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

Aplicação de técnicas fatoriais de planejamento no desenvolvimento de
um modelo de avaliação da oxidação em óleos e emulsões

Gabriel Favalli Branco

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Inar Alves de Castro

São Paulo
2011

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

Aplicação de técnicas fatoriais de planejamento no desenvolvimento de
um modelo de avaliação da oxidação em óleos e emulsões

Gabriel Favalli Branco

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Inar Alves de Castro

São Paulo
2011

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Branco, Gabriel Favalli

B816a Aplicação de técnicas fatoriais de planejamento no desenvolvimento de um modelo de avaliação da oxidação em óleos e emulsões / Gabriel Favalli Branco. -- São Paulo, 2011.
1v. (várias paginações)

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Orientador: Castro, Inar Alves de

1. Ciência dos alimentos 2. Alimentos : Química 3. Antioxidante : Ciência dos alimentos 4. Alimentos : Estatística : Métodos I. T. II. Castro, Inar Alves de, orientador.

641 CDD

Gabriel Favalli Branco

Aplicação de técnicas fatoriais de planejamento no desenvolvimento de
um modelo de avaliação da oxidação em óleos e emulsões

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Dr^a. Inar Alves de Castro
Orientadora / Presidente

1^o. examinador

2^o. examinador

São Paulo, _____ de _____.

*À **Deus**, pelo encaminhamento, harmonia e força que me foram dados.
Aos meus pais, **Marina e Joel**, pelo amor, carinho, otimismo e apoio incondicionais.
À **Lume**, pelo amor, cumplicidade e incentivo tão essenciais neste caminho trilhado.
Esta conquista é dedicada a vocês!*

*Possuímos em nós mesmos, pelo pensamento e pela vontade, um poder de ação
que se estende muito além dos limites de nossa esfera corpórea.*

Allan Kardec

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por iluminar meus caminhos e me dar a saúde, a força e a determinação para realizar este trabalho.

À minha orientadora, professora **Inar**, pela confiança e orientação durante estes dois anos e meio. Os ensinamentos e o aprendizado foram fundamentais para esta conquista.

À minha **família**, pelo amor, carinho, incentivo e apoio durante este período, que me possibilitaram alcançar mais esta realização.

À todos os colegas de laboratório (**Camile, Cláudia, Cyntia, Daniel, Flávia, Karina, Luciene, Mariana, Michelle, Natália, Patrícia**) pelo apoio nas análises e metodologias, pelos conselhos e pela amizade.

À **Luciene** pela amizade, ajuda nas análises e inúmeros *vials* retirados da estufa.

À **Joana e Lurdinha**, pela atenção, auxílio e conversas descontraídas.

Ao professor **Luiz Antônio Gioelli** e a **Fabiana**, do Laboratório de Tecnologia de Alimentos, pelas análises de perfil de ácidos graxos e microscopia do tamanho de partícula.

À professora **Maria Isabel Rodrigues**, da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, pelo suporte e ajuda no planejamento experimental e análises estatísticas.

Ao **Edílson, Cléo e Mônica**, da Secretaria do Bloco 14, por todo auxílio e atenção.

À **Elaine e Jorge**, da Secretaria de Pós-graduação, pelo suporte e apoio disponibilizados.

Ao **Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP e à **Comissão de Pós-Graduação**, pela oportunidade de realizar este curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pela concessão do auxílio financeiro para realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela concessão de bolsa de estudos.

A todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1. Oxidação lipídica	15
2.2. Fatores que influenciam a oxidação lipídica	17
2.2.1 Pró-oxidantes	18
2.2.2 Antioxidantes	19
2.2.3 Temperatura	20
2.2.4 Emulsificante	21
2.2.5 pH	22
2.2.6 Composição da emulsão	22
2.2.7 Presença de compostos minoritários	23
2.3. Métodos de avaliação da oxidação lipídica	23
2.3.1 Índice de Peróxido (IP)	26
2.3.2 Teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)	28
2.4. Metodologia de Superfície de Resposta (RSM)	29
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo Geral	31
3.2. Objetivos Específicos	31
3.3. Etapas	31
4. METODOLOGIA GERAL	33
4.1. Planejamento experimental	33
4.2. Modelagem, otimização e validação das regressões polinomiais	34
4.3. Preparação do óleo ausente de seus componentes minoritários	35
4.4. Preparação das emulsões	35
4.5. Tamanho de partícula	35
4.6. Avaliação da oxidação lipídica	36
4.7. Análise de tocoferóis por HPLC	36
4.8. Perfil de ácidos graxos por CG	36
4.9. Avaliação de compostos naturais e artificiais	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL	38
5.1. Sistema óleo puro	39
5.2. Sistema emulsão óleo-em-água	41
6. CONCLUSÃO GERAL	44
7. REFERÊNCIAS	45
CAPÍTULO 1	i
CAPÍTULO 2	ii
ANEXOS	iii

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Métodos de determinação da extensão oxidativa	24
Tabela 2 Perfil de ácidos graxos do óleo de linhaça ausente de seus componentes minoritários e sua comparação com valores de referência.	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura molecular do SDS.....	21
Figura 2 Estrutura molecular do Tween 20.	22
Figura 3 Etapas da oxidação lipídica.....	27
Figura 4 Mecanismo de reação do TBARS	28

LISTA DE ABREVIATURAS

Fe^{2+}	íon ferroso
Fe^{3+}	íon férrico
Cu^{2+}	íon cúprico
Me^{2+}	íon metálico reduzido
Me^{3+}	íon metálico oxidado
$\text{In}^\bullet$	Iniciador
LH	ácido graxo ou lipídio
$\text{L}^\bullet$	radical acila ou lipídio-acil
$\text{LO}^\bullet$	radical alquila ou lipídio-alquil
$\text{LOO}^\bullet$	radical peroxila ou lipídio-peroxil
LOOH	hidroperóxido lipídico
LOOL, LL	produtos secundários não radicalares
Asc	ácido ascórbico
DHA	ácido desidroascórbico
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
IP	índice de peróxido
RSM	metodologia de superfície de resposta
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
CG	cromatografia gasosa
SDS	dodecil sulfato de sódio
Tween 20	polioexitlenosorbitano monolaurato
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
DCCR	delineamento composto central rotacional

APLICAÇÃO DE TÉCNICAS FATORIAIS DE PLANEJAMENTO NO DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO EM ÓLEOS E EMULSÕES

A estabilidade oxidativa em óleos e emulsões é influenciada pela ação simultânea de diversos fatores. Entretanto, a avaliação do efeito antioxidante de novos compostos tem sido conduzida utilizando-se valores fixos para esses fatores. Portanto, o objetivo deste estudo foi aplicar técnicas fatoriais para desenvolver modelos de oxidação lipídica nos quais os principais fatores pudessem variar simultaneamente. A oxidação de óleo de linhaça removido de seus componentes minoritários, determinada pela concentração de hidroperóxidos e malonaldeído (TBARS), foi avaliada em função da variação conjunta da temperatura (40 – 60 °C), concentração de ferro (0,0 – 1,0 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e de ascorbil palmitato (0,0 – 1,5 mmol/L). Os maiores valores observados para os marcadores foram obtidos a 40°C, sendo altamente dependentes da relação “ferro / ascorbil palmitato”. Adicionando-se 1,4707 mmol/L de ferro e 1,5839 mmol/L de ascorbil palmitato, a amplitude de formação de hidroperóxidos aumentou em 57%. Uma emulsão foi preparada com 1% do mesmo óleo de linhaça removido de seus componentes minoritários, utilizando-se um emulsificante aniônico sob alta pressão. A variação da temperatura, pH e concentração de ferro, cobre, ácido ascórbico, ascorbil palmitato e cloreto de sódio nos marcadores químicos da oxidação (hidroperóxidos e TBARS) foi avaliada através de um planejamento fracionário do tipo Plackett-Burman para seleção de variáveis. A seguir, o efeito das concentrações de ferro (0,0 – 1,0 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), ácido ascórbico (0,0 – 2,0 mmol/L) e pH (3,0 – 7,0) na estabilidade oxidativa das emulsões foi avaliado utilizando-se um Delineamento Composto Central. Os maiores valores dos marcadores foram obtidos adicionando-se 0,885 mmol/L de ferro e 1,700 mmol/L de ácido ascórbico à emulsão mantida a 30°C sob pH 5,51. A atividade antioxidante de seis compostos foi avaliada em ambos os modelos (óleo puro e emulsão), sendo que uma melhor discriminação entre as amostras foi observada nos sistemas otimizados. A utilização de técnicas fatoriais mostrou-se eficiente na avaliação conjunta de vários fatores que influenciam a estabilidade oxidativa de óleos e emulsões, e proporcionou um melhor poder de discriminação na atividade antioxidante de compostos naturais e artificiais.

Palavras-chave: Antioxidantes. Oxidação. Óleo puro. Emulsões. Metodologia de superfície de resposta.

APPLICATION OF FACTORIAL DESIGN TECHNIQUES ON THE DEVELOPMENT OF AN ASSESSMENT MODEL OF THE OXIDATION IN BULK OILS AND EMULSIONS

The oxidative stability in bulk oils and emulsions is affected by many factors. However, assessment of the antioxidant effect of new compounds has been carried out under fixed conditions. Thus, the objective of this study was to apply factorial techniques to develop lipid oxidation models in which the main factors vary simultaneously. Oxidation of flaxseed oil stripped of its minor components determined by the concentration of hydroperoxides and malonaldehyde (TBARS) was evaluated according to the combined variation of temperature (40 – 60 °C), iron concentration (0,0 – 1,0 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) and ascorbyl palmitate concentration (0,0 – 1,5 mmol/L). The highest observed values to these markers were obtained at 40°C, being greatly dependent on the “iron / ascorbyl palmitate” ratio. Addition of 1,4707 mmol/L of iron and 1,5839 mmol/L of ascorbyl palmitate increased the hydroperoxide formation by 57%. An emulsion was prepared with 1% of the same stripped flaxseed oil and an anionic emulsifier under high pressure. The variation of temperature, pH and iron, copper, ascorbic acid, ascorbyl palmitate and sodium chloride concentration on the chemical markers of oxidation (hydroperoxides and TBARS) was evaluated using a Plackett-Burman design to screen the variables. Following, the effect of iron concentration (0,0 – 1,0 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), ascorbyl palmitate concentration (0,0 – 2,0 mmol/L) and pH (3,0 – 7,0) on the oxidative stability of the emulsion was evaluated using a Central Composite Design. The highest observed values to these markers were obtained adding 0,885 mmol/L of iron and 1,700 mmol/L of ascorbic acid to the emulsion under 30°C and pH 5,51. The antioxidant activity of six compounds was evaluated using both models (bulk oil and emulsion), in which a better discrimination was observed for the samples in the optimized systems. The application of factorial techniques was efficient on the joint assessment of several factors that affect the oxidative stability of oils and emulsions, and provided a better discrimination power on the antioxidant activity of natural and artificial compounds.

Keywords: Antioxidants. Oxidation. Bulk oil. Emulsions. Response surface methodology.

1. INTRODUÇÃO

A oxidação lipídica é uma das maiores causas de deterioração de alimentos *in natura* e processados. Este problema é de grande importância tanto para a indústria de alimentos quanto para a segurança alimentar, uma vez que a oxidação de ácidos graxos insaturados compromete a qualidade sensorial e nutricional após a formação de produtos primários e secundários (FRANKEL, 1980; FRANKEL, 2005). Espécies reativas naturalmente presentes ou formadas em óleos e emulsões podem abstrair moléculas de hidrogênio de ácidos graxos, iniciando o processo de autooxidação e quebra da cadeia, responsáveis pela alteração de aroma, cor, textura e valor nutricional (CHAIYASIT *et al.*, 2008; MINIHANE; HARLAND, 2007). Diferentes fatores afetam a estabilidade oxidativa, tais como: composição de ácidos graxos, grau de insaturação da cadeia, presença de antioxidantes e pró-oxidantes, condições de iluminação e armazenamento, nível de oxigênio e temperatura (ABUZAYTOUN; SHAHIDI, 2006; MERRILL *et al.*, 2008). Estes fatores podem interagir entre si de maneira sinérgica ou antagônica. Portanto, é de grande interesse o desenvolvimento e aplicação de compostos e processos que possam retardar ou inibir a oxidação lipídica.

Os principais métodos aplicados para melhoria da estabilidade oxidativa incluem: modulação de embalagens (reduzindo permeabilidade de oxigênio e incidência de luz), adição de compostos com atividade antioxidante, redução do grau de insaturação dos ácidos graxos por hidrogenação ou modificação genética das sementes, redução da temperatura de armazenamento, controle de substâncias pró-oxidantes, entre outros (DECKER; ALAMED; CASTRO, 2010; GIET *et al.*, 2009; ABUZAYTOUN; SHAHIDI, 2006). Antioxidantes são quaisquer substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retardam ou inibem a oxidação desse substrato (HALLIWELL, 1999). A incorporação de antioxidantes nos alimentos é um dos métodos mais efetivos para retardar a oxidação lipídica, entretanto, muitos fatores podem afetar sua atividade, de maneira que alguns deles podem retardar a oxidação sob certas condições, mas acelerá-la em outras (HUANG *et al.*, 1994). Desta maneira, a atividade antioxidante dessas substâncias deve ser previamente avaliada antes da sua utilização em alimentos.

Os compostos antioxidantes mais comuns usados pelas indústrias de alimentos são sintetizados artificialmente. Esses compostos podem apresentar efeitos deletérios à saúde humana (SOUBRA *et al.*, 2007) e devem ser declarados nos rótulos dos alimentos, causando rejeição por parte de alguns consumidores, que associam um “rótulo limpo” com “segurança e saúde”. Pesquisadores avaliaram a atividade antioxidante de diferentes compostos naturais, sugerindo sua aplicação em matrizes alimentícias como substitutos dos artificiais (CAPITANI *et al.*, 2009; MENDIOLA *et al.*, 2010). Entretanto, poucos alimentos lipídicos disponíveis no mercado apresentam antioxidantes naturais em sua composição. Este fato pode ser consequência de fatores econômicos e da diferença entre a atividade desses compostos observada nos métodos indiretos e aquela obtida quando o novo composto é adicionado ao alimento. Contudo, métodos indiretos são úteis para avaliar a capacidade inicial de novos compostos em doar elétrons ou átomos de hidrogênio para uma espécie reativa (JIMENEZ-ALVAREZ *et al.*, 2008) e para evidenciar mecanismos de ação sem a interferência de outras moléculas que fazem parte da composição do alimento. Entretanto, após esta avaliação inicial, os novos compostos devem ser aplicados em sistemas similares à matriz alimentícia, sejam óleos ou emulsões, onde exercerão sua função antioxidante antes de serem avaliados no produto final. Além disso, diferenças significativas constatadas nos métodos indiretos podem não ser confirmadas quando esses compostos são adicionados em óleo puro ou outros sistemas similares (FRANKEL; FINLEY, 2008; LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007), tornando necessários protocolos que contribuam efetivamente para que se alcance maior consenso nesta área científica e tecnológica tão importante (FRANKEL; FINLEY, 2008). Portanto, o objetivo deste estudo foi aplicar técnicas fatoriais para desenvolver modelos de oxidação lipídica em sistemas emulsionados e não emulsionados nos quais os principais fatores pudessem variar simultaneamente.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Oxidação lipídica

Alimentos com alto teor de ácidos graxos poliinsaturados são extremamente susceptíveis à oxidação. O desenvolvimento da rancidez oxidativa é um sério problema em alguns setores da indústria alimentícia, devido ao aumento do uso de óleos poliinsaturados de peixes e vegetais, restrições ao uso de antioxidantes sintéticos e fortificação de alimentos com ferro, um conhecido pró-oxidante (FRANKEL, 1996). Além de alterações em parâmetros de qualidade, como sabor, cor, aroma, textura e valor nutricional, a oxidação produz compostos adversos à saúde (KUBOW, 1993; NAWAR, 1996; FRANKEL, 2005), tornando-se um problema econômico e de saúde pública.

A oxidação lipídica constitui-se de uma complexa série de interações químicas entre os grupamentos acil de ácidos graxos insaturados e espécies reativas de oxigênio (MCCLEMENTS; DECKER, 2000). Diferentes mecanismos químicos são responsáveis pela oxidação dos óleos durante o processamento e armazenamento, dependendo da natureza das espécies reativas presentes e da composição e natureza dos ácidos graxos (COUPLAND; MCCLEMENTS, 1996; MCCLEMENTS; DECKER, 2000).

A reação em cadeia clássica de oxidação lipídica tem como força motriz a repetida abstração dos átomos de hidrogênio por radicais peroxila ($\text{LOO}^\bullet$), formando hidroperóxidos e espécies reativas a partir de novos ácidos graxos. O processo continua indefinidamente até que não exista mais fonte de hidrogênio disponível ou que a reação em cadeia seja interrompida (GARDNER, 1989; SCHAICH, 2006). Este comportamento implica em inúmeros desafios na determinação e controle da oxidação lipídica, mostrando que a rancificação é um dos maiores problemas no armazenamento de alimentos ricos em gordura insaturada e de alimentos nos quais a oxidação lipídica conduza a alterações sensoriais que inibam seu consumo, tais como café e vinho.

O processo de oxidação lipídica em alimentos pode ocorrer de diferentes formas, entre as quais: reações hidrolíticas, catalisadas por enzimas e pela ação do calor ou umidade; oxidação enzimática, caracterizada pela ação das lipoxigenases,

que catalisam a adição de um oxigênio às ligações poliinsaturadas; fotoxidação, catalisadas pela presença de luz e raios ultravioleta na presença de fotossensibilizadores; e autooxidação, propagada na presença de oxigênio e espécies reativas (RAMALHO; JORGE, 2006).

A autooxidação é o principal mecanismo, envolvendo três etapas clássicas: iniciação, propagação e terminação (MIYASHITA, 2008). Embora seja autocatalítica, ela pode ser acelerada por pró-oxidantes, como íons de metais de transição, fotossensibilizadores, luz e certas enzimas (KANNER *et al.*, 1987; KUBOW, 1992). Na iniciação, espécies reativas ou iniciadores ($\text{In}^\bullet$) promovem a quebra homolítica da ligação hidrogênio-carbono na dupla ligação do ácido graxo, com a abstração de um hidrogênio alílico no lado carboxílico da cadeia, formando um radical acila ($\text{L}^\bullet$) (MIYASHITA, 2008). Na presença de oxigênio, este reage diretamente com o radical acila ($\text{L}^\bullet$), produzindo um radical peroxila ($\text{LOO}^\bullet$), mais reativo e que leva à formação de hidroperóxidos (LOOH) ao abstrair hidrogênios de outra dupla ligação do ácido graxo (LH) (CHOE; MIN, 2006). Além disso, radicais alquila ($\text{LO}^\bullet$) também abstraem hidrogênio dos lipídios. Os hidroperóxidos, na presença de luz, temperatura elevada e metais, sofrem β -cisão, formando produtos secundários, como aldeídos, álcoois, cetonas, ceto-ácidos, hidróxi-ácidos, hidrocarbonetos e outros compostos voláteis, que podem ser adversos à saúde de humanos e produzem sabor e odor desagradáveis (KUBOW, 1993; MIN; BOFF, 2002; GIET *et al.*, 2009).

O **Quadro 1** apresenta um resumo de cada uma das etapas do processo de autooxidação.

Quadro 1: Etapas do processo de autooxidação (Adaptado de Chaiyasit *et al.*, 2007)

Iniciação:	$\text{In}^\bullet + \text{LH} \rightarrow \text{InH} + \text{L}^\bullet$
Propagação:	$\text{L}^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{LOO}^\bullet$
	$\text{LOO}^\bullet + \text{LH} \rightarrow \text{LOOH} + \text{L}^\bullet$
Terminação:	$\text{LOO}^\bullet + \text{LOO}^\bullet \rightarrow \text{LOOL} + \text{O}_2$
	$\text{L}^\bullet + \text{LOO}^\bullet \rightarrow \text{LOOR}$
	$\text{L}^\bullet + \text{L}^\bullet \rightarrow \text{LL}$

Considerando as implicações na qualidade dos alimentos e na saúde dos consumidores, é de grande interesse o controle da oxidação lipídica nestes produtos. Medidas efetivas para a melhoria da estabilidade oxidativa incluem: processamento visando o mínimo de perda dos antioxidantes naturalmente presentes, eliminação da contaminação metálica, adição de compostos antioxidantes, embalagens que minimizam o contato do produto com o ar ou a luz, controle da temperatura de armazenamento, redução do grau de insaturação através de hidrogenação ou modificação genética das sementes, entre outros (FRANKEL, 1996; FENNEMA, 1996; DECKER *et al.*, 2010).

Devido à sua complexidade, as reações de oxidação lipídica são influenciadas por diferentes fatores, tanto intrínsecos quanto extrínsecos ao meio, os quais podem acelerar ou reduzir a velocidade de reação, devendo ser considerados nas metodologias de controle oxidativo.

2.2. Fatores que influenciam a oxidação lipídica

A oxidação lipídica é influenciada por uma série de fatores, tais como: composição de ácidos graxos do óleo, luz, temperatura, concentração e tipo de oxigênio, presença de antioxidantes, metais de transição, pigmentos, entre outros (VELASCO; DOBARGANES, 2002). Em óleos, a taxa de oxidação é dependente de fatores como temperatura, presença de pró e antioxidantes, exposição à luz e natureza dos lipídios (MIN; BOFF, 2002). Já no caso de emulsões, diferentes características físicas, como tamanho da partícula e tipo de emulsificante, também podem afetar consideravelmente a cinética de reação (KIOKIAS *et al.*, 2006). Desta maneira, esses fatores e suas interações precisam ser estudados ao se desenvolver estratégias de estabilização oxidativa, tanto no óleo puro quanto emulsionado.

Em geral, a avaliação desses fatores tem ocorrido sob uma abordagem individualizada, isto é, discutem-se seus efeitos isoladamente, o que limita os resultados obtidos nas análises. Poucos estudos têm reportado seus efeitos interativos na cinética oxidativa da forma como são abordados neste trabalho. Considerando que os fatores que alteram a estabilidade oxidativa em óleos e emulsões podem ter tanto efeitos sinérgicos quanto antagônicos entre si e

apresentarem diferentes impactos conforme o meio em que atuam, torna-se necessário conhecer detalhadamente cada um destes fatores antes de sua seleção para estudos aprofundados.

2.2.1 Pró-oxidantes

Pró-oxidantes são compostos que iniciam, facilitam ou aceleram a oxidação lipídica, estando presentes na maioria dos sistemas alimentícios. Eles podem acelerar a oxidação lipídica ao interagir diretamente com ácidos graxos insaturados, formando hidroperóxidos (lipoxigenases e oxigênio singlete), ou promovendo a formação de espécies reativas (metais de transição, pigmentos e luz ultravioleta) (CHAIYASIT *et al.*, 2007).

A geração de espécies reativas é facilitada pela presença accidental ou intencional de substâncias iniciadoras, tais como os metais de transição. Os metais de transição, como o ferro e o cobre, tem o potencial variável de acordo com o seu ligante, atuando como catalisadores de reações de transferência de elétrons (KANNER; ROSENTHAL, 1992). Os alimentos contêm menos cobre do que ferro, de maneira que o ferro é o maior pró-oxidante presente nos óleos (KOLAKOWSKA, 2003), e é introduzido na maioria dos alimentos como um contaminante durante o processamento (TAYLOR, 1987). Estes metais de transição catalisam a oxidação tanto doando quanto captando elétrons dos hidroperóxidos, decompondo-os em novas espécies reativas, conforme as equações a seguir (FRANKEL, 2005):

Oxidação do Me^{2+} (reação mais rápida)

Redução do Me^{3+} (reação mais lenta)

Algumas substâncias que retardam a oxidação lipídica sob certas condições podem promovê-la em outras (HUANG *et al.*, 1994). Este é o caso de compostos redutores, como o ácido ascórbico, que podem ter papel pró-oxidante na presença de ferro. Yen *et al.* (2002) observaram que o ácido ascórbico a 1,65mM acelerou a oxidação de desoxiribose induzida por Fe^{3+} -EDTA. O mecanismo pró-oxidativo do ácido ascórbico deve-se ao seu alto poder redutor sobre o ferro e pela baixa habilidade em seqüestrar metais. Aruoma (1996) mostrou que a formação de radicais hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) em uma mistura com H_2O_2 e Fe^{3+} é fortemente aumentada pela adição de ácido ascórbico, devido à sua ação redutora sobre o ferro, mantendo assim altos os níveis de Fe^{2+} , responsáveis pela formação de espécies reativas.

O ascorbato causa a liberação de moléculas de ferro presentes em proteínas, como a ferritina. Portanto, o ascorbato apresenta atividade pró-oxidante na presença de metais de transição e de proteínas que possuam ferro em sua composição (DECKER, 2002).

2.2.2 Antioxidantes

Antioxidantes são quaisquer substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retardam ou inibem a oxidação desse substrato (HALLIWELL, 1999). Sua incorporação em alimentos constitui um dos métodos mais efetivos para retardar a oxidação lipídica, entretanto, muitos fatores podem afetar sua atividade, de maneira que alguns compostos podem retardar a oxidação sob certas condições, mas promovê-la em outras (HUANG *et al.*, 1994; HUANG *et al.*, 1996).

Os antioxidantes podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de ação como primários ou secundários, embora algumas substâncias apresentem mais de um mecanismo e sejam classificadas como múltiplas-funções (REISCHE *et al.*, 2002). Esses mecanismos incluem: controle do substrato de reações oxidativas; captura de espécies reativas; inativação de peróxidos e outras espécies reativas de

oxigênio; controle de metais de transição; e inativação de fotossensibilizadores, do oxigênio singlete e de produtos secundários de oxidação que causam odor de ranço (MCCLEMENTS; DECKER, 2000). Além de doar átomos de hidrogênio às espécies reativas, os antioxidantes podem atuar como quelantes de íons metálicos que estão envolvidos na produção de espécies reativas de oxigênio; na decomposição de hidroperóxidos em produtos finais estáveis; ou ainda inibindo os efeitos deletérios de enzimas pró-oxidantes (CHAILLOU; NAZARENO, 2006).

Os alimentos normalmente possuem antioxidantes endógenos, como ácido ascórbico, tocoferóis, carotenóides e compostos fenólicos, que os protegem contra o dano oxidativo. Como os pró-oxidantes são tanto hidro quanto lipofílicos, os sistemas endógenos são normalmente bifásicos (DECKER, 2002).

Na presença de antioxidantes em sistemas de óleo, a energia de ativação da oxidação lipídica aumenta e as taxas de oxidação diminuem, o que pode balancear o efeito dos pró-oxidantes (FRANKEL, 1993). O comportamento dos antioxidantes em emulsões é mais complexo, uma vez que suas interações com o emulsificante, pH e pró-oxidantes alteram sua efetividade (SORENSEN, 2008). Antioxidantes hidrofílicos se mostraram menos efetivos em emulsões óleo em água do que antioxidantes lipofílicos (ABDALLA; ROOZEN, 1999). Já em óleos, os antioxidantes lipofílicos apresentam menor efetividade do que os hidrofílicos. Tal fato pode decorrer da localização dos antioxidantes, denominada de “paradoxo polar”. Os antioxidantes lipofílicos tendem a se concentrar na interface óleo-água de uma emulsão, onde podem atuar sobre as espécies reativas de maneira mais efetiva. Já no óleo puro, os antioxidantes hidrofílicos tendem a se concentrar na interface óleo-ar, ou nas pequenas partículas de água existentes no óleo, fontes de pró-oxidantes e espécies reativas (PORTER, 1993; FRANKEL, 1996).

2.2.3 Temperatura

A autooxidação de óleos aumenta com o aumento da temperatura, visto que a energia de ativação envolvida nessa reação é relativamente alta. A formação de produtos oxidativos durante o período de indução é lenta em baixas temperaturas, aumentando em estágios avançados da autooxidação (SHAHIDI; SPURVEY, 1996; VELASCO; DOBARGANES, 2002). O maior efeito do calor é o aumento da taxa de

decomposição de hidroperóxidos e consequente formação de espécies reativas e produtos secundários, acelerando a cinética oxidativa.

2.2.4 Emulsificante

A oxidação lipídica é um problema quando óleos altamente insaturados são emulsificados, como acontece na adição de fosfolipídios, já que o processo de emulsificação gera uma grande área interfacial, e a oxidação lipídica se inicia na interface entre o óleo e a água. Uma emulsão é um sistema multifásico com diferentes substâncias em diferentes fases. Os emulsificantes têm papel fundamental nos efeitos de substâncias pró e antioxidantes, uma vez que alteram a proximidade entre os glóbulos de gordura e os pró-oxidantes, antioxidantes e espécies reativas presentes em um sistema emulsionado. A possível atração ou repulsão entre estes compostos depende da estrutura e da carga elétrica do emulsificante, onde uma superfície carregada eletricamente atrai íons de cargas opostas, que podem ser tanto metais de transição quanto compostos antioxidantes (MCCLEMENTS; DECKER, 2000; SORENSEN *et al.*, 2008).

Segundo Dimakou *et al.* (2007), a oxidação lipídica em emulsões catalisada por ferro só se mostrou dependente do pH quando o tipo de emulsificante usado foi aniônico, como é o caso do SDS (**Figura 1**). Esses resultados podem ser explicados pela atração entre o ferro, carregado positivamente, e o emulsificante, carregado negativamente, o que aproxima o ferro dos glóbulos de gordura. No caso de emulsificantes não-iônicos, como o Tween (**Figura 2**), a concentração de ferro na superfície dos glóbulos de gordura independe do valor de pH, uma vez que estes não possuem carga elétrica na região interfacial.

Figura 1 Estrutura molecular do SDS.

Figura 2 Estrutura molecular do Tween 20.

2.2.5 pH

Muitos dos compostos emulsificantes utilizados em alimentos apresentam carga elétrica, como é o caso de proteínas, fosfolipídios e alguns surfactantes. Portanto, a região interfacial dos glóbulos de uma emulsão também pode apresentar carga elétrica, determinada pelo tipo e concentração dos emulsificantes presentes. Desta maneira, alterações no pH de uma emulsão podem modificar as cargas dos emulsificantes adicionados a um sistema alimentício. Estas mudanças podem influenciar a localização dos antioxidantes e dos pró-oxidantes presentes, devido às forças atrativas e repulsivas entre eles e os emulsificantes, influenciando seu efeito no sistema (MCCLEMENTS; DECKER, 2000). Sorensen *et al.* (2008) observaram que a oxidação lipídica aumenta quando o pH diminui de pH 6 para pH 3. Isto se dá especialmente quando há a presença de ferro, já que o pH baixo aumenta a solubilidade dos íons ferro e, conseqüentemente, a oxidação lipídica, por ter maior contato com a superfície interfacial. Por outro lado, Dimakou *et al.* (2007) observou que a oxidação lipídica, medida por dienos conjugados, aumentou quando o pH passou de pH 3 para pH 7, o que pode ser explicado pela utilização de um emulsificante não-iônico, que não forma cargas ao seu redor com a variação de pH e, conseqüentemente, não influencia diretamente a oxidação.

2.2.6 Composição da emulsão

A concentração de lipídios em uma emulsão pode variar desde uma pequena fração, como ocorre em sucos, até 80%, como é o caso da maionese, de maneira que esta concentração influencia a cinética oxidativa. Sims (1994) reportou que a oxidação diminuiu quando a concentração de óleo aumentou em uma emulsão de

óleo em água com sacarose. Resultados similares foram obtidos por Kiokias *et al.* (2006), que reportaram redução da deterioração oxidativa quando o teor de lipídios aumentou de 10% para 40% em emulsões de óleo de girassol. Estes resultados semelhantes sugerem que o aumento da concentração de óleo na emulsão aumenta o tamanho da partícula, reduzindo a área superficial e retardando a oxidação lipídica, que ocorre na região interfacial.

2.2.7 Presença de compostos minoritários

Alguns componentes minoritários presentes no óleo podem influenciar sua estabilidade oxidativa (CALLIGARIS; NICOLI, 2006), como tocoferóis, fenóis, esteróis, carotenóides e fosfolipídios, que possuem um efeito protetor contra espécies reativas, podendo: seqüestrar espécies reativas e inativar oxigênio singlete, retardando a oxidação; quelar íons de metais de transição, inibindo a degradação de hidroperóxidos; ou interromper a autooxidação, reagindo com os radicais peroxil. Por outro lado, alguns componentes minoritários, como ácidos graxos livres, clorofila, peróxidos e metais de transição, podem atuar como pró-oxidantes, acelerando a cinética oxidativa (CHAIYASIT *et al.*, 2008; HAL III; CUPPETT, 2000). O equilíbrio entre a ação anti e pró-oxidante de componentes minoritários vai depender da sua composição química em relação às características do sistema no qual o lipídio está presente.

A escolha dos fatores que influenciam o processo oxidativo depende dos objetivos de cada estudo e das características do meio onde ocorrerá a oxidação, podendo ser em maior ou menor número. Além deles, os métodos de mensuração dos produtos de oxidação também devem ser estudados previamente e determinados corretamente, sendo também parte fundamental nos estudos de estabilidade oxidativa.

2.3. Métodos de avaliação da oxidação lipídica

A avaliação do estado de oxidação de óleos e gorduras é essencial no controle e na garantia da qualidade de alimentos. Contudo, uma das dificuldades

para se avaliar o grau de oxidação é a escolha do método e dos marcadores químicos. Além disso, os resultados dos diversos métodos variam em função das condições aplicadas e dos substratos lipídicos utilizados (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Os métodos para a determinação da oxidação lipídica em alimentos podem ser divididos em: métodos de medida de produtos de oxidação (primários e secundários); métodos indiretos de determinação de perda de ácidos graxos insaturados, vitaminas e carotenóides; e métodos instrumentais não invasivos. Dada a complexidade dos mecanismos de oxidação de lipídios nos alimentos, mais de um método é aplicado de forma a medir os produtos primários e secundários da oxidação, onde estes últimos caracterizam mudanças sensoriais (KOLAKOWSKA, 2003). Na **Tabela 1** estão descritos alguns dos principais métodos utilizados para determinação do grau de oxidação lipídica.

Tabela 1 Métodos de determinação da extensão oxidativa (Adaptado de Fennema, 1996; Silva; Borges; Ferreira, 1999; Tong *et al.*, 2000; Marriott; Shellie, 2002; Osborn-Barnes; Akoh, 2003; Kolakowska, 2003; Castro *et al.*, 2005; Frankel, 2005; Sebranek *et al.*, 2005;).

Marcadores	Métodos	Características
Produtos primários da oxidação	<i>Índice de Peróxido (IP)</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Diferença entre a formação e a decomposição de hidroperóxidos. Resultados expressos em milimoles ou miliequivalentes de peróxido ou de oxigênio por kg de óleo/gordura. - Medido por titulação ou espectrofotometria (510nm).
	<i>Dienos conjugados (DC)</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Gerados pelo deslocamento das duplas ligações no ácido graxo. Acompanha a formação de hidroperóxidos. Medido por espectrofotometria (232nm).

**Produtos
secundários da
oxidação**

*Teste do ácido 2-
tiobarbitúrico
(TBARS)*

- Reação do malondialdeído (MDA) com o TBA, formando um complexo de cor vermelha (532-535nm).
- Determinação das “substâncias reativas ao TBA” (TBARS), expressa em milimoles de TBARS por kg de matéria graxa.

*Índice de ρ -
Anisidina (IpA)*

- Reação da ρ -anisidina com aldeídos (*trans*, *trans*-2,4-decadienal) resultantes da degradação do ácido linoléico.
- Óleo em condições adequadas deve ter IpA inferior a 10.
- Valor Totox = 2 (IP) + (IpA)

*Cromatografia
Líquida de Alta
Eficiência (HPLC)*

- Avalia o teor de MDA e outros produtos secundários da oxidação. A maioria dos autores sugere análise em fase reversa e com uso de detectores diodo (DAD), UV-Vis (ultravioleta) ou amperométricos.
- Os resultados da cromatografia apresentam elevada correlação com os resultados de análise sensorial.

*Análise de
compostos voláteis
por cromatografia
gasosa*

- Determinação de compostos voláteis (aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos).
- GC-headspace (dinâmico, estático, “purge and trap”, solid-phase microextraction).

	<i>Bidimensional GC-MS</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Separação cromatográfica abrangente, com eluição da amostra por duas colunas cromatográficas com diferentes solventes. Há possibilidade de utilização conjunta de um espectrômetro de massa.
Outros métodos	<i>Análise sensorial</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Análise descritiva qualitativa (ADQ) com provadores treinados. - Determinação de sabores e odores específicos da oxidação. Testes de aceitabilidade.
	<i>OSI (Oxidative Stability Instrument) e Rancimat</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Após iniciação forçada da oxidação utilizando temperatura de 110-130°C e corrente de ar ou de oxigênio, avalia-se o teor dos ácidos voláteis formados através de condutimetria. As condições de trabalho se assemelham ao método de oxigênio ativo (AOM).

Os métodos ideais de avaliação da oxidação lipídica devem ser simples, práticos, acessíveis e abrangentes em relação a todas as etapas da oxidação, sendo o índice de peróxido (IP) e o teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) os mais utilizados com estas características.

2.3.1 Índice de Peróxido (IP)

Os hidroperóxidos são produtos primários da oxidação, com sua taxa inicial de formação excedendo sua taxa de decomposição, comportamento que se inverte nos estágios finais do processo oxidativo (**Figura 3**). Este comportamento gaussiano faz com que um nível baixo de hidroperóxidos não represente uma boa estabilidade

oxidativa, podendo, pelo contrário, indicar alterações profundas. Desta maneira, monitorar a quantidade de hidroperóxidos em função do tempo possibilita visualizar se um lipídio está na fase ascendente ou descendente da curva de concentração. Essa informação pode ser utilizada para monitorar a aceitabilidade de alimentos em relação à extensão da sua deterioração (BERSET; CUVELIER, 1996; SHAHIDI; WANASUNDARA, 2002).

Figura 3 Etapas da oxidação lipídica (Adaptado de Frankel, 2005).

De acordo com o método clássico descrito pelo American Oil Chemists' Society (1987), os hidroperóxidos são determinados por iodometria, baseado na redução do hidroperóxido (LOOH) pelo iodeto de potássio. A quantidade de I_2 liberada é quantificada por titulação utilizando-se uma solução padrão de tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$) e um indicador de amido.

As principais desvantagens deste método são: o I_2 pode ser absorvido pelas duplas ligações dos ácidos graxos; os resultados podem sofrer alterações pela temperatura, tempo, estrutura e reatividade dos peróxidos; a titulação é difícil quando o nível de peróxidos é baixo; a utilização do índice de peróxidos está limitada aos estágios iniciais da oxidação lipídica (BERSET; CUVELIER, 1996).

A determinação de hidroperóxidos também pode ser conduzida por espectrofotometria, baseada na oxidação do Fe^{2+} para Fe^{3+} , sendo dez vezes mais sensível que a iodométrica. O complexo vermelho de Fe^{3+} sob a forma de cloreto ou tiocianato férrico é medido em espectrofotômetro a 500nm, e a técnica pode ser aplicada diretamente no extrato lipídico (BERSET; CUVELIER, 1996; JADHAV *et al.*,

1996). Trata-se de um método simples, preciso e de alta reprodutibilidade, sendo extensivamente aplicado na avaliação oxidativa de lipídios.

2.3.2 Teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)

O malondialdeído (MDA), um produto final da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, é um biomarcador confiável e muito utilizado para medida da oxidação lipídica (SHEU, 2003). O MDA é um produto minoritário da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados que reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para produzir um complexo TBA-MDA de cor rosa, com absorção a 530-532 nm (**Figura 4**). O complexo TBA-MDA é formado pela condensação de duas moléculas de TBA com uma molécula de malondialdeído. Este método pode ser aplicado diretamente na amostra, nos seus extratos ou destilados (KOLAKOWSKA, 2003).

Há certas limitações ao se utilizar o método de TBARS para avaliar o estado oxidativo dos alimentos e de sistemas biológicos, devido à sua complexidade química, de maneira que pode haver interferências e reações de diversos componentes com os reagentes, tais como compostos da reação de Maillard ou aldeídos que não provém do processo oxidativo. Além disso, o MDA forma-se preferencialmente a partir de ácidos graxos que possuam pelo menos três duplas ligações, e não é o único produto de oxidação que reage com o TBA (FRANKEL, 1993; JADHAV *et al.*, 1996). Contudo, o TBARS é um método simples e adequado para avaliar o estado oxidativo de um sistema, de maneira que seus resultados refletem a rancidez do alimento melhor que outros métodos convencionais, especialmente no aparecimento de sabores indesejáveis em óleos e gorduras (SHAHIDI; WANASUNDARA, 2002).

Figura 4 Mecanismo de reação do TBARS (Adaptado de Frankel, 2005).

A escolha correta dos fatores que influenciam a oxidação e de suas metodologias de análise permite o estudo aprofundado da estabilidade oxidativa

através de planejamentos experimentais e técnicas estatísticas de otimização, as quais fornecem resultados robustos e possibilitam o desenvolvimento de modelos preditivos.

2.4. Metodologia de Superfície de Resposta (RSM)

Metodologia de Superfície de Resposta ou “Response Surface Methodology” (RSM) é um conjunto de técnicas estatísticas úteis no desenvolvimento e otimização de processos (MYERS; MONTGOMERY, 2002). A RSM oferece uma grande quantidade de informação a partir de um número reduzido de experimentos, permitindo a observação dos efeitos interativos entre parâmetros independentes na resposta avaliada, sendo extremamente útil na otimização de processos químicos e bioquímicos (BAS; BOYACI, 2007). As técnicas de RSM são baseadas nos planejamentos fatoriais. Os mais simples tratam com um número “p” de variáveis em dois níveis, e podem ser conduzidos de forma completa ou através de frações do planejamento completo. O objetivo da aplicação dos chamados “fatoriais fracionários”, bem como dos planejamentos Plackett-Burman, é de triagem das variáveis originais ou das faixas selecionadas para a variação. A partir dos resultados obtidos nessa etapa de triagem, variáveis e faixas de variação são definidas, e ensaios mais complexos, como os planejamentos rotacionais, são conduzidos com objetivo de modelar as respostas em função desse número menor de variáveis significativas. Uma vez obtido um modelo bem ajustado, técnicas de otimização podem ser finalmente aplicadas, considerando-se um número “n” de respostas de interesse, com objetivo de identificar quais seriam as condições mais favoráveis de combinação entre essas variáveis para se alcançar o melhor resultado final.

Em resumo, sabe-se que o potencial antioxidante de diferentes compostos deve ser inicialmente avaliado através de métodos diretos e indiretos, úteis também para evidenciar os possíveis mecanismos de ação. A seguir, esses compostos devem ser avaliados em sistemas mais complexos que simulem as condições da matriz alimentícia, seja ela caracterizada por um sistema óleo ou uma emulsão.

Nessa fase, vários fatores podem alterar os resultados, sendo um deles a estreita faixa de variação nos marcadores químicos selecionados.

A influência combinada desses fatores na ampliação da faixa de variação dos resultados tem sido pouco estudada, provavelmente pela necessidade de um grande número de ensaios experimentais para se obter um resultado de interesse prático. A aplicação de técnicas fatoriais permite que se alcance essa resposta com um número menor de ensaios. Dessa forma, a utilização desses planejamentos pode ser uma alternativa para a maximização da oxidação em sistemas similares a alimentos, permitindo assim a melhor diferenciação da ação antioxidante de novos compostos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar a ação simultânea de fatores que afetam a oxidação lipídica em sistema emulsionados e não-emulsionados.

3.2. Objetivos Específicos

- Selecionar os principais fatores que afetam a oxidação lipídica, assim como a faixa de variação de cada um deles;
- Modelar a reação de oxidação em função da variação dos fatores selecionados;
- Otimizar o modelo visando ampliar a faixa de variação dos marcadores químicos utilizados para medir a reação;
- Avaliar a estabilidade oxidativa relativa proporcionada pela aplicação de antioxidantes nos modelos otimizados.

3.3. Etapas

O presente estudo foi dividido em duas etapas. Numa primeira fase, a ação catalisadora de três fatores (temperatura, concentração de Fe^{2+} e concentração de ascorbil palmitato) foi avaliada através da oxidação de um sistema contendo apenas óleo puro. Uma breve introdução, seguida da descrição da metodologia, resultados e discussão estão apresentados a seguir (Capítulo 1), na forma de artigo científico publicado no periódico *Journal of the American Oil Chemists Society*.

Os mesmos procedimentos foram aplicados numa segunda fase, na qual os fatores inicialmente designados como: temperatura, pH e concentração de Fe^{2+} , Cu^{2+} , ácido ascórbico, ascorbil palmitato e cloreto de sódio foram avaliados quanto ao seu potencial catalítico na oxidação de um sistema emulsionado. Da mesma forma que apresentado anteriormente, uma breve introdução seguida da descrição metodológica, resultados e discussão estão apresentados no Capítulo 2, na forma de artigo científico submetido à publicação.

4. METODOLOGIA GERAL

4.1. Planejamento experimental

No sistema óleo puro, três fatores foram selecionados como catalisadores da reação de oxidação: temperatura (x_1), concentração de Fe^{2+} (x_2) e concentração de ascorbil-palmitato (x_3). Já no sistema emulsão foram considerados sete fatores catalisadores: temperatura (x_1), concentração de Fe^{2+} (x_2), concentração de Cu^{2+} (x_3), concentração de ascorbil-palmitato (x_4), concentração de ácido ascórbico (x_5), concentração de cloreto de sódio (x_6) e pH (x_7). Devido a influencia dos componentes polares naturalmente presentes ou artificialmente adicionado ao óleo na estabilidade oxidativa (KHAN; SHAHIDI, 2002; DECKER; ALAMED; CASTRO, 2010), optou-se por trabalhar com o óleo de linhaça ausente de seus componentes minoritários. A linhaça foi utilizada neste modelo devido ao seu alto conteúdo de ácido α -linolênico e conseqüente alta susceptibilidade à oxidação (CHOO; BIRCH; DUFOUR, 2007).

Um planejamento fatorial completo ($2^{(3-0)}$) foi aplicado no sistema óleo puro para avaliar o efeito dos três fatores citados no óleo de linhaça ausente de seus componentes minoritários em dois níveis de variação. Baseado nos resultados obtidos neste planejamento $2^{(3-0)}$, o valor da temperatura foi fixado em 40°C e um novo planejamento fatorial completo ($3^{(2-0)}$) foi aplicado considerando-se a variação da concentração de Fe^{2+} (x_2) e da concentração de ascorbil-palmitato (x_3) em três níveis. No sistema emulsionado, um planejamento do tipo Plackett-Burman, com 12 ensaios e 3 pontos centrais, foi utilizado para identificar os fatores mais significativos na oxidação da emulsão óleo-em-água. Baseado nos resultados obtidos neste planejamento, aplicou-se um Delineamento Central Composto Rotacional com 14 ensaios e 3 pontos centrais, fixando o valor da temperatura em 30°C, variando-se a concentração de Fe^{2+} (x_1), a concentração de ácido ascórbico (x_2) e o pH (x_3) em cinco níveis. Tal delineamento teve como objetivo estimar as interações simultâneas entre estes fatores dentro das suas faixas de variação, e determinar o nível de cada fator que maximizaria a oxidação na emulsão.

Amostras de óleo (0,5mL) e emulsão (1,0 mL) foram transferidas para vials abertos e fechados, respectivamente, e armazenados no escuro sob temperatura fixa (L.S. 1.0 A, Logen Scientific, Brasil) por um determinado período de tempo. Em diferentes intervalos de tempo, o óleo e a emulsão foram retirados para avaliação dos marcadores químicos da oxidação. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.2. Modelagem, otimização e validação das regressões polinomiais

Os resultados foram expressos como média ($\pm$ desvio padrão) e submetidos a testes de homogeneidade (Hartley) e análise de variância univariada (ANOVA one-way), adotando 0,05 como valor alfa. A partir dos dados experimentais foram obtidos modelos de regressão.

Com base no planejamento experimental do sistema óleo puro, um modelo linear foi ajustado aos resultados do primeiro planejamento experimental (2^3): $\hat{y}_i = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \beta_3 \cdot x_3 + \beta_{12} \cdot x_1 x_2 + \beta_{13} \cdot x_1 x_3 + \beta_{23} \cdot x_2 x_3 + \beta_{123} \cdot x_1 x_2 x_3$; e um modelo quadrático foi ajustado aos resultados do segundo planejamento experimental (3^2): $\hat{y}_i = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_{11} \cdot x_{11} + \beta_2 \cdot x_2 + \beta_{22} \cdot x_{22} + \beta_3 \cdot x_3 + \beta_{33} \cdot x_{33} + \beta_{12} \cdot x_1 x_2 + \beta_{13} \cdot x_1 x_3 + \beta_{23} \cdot x_2 x_3 + \beta_{123} \cdot x_1 x_2 x_3$; onde: $\hat{y}_i$ = resposta estimada; b_i = coeficientes estimados pelo método dos mínimos quadrados e x_i = variáveis dependentes. O coeficiente de determinação (R^2 ajustado) e ANOVA foram aplicados para avaliar a qualidade dos modelos. Em seguida, estes modelos obtidos foram otimizados baseando-se na metodologia proposta por Derringer e Suich (1980). A validação foi realizada baseando-se em três pontos nas condições de interesse dentro da superfície e aplicando-se os mesmos procedimentos experimentais usados para construir os modelos.

Considerando o sistema emulsionado e seu planejamento experimental, um modelo quadrático foi ajustado aos resultados do delineamento composto central rotacional (DCCR): $\hat{y}_i = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_{11} \cdot x_{11} + \beta_2 \cdot x_2 + \beta_{22} \cdot x_{22} + \beta_3 \cdot x_3 + \beta_{33} \cdot x_{33} + \beta_{12} \cdot x_1 x_2 + \beta_{13} \cdot x_1 x_3 + \beta_{23} \cdot x_2 x_3 + \beta_{123} \cdot x_1 x_2 x_3$; onde: $\hat{y}_i$ = resposta estimada; b_i = coeficientes estimados pelo método dos mínimos quadrados e x_i = variáveis dependentes. O coeficiente de determinação (R^2 ajustado) e ANOVA foram

aplicados para avaliar a qualidade dos modelos. Além disso, estes modelos obtidos foram otimizados baseando-se na metodologia proposta por Derringer e Suich (1980). A validação foi realizada baseando-se em cinco pontos nas condições de interesse dentro da superfície e aplicando-se os mesmos procedimentos experimentais usados para construir os modelos. As análises estatísticas e os gráficos foram conduzidos utilizando o software estatístico Statistica v.9 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

4.3. Preparação do óleo ausente de seus componentes minoritários

O óleo de linhaça foi separado dos seus componentes minoritários de acordo com o método proposto por Khan e Shahidi (2002) e modificado por Waraho et al. (2009). O óleo ausente de seus componentes minoritários foi armazenado a -80°C até utilização. Todos os procedimentos foram realizados mantendo o óleo resfriado em banho de gelo e protegido da luz.

4.4. Preparação das emulsões

A emulsão de óleo em água foi preparada utilizando-se 1% (v/v) de óleo de linhaça ausente de seus componentes minoritários em uma solução tampão de acetato de sódio-imidazol (10mM e 10mM), contendo 1% de emulsificante SDS. As amostras foram preparadas através da mistura do óleo com a fase aquosa e homogeneizadas em quatro passagens (pressão de 300 bar) usando um homogeneizador de alta pressão (A-10, Alitec, Brasil). Após a homogeneização, o pH de cada emulsão foi ajustado utilizando-se HCl ou NaOH. As amostras foram protegidas da exposição à luz e mantidas em banho de gelo.

4.5. Tamanho de partícula

O tamanho de partícula das emulsões óleo-em-água foi medido por microscopia. Com o auxílio de um tubo capilar colocou-se uma gota de amostra

sobre lâmina de vidro e cobriu-se com uma lamínula. As lâminas prontas foram analisadas em microscópio de luz polarizada (BX-50, Olympus, EUA) ligado a uma câmera de vídeo digital (Media Cybernetics, EUA), na qual foram capturadas imagens com aumento de 40x pelo aplicativo Image Pro-Plus versão 4.5.1.22 for Windows (Media Cybernetics). A análise foi realizada em quadruplicata e, a partir das imagens capturadas, os tamanhos das partículas foram determinados.

4.6. Avaliação da oxidação lipídica

As concentrações de hidroperóxidos, expressas em meq L⁻¹ LOOH, foram determinadas de acordo com o método descrito por Shantha e Decker (1994) com modificações, utilizando-se uma curva padrão construída com hidroperóxido de cumeno. As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), expressas em mmol L⁻¹ TBARS, foram determinadas utilizando-se um método modificado descrito por McDonald e Hultin (1987) e através de uma curva padrão, construída com 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP).

4.7. Análise de tocoferóis por HPLC

O conteúdo de tocoferóis do óleo de linhaça foi determinado utilizando-se o método proposto por Gliszczynska-Swiglo e Sikorska (2004) com modificações. Os tocoferóis (α , γ + β e δ) foram expressos como mg kg⁻¹ óleo. Óleo de soja foi utilizado para comparação de resultados.

4.8. Perfil de ácidos graxos por CG

Os ácidos graxos foram transformados em ésteres metílicos segundo o método 5509 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2000). A análise foi realizada em cromatógrafo a gás Varian GC, modelo 430 GC, equipado com injetor automático, detector de ionização de chama e “Varian’s

Galaxie Chromatography Software”. Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida SP-2560 (Supelco, EUA), com 100 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno e contendo 0,2 μ m de polietilenoglicol dentro da coluna. As condições foram: injeção split, razão de 50:1; temperatura da coluna: 140 °C por 5 minutos, programada até 240 °C numa razão de 4 °C/min; gás de arraste: hélio, em pressão isobárica de 37 psi; velocidade linear de 20 cm/s; gás make-up: hélio a 29 mL/ min; temperatura do injetor: 250 °C; temperatura do detector: 250 °C. A composição qualitativa foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos com os respectivos padrões de ácidos graxos. A composição quantitativa foi realizada por normalização de área, sendo expressa como porcentagem em massa, de acordo com o método oficial AOCS Ce 1-62 (AMERICAN OIL CHEMISTS’ SOCIETY, 1987). Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os valores apresentados correspondem às médias destes valores.

4.9. Avaliação de compostos naturais e artificiais

Na última etapa de cada sistema, seis compostos (Trolox, ácido cafeico, ácido gálico, catequina, α -tocoferol e TBHQ) foram diluídos em metanol e adicionados ao óleo de linhaça ausente de seus componentes minoritários (0.0, 50.0, 100.0, 150.0 e – 200.0 mg/kg) e sua emulsão óleo-em-água 1% (v/v) (0.0, 0.5, 1.0, 1.5 mM) nas condições otimizadas. As concentrações de hidroperóxidos e TBARS foram determinadas em todas as amostras através das mesmas metodologias descritas anteriormente. Para o sistema óleo, modelos polinomiais foram ajustados à “concentração de produtos de oxidação x concentração do composto” e utilizados para determinar o valor de IC_{50} de cada composto. Já para o sistema emulsão, os resultados obtidos no modelo otimizado foram comparados com aqueles obtidos no modelo não-otimizado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL

A avaliação da estabilidade oxidativa é um processo complexo que envolve a utilização de ao menos duas técnicas analíticas para obter uma descrição adequada do processo (MCCLEMENTS; DECKER, 2000). A escolha dos marcadores químicos para descrever o processo depende de muitos fatores, incluindo: composição de ácidos graxos, presença de compostos polares minoritários, temperatura, exposição à luz e superfície de exposição. Além disso, pequenas variações nesses fatores podem alterar profundamente os valores dos marcadores químicos, dificultando a comparação da ação antioxidante de novos compostos.

A recente demanda por produtos com antioxidantes naturais, em especial em alimentos funcionais, suplementos nutricionais e produtos orgânicos, tem incentivado a realização de estudos que comparam a ação de compostos naturais com artificiais. A maioria desses estudos utiliza metodologias indiretas para avaliar este potencial antioxidante, através de diferentes métodos de indução de oxidação e diferentes marcadores químicos (FRANKEL; FINLEY, 2008). Embora estes métodos sejam simples e permitam avaliar diferentes amostras de uma vez, na maioria dos casos há uma baixa correlação entre seus efeitos e aqueles observados quando aplicados em óleos puros ou emulsões. Portanto, não há um método geral e confiável para determinar a capacidade antioxidante, nem mesmo *in vitro* (NIKI, 2010).

A discrepância entre os resultados obtidos nos métodos indiretos e aqueles quando os compostos são aplicados diretamente em óleos e emulsões pode ocorrer devido à estreita faixa de variação possível dos marcadores, dificultando a visualização de diferenças significativas. Desta maneira, a proposta deste trabalho foi de desenvolver um modelo que avaliasse a oxidação do óleo puro e emulsionado com marcadores químicos simples ampliando sua faixa de variação.

5.1. Sistema óleo puro

A oxidação do óleo de linhaça ausente de seus componentes minoritários nos planejamentos fatoriais completos $2^{(3-0)}$ e $3^{(2-0)}$ foi avaliada pelos seguintes parâmetros: a concentração máxima de hidroperóxidos (LOOH_{max}); o tempo necessário para se alcançar o LOOH_{max} ; a concentração máxima de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ($\text{TBARS}_{\text{max}}$) e a área calculada pela integral da curva de peróxidos entre o tempo zero e o tempo quando o máximo valor de LOOH (LOOH_{max}) foi alcançado (AUC_{LOOH}). As diferenças significativas entre todos os ensaios nos quatro parâmetros ($p < 0.001$) permitiram o ajuste dos modelos aos dados experimentais.

O aumento da temperatura acelerou a decomposição dos hidroperóxidos e a volatilização dos produtos secundários, resultando em concentrações menores de produtos primários e secundários, conforme indicado pelos valores reduzidos de LOOH_{max} , $\text{TBARS}_{\text{max}}$ e AUC_{LOOH} . Como o objetivo deste projeto era de alcançar os maiores níveis de produtos de oxidação, o valor da temperatura foi fixado em 40°C para o segundo planejamento fatorial. A presença de Fe^{2+} também acelerou as reações de oxidação, já que este metal promove a decomposição de LOOH em $\text{LO}^{\bullet}$, $\text{LOO}^{\bullet}$, $\text{OH}^{\bullet}$ e H^+ , exponencializando as taxas de oxidação e reduzindo o tempo necessário para se alcançar os valores de pico. A presença do ascorbil palmitato resultou em efeitos tanto anti- quanto pró-oxidantes, dependendo da sua concentração e da interação com outros compostos, como o Fe^{2+} . Sua ação como antioxidante deve-se à sua capacidade redutora, inativação de metais, redução da formação e decomposição de LOOH e retirada oxigênio de sistemas aquosos (FRANKEL, 2005). Seu efeito pró-oxidante ocorre ao manter o Fe^{2+} em seu estado reduzido, que atua 100 vezes mais rápido que a forma oxidada (CHOE; MIN, 2006), aumentando consequentemente a taxa de oxidação e a decomposição de LOOH . Esta reação explica o claro efeito sinérgico que o Fe^{2+} e o ascorbil palmitato apresentam na oxidação lipídica.

A qualidade dos modelos foi expressa através do valor de probabilidade (p) da replicata, analisada neste estudo como bloco, do valor de probabilidade p relativo à “falta de ajuste” e do coeficiente de determinação ajustado (R^2_{adj}). Os modelos polinomiais para ambos os planejamentos fatoriais completos $2^{(3-0)}$ e $3^{(2-0)}$ mostraram

qualidade de ajuste, conforme mostrado pela não significância associada à “falta de ajuste”, bem como pelos altos valores de R^2_{adj} (>0.94).

A otimização considerando as quatro respostas sugeriu que a maior faixa de variação dos marcadores pode ser alcançada com o óleo de linhaça ausente de seus componentes minoritários contendo Fe^{2+} na concentração de 1,47 mmol/L e ascorbil palmitato na concentração de 1,58 mmol/L, mantido a 40°C por 8 dias, demonstrando um claro efeito sinérgico entre estes dois fatores. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os valores experimentais e estimados para as quatro respostas nos três pontos aleatórios, sugerindo a alta qualidade dos modelos utilizados neste estudo.

A atividade antioxidante dos compostos escolhidos para testar o modelo foi avaliada pela concentração de LOOH, concentração de TBARS e seus valores IC_{50} , isto é, a concentração de um antioxidante necessária para inibir 50% da oxidação. Todos os compostos apresentaram homogeneidade de variâncias ($p>0.5$) e diferenças significativas ($p<0.001$) entre as amostras, indicando que o modelo foi adequado para a avaliação de compostos naturais e artificiais. Além disso, o presente modelo foi desenvolvido utilizando a maioria das condições recomendadas por Frankel e Finley (2008), incluindo o uso de um substrato oxidável (óleo de linhaça), condições brandas de oxidação (abaixo de 60°C), baixos níveis iniciais de produtos de oxidação, e acompanhamento de todos os estágios do processo oxidativos (8 dias).

A análise de tocoferóis do óleo de linhaça com e sem seus componentes minoritários mostrou ausência de α -, β + γ - e δ -tocoferol em ambas amostras. Valores de 0,0 a 5,0 mg kg⁻¹ óleo e de 100 a 150 mg kg⁻¹ óleo eram esperados para α - e γ -tocoferol, respectivamente (CHOO; BIRCH; DUFOUR, 2007). A ausência de tocoferóis na amostra original poderia ser justificada tanto pelo processamento (refino) pelo qual as amostras foram submetidas, quanto pela oxidação do tocoferol durante o transporte e armazenamento. O óleo de soja também foi avaliado e apresentou 156.81 $\pm$ 6.65 mg/kg de α -tocoferol, 676.15 $\pm$ 3.18 mg/kg de β + γ -tocoferóis e 244.59 $\pm$ 1.81 mg/kg de δ -tocoferol, Houve ausência de tocoferóis no óleo de soja retirado de componentes minoritários (stripped). Este comportamento sugere que o método de stripping usado neste estudo foi adequado para remover componentes minoritários do óleo. Embora nenhum tocoferol tenha sido encontrado no óleo de linhaça utilizado neste experimento, o processo de stripping foi

importante para remover outros componentes minoritários que poderiam interferir no processo oxidativo.

O perfil lipídico do óleo de linhaça ausente de seus componentes minoritários se mostrou proporcionalmente semelhante àquele disponível na literatura (**Tabela 2**), indicando que o método de extração não afetou significativamente a composição de triglicerídeos do óleo. As diferenças observadas podem ser atribuídas à oxidação do óleo durante seu transporte e a possíveis diferenças nas variedades de sementes de linhaça utilizadas na produção do óleo.

Tabela 2 Perfil de ácidos graxos do óleo de linhaça ausente de seus componentes minoritários e sua comparação com valores de referência.

Principais Ácidos Graxos		% referência (USDA, 2010)
C16:0 - Ácido palmítico	6,11 ± 0,02	5,30
C18:0 - Ácido esteárico	4,99 ± 0,00	4,10
C18:1n9c - Ácido oléico	28,09 ± 0,01	20,20
C18:2n6c - Ácido linoléico	20,30 ± 0,05	12,70
C18:3n6 - Ácido gama-linolênico	0,19 ± 0,01	n.d.*
C20:1n9 - Ácido cis-11-eicosenóico	0,31 ± 0,00	0,00
C18:3n3 - Ácido alfa-linolênico	39,91 ± 0,03	53,30
C22:0 - Ácido Behenico	0,11 ± 0,01	n.d.*

*n.d. – não disponível

5.2. Sistema emulsão óleo-em-água

A estabilidade oxidativa da emulsão de óleo de linhaça ausente de seus componentes minoritários nos planejamentos Plackett-Burman e DCCR foi avaliada pelos seguintes parâmetros: a concentração máxima de hidroperóxidos (LOOH_{max}); o tempo necessário para se alcançar o LOOH_{max} ; e a concentração máxima de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ($\text{TBARS}_{\text{max}}$). As emulsões óleo-em-água 1% (v/v) estabilizadas utilizando-se SDS apresentaram partículas com diâmetro médio de $76,3 \pm 13,2 \mu\text{m}$ (amplitude de $63,2 \pm 24,0 \mu\text{m}$ a $92,5 \pm 37,1 \mu\text{m}$).

No planejamento Plackett-Burman, a temperatura foi a variável mais importante para ambos marcadores (LOOH_{max} e $\text{TBARS}_{\text{max}}$), uma vez que seu incremento de 30°C para 60°C reduziu significativamente ($p < 0,001$) as

concentrações de LOOH_{max} e $\text{TBARS}_{\text{max}}$. Como o objetivo deste estudo foi ampliar a faixa de variação dos marcadores, a temperatura foi fixada no seu menor nível (30°C) para o segundo planejamento. A concentração de LOOH aumentou ($p < 0.001$) quando o pH mudou de 3,0 para 7,0, e nenhum outro efeito significativo foi observado nas outras cinco variáveis para esse marcador. Este resultado é suficientemente confiável, já que a curvatura estatisticamente significativa evita que outras variáveis significativas sejam mascaradas pelo alto erro padrão proveniente da variação do ponto central. Em relação à TBARS , além da temperatura, a concentração de ácido ascórbico e o pH apresentaram efeitos significativos neste marcador. O aumento do pH de 3,0 para 7,0 reduziu a concentração de TBARS , enquanto a presença de ácido ascórbico (2mmol/L) mostrou resultado oposto, aumentando a concentração. Não foi constatada nenhuma influência das outras quatro variáveis na resposta de TBARS .

Desta maneira, apenas três variáveis afetaram a oxidação da emulsão na faixa de valores estudada: temperatura, pH e concentração de ácido ascórbico. Como a temperatura foi fixada em seu menor valor, pH e concentração de ácido ascórbico foram as variáveis selecionadas para o próximo planejamento. Devido à interação redox amplamente conhecida e reportada na literatura sobre sistemas contendo ferro e ácido ascórbico, optou-se por incluir esta terceira variável (Fe^{2+}). Portanto, no segundo planejamento, um DCCR foi aplicado para modelar o comportamento oxidativo da emulsão quando pH, concentração de ácido ascórbico e de ferro variam dentro de uma faixa de valores pré-definida. Todos os modelos apresentaram boa qualidade de ajuste aos dados experimentais e, por esta razão, superfícies de contorno foram elaboradas baseadas neles. O objetivo de realizar um DCCR foi avaliar as interações e otimizar as condições de oxidação.

No DCCR, diversas possibilidades de interação podem ser avaliadas quando há três variáveis independentes. A maior vantagem desta metodologia é que a análise de interações pode ser customizada de acordo com as condições da emulsão. No presente estudo, a interação entre ácido ascórbico e ferro foi avaliada em função da variação de pH para valores de LOOH_{max} e $\text{TBARS}_{\text{max}}$. Em pH 3,0 valores reduzidos de LOOH foram observados quando ferro e ácido ascórbico estavam presentes nas concentrações máximas. Por outro lado, sob pH neutro, a formação de LOOH foi independente da concentração de ferro, aumentando sua quantidade apenas quando as concentrações de ácido ascórbico eram menores que

1mmol/L. De maneira oposta ao observado para os valores de LOOH, em pH 3,0 valores elevados de TBARS foram observados quando ferro e ácido ascórbico estavam em suas concentrações máximas. Em condições de neutralidade, os valores elevados de TBARS foram praticamente independentes da concentração de ferro, ocorrendo apenas quando as concentrações de ácido ascórbico eram maiores que 1mmol/L.

Tendo em vista a otimização do sistema, três marcadores químicos foram considerados na construção da função de desejabilidade: valores máximos de LOOH_{max} e $\text{TBARS}_{\text{max}}$, e valores mínimos para o tempo necessário para se alcançar LOOH_{max} . A combinação de fatores que alcançou 85% da função de desejabilidade foi de 0,885 mmol/L Fe^{2+} e 1,700 mmol/L ácido ascórbico em pH de 5,51, associados com o fator pré-fixado de 30°C e tempo de 36 horas. Objetivando a validação do modelo construído, o ponto otimizado e mais quatro pontos adicionais foram analisados quanto às suas respostas de LOOH_{Max} , $\text{TBARS}_{\text{max}}$ e tempo. Não foram observadas diferenças significativas entre os valores estimados e experimentais para todas as respostas. Como última etapa, seis compostos tiveram sua atividade antioxidante avaliada em base molar usando a emulsão em duas condições: oxidação otimizada e não-otimizada pela metodologia de superfície de resposta. A comparação entre os dois sistemas para valores de LOOH_{max} e $\text{TBARS}_{\text{Max}}$, expressos como porcentagem de inibição, mostrou que o sistema otimizado permitiu uma melhor discriminação entre as amostras.

6. CONCLUSÃO GERAL

A utilização de planejamentos experimentais associados à metodologia de superfície de resposta (RSM) possibilitou a seleção dos principais fatores que afetam a oxidação lipídica, bem como a maximização da faixa de variação dos marcadores da oxidação e a modelagem da reação oxidativa do óleo puro e emulsionado. A otimização aumentou o poder discriminativo das amostras de antioxidante avaliadas. Este trabalho apresenta modelos simples, práticos, facilmente reproduzíveis e com elevado poder discriminativo para avaliar o efeito antioxidante potencial de compostos naturais e artificiais em óleo puro e emulsões, beneficiando as metodologias diretas hoje existentes. Além disso, estes modelos apresentam capacidade preditiva, permitindo a avaliação de outras combinações entre os fatores.

7. REFERÊNCIAS

ABDALLA, A.E.; ROOZEN, J.P. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. *Food Chemistry*, v.64, n.3, p.323–329, 1998.

ABUZAYTOUN, R.; SHAHIDI, F. Oxidative stability of flax and hemp oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.83, n.10, p.855-861, 2006.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. 4.ed. Champaign: AOCS Press, 1987. [Method Cd 8-53 and Ce 1-62].

ARUOMA, O.I. Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.73, n.12, p.1617-1625, 1996.

BAS, D.; BOYACI, I.H. Modeling and optimization I: usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, v.78, n.3, p.836-845, 2007.

BERSET, C.; CUVELIER, M.-E. Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power. *Sciences des Aliments*, v.16, p.219-245, 1996.

CALLIGARIS, S.; NICOLI, M.C. Effect of selected ions from lyotropic series on lipid oxidation rate. *Food Chemistry*, v.94, n.1, p.130-134, 2006.

CAPITANI, C.D.; CARVALHO, A.C.L.; BOTELHO, P.B.; CARRAPEIRO, M.M.; CASTRO, I.A. Synergism on antioxidant activity between natural compounds optimized by response surface methodology. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.111, n.11, p.1100-1110, 2009.

CASTRO, I.A.; MORAES BARROS, S.B.; LANFER MARQUEZ, U.M.; MOTIZUKI, M.; HIGASHI SAWADA, T.C. Optimization of the antioxidant capacity of a mixture of carotenoids and α -tocopherol in the development of a nutritional supplement. *Food Research International*, v.38, n.8/9, p.861-866, 2005.

CHAILLOU, L.L.; NAZARENO, M.A. New method to determine antioxidant activity of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, n.22, p.8397-8402, 2006.

CHAIYASIT, W.; ELIAS, R.J.; McCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.47, n.3, p.299-317, 2007.

CHAIYASIT, W.; McCLEMENTS, D.J.; WEISS, J.; DECKER, E.A. Impact of surface-active compounds on physicochemical and oxidative properties of edible oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, n.2, p.550-556, 2008.

CHOE, E.; MIN, D.B. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.5, n.4, p.169-186, 2006.

CHOO, W.-S.; BIRCH, J.; DUFOUR, J.-P. Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed flaxseed oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.20, n.3/4, p.202-211, 2007.

COUPLAND, J.N.; McCLEMENTS, D.J. Lipid oxidation in food emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, v.7, n.3, p.83-91, 1996.

DECKER, E.A. Antioxidant mechanisms. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B., eds. *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2002. cap.16, p.517-542.

DECKER, E.A.; ALAMED, J.; CASTRO, I.A. Interaction between polar components and the degree of unsaturation of fatty acids on the oxidative stability of emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.87, n.7, p.771-780, 2010.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, v.12, n.4, p.214-219, 1980.

DIMAKOU, C.P.; KIOKIAS, S.N.; TSAPROUNI, I.V.; OREOPOULOU, V. Effect of processing and storage parameters on the oxidative deterioration of oil-in-water emulsions. *Food Biophysics*, v.2, n.1, p.38-45, 2007.

FENNEMA, O.R., ed. *Food chemistry*. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. 1067p. (Food Science and Technology).

FRANKEL, E.N. Lipid oxidation. *Progress in Lipid Research*, v.19, n.1/2, p.1-22, 1980.

FRANKEL, E.N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends in Food Science & Technology*, v.4, n.7, p.220-225, 1993.

FRANKEL, E.N. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chemistry*, v.57, n.1, p.51-55, 1996.

FRANKEL, E.N. *Lipid oxidation*. 2.ed. Bridgewater: Oily Press, 2005. p.391-405. (Oily Press lipid library, v.18).

FRANKEL, E.N.; FINLEY, J.W. How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, n.13, p.4901-4908, 2008.

GARDNER, H.W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biology & Medicine*, v.7, n.1, p.65-86, 1989.

GIET, J.M.; AGUEDO, M.; DANTHINE, S.; PAQUOT, M.; THOMAS, A.; VANDENBOL, M.; THONART, P.; WATHELET, J.P.; BLECKER, C.; LOGNAY, G. Enzymatic interesterification of anhydrous milk fat with rapeseed and/or linseed oil: oxidative stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, n.15, p.6787-6794, 2009.

GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A.; SIKORSKA, E. Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. *Journal of Chromatography, A*, v.1048, n.2, p.195-198, 2004.

HALL III, C.A.; CUPPETT, S.L. Rosmariquinone interactions in autoxidation and light-sensitized oxidation of stripped soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.77, n.9, p.937-943, 2000.

HALLIWELL, B.; MURCIA, M.A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O.I. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.35, n.1/2, p.7–20, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3.ed. Oxford: Clarendon Press; New York: Oxford University Press, 1999. p.285, 293, 625. (Oxford Science Publications).

HUANG, S.W.; FRANKEL, E.N.; GERMAN, J.B. Antioxidant activity of alpha-tocopherols and gamma-tocopherols in bulk oils and oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.42, n.10, p.2108-2114, 1994.

HUANG, S.W.; HOPIA, A.; SCHWARZ, K.; FRANKEL, E.N.; GERMAN, J.B. Antioxidant activity of alpha-tocopherol and trolox in different lipid substrates: bulk oils vs oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.44, n.2, p.444–452, 1996.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 5509: animal and vegetable fats and oils -- preparation of methyl esters of fattyacids. Geneva: ISO, 2000.

JADHAV, S.J.; NIMBALKAR, S.S.; KULKARNI, A.D.; MADHAVI, D.L. Lipid oxidation in biological and food systems. In: MADHAVI, D.L.; DESHPANDE, S.S.; SALUNKHE, D.K., eds. *Food antioxidants: technological, toxicological, and health perspectives*. New York: Marcel Dekker, 1996. p.5-64. (Food science and technology, 71).

JIMENEZ-ALVAREZ, D.; GIUFFRIDA, F.; VANROBAEYS, F.; GOLAY, P.A.; COTTING, C.; LARDEAU, A.; KEELY, B.J. High-throughput methods to assess

lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity of food extracts in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, n.10, p.3470-3477, 2008.

KANNER, J.; GERMAN, J.B.; KINSELLA, J.E. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.25, n.4, p.319-364, 1987.

KANNER, J.; ROSENTHAL, I. An assessment of lipid oxidation in foods. *Pure and Applied Chemistry*, v.64, n.12, p.1959-1964, 1992.

KHAN, M.A.; SHAHIDI, F. Photooxidative stability of stripped and non-stripped borage and evening primrose oils and their emulsions in water. *Food Chemistry*, v.79, n.1, p.47-53, 2002.

KIOKIAS, S.N.; DIMAKOU, C.P.; TSAPROUNI, I.V.; OREOPOULOU, V. Effect of compositional factors against the thermal oxidative deterioration of novel food emulsions. *Food Biophysics*, v.1, n.3, p.115-123, 2006.

KOLAKOWSKA, A. Lipid oxidation in food systems. In: SIKORSKI, Z.E.; KOLAKOWSKA, A., eds. *Chemical and functional properties of food lipids*. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.133-166. (Chemical and functional properties of food components series).

KUBOW, S. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Radical Biology & Medicine*, v.12, n.1, p.63-81, 1992.

KUBOW, S. Lipid oxidation products in foods and atherogenesis. *Nutrition Reviews*, v.51, n.2, p.33-40, 1993.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, v.46, n.5, p.244-282, 2007.

MARRIOTT, P.J.; SHELLIE, R. Principles and applications of comprehensive two-dimensional gas chromatography. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*, v.21, n.9/10, p.573-583, 2002.

McCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, v.65, n.8, p.1270–1282, 2000.

McDONALD, R.E.; HULTIN, H.O. Some characteristics of the enzymic lipid peroxidation system in the microsomal fraction of flounder skeletal muscle. *Journal of Food Science*, v.51, n.1, p.15-21, 27, 1987.

MENDIOLA, J.A.; MARTIN-LVAREZ, P.J.; SENORANS, F.J.; REGLERO, G.; CAPODICASA, A.; NAZZARO, F.; SADA, A.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. Design of natural food antioxidant ingredients through a chemometric approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.58, n.2, p.787-792, 2010.

MERRILL, L.I.; PIKE, O.A.; OGDEN, L.V.; DUNN, M.L. Oxidative stability of conventional and high-oleic vegetable oils with added antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.85, n.8, p.771-776, 2008.

MIN, D.B.; BOFF, J.M. Lipid oxidation of edible oil. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B., eds. *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2002. cap.11, p.335-363.

MINIHANE, A.M.; HARLAND, J.I. Impact of oil used by the frying industry on population fat intake. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.47, n.3, p.287-297, 2007.

MIYASHITA, K. Oxidation of long-chain polyunsaturated fatty acids. In: KAMAL-ELDIN, A.; MIN, D.B., eds. *Lipid oxidation pathways*. 2.ed. Urbana: AOCS Press, 2008. v.2, p.55-76.

MYERS, R.H.; MONTGOMERY, D.C. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. 2.ed. New York: John Wiley, 2002. p.1-16. (Wiley series in probability and statistics).

NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.R., ed. Food chemistry. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. 1067p. (Food science and technology).

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. Free Radical Biology & Medicine, v.49, n.4, p.503-515, 2010.

PORTER, W.L. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. Toxicology and Industrial Health, v.9, n.1/2, p.93-122, 1993.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. Química Nova, v.29, n.4, p.755-760, 2006.

REISCHE, D.W.; LILLARD, D.A.; EITENMILLER, R.R. Antioxidants. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B., eds. Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2002. cap.15, p.489-516.

SCHAIK, K. Lipid oxidation in specialty oils. In: SHAHIDI, F., ed. Nutraceutical and specialty lipids and their co-products. Boca Raton: CRC Press; London: Taylor & Francis, 2006. p.401-448. (Nutraceutical science and technology, 5).

SEBRANEK, J.G.; SEWALT, V.J.H.; ROBBINS, K.L.; HOUSER, T.A. Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. Meat Science, v.69, n.2, p.289-296, 2005.

SHAHIDI, F.; SPURVEY, S.A. Oxidative stability of fresh and heat-processed dark and light muscles of mackerel (*Scomber scombrus*). Journal of Food Lipids, v.3, n.1, p.13-25, 1996.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U.N. Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B., eds. Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2002. cap.14, p.465-487.

SHANTHA, N.C.; DECKER, E.A. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, v.77, n.2, p.421-424, 1994.

SHEU, J.; KU, H.; TSENG, W.; CHEN, M.; TSAI, L.; HUANG, Y. Determination of thiobarbituric acid adduct of malondialdehyde using on-line microdialysis coupled with high-performance liquid chromatography. *Analytical Sciences*, v.19, n.4, p.621-623, 2003.

SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, v.22, n.1, p.94-103, 1999.

SIMS, R.J. Oxidation of fats in food products. *INFORM*, v.5, p.1020-1028, 1994.

SORENSEN, A.D.M.; HAAHR, A.M.; BECKER, E.M.; SKIBSTED, L.H.; BERGENSTAHL, B.; NILSSON, L.; JACOBSEN, C. Interactions between iron, phenolic compounds, emulsifiers and pH in omega-3-enriched oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, n.5, p.1740-1750, 2008.

SOUBRA, L.; SARKIS, D.; HILAN, C.; VERGER, P. Dietary exposure of children and teenagers to benzoates, sulphites, butylhydroxyanisol (BHA) and butylhydroxytoluen (BHT) in Beirut (Lebanon). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.47, n.1, p.68-77, 2007.

WARAHO, T.; CARDENIA, V.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T.; McCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Prooxidant mechanisms of free fatty acids in stripped soybean oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, n.15, p.7112-7117, 2009.

TAYLOR, A.J. Effect of water quality on lipid oxidation. *Food Science & Technology Today*, v.1, p.158-159, 1987.

TONG, L.M.; SASAKI, S.; McCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Antioxidant activity of whey in a salmon oil emulsion. *Journal of Food Science*, v.65, n.8, p.1325-1329, 2000.

USDA. National Nutrient Database for Standard Reference. 2010. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>. Acesso em: 7 dez. 2010.

VELASCO, J.; DOBARGANES, C. Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.104, n.9/10, p.661-676, 2002.

YEN, G.C.; DUH, P.D.; TSAI, H.L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry*, v.79, n.3, p.307-313, 2002.

CAPÍTULO 1

Optimization of Oil Oxidation by Response Surface Methodology and the Application of this Model to Evaluate Antioxidants

Gabriel Favalli Branco · Inar Alves Castro

Received: 29 November 2010 / Revised: 5 April 2011 / Accepted: 18 April 2011
© AOCS 2011

Abstract The oxidative stability of oils is a complex process influenced by several factors, making the evaluation of antioxidant effects of new compounds difficult. Thus, the objective of this study was to apply a factorial design to obtain the combination of factors that maximizes the formation of oil oxidation products, and use this model to evaluate the antioxidant activity of different compounds. Temperature, Fe^{2+} and ascorbyl palmitate were evaluated in two full-factorial designs (2^3 and 3^2). The validated optimized oxidation model was obtained by adding 1.47 mmol/L of Fe^{2+} and 1.54 mmol/L of ascorbyl palmitate to flaxseed oil stripped of tocopherol kept at 40 °C for 8 days. Antioxidant activities of six compounds were evaluated using this model. All antioxidant samples were statistically different ($p < 0.001$) at 200 ppm concentration, indicating the efficiency of the optimized model to evaluate the antioxidant action of natural and synthetic compounds.

Keywords Oil · Flaxseed · Minor components · Response surface methodology · Oxidation · Antioxidants

Introduction

Foods and edible oils with high contents of polyunsaturated fatty acids are especially susceptible to oxidative damage [1]. Oxidation of the edible oils is a natural reaction that is

favorable by many factors including heat, fatty acid composition, oxygen contact, light, absence of minor components such as tocopherols and polyphenols and the presence of free fatty acids, transition metals, pigments, and thermally oxidized compounds [2]. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids is a free chain reaction that includes the steps of initiation, propagation and termination (Fig. 1). In the initiation, a free radical or initiator ($\text{In}^\cdot$) abstracts the hydrogen atom from the fatty acids or acylglycerol (LH) producing a lipid alkyl radical ($\text{L}^\cdot$), that will react very quickly with oxygen forming lipid peroxy radicals ($\text{LOO}^\cdot$). In the autoxidation process, the lipid alkyl radical abstracts hydrogen from other lipid molecules and reacts with oxygen to form hydroperoxides (LOOH) and another lipid alkyl radical ($\text{L}^\cdot$). In the presence of the metals or under high temperature the hydroperoxides are readily decomposed to alkoxy radicals ($\text{LO}^\cdot$) and then form aldehydes, ketones, acids, esters and others secondary compounds [2].

Besides the alterations caused in the quality properties of flavor, color, texture and nutritional value, lipid oxidation leads to the formation of several secondary products that have mutagenic capacity and high toxicological potential [3, 4]. For this reason, many strategies have been developed to avoid the oxidation of oils and food emulsions. One of these strategies involves the addition of antioxidants (AH), which are compounds that extend the induction period of oxidation or slow the oxidation rate [4]. Antioxidants (AH) can donate hydrogen atoms to free radicals ($\text{In}^\cdot$) or react with lipid peroxy radicals ($\text{LOO}^\cdot$) faster than lipids (LH). Antioxidants can also convert metal ions into insoluble complexes [2], through scavenging activity (Fig. 1). Generally, antioxidants have reduction potentials (≈ 500 mV) lower than those of free radicals (≈ 600 – $1,600$ mV), and their own radicals are stabilized by resonance [2].

G. F. Branco · I. A. Castro (✉)
Department of Food and Experimental Nutrition,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo,
Av. Lineu Prestes 580 B14, 05508-900 São Paulo, Brazil
e-mail: inar@usp.br

G. F. Branco
e-mail: gabrielfavalli@gmail.com

Fig. 1 Scheme of lipid oxidation considering the prooxidant effect of Fe^{2+} and ascorbyl palmitate (Fe^{2+} , ferrous ion; Fe^{3+} , ferric ion; LH, lipid alkyl; $\text{L}^\cdot$, lipid alkyl radical; $\text{LO}^\cdot$, alkoxy radical; $\text{LOO}^\cdot$, peroxy radical; LOOH , hydroperoxide; AH, antioxidant; $\text{A}^\cdot$, antioxidant radical; Asc, ascorbic acid; DHA, dehydroascorbic acid; $\text{In}^\cdot$, initiator; InH , stable initiator). (Adapted from 5, 3, 33)

Synthetic food additives such as butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) and *tert*-butyl hydroquinone (TBHQ) are widespread chain-breaking antioxidants used in food systems [1, 5]. These compounds may be toxic [6, 7] and must be declared on the oil or food labels, causing rejection by consumers who associate a “clean label” with “safety and health” [4]. Several researchers have reported the antioxidant activities of a number of natural compounds, suggesting their use to replace synthetic antioxidants in foods [1, 8].

A large number of studies apply *in vitro* methodologies to evaluate the potential antioxidant action of compounds, using a wide variety of free radical generating systems, different methods of inducing oxidation and different endpoints or chemical markers [9]. The most widely applied methods have been DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity, ORAC (oxygen radical absorption capacity), ABTS⁺ (2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) cation radical and FRAP (ferric reducing antioxidant power) [10]. Although these *in vitro* methodologies are very simple and allow the assessment of several samples at the same time, correlations with results observed in bulk oils or emulsions are not always high or significant. Confusing results have been reported depending on the protocols, methods and conditions used to test the antioxidant activity [9]. Therefore, despite numerous studies on this topic, there is no general and official method for assessing antioxidant capacity [11]. This discrepancy can be attributed to many factors, including fatty acid composition, surface area, storage conditions, and the presence of minor components. One factor less discussed in the literature is the

short range of variation of the chemical markers or endpoints used to measure the oxidation. In other words, the magnitude between minimum and maximum values of the chosen markers might be too narrow to reveal statistically significant differences in the antioxidant activities of different compounds. For this reason, a stripped oil rich in polyunsaturated fatty acids as the oxidizable substrate could be useful, if the oxidation conditions are optimized, as a model for oxidation. Among the factors able to increase the oil oxidation are temperature, iron and ascorbic acid content. Temperature is probably the most influential factor when assessing the extent of oxidation. Transition metals fully participate in the radical autoxidation mechanism via $\cdot\text{OH}$ radicals. Ascorbic acid is a well-known prooxidant rather than an antioxidant in the presence of transition metal ions, such as iron [10].

According to Frankel and Finley [9], more valid and rigorous guidelines and assay protocols are required to shed light on discrepancies found in antioxidant literature. Thus, the objective of this study was to apply response surface methodology (RSM) to optimize oil oxidation, and then to use this optimized model to evaluate the antioxidant activities of different compounds.

Experimental Procedures

Materials

Iso-octane, 2-propanol, methanol, hexane and 1-butanol were obtained from Merck & Co. (Whitehouse Station, NJ,

Table 1 Primary and secondary products of the oil oxidation observed in the first $2^{(3-0)}$ full factorial design

Assay	Coded Factors			Original Range			Oil Oxidation Products			
	Temp (x_1)	Fe ²⁺ (x_2) ^a	Asc (x_3) ^b	Temp (x_1) °C	Fe ²⁺ (x_2) ^a mmol kg ⁻¹ oil	Asc (x_3) ^b mmol kg ⁻¹ oil	LOOH _{max} ^c meq kg ⁻¹ oil	Time ^d days	TBARS _{max} mmol kg ⁻¹ oil	AUC _{LOOH} ^e meq days kg ⁻¹ oil
1	-1.0	-1.0	-1.0	40	0.0	0.0	655.35	08	15.7	2365.60
2	1.0	-1.0	-1.0	60	0.0	0.0	569.34	06	14.0	1209.57
3	-1.0	+1.0	-1.0	40	1.0	0.0	700.35	07	19.9	1677.52
4	+1.0	+1.0	-1.0	60	1.0	0.0	617.36	07	15.3	1287.17
5	-1.0	-1.0	+1.0	40	0.0	1.5	626.97	10	18.7	3426.68
6	+1.0	-1.0	+1.0	60	0.0	1.5	458.36	09	15.0	1863.68
7	-1.0	+1.0	+1.0	40	1.0	1.5	740.57	09	27.0	2924.06
8	+1.0	+1.0	+1.0	60	1.0	1.5	492.17	04	11.7	1217.43
9 ^f	+1.0	+1.0	+1.0	60	1.0	1.5	476.92	04	12.4	1211.06
Pooled SD							98.49	—	16.6	800.60
P (Hartley) ^g							0.731	0.999	0.440	0.174
P (ANOVA) ^h							<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^a Iron (II) sulfate heptahydrate (Fe²⁺)^b Ascorbyl palmitate^c Maximum hydroperoxides concentration^d Days to achieve the maximum hydroperoxide concentration^e Area under the hydroperoxides formation curve (relative only to the ascendant part)^f Replicate of the assay number 8^g Probability value obtained from Tests of Homogeneity of Variances (Hartley)^h Probability value obtained from one-way ANOVAⁱ Values expressed as means $\pm$ SD ($n = 2$)

USA). The soybean oil was purchased at a local market. Flaxseed oil (stored in the dark at 4 °C), ammonium thiocyanate, barium chloride, iron(II) sulfate heptahydrate, 2-thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA), butylated hydroxytoluene (BHT), silicic acid, activated charcoal, 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP), cumene hydroperoxide, ascorbyl palmitate, α -tocopherol, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), tocopherol, caffeic acid, gallic acid, catechin and *tert*-butyl hydroquinone (TBHQ) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The organic solvents and water were HPLC grade. All other reagents used in the experiment were analytical grade.

Crude and refined oils contain endogenous antioxidants that may compete with the tested antioxidants, which could markedly bias the results [10]. Thus, we opted to use an oil that was stripped of its minor compounds. Flaxseed (or linseed) was used in this model because of its high content of α -linolenic acid and high susceptibility to oxidation [12]. The oil was stripped of tocopherol according to the method proposed by Khan and Shahidi [13] and modified by Waraho et al. [14].

Experimental Design and Statistical Analysis

Two different experimental designs were applied in this study. The objective of the first design was to screen the variables that had a significant influence on all of the evaluated responses. Usually, designs containing two levels (2^k) are applied to screen variables. Once the variables were selected, a second design was carried out to identify the curvature of the responses so as to obtain a better adjustment of the models to the experimental data and for further optimization.

First Design

The objective of the first design was only to identify which of the selected factors were relevant to the oxidative reaction and to determine the behavior of these variables. For this reason, a full-factorial design ($2^{(3-0)}$) was applied to evaluate the effect of three factors on stripped flaxseed oil oxidation at two variation levels: -1 and $+1$. The factors were temperature (x_1), Fe²⁺ (ferrous ion) content (x_2) and ascorbyl palmitate content (x_3); and the design is shown in Table 1. The responses were firstly submitted to a

homogeneity test (Hartley) and to an one-way ANOVA, adopting 0.05 as the p value. These proceedings are necessary because there is no reason to use a regression model when the results do not present variation. In our study, all the measurements were replicated, and the results were separated into two blocks. In addition, an extra assay was performed to add one more degree of freedom, which was useful for checking the model's quality. This extra additional assay is usually carried out in the central point, but in our study we opted to duplicate the last point. This decision was because in the beginning of the experimental design some qualitative variables (with no central point) had been included, however, they were removed after preliminary tests. Based on the results from the nine assays with replication, a total of seventeen degrees of freedom were used to fit the model:

$$\hat{y}_i = \beta_0 + \beta_1 \times x_1 + \beta_2 \times x_2 + \beta_3 \times x_3 + \beta_{12} \times x_1 x_2 + \beta_{13} \times x_1 x_3 + \beta_{23} \times x_2 x_3 + \beta_{123} \times x_1 x_2 x_3 \quad (1)$$

where $\hat{y}_i$ = estimated response, b_i = coefficients estimated by the least square method and x_i = dependent variables. Non-significant coefficients were excluded and the models were readjusted. The coefficient of determination (Adjusted R^2) and ANOVA were applied to check the models' quality. Based on the first design analysis, the temperature was kept at 40 °C. Both Fe^{2+} and ascorbyl palmitate were the variables selected for the second experimental design, in order to determine what relative content of these two compounds would yield the highest oil oxidation.

Second Design

A new factorial design ($3^{(2-0)}$) was applied to the variables selected from the first design. Fe^{2+} and ascorbyl palmitate were chosen as factors based on the significance of their β 's coefficients observed to all responses, showing contrary signals to $\text{LOOH}_{\max}$ (maximum concentration of hydroperoxides), $\text{TBARS}_{\max}$ (maximum concentration of thiobarbituric acid reactive substances) and AUC_{LOOH} (area under the curve), while the effect of temperature (β_1) presented negative signals for all responses. Fe^{2+} and ascorbyl palmitate had a range within three levels (Table 2), designated as -1 , 0 and $+1$. This new design allows the model curvature to be detected and requires nine assays. There were other design options to investigate the model curvature, such as the central composite or Box Behnken designs, but we applied a 3^2 full factorial design because it seemed rapid enough to achieve the objectives of this study. Similar to the first design, an additional point was included, and all of the assays were performed twice. Thus,

nineteen degrees of freedom were used to adjust the following second-order model:

$$\hat{y}_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

where $\hat{y}_i$ = estimated response, b_i = coefficients estimated by the least square method, x_i = dependent variables. The same proceedings applied in the first design were also used to check the fitness of the models obtained from this second design. In addition, the models obtained for the four responses were optimized based on methodology proposed by Derringer and Suich [15]. Optimization was achieved by looking for the maximum values for AUC_{LOOH} , $\text{LOOH}_{\max}$ and $\text{TBARS}_{\max}$ as well as the minimum values for time to achieve the $\text{LOOH}_{\max}$ (TIME). Validation was carried out based on three randomized points ($x_1 = 0.73$ mmol/L and $x_2 = 0.71$ mmol/L; $x_1 = 0.20$ mmol/L and $x_2 = 2.60$ mmol/L; and $x_1 = 1.81$ mmol/L and $x_2 = 1.32$ mmol/L) by applying the same experimental procedures used to build the models. The observed and estimated values were compared by a Chi square test. Statistical analysis and graphical representations were calculated using STATISTICA v.9 software (Statsoft Inc., Tulsa, OK).

Preparation of Minor Polar Component-Stripped Oils

Flaxseed oil was stripped of tocopherol according to the methodology proposed by Khan and Shahidi [13] and modified by Waraho et al. [14]. Briefly, samples were prepared by dissolving 30 g of oil in 100 mL of hexane. Then, the mixture was passed through a chromatographic column (29.5-mm ID, 350 mm in length; Wilmad Labglass No.:LG-4567T-130 w/Fritted Disc and PTFE Stopcock). The process was repeated adding 100 mL of hexane through the chromatographic column, and after adding another 70 mL of hexane. The bottom layer of the column was packed with 22.5 g of silicic acid that had been washed three times with distilled water, filtered and activated at 110 °C for 24 h according to Waraho et al. [14]. A middle layer of 5.625 g of activated charcoal and a top layer of 22.5 g of washed, filtered and activated silicic acid were used in the column. The solvent from the eluate was removed using a rotary evaporator (Rotavac valve tec, Heidolph, Germany) at 30 °C. Traces of hexane were removed by flushing the column with nitrogen. The stripped and non-stripped oils were stored at -80 °C until use. The column containing the oil was protected from light using aluminum foil paper. The stripped oil was received in an Erlenmeyer flask also covered by foil paper and immersed in an ice bath.

Table 2 Primary and secondary products of the oil oxidation observed in the second $3^{(2-0)}$ full factorial design

Assay	Coded factors		Original range		Oil oxidation products (responses)			
	$\text{Fe}^{2+}(x_1)^a$	Asc $(x_2)^b$	$\text{Fe}^{2+}(x_1)^a$ mmol kg ⁻¹ oil	Asc $(x_2)^b$ mmol kg ⁻¹ oil	$\text{LOOH}_{\text{max}}^c$ meq kg ⁻¹ oil	Time ^d days	$\text{TBARS}_{\text{max}}$ mmol kg ⁻¹ oil	$\text{AUC}_{\text{LOOH}}^e$ meq days kg ⁻¹ oil
1	-1.0	-1.0	0.0	0.0	655.35	8	15.67	2365.88
2	-1.0	0.0	0.0	1.5	626.97	10	18.69	3424.89
3	-1.0	+1.0	0.0	3.0	675.51	8	25.45	1620.63
4	0.0	-1.0	1.0	0.0	700.35	7	18.63	1680.11
5	0.0	0.0	1.0	1.5	740.57	9	26.99	2925.74
6	0.0	+1.0	1.0	3.0	536.62	10	38.25	2663.57
7	+1.0	-1.0	2.0	0.0	760.70	9	35.44	2858.70
8	+1.0	0.0	2.0	1.5	737.01	7	30.82	1688.05
9	+1.0	+1.0	2.0	3.0	728.66	8	39.33	2475.52
10 ^f	+1.0	+1.0	2.0	3.0	721.41	8	39.01	2357.77
Pooled SD					66.18	—	8.86	584.83
<i>P</i> (Hartley) ^g					0.531	0.998	0.073	0.189
<i>P</i> (ANOVA) ^h					<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^a Iron (II) sulfate heptahydrate (Fe^{2+})^b Ascorbyl palmitate^c Maximum hydroperoxides concentration^d Days to achieve the maximum hydroperoxide concentration^e Area under the hydroperoxides formation curve (relative only to the ascendant part)^f Replicate of the assay number 9^g Probability value obtained from Tests of Homogeneity of Variances (Hartley)^h Probability value obtained from one-way ANOVAⁱ Values expressed as means $\pm$ SD ($n = 2$)

Lipid Oxidation Measurements

Ascorbyl palmitate was added directly to the oil according to the concentration described in Table 1 and 2 (original range). Iron (II) sulfate heptahydrate was first diluted in a mixture of water and Tween 20 (1.0%, w/w) (27.8 mg/5.0 mL) and then added to the oil (250 μL /5.0 g oil). The oil samples (0.5 mL) were transferred to 1.5-mL, opaque, unsealed vials and stored in the dark at a fixed temperature (40 °C) in an oven (L.S. 1.0 A, Logen Scientific, Diadema, SP) for twelve days. At different time intervals, two vials from each assay were taken to evaluate the chemical markers of oxidation. All assays were performed in duplicate.

Lipid hydroperoxide concentrations were determined according to procedures of Shanta and Decker [16] with some modifications. Oil samples (50 μL) were mixed with 1.75 mL of an iso-octane/2-propanol solution (3:1, v/v), which resulted in a final volume of 1.80 mL. The mixture was vortexed three times for 10 s, and 20 μL of the mixture was added to a 2.98 mL solution of methanol/1-butanol (2:1, v/v). The final volume of the sample was 3.0 mL. A thiocyanate/ferrous solution was prepared by mixing 500 μL of 3.94 M thiocyanate solution with 500 μL of

0.072 M Fe^{2+} solution. The 0.072 M Fe^{2+} solution was obtained from the supernatant of a mixture of 1.5 mL 0.144 M FeSO_4 and 1.5 mL 0.132 M BaCl_2 in 0.4 M HCl. The thiocyanate/ferrous solution (30 μL) was added to the methanol/1-butanol mixture (3.0 mL), vortexed and incubated at room temperature for 20 min. Following the incubation period, the samples' absorbance readings were measured at 510 nm using a UV-Vis mini 1240 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). Due to the high concentrations of hydroperoxides, some samples were diluted in a methanol/1-butanol mixture prior to reading, with dilutions ranging from 1:10 to 1:20 (v/v). The hydroperoxide content was determined using a standard curve prepared with known concentrations of cumene hydroperoxide. Concentrations were expressed as meq kg⁻¹ oil. Lipid hydroperoxide concentrations were measured for 12 days. During this time, all assays showed an increase, followed by a reduction in their hydroperoxide concentration. The values obtained during the ascendant phase were considered for analysis. Based on these data, a cubic-order polynomial function was fitted for each sample. The maximum hydroperoxide concentration (LOOH_{max}) and the area under the curve (AUC_{LOOH}) were selected as markers of the primary products of the oxidation. AUC

values were calculated using MATHEMATICA v.7 software (Wolfram Research Inc., Champaign, IL).

The amount of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the samples was determined using a modified method from McDonald and Hultin [17]. The oil (0.02 mL) was diluted with 0.98 mL of an iso-octane/2-propanol mixture (3:1, v/v), mixed with 2.0 mL of TBA reagent (15% w/v trichloroacetic acid and 0.375% w/v thiobarbituric acid in 0.25 M HCl, mixed with 2% BHT in ethanol) in test tubes and placed in a boiling water bath for 15 min. The tubes were cooled at room temperature for 10 min then centrifuged at 1,000g for 15 min. The absorbances were read at 532 nm using a UV-Vis mini 1240 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). Due to the high concentrations of TBARS, some samples were diluted in an iso-octane/2-propanol mixture (3:1, v/v), with dilution factors ranging from 1:10 to 1:40 (v/v). The concentrations of TBARS were determined based on a standard curve prepared using 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP). The concentrations were expressed as mmol kg^{-1} oil. The TBARS concentration was followed for 12 days and only the ascendant part of the curve was analyzed. The maximum TBARS concentration ($\text{TBARS}_{\text{max}}$) was selected as a marker of secondary products from oxidation.

Evaluation of the Natural and Synthetic Compounds using the Optimized Model

Trolox (0.0, 2.0, 4.0, 6.0 and 8.0 mg), α -tocopherol (0.0, 2.0, 4.0, 6.0 and 8.0 mg), caffeic acid (0.0, 2.0, 4.0, 6.0 and 8.0 mg), gallic acid (0.0, 2.0, 4.0, 6.0 and 8.0 mg), catechin (0.0, 2.0, 4.0, 6.0 and 8.0 mg) and TBHQ (0.0, 2.0, 4.0, 6.0 and 8.0 mg) were dissolved in 2.0 mL methanol, and 25 μL of each solution was mixed with 0.5 mL stripped flaxseed oil, Fe^{+2} (1.47 mmol/L) and ascorbyl palmitate (1.54 mmol/L). The solutions were protected from air and light by keeping them covered and adding nitrogen inside the tubes. Vials containing 0.5 mL of the solutions were kept at 40 °C for 8 days. Hydroperoxide and TBARS concentrations were determined for all samples following the methodologies described above. A second-degree polynomial model was adjusted to the “oxidation products concentration x compound concentration” and was used to determine the IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) value for each compound.

HPLC Analysis of Tocopherols

The flaxseed oil tocopherol content was determined using a modified method of Gliszczynska-Swiglo and Sikorska [18]. All analyses were performed using an HPLC (Agilent Technologies 1200 series, Santa Clara, CA, USA),

equipped with a Zorbax Reverse-phase C18 column (150 mm x 4.6 mm; 5 μm) with pre-column LC8-D8 (Phenomenex AJ0-1287, Torrance, USA). For the determination of α , ($\beta + \gamma$) and δ -tocopherols in the oils, a mobile phase consisting of 50% acetonitrile (solvent A) and 50% methanol (solvent B) was used with a flow rate of 1 mL/min and an isocratic method under a constant pressure of 34 bar. The injection volume was 20 μL and a rheodyne-type injector was used. The eluate, containing 0.125 mL oil sample plus 1.125 mL isopropanol, was detected using a diode array detector (DAD) set at 292 nm. Tocopherols (α , $\beta + \gamma$ and δ) were identified by comparing their retention times with those of corresponding standards. Results were expressed as mg kg^{-1} oil. To validate tocopherol results, soybean oil was also subjected to the stripping process and tocopherol analysis.

Results and Discussion

A tocopherol analysis of both full and stripped flaxseed oil showed an absence of α -, $\beta + \gamma$ - and δ -tocopherols. Values from 0.0 to 5.0 mg kg^{-1} oil and from 100.0 to 150 mg kg^{-1} oil were expected for α - and $\beta + \gamma$ -tocopherol, respectively [12]. We attribute the differences between our experimental values and the expected values to the processing (refining) applied on our samples or to the possibility that tocopherol oxidization could have occurred during transportation. Soybean oil was also evaluated, containing α - ($156.81 \pm 6.65 \text{ mg/kg}$), $\beta + \gamma$ - ($676.15 \pm 3.18 \text{ mg/kg}$) and δ - ($244.59 \pm 1.81 \text{ mg/kg}$) tocopherols. In contrast, no tocopherols were found in the stripped form of soybean oil. This pattern suggests that the stripping method used in this assay was suitable to remove tocopherols from oils. Although no tocopherols were found in the flaxseed oil used in these experiments, the stripping process was important for removing all other minor components that might interfere in the oxidation process. Flaxseed oil contains approximately 53% linolenic acid, so it is a suitable substrate to produce malondialdehyde, which was measured as TBARS.

Oxidation of stripped flaxseed oil in $2^{(3-0)}$ and $3^{(2-0)}$ full-factorial designs (shown in Tables 1 and 2, respectively) were analyzed by measurement of the maximum concentrations of hydroperoxides (LOOH_{max}), the time taken to reach the LOOH_{max} (TIME), the maximum concentrations of thiobarbituric acid reactive substances ($\text{TBARS}_{\text{max}}$) and the area calculated by the integration of the peroxide value curve from time zero to the time when LOOH_{max} was reached (AUC_{LOOH}). The significant differences observed among the assays in all four parameters ($p < 0.001$) allowed the adjustment of the models to the experimental data.

In general, an increase in temperature accelerated the oxidative deterioration of the primary products and increased the volatility of the secondary products. This trend resulted in reduced concentrations of primary and secondary reaction products, as shown by lower LOOH_{max}, TBARS_{max} and AUC_{LOOH} values (Tables 1, 3). Since our objective was to obtain the maximum content of oxidation products, the temperature value was fixed at 40 °C for all the subsequent evaluations. The presence of Fe²⁺ also accelerated the oxidative reaction, increasing hydroperoxide and TBARS formation, as well as decreasing the time taken for these substances to reach their peak amounts. The presence of ascorbyl palmitate resulted in both antioxidant and prooxidant effects depending on its concentration and interactions with other compounds, such as iron. Table 3 presents the coefficients of the polynomial models for the 2⁽³⁻⁰⁾ full-factorial design, which was adjusted to the four oxidation end-points. The block effect, the *p* value relative to “lack-of-fit” and the adjusted coefficient of determination (*R*_{adj}²) were analyzed. The polynomial models fit the data well as shown by their non-significant lack-of-fit value, non-significant block effect and high *R*_{adj}² values (>0.94).

Table 4 presents the coefficients of the polynomial models for the 3⁽²⁻⁰⁾ full-factorial design, which were adjusted to the four oxidation end-points. The block effect, the *p* value relative to the “lack-of-fit” and the adjusted coefficient of determination (*R*_{adj}²) were also analyzed. Similar to the first design, the polynomial models also fit the data well as shown by the non-significant lack-of-fit

value, the non-significant block effect and high *R*_{adj}² values (> 0.98). Figure 2 shows the response surface plots obtained from the second 3⁽²⁻⁰⁾ full-factorial design, which were applied to LOOH_{max}, time, TBARS_{max} and AUC_{LOOH}. The optimization using all four parameters suggested that maximum oxidation could be achieved with stripped flaxseed oil containing Fe²⁺ at a concentration of 1.47 mmol/L and ascorbyl palmitate at a concentration of 1.58 mmol/L. These results demonstrate a clear additive effect between these two factors. Figure 3 presents the observed and estimated results obtained at three randomized points, which had been evaluated with the same experimental procedures used for building the models. No statistical differences were observed between the experimental and estimated points in all four parameters for all three randomized points, thereby suggesting the high quality of the models used in this study.

Oil oxidative stability evaluation is a complex process that involves the use of least two different analytical techniques to obtain an adequate description of the process [4]. The choice of chemical markers or end-points to describe the process depends on many factors, including fatty acid compositions, presence of minor polar compounds, temperature, light exposition and surface area. Furthermore, small variations on these factors can deeply change the chemical markers' values, becoming difficult to compare the antioxidant action of new compounds. With this limitation in mind, we proposed to develop a model to evaluate oil oxidation using very simple chemical markers at their maximum levels of variation. Our model was

Table 3 Coefficients of the polynomial models adjusted to the primary and secondary products observed in the first 2⁽³⁻⁰⁾ full factorial design and quality evaluation of the model fitness

Regression coefficients	LOOH _{max}	Time	TBARS _{max}	AUC _{LOOH}
Mean (β_0)	605.37 ($p < 0.001$)	7.48 ($p < 0.001$)	17.20 ($p < 0.001$)	1.996.07 ($p < 0.001$)
Temperature (β_1)	-75.44 ($p = 0.001$)	-1.03 ($p = 0.001$)	-3.11 ($p = 0.002$)	-602.40 ($p < 0.001$)
Fe ²⁺ (β_2) ^a	+27.87 ($p = 0.010$)	-0.78 ($p = 0.001$)	+1.36 ($p = 0.008$)	-220.32 ($p < 0.001$)
Asc (β_3) ^b	-30.23 ($p = 0.009$)	+0.48 ($p = 0.002$)	+0.98 ($p = 0.015$)	+361.10 ($p < 0.001$)
Temp × Fe ²⁺ (β_{12})	–	–	-1.77 ($p = 0.005$)	+77.36 ($p = 0.001$)
Temp × Asc (β_{13})	-33.18 ($p = 0.007$)	-0.48 ($p = 0.003$)	-1.55 ($p = 0.006$)	-215.81 ($p < 0.001$)
Fe ²⁺ × Asc (β_{23})	–	-0.78 ($p = 0.001$)	–	-67.70 ($p = 0.001$)
Temp × Fe ²⁺ × Asc (β_{123})	–	-0.77 ($p = 0.001$)	-1.04 ($p = 0.014$)	- 114.06 ($p < 0.001$)
<i>p</i> (replicate) ^c	0.112	0.684	0.102	0.016
<i>p</i> (lack of fit) ^d	0.205	0.069	0.400	0.050
Adjusted <i>R</i> ²	0.946	0.985	0.979	0.998

^a Iron (II) sulfate heptahydrate (Fe²⁺)

^b Ascorbyl palmitate

^c Probability value observed for the replicates (blocks)

^d Probability value obtained from one-way ANOVA

^e For example, the regression should be read as: $\hat{y}_{\text{LOOH}} = 605.37 - 75.44x_1 + 27.87x_2 - 30.23x_3 - 33.18x_1x_3$

Table 4 Coefficients of the polynomial models adjusted to the primary and secondary products observed in the second $3^{(2-0)}$ full factorial design and quality evaluation of the model fitness

Regression coefficients	LOOH _{max}	Time	TBARS _{max}	AUC _{LOOH}
Mean (β_0)	740.57 ($p < 0.001$)	9.05 ($p < 0.001$)	26.99 ($p < 0.001$)	2925.75 ($p < 0.001$)
Linear Fe ²⁺ (β_1) ^a	+55.02 ($p = 0.003$)	−1.47 ($p = 0.001$)	+6.07 ($p < 0.001$)	−868.42 ($p = 0.002$)
Quadratic Fe ²⁺ (β_1^2)	−58.58 ($p = 0.007$)	−0.58 ($p = 0.011$)	−2.24 ($p = 0.010$)	−369.28 ($p = 0.036$)
Linear Asc (β_2) ^b	−81.87 ($p = 0.001$)	+1.50 ($p = 0.001$)	+9.81 ($p < 0.001$)	+491.73 ($p = 0.007$)
Quadratic Asc (β_2^2)	−122.08 ($p = 0.002$)	−0.60 ($p = 0.010$)	+1.45 ($p = 0.024$)	−753.91 ($p = 0.009$)
Fe ²⁺ (β_1) x Asc (β_2)	−13.96 ($p = 0.019$)	−0.25 ($p = 0.009$)	−1.51 ($p = 0.003$)	−
p (replicate) ^c	0.278	1.000	0.567	0.854
p (lack of fit) ^d	0.323	0.376	0.157	0.634
Adjusted R^2	0.983	0.992	0.996	0.982

^a Iron (II) sulfate heptahydrate (Fe²⁺)^b Ascorbyl palmitate^c Probability value observed for the replicates (blocks)^d Probability value obtained from one-way ANOVA **Fig. 2** Surface plots of the second $3^{(2-0)}$ full factorial design showing the effects of Fe²⁺ and 6-O-palmitoyl-L-ascorbic acid on stripped flaxseed oil oxidation (**a** LOOH_{max}, **b** time, **c** AUC_{LOOH} and **d** TBARS_{max})

Fig. 3 Validation of the optimized system based on the second $3^{(2-0)}$ full factorial design expressed as mean values ($n = 2$). **a** LOOH_{max} (Chi-square = 1.469549; $df = 5$; $p < 0.916556$); **b** time (Chi-

square = 0.0567427; $df = 5$; $p < 0.999960$); **c** AUC_{LOOH} (Chi-square = 0.5341780; $df = 5$; $p < 0.990818$); and **d** TBARS_{max} (Chi-square = 0.6056443; $df = 5$; $p < 0.987743$)

obtained through use of flaxseed oil stripped of its tocopherols added Fe²⁺ (1.47 mmol/L) and ascorbyl palmitate (1.54 mmol/L) at 40 °C for 8 days. Four markers were originally used to evaluate the oil oxidation in our study. However, as observed in Fig. 2, it was evident that the AUC_{LOOH} (Fig. 2c) was very similar to the time to reach LOOH_{max} (Fig. 2b). Thus, our discussion was based on the effects of these three markers: LOOH_{max}, the time to reach LOOH_{max} and TBARS.

The increase in temperature from 40 to 60 °C significantly decreased the LOOH ($\beta_1 = -75.44$), but had minor

effects on TBARS concentration ($\beta_1 = -3.11$) (Table 3). Lipid oxidation reactions have high activation energies (16.2 kcal mol⁻¹). Thus, there is an increase in autoxidation of oils and decomposition of hydroperoxides as the temperature increases [2, 19]. The effect of temperature on the oxidation of oils containing high amounts of polyunsaturated fatty acids is known and can be estimated by the Arrhenius equation [20]. The clear influence of temperature on the formation of hydroperoxides was reported by the observation of increases in LOOH values (from 0 to 600 mmol/kg) in stripped rapeseed oil stored between

5 and 60 °C [21]. However, Yin and Sathivel [21] reported that menhaden oil stored at 50 °C had lower rates of hydroperoxide formation than when it is stored at room temperature. The authors attributed this fact to the higher decomposition of primary hydroperoxides at 50 °C. Considering that our objective was to achieve maximum LOOH values, the temperature of 40 °C was obviously chosen for the second step of optimization. Still in the first experimental design, the prooxidant effect of the Fe^{2+} (x_2) at 1.0 mmol/L and the antioxidant effect of the ascorbyl palmitate (x_3) at 1.5 mmol/L were evident when the LOOH concentration ($\beta_2 = +27.87$ and $\beta_3 = -30.23$) and time to achieve the maximum LOOH level ($\beta_2 = -0.78$ and $\beta_3 = +0.48$) were observed (Table 3). Transition metals such as iron and copper promote the formation of free radicals by decomposing LOOH through redox reactions (Fig. 1). The increase observed in LOOH formation when Fe^{2+} was present was caused both by the reducing effect of Fe^{2+} on the LOOH scission that produces $\text{LO}^\bullet$ (alkoxyl radical) + $\text{OH}^\bullet$, and the oxidant effect of the Fe^{3+} that forms $\text{LOO}^\bullet$ (peroxyl radical) + $\text{H}^\bullet$ (Fig. 1), exponentially raising the oxidation rates. On the other hand, until the concentration of Fe^{2+} was raised to 1.5 mmol/L, ascorbyl palmitate showed only antioxidant action. Ascorbic acid and ascorbyl palmitate are powerful reducing agents that are able to inactive metals and, thus, reduce the rate of initiation and decomposition of LOOH, to reduce LOOH to stable alcohols and to scavenge oxygen [19]. However, according to Niki and Noguchi [22], ascorbic acid acts like a prooxidant when the ascorbic acid/ Fe^{3+} ratio is low. No significant interactions (β_{23}) were observed when Fe^{2+} and ascorbyl palmitate were added together to the LOOH_{max} and $\text{TBARS}_{\text{max}}$ responses. A prooxidant effect has been extensively reported when mixtures of ascorbic acid and Fe^{2+} are added to oils [23]. For this reason, the second factorial design was performed using a wider range of variation for these two factors.

Fixing the temperature at 40 °C, the maximum LOOH concentration at the minimum time associated to the maximum values of TBARS were achieved when Fe^{2+} was added near its highest concentration (1.47 mmol/L; range 0–2 mmol/L) and with ascorbyl palmitate at an intermediate level (1.54 mmol/L; range 0–3 mmol/L). This effect can be easily visualized in Fig. 2. For example, without Fe^{2+} ($x_2 = -1$), ascorbyl palmitate exerts an antioxidant action (green and yellow surfaces; clearer surfaces) (Fig. 2a). However, when Fe^{2+} increases from $x_2 = -1$ to $+1$, the LOOH concentration achieves its maximum value (red surface; darker surface) at the intermediate concentration of ascorbyl palmitate ($x_3 = 0$). The LOOH concentration reduces again when ascorbyl palmitate is closer to its highest level ($x_3 = +1$). These trends show that the prooxidant effect of the combination of ascorbyl palmitate

and Fe^{2+} is strongly dependent on their relative concentrations. Although this observation is largely known, this is the first time that it has been graphically shown.

After decomposing hydroperoxides (LOOH), iron remains in its oxidized form (Fe^{3+} (ferric ion)), which slowly reacts with other LOOH. Ferrous ion (Fe^{2+}) acts 100 times faster than ferric ion (Fe^{3+}) [2]. Ascorbyl palmitate reduces Fe^{3+} to Fe^{2+} , increasing the oxidation rate and LOOH decomposition. This explains the synergistic oxidant effects observed between Fe^{2+} and ascorbyl palmitate in our model, which caused a decrease in the peak time ($\beta_{23} = -0.78$). Let et al. [24] reported that, at high concentrations of ascorbyl palmitate (300 mg/kg), the regeneration of metal ions might override the antioxidant properties, resulting in prooxidant effects in salad dressing enriched with fish oil. Micciché et al. [25], investigating iron-based alkyd paints driers using methyl linoleate as substrate, observed that the molar ratio of 2:1 (ascorbyl palmitate:iron-2-ethylhexanoate) reduced the lag time to zero, resulting in a LOOH of 600 mmol/kg after 100 h. They also observed that the oxidation occurred slower when the proportion of ascorbyl palmitate was above 2:1, which might be attributable to the antioxidant properties of ascorbyl palmitate above this critical concentration.

The antioxidant activities of the compounds chosen to test the model were evaluated by LOOH (hydroperoxide) concentration and TBARS concentration, expressed as IC_{50} values (Table 5). In this study, IC_{50} was the concentration of the antioxidant required for a 50% oxidation inhibition compared with the control without antioxidant. All compounds showed non-significant heterogeneity of variances ($p > 0.5$) and significant differences ($p < 0.001$), indicating that the model was suitable for evaluating natural and artificial compounds. The IC_{50} values were also reported in molar concentrations. Except for two samples analyzed by TBARS (α -tocopherol and gallic acid), statistically significant differences ($p < 0.001$) were observed among all of the compounds. The six compounds chosen to test our model have different molecular structures, solubilities, numbers of hydroxyl groups and numbers of aromatic rings, which contribute to their different antioxidant performances using in vitro methodologies [7, 8]. However, when these same compounds are applied in bulk oils or emulsions, taking the polar paradox into account, the differences of the results observed in the in vitro methodologies are often not confirmed. For example, in our study, TBHQ showed the best antioxidant activity, which is in agreement with the results reported by Bera et al. [5], whereas the phenolic compounds, Trolox and tocopherol had less antioxidant activity, although their antioxidant activities measured against free radicals have been reported to be high in other in vitro evaluations [26, 27]. According to Maqsood and Benjakul [7], caffeic and ferulic acids had

Table 5 Antioxidant activity of the compounds evaluated by IC₅₀ to the LOOH and TBARS concentration, using the optimized system

Compounds ^a	IC 50 (mg/kg) to LOOH	IC 50 (mg/kg) to TBARS	IC 50 (mmol/L) to LOOH	IC 50 (mmol/L) to TBARS
α -Tocopherol	170.00 ^a $\pm$ 0.01	78.25 ^a $\pm$ 1.06	0.39 ^a $\pm$ 0.01	0.19 ^a $\pm$ 0.01
Trolox	52.95 ^d $\pm$ 0.06	–	0.21 ^d $\pm$ 0.01	–
Caffeic acid	46.88 ^c $\pm$ 0.11	49.25 ^b $\pm$ 1.06	0.26 ^c $\pm$ 0.01	0.27 ^b $\pm$ 0.01
Gallic acid	56.10 ^c $\pm$ 0.14	30.47 ^d $\pm$ 0.76	0.33 ^b $\pm$ 0.01	0.18 ^d $\pm$ 0.01
Catechin	59.75 ^b $\pm$ 0.00	35.15 ^c $\pm$ 0.49	0.21 ^c $\pm$ 0.01	0.20 ^c $\pm$ 0.01
TBHQ	28.73 ^f $\pm$ 0.01	24.95 ^e $\pm$ 0.21	0.17 ^f $\pm$ 0.01	0.15 ^e $\pm$ 0.01
<i>P</i> (Hartley) ^b	0.510	0.780	0.450	0.721
<i>P</i> (ANOVA) ^c	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

^a Values expressed as means $\pm$ SD ($n = 2$)

^b Probability value obtained from Tests of Homogeneity of Variances (Hartley)

^c Probability value obtained from ANOVA. Values in the column followed by the same upper script letter are not statistically different

statistically significant differences in their antioxidant activity when measured by lipoxygenase inhibition, ABST radical scavenging, FRAP and methyl chelating activity, while similar effects were not observed on the prevention of the formation of hydroperoxides in fish oil-in-water emulsions ($p > 0.05$).

Our hypothesis is that, in some situations, the discrepancy observed between in vitro methods and when the compounds are directly applied in oils and emulsions could be caused by the narrow range of oxidation markers variation, causing the measured results to be too close to allow statistically significant differences. For example, in our study, the range of LOOH variation prior to optimization was 0.0–458 meq kg⁻¹ oil, whereas after optimization the LOOH values ranged from 0.0 to 751.13 meq kg⁻¹ oil. In the optimized condition, the separation of the antioxidant effects is greater than in the non-optimized one. Although other factors are also involved on the differences observed between the results obtained by in vitro methods and those found directly in the food matrix, the maximization of the end-points range can surely contribute to better describe these differences. The model developed in our study was built using most of the conditions recommended by Frankel and Finley [12], including the use of a suitable substrate (flaxseed oil), relatively mild conditions of oxidation (below 60 °C), initial low levels of primary products (LOOH = 3.09 $\pm$ 0.75 meq kg⁻¹ oil) and secondary products (TBARS = 0.02 $\pm$ 0.01 mmol kg⁻¹ oil), and the inclusion of initiation and early stages of the propagation phases of oxidation (8 days).

Conclusions

Response Surface Methodology allowed us to maximize the oxidation of bulk oil by considering several chemical markers at the same time. This study presents a simple,

practical and easily reproducible model to evaluate the antioxidant potential effect of natural and synthetic compounds in bulk oils. In addition, the models present predictive capacities, allowing other combinations among the factors to be further assessed.

Acknowledgments This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Process 08/09296-1) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROEX).

References

- Zhang Y, Yang L, Zu Y, Chen K, Wang F, Liu F (2010) Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chem* 118:656–662
- Choe E, Min DB (2006) Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 5:169–186
- Kubow S (1992) Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Radic Biol Med* 12:63–81
- McClements DJ, Decker EA (2000) Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *J Food Sci* 65:1270–1282
- Bera D, Lahir D, Nag A (2006) Studies on a natural antioxidant for stabilization of edible oil and comparison with synthetic antioxidants. *J Food Eng* 74:542–545
- Soubra L, Sarkis D, Hilan C, Verger P (2007) Dietary exposure of children and teenagers to benzoates, sulphites, butylhydroxyanisol (BHA) and butylhydroxytoluene (BHT) in Beirut (Lebanon). *Regul Toxicol Pharm* 47:68–77
- Maqsood S, Benjakul S (2010) Comparative studies of four different phenolic compounds on in vitro antioxidative activity and the preventive effect on lipid oxidation of fish oil emulsion and fish mince. *Food Chem* 119:123–132
- Capitani CD, Carvalho ACL, Botelho PB, Carrapeiro MM, Castro IA (2009) Synergism on antioxidant activity between natural compounds optimized by response surface methodology. *Eur J Lipid Sci Technol* 111:1100–1110
- Frankel EN, Finley JW (2008) How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *J Agric Food Chem* 56:4901–4908

10. Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P (2007) Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progr Lipid Res* 46:244–282
11. Niki E (2010) Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 49:503–515
12. Choo W-S, Birch J, Dufour J-P (2007) Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed flaxseed oils. *J Food Compos Anal* 20:202–211
13. Khan MA, Shahidi F (2002) Photooxidative stability of stripped and non-stripped borage and evening primrose oils and their emulsions in water. *Food Chem* 79:47–53
14. Waraho T, Cardenia V, Rodriguez-Estrada MT, McClements DJ, Decker EA (2009) Prooxidant mechanisms of free fatty acids in stripped soybean oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem* 57:7112–7117
15. Derringer G, Suich R (1980) Simultaneous optimization of several response variables. *J Qual Technol* 12:214–219
16. Shanta NC, Decker EA (1994) Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *J AOAC Int* 77:421–424
17. McDonald RE, Hultin HO (1987) Some characteristics of the enzymic lipid peroxidation system in the microsomal fraction of flounder skeletal muscle. *J Food Sci* 52:15–21
18. Gliszczynska-Swiglo A, Sikorska E (2004) Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. *J Chromatogr A* 1048:195–198
19. Chaiyasit W, Elias RJ, McClements DJ, Decker EA (2007) Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. *Crit Rev Food Sci Nutr* 47:299–317
20. Orlien V, Risbo J, Rantanen H, Skibsted LH (2006) Temperature-dependence of rate of oxidation of rapeseed oil encapsulated in a glassy food matrix. *Food Chem* 94:37–46
21. Yin H, Sathivel S (2010) physical properties and oxidation rates of unrefined menhaden oil (*Brevoortia patronus*). *J Food Sci* 75:E163–E168
22. Niki E, Noguchi N (2000) Evaluation of antioxidant capacity. What capacity is being measured by which method. *IUBMB Life* 50:323–329
23. Micciché F, van Haveren J, Oostveen E, Laven J, Ming W, Oyman ZO, van der Linde R (2005) Oxidation of methyl linoleate in micellar solutions induced by the combination of iron(II)/ascorbic acid and iron(II)/H₂O₂. *Arch Biochem Biophys* 443:45–52
24. Let MB, Jacobsen C, Meyer AS (2007) Ascorbyl palmitate, γ -tocopherol, and EDTA affect lipid oxidation in fish oil enriched salad dressing differently. *J Agric Food Chem* 55:2369–2375
25. Micciché F, van Haveren J, Oostveen E, Ming W, van der Linde R (2006) Oxidation and oligomerization of ethyl linoleate under the influence of the combination of ascorbic acid 6-palmitate/iron-2-ethylhexanoate. *App Catal A* 297:174–181
26. Castro IA, Rogero MM, Junqueira RM, Carrapeiro MM (2006) Free radical scavenger and antioxidant capacity correlation of α -tocopherol and trolox measured by three in vitro methodologies. *Int J Food Sci Nutr* 57:75–82
27. Konczak I, Zabaras D, Dunstan M, Aguas P (2010) Antioxidant capacity and phenolic compounds in commercially grown native Australian herbs and spices. *Food Chem* 122:260–266

CAPÍTULO 2

Effect of the simultaneous interaction among ascorbic acid, iron and pH on the oxidative stability of oil-in-water emulsions.

Journal:	<i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i>
Manuscript ID:	jf-2011-02808r
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	14-Jul-2011
Complete List of Authors:	Branco, Gabriel; University of São Paulo, Department of Food and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences Rodrigues, Maria Isabel; UNICAMP, Department of Food Engineering Gioielli, Luiz; University of Sao Paulo, Dept.of Biochemical & Pharma Tech Castro, Inar; University of São Paulo, Department of Food and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences

SCHOLARONE™
Manuscripts

Effect of the simultaneous interaction among ascorbic acid, iron and pH on the oxidative stability of oil-in-water emulsions

GABRIEL F. BRANCO¹, MARIA I. RODRIGUES², LUIZ A. GIOIELLI³ AND INAR
A.CASTRO^{1*}

¹ Department of Food and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Lineu Prestes 580 B14, 05508-900, São Paulo, Brazil

² Department of Food Engineering, Faculty of Food Engineering, University of Campinas, 13081-970, São Paulo, Brazil

³ Department of Biochemical-Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Lineu Prestes 580 B16, 05508-900, São Paulo, Brazil

*Corresponding Author: Inar Alves Castro, Av. Lineu Prestes 580 B14, 05508-900 São Paulo, Brazil, Tel.: +55 11 3091 1481, fax:+55 11 38154410. E-mail address: inar@usp.br (I.A.Castro)

ABSTRACT

The antioxidant activity of different compounds in emulsions depends on many factors. Usually, the effects of these factors have been evaluated under fixed conditions, limiting the results to these specific combinations. Thus, the objective of this study was to demonstrate how different factors can simultaneously influence the oxidative stability of an oil-in-water emulsion, and how these factors can be used to enlarge the variation range of oxidation chemical markers. Initially, a Plackett-Burman design was used to screen seven factors (temperature, pH and iron, copper, ascorbyl palmitate, ascorbic acid and sodium chloride concentrations). The temperature was then fixed at 30°C, and an emulsion was formulated with different combinations of ascorbic acid, iron and pH according to a central composite rotatable design. The antioxidant activity of six compounds was evaluated using the optimized emulsion that contained 1.70 mmol/L AH (ascorbic acid) and 0.885 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.0 mmol/L Fe^{2+}) at pH 5.51 and 30°C. A better discrimination was observed for samples in optimized emulsions than for those in non-optimized emulsions. Considering the importance of the interactions on oxidation studies, our model represents a significant improvement in a direct methodology that can be applied to evaluate natural compounds under different combination of factors.

KEYWORDS: emulsion, oxidation, ascorbic, metal, pH, factorial design.

20 INTRODUCTION

21

22 Lipid oxidation is one of the major causes of shelf-life reduction of food emulsions. Several
23 infant formulas consist of oil-in-water emulsions that contain polyunsaturated fatty acids
24 supplemented with ascorbic acid and iron to meet some nutritional requirements. Besides infant
25 formulas, meat emulsions rich in polyunsaturated fatty acids also contain a significant amount of iron
26 (as free metal or in heme form), and sodium erythorbate, an ascorbic acid analogue used as color
27 fixer (1). The prooxidant effect of ascorbic acid, when combined with iron at a specific
28 concentration, is well known because of its capacity to reduce ferric ions (Fe^{3+}) to ferrous ions (Fe^{2+})
29 (2-4). However, this behavior in a food emulsion depends on numerous factors, including pH,
30 temperature, presence of other compounds, oil-droplet interface area, thickness and permeability of
31 the interfacial area, concentration, surfactant ionic charge (5), and especially the molar ratio between
32 the ascorbate and the iron (6).

33 Because emulsions are highly susceptible to oxidation, considerable effort has been expended
34 to develop strategies for improving the oxidative stability of these products (7-9). Although much
35 progress has been achieved in the past few years and has brought relevant information to the food
36 manufacturers, most of the previous studies have evaluated one factor at a time. However, oxidation
37 in food emulsions is a dynamic process in which all factors constantly interact with each other (7).
38 Thus, the contributions of studies that investigate factors with fixed variation ranges would be much
39 greater if the interactions could be simultaneously evaluated, especially in those involving natural
40 antioxidants.

41 The acceleration of the oxidative reaction is useful to screen the efficacy of potential
42 antioxidants (2), and although antioxidants should be evaluated on the food itself, it is difficult to
43 standardize the accelerated oxidation using foods as substrates. In this case, direct methods can be
44 applied if the basic chemical principles can be deduced (10). A notable number of studies have

reported the antioxidant action of artificial and natural compounds measured by indirect methodologies (11-13). However, many of these studies have reported controversial results, even for the same material determined by different assays in different laboratories (14). When these new compounds are applied in systems that are more similar to real food emulsions, i.e., systems that contain an oxidizable substrate, such as triacylglycerols or phospholipids, the results can differ from those obtained using indirect methods (10, 15). Many factors have been suggested to justify these differences (10, 16). Among them, the narrow variation in the chemical markers can mask potential antioxidant effects, particularly when phenolic compounds that exhibit very similar molecular structures are being evaluated in bulk oils or emulsions (17). The simultaneous addition of iron and ascorbate is currently used to accelerate the oxidation (2) and could also be used to promote the amplification of the chemical markers, depending on the type of emulsifier, temperature, pH and presence of other compounds.

Thus, the objective of this study was to demonstrate how three different factors (ascorbic acid content, iron content and pH) can simultaneously influence the oxidative stability of an oil-in-water emulsion, and to optimize the combination of these three factors to enlarge the variation of the chemical oxidation markers.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Iso-octane, 2-propanol, methanol, hexane and 1-butanol were obtained from Merck (Whitehouse Station, NJ, USA). Flaxseed oil (stored in the dark at 4°C), ammonium thiocyanate, barium chloride, iron (II) sulfate heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 2-thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA), butylated hydroxytoluene (BHT), silicic acid, activated charcoal, 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP), imidazole, sodium dodecyl sulfate (SDS), copper (II) sulfate, sodium

chloride, ascorbic acid, cumene hydroperoxide, ascorbyl palmitate, α -tocopherol, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), tocopherol, caffeic acid, gallic acid, catechin and *tert*-butyl hydroquinone (TBHQ) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The organic solvents and water were HPLC grade. All other reagents used in the experiment were analytical grade.

75

76 Emulsion preparation and lipid oxidation measurements

77

78 A 1% (v/v) oil-in-water emulsion was prepared using 10.0 mL of flaxseed oil stripped of its
79 minor components according to the methodology proposed by Khan and Shahidi (18) and modified
80 by Waraho et al. (19), and 90.0 mL of sodium acetate–imidazole buffer solution (10 mmol/L each,
81 pH 7.0) containing 35 μ mol/L of SDS emulsifier. The oil was added to the SDS solution and
82 homogenized in four passages (35 MPa pressure) using a high-pressure valve homogenizer (A-10,
83 Alitec, São Paulo, Brazil). After each pass, the emulsion was cooled in an ice-bath to room
84 temperature. Then, the pH of each emulsion was measured and adjusted using 0.01 M HCl or 0.1 M
85 NaOH, being the solution again homogenized after this procedure. The samples were protected from
86 light and heat.

87 To measure emulsions' particle size, one drop of sample was placed over a glass lamina with
88 the assistance of a capillary tube and then covered with a cover slip. Laminas with samples were
89 analyzed on a polarized-light microscope (BX-50, Olympus, Center Valley, PA, USA) connected to
90 a digital video camera (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). The pictures were enhanced 40 $\times$
91 using the application Pro-Plus v. 4.5.1.22 for Windows (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA).
92 The analyses were performed in quadruplicate and the particle sizes were determined from the
93 images. The mean particle diameter in the emulsions ranged from $63.2 \pm 24.0 \mu\text{m}$ to $92.5 \pm 37.1 \mu\text{m}$.
94 Each emulsion was separated into several vials (1 mL) and kept in an oven (L.S. 1.0 A, Logen

Scientific, São Paulo, Brazil) under different temperatures (30 - 60 °C). Every 2 h, samples were collected to determine the chemical markers of oxidation. Near the peaks, the assay was repeated over shorter time intervals. Lipid hydroperoxide concentrations were determined according to procedures in Shantha and Decker (20). The amount of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the samples was determined according to the method proposed by McDonald and Hultin (21). Measurements were taken in duplicate, and the values were expressed as meq/L and mmol/L of emulsion for hydroperoxides and TBARS, respectively. The results of LOOH and TBARS concentrations used in this study correspond to the maximum value observed in each assay. In addition, in the second design, the time necessary to achieve the hydroperoxides peak was also determined and expressed as hours.

Experimental design and statistical proceedings

This study was divided into three parts, adopting a sequential design strategy as described by Rodrigues and Iemma (22). First, the effects of seven factors (temperature, pH and iron, copper, ascorbyl palmitate, ascorbic acid and sodium chloride concentrations) on the oxidative stability of the emulsions were checked using a Plackett–Burman (PB) design, as described in **Table 1**. From the results obtained in this first design, three factors were selected for the second design (Central Composite Rotatable design, CCRD) to estimate the simultaneous interaction among the factors within the variation range (**Table 2**) and also to determine the level of each factor that would maximize the emulsion oxidation markers. Optimization was carried out using Derringer and Suich (23) method. Afterwards, six compounds with different polarities were evaluated according to their antioxidant activity using the optimized and non-optimized emulsions.

Evaluation of the compounds antioxidant activity

Trolox, α -tocopherol, caffeic acid, gallic acid, catechin and TBHQ (1 mmol/L) were added to 1% stripped flaxseed oil emulsions containing Fe^{+2} (0.885 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) and ascorbic acid (1.70 mmol/L AH) at pH of 5.5. The solutions were protected from light and heat. Vials containing 1.0 mL of the solutions were kept at 30°C for 36 h. Hydroperoxide (LOOH) and TBARS concentrations were determined for all samples following the previously described methodologies.

Statistical analysis

The data obtained in this study was initially checked according to the homogeneity of variances using the Hartley test. The main effects of the seven factors on the oxidation reaction were determined based on the results from the PB design considering an alpha value (α) of 5%. However, it is plausible to use a α of 10% in biochemical processes' screening using PD designs, as so to avoid neglecting significant factors due to a too severe alpha value, as stated by Haaland (24).

For optimization, three factors (x_1 , x_2 and x_3) selected by the PB design were applied in a CCRD. Data were submitted to ANOVA and sequentially fitted to the response-surface regression procedure according to the following second-order polynomial equation:

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3,$$

where $\hat{y}$ is the estimated response, b_0 represents the main value, and b_i , b_{ii} and b_{ij} are linear, quadratic and the interaction terms of the model. The models' quality of fit was determinate by R^2 and p values relative to the lack of fit. Because all assays were repeated twice, the block effect was also evaluated in each model. Validation of the regressions was estimated by the relative error to compare the observed values to five randomized combinations with a fixed value estimated by the adjusted polynomial equation. The statistical software package Statistica v.9.0 (Statistica Inc., Tulsa,

OK) was used to perform all analyses and to plot the graphs of the response surfaces. An alpha value of 5% was adopted to reject the null hypothesis in this study.

RESULTS

Screening Design

The effects of each factor on the oxidative stability of the emulsions, as measured by LOOH and TBARS concentrations and using a PB design, are shown in **Figure 1A** and **B**, respectively. This analysis, which only considered the principal effects and curvature, was performed to screen the variables for the second step. The temperature was the most important factor for both markers (LOOH and TBARS). An increase of the temperature (from 30 to 60°C) significantly ($p < 0.001$) reduced both the LOOH (SE = -6.165) and the TBARS (SE = -4.334) concentrations. Because the objective of this study was to achieve higher values for the oxidation markers, the temperature was fixed at the lowest level (30°C) for the second step. The LOOH concentration increased (SE = +4.162) when the pH was changed from 3.0 to 7.0, and no other significant effect was observed for the other six variables on this marker. In this model, the statistically significant curvature reduces the standard error, indicating that other significant variables are not masked by the higher standard error caused by to the central-point variation.

In addition to temperature, the pH level and the presence of ascorbic acid (AH) showed significant effects on the TBARS marker. An increase of the pH from 3.0 to 7.0 reduced the TBARS concentration (SE = -2.569), whereas the presence of AH (1 mmol/L) showed the opposite result in that the TBARS concentration increased (SE = +2.943). No influence was observed on the TBARS response for the other four variables. Thus, only three variables affected the emulsion oxidation within the evaluated range: temperature, pH and ascorbic acid (AH). As temperature was fixed at the

lowest value, pH and AH were the variables selected for the next step. In function of the well-known redox interaction reported in the literature for systems containing iron and AH, we opted to include this third variable (Fe^{2+}) in the CCRD and amplify the variation range of AH from 0.0-1.0 to 0.0-2.0 mmol/L.

Central Composite Rotatable Design

In the second step, a CCRD was applied to model the oxidative behavior of the emulsion when pH, AH and iron concentrations were changed within a pre-defined range of variation (**Table 2**). Analysis of the LOOH and TBARS concentrations were performed in the 17 assays shown in **Table 2**. In addition to these two chemical markers, the time to achieve the maximum concentration of hydroperoxides was also evaluated (T_{LOOH}). The estimates of the effects and the quality evaluation of the models adjusted to the three responses (LOOH, TBARS and T_{LOOH}) are shown in **Table 3**. All of the models exhibited a good quality of fit to the experimental data. For this reason, contour curves were produced based on these models. The objective of performing a CCRD was to check the interactions between the factors and also to optimize the oxidation conditions.

Regarding the interactions, a number of possibilities can be evaluated in a system containing three independent variables (x_1 , x_2 and x_3). In this study, the interaction between AH and iron (Fe^{2+}) as a function of pH variation on the LOOH and TBARS (**Figure 2**) responses was evaluated. At pH 3.0, higher values of LOOH (**Figure 2A**) were obtained when Fe^{2+} and AH were present at the minimum concentration. However, at pH 7.0 (**Figure 2B**), the formation of LOOH was less dependent on the Fe^{2+} and increased only when the AH was less than 1.0 mmol/L. At acidic pH levels (**Figure 2C**), higher TBARS values were observed when Fe^{2+} and AH were present at their maximum concentrations. Under neutral pH conditions (**Figure 2D**), higher TBARS values were

practically independent of the Fe^{2+} and increased only when the AH concentration was higher than 1.0 mmol/L.

Optimization and Validation

These chemical markers were taken into account to build the desirability function in order to maximize values of LOOH and TBARS and minimize values of T_{LOOH} . The following combination of coded variables was suggested: 1.29 (Fe^{2+}), 1.18 (AH) and 0.43 (pH). This combination achieved approximately 85% of the desirability function and corresponded to the following true values: 0.885 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.0 mmol/L Fe^{2+}), 1.700 mmol/L AH and pH of 5.51. Four additional points were examined to validate the models that were adjusted for LOOH, TBARS and T_{LOOH} responses. No significant differences were observed between the estimated and the experimental results for all three responses (**Table 4**). Finally, the antioxidant activity of six compounds was determined on a molar basis using the emulsion in which the oxidation conditions were optimized and non-optimized by the response surface methodology (**Figure 3**). The comparison between the two emulsion systems for the LOOH (**Figures 3A**) and TBARS values (**Figures 3B**) indicated that a better discrimination of these markers could be achieved in the optimized system.

DISCUSSION

The first objective of our study was to evaluate the simultaneous action of different factors on the oxidative stability of the emulsions over a range of variation instead of at fixed values for each factor. In this case, all possible interactions between ascorbic acid (AH) and iron (Fe^{2+}) under acidic and neutral conditions were evaluated using a CCRD. Our model followed the recommendations proposed by AOCS (25), including the use of purified oil stripped of its minor components, mild

temperatures, and analysis of primary and secondary products of the reaction. The chemical interpretation of the responses presented in the contour curves (**Figure 2**) is summarized in **Figure 4**.

Higher concentrations of LOOH were observed in the emulsions prepared at neutral pH than in those prepared at acidic pH levels. At pH 3.0, higher Fe^{2+} concentrations reduced the hydroperoxide concentrations (LOOH), and this behavior was more pronounced when AH was also present at higher concentrations. Polyunsaturated fatty acids placed in the inner position of the lipid globule (**Figure 4**) are oxidized by the radicals present in the emulsion to form alkyl radicals ($\text{L}\cdot$) (**Figure 4, equation 1**). Under aerobic conditions, oxygen is added to the alkyl radical to form alkoxyl ($\text{LO}\cdot$) and peroxy radicals ($\text{LOO}\cdot$) (**Figure 4, equation 2**) (7). Hydrogen is subsequently attracted to the lipid radicals to produce hydroperoxides (LOOH) (**Figure 4, equation 3**). In oil-in-water emulsions, one of the major mechanisms of lipid oxidation is the metal-promoted decomposition of lipid hydroperoxide to a free radical (**Figure 4, equation 4**) (26). A reduction of pH increases Fe^{2+} solubility, contributing to the decomposition of LOOH, catalyzed by Fe^{2+} (15). According to Frankel (27), ferrous ion (Fe^{2+}) is 14 times more effective in decomposing linoleic hydroperoxides than ferric ion (Fe^{3+}). Consequently, the capacity of AH to reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} (**Figure 4, equations 5 and 6**) may explain why lower LOOH values were observed when Fe^{2+} and AH were present at their maximum concentrations. According to Mei et al. (28), iron-promoted lipid oxidation rates were highest in SDS-stabilized emulsion droplets at lower pH values (3-5), because the emulsifier SDS is strongly negative at pH 3.0, attracting more metals to the droplet surface. The activity of iron for this decomposition reaction increases significantly when ascorbic acid is added and the pH decreases from 7.0 to 5.5 (26). Boon et al. (29) observed that lycopene degraded faster at pH 3.0 than at pH 7.0 in a model emulsion system that contained ferric and ferrous species. However, according to Xie et al. (15), methyl linoleate micelles at pH 6.8 exhibited faster rates of oxidation than micelles at pH 3.0.

Contradictory conclusions can result from differences in the emulsion preparation, such as concentration and ionic charge of the emulsifier, globule size, type of lipid substrate, composition of the aqueous phase, the method by which the oxidation is induced, the emulsion stability during the assay, the chemical markers selected to follow the reaction, among other factors. In our study, the lower LOOH concentration at pH 3.0 was caused by faster decomposition in the presence of AH and Fe^{2+} , and not because of its reduced formation. This fact was confirmed when AH was present without Fe^{2+} (**Figure 2A**). In this situation, high LOOH values were observed (> 2.0 mmol/L), which suggests the lack of an antioxidant effect of the AH. This interpretation is also based on fact that a similar amount of TBARS ($10\text{--}12$ $\mu\text{mol/L}$) was observed at both pH levels. According to the “polar paradox” reported by Porter (30), polar antioxidants such as AH are more effective in bulk oils than in emulsions. This effectiveness results from their greater affinity for the aqueous phase, which keeps these types of molecules far from the interface where the oxidation occurs (31). Capitani et al. (12) have observed that ascorbic acid and sodium erythorbate do not present any antioxidant effect when added to a system that contained micelles of linoleic acid oxidized by an azo-inductor.

When pH is increased from 3.0 to 7.0, the iron solubility reduces, and the LOOH formation becomes faster than its decomposition, which increases the LOOH stability in the emulsions (32). The reaction at neutral pH in our study was independent of Fe^{2+} concentration and almost exclusively dependent on AH concentration (**Figure 2B**). When the AH concentration is low, LOOH suffers less decomposition; however, when the AH concentration is increased above 1 mmol/L, the reaction in **equation 6** (**Figure 4**) is accelerated. This increased rate of reaction favors the reduction of the sparingly soluble Fe^{3+} , which promotes a strong prooxidant effect in the emulsion. In addition, at neutral pH, AH ($\text{pK}_a = 4.04$) is present predominantly as the monoanion (AH^-), which facilitates the electron transfer to Fe^{3+} (33). A more rapid increase in the concentration of MDA in micelles at pH 6.8 than in micelles at pH 3.0 was observed by Xei et al. (15), who have attributed this result to the low solubility or precipitation of transition metals in the continuous phase.

Regarding **Figure 2C**, higher TBARS concentrations were obtained when AH and Fe^{2+} were present at their maximum concentrations at pH 3.0. After decomposition, the carboxylic acid end of the fatty acid is esterified to the glycerol chain of the triacylglycerol or phospholipid, unless it undergoes further decomposition to a low-molecular-weight compound. The methyl terminal undergoes different reactions to form a number of volatile products, including MDA (7) (**Figure 4, equation 7**). **Figure 2C** suggests that AH does not exert any antioxidant effect toward the MDA formation, here expressed as TBARS, because this marker at pH 3.0 does not change in either the presence or absence of AH. MDA is one of the most important secondary products of lipid oxidation because hydroperoxides of fatty acids that contain three or more double bonds are its major precursor (11, 34). LOOH decomposition represents the first step to MDA formation (**Figure 4, equation 7**), for which $\text{LO}^\bullet$ and $\text{LOO}^\bullet$ both serve as precursors. Because the lipid radicals are more soluble than the original lipid, AH may be able to reduce these molecules as a function of their relative reduction potentials (for example, $E^\circ = 0.28 \text{ V}$ for ascorbate and $E^\circ = 1.0 \text{ V}$ for peroxy radicals) (7). However, this effect was not observed in our emulsion. Oxygen is involved in the formation of MDA from LOOH. Even though AH is able to react directly with oxygen, thereby excluding it from the emulsion (7), this effect was also not verified by our results. According to Frankel et al. (31), hydrophilic antioxidants become diluted to the point that they cannot adequately protect the oil in the oil–water interface. Micciché et al. (6) observed a reduction of the catalytic activity of the ascorbate/iron combination at a molar ratio greater than 2/1; and attributed this result to a possible antioxidant effect of the ascorbyl palmitate. Similar results might have been observed in our study if a molar ratio greater than 2/1 had been tried and ascorbyl palmitate had been used instead of ascorbic acid.

When the pH is increased from 3.0 to 7.0 (**Figure 2D**), an AH concentration greater than 1 mmol/L exerts a strong prooxidant effect, which increases the TBARS values from around 3 to 12 mmol/L, independent of the concentration of Fe^{2+} . The same explanation used for LOOH can be

applied to this situation. Considering the limited solubility of Fe^{2+} in the emulsion at neutral pH compared to that at acidic pH, any contribution of the AH to the reduction of Fe^{3+} has an important impact on the LOOH decomposition and consequent TBARS formation. Yen et al. (35) have observed similar results. Using TBARS as a marker in the deoxyribose model, the authors observed that TBARS formation increased with increasing concentration of AH and reached a maximum value when the concentration of AH was 1.65 mmol/L. In practical terms, the application of AH or erythorbate in emulsions containing iron prepared at a neutral pH cannot be an alternative for controlling the oxidation rate, unless other antioxidants or metal chelators are present.

The second objective of this study was to apply the optimized method to evaluate the antioxidant activity of compounds with different molecular structures and polarities. According to Micciché et al. (6), the combination of ascorbyl palmitate and iron(II) perchlorate hydrate at a molar ratio of 2.0/1.0 reached its optimal catalytic activity, as determined by measurements of lag time. In our study, a molar ratio of 1.9/1.0 was identified as the optimal proportion, in agreement with the results of Micciché et al. (6), although the models applied in these two studies were different. A better degree of differentiation among the compounds was achieved in the optimized method than in the non-optimized method (**Figure 3**). In our study, the optimized oxidation conditions, including the combination of ascorbate/iron (2:1) at pH 5.5 and 30°C, combined with the use of SDS as the emulsifier, and a stripped oil as substrate showed to be an interesting model to measure the antioxidant activity of different compounds with similar molecular structures.

In summary, the factorial design used in this study allowed the observation of the prooxidant behavior of infinite combinations of Fe^{2+} and ascorbic acid in the pH range of 3.0 to 7.0. Moreover, the model's optimization was extremely useful to discriminate the antioxidant activity effects of different compounds. This study presents a system that details how initial factors can be selected for further optimization to increase the formation of lipid oxidation products. This system can also be

316 applied to improve direct methodologies for evaluating the antioxidant activity of natural
317 compounds.

318

319 **ACKNOWLEDGEMENTS**

320

321 This research was supported by FAPESP (Process 08/09296-1) and CAPES (PROEX).

322

323 **LITERATURE CITED**

324

325 (1) Pereira, C. M.; Marques, M. F.; Hatano, M. K.; Castro, I. A. Effect of the Partial Substitution of
326 Soy Proteins by Highly Methyl-esterified Pectin on Chemical and Sensory Characteristics of
327 Sausages. *Food Sci Technol Int.* **2010**, *16*, 401-407.

328 (2) Bondet, V.; Cuvelier, M.-E.; Berset, C. Behavior of phenolic antioxidants in a partitioned
329 medium: Focus on linoleic acid peroxidation induced by iron/ascorbic acid system. *J Am Oil Chem*
330 *Soc.* **2000**, *77*, 813-819.

331 (3) Cuvelier, M.-E.; Lagunes-Galvez, L.; Berset, C. Do antioxidants improve the oxidative stability
332 of oil-in-water emulsions? *J Am Oil Chem Soc.* **2003**, *80*, 1101-1105.

333 (4) Micciché, F.; van Haveren, J.; Oostveen, E.; Laven, J.; Ming, W.; Oyman, Z. O.; van der Linde,
334 R. Oxidation of methyl linoleate in micellar solutions induced by the combination of
335 iron(II)/ascorbic acid and iron(II)/H₂O₂. *Arch Biochem Biophys.* **2005**, *443*, 45-52.

336 (5) Waraho, T.; McClements, D. J.; Decker, E. A. Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions.
337 *Trends Food Sci Technol.* **2011**, *22*, 3-13.

338 (6) Micciché, F.; van Haveren, J.; Oostveen, E.; Ming, W.; van der Linde, R. Oxidation and
339 oligomerization of ethyl linoleate under the influence of the combination of ascorbic acid 6-
340 palmitate/iron-2-ethylhexanoate. *App Catal A.* **2006**, *297*, 174–181.

- 341 (7) Chaiyasit, W.; Elias, R. J.; McClements, D. J.; Decker E. A. Role of physical structures in bulk
342 oils on lipid oxidation. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **2007**, *47*, 299-317.
- 343 (8) Hu, M.; McClements, D. J.; Decker, E. A. Antioxidant activity of a proanthocyanidin-rich extract
344 from grape seed in whey protein isolate stabilized algae oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem.*
345 **2004**, *52*, 5272-5276.
- 346 (9) Jacobsen, C.; Let, M. B.; Nielsen, N. S.; Meyer, A. S. Antioxidant strategies for preventing
347 oxidative flavour deterioration of foods enriched with n-3 polyunsaturated lipids: a comparative
348 evaluation. *Trends Food Sci Technol.* **2008**, *19*, 76-93.
- 349 (10) Frankel, E. N.; Finley, J. W. How To Standardize the Multiplicity of Methods To Evaluate
350 Natural Antioxidants. *J Agric Food Chem.* **2008**, *56*, 4901-4908.
- 351 (11) Moon, K.; Shibamoto, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *J Agric Food*
352 *Chem.* **2009**, *57*, 1655-1666.
- 353 (12) Capitani, C. D.; Carvalho, A. C. L.; Botelho, P. B.; Carrapeiro, M. M.; Castro, I. A. Synergism
354 on antioxidant activity between natural compounds optimized by response surface methodology. *Eur*
355 *J Lipid Sci Technol.* **2009**, *111*, 1100-1110.
- 356 (13) Castro, I. A.; Rogero, M. M.; Junqueira, R. M.; Carrapeiro, M. M. Free radical scavenger and
357 antioxidant capacity correlation of α -tocopherol and trolox measured by three *in vitro* methodologies.
358 *Int J Food Sci Nutr.* **2006**, *57*, 75-82.
- 359 (14) Niki, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med.* **2010**, *49*,
360 503-515.
- 361 (15) Xie, W.; Ji, J.; Wang, H. Impact of surfactant type, pH and antioxidants on the oxidation of
362 methyl linoleate in micellar solutions. *Food Res Int.* **2007**, *40*, 1270-1275.
- 363 (16) Laguerre, M.; Lecomte, J.; Villeneuve, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract
364 lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progr Lipid Res.* **2007**, *46*, 244-282.

- 365 (17) Branco, G. F.; Castro, I. A. Optimization of oil oxidation by response surface methodology and
366 the application of this model to evaluate antioxidants. *J Am Oil Chem Soc.* **2011**, doi:
367 10.1007/s11746-011-1842-8
- 368 (18) Khan, M. A.; Shahidi, F. Photooxidative stability of stripped and non-stripped borage and
369 evening primrose oils and their emulsions in water. *Food Chem.* 2002, 79, 47-53.
- 370 (19) Waraho, T.; Cardenia, V.; Rodriguez-Estrada, M. T.; McClements, D. J.; Decker, E. A.
371 Prooxidant mechanisms of free fatty acids in stripped soybean oil-in-water emulsions. *J Agric Food*
372 *Chem.* **2009**, 57, 7112-7117.
- 373 (20) Shantha, N. C.; Decker, E. A. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for
374 determination of peroxide values of food lipids. *JAOAC Int.* **1994**, 77, 421-424.
- 375 (21) McDonald, R. E.; Hultin, H. O. Some characteristics of the enzymic lipid peroxidation system
376 in the microsomal fraction of flounder skeletal muscle. *J Food Sci.* **1987**, 52, 15-21.
- 377 (22) Rodrigues, M. I.; Iemma, A. F. *Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos*, 2nd
378 ed.; Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor: Campinas, BR, 2009.
- 379 (23) Derringer, G.; Suich, R. Simultaneous optimization of several response variables. *J Qual*
380 *Technol.* **1980**, 12, 214-219.
- 381 (24) Haaland, P. D. *Experimental Design in Biotechnology*; Marcel Dekker, Inc.: New York, NY,
382 1989.
- 383 (25) AOCS. AOCS Recommended Practice. Assessing the Effects of Antioxidants in Oils and Fats
384 (Cg 7-05). *AOCS Official Methods and Recommended Practice*, 5th ed.; AOCS: Champaign, IL,
385 2005.
- 386 (26) McClements, D. J.; Decker E. A. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular
387 environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *J Food Sci.* **2000**, 65, 1270-1282.
- 388 (27) Frankel, E. N. *Lipid oxidation*, 2nd ed.; The Oily Press: Bridgewater, UK, 2005.

- 389 (28) Mei, L.; McClements, D. J.; Wu, J.; Decker, E. A. Iron-catalyzed lipid oxidation in emulsion as
390 affected by surfactant, pH and NaCl. *Food Chem.* **1998**, *61*, 307-312.
- 391 (29) Boon, C. S.; McClements, D. J.; Weiss, J.; Decker, E. A. Role of Iron and Hydroperoxides in
392 the Degradation of Lycopene in Oil-in-Water Emulsions. *J Agric Food Chem.* **2009**, *57*, 2993-2998.
- 393 (30) Porter, W. L. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. *Toxicol Indus*
394 *Health.* **1993**, *9*, 93-122.
- 395 (31) Frankel, E. N.; Huang, S.-W.; Kanner, J.; German, J. B. Interfacial phenomena in the evaluation
396 of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *J Agric Food Chem.* **1994**, *42*, 1054-1059.
- 397 (32) Donnelly, J. L.; Decker, E. A.; McClements, D. J.. Iron-Catalyzed Oxidation of Menhaden Oil
398 as Affected by Emulsifiers. *J Food Sci.* **1998**, *63*, 997-1000.
- 399 (33) Gregory III, J. F. Vitamins. In *Food Chemistry*, 4th edition; Damodaran, S.; Parkin, K.;
400 Fennema, O. R., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2008.
- 401 (34) Choe, E.; Min, D. B. Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Compre Rev Food Sci*
402 *Food Saf.* **2006**, *5*, 169-186.
- 403 (35) Yen, G.-C.; Duh, P.-D.; Tsai, H.-L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and
404 gallic acid. *Food Chem.* **2002**, *79*, 307-313.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Pareto chart of standardized effects observed in 1% emulsions: A (LOOH); B (TBARS).

Figure 2. Fitted surface of the responses LOOH and TBARS measured in the (1%) emulsions at pH 3.0 and pH 7.0 based on the interaction between Fe^{2+} and AH: A (LOOH at pH 3.0); B (LOOH at pH 7.0); C (TBARS at pH 3.0) and D (TBARS at pH 7.0).

Figure 3. Oxidation markers measured before and after optimization: A (LOOH) and B (TBARS). Optimized: 30°C, 1% stripped oil, 1.7 mmol/L AH, 0.885 mmol/L Fe^{2+} , pH 5.5. Non-optimized: 30°C, 1% stripped oil, 0.0 mmol/L AH, 1.000 mmol/L Fe^{2+} , pH 3.0.

Figure 4. Scheme of lipid oxidation based on the oil-in-water emulsion applied as model.

TABLES

Table 1. Plackett-Burman (PB) design applied for the initial screening of significant factors that influence the oxidation rate.

Assay	Factors ^a (coded values)						
	Temp	Fe ²⁺	Cu ²⁺	AP	AH	NaCl	pH
	°C	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	%	-
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	1
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0
True values ^b							
(-1)	30	0.00	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0
0	45	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	5.0
(+1)	60	0.50	1.0	1.0	1.0	1.0	7.0

^a Factors are designated as temperature (Temp), iron concentration (Fe²⁺), copper concentration (Cu²⁺), ascorbyl palmitate (AP), ascorbic acid (AH), sodium chloride (NaCl) and pH. Coded values: (+1), (0) and (-1) correspond to the highest, intermediate and lowest values of each factor.

^b Corresponds to the values adopted for each factor in the emulsion formulation. For example, assay 1 was performed under the following conditions: 60°C, iron absence, 1.0 mmol/L copper, ascorbyl palmitate, ascorbic acid and salt absence, at pH 7.0.

Table 2. Central composite design containing three factors selected by the PB design at three variation levels and the oxidative chemical markers observed in each assay.

Assay	Factors ^a			Oxidation markers ^b		
	Fe ²⁺	AH	pH	LOOH	TBARS	T _{LOOH}
	units	mmol/L	-	meq/L	mmol/L	h
1	-1.00	-1.00	-1.00	3.59	5.69	50.0
2	1.00	-1.00	-1.00	3.09	9.89	74.0
3	-1.00	1.00	-1.00	2.94	6.04	98.0
4	1.00	1.00	-1.00	2.57	12.59	36.1
5	-1.00	-1.00	1.00	5.11	4.35	48.0
6	1.00	-1.00	1.00	5.35	6.48	78.2
7	-1.00	1.00	1.00	4.06	8.00	96.4
8	1.00	1.00	1.00	4.37	12.45	40.1
9	-1.68	0.00	0.00	4.45	4.73	96.0
10	1.68	0.00	0.00	4.29	12.00	70.1
11	0.00	-1.68	0.00	5.26	6.40	70.0
12	0.00	1.68	0.00	3.88	11.72	78.2
13	0.00	0.00	-1.68	1.52	9.05	42.0
14	0.00	0.00	1.68	4.48	7.50	42.3
15	0.00	0.00	0.00	4.56	14.31	89.9
16	0.00	0.00	0.00	4.50	14.23	89.8
17	0.00	0.00	0.00	4.55	14.30	90.2
Pooled SD ^b	-	-	-	1.00	3.47	22.0
True values						
-1.68	0.00	0.00	3.00	-	-	-
-1.00	0.20	0.40	3.81	-	-	-
0.00	0.50	1.00	5.00	-	-	-
+1.00	0.80	1.60	6.19	-	-	-
1.68	1.00	2.00	7.00	-	-	-

^a Factors are designated as iron concentration (Fe²⁺), ascorbic acid (AH) and pH.
^b Values are means (n=2) followed by the pooled standard deviation. Chemical markers were measured in the (1%) emulsions at 30°C.

Table 3. Effect estimates ($\pm$ standard error) and quality evaluation of the models adjusted to the three chemical markers (LOOH, TBARS and T_{LOOH}).

<i>Chemical markers of oxidation reaction</i>			
Effect Estimates ($\pm$ SE)	<i>LOOH</i> (meq/L)	<i>TBARS</i> (mmoL/L)	T_{LOOH} (h)
Mean	4.54 $\pm$ 0.01	14.28 $\pm$ 0.02	89.96 $\pm$ 0.07
Fe ²⁺ (Linear, x_1)	-0.09 $\pm$ 0.01	4.33 $\pm$ 0.02	-15.76 $\pm$ 0.07
Fe ²⁺ (Quadratic, x_1^2)	-0.15 $\pm$ 0.01	-4.20 $\pm$ 0.02	-4.82 $\pm$ 0.08
AH (Linear, x_2)	-0.81 $\pm$ 0.01	3.17 $\pm$ 0.02	5.01 $\pm$ 0.07
AH (Quadratic, x_2^2)	-0.00 $\pm$ 0.01	-3.17 $\pm$ 0.02	-11.22 $\pm$ 0.08
pH (Linear, x_3)	1.71 $\pm$ 0.01	-0.81 $\pm$ 0.02	0.73 $\pm$ 0.07
pH (Quadratic, x_3^2)	-1.12 $\pm$ 0.01	-4.26 $\pm$ 0.02	-33.82 $\pm$ 0.08
Fe ²⁺ $\times$ AH (Linear, x_1x_2)	0.05 $\pm$ 0.02	1.17 $\pm$ 0.02	-43.09 $\pm$ 0.09
Fe ²⁺ $\times$ pH (Linear, x_1x_3)	0.35 $\pm$ 0.02	-1.04 $\pm$ 0.02	2.91 $\pm$ 0.09
AH $\times$ pH (Linear, x_2x_3)	-0.21 $\pm$ 0.02	1.64 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.09
Blocks	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.06
<i>Probability value (lack of fit)</i>	0.259	0.222	0.071
<i>Determination coefficient (R^2)</i>	0.99861	0.99973	0.99972

Table 4. Validation of the selected model using five randomized combinations of the three factors.

<i>Additional Assays</i>					
Factors and markers	1	2	3	4	5
Fe ²⁺ (mmol/L)	0.885	0.247	0.375	0.732	0.967
AH (mmol/L)	1.700	1.792	1.155	0.083	0.446
pH	5.51	4.37	3.61	4.63	6.24
LOOH (pred) ^a	4.24	3.51	2.80	4.65	5.32
LOOH (obs) ^b	4.22 ± 0.04	3.47 ± 0.01	2.79 ± 0.03	4.67 ± 0.02	5.21 ± 0.02
LOOH (relative error) ^c	-0,47%	-1,15%	-0,36%	0,43%	-2,11%
TBARS (pred) ^a	13.31	7.90	7.60	4.21	10.28
TBARS (obs) ^b	13.27 ± 0.03	7.94 ± 0.04	7.65 ± 0.04	4.26 ± 0.02	10.30 ± 0.01
TBARS (relative error) ^c	-0,30%	0,50%	0,65%	1,17%	0,19%
T _{LOOH} (pred) ^a	36.0	108.4	72.6	89.0	80.4
T _{LOOH} (obs) ^b	36.0	108.0	72.0	88.0	80.0
T _{LOOH} (relative error) ^c	0	-0,37%	-0,83%	-1,14%	-0,50%

^a Predicted values obtained by the respective polynomial models
^b Observed mean values (n=2) followed by the standard deviation (SD)
^c Relative error (%) = ((y_{obs} - y_{pred})/y_{obs})*100. Values between -5% < x < 5% indicate there is no significant differences between the observed value and the value predicted by the model.

FIGURES

Figure 1.

Figure 2.

Figure 3.

Figure 4.

ANEXOS

Gabriel Favalli Branco

Engenheiro de Alimentos formado pela Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP (2008) e mestrando em Ciências pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP. Possui experiência na área comercial, de qualidade e de planejamento, com ênfase em desenvolvimento de novos produtos, inovação, satisfação do cliente e gestão de projetos. Apresenta amplo conhecimento nas áreas de Engenharia, Tecnologia e Ciência de Alimentos, com ênfase em Química e Bioquímica dos Alimentos e Análise Estatística (técnicas de planejamento, modelagem e otimização).

(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 13/07/2011

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/8450482811222357>

Dados pessoais

Nome Gabriel Favalli Branco

Nome em citações bibliográficas BRANCO, G. F.

Sexo Masculino

Formação acadêmica/Titulação

- 2009** Mestrado em andamento em Ciências dos Alimentos (Conceito CAPES 7) .
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Aplicação de técnicas fatoriais de planejamento no desenvolvimento de um modelo para avaliação da oxidação em óleos e emulsões., *Orientador:* Inar Alves de Castro.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior .
Palavras-chave: antioxidantes; oxidação; óleo puro; emulsão; metodologia de superfície de resposta (RSM).
Grande área: Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Ciência de Alimentos / *Especialidade:* Química e Bioquímica dos Alimentos.
Grande área: Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Ciência de Alimentos / *Especialidade:* Análise estatística.
- 2004 - 2008** Graduação em Bacharelado em Engenharia de Alimentos .
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.

Formação complementar

- 2008 - 2008** XII Congresso Brasileiro de Nutrologia. (Carga horária: 30h).
Associação Brasileira de Nutrologia.
- 2007 - 2007** XI Congresso Brasileiro de Nutrologia. (Carga horária: 24h).
Associação Brasileira de Nutrologia.
- 2007 - 2007** Nutrição. (Carga horária: 16h).
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.
- 2006 - 2006** Alimentos Funcionais. (Carga horária: 16h).
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.
- 2005 - 2005** Alimentos Funcionais. (Carga horária: 16h).
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.
- 2004 - 2004** Inovações Tecnológicas. (Carga horária: 16h).
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.

Atuação profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2009 - Atual Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Pesquisador (mestrado), Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações Responsável pelo planejamento, modelagem e otimização de sistemas para avaliação de compostos antioxidantes, através da metodologia de superfície de resposta (RSM).

Vínculo institucional

2010 - 2010 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Programa de Aperfeiçoamento de Ensino, Carga horária: 6

Outras informações Participação no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE), auxiliando os docentes na elaboração, execução e apresentação das aulas. Disciplina - Fundamentos da Análise Sensorial de Alimentos.

Vínculo institucional

2009 - 2009 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Programa de Aperfeiçoamento de Ensino, Carga horária: 6

Outras informações Participação no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE), auxiliando os docentes na elaboração, execução e apresentação das aulas. Disciplina - Química e Bioquímica dos Alimentos.

Atividades

02/2009 - Atual Atividades de Participação em Projeto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .

Projetos de pesquisa

[Aplicação de técnicas fatoriais de planejamento no desenvolvimento de um modelo para avaliação da oxidação em óleos e emulsões.](#)

Universidade Guarulhos, UNG, Brasil.

Vínculo institucional

2009 - 2009 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Ministrante, Carga horária: 6

Outras informações Curso de Férias de Ciências e Tecnologia dos Alimentos, ministrado no dia 18/07/2009.

Tovani Benzaquen Representações Ltda., TVN, Brasil.

Vínculo institucional

2007 - 2008 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 24

Outras informações Atuação na área comercial e de planejamento, com ênfase em vendas técnicas de alto valor agregado, desenvolvimento de novos produtos, suporte ao cliente e gestão de projetos.

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Programa de Apoio Didático, Carga horária: 5

Outras informações Participação no Programa de Apoio Didático (PAD), auxiliando os docentes na elaboração, execução e apresentação das aulas. Disciplina - Microbiologia de Processos

Vínculo institucional

2007 - 2007 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Programa de Apoio Didático, Carga horária: 5

Outras informações Participação no Programa de Apoio Didático (PAD), auxiliando os docentes na elaboração, execução e apresentação das aulas. Disciplina - Química de Alimentos II

Vínculo institucional

2007 - 2007 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Programa de Apoio Didático, Carga horária: 5

Outras informações Participação no Programa de Apoio Didático (PAD), auxiliando os docentes na elaboração, execução e apresentação das aulas. Disciplina - Química de Alimentos I

Vínculo institucional

2006 - 2006 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Programa de Apoio Didático, Carga horária: 5

Outras informações Participação no Programa de Apoio Didático (PAD), auxiliando os docentes na elaboração, execução e apresentação das aulas. Disciplina - Características e Pré-processamento de Frutas, Hortaliças, Café, Cacau e Cana

Projetos de Pesquisa

2009 - 2011 Aplicação de técnicas fatoriais de planejamento no desenvolvimento de um modelo para avaliação da oxidação em óleos e emulsões.

Descrição: A estabilidade oxidativa em óleos e emulsões é influenciada pela ação simultânea de diversos fatores. Entretanto, a avaliação do efeito antioxidante de novos compostos tem sido conduzida utilizando-se valores fixos para esses fatores. Portanto, o objetivo deste estudo foi aplicar técnicas fatoriais para desenvolver modelos de oxidação lipídica nos quais os principais fatores pudessem variar simultaneamente..

Situação: Em andamento; *Natureza:* Pesquisa.

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1) .

Integrantes: Inar Alves de Castro - Coordenador / Gabriel Favalli Branco - Integrante.

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Auxílio financeiro..

Áreas de atuação

1. *Grande área:* Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Ciência de Alimentos.
2. *Grande área:* Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Ciência de Alimentos / *Especialidade:* Química e Bioquímica dos Alimentos.
3. *Grande área:* Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Tecnologia de Alimentos.
4. *Grande área:* Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Ciência de Alimentos / *Especialidade:* Análise estatística.
5. *Grande área:* Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Ciência de Alimentos / *Especialidade:* Avaliação e Controle de Qualidade de Alimentos.

Idiomas

- Inglês** Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
- Espanhol** Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

Prêmios e títulos

- 2009** Certificado de Honra ao Mérito - destaque em primeiro lugar no Curso de Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas no ano letivo de 2008, Conselho Regional de Engenharia, Arquitetura e Agronomia do Estado de São Paulo, CREA-SP.
- 2003** Proficiency in English - First Certificate in English, University of Cambridge.
- 2003** Proficiency in English, Instituto Cultural Norte Americano.
- 2003** Melhor aluno da década (2000), Colégio Agostiniano São José.

Produção em C,T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. ★ ZAJDENWERG, C. ; BRANCO, G. F. ; ALAMED, J. ; DECKER, E.A. ; CASTRO, I. A. . Correlation between sensory and chemical markers in the evaluation of Brazil nut oxidative shelf-life. *European Food Research & Technology (Print)* **JCR**, v. 233, p. 109-116, 2011.
2. ★ GRANATO, D. ; BRANCO, G. F. ; CRUZ, A. G. ; FARIA, J. A. F. ; SHAH, N. P. . Probiotic Dairy Products as Functional Foods. *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY* **JCR**, v. 9, p. 455-470, 2010.
3. GRANATO, D. ; BRANCO, G. F. ; CRUZ, A. G. ; FARIA, J. A. F. ; NAZZARO, F. . Functional foods and non-dairy probiotic food development: trends, concepts and products. *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY* **JCR**, v. 9, p. 292-302, 2010.

Capítulos de livros publicados

1. ★ SAAD, S.M.I. ; KOMATSU, T.R. ; GRANATO, D. ; BRANCO, G. F. ; BURITI, F.C.A. . Probióticos e prebióticos em alimentos: aspectos tecnológicos, legislação e segurança no uso. In: Susana Marta Isay Saad; Adriano Gomes da Cruz; José de Assis Fonseca Faria. (Org.). *Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas*. 1 ed. São Paulo: Varela, 2011, v. 1, p. 23-49.

Resumos publicados em anais de congressos

1. ZAJDENWERG, C. ; BRANCO, G. F. ; ALAMED, J. ; DECKER, E.A. ; CASTRO, I. A. . Correlation between sensory and chemical markers in the evaluation of Brazil nut oxidative shelf-life. In: 102nd AOCS Annual Meeting & Expo, 2011, Cincinnati. 102nd AOCS Annual Meeting & Expo - Abstracts, 2011. v. 1. p. 86-86.
2. BRANCO, G. F. ; CASTRO, I. A. . Optimization of Oil Oxidation by Response Surface Methodology and the Application of this Model to Evaluate Antioxidants. In: 102nd AOCS Annual Meeting & Expo, 2011, Cincinnati. 102nd AOCS Annual Meeting & Expo - Abstracts, 2011. v. 1. p. 87-87.
3. MINETTO, J.S. ; BRANCO, G. F. ; CASTRO, I. A. . Lipid Oxidation in French Fries Samples Commercialized on Districts with Different Human Development Index of São Paulo. In: 101st AOCS Annual Meeting & Expo, 2010, Phoenix. 101st AOCS Annual Meeting & Expo, 2010. v. 1. p. 104-104.
4. GRANATO, D. ; CASTRO, I. A. ; CRUZ, A. G. ; BRANCO, G. F. ; KATAYAMA, F.C.U. . Evaluation of the in vitro free-radical scavenging activity of purple grape juices using chemometrics. In: VIII Euro Fed Lipids, 2010, Munich. *Annals of the VIII Euro Fed Lipids*. Munich : VIII Euro Fed Lipids, 2010. v. 1. p. 3-4.
5. GRANATO, D. ; RIBEIRO, J. C. B. ; BRANCO, G. F. ; MASSON, M. L. ; CASTRO, I. A. . Instrumental Color and Sensory Acceptance of

Soy-based Emulsions: a Response Surface Approach. In: XXIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2009, São Paulo. XXIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2009.

6. GRANATO, D. ; RIBEIRO, J. C. B. ; BRANCO, G. F. ; MASSON, M. L. ; CASTRO, I. A. . Development of a New Soy-based dessert with Passion Fruit Juice. In: XXIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2009, São Paulo. XXIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2009.

Artigos aceitos para publicação

1. BRANCO, G. F. ; CASTRO, I. A. . Optimization of Oil Oxidation by Response Surface Methodology and the Application of this Model to Evaluate Antioxidants. Journal of the American Oil Chemists' Society **JCR**, 2011.

Apresentações de Trabalho

1. BRANCO, G. F. . Estratégias para controle de oxidação em emulsões. 2009. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

Demais tipos de produção bibliográfica

1. BRANCO, G. F. . Estudo da interação do alumínio com fases lipídicas em sistemas industriais e biológicos 2008 (Trabalho de Conclusão de Curso).

Eventos

Participação em eventos

1. XXIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. Instrumental Color and Sensory Acceptance of Soy-based Emulsions: a Response Surface Approach. 2009. (Simpósio).
2. XXIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. Development of a New Soy-based dessert with Passion Fruit Juice. 2009. (Simpósio).
3. XII Congresso Brasileiro de Nutrologia. 2008. (Congresso).
4. XI Congresso de Nutrologia. 2007. (Congresso).
5. Semana de Engenharia de Alimentos. 2007. (Encontro).
6. Semana de Engenharia de Alimentos. 2006. (Encontro).
7. Semana de Engenharia de Alimentos. 2005. (Encontro).
8. Semana de Engenharia de Alimentos. 2004. (Encontro).