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

**Aplicação de planejamento fatorial na oxidação de óleos
contendo diferentes tipos de ácidos graxos ômega 3**

Thamyris Agnes Dias Fabiano

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

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

São Paulo

2017

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

**Aplicação de planejamento fatorial na oxidação de óleos
contendo diferentes tipos de ácidos graxos ômega 3**

Thamyris Agnes Dias Fabiano

Versão Original

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

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

São Paulo

2017

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

A272a Agnes Dias Fabiano, Thamyris
Aplicação de planejamento fatorial na oxidação de
óleos contendo diferentes tipos de ácidos graxos
ômega 3 / Thamyris Agnes Dias Fabiano. - São Paulo,
2017.
119 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Castro, Inar Alves de

1. Oxidação. 2. Ácidos Graxos. 3. Oxidação
Acelerada. 4. Ômega 3. 5. Fenóis. I. T. II. Castro,
Inar Alves de, orientador.

Thamyris Agnes Dias Fabiano

**Aplicação de planejamento fatorial na oxidação de óleos
contendo diferentes tipos de ácidos graxos ômega 3**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

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

1°. Examinador

2°. Examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2017.

“Se você for tentar, vá até o fim. Senão, nem comece. Vá. Até. O fim. Isso pode significar perder amores, amigos, empregos e talvez até a cabeça. Vá até o fim. Isso pode significar três ou quatro dias sem comer. Isso pode significar congelar no banco de um parque. Isso pode significar deboche, rejeição. Solidão. Solidão? Pense nela como um presente. E em todo o resto como um teste à sua persistência. O tamanho da sua vontade de chegar lá. Você vai chegar. E vai ser melhor do que qualquer coisa que você possa imaginar”.

Henry Charles Bukowsk

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter guiado meu caminho para que eu pudesse chegar até aqui, e por ter me dado sabedoria quando as palavras me faltaram. “Porque sem Ele, nada do que foi feito, se fez”.

À minha mãe **Jocielene**, por ter me ensinado que o “lá” nunca é um lugar tão longe em que eu não possa chegar. Pelo ombro que sempre me foi ofertado com todo o amor incondicional que só uma mãe pode ter, por sempre acreditar e confiar em mim, e pelas inúmeras palavras sábias, que não só me espelharam como confortaram minha alma. Ao meu pai **Roberto**, por ter me ensinado a amar os números, que foram inicialmente a minha porta nos estudos. Por seu amor incondicional, que é fundamental nos meus dias e pelo brilho nos seus olhos quando fala da minha trajetória.

Aos meus amigos, irmãos e cunhada, pelos inúmeros conselhos, por incentivarem e acreditarem em mim. À minha madrinha por me acompanhar tão de perto, mesmo estando tão longe. À minha querida e eterna avó **Geny** (em memória), por celebrar comigo cada vitória. Vocês são fundamentais em minha vida!

À minha orientadora professora **Inar**, pela oportunidade concedida. Por todo o ensinamento oferecido e por contribuir com o meu crescimento profissional e pessoal.

Às colegas de laboratório **Bianca**, **Marina** e **Lívia**, por toda ajuda oferecida, pelas análises realizadas e pelos momentos de descontração.

Às queridas IC's **Aline**, **Carol** e **Gabi**, por cada peróxido e TBARS que me auxiliaram a fazer, sou muito grata. Por cada risada e por todos os momentos que pude passar com vocês, sempre as levarei comigo!

Às queridas amigas que esta universidade me trouxe: **Gabi**, por ter exercido o papel de irmã mais velha neste período, por chamar minha atenção, e principalmente por se orgulhar de mim. **Sabrina**, por ter me apoiado em cada passo e por estar ao meu lado quando

ninguém mais esteve, acreditando em mim, sempre. **Janayra**, por todo apoio e incentivo e por ter me mostrado o quão doce pode ser uma amizade. **Vanessa** por toda a luz que trouxe até mim, e por acreditar no meu potencial. Vocês são um presente pra mim!

Às alunas do professor Thomas, por sempre se prontificarem a ajudar.

Ao professor **Stanley Deming** da Universidade de Houston, pela parceria e suporte oferecido nas análises estatísticas.

Ao programa de **Ciência dos Alimentos**, e ao departamento de **Nutrição Experimental** da **Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP**, pela oportunidade concedida para a realização desse projeto.

Ao **Edilson, Mônica, Cléo e Roberta** da secretaria do bloco 14, por toda ajuda e suporte.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste projeto.

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

À todos que colaboraram, direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.
Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	17
2. Revisão da literatura.....	19
2.1. Ácidos graxos ômega 3 como estratégia de prevenção da Aterosclerose.....	19
2.2. Oxidação lipídica.....	20
2.3. Produtos secundários da oxidação de ácidos graxos ômega 3.....	22
2.4. Pró-oxidantes e oxidação acelerada.....	24
2.5. Inibição da oxidação lipídica.....	29
2.6. Compostos fenólicos e sua atividade antioxidante in vitro.....	30
3. Hipóteses.....	36
4. Objetivo.....	38
5. Materiais e métodos.....	39
5.1. Materiais.....	39
5.2. Métodos.....	39
5.2.1. Planejamento experimental.....	39
5.2.1.1. Preparação de amostras para indução – IND.....	40
5.2.1.2. Obtenção das regressões e otimização.....	41
5.2.1.3. Indução de oxidação pelo método tradicional – TRAD.....	42
5.2.2. Marcadores químicos da estabilidade oxidativa.....	42
5.2.2.1. Determinação da concentração de Hidroperóxidos (LOOH).....	42
5.2.2.2. Determinação da concentração de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	43
5.2.2.3. Determinação de compostos voláteis por HS-SPME-GC-MS.....	43
5.2.3. Composição de ácidos graxos.....	44
5.2.4. Determinação da concentração de tocoferol.....	45
5.2.5. Análise estatística.....	46
6. Resultados.....	47
6.1. Efeito dos indutores e suas interações sobre os marcadores químicos de oxidação.....	47
6.2. Valores recomendados para indução de oxidação.....	49

6.3.	Comparação de valores estimados e observados para os marcadores químicos de oxidação	51
6.4.	Marcadores químicos de oxidação.....	51
6.4.1.	Quantificação de LOOH, TBARS e produtos voláteis.....	52
6.4.2.	Composição de ácidos graxos, teor de tocoferol e índice de peroxidabilidade.....	54
6.5.	Identificação e quantificação de compostos voláteis.....	56
6.6.	Atividade antioxidantes do ácido sinápico e da rutina.....	59
7.	Discussão	61
7.1.	Efeito dos indutores na oxidação das amostras de óleo.....	61
7.2.	Compostos voláteis.....	62
7.3.	Ação antioxidante dos compostos fenólicos.....	64
8.	Conclusão	66
9.	Referências	67
	Anexos	77
	Anexo I. Preparo dos indutores adicionados diretamente no óleo.....	77
	Anexo II. Concentração de LOOH em amostras de óleo de <i>Echium</i>	80
	Anexo III. Concentração de TBARS em amostras de óleo de <i>Echium</i>	82
	Anexo IV. Concentração de LOOH em amostras de óleo de Linhaça.....	84
	Anexo V. Concentração de TBARS em amostras de óleo de Linhaça.....	85
	Anexo VI. Concentração de LOOH em amostras de óleo de Fígado de bacalhau.....	88
	Anexo VII. Concentração de TBARS em amostras de óleo de Fígado de bacalhau.....	90
	Anexo VIII. Ficha do aluno.....	92
	Anexo IX. Artigo.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Planejamento Experimental fatorial fracionário de resolução V (2^{5-1}).....	40
Tabela 2 - Indutores de oxidação e respectiva faixa de variação.....	41
Tabela 3 - Valores reais e codificados obtidos após otimização dos marcadores LOOH e TBARS. Desejabilidade (%) e os valores estimados obtidos pelos respectivos modelos.....	50
Tabela 4 - Marcadores químicos e alterações químicas de óleos: frescos (fresh), após oxidação acelerada por indutores (IND), e após oxidação acelerada tradicional por 60°C/15 dias (TRAD).....	53
Tabela 5 - Composição de ácidos graxos, teor de tocoferol e índice de peroxidabilidade das três amostras de óleo: frescos, após oxidação acelerada por indutores (IND) e após oxidação acelerada tradicional por 60°C/15 dias (TRAD).....	55
Tabela 6 - Efeitos dos compostos fenólicos nos marcadores oxidativos.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas da oxidação lipídica.....	21
Figura 2 - Formação de compostos primários (LOOH) e secundários (TBARS) a partir da autooxidação do ácido α -linolênico.....	23
Figura 3 - Mecanismo de decomposição de hidroperóxidos e formação de produtos secundários de oxidação.....	25
Figura 4 - Ação antioxidante e pró-oxidante do ascorbil palmitato.....	27
Figura 5 - Estrutura química dos azo-indutores AAPH e AMVN.....	28
Figura 6 - Etapas da indução de oxidação por azo-indutores.....	28
Figura 7 - Síntese de reações antioxidantes com radicais lipídicos e outros Antioxidantes.....	29
Figura 8 - Exemplos de diferentes classes de compostos fenólicos.....	31
Figura 9 - Estrutura química dos principais ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico e ácido cinâmico.....	32
Figura 10 - Estabilização por ressonância de um radical antioxidante.....	32
Figura 11 - Estrutura molecular do ácido sinápico.....	33
Figura 12 - Estrutura molecular da rutina.....	34
Figura 13 - Hipóteses abordadas nesse estudo.....	36
Figura 14 - Gráfico de pareto de efeitos padronizados.....	48
Figura 15 - Valores de LOOH e TBARS observados e estimados para cada óleo.....	51
Figura 16 - Área observada para os principais compostos voláteis.....	57
Figura 17 - TIC Cromatograma do óleo de <i>Echium</i> oxidado a 60°C/15dias (TRAD).....	57
Figura 18 - TIC Cromatograma dos padrões dos compostos voláteis diluídos em MTC...58	

LISTA DE ABREVIATURAS

A [•]	Antioxidante radical
AA	Dímero antioxidante
AAPH	2,2'-Azobis dicloridrato de 2-amidinopropano
AH	Antioxidante
ALA	Ácido alfa linolênico
AMVN	2,2'-azobis-2,4 dimetilvaleronitrilo
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	Ascorbil palmitato
ARA	Ácido Aracdônico
AUC	Área sob a curva
BHA	Butilhidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
CONT	Controle
COOH	Grupo carboxila
DHA	Ácido docosahexaenóico
DPA	Ácido docosapentaenoico
DVC	Doenças cardiovasculares
EDA	Ácido eicosadienóico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Ácido eicosapentaenoico
Fe ²⁺	Íon ferroso

Fe ³⁺	Íon férrico
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato ferroso heptahidratado
GLA	Ácido gama-linolênico
H ⁺	Íon hidron
HAT	Hydrogen Atom Transfer
HO [•]	Radical hidroxila
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HS-SPME-GC-MS	Headspace solid phase microextraction for gas chromatography mass spectrometry
In [•]	Espécie reativa
IND	Método de oxidação por indução
InH	Espécie reativa reduzida
L [•]	Radical acila
LA	Lipídio conjugado com antioxidante
LH	Ácido graxo insaturado
LNA	Ácido Alfa-linoleico
LO [•]	Radical alcoxila
LOA	Lipídio conjugado com antioxidante
LOH	Álcool lipídico
LOO [•]	Radical peroxila
LOOA	Lipídio conjugado com antioxidante
LOOH	Hidroperóxidos
MBIK	4-metil-2-pentanona
n-3 FA	Ácidos graxos poliinsaturados ômega 3

NaOH	Hidróxido de sódio
NIST	National Institute of Standards and Technology
O/W	Óleo em água
OH ⁻	Íon hidroxila
PG	Propil galato
ROS	Reactive Oxygen Species
SDA	Ácido estearidônico
SET	Single electron transfer
TBA	Ácido 2- tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBHQ	Terc-butil-hidroquinona
TCA	Ácido tricloroacético
TEP	1,1,3,3-tetraetoxipropano
TRAD	Método de oxidação tradicional
TROLOX	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico
TWEEN 20	Polioexitilenosorbitano monolaurato
W/O	Água em óleo

RESUMO

AGNES D. F., T. **Aplicação de planejamento fatorial na oxidação de óleos contendo diferentes tipos de ácidos graxos ômega 3**. 2017. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2017.

Óleos contendo alta proporção de ácidos graxos ômega-3 (n-3 FA) têm sido aplicados na formulação de alimentos ou comercializados como suplementos, com a finalidade de reduzir o risco cardiovascular, principalmente devido aos seus efeitos hipotriglicêmicos e anti-inflamatórios. No entanto, a susceptibilidade à oxidação dos n-3 FA é elevada, levando à formação de vários produtos secundários, incluindo alguns tóxicos e potencialmente aterogênicos. Por esta razão, compostos naturais com propriedades antioxidantes têm sido investigados com o objetivo de melhorar a estabilidade oxidativa dos óleos com alta proporção de n-3 FA. Neste estudo, avaliou-se a capacidade antioxidante de dois compostos naturais (ácido sinápico e hidrato de rutina) utilizando-se um modelo acelerado para oxidar os óleos. Foram combinados cinco indutores (Temperatura; Ferro- Fe^{2+} ; 2,2'-Azobis dicloridrato de 2-amidinopropano – AAPH; ascorbil palmitato - AP e 2,2'-azobis -2,4-dimetilvaleronitrilo - AMVN) em um delineamento fatorial (2^{5-1}) com $\frac{1}{2}$ fração de "resolução V" para acelerar a oxidação de três óleos (linhaça, *Echium* e peixe) contendo diferentes fontes de n-3 FA: ácido α -linolênico (ALA), ácido estearidônico (SDA) e ácido eicosapentaenóico (EPA) + ácido docosahexaenóico (DHA), respectivamente. Não houve diferença entre os marcadores de oxidação (LOOH e TBARS) estimados pelos modelos e os valores observados experimentalmente. Os indutores AMVN e Fe^{2+} foram os principais fatores responsáveis pelo aumento da concentração de TBARS. Os valores dos marcadores oxidativos obtidos 48 h após a indução foram semelhantes ou superiores àqueles observados nas amostras oxidadas a 60°C por 15 dias, sendo ambos maiores que os valores observados nas amostras de óleo frescas. Entre os compostos voláteis formados pela oxidação de diferentes fontes de n-3 FA, (E, E) 2,4 -heptadienal, (E, E) 2,4-decadienal, decanal, undecanal e (E) -2-undecenal foram identificados em todas as amostras, podendo ser utilizados como marcadores oxidativos mais específicos. Utilizando o modelo de oxidação acelerada, o hidrato de rutina melhorou a estabilidade oxidativa do óleo de peixe, provavelmente devido à presença de grupos catecol em sua estrutura química. Este estudo contribuiu para que ensaios mais rápidos fossem realizados na avaliação do efeito antioxidante de novas moléculas aplicadas em óleos funcionais comestíveis.

Palavras-chave: ácidos graxos, oxidação, fenóis, óleos, *Echium*, rutina, oxidação acelerada, ômega 3

ABSTRACT

AGNES D. F., T. **The use of factorial design to evaluate the oxidation of oils containing different types of omega 3 fatty acids.** 2017. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2017.

Oils containing a high proportion of omega-3 fatty acids (n-3 FA) have been used in the formulation of foods or sold as supplements, aiming to reduce cardio-vascular risks, mainly due to their hypotriglycemic and anti-inflammatory effects. However, n-3 FA are highly susceptible to oxidation, leading to the formation of several products, including some toxic and potentially atherogenic. For this reason, natural products with antioxidant properties have been investigated to improve the oxidative stability of oils with a high proportion of n-3 FA. This study evaluated the antioxidant capacity of two natural compounds (sinapic acid and rutin hydrate), using an accelerated model to oxidize the oils. Five inducers were combined (Temperature, Iron-Fe²⁺, 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride-AAPH, Ascorbyl palmitate-AP and 2,2'-azobis-2,4-dimethylvaleronitrile-AMVN) in a factorial design (2⁵⁻¹) ½ fraction of "resolution V" to accelerate the oxidation of three oils (flaxseed, *Echium* and fish) containing different sources of n-3 FA: α-linolenic acid (ALA), stearidonic acid (SDA) and eicosapentaenoic acid (EPA) + docosahexaenoic acid (DHA), respectively. There was no difference between the oxidation markers (LOOH and TBARS) estimated by the regression models and the values experimentally observed. The inducers AMVN and Fe²⁺ were the main factors responsible for the increase of TBARS concentration. The values of the oxidation markers obtained 48h after the induction were similar to or higher than those obtained when the samples were oxidized at 60°C for 15 days, both being more elevated than the values observed in the fresh oils. Among the volatile compounds formed by the oxidation of different sources of n-3 FA, (E, E) 2,4-heptadienal, (E, E) 2,4-decadienal, decanal, undecanal and (E)-2-undecenal were identified in all samples, and could be used as more specific oxidation markers. Using the accelerated model, rutin hydrate improved the oxidative stability of fish oil, probably due to the presence of catechol groups in its chemical structure. This study showed that faster assays could be performed to evaluate the antioxidant effect of new molecules applied on edible functional oils.

Key words: fatty acids, oxidation, phenols, oils, *Echium*, rutin, accelerated oxidation, omega

1. INTRODUÇÃO

Vários estudos têm relatado os efeitos cardioprotetores dos ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 (n-3 FA). Tais ácidos graxos estão envolvidos no funcionamento de diversos órgãos e sistemas, e seu consumo pode contribuir para retardar a progressão da aterosclerose ao reduzir a inflamação e a hipertriglicemia. A ingestão diária de 2g/dia de n-3 FA tais como EPA (ácido eicosapentaenóico) e DHA (ácido docosahexaenóico) reduz a concentração de triacilgliceróis e biomarcadores inflamatórios (Cicero et al., 2010; Kris-Etherton et al., 2002; Wall et al., 2010).

Os ácidos EPA e DHA são encontrados em óleos marinhos, enquanto o ácido estearidônico (SDA), que pode ser convertido em EPA, está presente em óleos vegetais como o óleo proveniente da extração e refino de sementes de *Echium plantagineum* (Surette et al., 2004). O óleo de *Echium*, dentre os óleos vegetais, apresenta uma ampla potencialidade como alternativa viável na substituição de óleos marinhos como fonte dietética efetiva de n-3 FA em função da sua menor limitação sensorial, menor risco de contaminação por metais pesados, assim como melhor opção em termos de sustentabilidade.

Apesar da vantagem sensorial, o alto teor de ácidos graxos poliinsaturados presente no óleo de *Echium*, o torna susceptível à oxidação quando exposto à luz, oxigênio e calor (Choe e Min, 2006). Quando oxidados, os lipídios apresentam perda da funcionalidade biológica, além de formarem produtos secundários com odor indesejável e potencial toxicidade (Espinosa et al., 2015; Frankel, 1980; Kubow, 1993; McClements e Decker, 2007). O óleo de *Echium* oxidado exibe um forte odor de peixe, inviabilizando sua aplicabilidade (Sghaier et al., 2015).

Uma alternativa seria a utilização de antioxidantes naturais capazes de proteger os ácidos graxos dos danos oxidativos, uma vez que os antioxidantes artificiais, tais como TBHQ, BHT e BHA podem ser mutagênicos (Botterweck et al., 2000). Em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo, a atividade antioxidante de onze compostos fenólicos extraídos da própolis vermelha foi avaliada em uma emulsão contendo óleo de *Echium* (Espinosa et al., 2015). Os resultados indicaram que o ácido sinápico e a rutina apresentaram maior atividade antioxidante no sistema emulsionado.

Embora o óleo de *Echium* apresente alto potencial para o desenvolvimento de alimentos funcionais, há pouca informação sobre sua estabilidade oxidativa. Uma vez que a oxidação à temperatura ambiente é relativamente lenta (Van Dyck et al., 2005), o uso de indutores capazes de acelerar a reação oxidativa configura-se como uma estratégia importante no desenvolvimento de sistemas acelerados que permitam avaliar a estabilidade de óleos. Outro aspecto importante consiste na necessidade de identificar marcadores químicos mais específicos na oxidação de lipídios contendo diferentes tipos de ácidos graxos ômega 3.

Portanto, o objetivo deste estudo foi inicialmente identificar a combinação de indutores capaz de acelerar a oxidação de óleos contendo diferentes tipos de n-3 FA, e posteriormente, utilizar esse modelo acelerado para avaliar a atividade antioxidante do ácido sinápico e da rutina, quando adicionados ao óleo de *Echium*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Ácidos graxos ômega 3 como estratégia na prevenção da aterosclerose

Os ácidos graxos ômega 3 (n-3 FA) apresentam cadeia poliinsaturada, com três ou mais duplas ligações, e recebem a nomenclatura ômega 3 devido a posição da primeira dupla ligação na cadeia carbônica, contada a partir do terminal metila (Harris, 2007). São encontrados em espécies vegetais e animais (Martin et al., 2006). Dentre eles destacam-se o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA), que são encontrados em óleos marinhos ou podem ser biossintetizados a partir do ácido α -linolênico (ALA) presente em alguns óleos vegetais (Barceló-Coblijn e Murphy, 2009; Cabo et al., 2012; Venegas-Calderón et al., 2010).

Embora óleos vegetais possam ser utilizados como fonte de ALA, a taxa de conversão em EPA e DHA é relativamente baixa em seres humanos (Burdge e Calder, 2005; Kris-Etherton et al., 2003; Surette et al., 2004). No entanto, existem algumas sementes que apresentam uma maior proporção de ácido estearidônico (SDA) na sua composição, como as sementes da planta *Echium plantagenium*. A principal limitação na conversão de ALA em EPA é a disponibilidade da enzima delta-6-dessaturase, responsável pela formação de SDA a partir de ALA. Dessa forma, óleos ricos em SDA podem ser convertidos em EPA a uma taxa mais elevada do que os óleos ricos em ALA. Estudos têm relatado uma taxa de conversão de 20 a 30% de SDA em EPA, em comparação com cerca de 5% de ALA em EPA (Gray et al., 2010; Guil-Guerrero, 2007; James et al., 2003; Kuhnt et al., 2014; Venegas-Calderón et al., 2010). Desta forma o óleo de *Echium*, dentre os óleos vegetais, apresenta uma ampla potencialidade como alternativa viável na substituição de óleos marinhos como fonte dietética efetiva de n-3 FA em função da sua menor limitação sensorial, menor risco de contaminação por metais pesados, assim como melhor opção em termos de sustentabilidade, podendo contribuir para retardar a progressão da aterosclerose ao reduzir os níveis de inflamação (Surette et al., 2004).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial, que consiste na inflamação de artérias, levando a formação de placas e, conseqüente, obstrução do fluxo sanguíneo (Libby et al., 2011). Tem início antes da fase adulta, e sua progressão ocorre lentamente durante a vida (Lönn et al., 2012). Embora intervenções farmacológicas tenham

apresentado sucesso na redução da mortalidade decorrente de DVC (doenças cardiovasculares) (Scandinavian Simvastatin Survival Study, 1994), estudos têm apontado os n-3 FA como possível co-terapia na prevenção primária e secundária, abrangendo redução da concentração de triacilgliceróis, diminuição da agregação plaquetária, efeitos antiarrítmicos e estabilização da placa de ateroma (Caslake et al., 2008; Din et al., 2004; Harris et al., 2008).

Embora o aumento do consumo de n-3 FA possa configurar como uma estratégia interessante na redução da progressão da aterosclerose, esses ácidos graxos são extremamente susceptíveis à oxidação durante sua extração, processamento e estocagem. A oxidação desses ácidos graxos, além de anular a funcionalidade biológica, induz à formação de compostos secundários potencialmente aterogênicos (Khan-Merchant et al., 2002; Asnaashari et al., 2014).

2.2. Oxidação lipídica

Alimentos com alto teor de ácidos graxos poliinsaturados são extremamente susceptíveis à oxidação. A oxidação lipídica é um dos principais fatores responsáveis pela deterioração de alimentos processados e *in natura*. Além de comprometer a qualidade e a segurança nutricional, a oxidação resulta na diminuição do “shelf-life”, promovendo alteração do odor, sabor, cor e textura que persistem mesmo após o cozimento ou processamento do alimento, tornando-os inteiramente inadequados para o consumo (Arab-Tehrany et al., 2012; Frankel, 2005; Guerra e Lajolo, 2005; Sørensen, 2010).

A autooxidação lipídica é uma reação em cadeia, iniciada pela exposição de ácidos graxos poliinsaturados à espécies reativas e oxigênio (Frankel, 1980; Ragnarsson e Labuza, 1977; Sørensen, 2010). É um processo autocatalítico que pode ser descrito em três etapas clássicas (**Figura 1**), conhecidas por iniciação, propagação e terminação (Frankel, 1980; Miyashita, 2008).

Figura 1. Etapas da oxidação lipídica. $\text{In}^\bullet$: espécie reativa, LH : ácido graxo insaturado, InH : espécie reativa reduzida, $\text{L}^\bullet$: radical acila, $\text{LOO}^\bullet$: radical peroxila, LOOH : hidroperóxido.

Adaptado de Chaiyasit et al. (2000).

A etapa de iniciação caracteriza-se pela presença de espécies reativas ($\text{In}^\bullet$) que abstraem elétrons ou um hidrogênio alílico da cadeia de ácidos graxos insaturados (LH), formando um radical acila ($\text{L}^\bullet$) (Miyashita, 2008). Esta etapa é favorecida em cadeias insaturadas, devido à menor energia necessária à ruptura das ligações π , e consequente abstração do hidrogênio alílico (Holman e Elmer, 1947). Este processo pode ser desencadeado por uma variedade de diferentes iniciadores, tais como metais de transição, temperatura, radicais já existentes e hidroperóxidos (Sørensen, 2010).

Na propagação, moléculas de oxigênio reagem diretamente com o radical acila ($\text{L}^\bullet$) formando radical alcóxila ($\text{LO}^\bullet$) ou peroxila ($\text{LOO}^\bullet$) que em sequência, abstraem hidrogênio de outra molécula de ácido graxo, formando os hidroperóxidos (Chaiyasit et al., 2007; Sørensen, 2010). Na terminação, dependendo da pressão de oxigênio, ocorre a formação de dímeros não radicalares (Frankel, 2005; Kanner et al., 1987; Kubow, 1992; Nawar, 1998).

2.3. Produtos secundários da oxidação de ácidos graxos ômega 3

Dienos conjugados e hidroperóxidos são produtos característicos do primeiro estágio da oxidação lipídica. Em temperatura elevada, presença de luz ou metais de transição, os hidroperóxidos sofrem β -cisão, e são facilmente decompostos para formar diversos produtos secundários, como aldeídos, cetonas, alcoóis, ceto-ácidos, hidróxi-ácidos, hidrocarbonetos, epóxidos, entre outros que são correlacionados ao grau de oxidação. Esses

compostos voláteis são os principais responsáveis pela redução da aceitabilidade de um produto pelo consumidor devido ao odor forte e desagradável que apresentam, reduzindo significativamente a qualidade do produto final, além da potencial toxicidade (Akoh e Min, 2008; Giet et al., 2009; Jayasinghe et al., 2013; Kubow, 1992; McClements e Decker, 2000).

Os aldeídos são os principais compostos secundários voláteis encontrados durante a oxidação de lipídios (Goicoechea & Guillén, 2014). Alguns compostos voláteis derivados da oxidação dos ácidos graxos ômega 3 têm sido reportados na literatura: (E)-2-butenal, 2-hidroxi-(E)-2-hexenal (HHE), (E)-2-pentenal, (E,E)-2,4-heptadienal, 4,5-epoxi-(E)-2-heptenal, hexanal, pentanal, (E,E) 2,4 heptadienal, nonanal e (E,E) 2,4 decadienal relacionados a oxidação de ALA (presente no óleo de linhaça) (Goicoechea & Guillén, 2014; Sorensen et al., 2013); (E, E) 2,4-heptadienal para SDA (presente no óleo de *Echium*) (Gray et al., 2010); (E,E) e (E,Z) 2,4 – heptadienal, 3,5 – octadien-2-ona, 1-penten-3-ol, 1-penten-3-ol, 1-penten-3-ona, 1-octen-3-ol, 2-hexanal e trans, trans-2,4-heptadienal 2-metil-butanal e tolueno tem sido observados na oxidação de EPA, DHA e DPA (presentes no óleo de peixe) (Grigorakis et al., 2010; Hartvigsen et al., 2000; Jayasinghe et al., 2013).

A **Figura 2** exemplifica a formação de compostos primários (LOOH) e secundários (TBARS) a partir da autooxidação de ALA (Laguerre et al., 2007b).

Figura 2. Formação de compostos primários (LOOH) e secundários (TBARS) a partir da autooxidação de ALA. Adaptado de Dahle et al., (1962) e Laguerre et al., (2007b).

Em óleos, a susceptibilidade à oxidação está associada ao número de insaturações da cadeia dos ácidos graxos e a presença de compostos com ação antioxidante (Decker et al., 2010; Holman e Elmer, 1947). Entretanto, parte desses compostos é normalmente removida durante a etapa de refino, expondo assim o óleo ao processo oxidativo (Frankel, 1980).

2.4. Pró-oxidantes e oxidação acelerada

A oxidação à temperatura ambiente é relativamente lenta, sendo que em alguns casos, as primeiras evidências de rancidez oxidativa podem surgir após semanas ou mesmo meses (Van Dyck et al., 2005). Os testes realizados à temperatura ambiente aproximam-se das condições de estocagem real, entretanto são longos e sua reprodutibilidade pode ser afetada por diversas variáveis como presença ou ausência de luz entre outros (Antoniassi, 2001). Nesse contexto, métodos artificiais têm sido amplamente utilizados para acelerar a oxidação, viabilizando assim o desenvolvimento de estratégias que permitam inibir ou retardar o processo em tempo real (Van Dyck et al., 2005). Embora a autooxidação seja um processo autocatalítico, a reação pode ser acelerada pela ação de pró-oxidantes, que são compostos que iniciam, facilitam ou aceleram a cinética oxidativa, sendo parte deles encontrados em sistemas alimentícios. Os pró-oxidantes aceleram a reação interagindo diretamente com ácidos graxos insaturados na formação de hidroperóxidos, ou no favorecimento da formação de espécies reativas (Antoniassi, 2001; Chaiyasit 2007).

Diversos fatores podem ser manipulados com objetivo de acelerar a oxidação lipídica, incluindo a elevação da temperatura, exposição do substrato à elevada pressão de oxigênio, adição de azo-indutores, exposição à luz e aumento da concentração de metais de transição como ferro e cobre (Antoniassi, 2001; Branco e Castro, 2011; Van Dyck et al., 2005).

A temperatura é um fator muito importante a ser considerado na avaliação da estabilidade oxidativa (Frankel, 2014), porque a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados segue o modelo de Arrhenious (Orlien et al., 2006). Para avaliação da estabilidade oxidativa, a temperatura a ser utilizada na indução depende da composição de ácidos graxos dos óleos, e deve ser menor quanto mais insaturações houver na cadeia (Frankel, 2014). A velocidade da oxidação depende também da concentração de oxigênio, cuja solubilidade decresce com o aumento da temperatura (Silva et al., 1999). O excesso de calor promove a decomposição de hidroperóxidos e a ocorrência de reações adicionais, tais como polimerização, ciclização e cisão (Choe e Min, 2006; Laguerre et al., 2007a; Silva et al., 1999). Cada etapa da reação de oxidação apresenta energia de ativação específica, sendo maior na propagação (5-10 kcal/mol) que na terminação (0-3 kcal/ mol) (Ragnarsson e Labuza, 1977). A **Figura 3** apresenta a via mais provável de decomposição de hidroperóxidos e formação de produtos

secundários de oxidação, através de uma clivagem homolítica entre o oxigênio e a ligação com oxigênio.

Figura 3. Mecanismo de decomposição de hidroperóxidos e formação de produtos secundários de oxidação. Adaptado de Choe e Min, (2006).

Metais reduzem a energia de ativação da oxidação, especialmente nas etapas de iniciação (Choe e Min, 2006), sendo que quantidades traço de metais, como ferro e cobre, aceleram de forma significativa a oxidação lipídica. Os alimentos possuem menor concentração de cobre que ferro, tornando este último o principal pró-oxidante presente nos óleos (Bartosz e Kołakowska, 2010). Esses metais catalisam a oxidação tanto doando

elétrons, quanto os abstraindo dos hidroperóxidos (Frankel, 2005; McClements e Decker, 2000; Shahidi e Zhong, 2010):

a) Através da tomada direta de elétrons:

b) Através de reações redox com hidroperóxidos:

Tanto em alimentos como em sistemas biológicos, a mistura de metais de transição e hidroperóxidos constitui o principal mecanismo de iniciação da oxidação lipídica, sendo que a concentração, tipo e estado químico do metal influenciam a taxa de decomposição dos hidroperóxidos (Chaiyasit et al, 2007). O estado redox também é importante, sendo que o Fe^{2+} decompõe hidroperóxidos 10^5 vezes mais rápido que o Fe^{3+} (Damodaran et al., 2010). Como o estado reduzido do metal de transição é mais eficiente na decomposição de hidroperóxidos, os componentes redutores, como por exemplo o ácido ascórbico, que promovem o ciclo redox de metais de transição, podem consequentemente promover a oxidação lipídica (Damodaran et al., 2010).

O ascorbil palmitato (L-ascorbil-6-palmitato) é um éster sinteticamente derivado do ácido ascórbico e do ácido palmítico, de caráter anfifílico, que possui atividade antioxidante através da quelação do oxigênio singlete. Entretanto, na presença de íons de metais de transição, apresenta capacidade de acelerar a oxidação, devido ao seu alto poder redutor sobre o ferro (**Figura 4**) (Branco e Castro, 2011; Damodaran et al., 2010; Jurkovič et al., 2003; Karabulut, 2010; Lee et al., 1999; Shahidi e Wanasundara, 2011).

Figura 4 – Ação antioxidante e pró-oxidante do ascorbil palmitato. Adaptado de Branco e Castro, (2011) e Teneva e Dimcheva, (2016).

Azo-indutores também são utilizados para oxidar lipídios (Banerjee et al., 2008; Van Dyck et al., 2005). Embora não sejam naturalmente encontrados em alimentos, permitem a aceleração do processo oxidativo sob temperaturas mais baixas. Entretanto, precisam ser associados à metais de transição, uma vez que formam apenas hidroperóxidos (Frankel e Meyer, 2000). 2,2'-azobis dicloridrato de 2-amidinopropano (AAPH) e 2,2'-azobis (2,4-dimetilvaleronitrilo) (AMNV) são os azo-indutores mais comumente utilizados (**Figura 5**).

Figura 5. Estrutura química dos azo-indutores AAPH e AMVN. Adaptado de Krainev e Bigelow, (1996).

AAPH e AMVN possuem caráter hidrofílico e lipofílico respectivamente, e apresentam capacidade de gerar espécies reativas no meio em que atuam (Krainev e Bigelow, 1996). A **Figura 6** representa mecanismo da geração de espécies reativas por decomposição térmica dos azo-indutores AAPH e AMVN.

Figura 6. Etapas da indução de oxidação por azo-indutores. Adaptado de Kunwar et al., (2007).

Quando adicionados em soluções hidrofílicas (AAPH) ou lipofílicas (AMVN), sofrem decomposição térmica gerando o radical acila ($L^{\bullet}$), que na presença de oxigênio é convertido em radicais peroxila ($LOO^{\bullet}$), que por sua vez induzem a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados (Banerjee et al., 2008).

2.5. Inibição da oxidação lipídica

Várias estratégias podem ser utilizadas na inibição da oxidação lipídica, sendo a adição de compostos com atividade antioxidante a mais efetiva (Asnaashari et al., 2014; Broinizi et al., 2007). Antioxidantes são substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retardam significativamente ou impedem a oxidação desse substrato (Halliwell e Gutteridge, 2015). Os antioxidantes são classificados como primários ou secundários baseados em seu mecanismo de ação. Dentre esses mecanismos, estão: inativação de espécies reativas, quelação de metais de transição, e inativação de fotossensibilizadores (McClements e Decker, 2000). No entanto, alguns antioxidantes possuem mais do que um mecanismo de ação, sendo classificados como antioxidantes de múltipla função (Sørensen, 2010).

Antioxidantes primários são caracterizados por sua capacidade de reagir diretamente com espécies reativas, tais como radicais acila, alcoxila e peroxila, convertendo-os em produtos não radicalares mais estáveis (**Figura 7**). Em contrapartida, antioxidantes secundários podem inibir a oxidação por vários mecanismos, incluindo a remoção de oxigênio e a quelação de metais de transição (Sørensen, 2010). Muitos fatores podem influenciar a atividade dos antioxidantes, de modo que alguns compostos podem retardar a oxidação lipídica em determinadas condições, mas promovê-la em outras (Huang et al., 1994).

Figura 7. Síntese de reações antioxidantes com radicais lipídicos e outros radicais antioxidantes. AH: antioxidante, LH: ácido graxo insaturado, LOOH: hidroperóxido, LOH: álcool lipídico, $\text{LOO}^\bullet$: radical peroxila, $\text{LO}^\bullet$: radical alcoxila, $\text{L}^\bullet$: radical acila, $\text{A}^\bullet$: antioxidante radical, LOOA, LOA e LA: lipídios conjugados com antioxidantes e AA: dímero antioxidante. Adaptado de Sørensen, (2010).

Em relação à oxidação mediada por espécies reativas, os antioxidantes agem através da transferência do átomo de hidrogênio (mecanismo HAT - Hydrogen Atom Transfer), transferência de elétrons (mecanismo SET - Single Electron Transfer) ou através da quelação de metais de transição que estão envolvidos na produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Chaillou e Nazareno, 2006; Laguerre et al., 2007a). Agentes quelantes são capazes de se ligar a íons metálicos e desta forma inativar ou reduzir sua atividade. Exemplos de compostos quelantes de metais são EDTA, citratos e alguns fenóis, dependendo da estrutura e o número de grupos hidroxila no anel benzeno (Sørensen, 2010).

Os antioxidantes mais utilizados são os sintetizados artificialmente, tais como butilhidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propilgalato (PG) (Bailey e Hui, 1996). No Brasil, o uso dos antioxidantes artificiais é controlado pelo Ministério da Saúde, que limita a 200 mg/kg de óleo para BHA e TBHQ, e 100 mg/g para BHT, como concentrações máximas permitidas (ANVISA, 2015).

Tais antioxidantes apresentam algumas vantagens quando aplicados em matrizes alimentícias, como pureza, custo reduzido, alta eficiência e ausência de alterações sensoriais (Figuerola-Espinoza e Villeneuve, 2005). Entretanto, estudos realizados em animais, demonstraram que antioxidantes artificiais podem apresentar efeitos nocivos à saúde, como mutagênese e carcinogênese dependendo da dosagem na qual são consumidos (Arab-Tehrany et al., 2012; Botterweck et al., 2000). Uma alternativa ao uso de antioxidantes artificiais é a substituição destes por compostos naturais, ainda que a atividade antioxidante possa ser menos efetiva. Os vegetais apresentam uma ampla diversidade de compostos com significativa atividade antioxidante. Dentre esses destacam-se os compostos fenólicos (Broinizi et al., 2007).

2.6. Compostos fenólicos e sua atividade antioxidante *in vitro*

Compostos fenólicos são encontrados na natureza, particularmente nos vegetais, frutas, especiarias, ervas e grãos. São metabólitos secundários das plantas e possuem papel essencial no crescimento, reprodução e defesa contra patógenos. Além disso, são antioxidantes predominantemente hidrofílicos que apresentam propriedades biológicas (Natella et al., 1999; Silva et al., 2000). A maioria dos compostos fenólicos é proveniente da

fenilalanina e diversifica-se em derivados do ácido cinâmico, ácido benzóico, flavonóides, coumarinas, estilbenos, liganos e ligninas (Pereira et al., 2009) (**Figura 8**).

Figura 8: Exemplos de diferentes classes de compostos fenólicos. Adaptado de Waksmundzka-Hajnos e Sherma (2010)

Os principais ácidos fenólicos são aqueles derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico. Ambos possuem em sua estrutura química um anel aromático contendo pelo menos um grupo substituinte hidroxila (-OH) e um carboxila (-COOH). Alguns derivados do ácido benzóico são os ácidos salicílico, gálico, vanílico, e p-hidroxibenzóico, enquanto alguns derivados do ácido cinâmico são os ácidos sinápico, ferúlico e caféico (**Figura 9**) (Figuerola-Espinoza et al., 2013; Pereira et al., 2009).

Figura 9: Estrutura química dos principais ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico. Adaptado de Pereira et al. (2009).

Os grupos hidroxila associados aos fenólicos apresentam a capacidade de neutralizar as espécies reativas, já que podem doar rapidamente elétron ou hidrogênio, estabilizando-se através de ressonância (**Figura 10**).

Figura 10 – Estabilização por ressonância de um radical antioxidante. Adaptado de Choe e Min, (2006).

Espinosa et al. (2015) realizaram um estudo onde a atividade antioxidante de 11 compostos fenólicos extraídos da própolis vermelha foi avaliada em emulsões funcionais. Dentre os compostos avaliados, o ácido sinápico e a rutina apresentaram maior efetividade antioxidante.

O ácido sinápico (3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico) é um dos ácidos cinâmicos mais comumente encontrados em alimentos, sendo identificado em várias frutas como limão, laranja, tangerina, manga, abacate, em vegetais, grãos de cereais, oleaginosas, especiarias e plantas medicinais. Pode ser encontrado na forma livre, ou sob a forma de ésteres, como

ésteres de açúcar (glicosídeos), ou ésteres de uma variedade de compostos orgânicos (Nićiforović e Abramović, 2014) (**Figura 11**).

Figura 11: Estrutura molecular do ácido sinápico. Adaptado de Balasundram et al. (2006).

Estudos têm sugerido que o ácido sinápico teria maior atividade antioxidante que o ácido ferúlico, assim como atividade comparável ao ácido caféico (Cuvelier et al., 1992; Firuzi et al., 2003; Nenadis e Tsimidou, 2002). Entretanto, tem-se relativamente pouca informação sobre a possível utilização do ácido sinápico como antioxidante em matrizes alimentícias.

A rutina (3-O-rutinosídeo-quercetina) é um metabólito vegetal secundário que pertence ao grupo conhecido como flavonoides, que são compostos com dois grupos fenólicos ligados por um pirano (**Figura 12**). Foi inicialmente identificada no trigo mourisco no século XIX, sendo posteriormente encontrada em vegetais e frutas tais como maçãs, ameixas, aspargos e frutas cítricas. Apresenta baixo peso molecular, e assim como outros flavonoides possui ampla potencialidade antioxidante (Bruneton e Barton, 1991; Guo et al., 2007; Lue et al., 2010; Sørensen, 2010; Velasco et al., 2008).

Figura 12: Estrutura molecular da rutina. Adaptado de Sørensen, (2010)

Considerando-se que alguns compostos antioxidantes podem retardar a oxidação sob certas condições, mas acelerá-la em outras (Huang et al., 1994), a atividade antioxidante desses compostos deve ser previamente avaliada antes da sua adição em matrizes alimentícias.

Vários métodos tem sido desenvolvidos para avaliar a atividade antioxidante de compostos naturais como o ácido sinápico e a rutina, citados no presente estudo. A seleção do método depende da etapa da investigação, assim como de características do sistema lipídico no qual o composto será aplicado. Em geral, nas etapas iniciais utilizam-se métodos indiretos, como aqueles que avaliam o potencial da molécula em doar elétrons ou hidrogênio às espécies reativas (Chaillou e Nazareno, 2006). A seguir, moléculas com potencial redutor são avaliadas no alimento, que por sua vez pode consistir em uma matriz essencialmente lipídica como por exemplo um óleo vegetal (bulk oil), ou em uma matriz emulsionada, tanto óleo em água (o/w) como água em óleo (w/o). Para cada sistema há uma metodologia específica que contempla as características dos diferentes tipos de interfaces “óleo-água”. Entretanto, a quantificação dos produtos primários e secundários formados no processo oxidativo consiste na base de todas as metodologias aplicadas para essa finalidade (Sørensen, 2010). Tal quantificação pode ser realizada através de métodos clássicos como a determinação de hidroperóxidos e TBARS diretamente no óleo ou na emulsão (Shantha e Decker, 1993; McDonald e Hultin, 1987). Porém, sabe-se que o tipo de produto secundário

decorrente da reação oxidativa depende, dentre outros fatores, da configuração química estrutural do ácido graxo precursor (Shibata et al., 2015). Assim, o monitoramento da reação pode ser sub ou superestimado em função da escolha dos produtos secundários a serem avaliados. Outro aspecto importante refere-se ao tempo necessário para que tais produtos secundários possam ser adequadamente identificados e quantificados nos sistemas cromatográficos disponíveis. Em geral, costuma-se submeter a matriz lipídica a uma temperatura um pouco mais elevada (50-60°C) por cerca de no mínimo 15 dias, até que aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos, epóxidos e outros compostos secundários estejam presentes em concentrações mensuráveis (Gómez-Cortés et al., 2015).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi de otimizar uma combinação de indutores que acelerasse a oxidação de óleos comerciais ricos em diferentes tipos de ácidos graxos omega 3, identificar e quantificar os principais compostos secundários formados nessa reação, e então utilizar esse sistema acelerado para avaliar a potencial atividade antioxidante de dois compostos fenólicos naturais, ácido sinápico e rutina.

3. HIPÓTESES

A **Figura 13** apresenta um resumo das hipóteses abordadas neste estudo.

Figura 13: Hipóteses abordadas nesse estudo. LH: ácido graxo ômega 3, $L^{\bullet}$: radical acila, $LOO^{\bullet}$: radical peroxila, $LOOH$: hidroperóxido, AP: ascorbil palmitato.

A temperatura eleva a velocidade da reação oxidativa nas três matrizes lipídicas: óleo de linhaça (sistema com maior proporção de ácido alfa-linonênico); óleo de *Echium* (sistema

com maior proporção de ácido estearidônico) e óleo de peixe (sistema com maior proporção de ácido eicosapentaenóico e docosahexaenóico).

Azo-indutores elevam a formação de hidroperóxidos nas três matrizes lipídicas. **(1)**

Metais de transição como o ferro degradam a formação de hidroperóxidos e elevam a formação de compostos secundários (TBARS) nas três matrizes lipídicas. **(2)**

Ascorbil palmitato reduz o íon férrico a íon ferroso elevando a formação de compostos secundários (TBARS) nas três matrizes lipídicas. **(3)**

Há interação entre esses indutores na velocidade do processo oxidativo reduzindo o tempo para identificação e quantificação dos produtos da oxidação desses ácidos graxos nas três matrizes lipídicas. **(4)**

Há diferença na formação dos produtos secundários voláteis em termos quanti e qualitativos em função do tipo de ácido graxo omega 3 oxidado. **(5)**

É possível realizar uma investigação preliminar da atividade antioxidante de compostos fenólicos naturais, especificamente ácido sinápico e rutina, utilizando-se o modelo acelerado nas três matrizes lipídicas. **(6)**

4. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi de otimizar uma combinação de indutores que acelerasse a oxidação de óleos comerciais ricos em diferentes tipos de ácidos graxos omega 3, identificar e quantificar os principais compostos secundários formados nessa reação, e então utilizar esse sistema acelerado para avaliar a potencial atividade antioxidante de dois compostos fenólicos naturais, ácido sinápico e rutina.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Materiais.

Os óleos de linhaça, *Echium* e peixe foram selecionados como fonte de ALA, ALA + SDA e EPA + DHA, respectivamente. O óleo de *Echium* (NEWmega™ *Echium* Oil, Ref.15200) foi adquirido da empresa De Wit Speciality Oils (De Waal, Tescel, Holanda). O óleo de linhaça dourada (Pazze Industria de Alimentos LTDA) foi adquirido em mercado local, e o óleo de peixe (óleo de fígado de bacalhau) foi fornecido pela empresa Sorocaps Indústria Farmacêutica LTDA (Sorocaba, São Paulo, Brasil). O AMVN foi adquirido da empresa Sun Chemical Technology Co. (Pudong New Area, Shanghai, China). O ácido sinápico e o hidrato de rutina (>95%) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, Estados Unidos). Iso-octano, 2-propanol, metanol, hexano e 1-butanol foram obtidos da Merck & Co. (Whitehouse Station, NJ, Estados Unidos). Tiocianato de amônio, cloreto de bário, sulfato de ferroso hepta-hidratado, tween 20, ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético (TCA), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox), hidroxitolueno butilado (BHT), terc butilhidroquinona (TBHQ), α , Δ e λ tocoferol, 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), hidroperóxido de cumeno, ascorbil palmitato, 4-metil-2-pentanona (MBKI), AAPH, hexanal, heptanal, (E, E) 2,4, heptadienal, octanal, nonanal, (E, Z) 2,6 - nonadienal, (E) 2-nonenal, (E, E) 2,4-nonadienal, decanal, (E)-2-decenal, (E) 2-dodecenal, undecanal, (E, E) 2,4-dodecadienal, (E)-2-undecenal, (E, E) 2,4-decadienal, oxaciclododecan-2-one, (E)-2-tridecenal e dodecanal foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, Estados Unidos). Triacilglicerol de cadeia média (MCT) foi adquirido da Nutrimed Ind. Ltda (São Paulo, BR). Solventes orgânicos utilizados foram grau HPLC.

5.2. Métodos.

5.2.1. Planejamento Experimental.

Este estudo foi realizado em duas etapas. Inicialmente, três óleos contendo n-3 FA (óleo de linhaça, *Echium* e peixe) foram submetidos a oxidação, combinando cinco indutores (temperatura, Fe^{2+} , ascorbil palmitato, AMVN e AAPH). O planejamento completo 2^5 requer

a condução de 32 ensaios experimentais. Assim, nesse caso, aplicou-se um planejamento fracionário (2^{5-1}) de $\frac{1}{2}$ fração com resolução V, resultando em 16 ensaios, além de três repetições do ponto central para estimar o erro experimental (**Tabela 1**). A geratriz de confundimento foi dada por I=12345, na qual os efeitos principais foram confundidos com as interações quaternárias, enquanto que as interações binárias foram confundidas com as ternárias.

Tabela 1: Planejamento experimental fatorial fracionário de resolução V (2^{5-1}).

Ensaios	FATORES				
	F1	F2	F3	F4	F5
1	-1	-1	-1	-1	1
2	1	-1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1	-1
4	1	1	-1	-1	1
5	-1	-1	1	-1	-1
6	1	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1	1
8	1	1	1	-1	-1
9	-1	-1	-1	1	-1
10	1	-1	-1	1	1
11	-1	1	-1	1	1
12	1	1	-1	1	-1
13	-1	-1	1	1	1
14	1	-1	1	1	-1
15	-1	1	1	1	-1
16	1	1	1	1	1
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0

5.2.1.1. Preparação das Amostras para Indução - IND

Na preparação das amostras, 20 mL de cada óleo foram misturados a $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, AAPH, AMVN e ascorbil palmitato, de acordo com o planejamento apresentado nas **Tabelas 1 e 2** e mantidos em incubadora com agitação constante (30 a 50°C) por 48h (Quimis

Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, Brasil). As amostras foram retiradas após 30 segundos e depois 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24, 32 e 48h. O ascorbil palmitato foi adicionado diretamente às amostras de óleo (0,0, 8,3 ou 16,6 mg/20mL de óleo), enquanto o $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,0, 5,56mg ou 11,12 mg/20ml de óleo), AAPH (0,0, 0,5 ou 1,0 g/20mL), e AMVN (0,0, 0,5 ou 1,0 g/20mL) foram previamente dissolvidos, e posteriormente adicionados às amostras de óleo. O $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e o AAPH foram dissolvidos em uma solução de 1% de Tween 20, e o AMVN foi dissolvido em etanol (**Anexo I**).

Tabela 2. Indutores de oxidação e respectiva faixa de variação.

Fatores	Descrição	Faixa de variação		
		-1	0	+1
F1	Temperatura (°C)	30	40	50
F2	Fe^{+2} (mMol) ¹	0	1.0	2.0
F3	Azo indutor hidrofílico (%) ²	0	0.5	1.0
F4	Ascorbil palmitato (mMol) ¹	0	1.0	2.0
F5	Azo indutor lipofílico (%) ²	0	0.5	1.0

¹ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e ascorbil palmitato, de acordo com Branco e Castro (2011).

²2,2',-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) e 2,2'-azobis (2,4-dimethylvaleronitrile (AMVN) de acordo com Van Dyck et al. (2005).

5.2.1.2. Obtenção das regressões e otimização

Um modelo de regressão foi ajustado para cada óleo com o objetivo de maximizar um marcador de oxidação primário (LOOH) e um secundário (TBARS). Os produtos formados a partir da oxidação acelerada do óleo obtido pela otimização dos cinco indutores (IND) foram comparados aos compostos formados em óleo mantido a 60°C por 15 dias (TRAD), o que representa o procedimento tradicional para acelerar a oxidação lipídica. Os resultados encontrados para ambos os tratamentos (IND e TRAD) também foram comparados com o óleo fresco. Na segunda fase, o ácido sinápico e o hidrato de rutina foram adicionados aos óleos (200ppm), e a estabilidade oxidativa foi comparada com uma amostra sem antioxidante, aplicando o modelo otimizado.

5.2.1.3. Indução de oxidação pelo método Tradicional – TRAD.

Um método tradicional de indução de oxidação também foi utilizado em cada óleo para comparar os marcadores químicos após a aplicação dos indutores. Amostras de 25mL de cada óleo foram mantidas em estufa à 60°C por 15 dias (Gómez-Cortés et al., 2015).

5.2.2. Marcadores Químicos da Estabilidade Oxidativa.

A estabilidade oxidativa dos óleos foi avaliada durante 48h e determinada pela concentração de produtos primários (hidroperóxidos; LOOH) e secundários (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; TBARS) da oxidação. Os resultados obtidos de LOOH e TBARS foram representados em gráficos (tempo x concentração), sendo um modelo polinomial ajustado para cada tratamento. Posteriormente, a área sob a curva foi calculada (<http://www.wolframalpha.com/widgets/view.jsp?id=ec78b0700064223c5cd7898812ecffae>) e os valores obtidos foram aplicados na construção dos modelos de regressão, utilizando o planejamento fatorial.

5.2.2.1. Determinação da concentração de hidroperóxidos (LOOH).

Os hidroperóxidos foram determinados de acordo com o procedimento proposto por Shantha e Decker (1993), no qual 300µL de óleo foram adicionados a 1,5mL de uma solução de isoctano:isopropanol (3:1, v/v), e agitados em vortex três vezes por 10 segundos. Posteriormente, a 200µL dessa solução foram adicionados 2,8mL de uma solução de metanol:1-butanol (2:1, v/v). Uma solução de tiocianato/ferro foi preparada misturando-se 1mL de tiocianato de amônio (3,94 M) e 1mL de sulfato ferroso (0,072 M). A solução de sulfato ferroso (0,072 M) foi obtida do sobrenadante da mistura de 1mL de sulfato ferroso (0,144 M) e 1mL de cloreto de bário (0,132 M) em ácido clorídrico (0,4 M). 30µL da solução tiocianato/ferro foram adicionados à mistura de metanol/1-butanol (3,0mL). A mistura foi agitada e incubada, ao abrigo da luz, à temperatura ambiente por 20 minutos. Após o período de incubação, as misturas foram pipetadas em uma placa de 96 poços, e a leitura da absorbância das amostras foi realizada a 510nm, utilizando um leitor de micro placa Sinergy HT (Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). As concentrações de hidroperóxidos foram

determinadas utilizando uma curva padrão, preparada previamente com concentrações conhecidas de hidroperóxido de cumeno. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em meq/kg de óleo.

5.2.2.2. Determinação da Concentração de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foram quantificadas de acordo com o procedimento proposto por McDonald e Hultin (1987). Amostras de 50µL de óleo foram diluídas em 450µL de isoctano: isopropanol (3:1 v/v) e adicionadas a 1mL de solução de TBA (3,6g de TCA em 19,88mL de água MiliQ, 422µL de HCL, 90,24mg de TBA e 720µl de BHT 2% diluído em etanol). As amostras foram homogeneizadas e colocadas em banho-maria a 95°C por 15 minutos. Posteriormente foram resfriadas em água por 10 minutos e centrifugadas a 1000 x g por 15 minutos. Após serem retiradas da centrífuga, as amostras permaneceram em repouso por 10 minutos, e foram pipetadas em uma placa de 96 poços. A leitura da absorbância foi realizada em 534nm, utilizando-se um leitor de micro placa Sinergy HT (Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). As concentrações de TBARS foram determinadas utilizando uma curva padrão preparada previamente com concentrações conhecidas de TEP (tetraetoxi-propano). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em mg/L de óleo.

5.2.2.3. Determinação de compostos voláteis por HS-SPME-GC-MS (Headspace - Solid Phase microextraction Gas Chromatography Mass Spectrometry).

As concentrações de compostos voláteis foram determinadas de acordo com o procedimentos proposto por García-Llatas (2007) e Gómez-Córtés et al. (2015), com algumas modificações. As amostras de óleo (10 mL) foram pipetadas em vials de 20mL. Um amostrador automático Combi Pal foi utilizado na análise. Os vials foram agitados (400 rpm) durante 15 minutos a 50°C. Após este período, a fibra pré-condicionada (Analytical/Chromatography, DivynilBenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fibers, SPME Fiber Assemblies, SPME Fibers e Holders, Solid Phase Microextraction (SPME); StableFlex 50/30uM; Supelco 57298-U: DVB/CAR/PDMS, Bellefonte, PA) foi exposta

ao “headspace” dos vials durante 60 minutos sob agitação a 50°C. Em seguida, a fibra foi injetada no cromatógrafo gasoso Agilent 7890 GC System, equipado com um detector de massa (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). A temperatura de entrada foi de 250°C usando o modo Splitless. Durante a análise por GC, a fibra foi recondicionada à 250°C durante 30 minutos.

Vials contendo apenas água foram utilizados como branco. A coluna capilar foi ZB-5 MS (5% polysilarylene/95% polydimethylsiloxane) 30m, 0,25mm, 0,25µm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). A temperatura da fonte de íons e do quadrupolo foi de 230 e 150°C, respectivamente. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 0,7mL/minuto. A temperatura foi programada para iniciar a 40°C/5 minutos, elevando-se a 4°C/minuto até 100°C, em seguida, a 220°C a 17°C/minuto, sendo mantida a 220°C durante 10 minutos. Todos os espectros de massa foram adquiridos no modo de elétron-impacto (EI) com uma tensão de ionização de 70eV, adotando uma faixa de massa de 35-300 m/z, com tempo de corrida de 37,059 minutos. Monitoramento varredura (SCAN) foi utilizado como modo de aquisição de dados. Alguns dos picos foram identificados por comparação do tempo de retenção com os padrões externos: hexanal, heptanal, (E, E) 2,4, heptadienal, octanal, nonanal, (E) 2-Decenal, (E, Z) 2,6 - nonadienal, (E) 2-nonenal, (E, E) 2,4-nonadienal, decanal, (E, E) 2,4-dodecadial, undecanal, (E, E) 2,4-decadial, (E)2-Undecenal; Dodecanal; Oxaciclododecan-2-one; (E) 2-Tridecenal e (E) 2-Dodecenal. Foram preparadas curvas padrão nas concentrações 0,05-50µg/mL para todos os compostos voláteis, exceto para (E, Z) 2,6-nonadienal para o qual utilizou-se uma concentração de 0,02-22,2 µg/mL. Os coeficientes de correlação variaram de 0,7296 a 0,9974, e os resultados foram expressos em µg/mL. A semi-quantificação de compostos identificados pela NIST (National Institute of Standards and Technology) para os quais os padrões não estavam disponíveis baseou-se na área sob o pico. As amostras foram analisadas em triplicata.

5.2.3. Composição de Ácidos Graxos.

Os ácidos graxos foram quantificados por Cromatografia gasosa e detectados por espectrometria de massas (GC-MS). As amostras de óleo foram esterificadas de acordo com o procedimento proposto por Shirai (2005). As amostras foram transferidas (5 mg) para tubos contendo 1 mg de padrão interno (éster metílico do ácido tricosanóico (C23: 0)).

Foram adicionados 1mL de NaOH metanólico 0,5 N e 50µL de BHT 0,5%. Em seguida, as amostras foram agitadas durante 15 segundos e mantidas em banho-maria por 5 minutos a 100°C. As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente, e 2mL de solução de BF₃-metanol 14% (composta de cloreto de amônio, metanol e ácido sulfúrico) foram adicionados. Agitou-se por 15 segundos, seguido por imersão em banho-maria durante 5 minutos. Após o aquecimento, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e 1mL de isooctano foi adicionado. A mistura foi agitada vigorosamente durante 30 segundos, e em seguida 5mL de solução saturada de cloreto de sódio foi adicionada, sendo a mistura agitada levemente para não emulsionar. A camada de isooctano foi extraída da fase superior. Em seguida, a camada superior foi evaporada com nitrogênio e ressuspensa em 500 mL de isooctano. A composição de ácidos graxos foi determinada em um cromatógrafo gasoso (Agilent 7890 A GC System, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA), equipado com uma coluna capilar de sílica fundida revestida (J & W DB-23 Agilent 122-236; 60 mx250 mm de diâmetro interno, espessura de filme 0,15 milímetros). Gás hélio foi utilizado como gás de arraste, com fluxo de 1mL/minuto. A temperatura inicial da coluna foi programada para 80°C com acréscimo de 5°C/minuto, até atingir 175°C, em seguida houve um aumento na temperatura em gradiente de 3°C/minuto até atingir a temperatura de 230°C, sendo mantida durante 5 minutos. Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção com misturas padrão: 4-7801; 47085-L; 49453-U e U-47885 (Sigma Chemical Co. ; St. Louis, MO, EUA). Os resultados foram expressos como mg de ácidos graxos/5 mg de óleo obtidos por duplicata.

5.2.4. Determinação da concentração de tocoferol.

A concentração de tocoferol dos óleos foi determinada de acordo com o procedimento proposto por Gliszczynska-Świgło e Sikorska (2004) com algumas modificações. As amostras de óleo (1g) foram diluídas em 10mL de isopropanol e agitadas no vórtex por 30 segundos. Posteriormente as amostras foram filtradas em vials, utilizando membranas de 13mm (Millex, Millipore Corp., Billerica, MA, USA). As análises foram realizadas utilizando HPLC (Agilent Technologies da série 1200, Santa Clara, CA, EUA), equipado com uma coluna C18 Zorbax de fase reversa (150mm x 4,6mm; 5 µM), com pré-coluna LC8-D8 (AJ0-1287 de Phenomenex, Torrance, EUA). Para a determinação da α , ($\beta + \gamma$) e Δ -tocoferol nos óleos, uma

fase móvel consistindo em 50% de acetonitrila (solvente A) e 50% de metanol (solvente B) foi utilizada com um fluxo de 1mL/minuto com método isocrático sob pressão constante de 34 bar. O volume de injeção foi de 20µl. A detecção foi realizada por fluorescência ajustada a 325nm para emissão e 295nm para excitação. Tocoferóis (α , $\beta + \gamma$ e Δ) foram identificados por comparação do tempo de retenção da amostra com os de padrões correspondentes. Os resultados foram expressos em mg/kg de óleo. As análises foram realizadas em triplicata.

5.2.5. Análise estatística

Os valores foram expressos com média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A homogeneidade das variâncias foi previamente avaliada para todas as variáveis. A diferença entre os ensaios foi inicialmente avaliada por ANOVA. A análise do planejamento fatorial foi realizada considerando-se LOOH e TBARS (área sob a curva) como variáveis dependentes e os 5 indutores como variáveis independentes (temperatura, Fe^{+2} , AAPH, ascorbil palmitato e AMVN). Um ponto central foi utilizado para estimar o erro puro e a falta de ajuste dos modelos. Efeitos não significativos foram excluídos (teste T) e os significativos apresentados como gráfico de Pareto. A qualidade do modelo foi determinada avaliando-se a probabilidade da falta de ajuste, o valor do coeficiente de determinação (R^2), e pela análise da dispersão residual. A otimização dos modelos significativos foi realizada buscando-se maximizar os valores de ambos marcadores de oxidação (LOOH e TBARS), utilizando a função geral e atribuindo o mesmo peso para os dois marcadores. Os valores estimados e experimentais foram comparados utilizando o teste de Wilcoxon. O efeito dos dois compostos fenólicos em comparação com o controle foi analisado por ANOVA seguida pelo teste de Tukey. A significância foi estabelecida em valores de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com o software Statistica versão 9.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA).

6. RESULTADOS

6.1. Efeito dos indutores e suas interações sobre os marcadores químicos de oxidação.

A área sob a curva determinada para os produtos primários (LOOH) e secundários (TBARS) de oxidação foi ajustada para cada ensaio que compôs o planejamento experimental (**Anexos II a VII**). Esses resultados foram aplicados para identificar o efeito de cada indutor e suas interações sobre LOOH e TBARS. A **Figura 14** apresenta o gráfico de Pareto dos efeitos ajustados para LOOH e TBARS, observados nas três amostras de óleo. Não foi possível obter um modelo significativo para amostras de óleo de linhaça considerando LOOH como marcador. AMVN + Fe^{2+} foram os indutores que mais contribuíram para aumentar a concentração de TBARS nos três óleos (**Figuras 14A, 14C e 14E**). No óleo de linhaça, além de AMVN e Fe^{2+} , AP e AAPH também contribuíram para o aumento de TBARS (**Figura 14A**), enquanto no óleo de *Echium* a temperatura também mostrou influência significativa (**Figura 14C**). Esperava-se que os azo-indutores aumentassem LOOH, enquanto Fe^{2+} e AP iriam promover sua decomposição, seguido da formação de produtos secundários. Este fato foi verificado para o óleo de *Echium* (**Figura 14B**), mas não para o óleo de peixe (**Figura 14D**).

Figura 14: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados. Eixo Y: Fe ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), AMVN (2,2'-azobis (2,4-dimetilvaleronitrilo)), Temp (Temperatura), AAPH (2,2'-Azobis dicloridrato de 2-amidinopropano) e AP (Ascorbil palmitato). Eixo X: Efeitos Padronizados (Valor Absoluto). (A) óleo de linhaça – TBARS; (B) óleo de *Echium* – LOOH; (C) óleo de *Echium* – TBARS; (D) óleo de peixe – LOOH e (E) óleo de peixe – TBARS. Um valor de $p < 0,05$ foi adotado como significativo. Barras sem legenda representam a curvatura do modelo. O modelo ajustado a hidroperóxidos utilizando óleo de linhaça não foi significativo ($p < 0,05$).

6.2. Valores recomendados para indução da oxidação.

Com base nestes modelos, a função de desejabilidade foi aplicada com o objetivo de maximizar as concentrações de LOOH e TBARS, utilizando-se a "área sob a curva" como medida. Os resultados estão apresentados na **Tabela 3**. De acordo com os perfis de desejabilidade, diferentes combinações entre os indutores foram sugeridas para acelerar a oxidação de cada óleo. Em geral, elevada % de azo indutores foi recomendada, exceto para o óleo de peixe. A temperatura variou de 40 a 50°C; ascorbil palmitato foi recomendado de 1,00 a 1,26 mmol, enquanto elevada concentração de Fe^{2+} foi sugerida para os três óleos.

Tabela 3. Valores reais e codificados obtidos para os indutores após otimização dos marcadores LOOH e TBARS. Desejabilidade (%) e valores estimados obtidos pelos respectivos modelos.

Indutores	Óleos		
	Linhaça	Echium	Peixe
F1	0,0	+1,0	0,0
F2	+1,0	+0,7	+1,0
F3	+1,0	0,0	-1,0
F4	+0,1	+0,3	0,0
F5	+1,0	+1,0	-1,0
Temperatura (°C)	40°C	50°C	40°C
Fe ⁺² (mMol)	2,00 mMol	1,74 mMol	2,00 mMol
Azo Indutor AAPH (%)	1,0%	0,5%	-
Ascorbil palmitato (mMol)	1,15 mMol	1,26 mMol	1,00 mMol
Azo Indutor AMVN (%)	1,0%	1,0%	-
Desejabilidade (%)	41,70	48,30	48,22
Valores de LOOH (AUC) ¹	1.361,5	1.649,7	2.262,2
Valores de TBARS (AUC) ¹	5.586,1	5.930,6	5.080,3

¹ Valores estimados pelo o respectivo modelo:

TBARS (AUC para óleo de linhaça) = 2.557,82 + 2.279,77 (Curvatura) + 1.447,28 (F2) + 188,28 (F3) + 240,44 (F4) + 1.054,35 (F5) + 358,80 (F1 x F2) -357,33 (F1 x F3) -167,75 (F1 x F4) -216,34 (F1 x F5) -135,38 (F2 x F5) -129,94 (F2 x F4) + 333,99 (F2 x F5) + 113,24 (F3 x F4) = 176,39 (F3 x F5). $R^2=0,99939$; $R^2_{adj}:0,99727$. Falta de ajuste ($p = 0,466$).

LOOH (AUC para óleo de Echium) = 1157,47 + 62,39 (Curvatura) + 145,27 (F1) + 89,57 (F2) + 148,10 (F3) + 125,00 (F4) + 424,97 (F5) -61,12 (F1 X F2) -59,62 (F1 X F5) 239,82 (F2 F3) -133,80 (F2 X F5) -81,23 (F3 X F5), $R^2=0,99181$; $R^2_{adj}:0,97895$. Falta de ajuste ($p = 0,142$).

TBARS (AUC para óleo de Echium) = 2821,50 + 2370,54 (Curvatura) + 743,48 (F1) + 1061,85 (F2) + 1521,09 (F5) -309,40 (F1 X F2)+ 392,15 (F2 X F5) -593,78 (F3 X F4), $R^2 =0,9747$; $R^2_{adj}:0,9586$. Falta de ajuste ($p = 0,195$).

LOOH (AUC para óleo de peixe) = 1835,33 -1374,03 (Curvatura) -186,89 (F5) -118,76 (F1 X F2) -196,52 (F1 X F3) -161,88 (F1 X F4) -166,75 (F2 X F3) -240,72 (F2 X F4) -248,33 (F3 X F4), $R^2=0,97358$; $R^2_{adj}:0,95245$. Falta de ajuste ($p = 0,285$).

TBARS (AUC para óleo de peixe) = 3669,97 + 2070,91 (Curvatura) + 1925,77 (F2) -264,96 (F3) + 666,86 (F5) + 184,43 (F1 X F4) + 132,93 (F1 X F5) + 205,17 (F2 X F3) -248,79 (F2 X F5) -171,56 (F3 X F5), $R^2 =0,99408$; $R^2_{adj}:0,98816$. Falta de ajuste ($p = 0,160$).

6.3. Comparação entre os valores estimado e observado para os marcadores químicos da oxidação.

A **Figura 15** apresenta os valores mínimos, máximos, estimados e observados para LOOH e TBARS, encontrados em cada óleo. Não foram observadas diferenças entre os valores estimados e observados, sugerindo a concordância dos modelos ajustados aos dados experimentais. Pode-se observar a proximidade entre valores estimados e valores máximos para ambos os marcadores, evidenciando a vantagem de utilizar técnicas de planejamento fatorial em lugar de procedimentos empíricos para otimização.

Figura 15. Valores mínimos (min), valores estimados (est) (ver **Tabela 3**), expressos como área sob a curva (AUC), valores observados (obs) e valores máximos (max) de LOOH (A) e TBARS (B) encontrados em cada óleo. O teste de Wilcoxon entre os valores estimados e observados não apresentou diferença estatística ($p=0,179$). O modelo ajustado para LOOH usando óleo de linhaça não foi significativo ($p<0,05$).

6.4. Marcadores químicos de oxidação.

Para comparar os marcadores químicos, foram analisados LOOH, TBARS, tocoferol, e os principais produtos voláteis da oxidação por HS-SPME-GC-MS, após a aplicação dos indutores na proporção otimizada para acelerar a oxidação dos óleos (IND), após a oxidação dos óleos pelo método acelerado tradicional a 60°C/15 dias (TRAD) e nas amostras frescas (FRESCO). Também foram quantificados os ácidos graxos e determinado o índice de peroxidabilidade.

6.4.1. Quantificação de LOOH, TBARS e produtos voláteis da oxidação.

No que se refere à estabilidade oxidativa (**Tabela 4**), todos os óleos frescos mostraram baixa concentração LOOH, entre 2,13 e 9,11 meq/kg, e também baixa concentração de TBARS, variando de 5,06 a 9,57 mg/L de óleo, o que sugere estabilidade oxidativa adequada das amostras no início do estudo. Os óleos oxidados pelo método TRAD apresentaram valores mais elevados para LOOH do que os óleos oxidados pelo método IND. Os valores de TBARS mostraram-se mais elevados no óleo de linhaça e no óleo de *Echium* oxidados pelo método IND do que pelo método TRAD, enquanto o óleo de peixe apresentou valores similares para ambos os métodos.

Tabela 4. Marcadores químicos determinados nas amostras de óleo fresco (FRESCO), após oxidação acelerada por indutores (IND), e após oxidação acelerada tradicional a 60°C/15 dias (TRAD).

Marcadores Químicos	Óleo de Linhaça				Óleo de <i>Echium</i>				Óleo de Peixe			
	FRESCO	IND	TRAD	<i>p</i>	FRESCO	IND	TRAD	<i>p</i>	FRESCO	IND	TRAD	<i>p</i> ²
LOOH (meq/Kg) ¹	2,13 ^a ± 0,08	40,81 ^b ± 0,49	48,54 ^c ± 0,01	<0,01	3,75 ^a ± 0,04	45,4 ^b ± 2,31	49,12 ^b ± 0,11	<0,01	9,11 ^a ± 1,24	41,39 ^b ± 0,26	55,07 ^c ± 0,06	<0,01
TBARS (mg/L)	5,06 ^a ± 0,01	118,30 ^b ± 0,01	10,20 ^c ± 0,15	<0,01	5,39 ^a ± 0,32	111,62 ^b ± 0,84	24,68 ^c ± 0,27	<0,01	9,57 ^a ± 0,40	113,23 ^b ± 0,53	115,37 ^b ± 0,67	<0,01
Compostos voláteis (µg/g de óleo)												
hexanal	nd	nd	nd		17,03 ± 1,15	11,89 ± 0,01	11,90 ± 0,01		nd	nd	nd	
heptanal	nd	nd	190,33 ± 80,00		2,54 ± 0,49	2,05 ± 0,00	75,33 ± 73,28		2,00 ± 0,00	12,91 ± 10,86	32,77 ± 0,01	
octanal	nd	nd	22,87 ± 1,34		nd	nd	20,76 ± 0,82		nd	nd	nd	
(E,E)-2,4-heptadienal	11,57 ± 0,39	15,71 ± 4,54	11,18 ± 0,01		11,94 ± 0,77	23,20 ± 3,31	11,18 ± 0,00		12,93 ± 1,12	11,18 ± 0,01	11,00 ± 0,01	
nonanal	nd	nd	264,70 ± 0,90		nd	nd	281,41 ± 54,88		nd	18,73 ± 0,01	53,39 ± 0,01	
(E, Z)-2,6-nonadienal	0,02 ± 0,02	2,34 ± 0,49	nd		nd	1,29 ± 0,41	nd		nd	nd	nd	
(E)-2-nonenal	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,16 ± 0,01		0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,14 ± 0,04		0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,03	
decanal	53,46 ± 26,73	nd	82,84 ± 1,59		nd	nd	87,47 ± 22,29		nd	10,75 ± 8,51	46,98 ± 22,42	
(E,E)-2,4-nonodienal	52,30 ± 10,43	33,36 ± 1,92	31,44 ± 0,01		32,28 ± 0,83	31,44 ± 0,00	31,00 ± 0,00		33,14 ± 0,36	34,52 ± 2,73	31,44 ± 0,01	
(E)-2-decenal	13,03 ± 6,31	nd	nd		nd	nd	nd		0,41 ± 0,00	0,63 ± 0,21	0,71 ± 0,30	
undecanal	11,02 ± 5,27	0,48 ± 0,01	67,62 ± 3,94		0,48 ± 0,01	0,49 ± 0,00	113,75 ± 76,48		0,49 ± 0,00	1,63 ± 0,62	30,55 ± 28,18	
(E,E)-2,4-decadienal	1,34 ± 0,26	0,81 ± 0,01	1,22 ± 0,05		0,81 ± 0,00	0,82 ± 0,01	1,16 ± 0,04		0,81 ± 0,00	1,00 ± 0,19	0,98 ± 0,10	
(E)-2-undecenal	23,76 ± 9,22	41,68 ± 0,52	211,25 ± 16,07		41,51 ± 0,14	41,92 ± 0,27	197,46 ± 161,6		39,63 ± 0,22	14,06 ± 0,01	23,09 ± 0,01	
dodecanal	nd	nd	nd		nd	nd	nd		nd	nd	nd	
oxacyclododecan-2-one	0,67 ± 0,00	0,68 ± 0,00	5,38 ± 1,23		0,66 ± 0,00	0,67 ± 0,00	3,88 ± 1,59		0,66 ± 0,00	0,67 ± 0,00	2,81 ± 1,13	
(E)-2-tridecenal	nd	nd	nd		1,89 ± 0,00	1,87 ± 0,00	27,53 ± 11,23		1,87 ± 0,00	2,39 ± 0,26	8,34 ± 5,61	
(E)-2-dodecenal	18,98 ± 5,93	30,83 ± 0,01	nd		30,24 ± 0,60	30,19 ± 0,64	nd		27,81 ± 3,02	10,28 ± 0,01	14,70 ± 0,01	
Total voláteis (µg/g de óleo)	186,22	125,94	887,20		139,43	145,88	862,97		119,80	118,81	256,85	

¹Concentração de hidroperóxidos: mmol/L = ½ meq/Kg oil.

²Valor da probabilidade obtido por ANOVA.

³Os valores seguidos pela mesma letra sobrescrita não diferem (*p*<0.05).

Nd=não detectado na amostra.

6.4.2. Composição de ácidos graxos, teor de tocoferol e índice de peroxidabilidade

A **Tabela 5** apresenta a composição de ácidos graxos das três amostras de óleo: fresco, após oxidação acelerada por indutores (IND) e após oxidação acelerada tradicional a 60°C/15 dias (TRAD), realizada por GC-MS, teor de tocoferol e Índice de peroxidabilidade (PI) calculado de acordo com Hsu et al.(2001). O teor de tocoferol foi reduzido no óleo de peixe e no óleo de linhaça após a oxidação pelos métodos IND e TRAD. O óleo de *Echium* apresentou a maior susceptibilidade à oxidação (PI = 122,63), enquanto que não foi observada nenhuma diferença entre linhaça (PI = 95,00) e óleo de peixe (PI = 105,35). Esta alta oxidabilidade pode provavelmente justificar a maior concentração de α , λ e Δ -tocoferol observada no óleo de *Echium* fresco em comparação com óleos de linhaça e peixe. Os principais ácidos graxos encontrados nas amostras de cada óleo correspondem aos relatados em outros estudos (Elkin et al., 2015; Gray et al., 2010; Konráðsdóttir et al., 2014).

Tabela 5. Composição de ácidos graxos, teor de tocoferol e índice de peroxidabilidade das três amostras de óleo: fresco, após oxidação acelerada por indutores (IND) e após oxidação acelerada tradicional a 60°C/15 dias (TRAD)

Ácidos Graxos (mg/5mg de óleo)	Óleo de Linhaça			Óleo de <i>Echium</i>			Óleo de Peixe		
	FRESCO	IND	TRAD	FRESCO	IND	TRAD	FRESCO	IND	TRAD
C14:0	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-	0,20 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,17 ± 0,01
C14:1 n7 c	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01 ± 0,00
C15:0	-	-	-	-	-	-	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00
C16:0	0,40 ± 0,03	0,38 ± 0,00	0,43 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,42 ± 0,04	0,41 ± 0,01	0,65 ± 0,02	0,64 ± 0,04	0,60 ± 0,03
C16:1 n7	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	-	-	-	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
C16:1 n9	-	-	-	-	-	-	0,29 ± 0,02	0,32 ± 0,03	0,24 ± 0,01
C17:0	-	-	-	-	-	-	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
C17:0 n7	-	-	-	-	-	-	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
C18:0	0,26 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,29 ± 0,00	0,22 ± 0,01	0,25 ± 0,03	0,23 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,18 ± 0,01
C18:1 n9 c	1,18 ± 0,06	0,95 ± 0,01	1,16 ± 0,03	0,63 ± 0,03	0,70 ± 0,05	0,72 ± 0,04	0,69 ± 0,04	0,71 ± 0,07	0,54 ± 0,01
C18:1 n9 t	0,04 ± 0,04	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,13 ± 0,00
C18:2 n6 t	-	-	-	-	-	-	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
C18:2 n6 (LNA)	0,94 ± 0,05	0,60 ± 0,01	0,89 ± 0,03	0,64 ± 0,03	0,66 ± 0,05	0,70 ± 0,04	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,02
C18:3 n3 (ALA)	1,71 ± 0,09	1,29 ± 0,03	1,56 ± 0,05	1,27 ± 0,07	1,37 ± 0,11	1,33 ± 0,07	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,02 ± 0,01
C18:3 n6 (GLA)	-	-	-	0,46 ± 0,03	0,48 ± 0,04	0,48 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	-
C18:4 n3 (SDA)	-	-	-	0,56 ± 0,02	0,53 ± 0,05	0,55 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,04 ± 0,00
C20:0	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	-	0,01 ± 0,00	-	-	-
C20:1 n9	0,01 ± 0,00	-	0,01 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,36 ± 0,03	0,39 ± 0,03	0,19 ± 0,09
C20:2 n6 (EDA)	-	-	-	-	-	-	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	-
C20:3 n3 (ETA)	-	-	-	-	-	-	0,02 ± 0,00	-	0,01 ± 0,00
C20:4 n6 (ARA)	-	-	-	-	-	-	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00
C20:5 n3 (EPA)	-	-	-	-	-	-	0,38 ± 0,02	0,37 ± 0,04	0,10 ± 0,01
C22:0	0,01 ± 0,00	-	0,01 ± 0,00	-	-	-	-	-	-
C22:1 n9	-	-	-	-	-	-	0,34 ± 0,02	0,38 ± 0,02	-
C22:5 n3 (DPA)	-	-	-	-	-	-	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,01 ± 0,00
C22:6 n3 (DHA)	-	-	-	-	-	-	0,42 ± 0,02	0,41 ± 0,04	0,09 ± 0,01
C24:1	-	-	-	-	-	-	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Tocoferol (mg/kg)¹									
α-tocoferol	25,47 ± 13,56	nd	nd	139,09 ± 0,43	nd	nd	181,08 ± 2,38	nd	nd
λ-tocoferol	358,52 ± 5,73	nd	nd	1016,44 ^a ± 0,43	45,49 ^b ± 0,30	114,52 ^c ± 0,26	6,53 ± 0,41	nd	nd
Δ-tocoferol	12,69 ± 1,00	nd	nd	439,78 ^a ± 0,41	63,49 ^b ± 0,11	249,85 ^c ± 0,08	10,19 ± 0,64	nd	nd
Total tocoferol	396,68 ± 19,72	nd	nd	1595,31 ^a ± 1,12	109,08 ^b ± 0,41	364,37 ^c ± 0,34	197,80 ± 2,96	nd	nd
PI ²	95,00			122,63			105,35		

¹Valores seguidos da mesma letra sobrescrita não diferem ($p < 0,05$).

²Índice de peroxidabilidade (PI) calculado de acordo com Hsu et al. (2001).

Nd=não detectado na amostra.

6.5. Identificação e quantificação de compostos voláteis.

Os principais compostos voláteis encontrados nos óleos foram 2-metil-(Z, Z)-3,13-octadecadienal, ácido 17-octadecínico, 2-undecenal, nonanal and (E)-2-hepten-1-ol, (E)2-tridecenal, (E)2-dodecenal, (Z) 2-decenal, octanal, (E,E) 2,4-decadienal, (Z,Z,Z)-1,4,6-9-nonadecatrieno, 2-metil-5-(1-metiletenil)-ciclohexanol, (E,E) 2,4-dodecadienal, (E,E) 2,4-heptadienal, 2-pentadecin-1-ol, 2H-piran,(2-(2-heptadeciniloxy)tetrahidro, (Z)9-octadecenal and 5-metil-2-hepteno.

A **Figura 16** apresenta a área total dos principais compostos voláteis encontrados nos óleos frescos em comparação com aqueles submetidos a oxidação acelerada por indutores (IND) e aqueles mantidos a 60°C/15 dias (TRAD). Os resultados incluem compostos voláteis identificados e quantificados usando-se padrões externos (**Tabela 4**), e também aqueles identificados apenas pela NIST. Por esta razão, os dados da **Figura 16** foram apresentados como área total em lugar da concentração.

Os resultados mostraram houve maior formação de compostos voláteis no óleo oxidado pelo método TRAD do que no óleo oxidado por indutores. No entanto, este último procedimento (IND) aumentou a concentração de voláteis em comparação com os óleos frescos de *Echium* e de peixe.

Figura 16: Área total observada para os principais compostos voláteis no óleo fresco (FRESH), oxidado por indução (IND) e oxidado pelo método tradicional (60°C/15 dias) (TRAD): Óleo de linhaça (3A), óleo *Echium* (3B) e óleo de peixe (3C). As barras representam a média $\pm$ EPM ($n = 2$).

Como compostos voláteis encontrados no óleo de *Echium* oxidado ainda não foram relatados em outros estudos, a **Figura 17** apresenta os picos dos voláteis identificados por padrões e pela utilização da biblioteca NIST, encontrados no óleo de *Echium* oxidado pelo método TRAD. Já o cromatograma referente apenas aos padrões utilizados neste estudo, está apresentado na **Figura 18**. Os principais produtos voláteis encontrados na oxidação induzida (IND) do óleo de linhaça foram os seguintes: 2-metil (Z, Z) 3,13-octadecadienal, ácido 17-octadecínico, 2-undecenal, nonanal e (E) 2-hepten-1-ol; enquanto que no óleo de linhaça oxidado a 60°C foram: 2-undecenal, (E) 2-tridecenal, (E) 2-dodecenal, (Z) 2-decenal e nonanal. Os principais produtos voláteis encontrados na oxidação induzida (IND) do óleo de *Echium* foram os seguintes: 2-metil (Z, Z) 3,13-octadecadienal, ácido 17-octadecínico e

octanal; enquanto que no óleo de *Echium* oxidado a 60°C foram: ácido (Z) undecenal, 2-undecenal, (E)-2-dodecenal, (E)-2-tridecenal, 17-octadecínico, (Z)-2-decenal e nonanal. Os principais produtos voláteis encontrados na oxidação induzida (IND) do óleo de peixe foram os seguintes: (E, E) 2,4-decadienal, (Z, Z, Z) 1,4,6-9-nonadecatrieno, (Z) 2-decenal, 2-metil-5-(1-metiletenil)-ciclo-hexanol, (E, E) 2,4-dodecadienal, ácido 17-octadecínico e 2-undecenal; enquanto que no óleo de peixe oxidado a 60°C foram: (E) 2-tridecenal, 2-metil- (Z, Z) 3,13-octadecadienol, nonanal, (Z) 2-decenal, (E, E) 2,4, heptadienal, ácido 17-octadecínico, 2-pentadecin-1-ol, 2H-pirano, (2-(2-heptadeciniloxi)-tetrahydro, (Z) 9-octadecenal e 5-metil-2-hepteno.

Figura 17: TIC Cromatograma do óleo de *Echium* oxidado a 60°C/15 dias (TRAD).

1: heptanal; **2:** 5-etil-2(5-H)-furanona; **3:** octanal; **4:** (E,E)-2,4-heptadienal; **5:** 5-metil-2-hepteno; **6:** (E)-2-Octenal; **7:** cis-2-metil-ciclohexanal; **8:** nonenal; **9:** (E)-2-nonenal; **10:** Oxaciclododecan-2-ona; **11:** Decanal; **12:** (E)-2-Decenal; **13:** (Z)-2-decenal; **14:** ácido nonanóico; **15:** Undecenal; **16:** (E, E)-2,4-decadienal; **17:** (Z)-Undecenal; **18:** dodecanal; **19:** 2-dodecenal; **20:** (Z)-9-Octadecenal; e **21:** (E)-2-tridecenal. Picos após o número 21 são ácidos graxos.

Figura 18: TIC Cromatograma dos padrões dos compostos voláteis diluídos em MTC.

1: hexanal; **2:** heptanal; **3:** octanal; **4:** (E,E)-2,4-heptadienal; **5:** nonenal; **6:** (E, Z)-2,6-nonadienal; **7:** (E)-2-nonenal; **8:** decanal; **9:** (E,E)-2,4-nonadienal; **10:** (E)-2-decenal; **11:** undecanal; **12:** (E,E)-2,4-decadienal; **13:** (E)-2-undecenal; **14:** dodecanal; **15:** oxaciclododecan-2-ona; **16:** (E)-2-dodecenal; **17:** (E)-2-tridecenal.

6.6. Atividade antioxidante do ácido sinápico e da rutina.

Com base nos modelos otimizados, avaliou-se a atividade antioxidante dos dois compostos fenólicos, hidrato de rutina e ácido sinápico a 200 ppm. Observou-se que a rutina promoveu uma redução de TBARS no óleo de peixe (**Tabela 6**), sugerindo que a mesma poderia ser aplicada como antioxidante natural nessa amostra.

Tabela 6. Efeito dos compostos fenólicos nos marcadores oxidativos determinados em cada óleo submetidos à combinação otimizada dos cinco fatores na oxidação acelerada.

ÓLEO	ANTIOXIDANTE	LOOH (AUC)	TBARS (AUC)
Linhaça	CONT	1700,35 ± 5,46	5514,62 ± 75,28
Linhaça	SIN	1796,42 ± 109,38	5612,60 ± 29,80
Linhaça	RUT	1878,51 ± 106,68	5601,77 ± 1,59
<i>p</i>		0,459	0,390
<i>Echium</i>	CONT	2089,64 ± 57,14	5143,06 ± 321,73
<i>Echium</i>	SIN	2141,61 ± 35,44	5268,79 ± 259,61
<i>Echium</i>	RUT	2183,97 ± 6,43	5562,72 ± 127,30
<i>p</i>		0,360	0,547
Peixe	CONT	1834,02 ± 79,86	5311,21 ± 9,15 ^a
Peixe	SIN	1983,17 ± 75,92	5196,04 ± 33,51 ^a
Peixe	RUT	1725,76 ± 62,74	5011,11 ± 3,16 ^b
<i>p</i>		0,185	0,004

¹Ácido Sinápico (SIN) 200 ppm, rutina (RUT) 200 ppm e sem antioxidante (CONT).

²Valor de probabilidade obtido por ANOVA. Os valores seguidos pela mesma letra sobrescrita não diferem ($p < 0.05$).

7. DISCUSSÃO

7.1. Efeito dos indutores na oxidação das amostras de óleo

A hipótese avaliada neste estudo consiste no fato que os azo indutores AAPH e AMVN iriam acelerar a formação de hidroperóxidos, o ascorbil palmitato e o ferro contribuiriam para a formação de produtos secundários, enquanto a temperatura teria ação catalisadora para todas as reações. Em geral, esta hipótese foi confirmada em termos de AMVN e ferro, uma vez que AAPH, ascorbil palmitato e temperatura apresentaram pouca efetividade sobre o nosso modelo.

Em altas concentrações, a regeneração de íons metálicos pode substituir as propriedades antioxidantes do ascorbil palmitato e apresentar efeitos pró-oxidantes. Let et al. (2007) observaram um efeito pró-oxidante com ascorbil palmitato na concentração de 300 µg/g de óleo. Em emulsões preparadas com óleo de fígado de tubarão, observou-se que o ácido ascórbico ativava a oxidação de n-3 FA através da redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} , formando assim radicais alcoxila mais rapidamente (Jayasinha et al., 2013). Cuvelier et al. (2000) induziram a oxidação em uma emulsão contendo ácido linoléico utilizando Fe^{+2} e ascorbato a 30°C.

Em nosso estudo, embora o ascorbil palmitato tenha sido aplicado em concentrações mais elevadas: 414,53 µg/g de óleo (nível 0) e 829,06 µg/g de óleo (nível +1), em comparação com o estudo referido por Let et al. (2007), quase nenhum efeito foi observado na indução da oxidação. Essa ausência de efetividade pode ser atribuída à característica lipofílica do ascorbil palmitato, reduzindo sua colocalização com Fe^{3+} na interface aquosa, fato que não ocorre por exemplo, entre ácido ascórbico e Fe^{3+} em emulsões.

A hipótese deste estudo consiste no fato que na indução da oxidação o azo indutor AAPH, com caráter hidrofílico, tem sido utilizado para gerar radicais na fase aquosa, enquanto que o AMVN com caráter lipofílico tem sido utilizado para iniciar o processo de oxidação em fase lipofílica (Krainev e Bigelow, 1996). Nossos resultados confirmam essa prática, uma vez que o efeito pró-oxidante do AMVN foi maior que do AAPH. Considerando o “Paradoxo Polar” (Porter, 1993) e a água presente nas amostras de óleo (0,05 e 0,30%), outros fatores além da polaridade podem influenciar a oxidação dos óleos, uma vez que a mesma teoria deve ser aplicada para explicar a atividade pró e antioxidante. Nenhum efeito

da temperatura em nosso modelo pode ser observado devido à estreita faixa na qual os azo-indutores formam radicais (37°C) (Yoshida, et al., 2004).

7.2. Compostos voláteis

A técnica de HS-SPME para identificação e quantificação de compostos voláteis tem sido apontada como o método mais sensível para análise de oxidação em óleos vegetais (Stashenko et al., 2002). A análise quantitativa requer o uso de padrões (Goméz-Cortés et al., 2007). Por esta razão, a maioria dos estudos utilizam apenas alguns compostos previamente selecionados para quantificação. Entre eles, os aldeídos e cetonas insaturados de cadeia média têm sido citados com maior frequência devido a sua importância para o desenvolvimento de odores estranhos em óleos com elevada proporção de n-3 FA (Goméz-Cortés et al., 2007). Como relatado por Snyder et al. (1988), o perfil de compostos voláteis varia de acordo com o método utilizado para realizar esta análise. Em geral, encontra-se uma proporção relativamente maior dos voláteis de baixo peso molecular utilizando-se métodos estáticos, quando comparada a outros métodos, como o HS-SPME. Esta observação foi verificada em nosso estudo, uma vez que as curvas padrão indicaram maior variação para os compostos voláteis de baixo peso molecular, representada pelo menor coeficiente de correlação linear. Realmente em nossas amostras, não foi possível quantificar voláteis contendo menos de seis carbonos com alta precisão, usando o método HS-SPME-GC-MS.

Os aldeídos são os principais compostos secundários voláteis encontrados durante a oxidação de lipídios (Goicoechea & Guillén, 2014). A partir de ALA, (E) -2-butenal, 2-hidroxi-(E) -2-hexenal (HHE), (E) -2-pentenal, (E, E) -2,4-heptadienal e 4, 5-epoxi-(E) -2-heptenal foram identificados no headspace de óleos com alta proporção de ALA armazenados à temperatura ambiente (Goicoechea & Guillén, 2014). Em óleo de canola, que também apresenta ALA em sua composição, Sorensen et al. (2013) utilizaram hexanal, pentanal, 2,4 (E, E) heptadienal, nonanal e 2,4 (E, E) decadienal como marcadores oxidativos. Gray et al. (2010) adotaram (E, E) 2,4-heptadienal como marcador volátil da oxidação do óleo de peixe. Jayasinghe et al. (2013) identificaram cerca de quarenta compostos carbonílicos voláteis produzidos pela oxidação do óleo de fígado de tubarão, com predominância de 2,4-heptadienal, 3,5-octadien-2-ona e (E, E) 1-penten-3-ol. Grigorakis et al., (2010) submeteram óleo de peixe à oxidação forçada (50°/120h), e entre todos os compostos voláteis

encontrados nas amostras, sugeriram que o 2-metilbutanal e o tolueno poderiam ser índices úteis na avaliação da qualidade dos alimentos. Hartvigsen, (2000) notou que muitos aldeídos e cetonas que foram produzidos na oxidação do óleo de peixe, tais como 1-penten-3-ol, 1-penten-3-ona, 1-octen-3-ol, 2-hexanal e trans, trans-2,4-heptadienal, contribuíram para a formação de odores e sabores desagradáveis influenciando negativamente a aceitabilidade do produto final (Hartvigsen et al., 2000).

Entre os voláteis identificados em nossas amostras, 2-undecenal, nonanal, (E) -2-hepten-1-ol, (E) 2-tridecenal, (E) 2-dodecenal, (Z) 2-decenal, octanal, 17-octadecínico, (E, E) 2,4-decadienal, (E, E) 2,4-dodecadienal e (E, E) 2,4, heptadienal foram os voláteis mais prevalentes. Na realidade, foram identificadas (E, E) 2,4-heptadienal e (E, E) 2,4-decadienal em todas as amostras, mas apenas o decanal, undecanal e (E) -2-undecenal aumentaram após a oxidação em nosso modelo.

O método TRAD produziu mais voláteis totais do que o método IND, embora tenha sido observado um aumento nas amostras submetidas à indução (IND) quando comparadas às amostras frescas. No entanto, usando TBARS como marcador oxidativo, o oposto foi observado. O método IND produziu mais TBARS do que o método TRAD, o que sugere que diferentes conclusões podem ser obtidas na análise oxidativa, dependendo do marcador químico selecionado na nossa avaliação. Poucos estudos envolvendo quantificação de compostos voláteis no óleo de *Echium* foram realizados até o momento. (Gray et al., 2010) quantificou trans-trans-2,4-heptadienal em óleo de *Echium*. Gabbanini et al. (2015) determinaram a formação de 4-hidroxinonenal (HNE) em óleo de *Echium* mantido a 75°C durante 90 minutos e não observaram diferença em relação à quantidade determinada no óleo fresco. Os autores atribuíram ao alto teor de derivados de quercentina e kaempferol presentes no óleo de *Echium* à proteção oxidativa das amostras. No entanto, o resultado relatado pelos autores também pode ser uma consequência do uso de 4-hidroxinonenal (HNE) como marcador, em lugar do 4-hidroxi-hexenal (HHE). Por esta razão, é importante selecionar compostos mais específicos para analisar a oxidação de óleos com alta proporção de n-3 FA.

7.3. Ação antioxidante dos compostos fenólicos.

Foi observado que a rutina apresentou maior efetividade na redução de TBARS no óleo de peixe em comparação com o ácido sinápico. A capacidade dos compostos fenólicos em neutralizar espécies reativas, está associada aos grupos hidroxila presentes na estrutura molecular desses compostos, já que podem doar rapidamente elétron ou hidrogênio, estabilizando a reação, além de serem responsáveis também pela quelação de metais de transição (Nićiforović e Abramović, 2014; Sørensen et al., 2010)

Os compostos fenólicos atuam como antioxidantes por dois mecanismos principais: (1) transferência de átomos de hidrogênio (HAT) ou transferência de elétrons simples (SET) para as espécies reativas, ou (2) quelação de metais de transição (Leopoldini et al., 2011). Em relação aos mecanismos de transferência de elétrons ou hidrogênio (SET ou HAT), a energia de dissociação da ligação "O-H" da hidroxila ligada ao anel, favorece a ação antioxidante de ambas as moléculas envolvidas neste estudo, ou seja, rutina e ácido sinápico.

Entretanto, diferente do ácido sinápico, a rutina apresenta um grupamento catecol em sua estrutura molecular. O potencial de redução do grupamento catecol ($E^{\circ'} = 530$ mv) é menor que o radical peroxila ($E^{\circ'} = 1000$ mv), o que acelera a doação de elétrons de fenólicos com essa característica estrutural, potencializando a capacidade antioxidante dos mesmos. Esse fato pode ter contribuído pela maior efetividade antioxidante da rutina em relação ao ácido sinápico, observado em nosso estudo. Com base no "Polar Paradox" (Porter, 1993), era esperado que a rutina e o ácido sinápico tivessem demonstrado uma melhor atividade antioxidante em óleos do que em emulsões como observado por Espinosa et al. (2015). Entretanto, estudos recentes sugerem que alguns compostos fenólicos não se comportam como previsto pelo "Paradoxo Polar" (Laguerre et al., 2015).

A presença de grupamento catecol também favoreceu a capacidade de quelar íons metálicos como o ferro. Segundo Sørensen et al., (2010), a rutina apresenta baixa solubilidade aquosa quando comparada à outros compostos fenólicos como o ácido caféico e cumárico, com estrutura molecular muito próximas à do ácido sinápico. Assim a solubilidade é um fator que precisa ser considerado quando a funcionalidade de uma substância é discutida. Shahidi e Zhong (2011) também sugeriram que a concentração e solubilidade de fenólicos afeta sua atividade antioxidante porque eles são particionados entre as interfaces. A desprotonação dos grupos hidroxila a um pH mais elevado favorece a

quelação do ferro, melhorando a capacidade destas moléculas para inibir a formação de espécies reativas de oxigénio (Genaro-Mattos et al., 2015). A desprotonação é possível em emulsões, mas não em óleo. Além disso, os tocoferóis, que foram significativamente consumidos durante a oxidação de todos os três óleos, não são capazes de concentrarem-se nas interfaces “óleo-água” (Kittipongpittaye et al., 2016). Juntamente com o maior efeito pró-oxidante do AMVN comparado ao AAPH, estes fatos confirmam que o "Paradoxo Polar" não parece ser o único mecanismo envolvido na oxidação de óleos.

8. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que combinação otimizada dos indutores representou um modelo eficaz para acelerar a oxidação de óleos contendo diferentes tipos de ácidos graxos ômega-3. Valores semelhantes ou mais elevados dos marcadores químicos foram encontrados após 48h, em lugar dos 15 dias normalmente necessários para oxidar estes óleos a 60°C pelo método tradicional. Trata-se de uma opção interessante, uma vez que estudos mais rápidos poderiam ser desenvolvidos visando melhorar a estabilidade oxidativa de ácidos graxos poliinsaturados presentes nos óleos para consumo humano. Entre os compostos voláteis formados pela oxidação das diferentes fontes de n3-FA avaliadas neste estudo, (E, E) 2,4-heptadienal, (E, E) 2,4-decadienal, decanal, undecanal e (E) -2-undecenal, foram identificados em todas as amostras, e poderiam ser utilizados como marcadores oxidativos mais específicos. Utilizando este modelo acelerado, a rotina apresentou melhor potencial antioxidante do que o ácido sinápico no óleo de peixe, provavelmente devido a presença de um grupamento catecol em sua estrutura molecular.

9. REFERÊNCIAS

- Akoh, Casimir C. (Ed.). **Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology**. CRC press, 2008.
- Antoniassi, R. "Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras." **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 353-380, jul./dez. 2001.
- Arab-Tehrany, E., M. Jacquot, C. Gaiani, M. Imran, S. Desobry, e M. Linder, 2012, Beneficial effects and oxidative stability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. **Trends in Food Science & Technology**, v. 25, p. 24-33.
- Asnaashari, M., R. Farhoosh, e A. Sharif, 2014, Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerols of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion. **Food Chemistry**, v. 159, p. 439-44.
- Bailey, A. E.; Hui, Y. Industrial oil and fat products. Bailey's industrial oil and fat products. **Oils and Oilseeds**. 1996.
- Balasundram, N., K. Sundram, and S. Samman, 2006, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203.
- Banerjee, A., A. Kunwar, B. Mishra, e K. I. Priyadarsini, 2008, Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin: Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemico-biological Interactions**, v. 174, p. 134-139.
- Barceló-Coblijn, G., e E. J. Murphy, 2009, Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n- 3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n- 3 fatty acid levels. **Progress in Lipid Research**, v. 48, p. 355-374.
- Bartosz, G., e A. Kołakowska, 2010, Lipid oxidation in food systems. **Chemical, Biological, and Functional Aspects of Food Lipids**. Eds. Z. Sikorski, A. Kołakowska. CRC Press, New York, USA, p. 163-184.
- Botterweck, A. A. M., H. Verhagen, R. A. Goldbohm, J. Kleinjans, e P. A. Van Den Brandt, 2000, Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 599-605.
- Branco, G. F., e I. A. Castro, 2011, Optimization of oil oxidation by response surface methodology and the application of this model to evaluate antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, p. 1747-1758.
- Broinizi, P. R. B., E. R. S. d. Andrade-Wartha, A. J. V. Novoa, R. P. Torres, H. M. C. Azeredo, R. E. Alves, e J. Mancini-Filho, 2007, Avaliação da atividade antioxidante dos compostos

fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Food Science and Technology** (Campinas), v. 27, p. 902-908.

Bruneton, J., e D. H. R. Barton, 1991, **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**, Acribia.

Burdge, G. C., e P. C. Calder, 2005, Conversion of α -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, p. 581-597.

Cabo, J., R. Alonso, e P. Mata, 2012, Omega-3 fatty acids and blood pressure. **British Journal of Nutrition**, v. 107, p. S195-S200.

Caslake, M. J., E. A. Miles, B. M. Kofler, G. Lietz, P. Curtis, C. K. Armah, A. C. Kimber, J. P. Grew, L. Farrell, e J. Stannard, 2008, Effect of sex and genotype on cardiovascular biomarker response to fish oils: the FINGEN Study. **The American journal of clinical nutrition**, v. 88, p. 618-629.

Chaillou, L. L., e M. A. Nazareno, 2006, New method to determine antioxidant activity of polyphenols. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, p. 8397-8402.

Chaiyasit, W., R. J. Elias, D. J. McClements, e E. A. Decker, 2007, Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, p. 299-317.

Chaiyasit, W., M. P. C. Silvestre, D. J. McClements, e E. A. Decker, 2000, Ability of surfactant hydrophobic tail group size to alter lipid oxidation in oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3077-3080.

Chen, Bingcan, David Julian McClements, e Eric Andrew Decker. "Minor components in food oils: a critical review of their roles on lipid oxidation chemistry in bulk oils and emulsions." **Critical reviews in food science and nutrition**, 51.10 (2011): 901-916.

Choe, E. 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.

Cicero, A. F. G., G. Derosa, V. D. Gregori, M. Bove, A. V. Gaddi, e C. Borghi, 2010, Omega 3 polyunsaturated fatty acids supplementation and blood pressure levels in hypertriglyceridemic patients with untreated normal-high blood pressure and with or without metabolic syndrome: a retrospective study. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 32, p. 137-144.

Cuvelier, M.-E., H. Richard, e C. Berset, 1992, Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, p. 324-325.

Dahle, Leland K., Eldon G. Hill, e Ralph T. Holman. "The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters." **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 98.2 (1962): 253-261.

Damodaran, S., K. L. Parkin, e O. R. Fennema, 2010, **Química de Alimentos de Fennema**, Artmed.

Decker, E. A., J. Alamed, e I. A. Castro, 2010, 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, p. 771-780.

Din, J. N., D. E. Newby, e A. D. Flapan, 2004, Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease--fishing for a natural treatment. **British Medical Journal**, v. 328, p. 30-35.

Elkin, R. G.; Ying, Y.; Harvatine, K. J., Feeding laying hens stearidonic acid-enriched soybean oil, as compared to flaxseed oil, more efficiently enriches eggs with very long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2015, 63 (10), 2789-2797.

Espinosa, R. R., R. Inchingolo, S. M. Alencar, M. T. Rodriguez-Estrada, e I. A. Castro, 2015, Antioxidant activity of phenolic compounds added to a functional emulsion containing omega-3 fatty acids and plant sterol esters. **Food Chemistry**, v. 182, p. 95-104.

Figueroa-Espinoza, M.-C., e P. Villeneuve, 2005, Phenolic acids enzymatic lipophilization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2779-2787.

Figueroa-Espinoza, M. C., M. Laguerre, P. Villeneuve, e J. Lecomte, 2013, From phenolics to phenolipids: Optimizing antioxidants in lipid dispersions. **Lipid Technology**, v. 25, p. 131-134.

Firuzi, O., L. Giansanti, R. Vento, C. Seibert, R. Petrucci, G. Marrosu, R. Agostino, e L. Saso, 2003, Hypochlorite scavenging activity of hydroxycinnamic acids evaluated by a rapid microplate method based on the measurement of chloramines. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, p. 1021-1027.

Frankel, E. N., 1980, **Lipid oxidation**. Progress in lipid research, v. 19, p. 1-22.

Frankel, E. N., 2005, **Lipid oxidation**, The Oily Press.

Frankel, E. N., 2014, **Lipid oxidation**, Elsevier.

Frankel, E. N., e A. S. Meyer, 2000, The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1925-1941.

Gabbanini, S., R. Matera, A. Valvassori, e L. Valgimigli, 2015, Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of 4-hydroxynonenal for the assessment of oxidative degradation and safety of vegetable oils. **Analytica Chimica Acta**, v. 869, p. 50-58.

García-Llatas, G., M. J. Lagarda, F. Romero, P. Abellán, e R. Farré, 2007, A headspace solidphasemicroextraction method of use in monitoring hexanal and pentane during storage: Application to liquid infant foods and powdered infant formulas. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1078-1086.

Genaro-Mattos, Thiago C., et al. "Antioxidant Activity of Caffeic Acid against Iron-Induced Free Radical Generation—A Chemical Approach." **Plos One** 10.6 (2015): e0129963.

Giet, J.-M., M. Aguedo, S. Danthine, M. Paquot, A. Thomas, M. Vandenbol, P. Thonart, J.-P. Wathélet, C. Blecker, e G. Lognay, 2009, Enzymatic interesterification of anhydrous milk fat with rapeseed and/or linseed oil: oxidative stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 6787-6794.

Gliszczyńska-Świgło, A., e E. Sikorska, 2004, Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. **Journal of Chromatography A**, v. 1048, p. 195-198.

Goicoechea, Encarnación, e María D. Guillén. "Volatile compounds generated in corn oil stored at room temperature. Presence of toxic compounds." **European Journal of Lipid Science and Technology**, 116.4 (2014): 395-406.

Gómez-Cortés, P.; Sacks, G. L.; Brenna, J. T. Quantitative analysis of volatiles in edible oils following accelerated oxidation using broad spectrum isotope standards. **Food chemistry**, v. 174, p. 310-318, 2015. ISSN 0308-8146.

Gray, D. A., G. Payne, D. J. McClements, E. A. Decker, e M. Lad, 2010, Oxidative stability of *Echium* plantagineum seed oil bodies. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 741-749.

Grigorakis, K., I. Giogios, A. Vasilaki, e I. Nengas, 2010, Effect of the fish oil, oxidation status and of heat treatment temperature on the volatile compounds of the produced fish feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, p. 73-84.

Guerra, N. B., e F. M. Lajolo, 2005, Ação antioxidante de especiarias face diferentes atividades de água. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, p. 45-50.

Guil-Guerrero, J. L., 2007, Stearidonic acid (18: 4n-3): Metabolism, nutritional importance, medical uses and natural sources. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, p. 1226-1236.

Guo, R., P. Wei, e W. Liu, 2007, Combined antioxidant effects of rutin and Vitamin C in Triton X-100 micelles. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 1580-1586.

Halliwell, B., e J. M. C. Gutteridge, 2015, **Free radicals in biology and medicine**, Oxford University Press, USA.

Harris, W. S., 2007, Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: a case for omega-3 index as a new risk factor. **Pharmacological Research**, v. 55, p. 217-223.

Harris, W. S., M. Miller, A. P. Tighe, M. H. Davidson, e E. J. Schaefer, 2008, Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. **Atherosclerosis**, v. 197, p. 12-24.

Hartvigsen, Karsten, et al. "Dynamic headspace gas chromatography/mass spectrometry characterization of volatiles produced in fish oil enriched mayonnaise during storage." **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48.10 (2000): 4858-4867.

Holman, R. T., e O. C. Elmer, 1947, The rates of oxidation of unsaturated fatty acids and esters. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 24, p. 127-129.

Hsu, Hsiu-Ching, Yuan-Teh Lee, e Ming-Fong Chen. "Effects of fish oil and vitamin E on the antioxidant defense system in diet-induced hypercholesterolemic rabbits." **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, 66.2 (2001): 99-108.

Huang, S.-W., E. N. Frankel, e J. B. German, 1994, Antioxidant activity of. alpha.-and. gamma.-tocopherols in bulk oils and in oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 2108-2114.

James, M. J., V. M. Ursin, e L. G. Cleland, 2003, Metabolism of stearidonic acid in human subjects: comparison with the metabolism of other n- 3 fatty acids. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, p. 1140-1145.

Jurkovič, P., M. Šentjerc, M. Gašperlin, J. Kristl, e S. Pečar, 2003, Skin protection against ultraviolet induced free radicals with ascorbyl palmitate in microemulsions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 59-66.

Jayasinghe, Chamila, Naohiro Gotoh, e Shun Wada. "Pro-oxidant/antioxidant behaviours of ascorbic acid, tocopherol, and plant extracts in n-3 highly unsaturated fatty acid rich oil-in-water emulsions." **Food chemistry**, 141.3 (2013): 3077-3084.

Kanner, J., J. B. German, J. E. Kinsella, e H. O. Hultin, 1987, Initiation of lipid peroxidation in biological systems. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 25, p. 317-364.

Karabulut, I., 2010, Effects of α -tocopherol, β -carotene and ascorbyl palmitate on oxidative stability of butter oil triacylglycerols. **Food chemistry**, v. 123, p. 622-627.

Keceli, T., e M. H. Gordon. "Ferric ions reduce the antioxidant activity of the phenolic fraction of virgin olive oil." **Journal of Food Science**, 67.3 (2002): 943-947.

Khan-Merchant, N., M. Penumetcha, O. Meilhac, and S. Parthasarathy, 2002, Oxidized fatty acids promote atherosclerosis only in the presence of dietary cholesterol in low-density lipoprotein receptor knockout mice. **The Journal of Nutrition**, v. 132, p. 3256-3262.

Kittipongpittaya, Ketinun, Atikorn Panya, e Eric A. Decker. "Role of Water and Selected Minor Components on Association Colloid Formation and Lipid Oxidation in Bulk Oil." **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 93.1 (2016): 83-91.

Konráðsdóttir, F.; Geirsson, T.; Halldórsson, A.; Halldórsson, S.; Loftsson, T., Physicochemical characterization and stability of microbeads containing cod-liver oil encircled with natural cyclodextrins. **Journal of Inclusion Phenomena Macrocyclic Chemistry**, 2014, 78 (1), 485-499.

Kraïnev, A. G., e D. J. Bigelow, 1996, Comparison of 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH) and 2, 2'-azobis (2, 4-dimethylvaleronitrile)(AMVN) as free radical initiators: a spin-trapping study. **Journal of the Chemical Society**, Perkin Transactions 2, p. 747-754.

Kris-Etherton, P. M., W. S. Harris, e L. J. Appel, 2002, Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. **Circulation**, v. 106, p. 2747-2757.

Kris-Etherton, P. M., W. S. Harris, e L. J. Appel, 2003, Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease new recommendations from the American Heart Association. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, p. 151-152.

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

Kubow, S., 1993, Lipid oxidation products in food and atherogenesis. **Nutrition Reviews**, v. 51, p. 33-40.

Kuhnt, K., C. Fuhrmann, M. Köhler, M. Kiehntopf, e G. Jahreis, 2014, Dietary *Echium* Oil Increases Long-Chain n-3 PUFAs, Including Docosapentaenoic Acid, in Blood Fractions and Alters Biochemical Markers for Cardiovascular Disease Independent of Age, Sex, and Metabolic Syndrome. **The Journal of Nutrition**, p. jn-113.

Kunwar, A., B. Mishra, A. Barik, L. B. Kumbhare, R. Pandey, V. K. Jain, e K. I. Priyadarsini, 2007, 3, 3'-Diselenodipropionic acid, an efficient peroxy radical scavenger and a GPx mimic, protects erythrocytes (RBCs) from AAPH-induced hemolysis. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20, p. 1482-1487.

Laguerre, M.; Bayrasy, C.; Panya, A.; Weiss, J.; McClements, D. J.; Lecomte, J.; Decker, E. A.; Villeneuve, P., What makes good antioxidants in lipid-based systems? The next theories beyond the polar paradox. **Critical Reviews and Food Science and Nutrition**, 2015, 55 (2), 183-201.

Laguerre, M., J. Lecomte, e P. Villeneuve, 2007a, Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v. 46, p. 244-282.

Laguerre, M., L. J. López-Giraldo, J. Lecomte, M. Pina, e P. Villeneuve, 2007b, Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. **Oléagineux, Corps Gras, Lipides**, v. 14, p. 278-292.

Lee, K. H., H. S. Yook, J. W. Lee, W. J. Park, K. S. Kim, e M. W. Byun, 1999, Quenching mechanism and kinetics of ascorbyl palmitate for the reduction of the gamma irradiation-induced oxidation of oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, p. 921-925.

Leopoldini, Monica, Nino Russo, e Marirosa Toscano. "The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants." **Food Chemistry**, 125.2 (2011): 288-306.

Let, M. B., C. Jacobsen, e A. S. Meyer, 2007, Ascorbyl Palmitate, γ -Tocopherol, and EDTA Affect Lipid Oxidation in Fish Oil Enriched Salad Dressing Differently. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2369-2375.

Libby, P., P. M. Ridker, e G. K. Hansson, 2011, Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature**, v. 473, p. 317-325.

Lönn, Maria E., Joanne M. Dennis, e Roland Stocker. "Actions of "antioxidants" in the protection against atherosclerosis." **Free Radical Biology and Medicine**, 53.4 (2012): 863-884.

Lue, B.-M., Z. Guo, M. Glasius, e X. Xu, 2010, Scalable preparation of high purity rutin fatty acid esters. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, p. 55-61.

Marangoni, F., e A. Poli, 2010, Phytosterols and cardiovascular health. **Pharmacological Research**, v. 61, p. 193-199.

Martin, C. A., V. V. d. Almeida, M. R. Ruiz, J. E. L. Visentainer, M. Matshushita, N. E. d. Souza, e J. V. Visentainer, 2006, Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 19, p. 761-770.

McClements, D. J., e E. A. Decker, 2000, Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. **Journal of Food Science-Chicago**, v. 65, p. 1270-1283.

McClements, D. J., e E. A. Decker, 2007, Role of Physical Structures in Bulk Oils on Lipid Oxidation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 41, p. 299-317.

McDonald, R. E., e H. O. Hultin, 1987, Some characteristics of the enzymic lipid peroxidation system in the microsomal fraction of flounder skeletal muscle. **Journal of Food Science**, v. 52, p. 15-21.

Miyashita, K., 2008, Oxidation of long-chain polyunsaturated fatty acids. **Lipid Oxidation Pathways**, v. 2, p. 51-53.

Natella, F., M. Nardini, M. Di Felice, e C. Scaccini, 1999, Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1453-1459.

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

Nenadis, N., e M. Tsimidou, 2002, Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) tests. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, p. 1191-1195.

Nićiforović, N., e H. Abramovič, 2014, Sinapic Acid and Its Derivatives: Natural Sources and Bioactivity. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 34-51.

Orlien, V., J. Risbo, H. Rantanen, e L. H. Skibsted, 2006, Temperature-dependence of rate of oxidation of rapeseed oil encapsulated in a glassy food matrix. **Food Chemistry**, v. 94, p. 37-46.

Pereira, D. M., P. Valentão, J. A. Pereira, e P. B. Andrade, 2009, **Phenolics: From chemistry to biology: Molecules**, v. 14, p. 2202-2211.

Porter, 1993, Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. G.M. Williams (Ed.), **Antioxidants: Chemical, physiological, nutritional and toxicological aspects. Princeton Scientific**, Princeton, NJ (1993), pp. 93-122

Ragnarsson, J. O., e T. P. Labuza, 1977, Accelerated shelf-life testing for oxidative rancidity in foods—A review. **Food Chemistry**, v. 2, p. 291-308.

Scandinavian Simvastatin Survival Study, G., 1994, Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S): **The Lancet**, v. 344, p. 1383-1389.

Sghaier, Lilia, et al. "Comprehensive two-dimensional gas chromatography for analysis of the volatile compounds and fishy odor off-flavors from heated rapeseed oil." **Chromatographia**, 78.11-12 (2015): 805-817.

Shahidi, F.; Zhong, Y., Revisiting the polar paradox theory: a critical overview. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2011, 59 (8), 3499-3504.

Shahidi, F., e Y. Zhong, 2010, Lipid oxidation and improving the oxidative stability. **Chemical Society Reviews**, v. 39, p. 4067-4079.

Shahidi, Fereidoon, e PKJPD Janitha Wanasundara. "Antioxidants." **Food Additives Data Book**, Second Edition (2011): 59-99.

Shantha, N. C., e E. A. Decker, 1993, Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. **Journal of AOAC International**, v. 77, p. 421-424.

Shibata, A., M. Uemura, M. Hosokawa, e K. Miyashita, 2015, Formation of Acrolein in the Autoxidation of Triacylglycerols with Different Fatty Acid Compositions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 92, p. 1661-1670.

Shirai, N., H. Suzuki, e S. Wada, 2005, Direct methylation from mouse plasma and from liver and brain homogenates. **Analytical Biochemistry**, v. 343, p. 48-53.

Silva, F. A. M., F. Borges, C. Guimarães, J. L. F. C. Lima, C. Matos, e S. Reis, 2000, Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity, and physicochemical parameters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2122-2126.

Silva, F. A. M., M. F. M. Borges, e M. A. Ferreira, 1999, Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, p. 94-103.

Snyder, J. M., et al. "Comparison of gas chromatographic methods for volatile lipid oxidation compounds in soybean oil." **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 65.10 (1988): 1617-1620.

Stashenko, Elena E., Miguel A. Puertas, e Jairo R. Martínez. "SPME determination of volatile aldehydes for evaluation of in-vitro antioxidant activity." **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 373.1 (2002): 70-74.

Surette, M. E., M. Edens, F. H. Chilton, e K. M. Tramposch, 2004, Dietary *Echium* oil increases plasma and neutrophil long-chain (n-3) fatty acids and lowers serum triacylglycerols in hypertriglyceridemic humans. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 1406-1411.

Sørensen, A.-D. M., 2010, **The influence of ingredients or lipophilized antioxidants on the oxidative stability of fish oil enriched food systems**, Technical University of Denmark Danmarks Tekniske Universitet, National Institute of Aquatic Resources Institut for Akvatiske Ressourcer.

Sørensen, Ann-Dorit Moltke, et al. "Interactions between iron, phenolic compounds, emulsifiers, and pH in omega-3-enriched oil-in-water emulsions." **Journal of agricultural and food chemistry**, 56.5 (2008): 1740-1750.

Sørensen, Ann-Dorit Moltke, et al. "Impact of endogenous canola phenolics on the oxidative stability of oil-in-water emulsions." **European Journal of Lipid Science and Technology**, 115.5 (2013): 501-512.

Teneva, Olga, e Nina Dimcheva. "Electrochemical assay of the antioxidant ascorbyl palmitate in mixed medium." **Food chemistry**, 203 (2016): 35-40.

Van Dyck, S. M. O., T. Verleyen, W. Dooghe, A. Teunckens, e C. A. Adams, 2005, Free radical generation assays: New methodology for accelerated oxidation studies at low temperature in complex food matrices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 887-892.

Velasco, M. V. R., T. S. Balogh, C. A. Pedriali, F. D. Sarruf, C. Pinto, T. M. Kaneko, e A. R. Baby, 2008, Associação da rutina com p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação in vitro da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância: **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 23-7.

Venegas-Calcrón, M., O. Sayanova, e J. A. Napier, 2010, An alternative to fish oils: metabolic engineering of oil-seed crops to produce omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 49, p. 108-119.

Waksmundzka-Hajnos, M., e J. Sherma, 2010, **High performance liquid chromatography in phytochemical analysis**, CRC Press.

Wall, R., R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, e C. Stanton, 2010, Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. **Nutrition Reviews**, v. 68, p. 280-289.

YOSHIDA, Yasukazu et al. Application of water-soluble radical initiator, 2, 2'-azobis-[2-(2-imidazolin-2-yl) propane] dihydrochloride, to a study of oxidative stress. **Free Radical Research**, v. 38, n. 4, p. 375-384, 2004.

ANEXOS

Anexo I: Preparo dos indutores adicionados indiretamente ao óleo.

Os cálculos foram projetados para 20mL de óleo ($\cong$ 20g).

Ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Massa molecular (MM): 278 g/mol

Concentração: 1 mMol

$$\begin{array}{rclcl} 278\text{mg} & \longrightarrow & 1\text{L} & \longrightarrow & 1\text{mMol} \\ X & \longrightarrow & 0,02\text{L} & & \end{array}$$

$X = 5,56\text{mg em } 20\text{mL}$

Para obter **5,56mg** e **11,12mg** em 20mL de óleo, á concentrações de 1mMol e 2 mMol respectivamente, **55,6mg** de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foram adicionados a uma solução (5 mL) de Tween 20 a 1%. A solução foi agitada em vórtex para total dissolução e posteriormente, 0,5mL desta solução foram adicionados à amostra de óleo (para concentração de 1mMol) e 1mL (para concentração de 2mMol).

Ascorbil Palmitato

Massa molecular (MM): 414,53 g/mol

Concentração: 1 mMol

$$\begin{array}{ccccc} 414,53\text{mg} & \longrightarrow & 1\text{L} & \longrightarrow & 1\text{mMol} \\ X & \longrightarrow & 0,02\text{L} & & \end{array}$$

$X = 8,29\text{mg em } 20\text{mL}$

Massa de Ascorbil Palmitato pesada: **8,29mg** (para concentração de 1mMol) e **16,58mg** (para concentração de 2mMol).

A quantidade determinada de Ascorbil palmitato foi adicionada diretamente na amostra de óleo (20 mL).

AMVN e AAPH**Concentração: 0,5%**

20g	_____	100% em massa
X	_____	0,5% em massa

X= 0,1g

Para obter **0,1g** e **0,2g** em 20mL de óleo, á concentrações de 0,5% e 1% respectivamente, **1g** de AAPH foi adicionado a uma solução (5 mL) de Tween 20 a 1%. A solução foi agitada em vórtex para total dissolução e posteriormente, 0,5mL desta solução foram adicionados à amostra de óleo (para concetração de 0,5%) e 1mL (para concentração de 1%). **0,5g** de AMVN foram adicionados a uma solução (5 mL) de etanol. A solução foi agitada em vórtex para total dissolução e posteriormente, 1mL desta solução foi adicionado à amostra de óleo (para concentração de 0,5%) e 2mL (para concentração de 1%).

Anexo II: Concentração de hidroperóxidos (LOOH) em amostras de óleo de *Echium* tratadas de acordo com o planejamento fatorial fracionário (n=3).

Anexo III: Concentração de TBARS em amostras de óleo de *Echium* tratadas de acordo com o planejamento fatorial fracionário (n=3).

Anexo IV: Concentração de hidroperóxidos (LOOH) em amostras de óleo de linhaça tratadas de acordo com o planejamento fatorial fracionário (n=3).

Anexo V: Concentração de TBARS em amostras de óleo de linhaça tratadas de acordo com o planejamento fatorial fracionário (n=3).

Anexo VI: Concentração de hidroperóxidos (LOOH) em amostras de óleo de fígado de bacalhau tratadas de acordo com o planejamento fatorial facionário (n=3).

Anexo VII: Concentração de TBARS em amostras de óleo de peixe tratadas de acordo com o planejamento fatorial fracionário (n=3).

Anexo VIII: Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9132 - 9161643/1 - Thamyris Agnes Dias Fabiano

Email: thamyris_agnes@usp.br
Data de Nascimento: 14/09/1991
Cédula de Identidade: RG - 47.732.784-3 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Química Tecnológica - Universidade Católica de Santos - São Paulo - Brasil - 2014

Curso: Mestrado
Programa: Ciência dos Alimentos
Área: Nutrição Experimental
Data de Matrícula: 28/08/2014
Início da Contagem de Prazo: 28/08/2014
Data Limite para o Depósito: 28/06/2017
Orientador: Prof(a). Dr(a). Inar Alves de Castro - 28/08/2014 até o presente. Email: inar@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 28/08/2014
Trancamento(s): 120 dias
Período de 19/03/2015 até 16/07/2015
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 18/12/2015
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 28/08/2014
Trancado em 19/03/2015

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/01/2017

Impresso em: 26/06/2017 11:31:23

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9132 - 9161643/1 - Thamyris Agnes Dias Fabiano

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBA5741-3/2	Química e Bioquímica de Alimentos I	12/09/2014	16/10/2014	60	4	100	A	N	Concluída
BMF5872-1/1	Compostos Bioativos com Propriedades Antioxidantes e Anti-inflamatórias (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	08/10/2014	04/11/2014	60	4	75	A	N	Concluída
FBA5706-2/2	Planejamento Experimental para Otimização de Produtos e Processos em Alimentos	26/02/2015	21/06/2015	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBT5785-4/2	Tecnologia de Produtos com Alto Teor Lipídico	11/03/2015	14/04/2015	75	0	-	-	N	Matrícula cancelada
ECQ5717-1/1	Reações de Oxirredução e seu Ensino: Conteúdo, Dificuldades e Possibilidades (Curso Interinstitucional: Ensino de Química - Universidade de São Paulo)	13/08/2015	25/11/2015	120	8	75	C	N	Concluída
FBF5779-2/4	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	08/04/2016	09/06/2016	90	6	95	A	N	Concluída
FBA5728-4/2	Aprimoramento Pedagógico	31/05/2016	27/06/2016	60	4	75	A	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25
Estágios:		26
Total:	0	25

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71**Conceito a partir de 02/01/1997:**

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/01/2017

Impresso em: 26/06/2017 16:10:19

The use of factorial design to evaluate the oxidation of oils containing different types of omega 3 fatty acids

Journal:	<i>Journal of the Science of Food and Agriculture</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Agnes, Thamiris; University of Sao Paulo, Department of Food and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences Roschel , Gabriela; University of São Paulo, Department of Food and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences Castro, Inar; Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Department of Food and Experimental Nutrition
Key Words:	oxidation, phenolics, echium, omega 3, oils

SCHOLARONE™
Manuscripts

**The use of factorial design to evaluate the oxidation of oils containing different types
of omega 3 fatty acids**

Thamyris Dias Fabiano Agnes, Gabriela Grassmann Roschel and Inar Alves Castro*

LADAF, Department of Food and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Lineu Prestes, 580, B14, 05508-000, São Paulo, Brazil.

**Corresponding author. Address: Department of Food and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Lineu Prestes, 580, B14, 05508-900, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 (11) 3091-1152; Fax: +55 (11) 3815-4410.
E-mail address: inar@usp.br; www.ladaf.com.br (I. Castro).*

Short running title: omega 3 fatty acids oxidation

ABSTRACT

Omega 3 polyunsaturated fatty acids (n3 FA) have beneficial effects on cardiovascular diseases, but they are highly susceptible to oxidation, which leads to the formation of potentially toxic secondary products. In this study, the antioxidant capacity of natural compounds (sinapic acid and rutin) was evaluated using an accelerated model to oxidize the oils. Five inducers (Temperature, Fe^{2+} , AAPH, Ascorbyl palmitate and AMVN) were combined in a factorial design to accelerate the oxidation of three oils (flaxseed, echium and fish) containing different sources of n3 FA. Hydroperoxide and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentrations estimated using the regression models did not differ from the observed values. AMVN + Fe^{2+} increased TBARS in all samples. The values for the oxidative markers obtained 48 h after induction were similar to those obtained when the oils were heated at 60°C for 15 days. Of a number of volatile compounds formed from the oxidation of different n3 FA sources, (E,E) 2,4-heptadienal, (E,E) 2,4-decadienal, decanal, undecanal and (E)-2-undecenal were identified in all samples and could be used as more specific oxidative markers. Using the accelerated model, rutin improved the oxidative stability of fish oil, probably due to the presence of catechol groups in its chemical structure.

Key words: oxidation, phenolics, oils, echium, omega 3

INTRODUCTION

The consumption of omega 3 fatty acids (n3 FA) has recently increased due to their cardiovascular protective action ¹. Supplements containing n3 FA are used by more than a third of American adults ². Several studies have reported anti-inflammatory and hypotriglyceridemic effects after n3 FA intake ³. For this reason, companies are adding n3 FA to food product formulations or even commercializing them as capsules. However, oils containing a higher proportion of long chain polyunsaturated fatty acids are more susceptible to oxidation ⁴. These polyunsaturated fatty acids contain 1,4-cis-pentadiene systems, which are prone to hydrogen abstraction and subsequent free-radical oxidation reactions ⁵. Once oxidized, n3 FA can lose their functionality, leading to the formation of potentially toxic secondary products that lower food quality and safety ^{2, 6-11}. The autoxidation of oils depends on the temperature, exposure to oxygen, the concentration of minor components such as hydroperoxides and transition metals and the number of unsaturated sites on the carbon chain ^{6, 7}. The degree of fatty acid unsaturation and the presence of minor polar components respectively contribute 30% and 20% to the oxidation of the oils ¹². Thus, after refining, compounds with antioxidant action, such as BHT (butylhydroxytoluene), BHA (butylhydroxyanisol) and TBHQ (t-butylhydroxyquinone), citric acid or tocopherol, are usually added to commercial oils ^{6, 10}, packed into glass or plastic containers protected from the light and kept at room temperature or under refrigeration until consumption. However, artificial compounds such as BHT, BHA and TBHQ are potentially carcinogenic. For this reason, their addition to “healthy” functional oils does not configure an alternative to delay oxidative damage of high polyunsaturated fatty acids oils. Moreover, consumers are interested in foods without artificial additives ¹³.

Currently, some natural antioxidants have been added to oils for human consumption, including tocopherol, rosemary extracts, citric acid and others ^{9, 11}. Although natural, the addition of these compounds has not been sufficient to inhibit the oxidation of higher n3 FA oils. For example, the oxidation of over-the-counter marine n3 FA supplements containing tocopherol is variable, but it affects between 11% and 62% of all such products ². Thus, it is necessary to find other options and strategies to extend the shelf-life of n3 FA oils ¹¹. In a previous study carried out with emulsions containing a vegetable oil rich in n3 FA, sinapic acid and rutin showed higher antioxidant action than did other

phenolic compounds¹⁴. According to the “Polar Paradox”, first reported by^{15 15} and after discussed by¹⁶, polar compounds would exert a better antioxidant activity in bulk oils than when present in emulsions, in function of their better affinity for the water-lipid interface where the oxidative reaction is more intense. For this reason, it is interesting to evaluate the antioxidant effect of these two phenolics (sinapic acid and rutin) when directly added to the oil. However, two aspects must be considered before such evaluation can be carried out. The first aspect concerns to the long time, in terms of analysis, for oxidative damage to occur in a commercial oil at room temperature⁷. Usually, the oil is kept at 60 °C for a minimum of 15 days before secondary oxidative markers can be quantified by instrumental analysis such as gas or liquid chromatography⁵. The second aspect is concerned with the secondary products produced from different types of n3 FA. To track the oxidative reaction, it is important to choose a compound that better represents a specific n3 FA oxidative alteration. Thus, the objectives of this study were to first optimize the combination of five inducers to accelerate the oxidation of three commercial oils containing high concentration of different types of n3 FA, and then to apply this accelerated model to evaluate the antioxidant action of sinapic acid and rutin.

EXPERIMENTAL

Materials

Flaxseed, echium and fish oil were chosen as sources of ALA, ALA+SDA and EPA+DHA respectively. Echium oil (Echium Oil NEWmega™) was a refined oil purchased from De Wit Speciality Oils (De Waal, Tescel, Netherlands). Gold flaxseed oil (Pazze Indústria de Alimentos LTDA; Panambi, Brazil) was a cold pressed oil acquired from a local market. Cod liver oil was a cold pressed oil donated by Sorocaps Pharmaceutical Industry LTDA (Sorocaba, SP, BR). Sinapic acid and rutin hydrate (>95%) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Hydrophilic (2,2'-Azobis(2-amidinopropane dihydrochloride - AAPH) and the hydrophobic (2,2'-azobis -2,4-dimethylvaleronitrile - AMVN) free radical generators were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and Sun Chemical Technology Co. (Shanghai, China) respectively. The volatile standards analyzed in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Medium-chain triacylglycerol (MCT) was supplied by Nutrimea Ind. Ltda (São Paulo, BR). The organic solvents were HPLC grade.

Experimental design

This study was conducted in two stages. First, three oils containing n3 FA were oxidized with a combination of five independent inducers (**Table 1**). A fractional design (2^{5-1}) $\frac{1}{2}$ fraction with resolution V was applied resulting in 16 assays. In addition, 3 central points were added to estimate the experimental error. The generator of confounding was given by I = 12345, in which the main effects were confounded with the quaternary interactions and the binary interactions were confounded with the ternary ones. To prepare the samples, 20 mL of each oil was mixed with $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, AAPH, AMVN and ascorbyl palmitate, according to the design (**Table 1**), and kept in the incubator (30 – 50°C) for 48 h on an orbital shaker (Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, Brazil). Samples were taken after 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24, 32 and 48 h. Ascorbyl palmitate (0.0, 8.3 or 16.6 mg/20 mL oil) was directly added to an oil sample. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.0, 55.6 mg or 27.8 mg/20 mL oil) and AAPH (0.0, 0.5 or 1.0 g/20 mL) were first dissolved in a Tween 1% solution (5.0 mL) and 1.0 mL of this solution was added to an oil sample (20 mL). AMVN (0.0, 0.5 or 1.0 g/ 20 mL) was first dissolved in 5.0 mL ethanol, and 1.0 mL was added to an oil sample (20 mL). A regression model was optimized to maximize two oxidative markers: LOOH and TBARS. The products formed from the accelerated oxidation of the oil obtained by optimizing the five inducers (IND) were compared with compounds formed in oil kept at 60°C for 15 days (TRAD), which represents the traditional procedure for increasing lipid oxidation. The results found for both treatments (IND and TRAD) were also compared with fresh oil (FESH). In the second stage, the antioxidant activity of sinapic acid and rutin hydrate (200 ppm) were compared using the accelerated model.

Oxidative stability chemical markers

The oxidative stability of the three oils was followed for 48 h by measuring the concentration of LOOH, which was determined according to the procedure proposed by ¹⁷ ¹⁷ expressed as meq/kg oil while TBARS was quantified according to ¹⁸ and expressed as mg/L oil. The LOOH and TBARS results were plotted (time x concentration), and each treatment was fit with a polynomial model. The area under the curve (<http://www.wolframalpha.com/widgets/view.jsp?id=ec78b0700064223c5cd7898812ecffae>) was calculated, and these values were used to estimate the regression coefficients.

Fatty acid composition of the oils

Oil samples were esterified as described by ¹⁹ using Tricosanoic Acid Methyl Ester (C23:0) as internal standard. Samples were injected into a gas chromatograph (Agilent 7890 A GC System, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). A coated fused silica capillary column (J&W DB-23 Agilent 122-236; 60 m x 250 mm inner diameter, 0.15 mm film thickness) was used to separate the fatty acids. The fatty acids were identified by comparing their retention time with those of four purified standard mixtures of fatty acid methyl esters: 4-7801; 47085-U; 49453-U and 47885-U (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, USA). The results were expressed as mg/5 mg of oil.

Tocopherol content of the oils

The tocopherol content was determined using a modification of the method proposed by ²⁰. All analyses were performed using a High Performance Liquid Chromatograph - HPLC (Agilent Technologies 1200 series, Santa Clara, CA, USA), equipped with a Zorbax Elipse Reverse-phase C18 column (150 mm x 4,6 mm; 5 µm) with pre-column LC8-D8 (Phenomenex AJ0-1287, Torrance, CA, USA). The results were expressed as mg/kg oil.

Determination of Volatile compounds by Headspace Solid Phase Microextraction for Gas Chromatography Mass Spectrometry (HS-SPME-GC-MS)

The volatile content of the samples was determined according to ⁵ with some modifications. Oil samples (10 mL) were sealed in a glass vial with 20 mL headspace. A Combi PAL autosampler was used for automated SPME analysis. The vials were agitated (400 rpm) for 15 min at 50°C, then a 50/30 µm Stableflex 23Ga fiber (DivynilBenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane; DVB/CAR/PMDS – 57298-U; Supelco; Bellefonte, PA, USA) was inserted into the headspace and the vial was agitated for 60 min at 50°C. The fiber was injected in the GC-MS (Agilent 7890 A GC System, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), at 250°C for 5 min, using a splitless mode. During the GC analysis, the fiber was thermally desorbed at 250 °C for 30 min. Vials containing only MCT were used as blank. The stationary phase was a 19091S-433UI HP-5ms Ultra Inert, 30 m, 0.25 mm, 0.25 µm, capillary column (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The ion source and quadrupole

temperatures were 230°C and 150°C respectively. Ultra-pure helium was the carrier gas at a constant flow of 0.7 mL/min. The oven temperature started at 40°C/5 min, increased to 100°C at 4°C/min, to 220°C at 17°C/min and was held at 220°C for 10 min. All mass spectra were acquired in the electron-impact (EI) mode with an ionization voltage of 70 eV, adopting a mass range of m/z 35–350. Scan monitoring was used as the data acquisition mode. Most compounds were identified by comparing their retention time with the appropriate standards. Standard curves were prepared for all volatile compounds (from 0.05 to 50 µg/mL), except for (E,Z) 2,6-Nonadienal (from 0.02 to 22.2 µg/mL). The correlation coefficients ranged from 0.7296 to 0.9974, and the results were expressed as µg/mL. The semi-quantification of the compounds identified by NIST (National Institute of Standards and Technology) for which standards were not available was based on the area under the peak.

Statistical analysis

Values were expressed as the mean $\pm$ standard error of mean (SEM). The analysis of the design was carried out with LOOH and TBARS (area under the curve) as dependent variables, 5 independent factors (Temperature, Fe^{+2} , AAPH, Ascorbyl palmitate and AMVN), and a central point. A two-way interaction model was applied. A central point was applied to check the curvature and its replicates to estimate the pure error and the lack of fit of the regression. Non-significant effects were excluded from the model and the significant effects were presented in a Pareto chart. The model's quality was determined by the probability value of the lack of fit, the value of the Determination Coefficient (R^2) and also by the analysis of the residual dispersion. The significant models were optimized by seeking the highest values of both oxidative markers (LOOH and TBARS), using a general function and attributing the same load to the two markers. The estimated and experimental values were compared using Wilcoxon test. The effect of the two phenolic compounds compared with the control was analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test. The significance was set at p -value of 0.05. All analyses were performed using the STATISTICA software version 9.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

RESULTS

The area under the curve was used to determine a primary (hydroperoxides, LOOH) and a secondary (TBARS) oxidation product for all assays. These results were applied to identify the effect of each inducer and their interactions in the reaction. **Figure 1** presents the Pareto Chart of the standardized effects fitted to LOOH and TBARS results in the three oil samples. No model for the LOOH response could be fitted to Flaxseed samples. Based on these models, a desirability function was applied to increase the LOOH and TBARS values. The results are shown in **Table 2**. According to the desirability profiles, different combinations of inducers to accelerate the oxidation of each oil were suggested. In general, a high % of azo inducers were recommended except for fish oil. At temperature range of 40 to 50 °C, ascorbyl palmitate was suggested from about 1.00 to 1.26 mMol, and a high concentration of Fe^{2+} was suggested for all three oils. **Figure 2** shows the minimum, maximum, estimated and observed values for LOOH and TBARS in each oil. No differences were observed between the estimated and observed values expressed as the area under the curve, suggesting the good predictive capacity and agreement of the adjusted models to the experimental data. **Table 3** shows the chemical markers and the concentrations of tocopherols, fatty acids and volatile compounds observed in the samples. All fresh oils had a low LOOH concentration ranging from 2.13 to 9.11 meq/Kg, and a low TBARS concentration, which ranged from 5.06 to 9.57 mg/L oil, suggesting adequate oxidative stability of these samples at the beginning of the study. The oils oxidized at 60 °C/15 days (TRAD) had higher LOOH values than did the oils oxidized by the inducers (IND). On the contrary, TBARS concentration was higher in the Flaxseed and Echium oils oxidized by the inducers (IND) than at 60°C/15 days (TRAD), while the fish oil showed similar values for both methods. Echium oil was the most highly susceptible to oxidation (PI = 122.63), followed by Fish (PI=105.35) and Flaxseed oil (PI= 95.00). This high oxidability can probably justify the highest concentration of α , λ and Δ -tocopherol observed in fresh Echium oil compared with Flaxseed and Fish oils. In fact, tocopherol was added to Echium oil by the supplier, and all fractions (α , γ and Δ -tocopherol) were consumed during oxidation. Tocopherol was also reduced in the other two oils after inducer-accelerated oxidation (IND) and by oxidation at 60°C for 15 days (TRAD). The major fatty acids found in the oil samples corresponded to those reported in other studies²¹⁻²³. The major volatile compounds found in oils were 2-methyl (Z, Z) 3,13-octadecadienal, 17-octadecynoic acid, 2-undecenal, nonanal and

(E)- 2-hepten-1-ol, (E)2-tridecenal, (E)2-dodecenal, (Z) 2-decenal, octanal, (E,E) 2,4-decadienal, (Z,Z,Z)1,4,6-9 nonadecatriene, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-cyclohexanol, (E,E) 2,4-dodecadienal, (E,E) 2,4, heptadienal, 2-pentadecyn-1-ol, 2H-pyran,(2-(2-heptadecynyloxy)tetrahydro, (Z)9-octadecenal and 5-methyl-2-heptene.

Figure 3 shows the total amount of major volatile compounds found in fresh oil compared with oil subjected to inducer-accelerated oxidation (IND) and oxidation at 60°C/15 days (TRAD). These results include volatile compounds identified and quantified with external standards (**Figure 4**) and also those identified by NIST (**Table 3**). For this reason, the results are shown as the total area instead of concentration. **Figure 5** shows an example of the volatile peaks identified by standards and the NIST library found in echium oil oxidized at 60°C/15 days. The results showed that incubating the oils at 60 °C /15 days promoted greater formation of volatile compounds than oxidation via inducers. However, the latter procedure (IND) increased the concentration of volatile compounds compared to fresh echium and fish oils (**Figure 3**). The antioxidant activity of two phenolic compounds, rutin and sinapic acid, was evaluated using optimized inducer-accelerated oxidation model (**Table 4**). It was observed that at 200 ppm rutin could be applied as a natural antioxidant to delay oxidative damage in fish oil.

DISCUSSION

We hypothesized that azo inducers such as AAPH and AMVN would accelerate hydroperoxide formation, ascorbyl palmitate and iron would contribute to secondary product formation, while temperature would accelerate all reactions. In general, this hypothesis was confirmed for AMVN and iron because AAPH, ascorbyl palmitate and temperature showed lower effect in our model.

At high concentration, the regeneration of metal ions might override the antioxidative properties of ascorbyl palmitate and lead to pro-oxidant effects. ²⁴ ²⁴ observed a pro-oxidant effect with ascorbyl palmitate at 300 µg/g oil. In emulsions prepared with shark liver oil, ascorbic acid activated n3 FA oxidation by reducing Fe³⁺ to Fe²⁺, and forming alkoxyl radicals more rapidly ⁸. ²⁵ ²⁵ had already induced oxidation in an emulsion containing linoleic acid mixed with Fe⁺² and ascorbate at 30°C. The small amount of water present in the bulk oils (0.05 to 0.30%) is found in association with colloids, mainly reverse micelles and lamellar structures, that are stabilized by surface active minor components such as

free fatty acids, transition metals and hydroperoxides. These surface active minor components are preferentially located on the water-in-oil interface and can participate of the lipid oxidation, acting as reaction sites in the bulk oil ^{11, 13}. Actually in our study, although ascorbyl palmitate was at higher concentrations (414.53 at level 0 or 829.06 µg/g oil at level +1) compared with the study reported by Let et al. (2007)²⁴, almost no effect on the induction of oxidation was observed. This result could be attributed to the lipophilic characteristic of ascorbyl palmitate, which reduces its colocalization with Fe³⁺ at the water interface. Regarding to azo-inducers, hydrophilic AAPH has been used to generate radicals in the aqueous region, while the lipophilic AMVN has been employed to initiate the oxidation process in a lipophilic environment ²⁶. Our results matched to this statement, since the pro-oxidant effect of AMVN was higher than of AAPH. However, considering the “Polar Paradox” ²⁷ and the colloids present in the oil samples, other factors than just polarity must affect the oxidation of the bulk oils, since the same theory should be applied to explain pro and antioxidant activity. The lower effect of temperature in our model could be a consequence of the narrow range in which azo-inducers form radicals ²⁸.

Volatile compounds formed by lipid oxidation are major factors that influence consumers acceptance of products, in addition to their concern about toxicity ⁸. As quantitative analysis of volatile compounds by HS-SPME-GC-MS requires the use of standards, most studies choose only a few compounds for quantification ⁵. Medium-chain unsaturated aldehydes and ketones have been evaluated more frequently due to their greater importance for off-odors caused by high n3 FA oils oxidation ^{5, 29}. reported that the relative volatile composition changes according to the method used to perform the analysis. A relatively higher proportion of low molecular weight volatile compounds may be found using the static headspace method than with other methods, including SPME-GC-MS. This observation was verified in our analysis, because the standard curves indicated a larger variation for the low molecular weight volatile compounds, represented by lower coefficient of linear correlation. In fact, in our samples, it was not possible to quantify volatile compounds containing fewer than six carbons at high precision, using HS-SPME-GC-MS method.

Aldehydes are the main volatile secondary oxidation compounds found during lipid oxidation ⁷. From α-linolenic acid, (E)-2-butenal, 2-hydroxy-(E)-2-hexenal (HHE), (E)-2-pentenal, (E,E)-2,4-heptadienal and 4,5- epoxy-(E)-2-heptenal were identified in the headspace of high ALA oils stored at room temperature ⁷. In canola oil, which also contains α-linolenic acid, ³⁰ applied hexanal, pentanal, (E,E) 2,4

heptadienal, nonanal and (E,E) 2,4 decadienal as oxidative markers. ²¹ also applied (E,E) 2,4-heptadienal as volatile marker for echium oil oxidation. ⁸ identified approximately forty volatile carbonyl compounds produced by the oxidation of shark liver oil, with the predominance of (E,E) and (E,Z) 2,4 – heptadienal, 3,5 –octadien-2-one and 1-penten-3-ol. ³¹ submitted fish oil to forced oxidation (50°C/120 h) and of all volatile compounds found in the samples, they suggested that 2-methyl-butanal and toluene could be useful indexes of food quality. Of the volatile compounds identified in our samples, 2-undecenal, nonanal, (E)- 2-hepten-1-ol, (E)2-tridecenal, (E)2-dodecenal, (Z) 2-decenal, octanal, 17-octadecynoic acid, (E,E) 2,4-decadienal, (E,E) 2,4-dodecadienal and (E,E) 2,4, heptadienal were the most prevalent.

The TRAD method produced more total volatile compounds than the IND method, although more volatiles were present in the IND than in the FRESH samples. However, the opposite was observed when TBARS was used as the oxidative marker, which suggests that different conclusions can result from an oxidative analysis depending on the chemical marker. ³² determined 4-hydroxynonenal (HNE) formation in Echium oil kept at 75°C for 90 min and did not observe any difference from the amount present in the fresh oil. The authors suggested that the high content of quercetin and kaempferol derivatives present in the oil protected it from oxidation. However, the results reported by these authors could also be because 4-hydroxynonenal (HNE) was used as a marker instead of 4-hydroxyhexenal (HHE). For this reason, it is important to select specific compounds to follow the oxidation of high n3 FA oils.

Phenolic compounds act as antioxidants by two major mechanisms: (1st) hydrogen atom transfer (HAT) or single electron transfer (SET) to the reactive species or (2nd) chelation of transition metals ³³. In the former mechanism, the bond dissociation enthalpy of the phenolic O-H favors both of the molecules applied in our study toward peroxy radicals: $\text{PheOH} + \text{R}^\bullet \rightarrow \text{PheO}^\bullet + \text{RH}$ and $\text{PheOH} + \text{R}^\bullet \rightarrow \text{PheOH}^{+\bullet} + \text{R}^-$. Rutin can have an advantage over sinapic acid due to the presence of a catechol group in its molecular structure. The electron reduction potential of catechol ($E^\circ = 530 \text{ mV}$) is lower than that of peroxy radicals ($\text{LOO}^\bullet$; $E^\circ = 1000 \text{ mV}$), allowing that some phenolics faster donate their hydrogen to the peroxy radical ⁶. The “Polar Paradox” ²⁷ lead to the expectation that rutin and sinapic acid had better antioxidant activity in bulk oil than in emulsions ¹⁴. However, recent studies showed that some phenolic compounds do not have behave in the manner indicated by the “Polar Paradox” ¹⁰. ³⁴ also suggested that the concentration and solubility of phenolics affect their antioxidant activity because they are partitioned between interfaces. Deprotonation of hydroxyl groups at a higher pH favors iron chelation,

which improves the capacity of these molecules to inhibit the formation of reactive oxygen species³⁵. Deprotonation is possible in emulsions but not in bulk oil. In addition, tocopherols, which were significantly consumed during oxidation of all three oils, do not concentrate at the oil-water interface³⁶. Coupled with the higher pro-oxidant effect of AMVN than AAPH, these facts confirm that the “Polar Paradox” is not the only mechanism involved in the bulk oils oxidation.

Our results suggested that a combination of inducers could be used to accelerate the oxidation of oils containing different sources of omega 3 fatty acids. Similar or even higher values of the chemical markers were found after 48 h instead of 15 days that are usually required to oxidize these oils at 60°C. It configures an interesting option, once faster studies could be developed to improve the oxidative stability of these polyunsaturated fatty acids present in the oils for human consumption. Among a number of volatile compounds formed from the oxidation of different sources of n3 FA, (E,E) 2,4-heptadienal, (E,E) 2,4-decadienal, decanal, undecanal and (E)-2-undecenal were identified in all samples and could be used as more specific oxidative markers. Using this accelerate model, rutin that contains a catechol groupment in its molecule, showed better potential than sinapic acid to be used to improve fish oil oxidative stability.

FUNDING

This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Process: 12/08058-5) and by Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROEX).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Stanley N. Deming, Statistical Designs, El Paso, TX, for helpful discussions and comments.

REFERENCES

1. Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ and Nutrition C, Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* **106**:2747-2757 (2002).
2. Albert BB, Cameron-Smith D, Hofman PL and Cutfield WS, Oxidation of marine omega-3 supplements and human health. *BioMed Research International* **2013** (2013).
3. Calder PC, The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability. *Molecular Nutrition & Food Research* **56**:1073-1080 (2012).
4. Frankel EN, *Lipid oxidation*. The Oily Press (2005).
5. Gómez-Cortés P, Sacks GL and Brenna JT, Quantitative analysis of volatiles in edible oils following accelerated oxidation using broad spectrum isotope standards. *Food Chemistry* **174**:310-318 (2015).
6. Chaiyasit W, Elias RJ, McClements DJ and Decker EA, Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. *Crit Rev Food Sci Nutr* **47**:299-317 (2007).
7. Goicoechea E and Guillén MD, Volatile compounds generated in corn oil stored at room temperature. Presence of toxic compounds. *European Journal of Lipid Science and Technology* **116**:395-406 (2014).
8. Jayasinghe C, Gotoh N and Wada S, Pro-oxidant/antioxidant behaviours of ascorbic acid, tocopherol, and plant extracts in n-3 highly unsaturated fatty acid rich oil-in-water emulsions. *Food chemistry* **141**:3077-3084 (2013).
9. Kolanowski W, Jaworska D and Weißbrodt J, Importance of instrumental and sensory analysis in the assessment of oxidative deterioration of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid-rich foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**:181-191 (2007).
10. Laguerre M, Bayrasy C, Panya A, Weiss J, McClements DJ, Lecomte J, Decker EA and Villeneuve P, What makes good antioxidants in lipid-based systems? The next theories beyond the polar paradox. *Crit Rev Food Sci Nutr* **55**:183-201 (2015).
11. Chen B, McClements DJ and Decker EA, Minor components in food oils: a critical review of their roles on lipid oxidation chemistry in bulk oils and emulsions. *Crit Rev Food Sci Nutr* **51**:901-916 (2011).
12. Decker EA, Alamed J and Castro IA, 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* **87**:771-780 (2010).
13. Homma R, Johnson DR, McClements DJ and Decker EA, Influence of iron solubility and charged surface-active compounds on lipid oxidation in fatty acid ethyl esters containing association colloids. *Food Chemistry* **199**:862-869 (2016).
14. Espinosa RR, Inchingolo R, Alencar SM, Rodriguez-Estrada MT and Castro IA, Antioxidant activity of phenolic compounds added to a functional emulsion containing omega-3 fatty acids and plant sterol esters. *Food Chemistry* **182**:95-104 (2015).
15. Porter WL, Recent trends in food applications of antioxidants, in *Autoxidation in food and biological systems*. Springer, pp 295-365 (1980).
16. Frankel EN, Huang S-W, Kanner J and German JB, Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**:1054-1059 (1994).
17. Shantha NC and Decker EA, Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *J AOAC Int* **77**:421-424 (1994).
18. McDonald RE and Hultin HO, Some characteristics of the enzymic lipid peroxidation system in the microsomal fraction of flounder skeletal muscle. *Journal of Food Science* **52**:15-21 (1987).

19. Shirai N, Suzuki H and Wada S, Direct methylation from mouse plasma and from liver and brain homogenates. *Analytical Biochemistry* **343**:48-53 (2005).
20. Gliszczynska-Świąto A and Sikorska E, Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. *Journal of Chromatography A* **1048**:195-198 (2004).
21. Gray DA, Payne G, McClements DJ, Decker EA and Lad M, Oxidative stability of Echium plantagineum seed oil bodies. *European Journal of Lipid Science and Technology* **112**:741-749 (2010).
22. Konráðsdóttir F, Geirsson T, Halldórsson A, Halldórsson S and Loftsson T, Physicochemical characterization and stability of microbeads containing cod-liver oil encircled with natural cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **78**:485-499 (2014).
23. Elkin RG, Ying Y and Harvatine KJ, Feeding laying hens stearidonic acid-enriched soybean oil, as compared to flaxseed oil, more efficiently enriches eggs with very long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**:2789-2797 (2015).
24. Let MB, Jacobsen C and Meyer AS, Ascorbyl palmitate, γ -tocopherol, and EDTA affect lipid oxidation in fish oil enriched salad dressing differently. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**:2369-2375 (2007).
25. Cuvelier M-E, Bondet V and Berset C, Behavior of phenolic antioxidants in a partitioned medium: structure—Activity relationship. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **77**:819-824 (2000).
26. Krainev AG and Bigelow DJ, Comparison of 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH) and 2, 2'-azobis (2, 4-dimethylvaleronitrile)(AMVN) as free radical initiators: a spin-trapping study. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*:747-754 (1996).
27. Porter WL, Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. *Toxicology and Industrial Health* **9**:93 (1993).
28. Yoshida Y, Itoh N, Saito Y, Hayakawa M and Niki E, Application of Water-Soluble Radical Initiator, 2,2'-Azobis-[2-(2-imidazolin-2-yl)propane] Dihydrochloride, to a Study of Oxidative Stress. *Free Radical Research* **38**:375-384 (2004).
29. Snyder JM, Frankel EN, Selke E and Warner K, Comparison of gas chromatographic methods for volatile lipid oxidation compounds in soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **65**:1617-1620 (1988).
30. Sørensen ADM, Friel J, Winkler-Moser JK, Jacobsen C, Huidrom D, Reddy N and Thiyam-Holländer U, Impact of endogenous canola phenolics on the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology* **115**:501-512 (2013).
31. Grigorakis K, Giogios I, Vasilaki A and Nengas I, Effect of the fish oil, oxidation status and of heat treatment temperature on the volatile compounds of the produced fish feeds. *Animal Feed Science and Technology* **158**:73-84 (2010).
32. Gabbanini S, Matera R, Valvassori A and Valgimigli L, Rapid liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of 4-hydroxynonenal for the assessment of oxidative degradation and safety of vegetable oils. *Analytica Chimica Acta* **869**:50-58 (2015).
33. Leopoldini M, Russo N and Toscano M, The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry* **125**:288-306 (2011).
34. Shahidi F and Zhong Y, Revisiting the polar paradox theory: a critical overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**:3499-3504 (2011).
35. Genaro-Mattos TC, Maurício ÂQ, Rettori D, Alonso A and Hermes-Lima M, Antioxidant Activity of Caffeic Acid against Iron-Induced Free Radical Generation—A Chemical Approach. *PLoS One* **10**:e0129963 (2015).

36. Kittipongpittaya K, Panya A, Phonsatta N and Decker EA, Effects of Environmental pH on Antioxidant Interactions between Rosmarinic acid and α -Tocopherol in Oil-in-Water (O/W) Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**:6575-6583 (2016).
37. Branco GF and Castro IA, Optimization of oil oxidation by response surface methodology and the application of this model to evaluate antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **88**:1747-1758 (2011).
38. Van Dyck SMO, Verleyen T, Dooghe W, Teunckens A and Adams CA, Free radical generation assays: new methodology for accelerated oxidation studies at low temperature in complex food matrices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**:887-892 (2005).
39. Hsu H-C, Lee Y-T and Chen M-F, Effects of fish oil and vitamin E on the antioxidant defense system in diet-induced hypercholesterolemic rabbits. *Prostaglandins Other lipid mediators* **66**:99-108 (2001).

LEGENDS

Figure 1: Pareto chart of standardized effects. Axis Y: Fe ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), AMVN (2,2'-azobis (2,4-dimethylvaleronitrile)), Temp (Temperature), AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride)) and AP (Ascorbyl palmitate). Axis X: Standardized Effects (Absolute Value). (A) Flaxseed oil TBARS; (B) Echium oil LOOH; (C) Echium oil TBARS; (D) Fish oil LOOH; and (E) Fish oil TBARS. A p value of 0.05 was used as significant. Bars without legend represent the model's curvature. The model adjusted to hydroperoxides using flaxseed oil was not significant ($p < 0.05$).

Figure 2: Minimum values (*min*), Estimated values (see **Table 3**) expressed as area under curve (AUC), Observed values and Maximum values (*max*) of LOOH (A) and TBARS (B) found in each oil. The model adjusted to hydroperoxides using flaxseed oil was not significant ($p < 0.05$).

Figure 3: Volatile compounds total area observed for fresh (FRESH), oxidized by induction (IND) and oxidized at 60 °C/15 days (TRAD) oils: Flaxseed oil (3A), echium oil (3B) and fish oil (3C). Bars represent the mean value $\pm$ SEM.

Figure 4: Chromatogram of standards of volatile compounds diluted in MCT.

1: Hexanal; **2:** Heptanal; **3:** Octanal; **4:** (E,E)-2,4-Heptadienal; **5:** Nonenal; **6:** (E, Z)-2,6-Nonadienal; **7:** (E)-2-Nonenal; **8:** Decanal; **9:** (E,E)-2,4-Nonadienal; **10:** (E)-2-Decenal; **11:** Undecanal; **12:** (E,E)-2,4-Decadienal; **13:** (E)-2-Undecenal; **14:** Dodecanal; **15:** Oxacyclododecan-2-one; **16:** (E)-2-Dodecenal; **17:** (E)-2-Tridecenal.

Figure 5: Chromatogram of the echium oil oxidized at 60 °C/15 days (TRAD). **1:** Heptanal; **2:** 5-ethyl-2(5-H)-Furanone; **3:** Octanal; **4:** (E,E)-2,4-Heptadienal; **5:** 5-methyl-2-heptene; **6:** (E)-2-Octenal; **7:** cis-2-methyl-cyclohexanal; **8:** Nonenal; **9:** (E)-2-Nonenal; **10:** Oxacyclododecan-2-one; **11:** Decanal; **12:** (E)-2-Decenal; **13:** (Z)-2-decenal; **14:** Nonanoic acid; **15:** Undecenal; **16:** (E,E)-2,4-Decadienal; **17:** (Z)-Undecenal; **18:** Dodecanal; **19:** 2-Dodecenal; **20:** (Z)-9-Octadecenal; and **21:** (E)-2-Tridecenal.

Table 1. Inductors of oxidation and their range of variation.

Factors	Description	Range of variation		
		-1	0	+1
F1	Temperature (°C)	30	40	50
F2	Fe ⁺² (mMol) ¹	0	1.0	2.0
F3	Hydrophilic Azo Inductor (%) ²	0	0.5	1.0
F4	Ascorbyl palmitate (mMol) ¹	0	1.0	2.0
F5	Lipophilic Azo Inductor (%) ²	0	0.5	1.0

¹FeSO₄ 7 H₂O and Ascorbyl palmitate, according to Branco and Castro (2011)³⁷.

²2,2',-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) and 2,2'-azobis (2,4-dimethylvaleronitrile (AMVN) according to Van Dyck et al. (2005)³⁸.

Table 2. Coded and real values obtained to the inductors level after optimization of LOOH and TBARS markers. Desirability (%) and estimated values obtained by the respective models.

Inductors	Oils		
	Flaxseed	Echium	Fish
F1	0.0	+1.0	0.0
F2	+1.0	+0.7	+1.0
F3	+1.0	0.0	-1.0
F4	+0.1	+0.3	0.0
F5	+1.0	+1.0	-1.0
Temperature (°C)	40°C	50°C	40°C
Fe ⁺² (mMol)	2.00 mMol	1.74 mMol	2.00 mMol
Azo Inductor AAPH (%)	1.0%	0.5%	-
Ascorbyl palmitate (mMol)	1.15 mMol	1.26 mMol	1.00 mMol
Azo Inductor AMVN (%)	1.0%	1.0%	-
Desirability (%)	41.70	48.30	48.22
LOOH Value (AUC) ¹	1,361.5	1,649.7	2,262.2
TBARS Value (AUC) ¹	5,586.1	5,930.6	5,080.3

¹ Values estimated by the respective model :

TBARS (AUC for Flaxseed oil) = 2.557.82 + 2.279.77 (Curvature) + 1.447.28 (F2) + 188.28 (F3) + 240.44 (F4) + 1.054.35 (F5) + 358.80 (F1 x F2) - 357.33 (F1 x F3) - 167.75 (F1 x F4) - 216.34 (F1 x F5) - 135.38 (F2 x F5) - 129.94 (F2 x F4) + 333.99 (F2 x F5) + 113.24 (F3 x F4) = 176.39 (F3 x F5). $R^2=0.99939$; $R^2Adj:0.99727$. Lack of fit p value = 0.466.

LOOH (AUC for Echium oil) = 1157.47 + 623.39 (Curvature) + 145.27 (F1) + 89.57 (F2) + 148.10 (F3) + 125.00 (F4) + 424.97 (F5) - 61.12 (F1 x F2) - 59.62 (F1 x F5) 239.82 (F2 F3) - 133.80 (F2 x F5) - 81.23 (F3 x F5). $R^2=0.99181$; $R^2Adj:0.97895$. Lack of fit p value = 0.142.

TBARS (AUC for Echium oil) = 2821.50 + 2370.54 (Curvature) + 743.48 (F1) + 1061.85 (F2) + 1521.09 (F5) - 309.40 (F1 x F2) + 392.15 (F2 x F5) - 593.78 (F3 x F4). $R^2=0.9747$; $R^2Adj:0.9586$. Lack of fit p value = 0.195.

LOOH (AUC for Fish oil) = 1835.33 - 1374.03 (Curvature) - 186.89 (F5) - 118.76 (F1 x F2) - 196.52 (F1 x F3) - 161.88 (F1 x F4) - 166.75 (F2 x F3) - 240.72 (F2 x F4) - 248.33 (F3 x F4). $R-sqr=0.97358$; $Adj:0.95245$. Lack of fit p value = 0.285.

TBARS (AUC for Fish oil) = 3669.97 + 2070.91 (Curvature) + 1925.77 (F2) - 264.96 (F3) + 666.86 (F5) + 184.43 (F1 x F4) + 132.93 (F1 x F5) + 205.17 (F2 x F3) - 248.79 (F2 x F5) - 171.56 (F3 x F5). $R^2=0.99408$; $R^2Adj:0.98816$. Lack of fit p value = 0.160.

Table 3. Chemical markers (lipid hydroperoxydes and TBARS), tocopherol, fatty acids and some volatile compounds detected in the fresh oils (FRESH), oils oxidized after optimized induction (IND) and oils heated at 60°C/15 days (TRAD).

Chemical markers ¹	Flaxseed oil			Echium oil			Fish oil		
	Fresh	IND	TRAD	Fresh	IND	TRAD	Fresh	IND	TRAD
LOOH (meq/Kg) ¹	2.13 ^a ± 0.08	40.81 ^b ± 0.49	48.54 ^c ± 0.01	3.75 ^a ± 0.04	45.4 ^b ± 2.31	49.12 ^b ± 0.11	9.11 ^a ± 1.24	41.39 ^b ± 0.26	55.07 ^c ± 0.06
TBARS (mg/L)	5.06 ^a ± 0.01	118.30 ^b ± 0.01	10.20 ^c ± 0.15	5.39 ^a ± 0.32	111.62 ^b ± 0.84	24.68 ^b ± 0.27	9.57 ^a ± 0.40	113.23 ^b ± 0.53	115.37 ^c ± 0.67
α-tocopherol (mg/Kg)	25.47 ± 13.56	nd	nd	139.09 ± 0.43	nd	nd	181.08 ± 2.38	nd	nd
λ-tocopherol (mg/Kg)	358.52 ± 5.73	nd	nd	1016.44 ^a ± 0.43	45.49 ^b ± 0.30	114.52 ^c ± 0.26	6.53 ± 0.41	nd	nd
Δ-tocopherol (mg/Kg)	12.69 ± 1.00	nd	nd	439.78 ^a ± 0.41	63.49 ^b ± 0.11	249.85 ^c ± 0.08	10.19 ± 0.64	nd	nd
Total tocopherol (mg/Kg)	396.68 ± 19.72	nd	nd	1595.31 ^a ± 1.12	109.08 ^b ± 0.41	364.37 ^c ± 0.34	197.80 ± 2.96	nd	nd
Fatty acids (mg/5 mg oil)									
C14:0	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	nd	nd	nd	0.20 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.17 ± 0.01
C14:1 n7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.01 ± 0.00
C15:0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00
C16:0	0.40 ± 0.03	0.38 ± 0.00	0.43 ± 0.01	0.39 ± 0.01	0.42 ± 0.04	0.41 ± 0.01	0.65 ± 0.02	0.64 ± 0.04	0.60 ± 0.03
C16:1 n7	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	nd	nd	nd	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
C16:1 n9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.29 ± 0.02	0.32 ± 0.03	0.24 ± 0.01
C17:0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
C17:1 n7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
C18:0	0.26 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.00	0.22 ± 0.01	0.25 ± 0.03	0.23 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.18 ± 0.3
C18:1 n9 cis	1.18 ± 0.06	0.95 ± 0.01	1.16 ± 0.03	0.63 ± 0.03	0.70 ± 0.05	0.72 ± 0.04	0.69 ± 0.04	0.71 ± 0.07	0.54 ± 0.01
C18:1 n9 trans	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.13 ± 0.00
C18:2 n6 trans	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
C18:2 n6 cis (LNA)	0.94 ± 0.05	0.60 ± 0.01	0.89 ± 0.03	0.64 ± 0.03	0.66 ± 0.05	0.70 ± 0.04	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.02
C18:3 n6 (GLA)	nd	nd	nd	0.46 ± 0.03	0.48 ± 0.04	0.48 ± 0.02	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	nd
C18:3 n3 (ALA)	1.71 ± 0.09	1.29 ± 0.03	1.56 ± 0.05	1.27 ± 0.07	1.37 ± 0.11	1.33 ± 0.07	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.01
C18:4 n3 (SDA)	nd	nd	nd	0.56 ± 0.02	0.53 ± 0.05	0.55 ± 0.03	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.04 ± 0.00
C20:0	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	nd	0.01 ± 0.00	nd	nd	nd
C20:1 n9	0.01 ± 0.00	nd	0.01 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.36 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.19 ± 0.09
C20:2 n6 (EDA)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	nd
C20:4 n6 (ARA)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00
C20:3 n3 (ETA)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.02 ± 0.00	nd	0.01 ± 0.00
C20:5 n3 (EPA)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.38 ± 0.02	0.37 ± 0.04	0.10 ± 0.00
C22:0	0.01 ± 0.00	nd	0.01 ± 0.00	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C22:1 n9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.34 ± 0.02	0.38 ± 0.02	nd
C22:5 n3 (DPA)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.01 ± 0.00
C24:0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C22:6 n3 (DHA)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.42 ± 0.02	0.41 ± 0.04	0.09 ± 0.01
C24:1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	nd
PI ²	95.00			122.63			105.35		
Volatiles (μg/g oil)									
Hexanal	nd	nd	nd	17.03 ± 1.15	11.89 ± 0.01	11.90 ± 0.01	nd	nd	nd
Heptanal	nd	nd	190.33 ± 80.00	2.54 ± 0.49	2.05 ± 0.00	75.33 ± 73.28	2.00 ± 0.00	12.91 ± 10.86	32.77 ± 0.01
Octanal	nd	nd	22.87 ± 1.34	nd	nd	20.76 ± 0.82	nd	nd	nd
(E,E)-2,4-Heptadienal	11.57 ± 0.39	15.71 ± 4.54	11.18 ± 0.01	11.94 ± 0.77	23.20 ± 3.31	11.18 ± 0.00	12.93 ± 1.12	11.18 ± 0.01	11.00 ± 0.01
Nonanal	nd	nd	264.70 ± 0.90	nd	nd	281.41 ± 54.88	nd	18.73 ± 0.01	53.39 ± 0.01
(E,Z)-2,6-Nonadienal	0.02 ± 0.02	2.34 ± 0.49	nd	nd	1.29 ± 0.41	nd	nd	nd	nd
(E)-2-Nonenal	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.16 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.14 ± 0.04	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.09 ± 0.03
Decanal	53.46 ± 26.73	nd	82.84 ± 1.59	nd	nd	87.47 ± 22.29	nd	10.75 ± 8.51	46.98 ± 22.42
(E,E)2,4-Nonadienal	52.30 ± 10.43	33.36 ± 1.92	31.44 ± 0.01	32.28 ± 0.83	31.44 ± 0.00	31.00 ± 0.00	33.14 ± 0.36	34.52 ± 2.73	31.44 ± 0.01
(E)-2-Decenal	13.03 ± 6.31	nd	nd	nd	nd	nd	0.41 ± 0.00	0.63 ± 0.21	0.71 ± 0.30
Undecanal	11.02 ± 5.27	0.48 ± 0.01	67.62 ± 3.94	0.48 ± 0.01	0.49 ± 0.00	113.75 ± 76.48	0.49 ± 0.00	1.63 ± 0.62	30.55 ± 28.18
(E,E) 2,4-Decadienal	1.34 ± 0.26	0.81 ± 0.01	1.22 ± 0.05	0.81 ± 0.00	0.82 ± 0.01	1.16 ± 0.04	0.81 ± 0.00	1.00 ± 0.19	0.98 ± 0.10
(E)-2-Undecenal	23.76 ± 9.22	41.68 ± 0.52	211.25 ± 16.07	41.51 ± 0.14	41.92 ± 0.27	197.46 ± 161.6	39.63 ± 0.22	14.06 ± 0.01	23.09 ± 0.01
Dodecanal	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Oxacyclododecan-2-one	0.67 ± 0.00	0.68 ± 0.00	5.38 ± 1.23	0.66 ± 0.00	0.67 ± 0.00	3.88 ± 1.59	0.66 ± 0.00	0.67 ± 0.00	2.81 ± 1.13
(E)-2-Tridecenal	nd	nd	nd	1.89 ± 0.00	1.87 ± 0.00	27.53 ± 11.23	1.87 ± 0.00	2.39 ± 0.26	8.34 ± 5.61
(E)-2-Dodecenal	18.98 ± 5.93	30.83 ± 0.01	nd	30.24 ± 0.60	30.19 ± 0.64	nd	27.81 ± 3.02	10.28 ± 0.01	14.70 ± 0.01
Total volatile (μg/g oil)	186.22	125.94	887.20	139.43	145.88	862.97	119.80	118.81	256.85

¹Hydroperoxide concentration: mmol/L = ½ meq/Kg oil.

²Peroxidability index (PI) calculated according to Hsu et al. (2001)³⁹.

³Values followed by the same upperscript letter do not differ (p<0.05).

Table 4. Effect of the phenolic compounds on lipid hydroperoxides and TBARS expressed as area under de curve (AUC) measured in each oil oxidized by optimized inductors.

Oil	Phenolics ¹	LOOH (AUC)	TBARS (AUC)
Flaxseed	CONT	1700.35 ± 5.46	5514.62 ± 75.28
Flaxseed	SIN	1796.42 ± 109.38	5612.60 ± 29.80
Flaxseed	RUT	1878.51 ± 106.68	5601.77 ± 1.59
<i>p</i> ²	-	0.459	0.390
Echium	CONT	2089.64 ± 57.14	5143.06 ± 321.73
Echium	SIN	2141.61 ± 35.44	5268.79 ± 259.61
Echium	RUT	2183.97 ± 6.43	5562.72 ± 127.30
<i>p</i> ²	-	0.360	0.547
Fish	CONT	1834.02 ± 79.86	5311.21 ± 9.15 ^a
Fish	SIN	1983.17 ± 75.92	5196.04 ± 33.51 ^a
Fish	RUT	1725.76 ± 62.74	5011.11 ± 3.16 ^b
<i>p</i> ²	-	0.185	0.004

¹Sinapic acid (SIN) at 200 ppm, rutine (RUT) at 200 ppm and without phenolics (CONT)

²Probability value obtained by ANOVA. Values followed by the same upperscript letter do not differ (*p*<0.05).

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5