

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

## RESUMO

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

**Palavras-chave:** ácido *trans*-9,10-epoxiesteárico, monoepóxidos de ácidos graxos, óleos de fritura, citotoxicidade, células HTC

## SUMMARY

During frying, the fat or oil is subjected to oxidation at high temperature. Among the new substances formed, the monoepoxy compounds are of great importance from the nutritional point of view due to both their high absorption and their presence in significant levels. The toxicity of the monoepoxy fatty acids and its metabolites has been demonstrated. Then, further studies are necessary for the evaluation of the risks associated to the consumption of fried foods. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* cytotoxicity of the *trans*-9,10 epoxystearic acid (EPO) in a hepatic tumor cell line (HTC) through the cellular viability assay mediated by the fluorescein diacetate and ethidium bromide. Twenty four hours after seeding  $210 \times 10^3$  HTC cells in minimum essential medium into plates (35 mm), the cells were treated for 2 h at 37°C in a CO<sub>2</sub> (5%) incubator with 2.5% DMSO (solvent control) and with seven concentrations of EPO (dissolved in DMSO) in the range of 2.5 to 125 µM. The EPO (2.5 to 10 µM) was not cytotoxic compared to the control, differently from the EPO in the range of 15 to 125 µM with significant decrease of the cellular viability from 20 to 100%. The EPO and/or its metabolites formed showed a significant level of the *in vitro* cytotoxicity in metabolically competent HTC cells.

**Keywords:** *trans*-9,10 epoxystearic acid, monoepoxy fatty acids, frying oils, cytotoxicity, HTC cells

Eliana Rodrigues Machado<sup>1</sup>,  
Denise Bispo<sup>1</sup>,  
Shirley Abrantes<sup>1</sup>,  
María del Carmen Dobarganes<sup>2</sup> e  
Helena Pereira da Silva  
Zamith<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) / FIOCRUZ

<sup>2</sup>Instituto de la Grasa / CSIC – Sevilha – Espanha

\*Autora para correspondência:  
Av. Brasil, 4365  
CEP: 21040-900. Rio de Janeiro. RJ  
Fone: (21) 3865-5124  
E-mail: eliana.machado@incqs.fiocruz.br

## INTRODUÇÃO

O consumo de alimentos fritos vem crescendo a cada dia em todo o mundo, por isso, a qualidade destes alimentos deve ser garantida. Estudos têm relatado que várias substâncias de oxidação lipídica são suspeitas de prejudicar o valor nutricional dos óleos e gorduras e estão relacionadas com um grande número de doenças (1,2). Além disto, os alimentos preparados nestes processos absorvem consideravelmente o óleo, onde o mesmo está sendo preparado, e as substâncias de degradação dissolvidas nele (3). Avaliações da qualidade destes óleos e gorduras (4), também têm demonstrado a necessidade de mais estudos sobre este processo, pois foram encontradas porcentagens altas de amostras insatisfatórias, em relação a legislações internacionais (5).

Na fritura, o óleo/gordura é alterado por ação de altas temperaturas, ar e água que propiciam à formação de um número considerável de substâncias (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13).

Das substâncias provenientes desta alteração, o grupo dos monômeros de triacilgliceróis oxidados é de grande importância do ponto de vista nutricional por seu alto grau de hidrólise pela lipase pancreática, sua alta absorção em cobaias dos ácidos graxos oxidados liberados por esta enzima e sua presença nestes óleos/gorduras em níveis significativos (14, 15, 16, 10). Fazem parte desta fração, os monoepoxiácidos, um dos principais produtos em termos quantitativos (17).

Consideráveis quantidades de monoepoxiácidos foram encontradas em óleo de oliva e em óleo de girassol termoxidados a 180°C por 5, 10 e 15 h; e em óleos usados em frituras de restaurantes e lanchonetes da Espanha mostrando que estas substâncias constituem o principal grupo dentre os monômeros de ácidos graxos oxidados formados a altas temperaturas (18). Os mesmos autores verificaram que o grupo dos óleos/gorduras monoinsaturados, como o óleo de oliva, apresentou maiores quantidades do ácido 9,10-epoxiestearico do que “os polinsaturados como exemplo” o óleo de girassol; e que os isômeros *trans* foram formados em quantidades maiores que os isômeros *cis* nos óleos monoinsaturados ao contrário dos óleos polinsaturados.

A absorção de epóxidos de ácidos graxos, normalmente consumidos na dieta na forma de triacilgliceróis, foi recentemente relatada em humanos. Foi verificado que os monoepóxidos foram mais absorvidos do que os diepóxidos (19).

Com relação aos efeitos tóxicos dos epóxidos e hidróxidos de ácidos graxos, estudos demonstraram que os monoepóxidos do ácido linoléico e seus metabólitos (dióis) estão relacionados à necrose tissular em pacientes com queimaduras severas (20) e ao mecanismo de lesão aguda do pulmão em humanos (21). Também apresentou relevante citotoxicidade em sistema teste de túbulo renal

de coelho (22). Em estudos com camundongos, sugeriu-se que o 9,10-epoxi-12-octadecenoato de metila como mediador tóxico na síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) (23). 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 (24). 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, foram demonstradas (25).

## OBJETIVO

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

## MATERIAL E MÉTODO

### Material

#### Células HTC

As células HTC (*hepatoma tissue culture*) de fígado de rato (*Rattus norvegicus*) foram provenientes do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro. São células epiteliais estabelecidas a partir do líquido ascítico de hepatoma de Morris originariamente induzido em rato *inbred* macho da cepa Buffalo por carcinogênese química (26, 27). Estas células apresentam alta atividade metabólica, por isso são largamente utilizadas em pesquisas para verificar *in vitro* a influência da metabolização do fígado na toxicidade de substâncias (28).

#### Soluções

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

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

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

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

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

## Equipamentos e outros itens

Estufa de CO<sub>2</sub>; Fluxo laminar vertical; Microscópio de fluorescência equipado com filtro de excitação (515 a 560 nm), filtro de barreira de 590 nm, objetiva (aumento de 20x) e ocular (aumento 10x).

## Ensaio de viabilidade celular mediado pelo acetato de fluoresceína e brometo de etídio (29)

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

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

Para o ensaio de viabilidade celular 100 µL de cada suspensão de células obtida foi transferida para um frasco contendo

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

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

100 µL da solução corante. Após homogeneização, 100 µL da suspensão foram adicionados em lâmina microscópica seguida de colocação de lamínula para observação ao microscópio. O percentual de citotoxicidade (% de letalidade) foi obtido através da análise de duzentas células por grupo experimental.

As células viáveis mostram fluorescência verde enquanto núcleos corados em laranja indicam células mortas (30).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

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

Dados obtidos de estudos relatados em artigo (3), demonstraram que os compostos polares migram, em quantidades similares do óleo da fritadeira para batatas que estão sendo preparadas na fritura.

“A ingestão dos epóxidos de ácidos graxos pode também acontecer em decorrência da migração do óleo de soja epoxidado (OSE), presente como material plastificante e/ou vedante utilizado em polímero de poli-(cloreto de vinila) (PVC), para o alimento gorduroso em contato” (31).



# ANIDROL<sup>®</sup>

Produtos para Laboratórios



Linha Própria de Reagentes Analíticos

Soluções Tituladas e Padronizadas

Produtos controlados pelo Ministério do Exército, Polícia Federal e Civil

Pça. Paul Harris, 204 Vila Conceição Diadema - SP cep: 09991-200 Fone/Fax: (11) 4043-3555  
e-mail: [anidrol@anidrol.com.br](mailto:anidrol@anidrol.com.br) [vendas@anidrol.com.br](mailto:vendas@anidrol.com.br)  
[www.anidrol.com.br](http://www.anidrol.com.br)

A absorção do monoepóxido do ácido esteárico foi constatada, através de estudo (19) envolvendo treze mulheres aparentemente saudáveis que consumiram com a alimentação normal o ácido 9,10-epoxiesteárico marcado, obtido a partir da reação do ácido oléico com o perácido *m*-cloro peroxibenzóico, administrado na forma de triacilglicerol habitual da dieta. Como a epoxidação do ácido oléico por perácidos forma o ácido *cis*-9,10-epoxiesteárico (CIS EPO) (31), concluímos que o monoepóxido daquele estudo (19) foi o CIS EPO. Neste estudo, este ácido foi recuperado no plasma na proporção de 17%. Embora este valor de porcentagem possa não representar risco à saúde, uma baixa absorção significa níveis altos desta substância no cólon (19). Como o consumo de carne vermelha tem sido relacionado ao câncer de cólon (32), cujo mecanismo acredita-se estar relacionado à peroxidação lipídica e à formação de epóxidos de ácidos graxos (33, 34), podemos supor que estes epóxidos também representam risco a esta doença.

Os ácidos graxos depois de ingeridos são absorvidos no intestino delgado, e a partir da corrente sanguínea podem seguir três destinos: o tecido muscular, o tecido adiposo e o fígado (35). Considerando as etapas da digestão do EPO similar às dos ácidos graxos, a figura 1 sugere, com base em dados da bibliografia (24, 32, 33, 34, 35), o que ocorre no organismo quando consumimos alimentos fritos em óleos/gorduras impróprios para o uso. No fígado, esta substância seria metabolizada a seu respectivo diol (34). O mesmo ocorreria com o CIS EPO.

Um dado relevante para a discussão sobre a toxicidade dos epóxidos de ácidos graxos é que o óleo de soja epoxidado, um plastificante que é utilizado em embalagens de alimentos e que entra em contato com estes, apresenta uma ingestão diária aceitável (IDA) de 1 mg/kg de peso corpóreo (SFC apud FANKHAUSER-NOTI *et al.*, 2006, p. 1279). Sabendo-se que o OSE é composto de 53% de diepóxido do ácido linoléico, 25% de monoepóxido do ácido oléico (CIS EPO) e 7% de triepóxido do ácido linolênico e dos ácidos palmítico e esteárico não alterados (31), podemos considerar a IDA do CIS EPO de 0,25 mg/ kg de peso corpóreo. Então, a IDA desta substância para um adulto de 60 kg seria de 15 mg.

Com os dados obtidos a partir do estudo de Machado *et al.*, 2007<sup>1</sup>, os seguintes teores (em mg) do EPO foram estimados em 100 g de batata frita em óleo de palma: 28,50; na gordura hidrogenada: 18,08; e no óleo de soja: 4,18, com valores de degradação em torno de 40 %, m/m, de compostos polares. Considerando a IDA do EPO, para um adulto de 60 kg, igual ao do CIS EPO (15 mg), verifica-se que níveis do EPO acima da sua IDA poderiam ser encontrados em 100 g de batata frita preparada em óleo de palma ou em gordura hidrogenada de soja, com alto grau de degradação.

<sup>1</sup>Avaliação quantitativa de monoepoxiácidos, monocetoácidos e monohidroxiácidos em óleos e gorduras provenientes de fritura descontínua de batatas, de autoria de Eliana Rodrigues Machado *et al.*, artigo científico elaborado e a ser submetido à publicação em periódico em 2007.

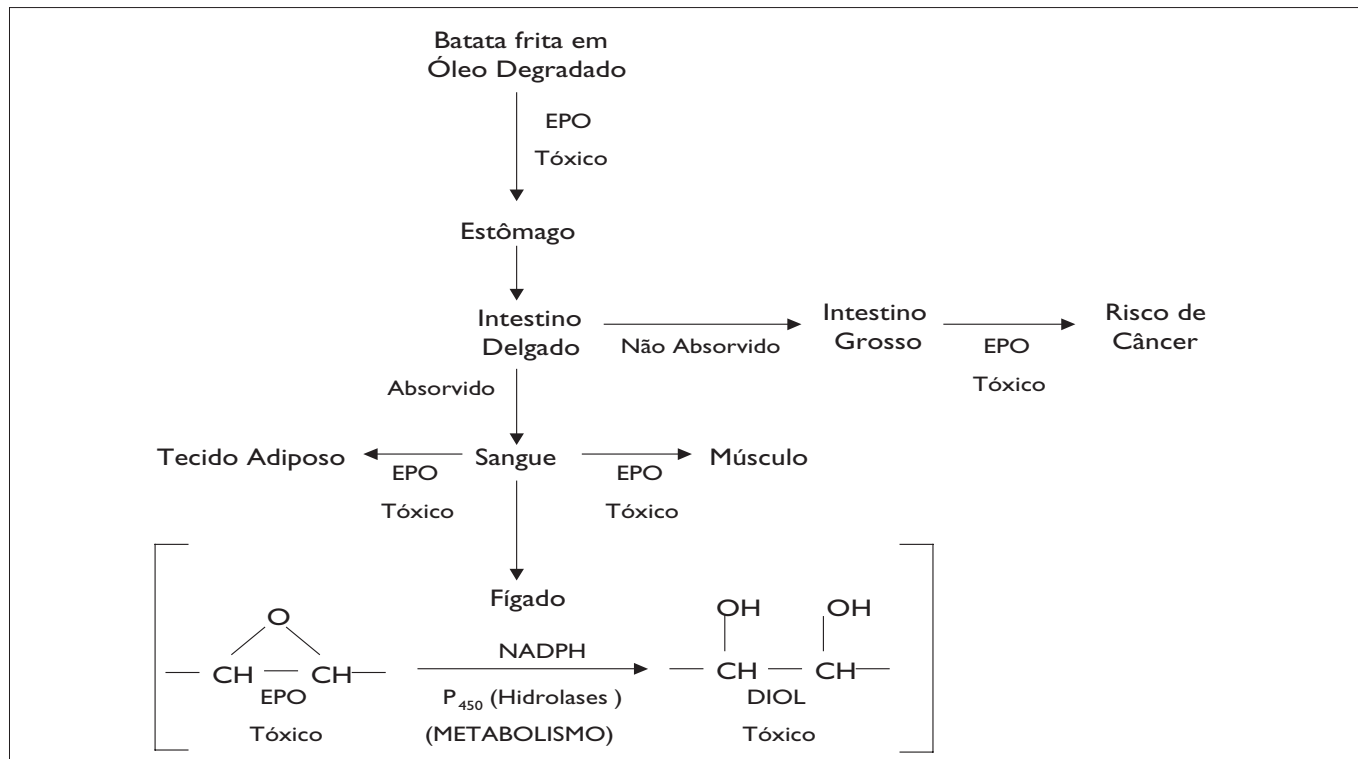


Figura 1. Prováveis destinos e metabolismo do EPO após exposição oral, suposição feita com base em dados da bibliografia (24, 32, 33, 34,35).

## CONCLUSÕES

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

Com os dados obtidos verifica-se a importância de estudos adicionais para verificar possível toxicidade dos

monômeros de triacilgliceróis oxidados formados em óleos/gorduras provenientes de frituras.

## AGRADECIMENTO

Denise Bispo agradece a bolsa da modalidade TEC-TEC recebida através do convênio FIOCRUZ / FAPERJ.

## Referências

1. COHN, J. S. Oxidized fat in the diet, postprandial lipaemia and cardiovascular disease -nutrition and metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, v. 13, n. 1, p. 19-24, 2002.
2. DOBARGANES, M. C.; MÁRQUEZ-RUIZ, G. Oxidized fats in foods. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 6, n. 2, p. 157-163, 2003.
3. DOBARGANES, M. C.; MÁRQUEZ-RUIZ, G.; VELASCO, J. Interactions between fat and food during deep-frying. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 8-9, p. 521-528, 2000.
4. SAM SAGUY, I.; DANA, D. Integrated approach to deep fat frying: engineering, nutrition, health and consumer aspects. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n. 2-3, p. 143-152, 2003.
5. DANA, D.; SAM SAGUY, I. Frying of nutritious foods: obstacles and feasibility. **Food Science Technology Research**, v. 7, n. 4, p. 265-279, 2001.
6. CHANG, S. S.; PETERSON, R. J.; HO, C. Chemical reactions involved in the deep-fat frying of foods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 55, n. 10, p. 718-727, 1978.
7. DOBARGANES, M. C.; PÉREZ-CAMINO, M. C. Fatty acid composition: a useful tool for the determination of alteration level in heated fats. **Revue Française des Corps Gras**, v. 35, n. 2, p. 67-70, 1988.
8. GASPAROLI, A. The formation of new compounds. **Grasas y Aceites**, v. 49, n. 3-4, p. 303-309, 1998.
9. JORGE, N., et al. Influence of dimethylpolysiloxane addition to edible oils: performance of sunflower oil in discontinuous and continuous laboratory frying. **Grasas y Aceites**, v. 47, n. 1-2, p. 20-25, 1996.
10. MÁRQUEZ-RUIZ, G.; TASIOLA-MARGARI, M.; DOBARGANES, M. C. Quantitation and distribution of altered fatty acids in frying fats. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 10, p. 1171-1176, 1995.
11. NAWAR, W. W. Volatile components of the frying process. **Grasas y Aceites**, v. 49, n. 3-4, p. 271-274, 1998.
12. SCHWARTZ, D. P.; RADY, A. H.; CASTAÑEDA, S. The formation of oxo-and hydroxy-fatty acids in heated fats and oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 4, p. 441-444, 1994.
13. VELASCO, J. et al. Formation of short-chain glycerol-bound oxidation products and oxidised monomeric triacylglycerols during deep-frying and occurrence in used frying fats. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 106, n. 11, p. 728-735, 2004b.
14. MÁRQUEZ-RUIZ, G.; DOBARGANES, M. C. Assessments on digestibility of oxidized compounds from [ $^{14}$ C]linoleic acid using a combination of chromatographic techniques. **Journal of Chromatography B: Biomedical applications**, v. 675, n. 1, p. 1-8, 1995.
15. MÁRQUEZ-RUIZ, G.; GUEVEL, G.; DOBARGANES, M. C. Applications of chromatographic techniques to evaluate enzymatic hydrolysis of oxidized and polymeric triglycerides by pancreatic lipase "in vitro". **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 2, p. 119-126, 1998.
16. MÁRQUEZ-RUIZ, G.; PÉREZ-CAMINO, M. C.; DOBARGANES, M. C. Digestibility of fatty acid monomers, dimers and polymers in the rat. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 69, n. 9, p. 930-934, 1992.
17. FRANKEL, E. N. Frying fats. In: LIPID Oxidation: oil. Dundee, U.K., 1998. p. 227-248.
18. VELASCO, J. et al. Formation and evolution of monoepoxy fatty acids in thermoxidized olive and sunflower oils and quantitation in used frying oils from restaurants and freid-food outlets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 14, p. 4438-4443, 2004a.
19. WILSON, R. et al. Dietary epoxy fatty acids are absorbed in healthy women. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 32, n. 2, p. 79-83, 2002.
20. 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.
21. 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.
22. MORAN, J. H. et al. Analysis of the cytotoxic properties of linoleic acid metabolites produced by renal and hepatic P450. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 168, n. 3, p. 268-272, 2000.
23. 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.
24. 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.
25. MITCHELL, L. A.; MORAN, J. H.; GRANT, D. F. Linoleic acid, cis-epoxy octadecenoic 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.
26. THOMPSON, E. B. Liver Cells (HTC). **Methods in enzymology**, v. 58, p. 544-552, 1979.
27. THOMPSON, E. B.; TOMKINS, G. M.; CURRAN, J. F. Induction of tyrosine  $\alpha$ -ketoglutarate transaminase by steroid hormones in a newly established tissue culture cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 56, p. 296-303, 1966.
28. GAD, S. C. Primary hepatocyte culture as an *in vitro* toxicologic system for the liver. In: GAD, S. C. **In Vitro Toxicology**. 2 ed., New York: Taylor & Francis, 2000. 410 p. cap. 11.
29. ENSAIO Cometa. Rev. 02. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2001. Seção 10. 62 p. (65.3330.011).
30. STRAUSS, G. H. Non-random cell killing in cryopreservation: implications for performance of the battery of leucocyte tests (BLT). 1. Toxic and immunotoxic effects. **Mutation Research**, v. 252, n. 1, p. 1-15, 1991.
31. FRANKHAUSER-NOTI, A. et al. Assessment of epoxidized soybean oil (ESBO) migrating into foods: comparison with ESBO-like epoxy fatty acids in our normal diet. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 8, p. 1279-1286, 2006.
32. VAN DER MEER, R. et al. Mechanisms of the intestinal effects of dietary fats and milk products on colon carcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 114, n. 1-2, p. 75-83, 1997.
33. BABBS, C. F. Free radicals and the etiology of colon cancer. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 8, n. 2, p. 191-200, 1999.
34. GIOVANNUCCI, E.; GOLDIN, B. The Role of fat, fatty acids and total energy intake in the etiology of human colon cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, n. 6, p. 1564S-1571S, 1997.
35. LIPÍDIOS. In: LEHNINGER, A. L. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3 ed., São Paulo: Savier, 2002. 975 p. cap. 11.