p.207–214, 1983.
- GREENE, J. F. *et al.* Toxicity of epoxy fatty acids and related compounds to cells expressing human soluble epoxide hydrolase. **Chemical Research in Toxicology**, v.13, n.4, p.217–226, 2000.
- GREINER, R.; KONIETZNY, U. Endogenous phytate-degrading enzymes are responsible for phytate reduction while preparing beans (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Food Processing and Preservation**, v.22, p.321–331. 1998.
- HATHCOCK, J. N. Residue trypsin inhibitor: data needs for riskassessment. In: FRIEDMAN, M. (Ed.). **Nutritional and Toxicological Consequences of Food Processing**. New York, NY: Plenum Press, 1991. p. 273–279.
- HAGEMAN, G.; KIKKEN, R.; TEN HOOR, F.; KLEINJANS, J. Assessment of mutagenic activity of repeatedly used deep-frying fats. **Mutation Research**, v.204, p.595–604, 1988.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 4. ed. São Paulo: O Instituto, 2005.
- INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO NACIONAL (IPHAN): **DOSSIÊ IPHAN 6: Ofício das Baianas do Acarajé**. Ministério da Cultura, DF, Brasil, 2005.

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

—, DOBARGANES, M. C; VELASCO, J.; DIEFFENBACHER, A. Determination of polar compounds, polymerized and oxidized triacylglycerols, and diacylglycerols in oils and fats. **Pure and Applied Chemistry**, v.72, n.8, p.1563–1575, 2000.

ISONG, E. U.; EBONG, P. E.; IFON, E. T.; UMOH, I. B.; EKA, O. U. Thermoxidized palm oil induces reproductive toxicity in healthy and malnourished rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.51, p.159–166, 1997.

JORGE, N.; GONÇALVES, L. A. G. Comportamento do óleo de girassol, com alto teor de ácido oléico em termoxidação e fritura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.18, n.3, p.335–342, 1998.

KAKADE, M. L.; RACKIS, J. L.; MCGHEE, J. E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy bean products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, v.51, p.376–382, 1974.

KING, H. G.; HEALTH, G. W. The chemical analysis of small samples of leaf material and the relationship between disappearance and composition of leaves. **Pedobiologia**, v.7, p.192–197, 1967.

KONIETZNY, U.; GREINER, R. Phytic acid: nutritional impact. In: CABALLERO, B.; TRUGO, L.; FINGLAS, P. (ed.). **Encyclopedia of Food Science and Nutrition**. London: Elsevier, 2003. p.4555–4563.

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

KRIS-ERTHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A.; COVAL, S. M.; BINKOSKI, A. E.; HILPERT, K. F.; GRIEL, A. E.; ETHEERTON, T. D. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. **American Journal of Medicine**, v.113, (Suppl. 9B), p.71–88, 2002.

KUMAR, V.; SINHA, A. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: a review. **Food chemistry**, v.120, n.4, p.945–959, 2010.

LANGYINTUO, A. S.; LOWENBERG-DE BOER, J.; FAYEC, M.; LAMBERT, D.; IBROD, G.; MOUSSAD, B.; KERGNAE, A.; KUSHWAHAF, S.; MUSA, S.; NTOUKAMG, G. Cowpea supply and demand in West and Central Africa. **Field Crops Research**, v.82, p.215–231, 2003.

LIENER, I. E. Toxic constituents in legumes. In: ARORA, S. K. **Chemistry and biochemistry of legumes**. New Delhi, India: Oxford and IBH, 1982. 217 p.

LIENER, I. E.; KAKADE, M. L. Protease inhibitors. In: LIENER, I. E. **Toxic constituents of plant foodstuffs** (2. ed.). Academic Press: New York, 1980.

LIMA, J. R.; GONÇALVES, L. A. G. O processo de fritura: alterações observadas em óleos e gorduras. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.2, n.29, p.179–185, 1995.

LIN, S. W. Palm oil. In: GUNSTONE, F. D. (Ed.). **Vegetable oils in food technology: composition, properties and use**. Iowa: Blackwell Publishing, 2011, p.59–93.

LODY, R. Dendê: bom de comer, de ver e de significar a matriz africana no Brasil. In: —. **Dendê: símbolo e sabor da Bahia**. São Paulo: Editora SENAC, 2009. p.9–24.

- LOLLI, M.; BERTELLI, D.; PLESSI, M.; SABATINI, A. G.; RESTANI, C. Classification of Italian Honeys by 2D HR-NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.1298-1304, 2008.
- LÓPEZ-AMORÓS, M. L.; HERNÁNDEZ, T.; ESTRELLA, I. Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, n.4, p.277–283, 2006.
- MACHADO, E. R.; DOBARGANES, G. M. C.; ABRANTES, S. M. P. Alterações dos óleos de palma e de soja em fritura descontínua de batatas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.4, p.786-792, 2008.
- MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v.113, p.173–215, 1983.
- MÁRQUEZ-RUIZ, G.; PÉREZ-CAMINO, M. C.; DOBARGANES, M. C. Evaluación nutricional de grasas termoxidadas y de fritura. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v.41, n.6, p.432-439, 1990.
- MASSON, L.; ROBERT, P.; IZAURIETA, M.; ROMERO, N.; ORTIZ, J. Fat deterioration in deep fat frying of french fries potatoes at restaurant and food shop sector. **Grasas y Aceites**, Sevilha, v.5, n.6, p.460-468, 1999.
- MCWATTERS, K. H.; HITCHCOCK, H. L.; RESURRECCION, A. V. A. Effect of frozen storage on the quality of akara, fried cowpea paste (*Vigna unguiculata*). **Journal of Food Quality**, v.14, n.2, p.165–174, 1991.
- MESQUITA, A. S. Do azeite de dendê de ogum ao *palm oil commodity*: uma oportunidade que a Bahia não pode perder. **Bahia Agrícola**, v.5, n.1, p.22-27, 2002.
- MEHTA, U.; SWINBURN, B. A. Review of Factors Affecting Fat Absorption in Hot Chips. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, v.41, n.2, p.133-154, 2001.
- MISRA, S. K.; FLETCHER, S. M.; MCWATTERS, K. H. Consumer acceptance of a new fast food: The case of akara. **Journal of Food Products Marketing**, v.3, n.1, p.25–35, 1996.
- MITCHELL, L. A.; MORAN, J. H.; GRANT, D. F. Linoleic acid, cis-epoxyoctadecenoic acids, and dihydroxyoctadecadienoic acids are toxic to Sf – 21 cells in the absence of albumin. **Toxicology Letters**, v.126, n.3, p.187–196, 2002.
- MORAN, J. F. *et al.* Analysis of the cytotoxic properties of linoleic acid metabolites produced by renal and hepatic P450S. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.168, n.3, p.268–272, 2000.
- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v.455, p.29–60, 2000.
- MPOC. **Malaysian Palm Oil Council**. Economic Contribution, Malaysian Palm Oil Industry. 2012. Disponível em: [http://www.mpoc.org.my/Malaysian\\_Palm\\_Oil\\_Industry.aspxS](http://www.mpoc.org.my/Malaysian_Palm_Oil_Industry.aspxS); <http://theoilpalma.org/economic-contribution/> Acesso em: 13 jan. 2013.
- OBIZOBA, I. C. Fermented Foods. In: OSAGIE, A. U.; EKA, O. U. (Ed.). **Nutritional Quality of Plant Foods**. Post Harvest Research Unit, Department of Biochemistry. University of Benin, Benin City, Nigeria, 1998. p. 160–198.
- O'DONNELL, C. D. Fats and oils: forces in fried food quality. **Prepared Foods**, p. 77-78, 1995.
- OIL WORLD. The Independent Forecasting Service for Oilseeds, Oils & Meals Providing Primary Information --Professional Analysis-- Unbiased Opinion. **Statistics Based on**

**the Oil World Forecasts.** ISTA Mielke GmnH, Hamburg, Germany.2012.Disponível em: <http://www.oilworld.biz/app.php?fid=1061&fpar=YToyOntzOjEzOiJQdWJsaWNhdGlvbkkljtzOjQ6IjcxMTgiO3M6NDoiVHlwZSI7aTowO30%3D&isSSL=0&aps=0&blub=a5882f792421741d7039c6e5240d4710>. Acesso em: 05 out. 2012.

OLAPADE, A. A.; OKAFOR, G. I.; OZUMBA, A. U.; OLATUNJI, O. Characterization of Common Nigerian Cowpea (*Vigna unguiculata* L. walp) Varieties. **Journal of Food Engineering**, v.55, p.101-105, 2002.

OLIVEIRA, H. P. Dendê, aspectos botânicos, agronômicos, ecológicos e econômicos. In: LODY, R. (ed.). **Dendê símbolo e sabor**. São Paulo: Editora SENAC, 2009, p. 52–82.

OSAWA, C. C.; GONÇALVES, M. L. A.; GRIMALDI, R. Nova ferramenta destinada ao monitoramento e à inspeção do descarte “*in situ*” de óleos e gorduras de fritura. **Revista Brasileira de Vigilância Sanitária**, São Paulo, v.2, n.1, p.102-107, 2005.

PATTERSON, S. P.; PHILLIPS, R. D.; MCWATTERS, K. H.; HUNG, Y.-C.; CHINNAN, M. S. Fat reduction affects quality of akara (fried cowpea paste). **International Journal of Food Science and Technology**, v.39, p.681–689, 2004.

PANTZARIS, T. P. Comparison of monounsaturated and polyunsaturated oils in continuous frying. **Grasas y Aceites**, v.49, p.319–352, 1998.

PREGNOLATTO, W.; PREGNOLATTO, N. P. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, SP). **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, v.1, n.3. São Paulo: O Instituto, 1985. p.21-22.

QI, D.; XIAU-O.; FAN, J.; YU-TANG, G.; ZIH-XIAN, H.; WEI, Z. Consumption of animal foods, cooking methods, and risk of breast cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.11, p.801-808, 2002.

RANGEL, A.; SARAIVA, K.; SCHWENGBER, P.; NARCISO, M. S.; DOMONT, G. B.; FERREIRA, S. T.; PEDROSA, C. Biological evaluation of a protein isolate from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Food Chemistry**, v.87, p.491-499, 2004.

RAO, B. S. N.; PRABHAVATHI, T. Tannin content of foods commonly consumed in India and its influence on ion isable iron. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.33, p.89-96, 1982.

REBER, E. F.; EBOH, L.; ALADESELU, A.; BROWN, W. A.; MARSHALL, D. D. Development of high-protein low-cost Nigerian foods. **Journal of Food Science**, v.48, n.1, p.217–219, 1983.

RIVAS-VEGA, M. E. *et al.* Nutritional value of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) meals as ingredients in diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). **Food Chemistry**, v.97, p.41-49, 2006.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. **Harvest plus handbook for carotenoid analysis**. Washington, DC e Cali: International Food Policy Research Institute e International Center for Tropical Agriculture, 2004, p.58.

ROGÉRIO, W. F. **Uma imersão no tabuleiro da baiana: o acarajé**. 2010. 82 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos, Nutrição e Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde, Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, Salvador. Disponível em: <http://www.repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/10491>.

SALUNKHE, D. K.; CHAVAN, J. K.; KADAM, S.S. **Dietary Tannins: Consequences and Remedies**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990.



SANDBERG, A. S. Bioavailability of minerals in legumes. **The British Journal of Nutrition**, v.88, p.S281–S285, 2002.

SANGRONIS, E.; MACHADO, C. J. Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. **LWT Food Science and Tecnology**, v.40, p.116-120, 2007.

SANTOS, W. P. C. **Estratégias para avaliação da composição mineral de leguminosas produzidas e comercializadas no estado da Bahia**. 2008. 224 f. Dissertação (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

SANTOS, W. P. C. dos; GRAMACHO, D. R.; TEIXEIRA, A. P.; COSTA, A. C. S.; KORN, M. G. A. Use of Doehlert Design for Optimizing the Digestion of Beans for Multi-Element Determination by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.19, n.1, p.1-10, 2008.

SANTOS, W. P. C. dos; SANTOS, D. C. M. B.; FERNANDES, A. P.; CASTRO, J. T.; KORN, M. G. A. Geographical Characterization of Beans Based on Trace Elements After Microwave-Assisted Digestion Using Diluted Nitric Acid. **Food Analytical Methods**, v.6, p.1133-1143., 2013.

SCHEUTWINKEL-REICH, M.; INGEROWSKI, G.; STAN, H. J. Microbiological studies investigating mutagenicity of deep frying fat fractions and some of their components. **Lipids**, v.15, p.849–852, 1981.

SHAHIDI, F. Beneficial health effects and drawbacks of antinutrients and phytochemicals in foods. In: **Antinutrients and phytochemicals in food**. ACS Symposium Series; American Chemical Society, Washington, D. C. 9 p. 1997.

SILVA, J. N.; MIRANDA, K. E. S.; ALMEIDA, V. F. A.; BENEVIDES, C. M. J. Avaliação da composição centesimal e valor calórico de acarajés comercializados na cidade de Salvador, BA. **Revista Higiene Alimentar**, v.17, n.113, p.43-45, 2003.

SINGH, A.; HUNG, Y.; PHILLIPS, R. D.; CHINNAN, M. S.; MCWATTERS, K. H. Particle-size Distribution of Cowpea Flours Affects Quality of Akara (Fried Cowpea Paste). **Journal of Food Science**, v.69, n.7, p.243–249, 2004.

SORAL-ŚMIETANA, M.; KRUPA, U.; MARKIEWICZ, K. White bean varieties – a source of elements, dietary fibre and resistant starch. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.11, n.52, p.17–24, 2002.

SREERAMA, Y. N.; SASHIKALA, V. B.; PRATAPE, V. M.; SINGH, V. Nutrients and antinutrients in cowpea and horse gram flours in comparison to chickpea flour: Evaluation of their flour functionality. **Food Chemistry**, v.131, n.2, p.462–468, 2012.

STANKEVICINS, L.; AIUB, C.; SANTA MARIA, L. C.; LOBO-HAJDU, G.; FELZENSZWALB, I. Genotoxic and antigenotoxic evaluation of extracts from *Arenosclera brasiliensis*, a Brazilian marine sponge. **Toxicology in Vitro**, v.22, p.1869–1877, 2008.

STEVENSON, S. G.; VAISEY-GENSER, M.; ESKIN, N. A. M. Quality control in the use of deep frying oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v.61, n.6, p.1102–1108, 1984.

SUNDRAM, K.; SAMBANTHAMURTHI, R.; TAN, Y-A. Palm fruit chemistry and nutrition. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.12, n.3, p.355–362, 2003.

- TAYLOR, S. L.; BERG, C. M.; SHOPTAUGH, N. H.; SCOTT, V. N. Lack of mutagens in deep-fat-fried foods obtained at the retail level. **Food and Chemical Toxicology**, v.20, p.209–212, 1982.
- TAVARES, M.; BARBÉRIO, J. C. Composição em ácidos graxos do azeite de dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.) brasileiro. **Revista de Farmácia e Bioquímica**, São Paulo, v.25, n.1, p.5-15, 1989.
- TOTANI, Y. *et al.* Leukotoxin and its diol induce neutrophil chemotaxis through signal transduction different from that of fMLP. **European Respiratory Journal**, v.15, n.1, p.75–79, 2000.
- TRIGUEIRO, I. N. S.; PENTEADO, M. V. C. Características físicas, químicas e estado de oxidação de óleos de dendê brasileiros. **Boletim Centro de Pesquisas de Processamento de Alimentos – B.CEPPA**, Curitiba, v.11, n.2, p.103-112, jul./dez. 1993.
- VAN GASTEL, A.; MATHUR, R.; ROY, V. V.; RUKMIRFI, C. Ames mutagenicity test of repeatedly heated edible oils. **Food and Chemical Toxicology**, v.22, p.403–405, 1984.
- VILLAVICENCIO, A. L. C. H.; MANCINI-FILHO, J.; DELINCÉE, H.; GREINER, R. Effect of irradiation on anti-nutrients (total phenolics, tannins and phytate) in Brazilian beans. **Radiation Physics and Chemistry**, v.57, n.3, p.289-293, 2000.
- WANG, N.; LEWIS, M. J.; BRENNAN, J. G.; WESTBY, A. Effect of processing methods on nutrients and antinutritional factors in cowpea. **Food Chemistry**, v.58, p.59–68, 1997.
- ZEB, A.; MURKOVIC, M. Determination of thermal oxidation and oxidation products of  $\beta$ -carotene in corn oil triacylglycerols. **Food Research International**, v.50, p.534-544, 2011.
- ZHENG, J. *et al.* Leukotoxin-Diol a putative toxic mediator involved in acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.25, n.4, p.434–438, 2001.

**ARTIGO APRESENTADO PELA MESTRANDA LUCIANA CONCEIÇÃO ARGÔLO  
CORREIA, PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIA DE  
ALIMENTOS, DA FACULDADE DE FARMÁCIA DA UFBA SOB A ORIENTAÇÃO  
DA PROFESSORA ITACIARA LARROZA NUNES.**

**ESTE ARTIGO FOI ELABORADO A PARTIR DAS AMOSTRAS OBTIDAS NESTE  
ESTUDO.**

**ARTIGO 5**

CIÊNCIA RURAL

Enviado: maio de 2013

CR-2013-0719

**Efeito da fritura de acarajés nos carotenoides e  
atividade antioxidante de óleo de palma bruto**

1 **Efeito da fritura de acarajés nos carotenoides e atividade antioxidante de óleo de palma**  
2 **bruto.**

3

4 **Effect of deep-frying of akara in carotenoids and antioxidant activity of crude palm oil.**

5

6 Luciana Conceição Argôlo Correia<sup>I</sup>, Sabrina Feitosa<sup>II</sup>, Débora Bahia de Mattos<sup>II</sup>, Deusdélia  
7 Teixeira de Almeida<sup>II</sup>, Alessandro de Oliveira Rios<sup>III</sup>, Itaciara Larroza Nunes<sup>II\*</sup>.

8

9 <sup>I</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), R. Barão do Jeremoabo, n°  
10 147, Ondina, 40170-115, Salvador, BA, Brasil.

11 <sup>II</sup> Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, R. Araújo Pinho, n° 32, Canela, 40110-  
12 150, Salvador, BA, Brasil. E-mail: itaciara@yahoo.com. \* Autor para correspondência.

13 <sup>III</sup> Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do  
14 Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves, n° 9500, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

15

## 16 RESUMO

17 O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da fritura de acarajés nos carotenoides e na  
18 atividade antioxidante de óleo de palma bruto (OPB). Foi realizado experimento de fritura de  
19 acarajés em OPB, sendo retiradas amostras nos tempos 0, 5, 10, 15, 20 e 25 horas e  
20 submetidas à determinação de carotenoides, cor e atividade antioxidante. O óleo inicial  
21 apresentou 584,86µg/g de carotenoides reduzindo 96,3% após 25h de fritura, com decaimento  
22 de 96,3% e 96,9% de  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno, respectivamente, formação de produtos de degradação  
23 e perda da cor alaranjada. A atividade antioxidante reduziu de 52,78 para 16,63% e de 28,06  
24 para 2,48% pelos métodos DPPH e ABTS. Conclui-se que o OPB não deve ser utilizado por  
25 tempo prolongado para a fritura de acarajés, pela evidente perda de compostos funcionais.

26 **Palavras-chave:** óleo de palma bruto, fritura,  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, atividade antioxidante.

27

## 28 ABSTRACT

29 The objective of this work was to evaluate the effect of frying akara on the carotenoids and on  
30 the antioxidant activity of the crude palm oil (CPO). An experiment was performed, frying the  
31 akara in CPO and removing samples at 0, 5, 10, 15, 20 and 25 hours. They were then  
32 submitted to determination of carotenoids, color and antioxidant activity. The initial oil  
33 presented 584.86 µg/g carotenoids, reducing 96.3% after 25 hour of frying, with a decrease of  
34 96.3% and 96.9% of  $\alpha$ - and all-*trans*- $\beta$ -carotene, respectively, as well as formation of  
35 degrading products and loss of the orange color. The antioxidant activity reduced from 52.78  
36 to 16.63% and from 28.06 to 2.48% by the DPPH and ABTS methods. It was concluded that  
37 the CPO should not be used for a prolonged period of time for frying akara, due to the clear  
38 loss of functional compounds and possible risks to the consumer's health.

39 **Key-words:** crude palm oil, frying,  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -carotene, antioxidant activity.

40

## 41 1. Introdução

42 A fritura consiste na imersão do alimento em óleo quente, que transfere calor para a  
43 cocção, conferindo características sensoriais agradáveis. Entretanto, durante o processo os  
44 óleos sofrem alterações provocadas por três agentes: a umidade do alimento que causa  
45 alteração hidrolítica; o oxigênio atmosférico, que provoca rancificação oxidativa, e a elevada  
46 temperatura de fritura (aproximadamente 180°C), ocasionando degradação térmica (CORSINI  
47 & JORGE, 2006).

48 O óleo de palma bruto (OPB) ou azeite de dendê é empregado na fritura de acarajés,  
49 que são produzidos à base de feijão fradinho descorticado, cebola ralada e sal, sendo um  
50 produto largamente comercializado na cidade de Salvador (LODY, 2009). Este óleo é  
51 considerado mais estável a tais alterações devido sua composição em ácidos graxos  
52 monoinsaturados (36,0-45,0%), polinsaturados (9,0-12,5%) e saturados (43,3-57,4%), além da  
53 presença de compostos antioxidantes, como tocotrienóis e tocoferóis (150-1500mg/Kg) e  
54 carotenoides (500-2000mg/Kg) (CODEX, 2011).

55 Os carotenoides são os principais responsáveis pela cor vermelha ou alaranjada do  
56 óleo de palma bruto, sendo o  $\beta$ - e o  $\alpha$ -caroteno os majoritários (80-90%) (ANDREU-  
57 SEVILLA et al., 2008). Alguns desses compostos possuem atividade de pró-vitamina A, além  
58 de atuarem como antioxidantes, sequestrando espécies reativas de oxigênio, como o radical  
59 peróxil ( $\text{ROO}^\bullet$ ) e o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) (RODRIGUEZ-AMAYA & KIMURA, 2004).

60 Esses pigmentos ocorrem naturalmente na forma *trans*, sendo que o aquecimento por  
61 tempo prolongado e a presença de luz podem conduzir a isomerização para as formas *cis*,  
62 além de propiciar a oxidação que provoca a formação de epóxidos, apocarotenoides e  
63 compostos de baixo peso molecular (ACHIR et al, 2010; ZEB & MURKOVIC, 2011).

64           Devido à ampla utilização do OPB para a fritura de acarajés na Bahia e considerando  
65 que a maioria dos estudos com óleos vegetais utilizados neste processo determina apenas a  
66 formação de compostos de decomposição lipídica, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito  
67 da fritura de acarajés nos carotenoides e na atividade antioxidante desse óleo.

68

## 69 **2. Material e métodos**

### 70 **2.1. Amostra**

71           Aproximadamente 30 litros de OPB (oleína + estearina), de mesmo lote, procedente de  
72 Nazaré (BA), foram adquiridos na Feira de São Joaquim, Salvador (BA).

### 73 **2.2. Experimento de fritura de acarajés em OPB**

74           O OPB foi colocado em um recipiente inox, aquecido a 45°C e homogeneizado, sendo  
75 retirados 20mL (tempo 0), filtrados em lã de vidro, e armazenados em frasco âmbar inertizado  
76 com nitrogênio à -20°C, sendo descongelado apenas no momento das análises. O processo de  
77 fritura foi efetuado respeitando a prática das baianas de acarajé, sendo utilizado tacho de  
78 alumínio com 5 litros de óleo contendo uma cebola submersa. Após 12 minutos de  
79 aquecimento do óleo iniciou-se a fritura até completar 5 horas de processo intermitente,  
80 obtendo-se aproximadamente 110 bolinhos fritos/dia. O óleo foi decantado, filtrado e  
81 armazenado no tacho com tampa, em temperatura ambiente, até a próxima fritura, sendo esses  
82 procedimentos seguidos nos 4 dias subsequentes, totalizando 25 horas de fritura. Foi realizada  
83 a reposição do óleo durante o processo para manter constante o nível de óleo no tacho, sendo  
84 utilizado para isso mistura de óleo novo com o óleo usado do dia anterior. A temperatura do  
85 óleo foi monitorada no início do processo e a cada hora, sendo coletadas alíquotas de 20 mL  
86 nos tempos 5, 10, 15, 20, 25h.

### 87 **2.3. Carotenoides totais**

88 As amostras de óleo foram dissolvidas em éter de petróleo e os carotenoides totais  
89 quantificados em espectrofotômetro UV-Vis (Perkin Elmer, Lambda 25) a 450nm e  
90 coeficiente de absorção ( $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) de 2592 (RODRIGUEZ-AMAYA & KIMURA, 2004).

### 91 **2.4. Extração dos carotenoides**

92 Realizada segundo ZEB & MURKOVIC (2011), com etapa prévia de remoção da  
93 gordura por congelamento à - 20°C/24 h. Os extratos em acetona foram filtrados e os  
94 carotenoides transferidos para éter de petróleo/éter etílico (1:1), secos com N<sub>2</sub> e analisados  
95 por CLAE.

### 96 **2.5. Análise por CLAE**

97 As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido (Waters, 2695) com detector de  
98 arranjo de diodos (DAD) (Waters, 2998), sendo as separações dos carotenoides realizadas em  
99 coluna de fase reversa YMC C<sub>30</sub> (Waters) com eluição por gradiente. O método para a  
100 quantificação de  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno foi validado quanto à linearidade, Limite de Detecção (LD),  
101 Limite de Quantificação (LQ) e precisão (intra e inter-dias) segundo RIBANI et al. (2004).

### 102 **2.6. Ensaios da atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS**

103 A atividade antioxidante das amostras de óleo foi determinada pelos métodos DPPH  
104 (KALANTZAKIS et al., 2006) e ABTS (RE et al.,1999) em espectrofotômetro UV-Vis  
105 (Perkin Elmer, Lambda 25) com leitura das absorbâncias realizada após 30 minutos de reação  
106 a 515nm e 6 minutos de reação a 734nm, respectivamente, sendo os resultados expressos  
107 como % de inibição.



## 108 2.7. Cor

109 As análises foram realizadas em colorímetro Minolta (CR 400), com escala CIELab,  
110 iluminante D<sub>65</sub> e ângulo de observação de 2° (ANDREU-SEVILLA et al., 2008).

## 111 2.8. Análise estatística

112 Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados avaliados através de  
113 teste de comparação de médias de STEEL (1960) ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa “R” 2.15.3.  
114 Foi utilizado o teste de *Spearman* para avaliar a correlação entre os carotenoides totais com as  
115 coordenadas de cor e com a atividade antioxidante.

## 116 3. Resultados e discussão

117 O teor médio de carotenoides encontrado no OPB (0h) foi de 584,86µg/g (Tabela 1).  
118 Valor inferior foi reportado para amostras de OPB sem aquecimento por CHOO et al. (2005)  
119 (550µg/g). Em experimento de fritura de batatas, utilizando óleo de palma Sioma<sup>®</sup>,  
120 ANDREU-SEVILLA et al. (2008), também verificaram um menor teor inicial de carotenoides  
121 (481µg/g). As diferenças nos teores de carotenoides em OPB são influenciadas por diferentes  
122 variedades/grau de amadurecimento dos frutos, processo de extração, armazenamento e  
123 proporção de estearina/oleína (LODY, 2009; CURVELO et al. 2011).

124 No decorrer da fritura, utilizando-se uma temperatura média de 161°C foi observada  
125 uma redução significativa no teor de carotenoides em relação ao conteúdo inicial ( $p < 0,05$ ),  
126 sendo perdidos 95,73% dos mesmos em 5h. Entre o período de 10 e 20h não foram  
127 verificadas alterações significativas, entretanto, no tempo de 25h houve um aumento no  
128 conteúdo desses pigmentos, ocasionada pela reposição de óleo realizada uma hora antes do  
129 processo final (24h) (Tabela 1). Cabe ressaltar, que normalmente as baianas permanecem nos  
130 pontos de comercialização em média por 5h/dia fritando os acarajés, e nesse tempo a redução  
131 dos carotenoides foi elevada.

132 ANDREU-SEVILLA et al. (2008) verificaram reduções de 52,2% e de 97,2% do  
133 conteúdo de carotenoides de óleo de palma Sioma<sup>®</sup> submetido à fritura a 180°C e 240°C,  
134 respectivamente durante 90 minutos. Estas alterações podem ser atribuídas à degradação pelo  
135 calor, a incorporação destes pigmentos nos alimentos fritos (MANORAMA & RUKMINI,  
136 1991), além de outras condições empregadas na fritura (equipamento utilizado, relação  
137 superfície/volume, exposição à luz e ao oxigênio) que podem ocasionar a isomerização e  
138 oxidação dos carotenoides (CORSINI & JORGE, 2006; ANDREU-SEVILLA et al., 2008).

139 As coordenadas L\*, a\*, b\* e h do óleo inicial, apresentaram diferença estatística  
140 significativa em relação aos demais tempos de fritura (Tabela 1). De modo geral o óleo foi se  
141 tornando mais luminoso (aumento de L\*), menos vermelho (redução de a\*) e menos amarelo  
142 (redução de b\*). Os valores de C não diferiram estatisticamente nos tempos 0 e 5h, mas  
143 apresentaram diferença em relação aos demais tempos. Somente as coordenadas b\* (r=0,94) e  
144 C (r=0,99) apresentaram correlação significativa positiva com os carotenoides totais,  
145 indicando que a perda da cor laranja é decorrente das alterações/perdas dos carotenoides.

146 CURVELO et al. (2011) verificaram valores superiores para todos os parâmetros de  
147 cor para OPB coletado em Salvador (BA) após 4h de fritura de acarajés a 141-160°C, além de  
148 uma cor mais luminosa e vermelha que a do tempo de 5h de fritura deste estudo (Tabela 1), no  
149 qual foram fritos de forma contínua, 98 bolinhos de acarajés à 160°C. Essa diferença pode ser  
150 pela menor degradação dos carotenoides em função da quantidade de bolinhos fritos (fritura  
151 contínua ou não), sendo que estas condições não foram informadas no estudo.

152 As porcentagens de inibição para os radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>+•</sup> do óleo foram  
153 reduzidas significativamente com o tempo de fritura (p<0,05) (Tabela 1), não ocorrendo  
154 correlação significativa entre % de inibição (DPPH: r=0,65; p>0,05; ABTS: r=0,60; p>0,05) e  
155 carotenoides totais, indicando que a atividade antioxidante pode estar relacionada

156 principalmente ao conteúdo de vitamina E do OPB (CASTELO-BRANCO & TORRES,  
157 2011).

158 KALANTZAKIS et al. (2006) aqueceram *blend* de (óleo de palma refinado, óleo de  
159 algodão e óleo de canola) por 10h/180°C, obtendo resultado superior (77,3%) para a % de  
160 inibição do radical DPPH<sup>•</sup>, provavelmente devido a diferentes condições experimentais  
161 (solvente, tempo de reação, quantidade de amostra e concentração da solução de DPPH) e/ou  
162 conteúdo de antioxidantes (RAMALHO & JORGE, 2006; CASTELO- BRANCO &  
163 TORRES, 2011).

164 Porcentagens de inibição do radical ABTS<sup>+•</sup> inferiores ao verificado neste estudo para  
165 o óleo inicial (28,06%), foram encontradas por KARAOSMANOGLU et al. (2010) para óleos  
166 de canola (22,52%), avelã (21,19%) e azeite de oliva refinado (23,50%), provavelmente pelo  
167 maior teor de carotenoides e vitamina E no OPB (150-1500mg/Kg) (CODEX, 2011).

168 O método utilizado para a quantificação de all-*trans*- $\alpha$ -caroteno e all-*trans*- $\beta$ -caroteno  
169 apresentou boa linearidade (R=0,9931 e 0,9986). O LD e o LQ para o all-*trans*- $\alpha$ -caroteno  
170 foram de 22,8ng/mL e 69,0ng/mL, enquanto que para o all-*trans*- $\beta$ -caroteno foram de  
171 38,5ng/mL e 111,5ng/mL. Os valores médios de Coeficiente de Variação (CV%) para a  
172 precisão intra e inter-dias foram de 4,3% e 3,0% para all-*trans*- $\alpha$ -caroteno e de 5,7% e 4,0%  
173 para all-*trans*- $\beta$ -caroteno, estando dentro dos limites permitidos (até 20%) (RIBANI et al.,  
174 2004). SILVA et al. (2011), obtiveram coeficiente de correlação (0,9942), LD (50ng/mL), LQ  
175 (100ng/mL), precisão intra-dia (CV%=5,15) e precisão inter-dias (CV%=9,26) superiores, ao  
176 validarem método para determinação de all-*trans*- $\beta$ -caroteno em óleos de buriti, tucumã e  
177 patuá, possivelmente pelas diferenças entre equipamentos, analistas e condições de validação  
178 (RIBANI et al., 2004).

179 Os carotenoides majoritários no OPB inicial foram o all-*trans*- $\beta$ -caroteno e o all-*trans*-  
180  $\alpha$ -caroteno (Tabela 2, Figura 1), representando 61,3% (358,5 $\mu$ g/g) e 36,0% (210,6 $\mu$ g/g) dos

181 carotenoides totais, sendo identificados ainda isômeros *cis* destes dois carotenos (Tabela 2).  
182 Valor similar (367 $\mu$ g/g) para o *all-trans*- $\beta$ -caroteno, foi observado por MANOROMA &  
183 RUKMINI (1991) em óleo de palma bruto.

184 Óleo de palma refinado analisado por ROSSO & MERCADANTE (2007) também  
185 apresentou esses carotenoides como principais, representando 65,77% e 22,34%,  
186 respectivamente, sendo observada também a presença de epóxidos, que não foram verificados  
187 nesse estudo, provavelmente porque a maior formação desses compostos ocorre durante o  
188 processo de refino (LODY, 2009).

189 No óleo de palma Sioma<sup>®</sup> avaliado por ANDREU-SEVILLA et al. (2008), o  $\alpha$ -  
190 caroteno foi responsável por 47% do total e o  $\beta$ -caroteno por apenas 17%, sendo identificados  
191 ainda  $\gamma$ -caroteno,  $\epsilon$ -caroteno e  $\delta$ -caroteno, não encontrados no OPB avaliado nesse estudo, e  
192 indicando que a variedade de palma Sioma apresenta uma composição diferente de  
193 carotenoides em relação à palma africana cultivada no Brasil e utilizada para a obtenção do  
194 óleo de palma (ANDREU-SEVILLA et al., 2008; LODY, 2009).

195 *All-trans*- $\beta$ -caroteno e *all-trans*- $\alpha$ -caroteno sofreram redução com o tempo de fritura  
196 (Figuras 1 e 2), atingindo 96,3% e 96,9% após 25h, respectivamente (Figura 2). ACHIR et al.  
197 (2010) utilizando temperatura de 180°C (superior a desse trabalho), observaram perda de 90%  
198 de *all-trans*- $\beta$ -caroteno de oleína de palma em apenas 30 minutos de aquecimento.

199 Somente os picos correspondentes ao *all-trans*- $\alpha$ -caroteno, *all-trans*- $\beta$ -caroteno 9-*cis*-  
200  $\beta$ -caroteno (Figura 1) mantiveram os espectros similares em todos os tempos avaliados, os  
201 demais foram sofrendo modificações. Na presença de temperatura e de oxigênio, os  
202 carotenoides são primeiramente isomerizados, depois oxidados (epóxidos) e por último,  
203 clivados (apocarotenoides), sendo possível que nos estudos de ANDREU-SEVILLA et al.  
204 (2008) e ACHIR et al. (2010) um maior número de carotenoides tenha sido identificado pelo

205 menor tempo de aquecimento empregado e/ou menor reação dos carotenoides com os  
206 peróxidos formados com a degradação dos lipídeos (ACHIR et al., 2010).

#### 207 **4. Conclusão**

208 Foi possível concluir que o OPB não deve ser utilizado por tempo prolongado para a  
209 fritura de acarajés e que a reposição não deve ser feita com óleo usado anteriormente, pela  
210 evidente redução dos carotenoides e da atividade antioxidante, com conseqüente perda da  
211 funcionalidade.

212

#### 213 **REFERÊNCIAS**

214 ACHIR, N. et al. Kinetic study of  $\beta$ -carotene and lutein degradation in oils during heat  
215 treatment. **European Journal of Lipid Science and Technology**, vol. 112, p. 349-361, jan.  
216 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejlt.200900165>>. Acesso  
217 em: 30 set. 2012.

218 ANDREU-SEVILLA, A. et al. Mathematical quantification of total carotenoids in Sioma oil  
219 using color coordinates and multiple linear regression during deep-frying simulations.  
220 **European Food Research and Technology**, vol. 226, p. 1283–1291, jun. 2008. Disponível  
221 em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00217-007-0656-2>>. Acesso em: 01 nov.  
222 2012.

223 CASTELO-BRANCO, V. N.; TORRES, A. G. Capacidade antioxidante total de óleos  
224 vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos.  
225 **Revista de Nutrição**, Campinas, vol. 24, p. 173-187, fev. 2011.

226 CHOO, Y.M. et al. Application of supercritical fluid chromatography in the quantitative  
227 analysis of minor components (carotenes, vitamin E, sterols, and squalene) from palm  
228 oil. **Lipids**, vol. 40, p. 429-432, 2005.

- 229 CODEX ALIMENTARIUS (FAO/WHO). Codex standard for named vegetable oils, CODEX  
230 STAN 210 (Amended 2001 – 2009). Roma, 2011.
- 231 CORSINI, M. S.; JORGE, N. Estabilidade oxidativa de óleos vegetais utilizados em frituras  
232 de mandioca palito congelada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 26, p. 27-32, 2006.  
233 Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612006000100005>>. Acesso em: 03 out.  
234 2012. Doi: 10.1590/S0101-20612006000100005.
- 235 CURVELO, F. M. et al. Qualidade do óleo de palma bruto (*Elaeis guineensis*): matéria-prima  
236 para fritura de acarajés. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, vol. 70, p. 641-646, 2011. Disponível  
237 em:<[http://revista.ial.sp.gov.br/index.php?option=com\\_remository&Itemid=27&func=startdo  
238 wn&id=762](http://revista.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=27&func=startdown&id=762)>. Acesso em: 15 de fev. 2013.
- 239 KALANTZAKIS, G. et al. Stability and radical-scavenging activity of heated olive oil and  
240 other vegetable oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, vol.108, p. 329–  
241 335, jan. 2006. Disponível em:<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejlt.200500314>>.  
242 Acesso em 10 nov. 2012. Doi: 10.1002/ejlt.200500314.
- 243 KARAOSMANOGLU et al. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Turkish Extra  
244 Virgin Olive Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 58, p. 8238-8245, jun.  
245 2010.
- 246 LODY, R. Dendê símbolo e sabor. São Paulo: Editora SENAC; 2009.
- 247 MANORAMA, R.; RUKMINI, C. Effect of processing on  $\beta$ -carotene retention in crude palm  
248 oil and its products. **Food Chemistry**, vol. 42, p. 253-264, 1991.
- 249 RAMALHO, V. C., JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos  
250 gordurosos. **Química Nova**, vol. 24, p. 755 – 760, 2006. RE, R. et al. Antioxidant activity  
251 applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and  
252 Medicine**, vol. 26, p. 1231-1237, 1999.

- 253 RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**,  
254 vol. 27, p. 771-780, jun. 2004. Disponível em:<[http://dx.doi.org/10.1590/S0100-](http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017)  
255 [40422004000500017](http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017)>. Acesso em: 12 set. 2012. Doi: 10.1590/S0100-40422004000500017.
- 256 ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by  
257 HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **Journal of Agricultural and Food**  
258 **Chemistry**, vol. 55, p. 5062-5072, mai. 2007. Disponível  
259 em:<<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0705412>>. Acesso em: 15 nov. 2012. Doi:  
260 10.1021/jf0705421.
- 261 RODRIGUEZ-AMAYA, D. B; KIMURA, M. Harvest plus handbook for carotenoid analysis.  
262 Washington, DC e Cali: International Food Policy Research Institute e International Center for  
263 Tropical Agriculture, 2004, p.58.
- 264 SILVA, S. M et al. Validation of a method for simultaneous quantification of total carotenes  
265 and tocopherols in vegetable oils by HPLC. **Food Chemistry**, vol. 129, p. 1874-1881, mai. 2011.
- 266 STEEL, R. G. D. A rank sum test for comparing all pairs of treatments. **Technometrics**,  
267 vol.3, p.197-207, 1960.
- 268 ZEB, A.; MURKOVIC, M. Determination of thermal oxidation and oxidation products of  $\beta$ -  
269 carotene in corn oil triacylglycerols. **Food Research International**, vol. 50, p. 534-544, mar.  
270 2011.

Tabela 1 - Alterações no teor de carotenoides, nas coordenadas CIELab de cor e na atividade antioxidante (DPPH e ABTS) do óleo de palma bruto submetido à fritura de acarajés por imersão.

<b>Tempo</b> <b>Fritura</b>	<b>CT</b> ( $\mu\text{g/g}$ )	<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>	<b>C</b>	<b>h<sub>ab</sub></b>	<b>DPPH</b> % Inibição	<b>ABTS</b> % Inibição
<b>0</b>	584,86 $\pm$ 4,97 <sup>a</sup>	31,06 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	12,39 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	22,06 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	25,30 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	60,67 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	52,78 $\pm$ 0,90 <sup>a</sup>	28,06 $\pm$ 2,05 <sup>a</sup>
<b>5</b>	24,98 $\pm$ 1,22 <sup>b</sup>	35,86 $\pm$ 0,43 <sup>b</sup>	-1,11 $\pm$ 0,84 <sup>b</sup>	24,64 $\pm$ 1,50 <sup>b</sup>	24,69 $\pm$ 1,51 <sup>a</sup>	93,58 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	26,33 $\pm$ 3,86 <sup>b</sup>	7,77 $\pm$ 0,36 <sup>b</sup>
<b>10</b>	16,92 $\pm$ 1,49 <sup>c</sup>	36,63 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>	-1,54 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	18,86 $\pm$ 0,12 <sup>c</sup>	18,93 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	94,67 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>	23,85 $\pm$ 3,70 <sup>b</sup>	5,70 $\pm$ 4,02 <sup>b</sup>
<b>15</b>	16,88 $\pm$ 1,86 <sup>c</sup>	36,05 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	-0,57 $\pm$ 0,42 <sup>b</sup>	17,90 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>	17,92 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	92,61 $\pm$ 0,06 <sup>d</sup>	23,01 $\pm$ 4,09 <sup>b</sup>	3,93 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup>
<b>20</b>	11,74 $\pm$ 1,55 <sup>c</sup>	35,85 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	-0,52 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	17,82 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>	17,82 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	91,66 $\pm$ 0,06 <sup>e</sup>	18,11 $\pm$ 4,31 <sup>c</sup>	3,01 $\pm$ 0,95 <sup>b</sup>
<b>25</b>	21,49 $\pm$ 1,34 <sup>b</sup>	34,01 $\pm$ 0,05 <sup>d</sup>	1,12 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	19,64 $\pm$ 0,09 <sup>d</sup>	19,67 $\pm$ 0,09 <sup>c</sup>	86,72 $\pm$ 0,09 <sup>f</sup>	16,63 $\pm$ 1,46 <sup>c</sup>	2,48 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3); médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente (p > 0,05). CT: Carotenoides Totais. L\* (luminosidade): 0 – escuro e 100 – branco), a\* (intensidade de vermelho): variando de verde (-a) a vermelho (+a), b\* (intensidade de amarelo): variando de azul (-b) a amarelo (+b)], C\* (Chroma):  $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ , ângulo h<sub>ab</sub> (arco tangente): b\*/a\*.



Tabela 2. Características cromatográficas e UV-Vis dos principais carotenoides de óleo de palma bruto.

<b>Pico</b>	<b>Carotenoide<sup>a</sup></b>	<b>Tr (minutos)</b> <b>b</b>	<b><math>\lambda_{\text{máx}}</math> (nm)<sup>c</sup></b>	<b>%III/II</b>	<b>%A<sub>B</sub>/A<sub>II</sub></b>
<b>1</b>	13- <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno <sup>d</sup>	24,5-25,3	332, 418, 440,466	28	46
<b>2</b>	<i>cis</i> -luteína	25,8-26,0	330, 412, 435, 460	23	20
<b>3</b>	di- <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno <sup>d</sup>	26,3-26,7	330, 415, 436, 462	23	33
<b>4</b>	Não identificado	27,3-28,4	333, 410, 436, 456	0	41
<b>5</b>	13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno <sup>d</sup>	28,7-29,1	338, 422, 443, 466	9	43
<b>6</b>	di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno <sup>d</sup>	29,4-30,1	337, 420, 443, 470	9	33
<b>7</b>	all- <i>trans</i> - $\alpha$ -caroteno <sup>e</sup>	31,4-31,8	422, 445, 473	55	0
<b>8</b>	9- <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno <sup>d</sup>	32,7-33,0	330, 418, 440, 469	62	9
<b>9</b>	Não identificado	35,0-35,4	422, 440, 467	33	0
<b>10</b>	all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno <sup>e</sup>	35,9-36,3	425, 451, 478	25	0
<b>11</b>	9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno <sup>d</sup>	37,8-38,1	341, 420, 446, 473	27	11

<sup>a</sup>Numerados de acordo com a Figura 1 (T 0h). <sup>b</sup>Tempo de retenção. <sup>c</sup>Gradiente linear metanol/éter *tert* metil butílico. <sup>d</sup>Identificação tentativa considerando a ordem de eluição e características dos espectros UV-Vis obtidos entre 250 e 600nm ( $\lambda_{\text{máx}}$ , %III/II e %A<sub>B</sub>/A<sub>II</sub>) (RODRIGUEZ-AMAYA & KIMURA, 2004; ROSSO & MERCADANTE, 2007; ACHIR et al.,2010). <sup>e</sup>Identificação realizada por co-cromatografia com padrões.

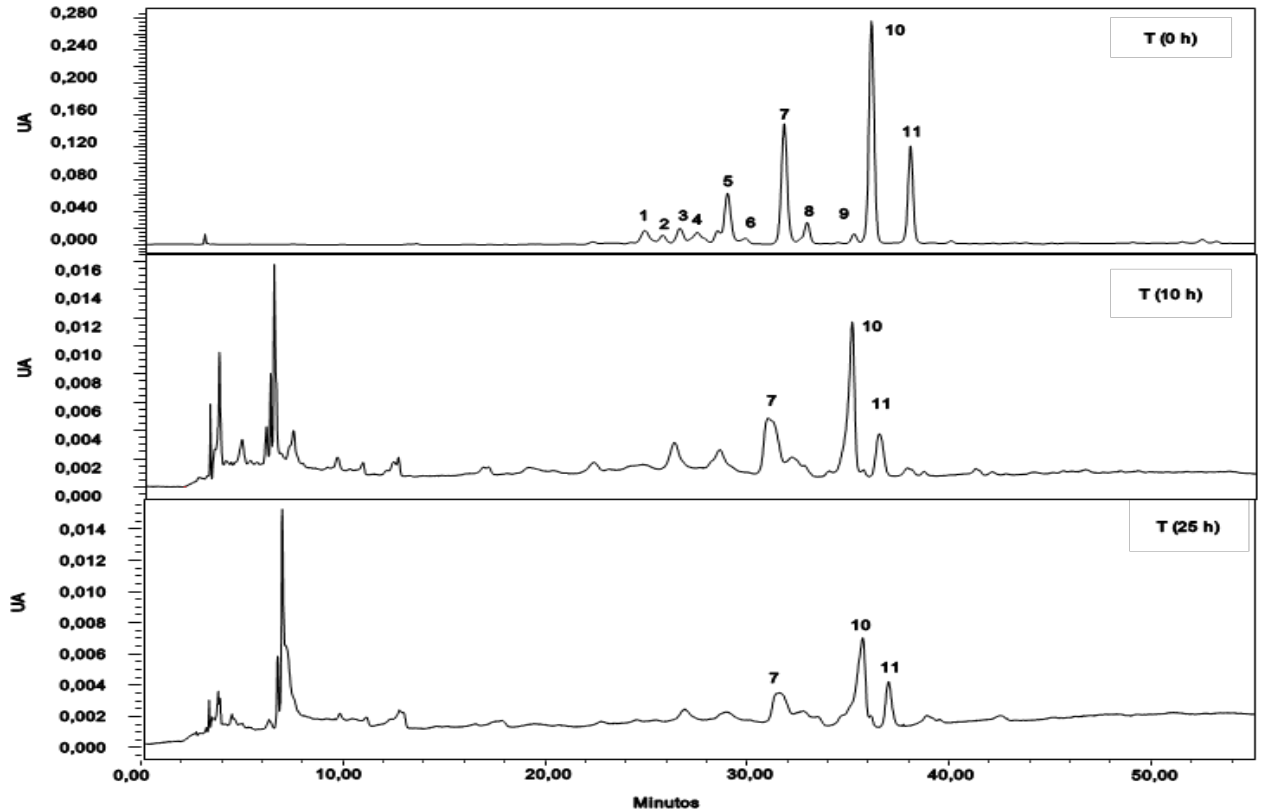


Figura 1 - Cromatogramas, obtidos por CLAE a 450nm, de extratos de carotenoides de óleo de palma bruto nos tempos 0, 10 e 25 h. Condições cromatográficas: coluna de fase reversa YMC C<sub>30</sub> (250 x 4,6mm d.i, 3µm), gradiente linear de metanol (0,1% trietilamina)/éter *tert* metil butílico de 95:5 para 70:30 em 30 minutos, para 50:50 em 20 minutos e mantendo essa proporção até o final da corrida, com fluxo de 0,9mL/min., temperatura da coluna de 22°C e solvente de injeção éter *tert* metil butílico.

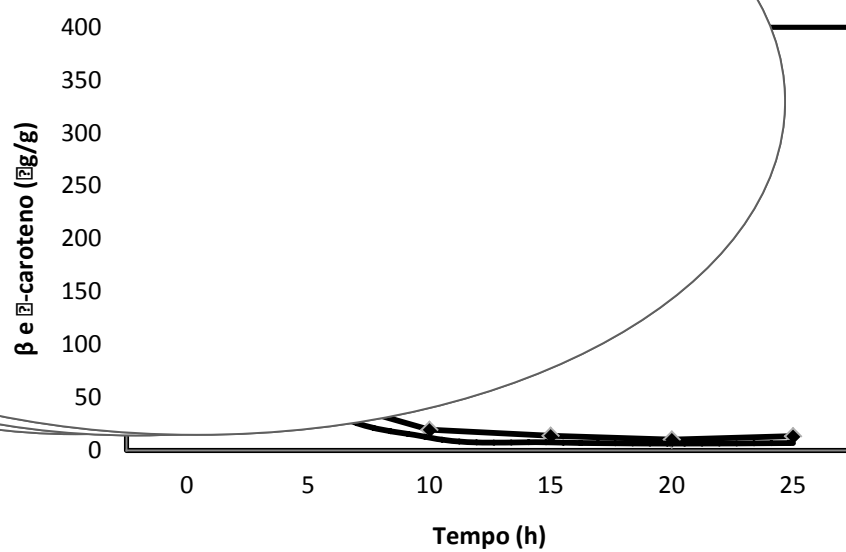


Figura 2. Alterações na concentração de all-*trans*- $\alpha$ -caroteno (●) e de all-*trans*- $\beta$ -caroteno (◆) no óleo de palma no decorrer das 25 horas de fritura.

## **Certificados de trabalhos apresentados em eventos científicos**

- **17º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA) – 09 de outubro de 2013:**

- **“Avaliação do perfil de elementos traço na massa crua e em acarajés por ICP OES e ICP-MS”**. Autores: Deusdélia T. Almeida, Elisângela Boffo, Maria das Graças A. Korn, Milena S. Pinelli, Sabrina Feitosa, Talita Rodrigues O. da Silva.

- **10º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos (SLACA) – 03 a 06 de novembro de 2013:**

- **“Características físico-químicas de acarajés fritos em diferentes intervalos de tempo”**. Autores: Mello LB, Feitosa S, Viana TV, Silva TRO, Almeida DT.

- **“Determinação de fatores antinutricionais em amostras de massa crua e acarajés”**. Autores: Almeida DT, Feitosa S, Sá LB, Araújo LA, Greiner R.

- **“Estabilidade oxidativa do óleo de palma bruto ou azeite de dendê bruto (*Elaeis guineensis*) empregado em fritura de acarajés”**. Autores: Viana TV, Feitosa S, Araújo LA, Correa LCA, Almeida DT.

- **“Influência do tempo de fritura sobre a estabilidade de azeite de dendê bruto (*Elaeis guineensis*) por RMN e a Quimiometria”**. Autores: Boffo EF, Batista CSC, Feitosa S, Mello LB, Almeida, DT.



**17º ENQA**

**ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA**

06 A 09 DE OUTUBRO DE 2013 / MINASCENTRO - BH/MG

ESP-026

**CERTIFICADO**

Certificamos que o trabalho "AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ELEMENTOS TRAÇO NA MASSA CRUA E EM ACARAJÉS POR ICP OES E ICP-MS", foi apresentado na forma de POSTER durante o 17º ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA, de 06 a 09 de outubro de 2013.

**Autores:** DEUSDELIA T. ALMEIDA, ELISÂNGELA BOFFO, MARIA DAS GRAÇAS A. KORN, MILENA S. PINELLI, SABRINA FEITOSA, TALITA RODRIGUES O. DA SILVA

Belo Horizonte, 09 de outubro 2013.

REALIZAÇÃO



*Cláudia Cristina Nascentes*

Cláudia Cristina Nascentes  
Coordenação Geral



# Certificado

Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos  
*Ciência de Alimentos: Impacto na Nutrição e Saúde*

Certificamos que o trabalho intitulado

**Características físico-químicas de acarajés fritos em diferentes intervalos de tempo.**

de autoria

**Mello, LB, Feitosa, S, Viana, TV, Silva, TRO, Almeida, DT**

foi apresentado na SESSÃO de PÔSTER no 10 SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos: "Impacto da Ciência de Alimentos na Nutrição e Saúde", realizado de 3 a 6 de Novembro de 2013, Campinas - São Paulo - Brasil.

*Mário Roberto Maróstica Jr.*

Dr. Mário Roberto Maróstica Jr.

Coordenador do Comitê de Programação

*Glaucia Maria Pastore*

Dra. Glaucia Maria Pastore

Presidente do Evento

*Gabriela Alves Macedo*

Dra. Gabriela Alves Macedo

Coordenadora do Comitê Científico



5913253013da43e471cf7545e45de2db0



# Certificado

Simposio Latino Americano de Ciéncia de Alimentos  
*Ciência de Alimentos: Impacto na Nutrição e Saúde*

Certificamos que o trabalho intitulado

**Determinação de fatores antinutricionais em amostras de massa crua e acarajés.**

de autoria

**Deusdélia Almeida Teixeira, Sabrina Feitosa, Laís Barbosa, Leticia Agnes, Ralf Greiner**

foi apresentado na SESSÃO de PÔSTER no 10 SLACA - Simposio Latino Americano de Ciéncia de Alimentos: "Impacto da Ciéncia de Alimentos na Nutrição e Saúde", realizado de 3 a 6 de Novembro de 2013, Campinas - São Paulo - Brasil.

*Mário Roberto Maróstica Jr.*  
Dr. Mário Roberto Maróstica Jr.  
Coordenador do Comitê de Programação

*Gabriela Alves Macedo*  
Dr. Gabriela Alves Macedo  
Coordenadora do Comitê Científico

*Glaucia Maria Pastore*  
Dr. Glaucia Maria Pastore  
Presidente do Evento



821541c57ac06c0eafb8083683e7052c



# Certificado

Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos  
*Ciência de Alimentos: Impacto na Nutrição e Saúde*

Certificamos que o trabalho intitulado

**Estabilidade oxidativa do óleo de palma bruto ou azeite de dendê bruto (Elaeis guineensis) empregado em fritura de acarajés.**

de autoria

**Viana, TV, Feitosa, S, Araújo, LA, Correia, LCA, Almeida, DT**

foi apresentado na SESSÃO de PÔSTER no 10 SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos: "Impacto da Ciência de Alimentos na Nutrição e Saúde", realizado de 3 a 6 de Novembro de 2013, Campinas - São Paulo - Brasil.

*Mário Roberto Maróstica Jr.*

Dr. Mário Roberto Maróstica Jr.  
Coordenador do Comitê de Programação

*Gabriela Alves Macedo*

Dra. Gabriela Alves Macedo  
Coordenadora do Comitê Científico

*Gláucia Maria Pastore*

Dra. Gláucia Maria Pastore  
Presidente do Evento



3a1f8f31305b2e521b107ec3f3504e34





# Certificado

Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos  
*Ciência de Alimentos: Impacto na Nutrição e Saúde*

Certificamos que o trabalho intitulado

**Influência do tempo de fritura sobre a estabilidade de azeite de dendê bruto (Elaeis guineensis) por RMN e a Quimiometria.**

de autoria

**Boffo, EF, Batista, CSC, Feitosa, S, Mello, LB, Almeida, DT**

foi apresentado na SESSÃO de PÔSTER no 10 SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos: "Impacto da Ciência de Alimentos na Nutrição e Saúde", realizado de 3 a 6 de Novembro de 2013, Campinas - São Paulo - Brasil.

*Mário Roberto Maróstica Jr.*

Dr. Mário Roberto Maróstica Jr.  
Coordenador do Comitê de Programação

*Gabriela Alves Macedo*

Dra. Gabriela Alves Macedo  
Coordenadora do Comitê Científico

*Gláucia Maria Pastore*

Dra. Gláucia Maria Pastore  
Presidente do Evento



e8613d2862f4be48860bf843cc1e1244