



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

DISSERTAÇÃO

**Efeito protetor do fruto da aroeira (*Schinus terebinthifolius*
Raddi) sobre a foto-oxidação do colesterol e ácidos graxos poli-
insaturados em sistemas modelo contendo óleo de sardinhas
(*Sardinella brasilliensis*)**

Jônathas de Souza Vieira

2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**EFEITO PROTETOR DOS FRUTOS DA AROEIRA (*Schinus
terebinthifolius*) SOBRE A FOTO-OXIDAÇÃO DO
COLESTEROL E ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS EM
SISTEMAS MODELO CONTENDO ÓLEO DE SARDINHAS
(*Sardinella brasiliensis*)**

JÔNATHAS DE SOUZA VIEIRA

Sob a Orientação da Professora

Dra. Tatiana Saldanha

e Co-orientação do Professor

Dr. Ormino Gamallo

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ

Maio de 2021

Ficha catalográfica

V657e Vieira, Jônathas de Souza, 1989 Efeito protetor do fruto da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) sobre a foto-oxidação do colesterol e ácidos graxos poli-insaturados em sistemas modelo contendo óleo de sardinhas (*Sardinella brasilliensis*). / Jônathas de Souza Vieira. Seropédica, 2021.
144 f.: il.

Orientadora: Tatiana Saldanha.
Coorientador: Ormindo Domingues Gamallo.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2021.

1. *Schinus terebinthifolius* Raddi. 2. Óleo de pescado. 3. Foto-oxidação. I. Saldanha, Tatiana, 1971 , orient. II. Gamallo, Ormindo Domingues, 1972-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



TERMO Nº 780/2021 - PPGCTA (12.28.01.00.00.00.41)

Nº do Protocolo: 23083.051161/2021-27

Seropédica-RJ, 16 de julho de 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

JONATHAS DE SOUZA VIEIRA

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre, no Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 22/06/2021

Dra. TATIANA SALDANHA, UFRRJ
(orientadora)

Dra. ALEXANDRA H. F. SAWAYA, UNICAMP

Dra. ELIANE TEIXEIRA MARSICO, UFF

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020.

Documento não acessível publicamente

(Assinado digitalmente em 19/07/2021 16:25)

TATIANA SALDANHA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DTA (12.28.01.00.00.00.46)
Matrícula: 2563412

(Assinado digitalmente em 30/07/2021 10:32)

ELIANE TEIXEIRA MARSICO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 709.453.657-72

(Assinado digitalmente em 16/07/2021 13:32)

ALEXANDRA CHRISTINE HELENA FRANKLAND
SAWAYA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 011.116.878-38

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **780**, ano: **2021**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **16/07/2021** e o código de verificação: **59a1613116**

DEDICATÓRIA

Finalmente este dia chegou, mas não pude ligar para compartilhar com você esse momento. Você se foi muito rápido, embora eu gostaria que você fosse eterno. Você abriu mão dos seus sonhos e lutou todos os dias para que pudéssemos alcançar nossos sonhos, nos ensinou sobre o amor, a bondade, a união, a persistência e sempre esteve ao nosso lado com os braços abertos.

Você sempre encarou todas as dificuldades como se fossem aventuras a serem enfrentadas, e observando todo seu esforço, eu aprendi que nada é impossível de ser realizado ou alcançado. Você me ensinou a amar as pessoas, a natureza e os animais. Falando em animais, você nos ensinou a criar coelhos, porquinhos da índia, hamster, gatos, cachorros, passarinhos, peixes e até um tatu. Em 2010 você me trouxe para o Rio de Janeiro todo feliz pois seu filho estava vindo estudar Medicina Veterinária, sabíamos que estaríamos longe e que seria difícil, mas seu menininho estava virando um homem e embora eu estivesse com o medo da distância, sabia que teria você me apoiando o tempo todo.

Obrigado por ter acreditado nos meus sonhos e por estar ao meu lado me apoiando a qualquer momento. O tempo que compartilhei com você sempre será eterno, minhas últimas memórias são do começo desse ano, quando eu estava pintando seu cabelo pela primeira vez e nós estávamos rindo muito porque estava ficando muito preto, então sugeri pintar suas sobrancelhas também e começamos a chorar de rir, tanto que a barriga até doeu, foi um momento incrível né?!

Meu lindo pai, gostaria de dedicar todo o esforço deste trabalho exclusivamente a você, pensar em tudo que você fez por mim me deu forças para finalizar este trabalho, mesmo nesse momento tão difícil. Espero que você receba esse agradecimento e dedicação aí no céu, sei que você deve estar muito orgulhoso. Sempre vou te amar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe Marta, minha irmã Vitória e meus irmãos Willians e Matheus por todo o apoio e incentivo para que eu pudesse realizar este mestrado, sei que não é fácil estar longe por tanto tempo. Obrigado por serem essa família tão linda e incrível, amo vocês!

Também agradeço aos meus orientadores Tatiana Saldanha e Ormino Gamallo pela orientação, paciência, incentivo e por ter direcionado meu caminho durante esta jornada.

Agradeço aos colegas de laboratório Ivanildinha, Fernanda, Maíra, Laura e Vavá pelos ensinamentos de suas experiências para o desenvolvimento deste estudo, pelo apoio e palavras de incentivo.

Ao meu companheiro Paulo Henrique Barbosa gostaria de agradecer por estar sempre ao meu lado me apoiando em todos os momentos, você é meu porto seguro.

Agradeço minha família PANAFTOSA-OPS/OMS pelas palavras que me encorajaram, pelo apoio e carinho, especialmente à Margarita Corrales e a Simone Raszl, não tenho palavras para agradecer o tanto vocês que me apoiaram ao longo dos anos que passamos juntos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

VIEIRA, Jônathas de Souza. **Efeito protetor dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius*) sobre a foto-oxidação do colesterol e ácidos graxos poli-insaturados em sistemas modelo contendo óleo de sardinhas (*sardinella brasiliensis*)**. 144p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

As sardinhas são constantemente caracterizadas como alimento de alto valor nutricional devido ao elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados EPA e DHA, entretanto, contêm concentrações apreciáveis de colesterol. A radiação ultravioleta, derivada da exposição destes compostos à luz fluorescente, promove a degradação e formação de compostos oxidados, comprometendo a qualidade nutricional e a segurança destes alimentos. Desta forma, torna-se imprescindível a busca por fontes alternativas de antioxidantes naturais que minimizem os processos foto-oxidativos e atendam a demanda dos consumidores por alimentos isentos de aditivos sintéticos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito protetor dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em três níveis de adição (1%, 2% e 3%) frente à oxidação lipídica em sistemas modelo contendo óleo de sardinhas expostos à radiação ultravioleta durante 15, 30, 45 e 60 dias, além do controle. Os frutos foram previamente caracterizados, nos quais determinou-se a presença de ácidos graxos essenciais e compostos bioativos. Compostos bioativos como os compostos fenólicos totais ($5,05 \pm 0,19$ mg GAE/g), flavonóides totais ($4,16 \pm 0,11$ mg EQ/g) e carotenóides totais ($25,42 \pm 0,48$ μ g/g) foram determinados e compostos como o ácido masticadienóico (m/z 453), tetraidroamentoflavona (m/z 541), agatisflavona (m/z 537), hikinoflavona (m/z 539) e 7-O-metilpelargonidina 3-O-galactosídeo (m/z 447) foram identificados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. A atividade antioxidante dos frutos da aroeira foi constatada em análises *in vitro*. O ensaio de sequestro de radicais livres (DPPH) determinou $84,45 \pm 1,61\%$ de inibição oxidativa para o extrato dos frutos, enquanto a determinação do poder de redução do ferro (FRAP) apresentou um valor de $121,54 \pm 1,31$ μ mol Fe²⁺/g. Para determinação da oxidação lipídica, identificou-se a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e alterações na composição dos ácidos graxos e colesterol, quantificando-se a formação de produtos da oxidação do colesterol (POCs). A exposição à luz fluorescente acarretou constante queda do conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) e o aumento do teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) e POCs durante os 60 dias de exposição. O conteúdo de AGPIs teve uma redução que variou entre 65,60 e 89,10% nas amostras controle (sem adição de antioxidantes) ao longo dos 60 dias de exposição à luz fluorescente. Entretanto, a adição dos frutos da aroeira minimizou a degradação dos AGPIs, indicando uma variação do percentual de degradação entre 58,36 e 80,93% ao longo dos 60 dias de exposição. A exposição do óleo sem antioxidantes à luz fluorescente durante 60 dias reduziu o conteúdo de colesterol em 61,86%, observando-se um aumento no conteúdo de POCs totais de $61,54 \pm 0,04$ para $2013,84 \pm 12,86$ μ g/g de óleo. No entanto, o tratamento com os frutos da aroeira apresentou efeito protetor de 21,55, 25,94 e 34,77% para as adições de 1, 2 e 3%, respectivamente. O antioxidante sintético apresentou maior ação protetora frente a foto-oxidação dos óleos de sardinha, embora o efeito protetor dos frutos da aroeira não apresentou diferenças significativas em relação ao BHT, sugerindo que o emprego dos mesmos como antioxidantes naturais pode ser uma alternativa em detrimento aos sintéticos, ajudando a preservar os aspectos nutricionais e a segurança do óleo de sardinhas.

Palavras-chave: *Schinus terebinthifolius* Raddi, óleo de pescado, foto-oxidação.

ABSTRACT

VIEIRA, Jônathas de Souza. **The protective effect of aroeira fruits (*Schinus terebinthifolius*) on the photo-oxidation of cholesterol and polyunsaturated fatty acids in model systems containing sardine oil (*sardinella brasiliensis*).** 144p. Dissertation (Master in food science and Technology). Institute of Technology, Food Technology Department, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Sardines are constantly characterized as food of high nutritional value due to the high content of polyunsaturated fatty acids EPA and DHA, however, they contain appreciable concentrations of cholesterol. Ultraviolet radiation, derived from the exposure of these compounds to fluorescent light, promotes their degradation and formation of oxidized compounds, compromising the nutritional quality and safety of these foods. Thus, it is essential to search for alternative sources of natural antioxidants that minimize photo-oxidative processes and meet consumer demand for foods that are free of synthetic additives. The objective of this study was to evaluate the protective effect of aroeira fruits (*Schinus terebinthifolius* Raddi) at three levels of addition (1%, 2% and 3%) against lipid oxidation in model systems containing sardine oil exposed to ultraviolet radiation for 15, 30, 45 and 60 days, beyond control. The fruits were previously characterized, where the presence of essential fatty acids and bioactive compounds was determined. Bioactive compounds such as total phenolics (5.05 ± 0.19 mg GAE / g), total flavonoids (4.16 ± 0.11 mg EQ / g) and total carotenoids (25.42 ± 0.48 μ g / g) were determined and composed as masticadienic acid (m/z 453), tetrahydroamentoflavone (m/z 541), agathisflavone (m/z 537), hikinoflavone (m/z 539) and 7-O-methylpelargonidin 3-O-galactoside (m/z 447) were identified by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. The antioxidant activity of aroeira fruits was verified in in vitro analyzes. Free radical scavenging test (DPPH) determined $84.45 \pm 1.61\%$ of oxidative inhibition for the fruit extract, while the determination of the iron reduction power (FRAP) presented a value of 121.54 ± 1.31 μ mol Fe²⁺/g. To determine lipid oxidation, the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and changes in the composition of fatty acids and cholesterol were identified, quantifying the formation of cholesterol oxidation products (COPs). Exposure to fluorescent light led to a constant drop in the content of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and an increase in the content of substances reactive to thiobarbituric acid (TBA) and COPs during the 60 days of exposure. The content of PUFAs decreased between 65.60 and 89.10% in the control samples (without the addition of antioxidants) over the 60 days of exposure to fluorescent light. However, the addition of aroeira fruits minimized the degradation of PUFAs, indicating a variation in the percentage of degradation between 58.36 and 80.93% over the 60 days of exposure. Exposure of oil without antioxidants to fluorescent light for 60 days reduced the cholesterol content by 61.86%, with an increase in the total COP content of 61.54 ± 0.04 for 2013.84 ± 12.86 μ g/g of oil. However, the treatment with aroeira fruits showed a protective effect of 21.55, 25.94 and 34.77% for the additions of 1, 2 and 3%, respectively. The synthetic antioxidant showed a greater protective action against the photo-oxidation of sardine oils, although the protective effect of aroeira fruits did not show significant differences in relation to BHT, suggesting that their use as natural antioxidants may be an alternative to the detriment of synthetics, helping to preserve the nutritional aspects of sardine oil and ensuring that the product is safe.

Key words: *Schinus terebinthifolius* Raddi, fish oil, photo-oxidation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proximate composition of pink pepper.	26
Tabela 2: Fatty acids profile of pink pepper reported in the literature.....	27
Tabela 3: Total contents of different classes of compounds determined in pink pepper.	31
Tabela 4: Terpenes present in the essential oil in pink pepper.....	41
Tabela 5: Antioxidant capacity of pink pepper.	47
Tabela 6: Recent applications of pink pepper in food systems.	52
Tabela 7: Capacidade antioxidante e determinação de bioativos presentes nos frutos da aroeira.....	69
Tabela 8: Identificação de compostos bioativos dos aroeira por UHPLC-ESI-MS/MS.	76
Tabela 9: Valores de TBARS (g MDA/100g de óleo) dos diferentes tratamentos.	78
Tabela 10: Composição de ácidos graxos das amostras de óleo (g/100g de amostra).....	84
Tabela 11: Colesterol (mg/100 g de óleo) e níveis de óxidos de colesterol (µg/g de óleo) dos óleos..	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sardinha verdadeira (<i>Sardinella brasiliensis</i>)	5
Figura 2: Mecanismo geral de oxidação lipídica.	7
Figura 3: Estrutura química do colesterol livre.....	9
Figura 4: Esquema da formação dos óxidos de colesterol por via enzimática e não enzimática.....	10
Figura 5: Mecanismos de formação de alguns óxidos de colesterol durante a auto-oxidação.....	11
Figura 6: Foto-oxidação lipídica do Tipo I e II.....	13
Figura 7: Caminhos de foto-oxidação do colesterol	15
Figura 8: Folhas e frutos da aroeira (<i>Schinus terebinthifolius</i> RADDI).	19
Figura 9: Inibição da formação de TBRAS nos diferentes tratamentos com antioxidantes.....	79
Figura 10: Degradação de AGPIs nos diferentes tratamentos expostos à radiação	81
Figura 11: Cinética de degradação do ácidos graxos presentes nos óleos controle	82
Figura 12: Porcentagem de degradação do colesterol para os diferentes tratamentos.	86
Figura 13: Razão de oxidação do colesterol das amostras de óleo de sardinha.	92
Figura 14: Concentração de POCs totais ($\mu\text{g/g}$ de óleo) nos diferentes tratamentos.	93
Figura 15: Capacidade protetora dos antioxidantes contra a formação de POCs.....	93
Figura 16: Cinética de degradação do colesterol e de formação de POCs.....	96

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAE	Acid Ascorbic Equivalent
AGMI	Ácido graxo monoinsaturado
AGPI	Ácido graxo poli-insaturado
AGS	Ácido graxo saturado
BHA	Butilidroxianisol/Butylhydroxyanisole
BHT	Butilidroxitolueno/Butylhydroxytoluene
CCE	Cyanidin Chloride Equivalent
CID	Collision-induced Dissociation
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COP	Cholesterol Oxidation Products
DHA	Ácido docosaexaenóico/Docosahexaenoic acid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DPPH	2,2-difenill-1-picril-hidraliza
DW	Dry Weight
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Ácido eicosapentaenoico/Eicosapentaenoic acid
EQ	Equivalente Quercetina
ERO	Espécie Reativa do Oxigênio
ESI	Electrospray Ionization/ Ionização por Eletrospray
FAME	Fatty acid methyl ester
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FID	Flame Ionization Detector/Detector por Ionização de Chama
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power/Poder Antioxidante Redutor Férrico
FTMS	Fourier-Transform Mass Spectrometry
GAE	Gallic Acid Equivalent/ Equivalente Ácido Gálico
GC	Gas chromatography
GP	Galato de propila
HAT	Hydrogen Atom Transfer
HPLC	High Performance Liquid Chromatography/
IU	International Unit
LC	Liquid chromatography
MDA	Malonaldeído
MS	Mass Spectrometry
MUFA	Monounsaturated Fatty Acids
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PDA	Photo Diode Array
PG	Propyl gallate
POC	Produto da Oxidação do Colesterol
PPM	Partes por milhão
PR	Pimenta Rosa
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acid

QE	Quercetin Equivalent
RE	Rutin Equivalent
ROS	Reactive oxygen species
SET	Single Electron Transfer
SFA	Saturated Fatty Acids
SIM	Selected Ion Monitoring
TAE	Tannic Acid Equivalent
TBA	Ácido tiobarbitúrico/ Thiobarbituric acid
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TBHQ	Terc-butildidroquinona / Tert-butylhydroquinone
TCA	Ácido tricloroacético
TE	Trolox Equivalent
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TEP	1,1,3,3-tetraetoxipropano
UFLC	Ultra-Fast Liquid Chromatography
UFLC	Ultra-Fast Liquid Chromatography
UHPLC	High Performance Liquid Chromatography
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Ultravioleta
$\omega 3$ / n3	Ômega 3
$\omega 6$ / n6	Ômega 6
$\omega 9$ / n9	Ômega 9
C12:0	Ácido láurico
C14:0	Ácido mirístico
C15:0	Ácido pentadecanóico
C16:0	Ácido palmítico
C17:0	Ácido margárico
C18:0	Ácido esteárico
C20:0	Ácido araquídico
C14:1 cis	Ácido miristoléico
C16:1 cis	Ácido palmitoleico
C17:1	Ácido margaroleico
C18:1 $\omega 6$ t	Ácido elaidico
C18:1 $\omega 9$ cis	Ácido oléico
C20:1 $\omega 9$	Ácido eicosenóico
C22:1 $\omega 9$	Ácido erúcico
C24:1 $\omega 9$	Ácido nervônico
C18:2 $\omega 6$ t	Ácido linolelaídico
C18:2 $\omega 6$ cis	Ácido linoléico
C18:3 $\omega 6$	Ácido γ -Linolênico
C18:3 $\omega 3$	Ácido α -Linolênico
C20:2 $\omega 6$	Ácido eicosadienóico
C20:3 $\omega 6$	Ácido di-homo- γ -linolênico
C20:3 $\omega 3$	Ácido di-homo- α -linonênico
C20:4 $\omega 6$	Ácido araquidônico
C20:5 $\omega 3$	Ácido eicosapentaenóico

C22:6 ω 3	Ácido docosaexaenóico
20 α -OH	20 α -hidroxicolesterol
22S-OH	22S-hidroxicolesterol
25-OH	25-hidroxicolesterol
5,6 α -Ep	5,6 α -epoxicolesterol
5,6 β -Ep	5,6 β -epoxicolesterol
7-ceto	7-cetocolesterol
7 α -OH	7 α -hidroxicolesterol
7 β -OH	7 β -hidroxicolesterol

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	4
REVISÃO DE LITERATURA	5
1 Sardinha verdadeira (<i>Sardinella brasiliensis</i>)	5
2 Mecanismo de oxidação lipídica.....	6
3 Mecanismo de oxidação do colesterol.....	8
4 Mecanismo de foto-oxidação.....	12
5 Antioxidantes.....	16
6 Fruto da aroeira (<i>Schinus terebinthifolius</i> RADDI)	18
6.1 Aroeira.....	18
6.2 Emprego alimentar.....	20
CAPÍTULO I – Artigo de revisão: Pink Pepper or Aroeira Fruit (<i>Schinus Terebinthifolius</i> Raddi): Chemical Composition, Bioactive Compounds, Antioxidant Activity and Application in Food Systems	
ABSTRACT	23
1 INTRODUCTION	24
2. CHEMICAL COMPOSITION	25
2.1. Macro components.....	25
2.2. Fatty acid composition.....	27
2.3. Phytosterols.....	30
2.4 Bioactive compounds in pink pepper.....	31
2.4.1. Phenolic compounds.....	35
2.4.1.1. Phenolic acids.....	36
2.4.1.2. Flavonoids.....	37
2.4.1.3. Biflavonoids.....	38
2.4.1.4. Anthocyanins.....	39
2.4.1.5. Tannins.....	40
2.4.1.6. Other phenolics.....	41
2.4.2. Terpenes.....	41
3 ANTIOXIDANT CAPACITY	46
3.1. The antioxidant capacity evaluated by in vitro assays.....	49

4. APPLICATION OF PINK PEPPER AS A NATURAL ANTIOXIDANT IN FOOD SYSTEMS.....	52
5. CONCLUSION.....	56

CAPÍTULO II - Efeito protetor do fruto da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) sobre a foto-oxidação do colesterol e ácidos graxos poli-insaturados em sistemas modelo contendo óleo de sardinhas (*Sardinella brasilliensis*)

1 INTRODUÇÃO.....	59
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
2.1 Padrões, reagentes e solventes.....	61
2.2 Fruto da aroeira.....	61
2.3 Compostos bioativos e atividade antioxidante.....	62
2.3.1 Preparo do extrato da fruta aroeira.....	62
2.3.2 Compostos Fenólicos Totais.....	62
2.3.3 Flavonoides Totais.....	63
2.3.4 Carotenoides Totais.....	63
2.3.5 Ensaio antioxidante de determinação do poder de redução ferro (FRAP).....	63
2.3.6 Ensaio de sequestro de radicais livres (DPPH)	64
2.4 Identificação de compostos bioativos por UHPLC-ESI-MS.....	64
2.5 Extração do óleo de sardinhas.....	65
2.6 Sistema modelo: preparo e exposição de amostras à foto-oxidação.....	65
2.7 Ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs).....	66
2.8 Composição de ácidos graxos.....	66
2.9 Colesterol e óxidos de colesterol.....	67
2.10 Análise estatística.....	67
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
3.1 Atividade antioxidante do extrato dos frutos da aroeira (<i>in vitro</i>).....	68
3.1.1 DPPH.....	68
3.1.2 FRAP.....	70
3.2 Compostos bioativos.....	71
3.2.1 Fenólicos totais.....	71
3.2.2 Flavonóides totais.....	72
3.2.3 Carotenóides totais.....	73
3.2.4 Identificação de compostos bioativos por UHPLC-ESI-MS.....	73

3.3 Efeito protetor dos frutos da aroeira sobre a formação TBARS após a foto-oxidação.....	77
3.4 Efeito protetor dos frutos da aroeira sobre os teores de AGs após a foto-oxidação.....	80
3.5 Efeito protetor dos frutos da aroeira sobre a degradação do colesterol após a fotooxidação.....	85
3.6 Efeito protetor dos frutos da aroeira sobre a formação de óxidos de colesterol após a fotooxidação.....	89
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
ANEXOS.....	118

INTRODUÇÃO GERAL

O pescado marinho é parte importante da alimentação humana, sendo que a Sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) se destaca por ser o peixe mais capturado, comercializado e consumido no Brasil. De acordo com o último Boletim Estatístico de Pesca, publicado oficialmente no ano de 2011, o volume de captura no país foi de 75.122 toneladas, resultando em um acréscimo de 21% em relação ao ano anterior, quando foram produzidas 62.134 toneladas.(BRASIL, 2011).

Além de ser um peixe de baixo custo, do ponto de vista nutricional as sardinhas-verdadeiras contêm proteínas de elevado valor biológico, vitaminas lipossolúveis (A e D), minerais como cálcio, fósforo, ferro, cobre e selênio. Sua composição lipídica apresenta altos teores de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) da série ômega-3, especialmente os ácidos eicosapentaenóico (EPA, 20:5 ω 3) e docosaexaenoico (DHA, 22:6 ω 3) (MARTINS et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2020). Estes compostos estão relacionados com efeitos benéficos à saúde, como prevenção de embolia, hiperglicemia, hipertensão, acidente vascular cerebral, doenças autoimunes, doenças cardíacas, alguns tipos de câncer e transtornos do sistema nervoso central, além da supressão do processo inflamatório e de possuírem um papel benéfico em uma variedade de doenças, incluindo diabetes, aterosclerose, asma, psoríase, artrite reumatoide, colites e processos alérgicos (GUINÉ; HENRIQUES, 2011; YAN et al., 2013; CALDER, 2015; HAIMEUR et al., 2016; ROSA et al., 2017; PIZATO et al., 2018; SAWADA; SAITO-SASAKI; NAKAMURA, 2021).

A composição lipídica dos peixes é variável e depende de fatores como a espécie, idade, sexo, alimentação, variações sazonais, comportamento migratório, época de desova e local de captura (GONÇALVES et al., 2020). Ainda que os altos teores de AGPIs tornem a sardinha-verdadeira um alimento saudável do ponto de vista nutricional, estes compostos estão propensos à oxidação durante a estocagem, devido a inúmeras insaturações na cadeia carbônica que reagem facilmente com o oxigênio atmosférico e desencadeiam uma série de modificações físico-químicas que alteram a qualidade nutricional do peixe, gerando compostos tóxicos (VITORIANO et al. 2019).

Além de ácidos graxos da família ômega-3, as sardinhas contêm concentrações consideráveis de colesterol (SALDANHA; BENASSI; BRAGAGNOLO, 2008; SCHERR et al., 2015; BALOI et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2020). Assim como outros lipídios insaturados, o colesterol também é instável e pode sofrer oxidação, originando Produtos da Oxidação do Colesterol (POCs), também conhecidos como óxidos de colesterol. Os POCs

podem ser formados por oxidação enzimática (endógena) ou auto-oxidação, sendo que alguns fatores podem determinar a extensão da mesma, tais como temperatura, oxigênio, radiação ultravioleta, metais e atividade da água ou a combinação destes fatores (GORASSINI et al., 2017; MALDONADO-PEREIRA et al., 2018). A ingestão de POCs em alimentos está associada a efeitos deletérios à saúde como redução da fluidez e estabilidade das membranas celulares, processos inflamatórios, citotóxicos, aterogênicos, carcinogênicos e mutagênicos, alterações cardiovasculares, além de possuir relação com o aparecimento de doenças neurodegenerativas (ORCZEWSKA-DUDEK et al., 2012; THANAN et al., 2014; KLOUDOVA; GUENGERICH; SOUCEK, 2017; ZMYSŁOWSKI; SZTERK, 2017; MALDONADO-PEREIRA et al., 2018).

Em condições de estocagem no varejo, tanto na forma refrigerada quanto congelada, a depender do tipo de embalagem utilizada, o pescado torna-se susceptível a foto-oxidação, devido à incidência de luz UV nas geladeiras ou freezers onde permanecem expostos. Para que ocorra o processo foto-oxidativo é necessária radiação UV na presença de fotossensibilizadores (clorofila, riboflavina, mioglobina), que absorvem e transferem a energia luminosa ao oxigênio triplete (${}^3O^2$), formando o oxigênio singlete (${}^1O^2$). O mecanismo de transferência é dado devido à absorção de luz na região UV visível e o oxigênio singlete formado pode reagir com a molécula de lipídio, originando produtos como aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos (BACELLAR; BAPTISTA, 2019).

Os antioxidantes fenólicos sintéticos, tais como o butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), galato de propila (PG) e *terc*-butil hidroquinona (TBHQ), são os principais aditivos que protegem a qualidade dos alimentos, com a finalidade de inibir ou retardar a degradação oxidativa dos lipídios durante os períodos de armazenamento. Porém, efeitos tóxicos têm sido demonstrados em decorrência da ingestão diária destes antioxidantes, tais como aumento na incidência ao aparecimento de tumores, anemia, retardo de crescimento e hiperplasia no estômago (DA SILVA; JORGE, 2015). Em resposta a esses efeitos deletérios, pesquisas têm sido dirigidas com o intuito de substituí-los por antioxidantes naturais ou mesmo serem associados aos sintéticos, para reduzir sua quantidade nos alimentos (VIANA et al., 2021). Além disso, os consumidores estão cada vez mais exigentes, com isso a indústria de alimento passou a elaborar produtos com ingredientes que tenham propriedades nutricionais, funcionais e tecnológicas, que sejam incluídos na dieta habitual, trazendo assim efeitos benéficos à saúde (GONÇALVES; SANTOS; MORAIS, 2015).

O conhecimento sobre a composição química, bem como a capacidade de sequestro de radicais livres da pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* RADDI) possibilita identificar seu potencial para consumo como alimento funcional, além de estender seu uso como conservante natural de alimentos, reduzindo a formação de produtos da oxidação de lipídios. Também pode se configurar como alternativa para geração de renda aos produtores rurais, considerando o crescente interesse por novas potencialidades de aplicação na culinária, visto que seus frutos são utilizados como condimento e apresentam grande potencial econômico, com elevados valores de mercado e elevada demanda no comércio exterior.

O efeito da radiação fluorescente sobre a composição lipídica em peixes foi extensivamente pesquisado, entretanto, são inexistentes estudos sobre as alterações ocorridas nos teores de ácidos graxos e formação de óxidos de colesterol em sistemas modelo contendo óleo de pescado altamente insaturado (sardinhas) e empregando a pimenta rosa como componente antioxidante, justificando a realização do estudo em questão.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o efeito protetor dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) frente à oxidação lipídica em sistemas modelo contendo óleo de sardinhas (*Sardinella brasilliensis*) expostos à luz fluorescente durante 15, 30, 45 e 60 dias.

Objetivos específicos

Determinar a capacidade antioxidante in vitro dos frutos da aroeira.

Identificar os compostos bioativos presentes nos frutos da aroeira a partir de análises em UPLC-ESI-MS;

Determinar o perfil lipídico do óleo de sardinhas logo após a obtenção do mesmo, a partir das análises de ácidos graxos, colesterol e óxidos de colesterol;

Preparar sistemas modelo mediante foto-oxidação (15, 30, 45 e 60 dias de exposição à luz ultravioleta), utilizando óleo de sardinhas (controle), óleo de sardinhas adicionados dos frutos da aroeira (1%, 2% e 3%) e BHT (0,01%);

Determinar a composição lipídica do óleo de sardinhas após a exposição à luz fluorescente em sistemas modelo ao longo dos 60 dias, a partir das análises de ácidos graxos, colesterol e óxidos de colesterol;

Determinar a cinética de degradação dos ácidos graxos e colesterol, a partir das análises de ácidos graxos, colesterol e óxidos de colesterol nas amostras controle (sem adição de antioxidantes), amostras com adição 3 diferentes níveis de frutos da aroeira moídos e amostras com adição de BHT, submetidas aos diferentes tempos de exposição à luz fluorescente;

Analisar e correlacionar os dados de forma a avaliar o efeito protetor da adição dos frutos da aroeira.

REVISÃO DE LITERATURA

1 SARDINHA-VERDADEIRA

No ano de 2017 o pescado representou 17,3% do total de ingestão de proteína animal da população mundial e 6,8% de todas as proteínas consumidas. A produção mundial de pescado 2018 chegou a 178.529 milhões de toneladas. O consumo *per capita*, por sua vez, em 2017 alcançou 20,3 Kg e as estimativas preliminares indicam que para 2018 o consumo foi de 20,5 Kg por pessoa (FAO, 2018).

O consumo de 150 g de pescado marinho ao dia fornece 37 g de proteína de alta qualidade, que representa 50 a 60% das necessidades diárias proteicas de um adulto, além de 17 g de lipídios, onde 1,5 g destes são ácidos graxos ômega-3, essenciais para o desenvolvimento normal do cérebro e para prevenção de doenças cardiovasculares (FAO, 2014).

No Brasil, a *Sardinella brasiliensis*, também conhecida como sardinha-verdadeira, é o pescado de maior importância econômica. Sua alta aceitação por parte do consumidor se dá pelo fato de ser um produto de baixo custo, em detrimento aos demais peixes, com excelente qualidade nutricional e sensorial, sendo este o peixe mais comercializado e consumido no País, especialmente pelas classes mais carentes (BRASIL, 2011; MARTINS et al., 2016).

A *Sardinella brasiliensis*, pertence à família Clupeidae, é uma espécie subtropical (19 a 24 °C), caracterizada por ser um peixe de pequeno porte (90 – 270 mm), de corpo lateralmente comprimido e prateado (Figura 1). Os peixes desta espécie formam cardumes e habitam águas costeiras, entrando em baías e estuários (IBAMA, 2013).



Figura 1: Sardinha verdadeira (*Sardinella brasiliensis*)

Por ser uma espécie de vida curta e de crescimento rápido, apresentam altas taxas de fecundidade e de mortalidade naturais. São consideradas um importante recurso pesqueiro no

país, capazes de sustentar a pescaria nas regiões Sudeste e Sul, além de envolver uma frota de traineiras e um setor de processamento de pescado responsável pela produção de conservas e sua distribuição em escala nacional (IBAMA, 2013; BARONE et al., 2017).

Do ponto de vista nutricional as sardinhas caracterizam-se por apresentarem altos teores de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa da série ômega-3, especialmente o ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5 ω 3) e o ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6 ω 3) (DE OLIVEIRA et al., 2020a). Esses compostos apresentam importante papel na manutenção da saúde, como auxílio no desenvolvimento neurológico de crianças durante a gravidez, amamentação e infância (VALENTINI et al., 2018; VON SCHACKY, 2021), prevenção de doenças não transmissíveis, como doenças cardiovasculares (acidente vascular cerebral, pressão alta e doença cardíaca coronária), inibição de uma série de doenças inflamatórias, tais como aterosclerose, artrite reumatoide, asma, doença inflamatória do intestino, psoríase e lúpus, e também possuem efeitos favoráveis na prevenção do câncer (mama, próstata e cólon). Além disso, o suprimento adequado de DHA na alimentação dos bebês é fundamental para o desenvolvimento da retina (HAIMEUR et al., 2016; LEMAY-NEDJELSKI et al., 2018; SATO et al., 2019; BROWN et al., 2020; QURESHI et al., 2020; RAJASINGHE et al., 2020; SAENZ DE VITERI et al., 2020).

Entretanto, o perfil lipídico das sardinhas é influenciado por fatores sazonais, ambientais, genéticos, fisiológicos e morfológicos. Embora o alto nível de ácidos graxos ômega-3 torne as sardinhas atraentes do ponto de vista nutricional, essa característica faz com que este pescado seja passível à deterioração oxidativa durante seu armazenamento (HUSS, 1997; OHSHIMA, 2002; KAZUO, 2019). Além dos AGPI da série ômega-3 as sardinhas também contém teores elevados de colesterol, Saldanha, Benassi e Bragagnolo (2008) constataram teores de 219 a 342 mg de colesterol /100 g de músculo em base seca, em sardinhas frescas, enquanto Ferreira et al. (2017) determinaram $237,2 \pm 3,7$ mg de colesterol / 100 g de amostra em base seca.

2 MECANISMO DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA

A oxidação lipídica é um dos principais processos de degradação do pescado e envolve a reação entre lipídios insaturados (ácidos graxos insaturados e colesterol) e o oxigênio. Este processo é responsável pela deterioração da qualidade do produto e pode ter origem durante a produção, processamento, armazenamento e preparo do pescado, afetando negativamente a

qualidade sensorial (cor, odor, sabor e textura). Também está relacionado à perda de propriedades funcionais, valor nutritivo, além de colocar em risco a segurança do alimento, devido à formação de produtos tóxicos (SOARES et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2020).

A formação de compostos primários de oxidação não causa sabores desagradáveis nos peixes, mas faz com que apareçam colorações castanhas ou amareladas no tecido muscular dos mesmos. Contudo, a formação de compostos secundários confere ao pescado um sabor característico de ranço, tornando o alimento impróprio para consumo (HUSS, 1997).

A oxidação lipídica pode ocorrer de diferentes formas, em função do meio e dos agentes catalizadores. Pode ser influenciada por vários fatores intrínsecos e extrínsecos, como a composição e grau de insaturação dos ácidos graxos, temperatura de armazenamento/preparo, irradiação, pressão de oxigênio, atividade de água, presença de catalizadores metálicos, fotossensibilizadores, pró-oxidantes e antioxidantes. Este processo oxidativo varia de acordo com diferentes mecanismos de reação (oxidação enzimática, foto-oxidação e auto-oxidação), a maioria dos quais envolvem radicais livres, além de outras espécies reativas intermediárias (WOOD et al., 2004; SHAHIDI; ZHONG, 2010).

A auto-oxidação está associada à reação de oxigênio com lipídios insaturados e ocorre por meio de um mecanismo descrito por três etapas: Iniciação, propagação e terminação, que levam a uma série de mudanças químicas complexas (SHAHIDI; ZHONG, 2010), o mecanismo geral do processo de oxidação é apresentado na Figura 2.

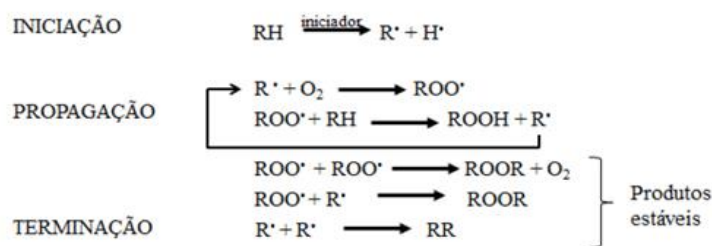


Figura 2: Mecanismo geral de oxidação lipídica (PERUMALLA E HETTIARACHCHY, 2011).

Os ácidos graxos insaturados reagem facilmente com o oxigênio atmosférico e seguem diferentes cinéticas de oxidação, de acordo com seu grau de insaturação (MORRISSEY et al., 1998).

Na etapa de iniciação, os ácidos graxos insaturados, na presença de iniciadores ou catalíticos (como luz, calor ou íons metálicos) perdem um átomo de hidrogênio e produzem radicais livres. A perda do átomo de hidrogênio ocorre mais facilmente no grupamento metil, adjacente à ligação dupla, devido a menor energia de ligação C-H, deixando um elétron desemparelhado no carbono, gerando, assim, um radical livre (R^\bullet) que reage rapidamente com

o oxigênio. Nesta etapa não ocorrem alterações sensoriais, há apenas o aumento da concentração de radicais livres (NIKI et al., 2005).

Na etapa de propagação, os radicais livres (R^*) formados na fase anterior, quando expostos à presença de oxigênio, são convertidos em outros radicais instáveis. Ocorre a remoção do hidrogênio localizado na posição alfa à ligação dupla, posição esta que apresenta baixa energia de dissociação, seguida da incorporação de uma molécula de oxigênio, formando assim um radical peroxil (ROO^*). Estes radicais são altamente reativos, e logo interagem com um átomo de hidrogênio do carbono alfa metilênico de outro ácido graxo insaturado, dando origem aos produtos primários da oxidação, os hidroperóxidos ($ROOH$) e radicais livres (R^*). A reação pode ser repetida inúmeras vezes devido à capacidade dos radicais livres formados de atuam como transportadores de uma reação em cadeia ao atacar novas moléculas de ácidos graxos insaturados. Os hidroperóxidos podem ainda ser decompostos a alcóxil (RO), peroxil (ROO), hidroxil (OH) e os novos radicais lipídicos (R) e ainda participam da reação em cadeia dos radicais livres (GORDON, 2004; LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

A redução dos ácidos graxos no sistema faz com que a etapa de propagação seja finalizada, dando sequência, então, ao início da etapa de terminação, caracterizada pela ligação entre radicais livres, formando compostos estáveis (NIKI et al., 2005).

3 MECANISMO DE OXIDAÇÃO DO COLESTEROL

O Colesterol ($C_{27}H_{46}O$) é uma biomolécula lipofílica e monoinsaturada presente nos tecidos animais. É um componente estrutural essencial nas membranas e lipoproteínas plasmáticas, cuja função é modular sua fluidez, além de ser precursor de hormônios esteroidais e vitamina D (MIYOSHI et al., 2014; MORZYCKI, 2014).

O colesterol, em sua forma livre, apresenta quatro anéis unidos, que formam um núcleo policíclico, três anéis possuem seis carbonos (A, B e C) e um apenas cinco carbonos (D). Há uma cadeia alifática ligada no carbono 17 do anel D, denominada cadeia lateral, o carbono 3 do anel A é ligado a um grupo hidroxila e o anel B possui uma insaturação na posição C5 e C6 (Figura 3) (TALAPATRA; TALAPATRA, 2015).

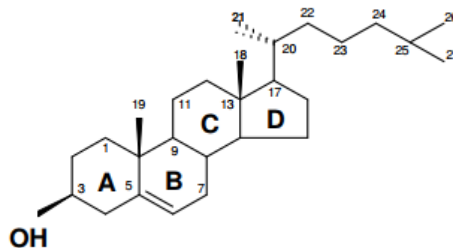


Figura 3: Estrutura química do colesterol livre (GUARDIOLA, 2002).

Seu anel A fica exposto para o lado externo da camada dupla de fosfolipídios, enquanto sua cadeia lateral fica posicionada entre a cadeia alquil de fosfolipídios. Por apresentar uma ligação dupla nas posições 5, 6 do anel B, o colesterol exibe instabilidade oxidativa, podendo ser oxidado por meio de diferentes mecanismos e caminhos de reação, gerando, assim, produtos da oxidação do colesterol (POCs), também conhecidos como óxidos de colesterol (LERCKER; RODRIGUEZ-ESTRADA, 2000; CARDENIA et al., 2013a).

Os óxidos de colesterol fazem parte de um grupo de esteróis com estrutura semelhante ao colesterol, no entanto, eles possuem um grupo adicional de hidroxil, cetona ou epóxido no núcleo de esterol ou um grupo hidroxilo na cadeia lateral da molécula (DANTAS et al., 2015).

Podem ser formados de forma endógena através de enzimas, principalmente no fígado e nos tecidos geradores de hormônios esteroides, porém são encontrados em baixas concentrações no organismo e possuem atividade na regulação metabólica (GOLDSTEIN; BROWN, 2015). Além disso, os óxidos podem ser incorporados ao organismo de forma exógena, através da ingestão de alimentos de origem animal. De maneira geral, o pescado fresco possui baixas concentrações de óxidos de colesterol, porém, os mesmos tendem a aumentar drasticamente quando há exposição do produto a mecanismos oxidativos e fatores ambientais como luz, calor, metais, oxigênio e/ou processamento e armazenamento extensivo (CARDENIA et al., 2013b).

A ingestão de óxidos de colesterol exógenos (formados durante os processos oxidativos) apresentam efeito negativo ao metabolismo devido à sua alta reatividade, fazendo com que sejam eficientes no início de processos radicais. Portanto, são responsáveis por várias doenças crônicas e degenerativas, além de causar alterações na funcionalidade celular e metabolismo lipídico (BOSELLI et al., 2005; DE OLIVEIRA et al., 2018; SAMADI et al., 2020). Estudos sugerem que os efeitos biológicos negativos incluem aterogênese, citotoxicidade, mutagênese, carcinogênese, apoptose, alterações na funcionalidade das membranas celulares, inibição da biossíntese do colesterol e modulação seletiva do receptor de estrogênio, além de estarem associados a transtornos neurológicos como mal de Alzheimer e

mal de Parkinson (MINTZER; CHARLES; GORDON, 2010; ORCZEWSKA-DUDEK et al., 2012; VICENTE et al., 2012; KHATIB; VAYA, 2014; THANAN et al., 2014; XUE-SHAN et al., 2016; MISHRA; MISHRA, 2017).

O colesterol pode sofrer ataque oxidativo no anel esterol, principalmente na posição 7 como por exemplo o 7 α e 7 β -hidroperoxicolesterol, 7-Keto e 7 α e 7 β -hidroxicoolesterol, eles geralmente tendem a ser de origem não enzimática. Além disso, também existem aqueles que sofrem ataque oxidativo na cadeia lateral, como por exemplo o 24 S, 25 e 27 – hidroxicoolesterol, que geralmente são de origem enzimática, porém, há exceções para o 25 – hidroxicoolesterol e 7 α – hidroxicoolesterol, ambos podem ser produzidos por vias enzimática e não enzimática (BROWN; JESSUP, 2009). A Figura 4 mostra o esquema da formação dos óxidos de colesterol por via enzimática e não enzimática.

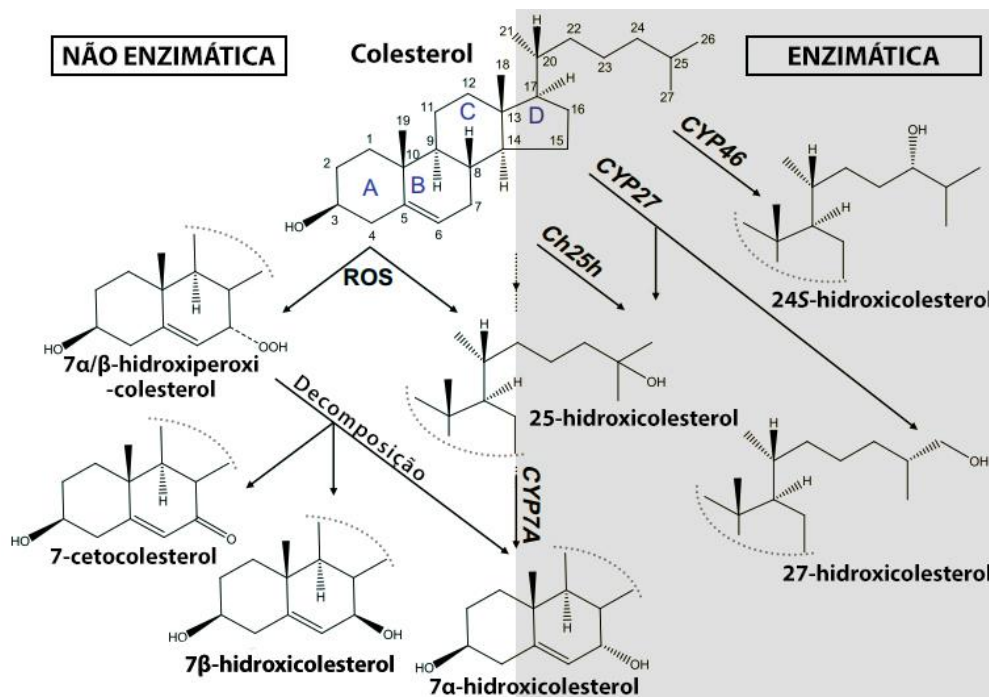


Figura 4: Esquema da formação dos óxidos de colesterol por via enzimática e não enzimática. São mostradas estruturas incompletas dos óxidos de colesterol enfatizando uma oxigenação adicional, onde ROS significa espécies reativas de oxigênio (BROWN; JESSUP, 2009).

Em alimentos, os óxidos de colesterol são formados por meio de reações em cadeia por auto-oxidação e se baseiam na formação de radicais livres. O processo de oxidação do colesterol divide-se em iniciação, propagação e terminação, assim como ocorre com os ácidos graxos insaturados. Inúmeras reações desencadeiam a formação de radicais livres, que podem ser formados quimicamente, enzimaticamente e fotoquimicamente, por irradiação e decomposição

de hidroperóxidos. Além disso, os radicais livres também são capazes de decompor-se ou reagir entre si formando novas espécies reativas de oxigênio (MEDINA-MEZA; BARNABA, 2013).

O foco da oxidação do colesterol por radicais livres é o carbono 7 (C7), devido à fraca energia de ligação na posição C-H. A reação é favorecida pois há uma menor demanda de energia de ativação para a abstração do hidrogênio. O processo de oxidação é autocatalítico e gera produtos primários da oxidação, em seguida, reações adicionais levam à formação de uma grande variedade de produtos secundários, voláteis ou não. Sendo assim, um total de mais de 80 produtos de oxidação do colesterol podem ser formados dessa maneira (SMITH, 1987). Na Figura 5 são demonstrados os principais mecanismos de oxidação do colesterol.

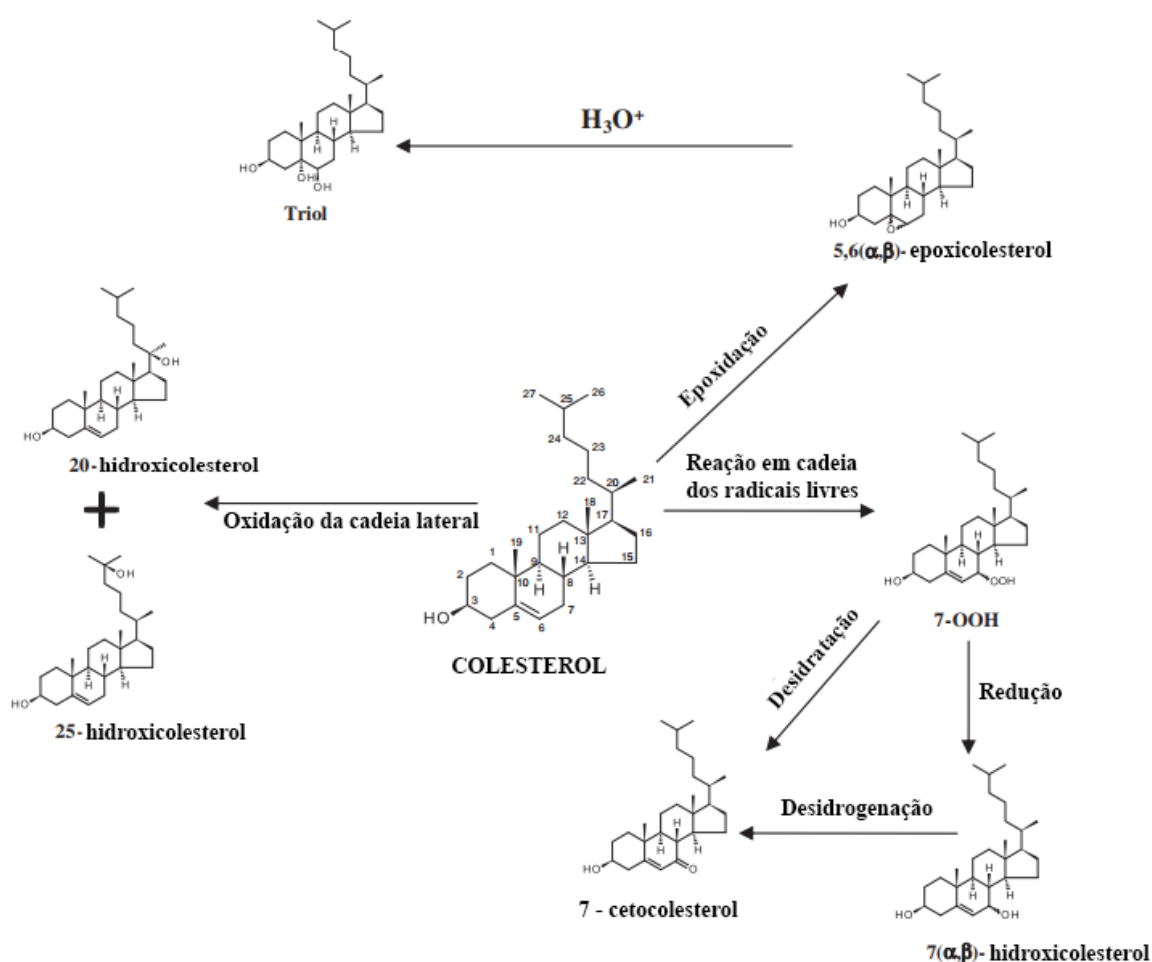


Figura 5: Mecanismos de formação de alguns óxidos de colesterol durante a auto-oxidação (MEDINA-MEZA et al., 2014).

Em condições de armazenamento no varejo, o pescado é exposto à radiação ultravioleta. Essa exposição pode desencadear o mecanismo de foto-oxidação, responsável por causar alterações físico-químicas no produto.

4 MECANISMO DE FOTO-OXIDAÇÃO

Os processos de foto-oxidação lipídica são iniciados na presença de radiações ultravioleta (UVA 340-400 nm) ou visíveis (400-700 nm), em conjunto com fotosensibilizadores e oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$). Esses processos produzem alterações oxidativas por meio de ação fotodinâmica (GIROTTI, 1998).

O oxigênio molecular, em seu estado fundamental, se encontra em estado triplete $^3\text{O}_2$ ($3\Sigma_g^-$), possuindo dois elétrons com spins paralelos ocupando dois orbitais π de mesma energia, chamados de desemparelhados. A reação direta entre uma molécula de $^3\text{O}_2$ e uma molécula lipídica violaria o princípio da conservação do momento angular da rotação, visto que a molécula lipídica e a molécula de hidroperóxido produzida durante a reação estariam no estado eletrônico singlete e a reação do oxigênio molecular com a molécula lipídica resultaria em uma mudança no momento angular da rotação. Sendo assim, a redução direta do oxigênio por dois elétrons é proibida pela regra de conservação do spin (WANKENNE, 2014). A restrição à regra de conservação do spin é removida quando ocorre um acréscimo de energia ao oxigênio, gerando uma forma mais reativa, conhecida como oxigênio singlete $^1\text{O}_2$, que é uma das principais espécies reativas de oxigênio (EROs), muito mais reativa do que o oxigênio molecular em seu estado fundamental triplete (RONSEIN et al., 2006). O oxigênio singlete é eletrofílico por apresentar um orbitário π 2p desemparelhado, possuindo mais energia que o oxigênio triplete, sendo assim, o mesmo reage mais facilmente com ligações duplas presentes nos lipídios (1500 vezes mais rápido que o oxigênio triplete) (SHAHIDI; ZHONG, 2010; MEDINA-MEZA; BARNABA, 2013).

O principal caminho para a formação do oxigênio singlete em alimentos é a foto-sensibilização, que pode ser iniciada na presença de moléculas conhecidas como fotossensibilizadores (pigmentos como hemoglobina, carotenoides, clorofila, feofitina, e corantes como o azul de metileno, rosa bengala e eosina), que podem absorver energia, como radiação, e transferi-la ao oxigênio triplete (SHAHIDI; ZHONG, 2010; BAPTISTA et al., 2017).

Quando os fotossensibilizadores (S) são irradiados com luz ultravioleta ou visível em determinados comprimentos de onda, absorvem energia e passam a um estado excitado singlete (1S^*). Este estado 1S^* pode retornar para o estado fundamental (S) com emissão de fluorescência, ou cruzar para um estado triplete excitado (3S^*) por inversão espontânea do spin do elétron excitado (RONSEIN et al., 2006).

A partir dos fotossensibilizadores no estado triplete excitado ($3S^*$), a foto-reação pode prosseguir no sentido de reação do Tipo I ou Tipo II, dependendo da concentração relativa de oxigênio e substrato redutor (fotossensibilizador triplete) (FOOTE, 1991; GIROTTI, 1998). A Figura 6 ilustra o mecanismo de reações da foto-oxidação lipídica.

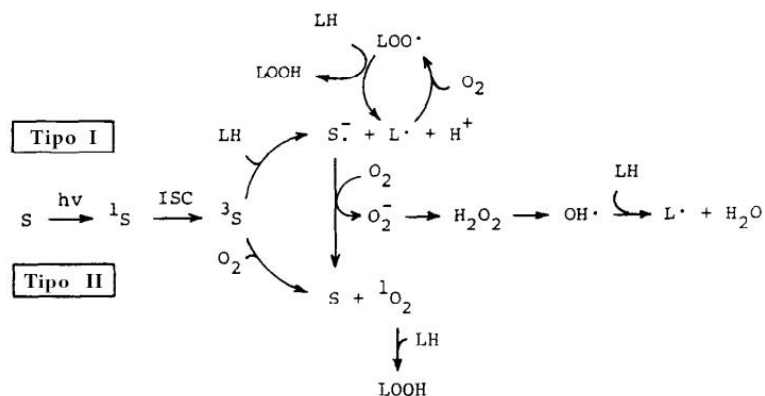


Figura 6: Foto-oxidação lipídica do Tipo I e II, onde LH pode ser um lipídio insaturado, como o colesterol (GIROTTI, 1992).

A reação do Tipo I pode ocorrer por duas vias distintas, de maneira simultânea, uma na qual o $3S$ ativa diretamente o lipídio e outra na qual o $S^{\cdot-}$ gerado ativa o oxigênio. Na primeira rota, o foto-sensibilizador triplete excitado abstrai um hidrogênio ou elétron de um redutor, podendo ser um lipídio insaturado (LH), produzindo, assim, radicais livres ou íons radicais livres. A oxidação em LH ocorre através da abstração de um hidrogênio, devido ao fato de a ligação dupla apresentar maior instabilidade, formando um radical alquilo lipídico (L^{\cdot}) e um fotossensibilizador radical (SH) que perde o próton formando o radical fotossensibilizador ânion ($S^{\cdot-}$) e H^+ . Rapidamente o L^{\cdot} reage com o O_2 gerando radicais peróxido (LOO^{\cdot}), que são radicais livres intermediários e propagam a peroxidação lipídica. Por último, são formados hidroperóxidos lipídicos (LOOHs), e então a auto-oxidação pode prosseguir (GIROTTI, 1998).

Em paralelo o $S^{\cdot-}$ é regenerado a S , dando origem ao superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que pode sofrer desproporção ou redução a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é capaz de reagir com o $O_2^{\cdot-}$ por meio do ciclo Haber-Weiss catalisado pelo ferro, gerando o radical hidroxila (OH^{\cdot}), considerado como um poderoso oxidante, que pode iniciar a peroxidação lipídica através da abstração de hidrogênio para formação de uma molécula de água (H_2O), caracterizando, assim, a segunda via da reação do tipo I, dando continuidade ao processo de autooxidação. Cada uma dessas vias de reação pode dar origem a um grande número de produtos de oxidação primária e secundária (GIROTTI, 1998).

Na reação do tipo II, o fotossensibilizador no estado triplete excitado (3S) retorna ao seu estado fundamental (S), após transferir sua energia ao oxigênio triplete (3O_2), transformando-o em oxigênio singlete (1O_2) (GIROTTI, 1998). O oxigênio singlete pode reagir com o colesterol e lipídio insaturados diretamente no carbono que possui uma ligação dupla, causando alteração na mesma, produzindo um hidroperóxido alílico de configuração trans (por adição ene em ambos os lados da ligação dupla da molécula esteroide) (ZAMBIAZI, 1999).

Nas reações do tipo I pode-se observar duas vias principais, a C-7 e a oxidação da cadeia lateral. O grupo mais reativo da cadeia lateral do colesterol é o carbono terciário C-25. As oxidações na cadeia lateral produzem uma rica variedade de 20, 24, 25 e 26 hidroperóxidos e seus produtos de decomposição, assim como outros hidroperóxidos, álcoois e cetonas, aldeídos, ácidos carboxílicos, entre outros (SMITH, 1987).

A foto-oxidação do tipo II, mediada por 1O_2 , é consideravelmente menos complexa mecanicamente do que a do tipo I e, em geral, há formação de menor variedade de produtos a partir do colesterol (MEDINA-MEZA; BARNABA, 2013). Nesta fase ocorre formação de apenas três produtos primários: 5α -hidroperóxidos, 5β -hidroperóxidos e 6β -hidroperóxidos, predominando 5α -hidroperóxidos por serem termodinamicamente mais estável devido a sua forma equatorial. Contudo, os 5α -hidroperóxidos podem sofrer rearranjo alílico e dar origem a 7α -hidroperóxidos e 7β -hidroperóxidos, que apresentam maior estabilidade; o último é favorecido termodinamicamente e, portanto, geralmente é mais abundante do que o primeiro (BOSELLI; CARDENIA; RODRIGUEZ-ESTRADA, 2012). Os hidroperóxidos são então convertidos rapidamente em seus álcoois correspondentes, derivados de hidroxilo e ceto, dando origem a 7α -hidroxicolesterol e 7β -hidroxicolesterol, juntamente com 7-cetocolesterol (CARDENIA et al., 2013a).

Por outro lado, os hidroperóxidos, quando são fortemente oxidados pelo O_2 singlete presente no ar atmosférico, levam à formação de $5,6\alpha$ -epoxicolesterol e $5,6\beta$ -epoxicolesterol. Estes compostos, na presença de água e condições ácidas, podem ser submetidos à abertura do anel epoxi e, assim, gerar colestanetriol (triol) (BOSELLI; CARDENIA; RODRIGUEZ-ESTRADA, 2012). A Figura 7 apresenta os principais caminhos da foto-oxidação do colesterol e os produtos originados a partir deste.

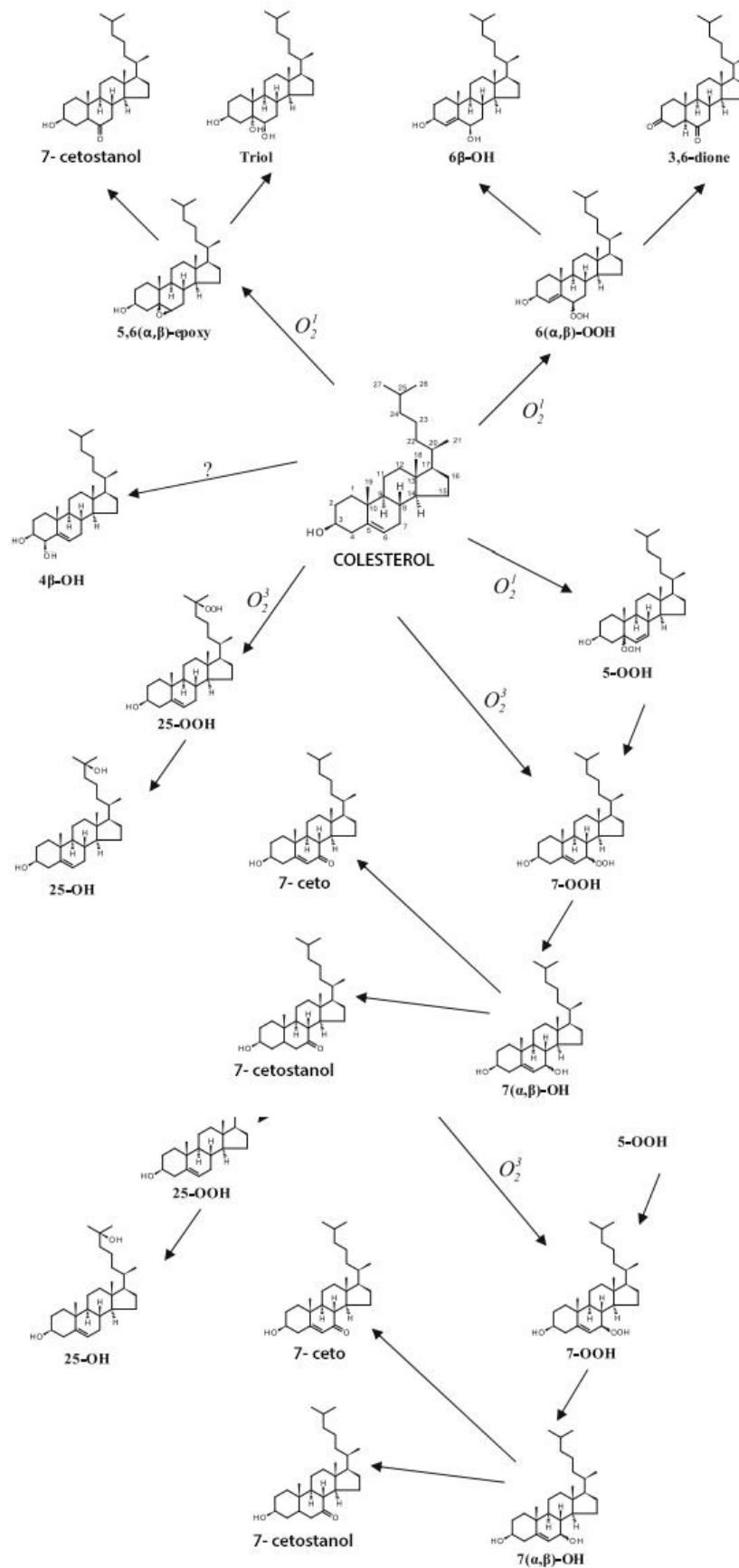


Figura 7: Caminhos de foto-oxidação do colesterol (MEDINA-MEZA E BARNABA, 2013).

Para evitar os processos oxidativos em pescado há a necessidade de diminuir a incidência de todos os fatores que a favorecem, mantendo ao mínimo os níveis de energia (temperatura e luz) que são responsáveis pelo desencadeamento do processo de formação de radicais livres. Além disso é necessário evitar ao máximo o contato com oxigênio e também inibir a formação de radicais livres por meio da utilização de compostos antioxidantes, os quais, em pequenas quantidades, atuam interferindo nos processos de oxidação de lipídios (SOARES, 2002; ZEHIROGLU; SARIKAYA, 2019).

5 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são substância capazes de inibir ou retardar significativamente a oxidação lipídica, protegendo os alimentos contra processos oxidativos, reduzindo o processo de deterioração. O efeito do antioxidante pode ser dado pela inativação dos radicais livres, complexação de íons metálicos ou redução dos hidroperóxidos (PARCHETA et al., 2021).

Os antioxidantes podem ser classificados como sintéticos e naturais, e podem estar presentes naturalmente nos alimentos ou serem adicionados intencionalmente. Os antioxidantes sintéticos são estruturas fenólicas que apresentam vários graus de substituintes alquila, são os mais utilizados pelas indústrias alimentícias e mostram-se eficientes contra a oxidação lipídica, dentre eles destacam-se o BHT, BHA e TBHQ (ATTA; MOHAMED; ABDELGAWAD, 2017; RIBEIRO et al., 2019; DE JESUS et al., 2020). Os naturais, por sua vez, são compostos fenólicos, quinonas, lactonas e os polifenóis (SOBHANI et al., 2020).

A utilização dos antioxidantes sintéticos no Brasil é regulada pelo Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que limita a 200 mg/kg⁻¹ para o uso de BHA, BHT e TBQH, como concentrações máximas permitidas (ANVISA, 2019).

Apesar de terem seu uso amplamente empregado dentro da indústria alimentícia e a legislação estabelecer limites máximos para seu consumo, a adição de antioxidantes sintéticos como aditivos alimentares vem sendo questionada quanto aos seus efeitos adversos à segurança dos alimentos, visto que estudos toxicológicos, em decorrência da ingestão diária destes antioxidantes, têm demonstrado relação com problemas à saúde, tais como alergia, envelhecimento precoce, hiperplasia no estômago e potencial mutagênico (ITO et al., 1986; BIRCH et al., 2001; KORNIENKO et al., 2019). Por outro lado, a utilização de antioxidantes

naturais pode ser um método eficaz para a prevenção de doenças associadas aos radicais livres (ZHENG; WANG, 2001; SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2003; ATTA; MOHAMED; ABDELGAWAD, 2017; RIBEIRO et al., 2019).

Com o aumento da demanda dos consumidores por produtos de origem natural, o uso de antioxidantes naturais nas indústrias alimentícias tornou-se uma alternativa atrativa, e seus mecanismos funcionais têm sido amplamente estudados, visto que estes apresentam compostos que possuem capacidade antioxidante considerável (LORENZO et al., 2018).

Os antioxidantes naturais estão presentes nos alimentos, e possuem a capacidade de interromper a formação de radicais livres, sendo capazes de reduzir a velocidade das reações de oxidação dos compostos lipídicos presentes nos produtos. Grande parte dos antioxidantes naturais mais utilizados na indústria de alimentos são compostos fenólicos e podem ser divididos em tocoferóis, flavonoides e ácidos fenólicos (HUYUT; BEYDEMIR; GÜLÇİN, 2017; RIBEIRO et al., 2019).

Os compostos fenólicos são substâncias exclusivas das plantas, amplamente distribuídas na natureza, sendo que mais de 8000 compostos fenólicos já foram detectados (SILVA et al., 2010). Podem ser pigmentos, que dão a aparência colorida aos alimentos, ou produtos do metabolismo secundário, normalmente derivados de reações de defesa das plantas contra agressões do ambiente, essenciais para sua adaptação em ambientes adversos e inconstantes (TANASE; BUJOR; POPA, 2019).

Os compostos fenólicos são os antioxidantes naturais presentes em maior quantidade na dieta humana. São definidos quimicamente como substâncias que possuem um ou mais anéis aromáticos com uma ou mais hidroxilas. Também podem apresentar outros derivados funcionais substituintes em sua estrutura, como ésteres, metil-ésteres e glicosídeos (HAN; SHEN; LOU, 2007; KAURINOVIC; VASTAG, 2019).

Esses compostos fenólicos agem como antioxidantes devido à facilidade de doar aos radicais livres um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) da sua estrutura aromática. Além disso, a mesma possui habilidade em suportar um elétron não emparelhado através do deslocamento do mesmo ao redor de todo o sistema de elétrons da molécula (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2009). Os compostos fenólicos também possuem a capacidade de interferir no processo de oxidação agindo como agentes redutores, quelantes de metais e sequestrantes de oxigênio singlete. Seus radicais intermediários são estáveis, impedindo a oxidação de diversos ingredientes presentes no alimento, particularmente os lipídios (PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011).

Alguns estudos indicam que uma maior eficácia para a inibição da oxidação lipídica tem sido observada em alguns antioxidantes naturais, quando comparado aos antioxidantes artificiais (SEOL et al., 2011; HWANG et al., 2015). Um estudo da ação dos compostos fenólicos quercetina e ácido cafeico evidenciou a efetividade dos mesmos no retardo da oxidação lipídica em óleo de sardinha (VAISALI; BELUR; REGUPATHI, 2016). Para determinar a atividade antioxidante do extrato aquoso obtido de resíduos de *Stevia rebaudiana*, Yu et al., (2017) isolaram cinco compostos fenólicos: ácido protocatecúico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido clorogênico e ácido cripto clorogênico, confirmando que os mesmos apresentam alta capacidade antioxidante, capaz de inibir a oxidação do óleo de peixe. De Oliveira et al., (2020a) avaliaram o efeito protetor da adição dos frutos de *S. terebinthifolius* contra a termo-oxidação de ácidos graxos e colesterol em sistemas modelo contendo óleo de sardinha. O estudo evidenciou a presença de biflavonóides, antocianina, terpenóides e compostos fenólicos nos extratos metanólicos dos frutos, estes compostos estão possivelmente associados a um efeito protetor importante frente a oxidação dos lipídeos estudados.

6 FRUTO DA AROEIRA

6.1 Aroeira

A Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), pertencente à família Anacardiaceae, é uma planta nativa do Brasil, que ocorre desde o Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe) passando pelos cerrados (Mato Grosso do Sul), região sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) chegando à região sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina), e se estendendo pela Argentina e Paraguai (SILVA-LUZ; PIRANI, 2012).

Apresentam-se na forma de arbusto ou árvore dióica de porte médio de copa globosa e tronco tortuoso revestido por uma capa grossa, com altura de 5-10 metros. Suas folhas são compostas e aromáticas, medem 10-15 cm de comprimento por 2-3 cm de largura, são perenes, verde-escuras, e apresentam de 7 a 13 folíolos verdes, oblongos a elípticos e suas nervuras são claras e proeminentes na parte superior do limbo. As flores são pequenas e apresentam coloração de amarelo a branco e são dispostas em inflorescências axilares e terminais do tipo ráculo. O período de florescimento ocorre nos meses de setembro a janeiro e frutificação entre

janeiro e julho (LORENZI; FLORA, 2002).

Quando frutificam tornam-se muito atraentes, a extremidade dos ramos é recoberta por cachos com frutos (Figura 8). Os frutos são pequenas drupas, esféricas, têm coloração verde no início e sua casca, durante a maturação, é seca e envolve uma única semente como uma espécie de concha de papel com cerca de 0,3 milímetros de diâmetro, de coloração brilhante e lustrosa, que vai do rosa claro até o vermelho escarlate, tornando-os assim, semelhantes a uma pequena pimenta, de onde se dá origem ao nome pimenta rosa (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; PRADO, 2005).



Figura 8: Folhas e frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* RADDI).

S. terebinthifolius Raddi, é popularmente conhecida no Brasil como "aroeira vermelha", "pimenta rosa", "aroeira pimenteira", "aroeira mansa", "pimenta brasileira", "aroeira da praia", "aroeira negra", "aroeira de Minas", "aroeira de remédio", "aroeira do sertão", "araguaraíba", "fruto de sabiá", "cabuí", "cambuí" e "árvore pimenteira". Também é conhecida como "chichita" (Argentina), "copal" (Cuba), "pimienta de Brasil" (Puerto Rico), "faux poivrir" (Riviera Francesa), "poivre rose" (França), "Christmas-berry", "Florida Holly" e "Christmas-berry" (Estados Unidos) (MORTON, 1978; BAGGIO, 1988; LENZI; ORTH, 2004; SILVA-LUZ; PIRANI, 2012).

Embora seja conhecida popularmente como pimenta rosa, esta variação nos nomes se dá, principalmente, pelo fato de seus frutos possuírem a aparência de uma pequena pimenta de coloração rosa avermelhada, ainda que não tenha qualquer parentesco com a família das pimentas. O fruto de *S. terebinthifolius* é parente do caju, da manga e do cajá-mirim, dentre outras conhecidas anacardiáceas frutíferas (CAVALCANTI; BRITO, 2009).

A colheita dos frutos é feita manualmente, principalmente em regiões de restinga do

litoral brasileiro. Embora seja uma espécie aparentemente pouco cultivada no Brasil para fins comerciais, a pimenta rosa possui grande potencial para a exploração e uso. Além disso, sua capacidade de adaptação a diversos ecossistemas aumenta a possibilidade de cultivo em diferentes regiões do Brasil (LENZI; ORTH, 2004; BARBOSA et al., 2007).

A vasta utilização da pimenta rosa na culinária internacional é responsável pelo aumento considerável da demanda destes produtos nas indústrias de especiarias. O fruto da Aroeira é empregado em muitas preparações na forma de grãos inteiros ou moídos. A pequena semente do fruto possui um sabor suave e levemente picante (BARBOSA et al., 2007).

A espécie *S. terebinthifolius* apresenta grande potencial de uso, sendo que as folhas e cascas são utilizadas há décadas pela medicina fitoterápica, para a formulação de chás que apresentam atividade antioxidante, atribuída aos compostos fitoquímicos encontrados na planta (LORENZI; MATOS, 2002; BRASIL, 2006). Alguns autores relatam que os frutos da aroeira possuem atividade antibacteriana e propriedades antioxidantes, antiabióticas, antiinflamatórias, antinociceptivas, antihiperlipidêmicas e antiaterogênicas, devido aos compostos bioativos presentes nos frutos (DA ROCHA et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2020b; LINDEN et al., 2020; FERIANI et al., 2021a; FERIANI et al., 2021b).

6.2 Emprego alimentar

O fruto da aroeira, também chamado de pimenta rosa, estão entre os condimentos “gourmets” mais sofisticados da alta gastronomia nacional e internacional, adicionando um sabor levemente adocicado e picante à comida. Nos últimos anos, seu consumo apresentou crescimento significativo no mercado internacional. Este tempero culinário é obtido de frutos maduros de *Schinus terebinthifolius* Raddi e na indústria alimentícia, esses frutos geralmente são comercializados em forma seca e devem ter uma cor vermelha brilhante e uma forma esférica na ausência de cascas quebradas (SILVA et al., 2017).

Devido ao seu sabor suave e levemente picante, além de sua aparência bonita, de uso decorativo, seu uso é permitido em diversas preparações, podendo ser utilizada na forma de grãos inteiros ou moídos. Além disso, a pimenta rosa é especialmente apropriada para o preparo de molhos que acompanham carnes brancas, de aves e pescado, por não sobrepor o seu gosto sutil (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; PRADO, 2005). O fruto também é muito apreciado nas exigentes culinárias internacionais para temperar salames e massas, e conferir sabores exóticos a bebidas e doces, como coquetéis e chocolate (GOMES et al., 2013).

Os principais canais locais de comercialização da pimenta rosa são as indústrias de alimentos (restaurantes e indústrias produtoras de molhos), supermercados, comércio de condimentos, especiarias e ervas, indústria cosmética e farmacêutica (GOMES et al., 2013).

No cenário nacional as potencialidades da produção da espécie ainda são empíricas, todavia, a etapa de secagem é, sem dúvida, o passo mais importante, sendo uma operação fundamental para inibir o crescimento microbiano e a deterioração da qualidade, agregando valor aos frutos. Entre outros, o benefício do processo de secagem é o peso reduzido, visto que a remoção de grandes quantidades de água torna o transporte mais econômico. No entanto, se a secagem não for realizada corretamente, a qualidade e a comercialização da pimenta rosa serão afetadas (SILVA et al., 2017).

Silva et al. (2017) estudaram o efeito de diferentes condições de secagem avaliando parâmetros de qualidade final da pimenta rosa, incluindo parâmetros físico-químicos e compostos voláteis. Os resultados indicaram que a secagem em secador de bandejas garante melhor qualidade ao produto, que a temperatura do ar apresentou maior influência nos parâmetros físico químicos estudados e que temperaturas de secagem entre 40 e 55°C asseguraram melhor redução de umidade sem degradação dos compostos presentes no óleo essencial. No entanto, sugerem que sejam feitos novos estudos de análise sensorial dos frutos de pimenta rosa.

CAPÍTULO 1

**ARTIGO DE REVISÃO ENVIADO A REVISTA
“Trends in Food Science & Technology”**

**PINK PEPPER OR AROEIRA FRUIT (*Schinus terebinthifolius* RADDI): CHEMICAL
COMPOSITION, BIOACTIVE COMPOUNDS, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND
APPLICATION IN FOOD SYSTEMS**

ABSTRACT

Background: *Schinus terebinthifolius* Raddi, also called *aroeira*, is described as an ornamental and medicinal plant. Its fruit is extensively used as a condiment known as pink pepper; however, it is most valued due to its composition of bioactive compounds, which present antioxidant properties. Nowadays, there is a great demand for more natural food with minor contents of synthetic additives. Since synthetic antioxidants are considered unsafe to be used, recent studies have focused on natural antioxidant alternatives such as pink pepper.

Scope and Approach: This review presents comprehensive information on the nutritional and phytochemical components of pink pepper, including macro components, fatty acids, phytosterols, phenolic acids, flavonoids, tannins, and terpenes. This study emphasizes the antioxidant properties of pink pepper. Therefore, to support pink pepper potential as a natural antioxidant, it provides an overview of results obtained from *in vitro* antioxidant assays. Finally, it brings together studies concerning the application of pink pepper as an antioxidant in food systems.

Key Findings and Conclusions: This review describes pink pepper as a highly nutritive and health-promoting food. Moreover, the cited literature supports the use of pink pepper to provide additional nutritional value to food products and to act as a promising natural antioxidant. Recent studies showed the effectiveness of pink pepper as a natural antioxidant in food, representing an alternative to the substitution of the synthetic antioxidants. However, future studies must be conducted to properly evaluate and establish important parameters such as safety, dose levels, and sensory acceptance for industrial applications.

Keywords: *Schinus terebinthifolius* Raddi, bioactive compounds, antioxidant capacity, natural antioxidant.

1 INTRODUCTION

Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae) is a native South American tree widely distributed in the Brazilian territory. It can be found in sixteen States: Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul, and Santa Catarina; ranging from the Northeast to the south of Brazil. In addition, it has also spread to other regions of Central America, North America, Africa, Europe, and Asia (Carvalho, Melo, Aragão, Raffin, & Moura, 2013; Lenzi & Orth, 2004).

The adult tree reaches from 4 to 10 m in height. In Brazil, it is known by a variety of names such as aroeira, aroeira vermelha, aroeira pimenteira, aroeira mansa aroeira da praia, aroeira negra, aroeira de Minas, aroeira de remédio, aroeira do sertão, araguaráiba, fruto de sabiá, cabuí, and cambuí (Lenzi & Orth, 2004; Morton, 1978). When fruiting, it is covered with bunches of small spherical fruit, whose color varies from light pink to red. As aroeira fruit is similar to a small pepper, the fruit is also called Brazilian pepper and pink pepper (Lenzi & Orth, 2004).

Aroeira is used as an ornamental plant and by the perfume industry. Most parts of the *aroeira* tree, including leaves, bark, fruit, seeds and oil, have been used in folk medicine to treat diverse disorders such as ulcers, tumors, diarrhea, arthritis, bronchitis, urinary inflammation, among others (Barbosa, Demuner, Clemente, Paula, & Ismail, 2007; Bernardes et al., 2014; Pagani et al., 2014; Patocka & de Almeida, 2017). The fruit are rich in essential oil, which imparts a slight peppery flavor. Therefore, they are extensively used in many culinary dishes in the form of whole or ground fruit, being considered a sophisticated condiment in the national and international cuisine, where they have shown significant market growth (Barbosa et al., 2007). However, in spite of its potential, *aroeira* is not usually cultivated in Brazil for commercial purposes (Barbosa et al., 2007; Lenzi & Orth, 2004).

Numerous studies have reported the biological activities of pink pepper, which is known for its antioxidant, antidiabetic, anti-inflammatory, and antimicrobial properties (Bernardes et al., 2014; da Rocha et al., 2019; da Silva Dannenberg, Funck, da Silva, & Fiorentini, 2019; de Lima Glória et al., 2017; de Oliveira et al., 2020a). Besides conferring color, flavor, and aroma, pink pepper is valued for its nutritional attributes; containing compounds such as tannins, flavonoids, anthocyanins, terpenes, and phenolic acids, which are recognized as vital for the maintenance of human health (Carvalho et al., 2013; de Oliveira et al. 2020a; Feuereisen et al.,

2014; Pagani et al., 2014; Sassi, Elayeb, Karaman, Marzouk, & Mastouri, 2020; Tlili et al., 2018). Therefore, since there is a growing interest in healthy food studies have focused on characterizing the phytochemical profile of plants such as *aroeira*.

The literature has reported the antioxidant capacity of pink pepper (Andrade, Poncelet, & Ferreira, 2017; de Oliveira et al., 2020a; Pagani et al., 2014; Sassi et al., 2020; Serrano-León et al., 2018). This supports its potential, not only as a condiment but also as an alternative to replace synthetic antioxidants, providing advantageous nutritional and protective properties (de Oliveira et al., 2020b; Fortunato et al., 2019; Menegali et al., 2020; Serrano-León et al., 2018). In this context, this review brings together relevant studies concerning the phytochemical profile and antioxidant capacity of pink pepper, which is correlated to its potential as a natural antioxidant for the food industry.

2. CHEMICAL COMPOSITION

2.1. Macro components

Table 1 shows the proximate composition (moisture, ash, lipids, protein, carbohydrates, fiber, and total energy) of pink pepper based on studies previously reported in the literature. The fruit presented moisture ranging from 12.90 to 39.00 g/100 g (Andrade et al., 2017; Degáspari et al., 2004). Lipid contents varied from 5.11 to 25.15 g/100 g and protein contents from 7.10 to 26.25 g/100 g (Degáspari et al., 2004; de Oliveira et al., 2020a; de Souza et al., 2012; Ennigrou et al., 2017; Feriani et al., 2020; Gonçalves et al., 2012; Silva et al., 2019a; Tlili et al., 2018). The main representative macronutrients are the carbohydrates, which ranged from 31.21 (Feriani et al., 2020) to 62.49 g/100 g (de Oliveira et al., 2020a). Pink pepper is also a source of fiber (17.90-21.30 g/100 g) (Gonçalves et al., 2012; Silva et al., 2019a) and presented total energy ranging from 358 to 391 kcal (de Oliveira et al., 2020a; Silva et al., 2019a). Reported ashes ranged from 0.19 to 14.24 g/100 g (de Oliveira et al., 2020a; de Souza et al., 2012; Feriani et al., 2020; Gonçalves et al., 2012; Pagani et al., 2014; Silva et al., 2019a).

Pink pepper presents diverse components of nutritional value; however, it is well established that the chemical composition of plant materials is influenced by numerous factors regarding their origin, harvest time, ripeness, climatic conditions (exposure to light and water, temperature, altitude, soil), genetic factors, among others (Ennigrou et al., 2017; Tlili et al., 2018).

Table 1: Proximate composition of pink pepper.

	Value	Reference
Moisture (g/100 g)	12.90 – 39.00	Andrade et al. (2017); Degáspari et al. (2004); de Oliveira et al. (2020a); de Souza et al. (2012); Ennigrou et al. (2017); Gonçalves et al. (2012); Pagani et al. (2014); Silva et al. (2019a)
Carbohydrate (g/100 g)	31.21 – 62.49	de Oliveira et al. (2020a); Feriani et al. (2020); Silva et al. (2019a)
Protein (g/100 g)	7.10 – 26.25	de Oliveira et al. (2020a); Feriani et al. (2020); Gonçalves et al. (2012); Silva et al. (2019a); Tlili et al. (2018)
Lipids (g/100 g)	5.11 – 25.15	Degáspari et al. (2004); de Oliveira et al. (2020a); de Souza et al. (2012); Ennigrou et al. (2017); Feriani et al. (2020); Silva et al. (2019a); Tlili et al. (2018)
Ash (g/100 g)	0.19 – 14.24	de Oliveira et al. (2020a); de Souza et al. (2012); Feriani et al. (2020); Gonçalves et al. (2012); Pagani et al. (2014); Silva et al. (2019a)
Fiber (g/100 g)	17.90 – 21.30	Golçalves et al. (2012); Silva et al. (2019a)
Total energy (kcal)	358 - 391	de Oliveira et al. (2020a); Silva et al. (2019a)

Although carbohydrates are the main macronutrients of pink pepper; there are few studies of their composition. Salem, Hamed & Mansour (2019) determined glucopyranosyl-D-glucose (1.09 %) and tetrasaccharide D-stachyose (1.07 %) in ethyl ether extracts of pink pepper and monosaccharides and disaccharides were detected in hydroethanolic extracts of their shells (de Araujo Gomes et al., 2020).

A recent study evaluated crude polysaccharides extracted from pink pepper and observed, using chromatographic techniques, that they were composed of four monosaccharides: arabinose (42.03 g/100 g), galacturonic acid (31.21 g/100 g), fucose (17.63 g/100 g), and glucose (9.13 g/100 g). In addition, the antiradical and antioxidant activities of the extracted polysaccharides were tested *in vitro* and *in vivo*, showing their antioxidant, anti-inflammatory, antidiabetic, and analgesic properties (Feriani et al., 2020).

Tlili et al. (2018) investigated the influence of aspects such as the location and, consequently, environmental conditions on the chemical composition of pink pepper. Fruits from different regions of Tunisia (Tunis and Gafsa) were evaluated. The protein level varied significantly, ranging from 17.50 to 26.25 g/100 g. However, the results did not show a difference in oil accumulation between regions (13.88 - 14.08 g/100 g). Moreover, this study highlighted pink pepper as a source of proteins: prolamins (more than 52%), glutelins (29.33%-35.50%), globulins (5%-9%), and albumins (3.5%-7%). As cited by the authors, the presence of prolamins and glutelins may also contribute to their antioxidant potential.

Variations due to the stage of maturity were studied by Ennigrou et al. (2017). Pink pepper fruit were collected at three stages, including “green” (immature), “half red” (half-mature), and “red” (mature), and their lipid contents were determined. The results revealed that there were no significant differences between immature and half-mature stages of maturation, where the levels were 8.64 and 8.68 g/100 g, respectively. However, the lipid content dropped in the mature fruit (5.11 g/100 g), demonstrating that the biosynthesis and/or accumulation of lipids decreases with the stage of maturation or may be affected by the activation of lipases during maturation.

Besides the points discussed above, processing may also result in changes in the chemical composition of natural materials. Regarding the decontamination of foods, de Souza et al. (2012) evaluated the effects of different radiation doses (0, 0.2, 0.4, 0.8, and 1.6 kGy), which were applied to on the levels of moisture, ash, and lipids of pink pepper. Higher doses of radiation resulted in decreases in the levels of moisture (26.89-29.04 g/100 g) and lipids (12.24-12.76 g/100 g), but no significant differences were observed in ash content among the studied doses (0.194-0.195 g/100 g).

2.2. Fatty acid composition

Most studies report similar fatty acids profiles for *aroeira* fruit, where linoleic and oleic acids are described as the most abundant. However, varied results were found when regarding quantitative analyses (Table 2).

Table 2: Fatty acids profile of pink pepper reported in the literature.

Sample	Total of fatty acids identified	Main fatty acids (g/100 g)	SFA	MUFA	PUF A	PUF A/SF A	n3/n6	Reference
Immature fruits from Ariana (Tunisia)	12	Linoleic acid (C18:2): 36.94 α -linolenic acid (C18:3): 21.31 Oleic acid (C18:1): 12.38 Palmitic acid (C16:0): 11.51	24.49	17.26	58.25	2.37	0.58	Ennigrou et al. (2017)
Half-mature fruits from Ariana (Tunisia)	12	Linoleic acid (C18:2): 42.62 α -linolenic acid (C18:3): 15.39 Oleic acid (C18:1): 15.06 Palmitic acid (C16:0): 14.56	24.26	17.73	58.01	2.39	0.36	Ennigrou et al. (2017)
Mature fruits from Ariana (Tunisia)	12	Linoleic acid (C18:2): 48.21 Oleic acid (C18:1): 22.34 Palmitic acid (C16:0): 15.98 α -linolenic acid (C18:3): 3.2	24.69	23.90	51.41	2.08	0.07	Ennigrou et al. (2017)

Mature fruits from Alexandria (Egypt)	14	Oleic acid (C18:1): 12.85 Palmitic acid (C16:0): 10.91 Erucic acid (C22:1): 8.81 Myristic acid (C14:0): 8.31	38.33	26.53	6.69	0.17	ND	Salem et al. (2018)
Mature fruits from Tunis (Tunisia)	15	Linoleic acid (C18:2): 48.98 Palmitic acid (C16:0): 34.40 Oleic acid (C18:1): 4.76	36.48	10.63	52.89	1.44	ND	Tlili et al. (2018)
Mature fruits from Gafsa (Tunisia)	15	Linoleic acid (C18:2): 49.72 Palmitic acid (C16:0): 33.22 Oleic acid (C18:1): 5.56	36.32	8.92	54.77	1.50	ND	Tlili et al. (2018)
Mature fruits from Seropédica (Brazil) (22°44'38" S; 43°42'27" W)	10	Oleic acid (C18:1): 34.51 Palmitic acid (C16:0): 24.53 Linoleic acid (C18:2): 17.58	36.77	36.52	19.16	0.52	ND	Silva et al. (2019a)
Mature fruits from Seropédica (Brazil) (23°00'3"S; 43°34'7"W)	20	Linoleic acid (C18:2): 36.33 Oleic acid (C18:1): 18.71 Palmitic acid (C16:0): 9.01 Palmitoleic acid (C16:1): 7.87	26.53	29.32	37.01	1.40	0.01	de Oliveira et al. (2020a)
Mature fruits from the center of Tunisia (Sahline area)	14	Linoleic acid (C18:2): 54.26 Oleic acid (C18:1): 25.39 Palmitic acid (C16:0): 13.45	17.69	26.36	55.88	3.15	ND	Sassi et al. (2020)

ND: Not determined. SFA = saturated fatty acids, MUFA = monounsaturated fatty acids, PUFA = polyunsaturated fatty acids.

Ennigrou et al. (2017) investigated the fatty acid composition of mature, half-mature, and immature fruits of *aroeira*. The results revealed linoleic acid as the major fatty acid, showing contents of 36.94 (mature fruit), 42.62 (half-mature fruit), and 48.21 g/100 g (immature fruit). The maturation process did not cause qualitative changes in fatty acid profiles; however, quantitative differences were observed. Regarding the levels of oleic, linoleic, and α -linolenic acids, the authors associated the maturation process with the activation of the enzyme oleic acid desaturase, which led to a higher production of linoleic acid.

According to Ennigrou et al. (2017), the mature fruits presented a higher lipid quality. A lower n-3/n-6 ratio was observed in mature fruits, suggesting that their consumption is more appropriate for human nutrition, since the high intake of n-6 PUFAs has been associated with inflammatory processes and cardiovascular diseases (Saini & Keum, 2018). The lower values of atherogenic (0.31) and thrombogenic indices (0.44) also corroborate with the healthier attributes of mature fruits. Moreover, the authors determined the calculated oxidizability (5.88)

and the oxidative susceptibility (2513.35) values, which indicated that the lipid fraction of mature fruits is less susceptible to oxidation

The main methylated fatty acids detected in a hexane extract of pink pepper were oleic (12.85 g/100 g), palmitic, (10.91 g/100 g), and erudic acids (8.81g/100 g). An acetone extract also presented the predominance of oleic acid; however, higher amounts were determined in this extract (38.7 g/100 g) (Salem et al., 2018). Da Silva et al. (2018) evaluated organic partitions obtained from ethanol extract of pink pepper and found saturated fatty acids such as palmitic, stearic, eicosanoic, and behenic acids.

The fatty acid contents of pink pepper grown in different regions were evaluated by Tlili et al. (2018). They analyzed fruit harvested at Gafsa and Tunis (Tunisia) and reported linoleic acid as the main fatty acid present in samples of both localities. Fifteen fatty acids were identified and around 63% were unsaturated fatty acids. However, when considering each group of fatty acids, saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids, statistical analyses revealed significant differences between regions.

Aroeira fruits cultivated in Tunisia were also studied by Sassi et al. (2018), who reported the predominance of unsaturated fatty acids (82.24%) as well. Linoleic acid showed the highest content (54.26 g/100 g), followed by oleic acid (25.39 g/100 g). Among the saturated fatty acids, palmitic acid (13.45 g/100 g) was the most abundant.

Silva et al. (2019) identified ten fatty acids in pink pepper; the main ones were oleic (34.51 g/100 g), palmitic (24.53 g/100 g), and linoleic acids (17.58 g/100 g). Regarding the n-3 serie, eicosapentaenoic (0.92 g/100 g) and α -linolenic (0.13 g/100 g) were found.

A total of 20 fatty acids were identified in pink pepper by de Oliveira et al. (2020a). Linoleic, oleic, palmitic, and palmitoleic acids were the principal constituents, with contents of 36.33, 18.71, 9.01, and 7.87 g/100 g, respectively. The fatty acid percentages increased in the order of saturated (26.53 g/100 g) < monounsaturated (29.32 g/100 g) < polyunsaturated (37.01 g/100 g). A residue from the *aroeira* processing industry composed of leaves and the fruit shells also presented fatty acids in its composition, wherein oleic, linoleic, palmitic, myristic, α -linolenic, stearic, pentadecanoic, heptadecanoic, eicosanoic, and behenic acids were determined (de Araujo Gomes et al., 2020). De Oliveira et al. (2020b) also identified linoleic and steric acids as a part of pink pepper composition.

Fatty acids are widely found in nature, food, and organisms. These compounds play a role in the human body, with biological and structural functionalities (Saini & Keum, 2018). Fatty acids from the n-3 and n-6 series have been shown to be the most important, since they

may influence inflammatory processes, reduce oxidative damage, and prevent neurodegenerative and cardiovascular diseases. Numerous studies have focused on important parameters for human nutrition such as the PUFA/SFA and n-3/n-6 ratios; however, specific saturated and polyunsaturated fatty acids present different metabolic effects and must be considered (Saini & Keum, 2018; Urlić et al., 2020).

2.3. Phytosterols

Phytosterols, which are similar to cholesterol in structure and function, are composed by a four-ring steroid nucleus and a side chain of nine or ten atoms of carbon. They differ from cholesterol by the presence of an ethyl or methyl group in the side chain (C-24), whereas both compounds play a role in the stabilization of the phospholipid bilayers in cell membranes (Kritchevsky & Chen, 2005).

Widely distributed in plant species, phytosterols have received growing attention, mainly due to their hypocholesterolemic properties. Phytosterols influence cholesterol absorption and lower its serum concentration, contributing to the prevention of cardiovascular diseases (Bai, 2019; Chawla, Sivakumar, & Goel, 2016). Additionally, phytosterols may act as cancer chemopreventive and therapeutic agents against breast, colorectal, and cervical cancer (Alvarez-Sala et al., 2019). Therefore, since they are exclusively found in the plant kingdom, the addition of different sources of phytosterols to animal origin products and dishes may present an alternative way to increase the consumption of these important compounds.

Previous studies have demonstrated the presence of phytosterols in pink pepper. The contents of β -sitosterol, stigmasterol, and campesterol present in fruits were assessed by Silva et al. (2019), who reported values of 166.70, 26.09, and 3.58 mg/100 g, respectively. Nine phytosterols were identified by Sassi et al. (2020) in the lipid fraction of pink pepper: β -sitosterol, campesterol, Δ -7-stigmastenol, stigmasterol, Δ -5-24-stigmastadienol, Δ -5-avenasterol, sitostanol, clerosterol, and Δ -7-avenasterol. Among them, β -sitosterol was the most prominent (74.81 g/100 g), followed by campesterol (5.19 g/100 g). β -sitosterol (11.29 g/100 g) was also quantified in a residue from the *aroeira* processing industry containing the fruit shells (de Araujo Gomes et al., 2020).

2.4 Bioactive compounds in pink pepper

Bioactive compounds are defined as essential and non-essential compounds that occur in nature, are part of the food chain and can promote positive effects on human health (Biesalski et al., 2009). They include naturally occurring plant *phytochemicals*, which are produced as part of the regular metabolic activities of plants, of the primary or, generally, secondary metabolism. They do not appear to participate directly in plant growth and development but confer survival benefits acting in the plant defense mechanisms (Sharangi, 2017). Besides their importance for the plant itself, these metabolites confer sensory attributes such as color, flavor, and aroma, and determine the nutritional quality of food. These compounds are considered to be vital human dietary components and play a fundamental role in the maintenance of human health, mainly due to their antioxidant properties (Embuscado, 2019; Kumar & Goel, 2019).

The phytochemical composition of plants is influenced by numerous factors such as genetic, growing location and environmental conditions, plant nutrition, ripeness stage, harvesting time, among others (Skrovankova, Sumczynski, Mlcek, Jurikova, & Sochor, 2015). In general, the literature has described the presence of a range of bioactive phytochemicals in *aroeira* fruit, where the main ones are phenolic acids, flavonoids, tannins, and terpenes (Carvalho et al., 2013; de Oliveira et al., 2020a; Feuereisen et al., 2014; Salem, Hamed, & Mansour, 2019; Sassi et al., 2020).

The bioactive properties of pink pepper are related to the presence of such secondary metabolites. D'Sousa'Costa et al. (2015) studied the ethanolic extract of pink pepper and detected the presence of the following classes of compounds: saponins, phenolic compounds, hydrolysable tannins, anthocyanins, anthocyanidins, and terpenes. De Oliveira et al. (2020a) evaluated the total phenolic, flavonoid, anthocyanins, and carotenoid contents of pink pepper, finding 13.66 mg GAE/g, 10.33 mg QE/g, 0.13 mg/g, and 24.66 µg/g, respectively. Table 3 summarizes the main findings regarding the total levels of distinct groups of phytochemicals determined by spectrophotometric methods.

Table 3: Total contents of different classes of compounds determined in pink pepper.

Total phenolic content				
Method	Sample	Extraction	Content	Reference
Folin-Ciocalteu spectrophotometric method	Fruits from Curitiba, Parana, Brazil	Extracts prepared with hot water or ethanol	88 µg CE/g DW (water) 685 µg CE/g DW (ethanol)	Degáspari et al. (2004)
	Fruits from Campos do Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil	Fruit and fruit shell: maceration with an	125.4 TAE µg/mL (fruit) 122.0 TAE µg/mL (shell)	Bernardes et al. (2011)

	acetone/water solution (7:3, v/v)		
Fruits from Mata de São João, Bahia, Brazil	Ethanol extracts obtained by Soxhlet (8 h) or maceration (72 h)	5.44 mg GAE/g extract (Soxhlet) 110 mg GAE/g extract (maceration)	D'Sousa'Costa et al. (2015)
Fruits from Florianópolis, Santa Catarina, Brazil	Ultrasound extraction with different solvents: hexane, ethanol, and ethyl acetate	39 mg GAE/g extract (hexane) 14.2 mg GAE/g extract (ethanol) 16 mg GAE/g extract (ethyl acetate)	Andrade et al. (2017)
	Soxhlet with different solvents: hexane, ethanol, and ethyl acetate	Not determined (hexane) 60 mg GAE/g extract (ethanol) 65 mg GAE/g extract (ethyl acetate)	Andrade et al. (2017)
	Supercritical fluid extraction: 150-300 bar / 40-60°C	2.9 mg GAE/g extract (150 bar/60 °C) – 16 mg GAE/g extract (300 bar/40 °C)	Andrade et al. (2017)
Fruits from Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil	Organic fraction of an extract obtained by static maceration for 30 days in methanol (10% w/v)	659.21 mg GAE/ g	de Lima Glória et al. (2017)
Fruits from Ariana (Tunisia)	Mature, half-mature, and immature intact fruits: methanolic extracts obtained by sonication (30 min) and maceration (24 h)	~275 mg GAE/g extract (mature)	Ennigrou et al. (2017)
		~180 mg GAE/g extract (half-mature)	
		~250 mg GAE/g extract (immature)	
Fruits from Ariana (Tunisia)	Hydrodistilled residual of mature, half-mature, and immature fruits: methanolic extracts obtained by sonication (30 min) and maceration (24 h)	~270 mg GAE/g extract (mature)	Ennigrou et al. (2017)
		~200 mg GAE/g extract (half-mature)	
		~240 mg GAE/g extract (immature)	
Dried fruits from Fuchs (Dissen, Germany)	Extracts from the exocarp and internal part of the fruit (called drupe)/ Pressurized liquid extraction	50 mg CAE/g extract (exocarp) 14 mg CAE/g extract (drupe)	Feuereisen et al. (2017)
Fruits from Miami (USA)	Maceration at room temperature for 24 hours (ethanol/hexane, 75/25)	252.2 – 7219 mg GAE/g	Russo et al. (2017)
Fruits from Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil	Methanol: stirring (200 rpm, 2 h, at 25 °C)	12.03 mg GAE/g	Romani et al. (2018)
Fruits from Alexandria (Egypt)	Extracts prepared with acetone and hexane	62.66 mg GAE/g extract (acetone)	Salem et al. (2018)
		5.34 mg GAE/g extract (hexane)	
<i>Aroeira</i> residue (mixture of stems,	Ethanol:water (80:20, v/v): water bath (25 min, at	45.01 mg GAE/g	Serrano-León et al. (2018)

	leaves and rejected fruits) provided by Agrorosa Ltda (São Mateus, Espírito Santo, Brazil)	95°C), sonication (15 min), and centrifugation (15 min, 5000 g)		
	Fruits from Gafsa and Tunis (Tunisia)	Methanolic extract obtained after 48 h of agitation	32.39 - 35.23 mg GAE/g DW	Tlili et al. (2018)
	Fruits from Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, Brazil	Microwave-assisted extraction varying power, time, solvent concentration, and solvent type	476.42 mg GAE/100 mL (70% acetic acid at 600 W for 90 s) 297.44 mg GAE/100 mL (70% ethanol at 600 W for 90 s)	Fortunato et al. (2019)
	Agro-industrial residues of <i>aroeira</i> (mixture of shell, stems, and pulp)	Maceration with a 80% (v/v) ethyl alcohol solution on a rotary shaker under constant mechanical agitation (48 h, at room temperature)	29.20 mg GAE/g	Merlo et al. (2019)
	Fruits from a local commerce of São Paulo, São Paulo, Brazil	80% ethanol-water (v/v): water bath (20 min, 90 °C), sonication (15 min, at room temperature), centrifugation (15 min, 5000 g)	12.17 mg GAE/g	Menegali et al. (2019)
	Fruits from Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil (22°44'38" S; 43°42'27" W)	Extract prepared at a concentration of 10 mg/mL in acetone: ethanol: water solution (40:30:30)	13.06 mg GAE/g DW	Silva et al. (2019a)
	Fruits from Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil (23°00'3"S; 43°34'7"W)	Metanol/water (80:20%, v/v): sonication (30 min) and centrifugation (3500 rpm, 5 min)	13.66 mg GAE/g extract	de Oliveira et al. (2020a)
	Fruits from Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil	Metanol/water (80:20%, v/v): sonication (30 min) and centrifugation (3500 rpm, 5 min)	3.11 mg GAE/g extract	de Oliveira et al. (2020b)
	-	Methanolic extraction (10% w/v) by static maceration for 30 days	125.4 TAE µg/mL	de Oliveira et al. (2020c)
	Fruits from Maceio, Alagoas, Brazil	Ethanolic extracts from the whole fruit and its shell obtained using Soxhlet for 6 h	73.6 GAE/g extract (whole fruit) 454.5 GAE/g extract (fruit shell)	dos Santos Oliveira et al. (2020)
	Fruits from the center of Tunisia	Extracts prepared with acetone or methanol by maceration	2.77 mg GAE/g DW (acetone) 9.21 mg GAE/g DW (methanol)	Sassi et al. (2020)
Total flavonoids				
Method	Sample	Extraction	Content	Reference

AlCl ₃ colorimetric assay	Fruits from Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil	Organic fraction of an extract obtained by static maceration for 30 days in methanol (10% w/v)	140.69 mg RE/g	de Lima Glória et al. (2017)
	Fruits from Ariana (Tunisia)	Mature, half-mature, and immature intact fruits: methanolic extracts obtained by sonication (30 min) and maceration (24 h)	~3 mg QE/g extract (mature) ~6 mg QE/g extract (half-mature) ~3.8 mg QE/g extract (immature)	Ennigrou et al. (2017)
	Fruits from Ariana (Tunisia)	Hydrodistilled residual of mature, half-mature, and immature fruits: methanolic extracts obtained by sonication (30 min) and maceration (24 h)	~3.7 mg QE/g extract (mature) ~7.9 mg QE/g extract (half-mature) ~4.3 mg QE/g extract (immature)	Ennigrou et al. (2017)
	Fruits from Gafsa and Tunis (Tunisia)	Methanolic extract obtained after 48 h of agitation	37.21 - 39.05 mg QE/g DW	Tliti et al. (2018)
	Fruits from Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil (23°00'3"S; 43°34'7"W)	Metanol/water (80:20%, v/v): sonication (30 min) and centrifugation (3500 rpm, 5 min)	10.33 mg QE/g extract	de Oliveira et al. (2020a)
	Fruits from the center of Tunisia	Extracts prepared with acetone and methanol by maceration	70.53 mg RE/g DW (acetone) 298.42 mg RE/g DW (methanol)	Sassi et al. (2020)
Flavonols				
Method	Sample	Extraction	Content	Reference
AlCl ₃ colorimetric assay	Fruits from the center of Tunisia	Extracts prepared with acetone and methanol by maceration	0.15 mg RE/g DW (acetone) 3.68 mg RE/g DW (methanol)	Sassi et al. (2020)
Condensed tannins				
Method	Sample	Extraction	Content	Reference
HCl/butan-1-ol method	Fruits from Campos do Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil	Fruit and fruit shell: extraction with a solution of butanol in hydrochloric acid	2.70% (fruit) 2.54% (shell)	Bernardes et al. (2011)
Methanolic extract was stirred with methanol Vanillin solution and H ₂ SO ₄	Fruits from Gafsa and Tunis (Tunisia)	Methanolic extract obtained after 48 h of agitation	6.82 –7.32 mg CE/g DW	Tlili et al. (2018)
HCl/butan-1-ol method	-	Aqueous extract	2.7%	de Oliveira et al. (2020c)
HCl/butan-1-ol method	Fruits from the center of Tunisia	Extracts prepared with acetone and methanol by maceration	5.63 mg CCE/g DW (acetone) 248.37 mg CCE/g DW (methanol)	Sassi et al. (2020)

Carotenoids				
Method	Sample	Extraction	Content	Reference
Simultaneous determination of carotenoids and chlorophylls (Lichtenthaler, 1987)	Fruits from the Lower São Francisco River, Sergipe, Brazil	Methanol/water (8:2, v/v): sonication (30 min) and centrifugation (at 4200 rpm, 15 min, 4°C)	27.50 µg/g	Pagani et al. (2014)
Simultaneous determination of carotenoids and chlorophylls (Lichtenthaler, 1987)	Fruits from Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil (23°00'3"S; 43°34'7"W)	Metanol/water (80:20%, v/v): sonication (30 min) and centrifugation (3500 rpm, 5 min)	24.66 µg/g	de Oliveira et al. (2020a)
Total anthocyanins				
Method	Sample	Extraction	Content	Reference
Fuleki and Francis (1968)	Fruits from Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil (23°00'3"S; 43°34'7"W)	Extracting solution of 95% ethanol and an aqueous solution of HCl	0.13 mg/g	de Oliveira et al. (2020a)

2.4.1. Phenolic compounds

Plant phenolics are the main source of natural antioxidant compounds. This group includes simple phenols, phenolic acids, flavonoids, coumarins, stilbenes, hydrolysable and condensed tannins, lignans and lignins, which contain one or more hydroxyl groups attached directly to the aromatic ring (de Oliveira et al., 2018; Embuscado et al., 2019; Kumar & Goel, 2019). Besides, they may also have other groups as substituents in their structure, such as: esters, methyl esters, and glycosides (Han, Shen, & Lou, 2007). Figure 1 shows the chemical structure of phenolic compounds previously reported in pink pepper.

The antioxidant property of phenolics is mainly attributed to the reactivity of the phenolic hydroxyl group. However, this activity varies according to the number and arrangement of the hydroxyl groups (Shahidi & Ambigaipalan, 2015). Phenolic compounds are known as direct antioxidants since they act as hydrogen donors, reducing agents, and oxygen and metal ion scavengers in numerous food matrices (de Oliveira et al., 2018; Embuscado et al., 2019). However, they may also induce endogenous antioxidant enzymes and positively regulate signaling pathways, being documented by their indirect antioxidant activity (Kumar & Goel, 2019).

2.4.1.1. Phenolic acids

Phenolic acids are phenolic compounds that also contain one carboxylic acid group. They are commonly found in a variety of plant-based foods in high concentration and can be mainly divided into two sub-groups: hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid, which are derived from benzoic and cinnamic acids, respectively (Soares, 2002).

Although several mechanisms are involved in the antioxidant properties of phenolic acids, the radical scavenging potential *via* hydrogen atom donation has proved to be the main one. However, it is well known that different substituents on the aromatic ring may affect the stabilization of structures, influencing the radical-quenching ability as well (Kumar & Goel, 2019).

The presence of gallic acid, which is a precursor of hydrolyzable tannins, is widely reported in the literature. Skopp and Schwenker (1986) identified gallic acid in the methanolic extract of pink pepper by UV, MS, and NMR spectra. Gallic acid was also determined by UHPLC-DAD-MS/MS analyses of the ethanolic extract obtained from the fruit exocarp (Feuereisen et al., 2014). De Lima Glória et al. (2017) studied the methanolic extract pink pepper partitioned in aqueous and organic fractions and found gallic acid in the ethyl acetate fraction, using HPLC and NMR.

The presence of gallic acid is commonly combined with the identification of its derivatives, such as ethyl gallate. Morais et al. (2017) observed the presence of both compounds in pink pepper by HPLC, confirming their structures by NMR spectral data analysis. (-)-ESI-TOF-MS spectra of ethanolic extract of pink pepper also revealed the presence of gallic acid and ethyl gallate (da Silva et al., 2018), as well as pyrogallol. Ethyl digallate was identified in a methanolic extract using UHPLC-MS/MS (de Oliveira et al., 2020b). Besides gallic acid, de Araujo Gomes et al. (2020) also found its derivatives such as methyl gallate and ethyl gallate in the composition of residues from pink pepper shells by liquid chromatography by Fourier transform mass spectrometry (LC-FTMS).

Tlili et al. (2018) carried out a comparative study between ripe fruits from two regions of Tunisia (Tunis and Gafsa). The authors identified and quantified phenolic acids such as gallic acid and vanilic acid by HPLC analyses. The levels of gallic acid were 5.52% and 2.63% in fruit from Tunis and Gafsa, respectively, while vanilic acid was found only in fruits from Tunis. This demonstrates that the chemical composition of pink pepper may vary according to the

location since *aroeira* trees were grown under different conditions and may have different genotypes.

p-Coumaric and gallic acids were determined in pink pepper shells and in the whole fruit by HPLC analyses (dos Santos Oliveira et al., 2020). In addition, Pagani et al. (2014) detected three phenolic compounds by Ultra-Fast Liquid Chromatography (UFLC), with higher values for vanillic acid (1076.1 mg/100g), followed by ferulic acid (393.8 mg/100g) and *p*-coumaric acid (119 mg/100g), while ellagic acid was found in extracts by Degáspari, Waszczynskyj, and Prado (2005). Romani, Hernández, and Martins (2018) reported the following phenolic compounds in pink pepper: protocatechuic acid (22.55 µg/g), *p*-Hydroxybenzoic acid (20.11 µg/g), *p*-Coumaric acid (4.44 µg/g), syringic acid (1.11 µg/g), gallic acid (0.56 µg/g), ferulic acid (0.49 µg/g), and vanillic acid (0.24 µg/g).

2.4.1.2. Flavonoids

Flavonoids are polyphenolic compounds that have a basic structure known as the flavan nucleus, which consists of 15 carbon atoms arranged in three rings (Panche, Diwan, & Chandra, 2016). Their antioxidant action is well established since they can act as reducing agents, hydrogen donors, singlet oxygen scavengers, superoxide radical scavengers, hydroxyl and peroxy radical scavengers, or even as metal-chelating agents (Procházková, Boušová, & Wilhelmová, 2011). They can be divided into different subgroups according to the level of oxidation and pattern of substitution of the C ring (Panche et al., 2016). Among the subclasses of flavonoids, those of particular interest in pink pepper are flavones, flavonols, and flavanones.

Degáspari, Waszczynskyj, & Prado (2005) detected the presence of the flavanone naringin in an aqueous extract of pink pepper by HPLC analyses. Regarding the flavonols, kaempferol, rutin, and myricitrin have been previously determined in *aroeira* fruit. Myricitrin was identified in a hydroethanolic extract prepared with residues of pink pepper shells by de Araujo Gomes et al. (2020) using liquid chromatography by LC-FTMS. Ethanolic extract of shells and whole fruits presented catechin and epicatechins, which were identified by HPLC (dos Santos Oliveira et al., 2020). In addition, Salem et al. (2018) identified and quantified the flavonol glycoside, kaempferol-3-O-rutinoside (2.6%), in the acetone extract of pink pepper by GC-MS.

Tlili et al. (2018) evaluated pink peppers collected from different locations of Tunisia (Tunis and Gafsa) through HPLC analyses and observed a significant difference between the

levels of flavonoids in these samples. The contents varied as follows: catechin (from 37.33 to 88.26%), epicatechin (from 0.57 to 1.65%), and rutin (from 0.6 to 3.81%). Kaempferol (27.13%) was observed only in samples from Tunis.

The presence of apigenin was detected in the methanolic extract of pink pepper by Degáspari et al. (2005), as well as in the methanolic extract of pink pepper shells by Bernardes et al. (2014) using HPLC and NMR. Then, Bernardes et al. (2014) isolated this flavone and demonstrated its inhibitory effect on the production of nitric oxide by LPS-stimulated macrophages (which contributes to its anti-inflammatory activity), as well as its antimycobacterial activity against *Mycobacterium bovis* BCG.

De Lima Glória et al. (2017) reported the flavanone naringenin in the methanolic extract of pink pepper partitioned in aqueous and organic fractions using NMR and HPLC techniques. Besides flavonols, Tlili et al. (2020) also found the flavone luteolin (17.95%) in pink pepper from Tunisia (Tunis).

2.4.1.3. Biflavonoids

Biflavonoids are dimers of flavonoids formed through radical reactions, differing from other oligomers such as proanthocyanidins, due to their common biogenetic origin. Biflavonoids isolated from different plants have different structural patterns; however, most naturally occurring biflavonoids are dimers of flavones and flavanones (Fidelis, Ribeiro, Araújo, & de Carvalho, 2014).

Skopp and Schwenker (1986) identified biflavonoids such as tetrahydroamentoflavone, dihydroamentoflavone, and amentoflavone in an extract of pink pepper prepared with acetone using column chromatography and UV spectroscopy, while agathisflavone, robustaflavone, and tetrahydrorobustaflavone were identified by Kassem, El-Desoky, and Sharaf (2004) in a methanolic extract by UV, MS, and NMR spectra.

By using UHPLC-DAD-MS/MS analyses, Feuereisen et al. (2014) studied an extract obtained from the exocarp of pink pepper and found amentoflavone, agathisflavone, and II-2,3-dihydro-I3',II8-biapigenin. Feuereisen et al. (2017a) also found amentoflavone and agathisflavone, as well as II-2,3-dihydro-I3',II6-biapigenin and I3',II8-binaringenin using the same chromatographic system. In this study, the authors evaluated both the exocarp and the drupe (pericarp and seed) of pink pepper, and I3',II8-binaringenin was found in its drupe. Later, Feuereisen, Zimmermann, Schulze-Kaysers, and Schieber (2017b) performed another study

aiming to differentiate *Schinus terebinthifolius* from *Schinus molle* fruit by determining their phenolic composition and reported the following biflavonoids: agathisflavone, amentoflavone, I4'-O,II6-biapigenin (hinokiflavone), 2,3-dihydroamentoflavone, and tetrahydroamentoflavone.

Other authors also described the mentioned biflavonoids as pink pepper constituents, determining these compounds using chromatographic techniques as follows: amentoflavone (de Araujo Gomes et al., 2020; Muhs et al., 2017), agathisflavone (de Araujo Gomes et al., 2020; de Oliveira et al. 2020a; de Oliveira et al, 2020b; Muhs et al., 2017), robustaflavone (Muhs et al., 2017), tetrahydroamentoflavone (da Silva et al., 2018; de Araujo Gomes et al., 2020; de Oliveira et al. 2020a; de Oliveira et al, 2020b; Muhs et al., 2017), tetrahydrorobustaflavone (de Araujo Gomes et al., 2020; Muhs et al., 2017), hinokiflavone (de Oliveira et al. 2020a; de Oliveira et al., 2020b). Besides, chamaejasmin was also detected in the methanolic extract of pink pepper by Muhs et al. (2017).

Linden, Brinckmann, Feuereisen, and Schieber (2020) identified four biflavonoids in an extract obtained by liquid-liquid extraction with formic acid/water/ethyl acetate (0.5/50/50, v/v/v) from exocarps and drupes of pink pepper by UHPLC-MS/MS analyses. The exocarp contained three biflavonoids; the main one was agathisflavone (82.3%), followed by amentoflavone (10.3%), dihydroamentoflavone (6.2%), and tetrahydroamentoflavone (1.2%). The drupe extract contained tetrahydroamentoflavone in a concentration of 4.0%. The authors also characterized these biflavonoids in terms of their antibacterial effects, reporting the highest activity for tetrahydroamentoflavone on planktonic cells and its influence on biofilm formation and composition.

2.4.1.4. Anthocyanins

Anthocyanins are colorful members of the flavonoid group widely distributed in nature. An important biological property of anthocyanins is their antioxidant activity, which plays a crucial role in the prevention of cardiovascular, neurological diseases, and cancer (Abdel-aal, Hucl, & Rabalski, 2018; Yue et al., 2019). Furthermore, anthocyanins are natural water-soluble substances, and this facilitates their incorporation into aqueous systems, being a viable alternative for red pigments in food (Khoo, Azlan, Tang, & Lim, 2017).

Extracts from the fruit exocarp were evaluated by UHPLC-DAD-MS/MS, and the following anthocyanins were identified: 7-O-methylpelargonidin 3-O-galactoside (Feuereisen et al., 2014), cyanidin 3-O-galactoside (Feuereisen et al., 2014; Feuereisen et al., 2017b),

pelargonidin 3-O-galactoside and 7-O-methylcyanidin 3-O-galactoside (Feuereisen et al., 2014; Feuereisen et al., 2017a; Feuereisen et al., 2017b), 7-O-methylcyanidin galloylhexoside and 7-O-methylpelargonidin 3-O-galactoside (Feuereisen et al., 2017b), and 7-O-methylpelargonidin 3-O-galactopyranoside (Feuereisen et al., 2017a). Additionally, 7-O-methylpelargonidine 3-O-galactoside was also found in methanolic extracts prepared with whole pink peppers using UPLC-ESI-MS by de Oliveira et al. (2020a) and de Oliveira et al. (2020b).

2.4.1.5. Tannins

The term tannin is used to designate a set of natural polyphenolic compounds that have multiple units with polyhydroxyphenols groups or their derivatives, which are capable of complexing with other compounds such as proteins, cellulose, and minerals. There are two main categories of tannins: hydrolysable and condensed (Hassanpour, Maherisis, & Eshratkhah, 2011).

Hydrolysable tannins can be hydrolytically fractionated into their basic components, polymeric derivatives of gallic acid or ellagic acid and its derivatives (Monteiro, Albuquerque, Araújo, & Amorim, 2005), which have been reported in pink pepper. Condensed tannins are found in higher quantities in food, being defined as oligomers or polymers formed by the condensation of 2 to 50 monomeric units of flavan-3-ol (catechins), joined by carbon-carbon bonds, not susceptible to hydrolytic cleavage (Venter et al., 2012).

The degree of polymerization of tannins has been correlated to their antioxidant activity, since they act as scavengers of free radicals that intercept the active oxygen forming stable radicals. Condensed and hydrolysable tannins of high molecular weight can present an antioxidant activity fifteen to thirty times greater than simple phenols (Sánchez-Moreno, 2002).

Previous studies have reported the presence of this group in pink pepper. Feuereisen et al. (2014) determined two hydrolysable tannins from the gallotannin group in an extract of the fruit exocarp by UHPLC-DAD-MS/MS: galloyl glucoses and galloyl shikimic acids, including galloyl shikimic acids with uncommon degrees of galloylation (tetra- to hexagalloyl shikimic acids). These compounds were later determined in the fruit exocarp (shell) and drupe (pericarp and seed) by Feuereisen et al. (2017b) as well.

Based on the MS/MS spectra of compounds reported in the studies conducted by Feuereisen and co-authors, de Oliveira et al. (2020a) and de Oliveira et al. (2020b) also detected gallotannins in extracts of pink pepper. Besides, gallotannins were found in a hydroethanolic extract obtained from fruit shells by LC-FTMS: galloylshikimic acid, galloylglucose,

galloylquinic acid, digalloylshikimic acid, digalloylglucose, digalloylquinic acid, trigalloylshikimic acid, and trigalloylglucose (de Araujo Gomes et al., 2020), which were responsible for some of the most intense signals of the mass spectra.

2.4.1.6. Other phenolics

The simple phenol cardanol was isolated from pink pepper by Stahl, Keller, and Blinn (1983). The presence of coumarins was reported by Tlili et al. (2018) in a methanolic extracts of pink pepper, from 6.19 to 6.84%. The stilbene resveratrol was found in ethanolic extracts obtained from the whole fruit and from the fruit shell (dos Santos Oliveira et al., 2020).

2.4.2. Terpenes

Terpenes represent a heterogenous group formed by unsaturated hydrocarbons, with different degrees of oxygen in the constituent groups attached to the basic isoprene unit (C₅H₈). Their nomenclature varies according to the number of isoprene structures and the carbon atoms in the molecule (Wagner & Elmadfa, 2003).

They are one of the most representative constituents of *aroeira*, being mainly found in its essential oil (Table 4). Studies of pink pepper essential oil have reported the presence of monoterpenes and sesquiterpenes, besides, oxygenated monoterpenes and oxygenated sesquiterpenes (Barbosa et al., 2007; Cole et al., 2014, Salem et al., 2018).

Table 4: Terpenes present in the essential oil in pink pepper.

Compounds in pink pepper essential oil	Method	Sample origin	Reference
α -thujene, α -pinene, sabinene, β -pinene, α -phellandrene, δ -3-carene, p-cymene, β -phellandrene γ -terpinene, linalool, terpin-4-ol, β -elemene, (<i>E</i>)-caryophyllene, α -humulene, germacrene D, bicyclogermacrene, δ -cadinene, α -cadinene, germacrene B, spathulenol, epi- α -muurolol, α -cadinol, α -bisabolol.	GC-MS	Minas Gerais, Brazil	Barbosa et al. (2007)
α -pinene, β -pinene, sabinene, α -phellandrene, myrcene, α -terpinene, limonene, γ -terpinene, δ -3-carene, p-cimene, α -cubebene, α -cubebene, α -copaene, β -caryophyllene, terpinene-4-ol, α -humulene, trans- β -farnesene, germacrene D, bicyclogermacrene, δ -cadinene, γ -cadinene, α -amorphene, spathulenol, α -cadinol.	GC-MS	Rio Grande do Sul, Brazil	dos Santos et al. (2009)

α -thujene, α -pinene, camphene, sabinene, β -pinene, myrcene, α -phellandrene, α -terpinene, p-cymene, limonene, γ -terpinene, terpinolene, terpinen-4-ol, citronellyl acetate, δ -elemene, α -copaene, (<i>E</i>)-caryophyllene, γ -elemene, aromadendrene, α -humulene, <i>allo</i> -aromadendrene, γ -muurolene, germacrene D, bicyclogermacrene, δ -amorphene, γ -cadinene, δ -cadinene, <i>trans</i> -cadinan-1(2)-diene, α -cadinene, germacrene B, elemol, spathulenol, caryophyllene oxide, salvial-4(14)-en-1-one, γ -eudesmol.	GC-MS and GC-FID	Reunion Island	Périno-Issartier, Abert-Vian, Petitcolas, and Chemat (2010)
α -pinene, β -pinene, p-cimene, α -phellandrene, β -phellandrene, α -terpineol, β -gurjunene, γ -cadinene.	GC-MS	Sfax, Tunisia	Bendaoud et al (2010)
α -pinene, α -felandrene, β -felandrene, limonene, terebanene, β -elemene, α -gurjunene, (-)-(e)- β -cariofillene, germacrene D, germacrene B, α -humulene, α -bergamotene, alloaromadendrene, delta-cadinene.	GC-FID and NMR	Hamburg and Hohenheim, Germany	Richter, von Reuß, and König (2010)
<i>trans</i> -p-Mentha-1(7).8-dien-2-ol, <i>cis</i> -4-Caranone, β -Cyclocitral, Carvone, neo-Menthyl acetate, Verbanyl acetate, α -Cubebene, β -Longipinene, <i>allo</i> -Aromadendrene, δ -Cadinene, Nerolidol, Spathulenol, β -Copaen-4- α -ol, Carotol, Guaiol, Atlantol Isolongifolan-7-ol, 10-epi- γ -Eudesmol, γ -Eudesmol, <i>allo</i> -Aromadendrene epoxide.	GC-MS	Recife, Brazil	do Nascimento, da Camara, de Moraes, and Ramos (2011)
α -pinene, β -pinene, myrcene, δ -3-carene, p-cymene, limonene, cis-sabinene hydrate, terpinen-4-ol, α -terpineol, (e)-caryophyllene, germacrene D, bicyclogermacrene, γ -cadinene, δ -cadinene, elemol.	GC-MS	Minas Gerais, Brazil	Sartoreli et al. (2012)
δ -3-carene, limonene, α -phellandrene, α -pinene, myrcene, σ -cymene, sabinene, β -pinene, isoterpinolene, borneole, 4-terpineol, carvacrol, <i>trans</i> -caryophyllene, γ -muurolene, α -farnesene, δ -cadinene, epi- α -cadinol.	GC-MS	Espírito Santo, Brazil	Cole et al. (2014)
α -thujene, α -pinene, sabinene, β -pinene, α -phellandrene, p-cymene, β -phellandrene, terpinolene, carvacrol, α -elemene, α -copaene, β -elemene, β -caryophyllene, aromadendrene, α -humulene, <i>allo</i> -aromadendrene, germacrene D, bicyclogermacrene, γ -cadinene, spatulenol, globulol, viridiflorol, α -eudesmol,	GC-MS	Northern of Tunisia	Jeribi, Karoui, Hassine, and Abderrabba (2014)
Z-salvene, α -pinene, α -fenchon, sabinene, β -pinene, limonene, 1,8-cineole, β -ocimene, γ -terpinene, terpinen-4-ol, neo-isoverbanol, Z-patchenol, longicyclen, α -copaene, α -funebrene, aromadendrene, germacrene D, bicyclogermacrene, δ -cadinene, spathulenol.	GC-MS	Mato Grosso do Sul, Brazil	Pinto et al (2014)
α -pinene, sabinene, β -pinene, limonene, <i>trans</i> -pinocarveol, α -phellandren-8-ol, terpinen-4-ol, α -terpineol, bornyl acetate, δ -elemene, α -copaene, β -caryophyllene, α - <i>trans</i> -bergamotene, α -humulene, γ -muurolene, germacrene D, α -muurolene, δ -cadinene, Germacrene B, spathulenol, <i>cis</i> -cadinen-4-en-7-ol, α -cadinol, (<i>E</i>)-bisabol-ol.	GC-MS	Rio de Janeiro, Brazil	dos Santos Cavalcanti et al. (2015)

<i>α</i> -thujene, <i>α</i> -pinene, camphene, sabinene, <i>β</i> -pinene, <i>β</i> -myrcene, <i>α</i> -phellandrene, <i>δ</i> -3-carene, <i>α</i> -terpinene, <i>p</i> -cymene, limonene, <i>β</i> -phellandrene, <i>trans-β</i> -ocimene, <i>γ</i> -terpinene, <i>p</i> -cymenene, terpinolene <i>cis</i> - <i>para</i> -menth-2-en-1-ol, thujyl alcohol, <i>trans</i> - <i>para</i> -menth-2-en-1-ol, 3-methyl-3-buthenyl valerate ethyl benzoate, neomenthol, cryptone, <i>p</i> -cymen-8-ol, terpinen-4-ol, <i>α</i> -terpineol, <i>cis</i> -piperitol, <i>α</i> -phellandrene epoxide, <i>trans</i> -piperitol, citronellol, carvone, carvotanacetone, piperitone, methyl citronellate, thymol, carvacrol, methyl geronate, citronellyl acetate, <i>δ</i> -elemene, <i>α</i> -cubebene, geranyl acetate, <i>α</i> -ylangene, <i>α</i> -copaene, <i>β</i> -patchoulene, <i>β</i> -cubebene, <i>β</i> -caryophyllene, <i>γ</i> -elemene aromadendrene, <i>α</i> -humulene, allo-aromadendrene, <i>γ</i> -muurolene, Germacrene D, <i>γ</i> -patchoulene, bicyclogermacrene, <i>α</i> -selinene, <i>γ</i> -cadinene, <i>δ</i> -cadinene, <i>δ</i> -cuprenene, Germacrene B, spathulenol, caryophyllene, globulol, humulene epoxide, <i>β</i> -atlantol, 10-epi- <i>γ</i> -eudesmol, <i>γ</i> -eudesmol, isospathulenol, <i>α</i> -cadinol, cubenol, t-muurolol, <i>α</i> -eudesmol, eudesm-4(15).7-dien-1- <i>β</i> -ol, bulnesol, juniper camphor.	GC-MS	Ariana, Tunisia	Ennigrou et al. (2017)
<i>α</i> -pinene, sabinene, <i>β</i> -myrcene, <i>α</i> -phellandrene, <i>δ</i> -3-carene, <i>p</i> -cymene, limonene, terpinolene, caryophyllene, germacrene D, <i>δ</i> -cadinene, elemol, <i>γ</i> -eudesmol, <i>β</i> -eudesmol, <i>α</i> -eudesmol.	GC-MS	Espirito Santo, Brazil	Silva et al. (2017)
<i>α</i> -pinene, sabinene, <i>β</i> -pinene, myrcene, <i>α</i> -phellandrene, <i>α</i> -terpinene, <i>o</i> -cymene, <i>β</i> -phellandrene, terpinolene, <i>δ</i> -elemene, germacrene D, <i>γ</i> -cadinene, germacrene B, <i>cis</i> -isolongifolanone, <i>trans</i> -isolongifolanone.	GC-MS	Zaghoun, Tunisia	Piras et al. (2017)
<i>α</i> -pinene sabinene, <i>β</i> -pinene, <i>β</i> -myrcene, <i>α</i> -phellandrene, <i>δ</i> -3-carene, <i>α</i> -terpinene, <i>p</i> -cymene, limonene, terpinolene, <i>δ</i> -elemene, caryophyllene, <i>α</i> -himachalene, germacrene D, <i>α</i> -farnesene, <i>δ</i> -cadinene, Elemol, germacrene B, <i>γ</i> -eudesmol, <i>β</i> -eudesmol, <i>α</i> -eudesmol.	GC-MS	Espirito Santo, Brazil	Guzzo da Silva et al. (2018)
<i>δ</i> -3-carene, <i>α</i> -pinene, sylvestrene, iso-sylvestrene, <i>α</i> -phellandrene, germacrene D, myrcene, silphiperfol-6-ene, eugenol, terpinolene, methyl perillate, <i>β</i> -ylangene, <i>β</i> -bisabolol, <i>cis</i> -muurola-3,5-diene, hedyacryol, <i>δ</i> -elemene, <i>α</i> -humulene, isobornyl acetate, <i>δ</i> -cadinene, <i>γ</i> -elemene, <i>trans</i> -sesquisabinene hidrate.	GC-MS	Espirito Santo, Brazil	Schimitberg et al. (2018)
<i>α</i> -pinene, <i>α</i> -phellandrene, <i>m</i> -cymene, Limonene, terpinolene, <i>γ</i> -terpinene, <i>α</i> -terppineol, <i>β</i> -cadinene, <i>α</i> -cadinol, <i>γ</i> -eudesmol, T-muurolol, <i>β</i> -eudesmol.	GC-MS	Egypt	Salem et al. (2018)
<i>α</i> -thujene, <i>α</i> -pinene, sabinene, <i>β</i> -pinene, <i>α</i> -phellandrene, <i>δ</i> -3-carene, <i>p</i> -cymene, <i>β</i> -phellandrene, 1,8-cineole, <i>β</i> - <i>cis</i> -ocimene, <i>p</i> -mentha-2,8-dien-1-ol, <i>trans</i> -pinocarveol, terpinen-4-ol, <i>δ</i> -elemene, <i>α</i> -cubebene, cyclosativene, <i>α</i> -copaene, <i>β</i> -cubebene, <i>β</i> -elemene, longifolene, <i>α</i> -gurjunene, <i>trans</i> -caryophyllene, <i>β</i> -copaene, <i>γ</i> -elemene, <i>α</i> -guaiene, aromadendrene.	GC-MS	Paraná, Brazil	de Campos Bortolucci et al. (2019)
<i>α</i> -pinene, <i>β</i> -pinene, <i>β</i> -myrcene, limonene, copaene, <i>β</i> -elemene, <i>α</i> -gurjunene, caryophyllene, <i>α</i> -caryophyllene, <i>β</i> -farnesene, <i>β</i> -cubebene, <i>γ</i> -muurolene, <i>α</i> -muurolene, <i>γ</i> -cadinene, <i>δ</i> -cadinene, germacrene, <i>δ</i> -cadinol, T-cadinol.	GC-MS	Brazil	da Silva Dannenberg et al. (2019)
<i>β</i> -thujene, <i>α</i> -pinene, sabinene, <i>β</i> -pinene, myrcene, <i>α</i> -terpinene, <i>p</i> -cymene, D-limonene, eucalyptol, <i>γ</i> -terpinene, <i>cis</i> - <i>p</i> -menth-2-en-1-ol, <i>trans</i> - <i>p</i> -menth-2-en-1-ol, terpinen-4-ol, <i>α</i> -terpineol, <i>cis</i> -piperitol, <i>trans</i> -piperitol, <i>β</i> -caryophyllene, spathulenol, caryophyllene oxide, <i>α</i> -muurolol.	GC-MS	Ceará, Brazil	Silva, Azevedo, Dias, Lima, and Rodrigues (2019b)

α -pinene, sabinene, β -pinene, β -myrcene, α -phellandrene, δ -3-carene, p-cymene, D-limonene, δ -elemene, caryophyllene, germacrene D, α -muurolene, δ -cadinene, elemol, germacrene B	GC-MS	Essential oil supplied by LINAX - Essential Oils and Distillers, São Paulo, Brazil	Locali-Pereira et al. (2020)
--	-------	--	------------------------------

Some terpenes are commonly described in pink pepper, independently of the geographic origin of the sample, such as: α -pinene, β -pinene, α -phellandrene, β -phellandrene, caryophyllene, germacrene D (Barbosa et al., 2007, Ennigrou et al., 2017; Locali-Pereira, Lopes, Menis-Henrique, Janzantti, & Nicoletti, 2000; Santos et al., 2009). However, the chemical composition of essential oil may vary according to many factors, such as maturation of the fruit, drying and extraction process, as well as the analytical methods used (Ennigrou et al., 2017; Salem et al., 2018). Besides environmental conditions, nutrient and water availability, as well as seasonality may affect their composition (Barbosa et al., 2007).

The presence of terpenes has also been reported in numerous studies where different solvents were used to extract pink pepper and the essential oil was not extracted from the plant material. The monoterpenes α -pinene, β -myrcene, δ -3-carene, α -phellandrene, and limonene, as well as the sesquiterpenes Germacrene D and caryophyllene were identified by da Silva et al. (2017) in the dichloromethane extract of pink pepper, wherein δ -3-carene (51.78%), limonene (23.85%), and Germacrene D (8.13%) were predominant.

Andrade, Poncelet, & Ferreira (2017) investigated the chemical profile of extracts from *aroeira* fruit, which were prepared using different methods and solvents. The gas chromatography analyses (GC/MS) revealed that the major compound identified in different extracts was germacrene D, followed by sabinene, β and α -phellandrene. Other terpenes were also identified: monoterpenes like β and α -pinene, β -terpinene, β and α -phellandrene, β -thujene, and p-cymene; sesquiterpenes like δ -elemene, 2-carene, copaene, α -farnesene, caryophyllene, humulene, δ -cadinene, germacrene B, and bicyclogermacrene.

Salem et al. (2018) studied an acetone extract of pink pepper by GC/MS and identified terpenes such as α -pinene, α -phellandrene, cosmene, α -bergamotene, β -farnesene, terpinen-4-ol, isocaryophyllene, and δ -cadinene. In this sample, the main component was α -phellandrene (13.3%), followed by δ -cadinene (11.1%) and α -pinene (4.7%).

Monoterpenes and sesquiterpenes were also identified and quantified in a study carried out by Salem, Hamed & Mansour (2019), where the authors evaluated an ethyl ether extract of pink pepper. The following composition was reported: δ -cadinene (7.52%), α -phellandrene

(6.44%), aromadendrene (4.01%), α -caryophyllene (3.10%), α -bergamotene (2.77%), germacrene D (2.21%), α -funebrene (1.71%), farnesol (1.23%), and *p*-cymene (1.22%).

Di- and triterpenes have also been reported in several studies. The triterpene terebinthone was identified by Kaistha and Kier (1962a) in hexane extract of pink pepper. Later, Kaistha and Kier (1962b) carried out a structural study on schinol triterpenes isolated from its ether extract. Lloyd, Jaouni, Evans, and Morton (1977) identified the triterpenes masticadienoic and ursolic acids in the hexane and ethereal extracts of pink pepper. In a study performed by Jain et al. (1995), both masticadienoic acid and schinol (Figure 2) were found in the ethyl acetate extract of pink pepper presenting anti-inflammatory properties due to their action as specific inhibitors of phospholipase A2.

The presence of masticadienoic acid and schinol was also reported in dichloromethane extracts of pink pepper, as well as oleanonic and moronic acids (Vieira et al., 2015). Besides masticadienoic acid and schinol, 3 α -acetytirucalla-7,24Z-dien-27-oic acid was identified by Morais et al. (2017), when they studied the use of ionic liquid in the microwave-assisted extraction process of metabolites from pink pepper. Andrade, Poncelet, & Ferreira (2017) identified the triterpene, β -amyrin. Schinol and masticadienoic acid were also confirmed as pink pepper constituents by de Araujo Gomes et al. (2020) and de Oliveira et al. (2020b) in extracts of pink pepper fruit and shell, respectively. Additionally, schinol was found in an ethanolic extract of fruits by da Silva et al. (2018).

A methanolic extract of pink pepper contained the following terpenes: albsapogenin, (13 α ,14 β ,17 α ,20R,24Z)-3 α -hydroxy-21-oxolanosta-8,24-dien-26-oic acid, (13 α ,14 β ,17 α ,20S,24Z)-3 α -hydroxy-21-oxolanosta-8,24-dien-26-oic acid, (3 α ,13 α ,14 β ,17 α ,24Z)-3-hydroxy-7-oxo-lanosta-8,24-dien-26-oic acid, mollinoic acid, and isomasticadienonic acid (Muhs et al., 2017).

The triterpene 3 α -hydroxymasticadienonic acid was found in a methanolic extract of pink pepper by de Oliveira et al. (2020a), while 3-oxo-olean-12-en-28-oic acid, 3-oxotirucalla-7,24Z-dien-26-oic acid, and 3 α -hydroxytirucalla-7,24 Z-dien-27-oic acid were reported by TANG et al. (2020).

3 ANTIOXIDANT CAPACITY

Reactive oxygen species (ROS) are naturally formed in the body as a result of cellular redox processes and/or originate from external factors, such as irradiation, environmental pollution, smoking, among others. While studies have shown the physiological role of ROS in normal cell functions, recent studies have shown that numerous diseases may arise when there is an excessive production of ROS that cannot be neutralized by endogenous or exogenous antioxidants. ROS, particularly free radicals, react with biomolecules like lipid membranes, protein, and DNA, causing damage to cellular structures and vital intra- and intercellular functions (Sharifi-Rad et al., 2020).

The human organism has several defense mechanisms in response to ROS, including enzymatic activities, metal chelators, and scavengers of radical species. However, this defense system must be supported by exogenous antioxidants from the diet, which minimize or inhibit oxidation processes in food and in the human body (Cömert & Gökmen, 2017).

Exogenous antioxidants are widely distributed in the plant kingdom (Embuscado, 2019). Therefore, there is a growing interest in identifying the antioxidant constituents of natural materials, as well as evaluate their antioxidant capacity. *In vitro* assays are usually applied to determine the antioxidant capacity of natural extracts, being divided into hydrogen atom transfer (HAT) and single electron transfer (SET). HAT-based techniques measure the capacity of an antioxidant to trap free radicals by hydrogen donation, while SET methods are based on the electron transfer reductive ability of an antioxidant compound against a radical species (Pisoschi, Pop, Cimpeanu, & Predoi, 2016).

These tests have peculiarities in relation to the mechanisms of action, targets, pH, time, temperature, and reference antioxidant standards, which are used to generate quantitative results in terms of antioxidant capacity. In addition, the conditions to which the samples are submitted and the method used to obtain an extract may also contribute to variable results. Due to these variations, it is difficult to confirm that these *in vitro* assays can reflect the total antioxidant capacity, although they are good screening methods. Therefore, the scientific community has encouraged these methods to be used in conjunction with chromatographic techniques, which can determine the phytochemical composition of foods (Andrade et al., 2017; Cömert & Gökmen, 2017; Ennigrou et al., 2017).

As previously presented, pink pepper has a wide variety of phytochemical compounds with known antioxidant activity. Therefore, this section provides general information about *in*

in vitro antioxidant analyses carried out with extracts of pink pepper available in the literature (Table 5).

Table 5: Antioxidant capacity of pink pepper.

Reference	Plant material	Extraction	Method	Value
Degáspari et al. (2004)	Fruits from Curitiba, Parana, Brazil	Extracts prepared with hot water or ethanol	DPPH	25% inhibition (water) 53% inhibition (ethanol)
Bernardes et al. (2011)	Fruits from Campos do Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil	Fruit shell / static maceration with methanol (10% w/v) for 30 days	DPPH	87.6 - 95.6% inhibition
Pagani et al. (2014)	Fruits from the Lower São Francisco River, Sergipe, Brazil	Methanol/water (8:2, v/v): sonication (30 min) and centrifugation (4200 rpm, 15 min, 4°C)	DPPH	83.33% inhibition
D'Sousa'Costa et al. (2015)	Fruits from Mata de São João, Bahia, Brazil	Ethanolic extracts obtained by Soxhlet (8 h) or maceration (72 h)	DPPH	60% inhibition (Soxhlet) 55% inhibition (maceration)
Andrade et al. (2017)	Fruits from Florianópolis, Santa Catarina, Brazil	Ultrasound / hexane, ethanol, or ethyl acetate	DPPH	18% inhibition / IC ₅₀ > 1000 µg/mL (hexane) 66% inhibition / IC ₅₀ 339 µg/mL (ethanol) 7% inhibition / IC ₅₀ > 1000 µg/mL (ethyl acetate)
			ABTS	75 µMTEAC/g (hexane) 297 µMTEAC/g (ethanol) 341 µMTEAC/g (ethyl acetate)
			DPPH	6% inhibition / IC ₅₀ > 1000 µg/mL (hexane) 94% inhibition / IC ₅₀ 112 (ethanol) 23% inhibition / IC ₅₀ > 1000 µg/mL (ethyl acetate)
			ABTS	51 µM TEAC/g (hexane) 403 µM TEAC/g (ethanol) 168 µM TEAC/g (ethyl acetate)
			DPPH	1.3% (200 bar/60°C and 150 bar/60°C) - 60% (300 bar/60°C) / IC ₅₀ 88 µg/mL (300 bar/60°C) - IC ₅₀ > 1000 µg/mL
			ABTS	60 µM TEAC/g (150 bar/40°C) - 342 (150 bar/60°C)
de Lima Glória et al. (2017)	Fruits from Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil	Methanolic extract obtained by static maceration for 30 days	DPPH	69.20-77.50% inhibition

Ennigrou et al. (2017)	Mature, half-mature, and immature fruits from Ariana (Tunisia)	Methanolic extracts from intact fruits obtained by sonication (30 min) and maceration (24 h)	DPPH	IC ₅₀ 127.86 µg/mL (immature) IC ₅₀ 218.68 µg/mL (half-mature) IC ₅₀ 154.67 µg/mL (mature)
		Methanolic extracts from hydrodistilled residual of fruits obtained by sonication (30 min) and maceration (24 h)	DPPH	IC ₅₀ 23.95 µg/mL (immature) IC ₅₀ 76.82 µg/mL (half-mature) IC ₅₀ 35.74 µg/mL (mature)
Russo et al. (2017)	Fruits from Miami (USA)	Maceration at room temperature for 24 h (ethanol/hexane, 75/25)	DPPH	81.27% inhibition
		Maceration at room temperature for 24 h (ethanol/hexane at different proportions)	FRAP	0.0549 - 1.657 mg AAE/g
Romani et al. (2018)	Fruits from Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil	Methanol: stirring (200 rpm, 2 h, at 25 °C)	DPPH	12.7% inhibition
(Salem et al., 2018)	Fruits from Alexandria (Egypt)	Extracts prepared with acetone or hexane	DPPH	84% inhibition / IC ₅₀ 118.16 µg/mL (acetone) 70.66% inhibition/ IC ₅₀ 324.26 µg/mL (hexane)
Serrano-León et al. (2018)	<i>Aroeira</i> residue (mixture of stems, leaves and rejected fruits) provided by Agrososa Ltda (São Mateus, Espírito Santo, Brazil)	Ethanol:water (80:20, v/v): water bath (25 min, at 95 °C), sonication (15 min), and centrifugation (15 min, 5000 g)	DPPH	535.74 µM TE/g
			ABTS	931 µM TE/g
			ORAC	158.24 µM TE/g
			Superoxide radical	IC ₅₀ 1.24 mg/mL
Tlili et al. (2018)	Fruits from Gafsa and Tunis (Tunisia)	Methanolic extract obtained after 48 h of agitation	DPPH	IC ₅₀ 182.48 – 202.74 µg/mL
			Phosphomolybdenum	98.05 - 100.61 g GAE/g DW
Silva et al. (2019)	Fruits from Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil (22°44'38" S; 43°42'27" W)	Extract prepared at a concentration of 10 mg/mL in acetone:ethanol:water solution (40:30:30)	DPPH	42.93% inhibition
			FRAP	189.58 µmol Fe ²⁺ /g
			ABTS	348.20 µM TEAC/g DW
de Oliveira et al. (2020a)	Fruits from Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil (23°00'3"S; 43°34'7"W)	Metanol/water (80:20%, v/v): sonication (30 min) and centrifugation (3500 rpm, 5 min)	DPPH	42.68% inhibition
			ORAC	43.40 µM TE/g
			β-carotene/linoleic acid	61.41% inhibition
Sassi et al. (2020)	Fruits from the center of Tunisia	Extracts prepared with acetone or methanol by	DPPH	IC ₅₀ 1.02 mg/mL (acetone) IC ₅₀ 0.41 mg/mL (methanol)

maceration	ABTS	IC ₅₀ 0.98 mg/mL (acetone) IC ₅₀ 0.61 mg/mL (methanol)
------------	------	---

Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC); Trolox Equivalent (TE); Gallic Acid Equivalent (GAE); Acid Ascorbic Equivalent (AAE); Concentration needed to scavenge 50% of a radical (IC₅₀).

3.1. The antioxidant capacity evaluated by *in vitro* assays

The antioxidant capacity of pink pepper has been extensively studied by using the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH); however, data based on other methods such as ABTS (ABTS•+ [2,2-azino-bis-(3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid)] radical scavenging assay), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), β -carotene/linoleic acid, Phosphomolybdenum, and superoxide assays are also available in the current literature. As different solvents, concentrations and methods have been used in these studies, it is impossible to compare results between the studies; however, a strong antioxidant activity was reported by all the authors.

Desgáspari, Waszczyński, and dos Santos (2004) reported antioxidant activities of 25 and 53% (% inhibition) for aqueous and ethanolic extracts of *aroeira* fruits. Bernardes et al. (2011) evaluated the antioxidant capacity of extracts of the fruit shell prepared by static maceration with methanol (10% w/v) for 30 days. Extracts with different concentrations were used (10, 100, and 1000 μ g/mL), showing free radical scavenging activities varying from 87.6 to 95.6%. BHT was used for comparison, presenting great antioxidant potential at its highest concentration (1000 μ g/mL). However, when comparing with extracts at 10 and 100 μ g/mL, the natural extracts showed higher antioxidant potential than BHT.

The hydro-methanolic extract (methanol:water, 80:20, v/v) of pink pepper presented an antioxidant capacity of 83.33% (Pagani et al., 2014). D'Sousa'Costa et al. (2015) carried out a study to compare the antioxidant capacity of ethanolic extracts of pink pepper obtained by Soxhlet (under heating) and maceration (at room temperature), and found approximately 60 and 55% reduction, respectively.

An extract of pink pepper obtained by static maceration for 30 days in methanol (10% w/v) and partitioned with ethyl acetate, to obtain the organic fraction, was evaluated. The authors showed that pink pepper exhibited higher antioxidant capacity when compared to BHT. Results from pink pepper extracts varied from 69.20 to 77.50% reduction, while percentages ranging from 66.30 to 76.40 reduction were found for BHT (de Lima Glória et al., 2017).

Changes in the antioxidant capacity were monitored during maturation by Ennigrou et al. (2017). They compared methanolic extracts obtained through sonication for 30 minutes and

maceration for 24 h. The extracts were from immature, half-mature, and mature fruits, which presented DPPH• free radical scavenging activity (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$) of 127.86, 218.68, and 154.67, respectively. Additionally, extracts obtained from the hydrodistilled residual of fruits showed the following results (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$): 23.95 (immature fruits), 73.82 (half-mature fruits), and 35.74 (mature fruits).

Andrade et al. (2017) investigated the influence of extraction solvents (hexane, ethanol, and ethyl acetate) and methods (soxhlet, ultrasound-assisted extraction, and supercritical fluid extraction) on the antioxidant capacity of pink pepper by DPPH and ABTS assays. Regarding the solvents, the highest value of antioxidant capacity obtained with the DPPH assay was achieved using ethanol, with percentages of 94% (soxhlet), 66% (ultrasound), and 60% (supercritical fluid extraction, 300 bar/60 °C). For the ABTS assay, Trolox was used as the antioxidant reference, and results were expressed as Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC). The extracts prepared with ethyl acetate showed higher values than the ones obtained using hexane and ethanol. Regarding the methods, the best results were achieved with Soxhlet extraction (403 $\mu\text{MTEAC/g}$), followed by ultrasound-assisted extraction (341 $\mu\text{MTEAC/g}$) and supercritical fluid extraction at 150 bar/60 °C (342 $\mu\text{MTEAC/g}$).

Results obtained with the DPPH assay showed that the 75/25 ethanol/hexane extract exhibited the greatest antioxidant activity with a value of 81.27% when different proportions of solvents were evaluated. The extracts were also evaluated by the FRAP assay, showing values ranging from 0.0549 to 1.657 mg acid ascorbic equivalent/g (Russo, Balistreri, Tapanes-Castillo, & Pina, 2017). Salem et al. (2018) determined the antioxidant capacity of extracts of pink pepper prepared with acetone and hexane. Both extracts presented antioxidant capacity, 84 (acetone) and 70.66% (hexane), which was comparable with the tannic acid radical scavenging activity (87%).

Serrano-León et al. (2018) evaluated ethanolic extracts from agro-industrial residues of *aroeira* (a mixture of stems, leaves, and rejected fruits) by DPPH, ABTS, and ORAC assays and found the following values: 535.74 $\mu\text{mol TE/g}$, 931 $\mu\text{mol TE/g}$, and 158.24 $\mu\text{mol TE/g}$, respectively. The authors also determined the superoxide anion scavenging activity of the extract, showing IC_{50} 1.24 mg/mL, which means the quantity of extract required to quench 50% of the superoxide radicals.

An extract of pink pepper prepared in a solution of acetone, ethanol, and water (40:30:30) showed antioxidant activity for DPPH (42.93%), FRAP (189.58 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$), and ABTS (348.20 $\mu\text{MTEAC/g}$) assays. Extracts obtained by the maceration of pink pepper with

methanol and acetone also showed an antioxidant capacity by the ABTS radical scavenging assay, with IC_{50} values of 0.98 mg/mL (acetone) and 0.61 mg/mL (methanol). In addition to the ABTS assay, acetone and methanol extracts were evaluated by the DPPH method as well, showing an IC_{50} value of 1.02 mg/mL and 0.41 mg/mL, respectively (Sassi et al. 2020).

Romani et al. (2018) found an inhibition percentage of 12.7% in a methanolic extract of pink pepper. As described by dos Santos Oliveira et al. (2020), values of 488.6 and 3484.7 μ M TE (Trolox equivalent)/g were obtained for extracts prepared from the whole fruit and from its shell with ethanol in a Soxhlet apparatus, respectively.

Tlili et al. (2018) studied pink peppers collected at two different locations in Tunisia (Tunis and Gafsa). Methanolic extracts were obtained after 48 h of agitation and were evaluated by the methods based on the DPPH radical and the formation of the phosphomolybdenum complex. The results varied between the samples in both methods, as follows: IC_{50} 182.48-202.74 μ g/mL (DPPH) and 98.05-100.61 g GAE/g DW (Phosphomolybdenum).

The methanolic extract of pink pepper studied by de Oliveira et al. (2020a) showed antioxidant potential for ORAC and carotene/linoleic acid assays, with a value of 43.40 μ M equivalent Trolox/g and a percentage of oxidative inhibition of 61.41%, respectively. DPPH assay was also performed in this study, resulting in an inhibition percentage of 42.68%.


Essential oils obtained from pink pepper have also been evaluated. Bendaoud, Romdhane, Souchard, Cazaux, and Bouajila (2010) tested the antioxidant potential of samples collected in Tunisia, reporting IC_{50} values of > 10000 mg/L and 24.1 mg/L by DPPH and ABTS, respectively. The DPPH test was applied by several authors to samples of different origins. Jeribi, Karoui, Hassine, and Abderrabba (2014) found IC_{50} of 82 μ g/mL for a sample of pink pepper essential oil from Tunisia. In contrast, Ennigrou et al. (2017) also tested a sample from Tunisia and found IC_{50} of >1000 μ g/mL. For essential oil obtained from samples collected in Brazil, da Silva Dannenberg, Funck, Mattei, da Silva, and Fiorentini (2016) found IC_{50} value of 23.5 μ g/mL by DPPH assay. In this way, the strong antioxidant activity of diverse types of extracts and essential oil of pink pepper supports its application as a natural antioxidant in food systems.







4. APPLICATION OF PINK PEPPER AS A NATURAL ANTIOXIDANT IN FOOD SYSTEMS

Popular health consciousness has increased over the last years, leading to a growing consumers' demand for more natural and healthy products. As a consequence, the food industry has made efforts to reduce the use of synthetic additives, leading to searches for natural alternatives. Although it is well-documented that lipid oxidation is one of the main causes of quality loss in food, the use of synthetic antioxidants has been the subject of numerous debates. Therefore, much attention has been paid to replacing synthetic antioxidants with natural ones (de Oliveira et al., 2018; de Oliveira et al., 2020b; Saldaña, Serrano-León, Selani, & Contreras-Castillo, 2020).

The use of pink pepper as a natural antioxidant in food systems has been investigated, including the use of extracts obtained from the fruits, agro-industrial residues, and the direct addition of fruits (de Oliveira et al., 2020b; de Oliveira et al., 2020c; Fagundes et al. 2020; Fortunato et al., 2019; Menegali et al., 2019; Merlo et al., 2019; Serrano-León et al., 2018) (Table 6). Most studies evaluate lipid oxidation by determining the peroxide and TBARS values, which indicate peroxides and malonaldehyde (MDA) contents, respectively. Peroxides are intermediated in the autoxidation reaction and their values provide evidence on the early stages of lipid oxidation (index to quantify the amount of hydroperoxide). MDA is a product of the decomposition of hydroperoxides, being a secondary product of oxidation. Thus, both values are sources of valuable data to assess the oxidation status of food (Barriuso, Astiasarán, & Ansorena, 2013).

Table 6: Recent applications of pink pepper in food systems.

Reference	Application	Main objective	Analyses	Main conclusions
Serrano-León et al. (2018) 	An active packing with an ethanolic extract of <i>aroeira</i> agro-industrial residue for a chicken restructured product	Evaluate the packing effects on the physicochemical characteristics and oxidative stability during 7 days of refrigerated storage (3°C)	Peroxide values TBARS	- ↑ oxidative stability - Proved to be as effective as BHT after 7 days of refrigerated storage
Menegali et al. (2019)	Incorporation of an ethanolic extract of pink pepper into chicken burger	Elucidate the effects on the physicochemical characteristics and oxidative stability	TBARS	- ↑ oxidative stability - The addition of pink pepper extract and BHT decreased the TBARS

		during storage at 2° C for 7 days		values by 79.44 and 67.29%, respectively
Merlo et al. (2019) 	An active packing with ethanolic extract of <i>aroeira</i> agro-industrial residue for salmon fillets	Evaluate the packing effects on the quality characteristics and the shelf life of salmon fillets during 28 days of refrigerated storage (2°C)	TBARS	did not increase the antioxidant activity of packing, but improved its antibacterial activity
Fortunato et al. (2019) 	Incorporation of pink pepper extracts (methanol and acetic acid) into sardine fillets	Evaluate the effects of ethanolic and acetic acid extracts on the oxidative stability of sardines stored at 4 °C for 9 days	TBARS	Acetic acid extract reduced lipid oxidation by 5%, while BHT and the ethanolic extract reduced it by approximately 45%
Fagundes et al. (2020) 	Olive oil flavored with pink pepper	Evaluate olive oil aromatization in terms of quality parameters, antioxidant activity, and oxidative stability	Free acidity, Peroxide values, TBARS, Induction and stability time (Rancimat), Spectrophotometric indices (K232, K270, and Kdelta)	↑ oxidative stability
de Oliveira et al. (2020b) 	Addition of ground pink pepper to a model system containing fish oil	Evaluate the protective effect of pink pepper against fatty acids degradation and cholesterol oxidation during heating (150 and 180°C)	Total contents of fatty acids, cholesterol, and cholesterol oxides	- ↓ degradation of polyunsaturated fatty acids - ↓ formation of cholesterol oxides
de Oliveira et al. (2020c) 	Incorporation of an aqueous pink pepper extract into pork sausage	Evaluate the effects of the extract on the oxidative stability during frozen (-18°C) storage for 120 days	TBARS	- ↑ oxidative stability - Proved to be as effective as sodium erythorbate

Serrano-León et al. (2018) developed chitosan films incorporating an extract obtained from *aroeira* agro-industrial residue (stems, leaves, and rejected fruits) and evaluated their effects on the lipid oxidation of a restructured chicken product. For comparison, the extract was also directly added to the chicken product and BHT (butylated hydroxytoluene), a synthetic antioxidant, was used. In general, the extract addition proved to be as effective as BHT to maintain oxidative stability when considering the peroxide and TBARS values. After seven days of storage, the peroxide value of control samples (without antioxidant) was 49% higher than the values determined for the other treatments, which presented similar protection against lipid oxidation. Moreover, the direct addition of extract resulted in the highest protection, decreasing TBARS value by 64% compared to control. The addition of the extract directly into the meat was 23% more efficient than the addition into the film; however, the latter also showed promising results.

The effects of ethanolic and acetic acid extracts of pink pepper (100 ppm) on the oxidative stability of sardines stored at 4°C during 9 days were investigated. Sardine patties treated with BHT (100 ppm) and the solvents were also evaluated for comparison. The MDA contents gradually increased during storage; however, both natural and synthetic antioxidants minimized MDA formation. After 9 days, MDA levels in samples were: samples treated with solvents (from 3.32 to 3.96 mg MDA/kg fish), BHT (1.83 mg MDA/kg fish), ethanolic extract (1.96 mg MDA/kg fish), and acetic acid extract (3.26 mg MDA/kg fish). BHT and pink pepper ethanolic extract reduced lipid oxidation by approximately 45%, while acetic acid extract reduced it by 5%. Since lipid oxidation is more intense at lower pH, it can explain the lower antioxidant activity of acetic acid extract (Fortunato et al., 2019).

In a study carried out by Menegali et al. (2019), the authors incorporated pink pepper methanolic extract into chicken burgers (90 mg GAE/kg meat). The burgers were stored in aerobic and vacuum packaging for 7 days at 2 °C, and at the end of the storage time, samples with pink pepper extract showed lower TBARS values than control samples. Moreover, the natural extract was as effective as BHT in controlling oxidation processes during refrigerated storage. The addition of pink pepper extract and BHT decreased the TBARS values by 79.44 and 67.29%, respectively, when compared to control samples. Results also revealed that packing type did not affect antioxidants' protective effect, demonstrating their effectiveness even in the presence of oxygen (aerobic packaging).

Merlo et al. (2019) evaluated the efficacy of modified atmosphere packaging (100% CO₂) and chitosan films incorporated with an extract obtained from agro-industrial residues of

aroeira (a mixture of shell, stems, and pulp) on the shelf life of Atlantic salmon fillets (2 °C, 28 days). Based on results obtained by TBARS analyses, chitosan films significantly reduced lipid oxidation after 28 days of storage when compared to the control (synthetic absorbent pads). However, both films, with *aroeira* extract and without, presented a similar protective effect, indicating that *aroeira* extract did not increase the antioxidant activity of chitosan. However, chitosan films with *aroeira* extract showed higher antibacterial activity when compared to chitosan films alone or with synthetic absorbent pads.

Fagundes et al. (2020) described the use of ripe and whole pink pepper as a suitable strategy to improve olive oil quality since aromatization with pink pepper increased the oxidative stability of oil. The addition of pink pepper in olive oil significantly reduced the peroxide values, suggesting its protective effect against oxidation. Besides, higher contents of phenolic compounds were found in flavored samples (from 166.30 to 172.85 mg GAE/kg oil) than in control samples (141.71 mg GAE/kg oil). Data obtained from the ORAC assay demonstrated the greater ORAC values of flavored samples. According to the authors, these findings can be associated with bioactive compounds of pink pepper and their possible migration to the oil, promoting an antioxidant environment.

De Oliveira et al. (2020c) determined the TBARS values of pork sausages prepared with aqueous extract of pink pepper at three levels (0.25%, 0.5%, and 1.0%). The sausage samples were frozen and stored for 420 days, and at the end of the storage period, samples with extracts presented lower levels of MDA when compared with control samples (samples with the synthetic additive sodium erythorbate). The treatment with 1% extract was the most effective at delaying lipid peroxidation, showing a MDA content of 1.14, while the control samples presented 2.00 mg MDA/kg.

Pink pepper was also tested as an antioxidant against cholesterol oxidation and consequently formation of cholesterol oxides, which are recognized due to their deleterious effects on health (de Oliveira et al., 2018). Ground pink pepper was applied in a model system containing fish oil during heating (150 and 180°C) by de Oliveira et al. (2020b). The ground fruit was added at 2 concentrations (0.2 and 0.5%), and BHT was applied for comparison. Ground pink pepper proved to be effective in minimizing the loss of important fatty acids and the formation of cholesterol oxides. Heating led to a reduction of fatty acids contents; however, the treated samples maintained 92.11% (0.2% ground pink pepper), 93.86% (0.5% ground pink pepper), and 93.24% (BHT) of the total level of polyunsaturated fatty acids (180 °C). BHT showed the highest protection against cholesterol oxidation; however, the authors highlighted

the fact that BHT was used in the maximum concentration permitted by Brazilian legislation (100 ppm).

The studies depicted above call attention to the potential application of pink pepper as a natural antioxidant in food. They present pink pepper as a promising natural additive to replace synthetic antioxidants since similar or even better results can be achieved (Serrano-León et al., 2018; Fortunato et al., 2019; de Oliveira et al., 2020b). Changes in sensory properties have also been investigated, showing that the addition of pink pepper preserves the sensory characteristics of products (Menegali et al., 2019). The sensory and hedonic perceptions were considered while evaluating chicken burgers prepared with extracts of pink pepper residue added directly to the meat and added to chitosan films, demonstrating that samples showed a medium–high level of acceptance and both treatments did not affect the overall liking of chicken burgers (Saldaña et al., 2020). Besides, pink pepper has also shown remarkable influence on color stability (Fortunato et al., 2019; de Oliveira et al., 2020c) and microbial control (Merlo et al., 2019), as well as on the shelf life of products in which enzymatic browning is unwanted (Romani et al., 2018).

5. CONCLUSION

This review brings together numerous studies available in the literature concerning the chemical composition and bioactive compounds of pink pepper or *aroeira* fruit, which provides scientifically sustained information to highlight pink pepper as a source of health-promoting substances. The biological activities linked to pink pepper are mainly due to its antioxidant properties derived from the presence of phytochemicals such as phenolic acids, flavonoids, tannins, and both volatile and non-volatile terpenes. The consumption of phytochemicals has been shown to improve human health and reduce risks of diseases, recommending their insertion in the diet, either through direct consumption or by incorporating plant materials into food products. Besides, concerns on the toxicological effects of synthetic additives have motivated the replacement of synthetic antioxidants with natural ones. Therefore, pink pepper is a potential alternative to attend consumer's demand for safe and healthier food. Studies were conducted to evaluate the effects of applying pink pepper in food systems, regarding it direct addition or the use of extracts, revealing its effectiveness as a natural antioxidant. Therefore, besides acting as a sensory attribute enhancer, pink pepper may also preserve food from undesirable reactions such as lipid oxidation. However, more research is needed to elucidate its

proper use by the food industry, which encompasses points such as safety and effective dose levels, sensory evaluation, and consumer acceptance of each product to be developed.

CAPÍTULO 2

**EFEITO PROTETOR DOS FRUTOS DA AROEIRA (*Schinus
terebinthifolius* Raddi) FRENTE A FOTO-OXIDAÇÃO DO COLESTEROL E ÁCIDOS
GRAXOS POLI-INSATURADOS EM SISTEMAS MODELO CONTENDO ÓLEO DE
SARDINHAS (*Sardinella brasiliensis*)**

1 INTRODUÇÃO

Os óleos de pescado marinho são considerados alimentos funcionais devido à presença de grandes concentrações de ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3. Embora os altos níveis destes ácidos graxos tornem as sardinhas atraentes do ponto de vista nutricional, estes compostos são altamente susceptíveis à oxidação lipídica (SALDANHA et al., 2008; KAZUO, 2019; DE OLIVEIRA et al., 2020a).

Além dos ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3, nas sardinhas também contêm teores elevados de colesterol, Saldanha, Benassi e Bragagnolo (2008) constataram teores de 219 a 342 mg de colesterol/100 g de músculo em base seca, em sardinhas frescas, enquanto Ferreira et al. (2017) determinaram $237,2 \pm 3,7$ mg de colesterol/100 g de amostra em base seca. Por apresentar uma ligação dupla nas posições 5, 6 do anel B, o colesterol exibe instabilidade oxidativa, podendo ser oxidado por meio de diferentes mecanismos e caminhos de reação, gerando, assim, produtos da oxidação do colesterol (POCs), também conhecidos como óxidos de colesterol.

A formação de óxidos de colesterol e a degradação de ácidos graxos poli-insaturados têm um papel de destaque entre os fatores responsáveis pela perda de qualidade e das características nutricionais do pescado. Em condições de armazenamento no varejo, o pescado é exposto à luz fluorescente e, conseqüentemente, à radiação ultravioleta. Esta exposição pode desencadear o mecanismo de foto-oxidação, responsável pelos processos oxidativos que causam alterações físico-químicas no produto e geram compostos possivelmente deletérios à saúde do consumidos (CARDENIA et al., 2013).

A radiação de comprimento de onda mais curto como a luz ultravioleta (UV) (200–400 nm) é mais energética do que a luz visível (400–750 nm) e, portanto, frequentemente mais perigosa para a estabilidade oxidativa dos lipídeos e a qualidade dos nutrientes. O início dos processos de foto-oxidação em lipídeos se dá pela produção de oxigênio singlete (1O_2), a partir do O_2 na presença de luz, que ataca as ligações duplas de AGPI e a ligação dupla do anel B do colesterol 1500 vezes mais rápido que o oxigênio triplete, presente na auto-oxidação (VEJDAN; OJAGH; ABDOLLAHI, 2017).

Além disso, o consumo de lipídeos oxidados tem sido alvo de constantes investigações na área de saúde pública, uma vez que existem correlações entre a ingestão dos mesmos e efeitos deletérios à saúde, tais como o desenvolvimento de alterações cardiovasculares e outras doenças crônicas degenerativas (LEOPOLD; LOSCALZO, 2009; ZHONG et al., 2019).

Os POCs podem causar efeitos biológicos negativos à saúde, tais como aterogênese, citotoxicidade, mutagênese, carcinogênese, apoptose, alterações na funcionalidade das membranas celulares, inibição da biossíntese do colesterol e modulação seletiva do receptor de estrogênio, além de estarem associados a transtornos neurológicos como mal de Alzheimer e mal de Parkinson (MINTZER; CHARLES; GORDON, 2010; ORCZEWSKA-DUDEK et al., 2012; VICENTE et al., 2012; KHATIB; VAYA, 2014; THANAN et al., 2014; XUE-SHAN et al., 2016; MISHRA; MISHRA, 2017).

Atualmente ocorre uma crescente preocupação da população em adquirir hábitos saudáveis, condição esta que reflete diretamente sobre seu estilo de vida e sua forma de alimentação, alertando-se cada vez mais sobre os constituintes dos alimentos que são ingeridos, optando-se preferencialmente por alimentos livres de componentes sintéticos (LORENZO et al., 2018).

O fruto da aroeira (*Schinus terebinthifolius*), uma planta nativa da América do Sul, popularmente conhecida como cambuí, pimenta rosa ou pimenta brasileira, pode ser uma boa opção de agente antioxidante para minimizar a oxidação lipídica (DE OLIVEIRA et al., 2020b). Estudos indicam que os frutos da aroeira possuem atividade antibacteriana e propriedades antioxidantes, antibiabéticas, antiinflamatórias, antinociceptivas, antihiperlipidêmicas e antiaterogênicas. Estes atributos estão relacionados à capacidade antioxidante dos compostos bioativos presentes nos frutos, tais como taninos, flavonóides, antocianinas, terpenos e ácidos fenólicos, que sustenta seu potencial, não só como condimento, mas também como uma possível alternativa para a substituição dos antioxidantes sintéticos (DA ROCHA et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2020b; LINDEN et al., 2020; FERIANI et al., 2021a; FERIANI et al., 2021b).

Desta forma, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito protetor obtido pelo tratamento com adição de 3 níveis dos frutos da aroeira moídos (1 %, 2% e 3%) em sistemas modelo contendo óleo de sardinhas expostos à luz fluorescente durante 15, 30, 45 e 60 dias, comparados às amostras controle e amostras com adição de BHT. Com os resultados obtidos, espera-se recomendar condições para evitar a formação dos produtos de oxidação do colesterol e garantir a segurança na ingestão destes alimentos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Padrões, reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados no experimento foram: metanol, hexano, acetona e etanol (Neon); nitrito de sódio, carbonato de cálcio, ácido acético glacial, ácido clorídrico, carbonato de sódio, sulfato de sódio anidro, ácido acético glacial, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, isopropanol, ácido tricloroacético, clorofórmio, n-hexano e 2-propanol grau Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (Vetec); BHT (butilidroxitolueno), TEP (1,1,3,3-tetraetoxipropano); metóxido de sódio reagente Folin-Ciocalteu, tricloreto de alumínio, quercetina, ácido gálico, 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox), 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e hexano UV-HPLC (Sigma-Aldrich); ácido fórmico, clorofórmio e fosfato monossódico (Synth); metanol de qualidade para HPLC e 2-ácido tiobarbitúrico (Merck); EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (Dinâmica Química Contemporânea LTDA); e a água desionizada foi obtida com um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Com pureza de pelo menos 95%, os padrões colesterol e o 7 α -hidroxicolesterol (7 α -OH) foram adquiridos da Steraloids (Wilton, N.H., U.S.A.), o 7-cetocolesterol (7-ceto), 7 β -hidroxicolesterol (7 β -OH), 5,6 α -epoxicolesterol (5,6 α -Ep), 5,6 β -epoxicolesterol (5,6 β -Ep), 20 α -hidroxicolesterol (20 α -OH), 22S-hidroxicolesterol (22S-OH) e 25-hidroxicolesterol (25-OH) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., EUA). O éster metílico undecanóico foi adquirido na Sigma e as misturas padrão de ácidos graxos foram adquiridas na Supelco TM 37 (FAME Mix 18919, Bellefonte, Pa., U.S.A.).

2.2 Fruto da aroeira

Os frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi foram coletados no Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil, na latitude 22°44'38"S e longitude 43°42'27"W, em maio de 2018. O material vegetal foi autenticado e o comprovante do espécime (RBR 15557) foi depositado no Herbário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

Os frutos maduros foram colhidos manualmente considerando sua coloração avermelhada, firmeza, tamanho e ausência de dano físico aparente e contaminação. Os frutos

colhidos foram lavados em água corrente para a retirada das sujidades mais grosseiras da superfície e pesados. Em seguida, os frutos foram secos em estufa com circulação de ar (Tecnal, São Paulo), a 30 °C, durante 24 horas. Após a retirada de umidade, os frutos inteiros foram triturados em multiprocessador doméstico (Arno, São Paulo), para obtenção dos frutos moídos. O material foi peneirado em peneira de 1mm e, em seguida, acondicionado em sacos de polietileno, embalados à vácuo e armazenados à temperatura ambiente na ausência de luz até o preparo das amostras.

2.3 Compostos bioativos e capacidade antioxidante

2.3.1 Preparação do extrato da pimenta rosa

Aproximadamente 2 g dos frutos da aroeira foram homogeneizados com 20 mL de solução metanol/água (80:20 % v/v). A mistura foi sonificada por 30 minutos em ultrassom com frequência de 40 Hz (Elmasonic P, Elma Schmidbauer GmbH) e posteriormente centrifugada em centrífuga de bancada (NI 1813, Nova Instruments) a 3500 rpm por 5 minutos, seguida da retirada do sobrenadante para um frasco âmbar.

A concentração do extrato preparado foi obtida determinando-se o teor de resíduo seco do extrato. O volume de 1 mL do extrato foi transferido para vidro relógio, previamente tarado, onde permaneceu em estufa à 105 °C, por 16 horas. Em seguida foi resfriado em dessecador e procedeu-se com a pesagem, sendo a operação repetida até peso constante, obtendo então o resíduo seco em mg/mL de extrato (AOAC, 1995). Foi determinada a concentração de 0,0203 g/mL de extrato.

2.3.2 Compostos Fenólicos Totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados seguindo o método de Folin-Ciocalteu (SWAIN; HILLIS, 1959). Água desionizada (7 mL) foi adicionada ao extrato (0,5 mL) e então misturada com 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos, a mistura foi homogeneizada com solução de carbonato de sódio a 20% (2 mL) e exposta a aquecimento em banho-maria (100 °C) durante 1 min. A absorvância foi avaliada a 685 nm. Os resultados foram obtidos a partir de uma curva de calibração preparada com ácido gálico e os resultados foram expressos como mg GAE/g de amostra (base seca).

2.3.3 Flavonoides Totais

O conteúdo de flavonoides totais foi determinado utilizando-se o método colorimétrico descrito por Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999), com modificações (SCAPIN et al., 2016). Uma alíquota de 250 µL do extrato foi misturada com 1250 µL de água destilada e 75 µL de solução de nitrito de sódio (5%). Após 5 minutos, 150 µL de solução de tricloreto de alumínio a 10% foi adicionada, deixando-se a mistura descansar por mais 5 minutos e seguindo com a adição de 500 µL de solução de hidróxido de sódio (1 M) e 775 µL de água destilada. A mistura foi homogeneizada e a absorbância medida em espectrofotômetro (Modelo NOVA 2000 UV) a 510 nm. O conteúdo total de flavonoides foi determinado utilizando-se uma curva padrão de quercetina com concentrações variando de 0 a 4×10^{-4} g/mL ($r=0,9901$). Os resultados foram expressos em mg de equivalente quercetina (EQ) por grama de amostra.

2.3.4 Carotenoides Totais

Os carotenoides totais foram analisados de acordo com a metodologia proposta por Lichtenthaler (1987). Para extração, 2 g dos frutos da aroeira foram macerados e adicionados a 0,2 g de carbonato de cálcio e 7 mL de acetona 80%. O extrato foi filtrado para balão volumétrico de 25 mL e o volume aferido com o solvente. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Modelo NOVA 2000 UV) a 470 nm para carotenoides totais, 647 nm e 663 nm para clorofila a e b, respectivamente. Os resultados foram expressos em µg/g e a concentração de carotenoides totais foi determinada de acordo com as equações apresentadas a seguir:

$$\text{Clorofila } a \text{ (Ca)} = [12,25 A_{663.2} - 2,79 A_{646.8}]$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (Cb)} = [21,50 A_{646.8} - 5,10 A_{663.2}]$$

$$\text{Carotenoides totais} = [100 A_{470} - (1,82Ca - 104,96 Cb)/198]$$

2.3.5 Ensaio antioxidante de determinação do poder de redução ferro (FRAP)

A atividade antioxidante do extrato dos frutos da aroeira foi realizada pelo ensaio FRAP, de acordo com o método proposto por Rufino et al. (2010), com modificações. A reação teve início após a adição de água destilada (270 µL) e reagente FRAP (2,7 mL) ao extrato (90 µL).

A mistura foi mantida a 30°C por 30 min e a absorbância determinada a 595 nm. Os resultados foram obtidos usando uma curva de calibração e expressos como μmol de Fe^{+2}/g de amostra.

2.3.6 Ensaio de sequestro de radicais livres (DPPH)

O ensaio DPPH foi realizado de acordo com o método proposto por Rufino et al. (2010), com modificações. Para determinar a atividade antioxidante, através da redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) pelos antioxidantes presentes nas amostras, o extrato (0,15 mL) foi homogeneizado com 2,85 mL de solução de DPPH (0,06 mM) e deixado em repouso a 25 °C na ausência de luz por 1 hora, então a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Modelo NOVA 2000 UV) a 517 nm. A quantificação foi realizada com uma curva de calibração de Trolox variando de 5 – 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Trolox ($r=0,9988$) e a taxa de inibição (% I) foi calculada da seguinte forma:

$\% I = (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{control}} \times 100$, onde A_{controle} é a absorbância de DPPH e A_{amostra} corresponde à absorbância de cada amostra contendo DPPH.

2.4 Identificação de compostos bioativos por UHPLC-ESI-MS

As análises cromatográficas foram realizadas com um cromatógrafo UPHLC Acquity acoplado a um espectrômetro de massas TQD Acquity (Micromass-Waters), com ionização por eletrospray (ESI) nos modos de íons negativos e positivos. Os parâmetros de MS otimizados foram os seguintes: tensão capilar, ± 3.00 kV; temperatura de dessolvatação, 350 °C; temperatura da fonte, 150 °C; cone ± 30 V; aquisição de dados entre m/z 100 e 900; e MS/MS dos picos selecionados adquiridos via CID com energia de colisão de 30 V. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna C18 BEH Waters Acquity (2.1 mm x 50 mm x 1.7 μm) a 30 °C. A vazão com uma fase móvel binária de 0.1% de ácido fórmico (solvente A) e metanol grau HPLC (solvente B) e o volume de injeção foi de 5 μL . O gradiente linear foi otimizado como segue: taxa de fluxo de 0.2 mL/min; 0 min, 5% B; 7.5–9 min, 100% B; 10 min, condições iniciais, seguido de reequilíbrio da coluna. A identificação proposta dos compostos foi realizada por comparação de seus produtos de íons com os dados obtidos da literatura. Os Espectros de massas dos frutos da aroeira moída identificados por UHPLC-ESI-MS/MS com modo de íons positivos e negativos, indicando tempos de retenção (min), íons precursores m/z e fragmentos principais m/z são apresentados no Anexo 2.

2.5 Extração do óleo de sardinhas

As sardinhas (*Sardinalla brasilliensis*) foram obtidas no município de Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil, em maio de 2018. O pescado foi lavado e posteriormente foi processado em um moedor (Becker, Santa Catarina, Brasil) para a obtenção de uma massa homogênea, que foi seca em estufa com circulação de ar (Solab, São Paulo, Brasil) a 35 °C por 72 h. O pescado seco foi moído em seguida, para obtenção da farinha. O óleo foi extraído da massa de sardinha seca por extração a frio, de acordo com a metodologia preconizada por Bligh e Dyer (1959), com modificações, utilizando uma mistura de clorofórmio-metanol-água. Optou-se por utilizar uma metodologia à temperatura ambiente para evitar qualquer tipo de degradação a fração lipídica devido a exposição a temperaturas elevadas. O óleo extraído foi armazenado em frascos âmbar, submetido à atmosfera de nitrogênio (99%, White Martins, RJ, Brasil), sendo armazenado a temperatura de refrigeração e na ausência de luz até preparo dos sistemas modelo.

2.6 Sistema modelo: preparação e exposição de amostras à foto-oxidação

Para o sistema modelo foram avaliados 2 fatores, o primeiro fator foi a porcentagem de adição dos frutos de aroeira moídos nos níveis 0%, 1%, 2% e 3%. O segundo fator foi o tempo de exposição à luz fluorescente (0, 15, 30, 45 e 60 dias). Para efeitos de comparação, adicionalmente, foi utilizado o BHT nos mesmos tempos de exposição, de acordo com o conteúdo máximo permitido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para óleos e gorduras (ANVISA, 2019).

O sistema modelo foi construído de acordo com Andersson e Lingnert (1998), com modificações. Foram utilizadas 2 lâmpadas fluorescentes brancas do tipo tubular de 20 watts e 60 cm de comprimento, dispostas no interior de uma Estufa Incubadora BOD (ThermoFisher, PR505750R-CN) à 15 ± 1 °C. As lâmpadas foram colocadas 30 cm acima das amostras que estavam dispostas em Placas de Petri com 7 cm de diâmetro, para aumentar a superfície de contato com a radiação. A intensidade da luz na superfície das amostras foi de 1400 lux, medida por meio de um luxímetro digital (Vonder, LDV2000). As amostras foram analisadas após 15, 30, 45 e 60 dias de exposição à radiação.

2.7 Ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs)

A quantificação das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Vyncke et al. (1975), com modificações. Em tubos, 5 mL da solução de TCA (75 g de ácido tricloroacético, 1 g de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 1000 mL de água destilada) e 5 mL da solução de TBA (0,2880 g de 2-ácido tiobarbitúrico e 100 mL de água destilada) foram adicionados a 0,15 g da amostra de óleo. Os tubos foram homogeneizados em vortex e dispostos em béquer com água fervente a 100°C por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram filtradas em papel de filtro e a absorbância foi medida em espectrofotômetro (modelo NOVA 2000 UV) a 532 nm.

Os resultados foram expressos em g de malonaldeído (MDA) por 100 g de amostra (óleo), utilizando-se uma curva de calibração ($r=0.9994$) preparada com TEP (1,1,3,3-tetraetoxipropano).

2.8 Composição de ácidos graxos

Uma alíquota das amostras (50 mg) foi submetida à transesterificação e convertida em éster metílico (ZHU et al., 2011). Os ésteres de metila foram analisados usando um cromatógrafo de gás (Shimadzu GC 2010, Tokio, Japão), injeção usando o modo dividido (1:50) split/splitless, coluna capilar de sílica fundida CP-SIL 88 (100 m × 0,25 mm id., espessura de filme de 0,20 µm) (Chrompack, Middelburg, Holanda), detector de ionização de chama e computador de estação de trabalho. As condições cromatográficas foram: temperatura inicial de 140 °C por 5 min, depois, a temperatura aumentou a uma taxa de 4 °C/min até 230 °C (0 min), depois 5 °C/min até 240 °C (18 min). As temperaturas do injetor e do detector foram estabilizadas em 250 °C e 280 °C, respectivamente. O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste (1 mL/min) e o nitrogênio como o gás de reposição (30 mL/min). A identificação dos picos cromatográficos das amostras foi realizada avaliando os tempos de retenção dos padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos e a quantificação foi realizada por padronização interna, utilizando o éster metílico undecanóico (C11:0) como padrão interno. Os cromatogramas referentes aos resultados são apresentados no anexo 1.

2.9 Colesterol e óxidos de colesterol

A extração do colesterol e seus produtos de oxidação foi realizada de forma simultânea de acordo com Dionisi et al. (1998). O colesterol e os óxidos de colesterol foram obtidos por saponificação direta das amostras a 20 °C durante 22 horas na ausência de luz, utilizando-se 4 mL de solução aquosa de hidróxido de potássio (1 M) a 50%, 6 mL de etanol e 0,15 g de amostra. Após esta etapa, foram realizadas quatro extrações da matéria-prima insaponificável com hexano, adicionando-se 5 mL de água destilada e 10 mL de hexano. A fração hexânica foi separada da fase aquosa e concentrada. Para as análises cromatográficas as amostras foram diluídas em 1 mL de fase móvel para serem injetadas no CLAE (SALDANHA et al., 2006).

A identificação e quantificação foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em um HPLC-PDA-IR (Waters, Milford, MA, EUA), equipado on-line com os detectores PDA (Waters 2998) e o índice de refração (RID-Waters, 2414), injetor Rheodyne com um loop de 20 µL, um sistema terciário solventes (Waters 600), forno aquecido a 32°C ± 1°C (CTO-3840) e software (Empower 2). Foi utilizada uma coluna analítica Nova Pack CN HP (300 mm x 3,9 mm x 4 mm, Waters, Milford, MA, EUA) e a fase móvel utilizada foi composta por n-hexano:2-propanol (97:3, v/v) com um fluxo de 1 mL/min. Devido aos produtos de oxidação 5,6 α -epoxicolesterol e 5,6 β -epoxicolesterol não possuírem ligações π e por isso não apresentarem características adequadas de absorção de luz UV, esses compostos foram detectados apenas pelo índice de refração. Os compostos foram determinados por comparação dos tempos de retenção dos picos nas amostras com aqueles dos padrões de referência. O detector PDA foi usado para quantificação por padronização externa usando curvas de calibração (Anexo 1) (SALDANHA et al., 2006).

2.10 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados foram analisados por meio de ANOVA de duas vias, onde foram detectadas diferenças estatísticas. As repetições foram aceitas quando o coeficiente de variação apresentou um nível médio menor que 20% para cada amostra (DANTAS et al., 2021). Para as amostras controle e com adição do fruto da aroeira foi utilizado o teste Tukey de comparação múltipla de médias, e para sua comparação frente ao BHT foi utilizado o teste Dunnett. Todas as análises estatísticas foram realizadas a nível de significância de 5%.

As cinéticas de degradação do colesterol e ácidos graxos foram calculadas a partir da equação cinética fundamental (equação 1) que foi integrada para obter a cinética de ordem zero, primeira e segunda ordem (equações 2, 3 e 4, respectivamente) (VAN BOEKEL, 1996).

$$(1) \int_{C_0}^C \frac{dC}{C^n} = \int_0^t k dt$$

$$(2) C_t = C_0 - kt$$

$$(3) C_t = C_0 * \exp(-kt)$$

$$(4) \frac{1}{C_t} = \frac{1}{C_0} + kt \quad \text{ou} \quad C_t = \frac{C_0}{1+ktC_0}$$

Onde, C_t é a concentração final, C_0 é a concentração inicial. k é a constante de velocidade e n é a ordem de reação.

Posteriormente, o efeito linear e quadrático dos frutos da aroeira foi adicionado para as equações acima (2-4), e foram obtidas as seguintes equações 3D:

$$(5) C_t = C_0 + \beta_1 PR + \beta_{11} PR^2 + \beta_2 t + \beta_{22} t^2 + \beta_{12} PR \cdot t$$

$$(6) C_t = C_0 + \beta_1 PR + \beta_2 t + \beta_{22} t^2 + \beta_{12} PR \cdot t$$

$$(7) C_t = C_0 + \beta_1 PR + \beta_{11} PR^2 + \beta_2 t + \beta_{12} PR \cdot t$$

$$(8) C_t = C_0 + \beta_1 PR + \beta_{11} PR^2 + \beta_2 t + \beta_{22} t^2$$

$$(9) C_t = C_0 + \beta_1 PR + \beta_2 t + \beta_{22} t^2$$

$$(10) C_t = C_0 + \beta_1 PR + \beta_{11} PR^2 + \beta_2 t$$

$$(11) C_t = C_0 + \beta_1 PR + \beta_2 t + \beta_{12} PR \cdot t$$

$$(12) C_t = C_0 + \beta_1 PR - kt$$

$$(13) C_t = C_0 + \beta_1 PR + C_0 * \exp(-kt)$$

$$(14) C_t = C_0 + \beta_1 PR + \beta_{11} PR^2 C_0 + C_0 * \exp(-kt)$$

$$(15) C_t = C_0 + \beta_1 PR + \frac{C_0}{1+ktC_0}$$

$$(16) C_t = C_0 + \beta_1 PR + \beta_{11} PR^2 + \frac{C_0}{1+ktC_0}$$

Onde C_0 e C_t são a concentração inicial e final do composto de interesse, β_1 e β_{11} são os coeficientes lineares e quadráticos do antioxidante dos frutos da aroeira (PR) e K é a constante de velocidade.

Foram selecionadas as equações que apresentaram maiores valores de coeficiente de determinação (r^2). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando a linguagem estatística de programação R.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade antioxidante do extrato dos frutos da aroeira (*in vitro*)

3.1.1 Ensaio de sequestro de radicais livres (DPPH)

O extrato metanólico dos frutos de *S. Terebinthifolius* apresentou uma inibição de $84,45 \pm 1,61\%$ (Tabela 7). Este método é considerado altamente sensível, preciso e rápido e se baseia no sequestro do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•) por dois mecanismos de reação que causam neutralização ou redução de um radical pelo composto antioxidante, através do decréscimo da absorbância do meio de reação (Oliveira 2015). A elevada atividade antioxidante dos frutos da aroeira pode ser atribuída aos compostos bioativos identificados, entre eles os compostos fenólicos que apresentam anéis aromáticos em sua estrutura e são capazes de estabilizar e deslocar elétrons desemparelhados de radicais livres, reduzindo os danos oxidativos (NAYAK; LIU, TANG, 2015).

De Oliveira et al. (2020a) e Bernardes et al. (2014) evidenciaram valores de inibição variando entre $42,68 \pm 0,05\%$ e $95,6\% \pm 0,96\%$ para extratos metanólicos obtidos por sonificação e centrifugação de frutos maduros inteiros e maceração estática das cascas de frutos maduros por 30 dias, respectivamente. As distintas partes do fruto, assim como as diferentes metodologias utilizadas nos dois estudos podem influenciar a eficiência da extração e conseqüentemente, a taxa de inibição.

Tabela 7: Capacidade antioxidante, fenólicos, flavonóides e carotenóides totais presentes no fruto da aroeira.

	DPPH	FRAP	Fenólicos totais	Flavonóides totais	Carotenóides totais
	% inibição	$\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$	mg GAE/g	mg EQ/g	$\mu\text{g/g}$
80% metanol	$84,45 \pm 1,61\%$	$121,54 \pm 1,31$	$5,05 \pm 0,19$	$4,16 \pm 0,11$	$25,42 \pm 0,48$

GAE (ácido gálico equivalente); EQ (equivalente de quercetina).

Os extratos metanólicos obtidos por sonificação e centrifugação dos frutos da aroeira também apresentaram resultados significativos de atividade antioxidante em estudo realizado por Pagani et al. (2014). Os autores encontraram valor de 83,33% para o extrato metanólico. Silva et al. (2019) avaliaram a atividade antioxidante de frutos maduros de *S. terebinthifolius* utilizando um extrato preparado em solução de acetona, etanol e água (40:30:30), submetidos a agitação no escuro por 1 hora e encontraram uma atividade antioxidante de $42,93 \pm 3,40\%$.

D'Sousa'Costa et al. (2015) realizaram um estudo comparando a atividade antioxidante de extratos etanólicos de frutos maduros da *S. terebinthifolius* obtidos por soxhlet (sob aquecimento por 8 horas) e maceração (por 72h à temperatura ambiente), utilizando o método DPPH de radical livre estável. Os autores evidenciaram uma atividade antioxidante de 60,37% para extrato etanólico obtido por soxhlet e 55% para o extrato etanólico obtidos por maceração.

Andrade et al. (2017) avaliaram a atividade antioxidante por meio do ensaio DPPH, utilizando extratos de frutos maduros de *S. terebinthifolius* preparados por diferentes métodos (Soxhlet, extração assistida por ultrassom e extração de fluido supercrítico) e solventes (hexano, etanol e acetato de etila). Os extratos que apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante foram obtidos utilizando etanol como solvente para os métodos Soxhlet (94%), ultrassom (66%), e extração de fluido supercrítico a 300 bar / 60 °C (60%), respectivamente.

De Lima Glória et al. (2017) determinaram a atividade antioxidante da fração G5 de frutos maduros de *S. terebinthifolius* obtida após a extração por maceração estática durante 30 dias em metanol (10% w/v) e partição com acetato de etila e separação em cromatografia de coluna. Os autores evidenciaram que a fração estudada apresentou uma alta atividade antioxidante quando comparada com o BHT, visto que houve uma variação de $69,2 \pm 6,47$ a $77,5 \pm 2,57\%$ de atividade antioxidante nos frutos, enquanto o BHT apresentou uma variação de $66,3 \pm 4,20$ a $76,4 \pm 4\%$.

Um estudo conduzido por Salem et al. (2018) objetivou determinar a atividade antioxidante do extrato de acetona e n-hexano de frutos maduros de *S. Terebinthifolius*. Os teores da atividade antioxidante total do extrato de acetona e n-hexano, medida pelo ensaio DPPH, foram 84 ± 1 e $70,66 \pm 2,31\%$, respectivamente. A menor atividade antioxidante do extrato de n-hexano pode estar relacionada a menor extração de compostos fenólicos do solvente, quando comparado ao extrato de acetona.

3.1.2 Ensaio antioxidante de determinação do poder de redução do ferro (FRAP)

A determinação do poder de redução do ferro do extrato metanólico dos frutos de *S. Terebinthifolius* foi de $121.54 \pm 1.31 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$. O ensaio antioxidante FRAP é baseado na redução do Fe^{3+} (complexo incolor) para Fe^{2+} (complexo azul intenso), devido sua interação com o antioxidante, embora o mecanismo exato de sua capacidade antioxidante e a influência da estrutura dos compostos em sua atividade ainda não foi totalmente elucidado (SPIEGEL et al., 2020).

Silva et al. (2019) avaliaram a capacidade antioxidante de frutos maduros de *S. terebinthifolius* com ensaio o FRAP, utilizando um extrato preparado em solução de acetona, etanol e água (40:30:30), submetidos a agitação na ausência de luz por 1 hora. Foi evidenciada uma capacidade antioxidante de $189.58 \pm 2.39 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ de amostra. Dos Santos Oliveira et al. (2020) avaliaram as capacidades antioxidantes equivalentes de Trolox

(TEACFRAP) dos extratos brutos das frutas inteiras e casca de *S. terebinthifolius* preparados com etanol, em aparelho de Soxhlet, aquecido por um período de 6 h. Os autores determinaram $488,6 \pm 81,1$ (TEACFRAP $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ de extrato seco) nos extratos etanólicos brutos de frutos inteiros e $3484,7 \pm 255,5$ (TEACFRAP $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ de extrato seco) nos extratos obtidos a partir das cascas dos frutos. As variações identificadas na literatura podem estar associadas a diferenças no perfil de compostos fenólicos entre os frutos, tempo de reação e tipo de extrato utilizado.

3.2 Compostos bioativos

3.2.1 Fenólicos totais

O conteúdo fenólico total do extrato dos frutos de *S. terebinthifolius* foi de $5,05 \pm 0,19$ mg de ácido gálico por grama de extrato (GAE/g). Estudos anteriores relataram resultados variados, devido a fatores que podem influenciar os resultados desta metodologia, tais como tempo de reação, concentração do reagente e estrutura química dos polifenóis presentes. Andrade; Poncelet e Ferreira (2017) utilizaram diferentes métodos (Soxhlet, extração assistida por ultrassom e extração de fluido supercrítico) e solventes (hexano, etanol e acetato de etila) e relataram que os maiores valores foram para acetato de etila como solvente para o método soxhlet (65 ± 1 mg GAE/g), etanol como solvente para o método soxhlet (60 ± 1 mg GAE/g) e hexano como solvente para o método ultrassom (39 ± 2 mg GAE/g).

Ennigrou et al. (2017) quantificaram os compostos fenólicos totais do extrato metanólico, obtido pela sonificação e maceração dos frutos intactos em 3 estágios de maturação (imaturo, meio maduro e maduro) evidenciando que o maior conteúdo total de fenólicos foi observado último estágio de maturação dos frutos (aproximadamente 275 mg GAE/g), enquanto os frutos imaturos e meio maduros apresentaram aproximadamente 255 e 200 mg GAE/g, respectivamente.

Tlili et al. (2018) compararam os extratos metanólicos de frutos maduros de duas regiões da Tunísia, obtidos por agitação por 48 h e encontraram 32,39 e 35,23 mg GAE/g (matéria seca). SASSI et al. (2020) compararam os extratos de metanol e acetona obtidos pela maceração de frutos maduros, evidenciando um conteúdo de $2,77 \pm 0,07$ mg GAE/g (matéria seca) para o extrato de acetona e $9,21 \pm 0,06$ mg GAE/g (matéria seca) para o extrato de metanol.

De oliveira et al. (2020a) determinaram o conteúdo fenólico total presente nos extratos de metanol e água (80:20% v/v), obtidos após sonificação dos frutos maduros e encontraram aproximadamente 13,66 mg GAE/g. O conteúdo fenólico total do extrato metanólico de frutos maduros obtidos por sonificação foi de aproximadamente 3,11 mg GAE/g (DE OLIVEIRA, V. S. et al., 2020b).

3.2.2 Flavonóides totais

O conteúdo total de flavonoides obtido no extrato dos frutos de *S. Terebinthifolius* foi de $4,16 \pm 0,11$ mg de equivalente quercetina por grama de amostra (Tabela 7), que contribuiu significativamente para o conteúdo de compostos fenólicos totais. Este valor foi mais elevado do que o conteúdo determinado Ennigrou et al. (2017) em extrato metanólico obtido através da sonificação e maceração dos frutos maduro, que foi cerca de 3 mg EQ/g de extrato. Conteúdos mais elevados foram evidenciados em extratos metanólicos obtidos por sonificação e centrifugação dos frutos maduros em um estudo realizado por de Oliveira et al. (2020a) e em extratos metanólicos de frutos maduros de duas regiões da Tunísia, obtidos por agitação em um estudo conduzido por Tlili et al. (2018). Os autores determinaram um nível aproximado de 10,33 e 37,21 - 39,05 mg de quercetina equivalente por grama de amostra, respectivamente. Os três estudos citados utilizaram o metanol como solvente no preparo dos extratos, mas em proporções distintas, utilizando outros tipos e tempos de extrações.

Utilizando rutina como padrão na curva de calibração de Lima Glória et al. (2017) determinaram um conteúdo total de $140,69 \pm 9,44$ mg de rutina equivalente por grama de extrato metanólico, obtido por maceração estática metanol. Sassi et al. (2020) realizaram um estudo comparativo para determinar o conteúdo flavonóide total dos extratos de acetona e metanol obtidos pela maceração de frutos maduros de *S. terebinthifolius*. No estudo os autores evidenciaram um conteúdo de $70,53 \pm 1,5$ e $298,42 \pm 2,5$ mg de rutina equivalente por grama de amostra seca.

Dentre os fitoterápicos atualmente estudados, os flavonoides têm merecido destaque em virtude da sua ampla gama de ações biológicas e terapêuticas demonstradas tanto em condições experimentais como em seres humanos. Estudos revelaram diversas atividades biológicas de interesse, dentre elas, atividades antioxidante, antimicrobiana, antibacteriana, antifúngica, antiviral, hepatoprotetora, anti-inflamatória, antidiabética, cardioprotetora, antiaterosclerótica, antitrombogênica, cardioprotetora e anticarcinogênica (TAPAS; SAKARKAR; KAKDE,

2008). Estudos reportaram a presença de flavonoides como rutina, kaempferol, catequina, epicatequina, luteína (TLILI et al., 2018), miricetina (DE ARAUJO GOMES et al., 2020), apigenina, naringina e narigenina (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; PRADO, 2005; BERNARDES et al., 2014 e DE LIMA GLÓRIA et al., 2017) nos frutos da aroeira.

3.2.3. Carotenóides totais

O conteúdo total de carotenoides determinado para os frutos de *S. Terebinthifolius* foi $25,42 \pm 0,48 \mu\text{g/g}$ de amostra, que corrobora com outros estudos realizados utilizando extrato metanólico dos frutos de aroeira. Os compostos carotenoides apresentam a capacidade de impedir a oxidação de substratos, promovendo efeitos benéficos ao organismo e atuando em diferentes mecanismos de defesa antioxidante (FIEDOR; BURDA, 2014; KURUTAS, 2016). A característica estrutural comum dos carotenoides, presentes em frutas e vegetais, é a cadeia polieno, um longo sistema de ligação dupla conjugada que confere à molécula a capacidade de absorver oxigênio singlete e radicais livres, para interromper as reações em cadeia, neutralizando assim o meio (SILVA et al., 2010). Embora os compostos fenólicos sejam os principais componentes bioativos dos extratos naturais responsáveis pelas propriedades antioxidantes desses materiais, as plantas são matrizes alimentares de composição diversificada e complexa.

Pagani et al. (2014) reportaram a presença de $27,50 \pm 0,23 \mu\text{g/g}$ de carotenoides totais nos extratos metanólicos dos frutos da aroeira, extraídos por sonificação e centrifugação. Valores semelhantes foram relatados por de Oliveira et al. (2020a). Neste estudo foram determinados $24,66 \pm 0,05 \mu\text{g/g}$ de carotenoides totais no extrato metanólico, também obtido por sonificação e centrifugação.

3.2.4 Identificação de compostos bioativos por UHPLC-ESI-MS

A identificação dos compostos bioativos do extrato da aroeira por UHPLC-ESI-MS/MS é apresentada na Tabela 8. A maioria dos compostos foi determinada no modo negativo devido ao seu caráter ácido. Os terpenóides, ácido 3α -hidroximasticadienólico (m/z 455) e ácido masticadienólico (m/z 453) foram encontrados na aroeira. Além disso os íons com m/z 371, 373 e 469 foram identificados como terpenóides. Identificações semelhantes foram relatadas anteriormente nestes frutos (KAISTHA; KIER, 1962; JAIN et al., 1995; SAWAYA et al., 2006;

CARNEIRO et al., 2016; DA SILVA et al., 2018; DE ARAUJO GOMES et al. , 2020; DE OLIVEIRA et al., 2020a; DE OLIVEIRA et al., 2020b). Dois ácidos graxos também foram detectados: ácido linoléico (m/z 279) e ácido esteárico (m/z 283) (DA SILVA et al., 2018; DE ARAUJO GOMES et al., 2020; DE OLIVEIRA et al., 2020a).

Nas massas, a presença de digalato de etila (m/z 349) e uma galotanina (m/z 539) foram confirmadas em comparação com dados de literatura (FEUEREISEN et al., 2014; FEUEREISEN et al., 2017a; DE ARAUJO GOMES et al., 2020; DE OLIVEIRA et al., 2020a; DE OLIVEIRA et al., 2020b). Além disso, duas biflavonas foram detectadas também no modo de íon negativo como m/z 537 (agathisflavona) e 541 (tetrahydroamentoflavona). Esses achados estão de acordo com as identificações anteriores (SKOPP; SCHWENKER, 1986; FEUEREISEN et al., 2014; FEUEREISEN et al., 2017a; FEUEREISEN et al., 2017b; MUHS et al., 2017; DA SILVA et al., 2018 ; DE ARAUJO GOMES et al., 2020; DE OLIVEIRA et al., 2020a; DE OLIVEIRA et al., 2020b; LINDEN et al., 2020).

Por ionização ESI em modo positivo, outra biflavona conhecida como hinokiflavona (m/z 539) foi detectada (FEUEREISEN et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2020a; DE OLIVEIRA et al., 2020b). A antocianina 7-O-metilpelargonidina 3-O-galactosídeo foi detectada como m/z 447, assim como em estudos desenvolvidos por FEUEREISEN et al. (2014), DE OLIVEIRA et al. (2020a) e DE OLIVEIRA et al. (2020b). Estes compostos identificados por ionização ESI correspondem somente a uma fração dos compostos presentes nos frutos da aroeira.

O reino vegetal é constituído por uma grande variedade de compostos, portanto é essencial identificá-los para melhor compreender os benefícios gerais da planta. Compostos similares aos encontrados neste estudo foram relatados por outros autores (DE OLIVEIRA et al., 2020a; DE OLIVEIRA et al., 2020b). No entanto, a composição da planta pode variar de acordo com o genótipo, origem, época de colheita, maturidade, entre outras questões (DI VITTORI et al., 2018). Portanto, como as amostras de aroeira não foram coletadas no mesmo local e foram expostas a diferentes condições ambientais, novos estudos visando a identificação de tais constituintes contribuem para elucidar o potencial nutricional e de saúde desta fruta.

Considerando as diferentes classes de compostos aqui identificados, os compostos fenólicos desempenham um papel importante contra o estresse causado por espécies reativas de oxigênio, que podem resultar em diversas patologias como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (EMBUSCADO, 2019). Além disso, sua capacidade como eliminadores de radicais livres podem ser estendidas aos sistemas alimentares.

A literatura tem relatado amplamente o uso de antioxidantes obtidos de fontes naturais, uma vez que seus constituintes podem retardar ou inibir a iniciação ou interromper a fase de propagação durante a oxidação lipídica (EMBUSCADO, 2019). Além disso, a oxidação do colesterol origina óxidos de colesterol que apresentam riscos notáveis à saúde humana. Os POCs apresentados em alimentos têm sido relacionados a alterações na membrana celular, inflamação, efeitos carcinogênicos, mutagênicos e citotóxicos (KULIG et al., 2016; SOTTERO et al., 2019). Assim, estratégias para limitar a formação de POCs são necessárias, principalmente aquelas que sugerem o emprego de antioxidantes naturais.

Tabela 8: Identificação de compostos bioativos do extrato da fruta da aroeira por UHPLC-ESI-MS/MS.

Modo positivo				
Tempo de retenção (min)	Íon precursor <i>m/z</i>	Fragmentos principais <i>m/z</i>	Identificação atribuída	Referência
4,389	447	285,3	7-O-metil pelargonidina 3-O-galactosídeo	FEUEREISEN et al. (2017b)
4,521	539	375,4; 403,0	Hinokiflavona	FEUEREISEN et al. (2017b) DE OLIVEIRA et al. (2020a) DE OLIVEIRA et al. (2020b)
Modo negativo				
Tempo de retenção (min)	Íon precursor <i>m/z</i>	Fragmentos principais <i>m/z</i>	Identificação atribuída	Referência
3,076	349	197,3	Digalato de etila	DE ARAUJO GOMES et al. (2020) DE OLIVEIRA et al. (2020b)
3,862	541	415; 389,2	Tetrahydroamentoflavona	SKOPP; SCHWENKER (1986) FEUEREISEN et al. (2017b) MUHS et al. (2017) DA SILVA, J. H. et al. (2018) DE ARAUJO GOMES et al. (2020) DE OLIVEIRA et al. (2020b) (DA SILVA, J. H. et al., 2018) (DE OLIVEIRA et al., 2020a) LINDEN et al. (2020)
4,159	539	387,3; 413,3	Galotanino	FEUEREISEN et al. (2014) FEUEREISEN et al. (2017b) DE ARAUJO GOMES et al. (2020) DE OLIVEIRA et al. (2020b) DE OLIVEIRA et al. (2020a)
4,489	537	537	Agatisflavona	FEUEREISEN et al. (2014) MUHS et al. (2017) FEUEREISEN et al. (2017a) DE ARAUJO GOMES et al. (2020) DE OLIVEIRA et al. (2020b) DE OLIVEIRA et al. (2020a) LINDEN et al. (2020)
6,826	469	469,4	Ácido triterpeno	DE ARAUJO GOMES et al. (2020) DE OLIVEIRA et al. (2020a)
7,568	279	279,3	Ácido linoléico	DE ARAUJO GOMES et al. (2020) DE OLIVEIRA et al. (2020a)

7,631	453	453,4	Ácido masticadienóico	DE ARAUJO GOMES et al. (2020) LLOYD et al. (1977) KAISTHA; KIER (1962) SAWAYA et al. (2006) DE OLIVEIRA et al. (2020b)
7,825	455	455,4	3 α - hidroximasticadienóico	KAISTHA; KIER (1962) JAIN et al. (1995) SAWAYA et al. (2006) DA SILVA, J. H. et al. (2018) DE ARAUJO GOMES et al. (2020) DE OLIVEIRA et al. (2020b) DE OLIVEIRA et al. (2020a)
8,020	371	327,3; 371,3	Ácido terpênico	CARNEIRO et al. (2016) DE OLIVEIRA et al. (2020a)
8,153	283	283,6	Ácido esteárico	DA SILVA, J. H. et al. (2018) DE ARAUJO GOMES et al. (2020) DE OLIVEIRA et al. (2020a)
8,232	373	329,5; 373,5	Ácido terpênico	CARNEIRO et al. (2016) DE OLIVEIRA et al. (2020a)

3.3 Efeito protetor dos frutos da aroeira sobre a formação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) após a foto-oxidação

Os resultados obtidos para a análise de TBARS estão apresentados na Tabela 9 em mg MDA/100g de óleo. O óleo controle sem exposição à luz fluorescente apresentou valores de TBARS de $2 \pm 0,7$ mg MDA/100g de óleo. Esse resultado está de acordo com os valores obtidos por De Oliveira et al. (2020) para óleo de sardinha, que encontraram 2,4 mg MDA/100g de óleo e por Maqsood e Benjakul (2010) que encontraram 5,2 mg MDA/100g de emulsão de óleo de pescado/água. Resultados inferiores foram determinados por Grigorakis et al. (2010) em óleo de sardinhas e óleo de pescado comercial, os autores encontraram teores de 0,5 e 9,6 mg MDA/100g de óleo nas amostras estudadas, respectivamente. Jaswir et al. (2009) estudaram amostras de óleos de cinco espécies de pescado diferentes (*Cynoglossus língua*, *Pristipomodes typus*, *Psettodes crumei*, *Scolidon sorrakowah* e *Scomberomorus commersoni*) e encontraram valores variando entre 0,12 e 0,14 mg MDA/100g de óleo.

Outros estudos envolvendo pescado *in natura* observaram valores de 0,058, 0,074 e 0,079 mg MDA/100g de tecido muscular para amostras de *Sardina pilchardus*, *Oncorhynchus*

mykiss e *Sardinella aurita*, respectivamente (OZOGUL et al., 2011; CARDENIA et al., 2013; RAEISI et al., 2016).

Tabela 9: Valores de TBARS (mg MDA/100g de óleo) dos diferentes tratamentos.

	Controle	Aroeira 1%	Aroeira 2%	Aroeira 3%	BHT
Dia 0	2 ^D	-	-	-	-
Dia 15	16,6 ^{B;a;*}	14,3 ^{A;b;*}	13,2 ^{A;b;*}	10,9 ^{A;c}	^a 10,5
Dia 30	18,4 ^{A;a;*}	13,3 ^{AB;b;*}	8,7 ^{B;c}	8,9 ^{B;c}	^a 10,1
Dia 45	15,5 ^{BC;a;*}	12,1 ^{B;b;*}	9,3 ^{AB;c}	9,2 ^{B;c}	^a 8,2
Dia 60	14,2 ^{C;a;*}	12,4 ^{AB;b;*}	8,6 ^{B;c;*}	9,9 ^{B;c;*}	^b 5,8

Letras minúsculas diferentes do lado esquerdo dos números, indicam diferença estatística ($p < 0.05$) entre os dias no tratamento BHT (pelo teste de tukey); Letras maiúsculas diferentes na direita do número, indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre os dias quando comparados por cada tratamento (pelo teste de tukey); Letras minúscula diferentes na direita do número, indicam diferença estatística significativa ($p < 0.05$) entre os tratamentos comparados no mesmo dia (pelo teste de tukey); * indica diferença estatística ($p < 0.05$) dos tratamentos frente ao BHT quando comparados nos mesmos dias (pelo teste de dunnet).

A exposição dos óleos à luz fluorescente acarretou um aumento nos valores de TBARS para todos os tratamentos. Para as amostras controle observou-se um aumento nos valores de TBARS nos primeiros 30 dias, seguido de uma redução nos 30 dias posteriores (Figura 9). A taxa mais alta de formação de malonaldeído que ocorreu nos 30 primeiros dias de exposição à luz fluorescente, provavelmente, se deve à destruição dos hidroperóxidos em produtos de oxidação secundária, especialmente aldeídos nos estágios posteriores da oxidação lipídica (CHAIJAN et al., 2006).

Cardenia et al. (2013) observaram um aumento significativo dos produtos da oxidação secundária em amostras de tecido muscular de sardinha expostos à luz fluorescente durante 4 horas. Os autores relataram uma variação de 57,57% entre as amostras expostas à luz, embora o valor máximo foi alcançado após 1 hora de armazenamento. Os valores de TBARS não exibiram um aumento contínuo devido à interação do aldeído com outros componentes da matriz, como proteínas, aminas e peptídeos. Além disso, os autores indicam que o tempo de exposição à luz fluorescente pode não ter sido longo o suficiente para impactar significativamente a quebra de hidroperóxidos e resultar em um aumento considerável do conteúdo de TBARS durante o armazenamento. Por outro lado, as amostras armazenadas na ausência de luz apresentaram uma redução de 42,17% durante o tempo de exposição à luz, confirmando que a foto-oxidação impactou a formação de TBARS.

Chaijan et al. (2006) relataram um aumento acentuado e constante no conteúdo de TBARS do músculo da sardinha ao longo do armazenamento em gelo após 15 dias. Os autores evidenciaram um aumento de 0,17 mg MDA/100g de tecido muscular nas amostras *in natura* para 6 mg MDA/100g de tecido muscular, nas amostras congeladas durante 15 dias).

No presente estudo, a oxidação lipídica ocorreu rapidamente no óleo da sardinha, provavelmente devido ao seu alto conteúdo de ácidos graxos insaturados e colesterol. O maior grau de oxidação do óleo de peixe exposto à luz fluorescente pode ter sido acelerado pela energia de radiação desse tipo de fonte de irradiação (BOSELLI et al., 2005). Além disso, a disposição das amostras em placas de Petri aumentou a superfície de contato entre os óleos e a luz fluorescente.

A adição de antioxidantes nos óleos reduziu a formação de malonaldeído em todos os tratamentos estudados. A Figura 9 apresenta o teor de proteção dos antioxidantes frente à reação de TBARS ao longo dos 60 dias de exposição à luz fluorescente. De maneira geral, o antioxidante sintético foi capaz de inibir a reação do ácido tiobarbitúrico de forma mais efetiva, quando comparado ao fruto da aroeira, exceto para as amostras expostas por 30 dias à luz fluorescente, onde a adição de 2% e 3% do fruto mostrou uma maior efetividade na inibição da formação de TBARS, quando comparado ao BHT. Além disso, a adição de 2% do fruto não apresentou diferenças significativas em relação ao BHT nos dias 30 e 45, enquanto a adição de 3% do fruto não apresentou diferenças significativas quando comparado ao BHT nos dias 15, 30 e 45, sugerindo assim a substituição do antioxidante sintético pelo natural.

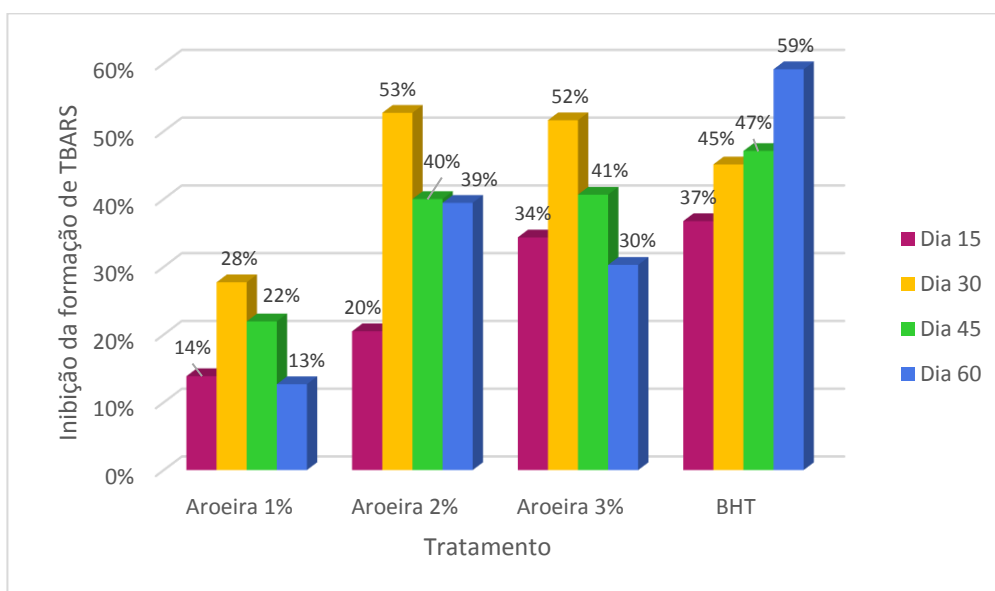


Figura 9: Inibição da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nos diferentes tratamentos com antioxidantes comparados aos controles durante a foto-oxidação.

O efeito protetor dos frutos da aroeira está associado à presença de compostos bioativos que podem atuar inibindo as reações em cadeia e protegem os lipídeos, pois atuam como doadores de hidrogênio, agentes redutores e captadores de oxigênio e íons metálicos em

inúmeras matrizes alimentares (DE OLIVEIRA et al., 2018; EMBUSCADO et al., 2019). De Oliveira et al. (2020) estudaram o efeito protetor dos frutos da aroeira frente à termo-oxidação em sistemas modelo contendo óleo de sardinhas, expostos a temperaturas de 150 e 180 °C. Os autores relataram que a adição de 0,2 e 0,5% do fruto da aroeira foi capaz de inibir a formação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em todos os tratamentos, evidenciando que não houve diferenças significantes entre os tratamentos com BHT e adição de 0,5% do fruto da aroeira, em ambas às temperaturas aplicadas no estudo.

3.4 Efeito protetor dos frutos da aroeira sobre os teores de ácidos graxos após a foto-oxidação

Vinte e cinco ácidos graxos foram identificados nas amostras não expostas à radiação ultravioleta e apresentaram a seguinte distribuição: $36,52 \pm 0,22$ g de Ácidos Graxos Saturados (AGS)/100 g de óleo, $24,06 \pm 0,11$ g de Ácidos Graxos Monoinsaturados (AGMI)/100 g de óleo e $34,97 \pm 0,11$ g de AGPI/100 g de óleo. Os principais ácidos graxos determinados foram palmítico (C16:0, $21,70 \pm 0,14$ g/100 g de óleo), eicosapentaenóico EPA (C20:5 ω 3, $16,24 \pm 0,03$ g/100 g de óleo), docosaheptaenóico DHA (C22:6 ω 3, $14,45 \pm 0,06$ g/100 g de óleo), oléico (C18:1 ω 9c, $10,43 \pm 0,04$ g/100 g de óleo), mirístico (C14:0, $8,88 \pm 0,05$ g/100 g de óleo) e palmitoléico (C16:1 ω 7, $8,45 \pm 0,08$ g/100 g de óleo) (Tabela 10). Autores relataram perfis de ácidos graxos semelhantes em sardinhas (SANTOS JÚNIOR et al., 2014; FERREIRA et al., 2017; BANDARRA et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2020a; ERKAN et al., 2020).

A exposição à radiação UV causou uma diminuição nos níveis de ácidos graxos monoinsaturados (AGMIs) e ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) de 11,72 e 89,10% (comparação entre amostra controle sem exposição à luz fluorescente e amostra controle exposta por 60 dias), respectivamente (Figura 10). Em geral, foi encontrada uma diminuição acentuada nos níveis de AGPI (de 34,97 para 3,81 g/100 g de óleo, comparando a amostra controle sem exposição UV e amostra controle exposta à luz fluorescente durante 60 dias), principalmente relacionada ao DHA (C22:6 ω 3), EPA (C20:5 ω 3), di-homo- α -linonênico (C20:3 ω 3) e linolelaídico (C18:2 ω 6t).

Na maioria dos tratamentos, não foram observadas diferenças significativas entre a proteção dos antioxidantes sintético e natural frente a foto-oxidação dos AGPI, indicando que o fruto da aroeira é uma boa opção para substituir o uso dos antioxidantes sintéticos. A adição de 1% do fruto da aroeira foi mais efetiva que o BHT na proteção da degradação dos AGPI nas

amostras expostas à luz fluorescente durante 30 dias. O mesmo foi observado para a adição de 3% do fruto da aroeira nas amostras expostas durante 60 dias.

Cardenia et al. (2013a) identificaram uma diminuição dos níveis de AGPIs de 47,36 para 38,72% em sardinhas expostas à foto oxidação durante 4 horas a 4°C, quando comparadas com as amostras não tratadas (tempo 0). Essa queda é atribuível à sua maior suscetibilidade dos ácidos graxos poli-insaturados à foto-oxidação, iniciada pela produção de oxigênio singlete ($^1O^2$) a partir do O_2 na presença de luz, que ataca as ligações duplas de AGPIs mais rápido do que a autooxidação e originam radicais livres e peróxidos por um mecanismo de reações em cadeia (HSIEH; KINSELLA, 1989; FRANKEL, 1987; ORLIEN; HANSEN; SKIBSTED, 2000).

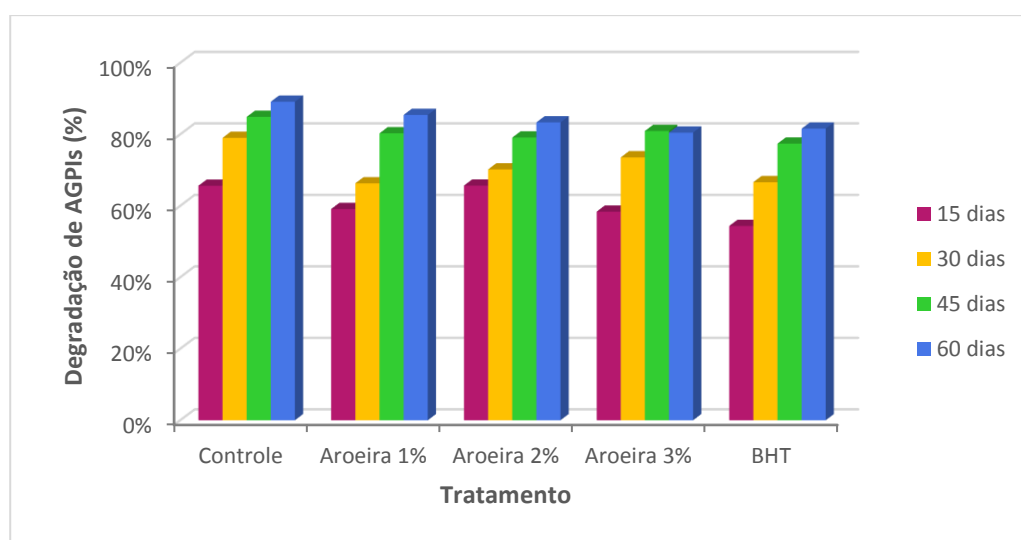


Figura 10: Degradação de AGPIs nos diferentes tratamentos expostos à radiação durante 15, 30, 45 e 60 dias.

A determinação do coeficiente satisfatório do modelo cinético de primeira ordem, aplicado para os tratamentos com o BHT (r^2 0,822) e do modelo cinético de efeito quadrático utilizado para os tratamentos com diferentes níveis de adição dos frutos da aroeira (r^2 0,829), indicam adequado ajuste dos modelos matemático, sugerindo que estes modelos são eficazes para uma possível avaliação do efeito protetor dos antioxidantes, que podem estar relacionados a reduções constantes na velocidade da reação em cadeia, facilitada pela foto-oxidação dos AGPIs por longos períodos de exposição à luz fluorescente.

O efeito da adição dos frutos da aroeira para os AGS, ajustado no modelo de cinética, apresentou um efeito quadrático, onde a adição de 2% apresentou um maior efeito de conservação sobre seus níveis, quando comparado com as adições de 1 e 3% (Figura 11a), além disso, também foram observados maiores níveis de AGS em 60 dias de exposição à luz

fluorescente, indicando um efeito quadrático relacionado ao tempo. A adição do BHT também apresentou um efeito quadrático sobre o tempo, atingindo maiores níveis de AGS em 60 dias de exposição (Figura 11b). Tanto a adição dos frutos de aroeira quanto o tempo de exposição à luz fluorescente apresentaram efeito quadrático para os níveis de AGMI (Figura 11c), indicando maiores níveis em aproximadamente 20 dias de exposição. A adição do BHT apresentou um efeito quadrático para o tempo de exposição, onde maiores níveis de AGMI foram observados em aproximadamente 30 dias de exposição (Figura 11d).

O ajuste do modelo cinético para os níveis de AGPI apresentou um efeito linear para a adição dos frutos da aroeira e efeito quadrático para o tempo (Figura 11e), com maiores reduções dos níveis em aproximadamente 50 dias. Já a adição do antioxidante sintético (BHT) apresentou um efeito de primeira ordem (Figura 11f), com maiores reduções dos níveis de AGPI em aproximadamente 60 dias. A adição dos frutos da aroeira e do BHT ao óleo da sardinha proporcionou efeito protetor frente à degradação dos AGPI.

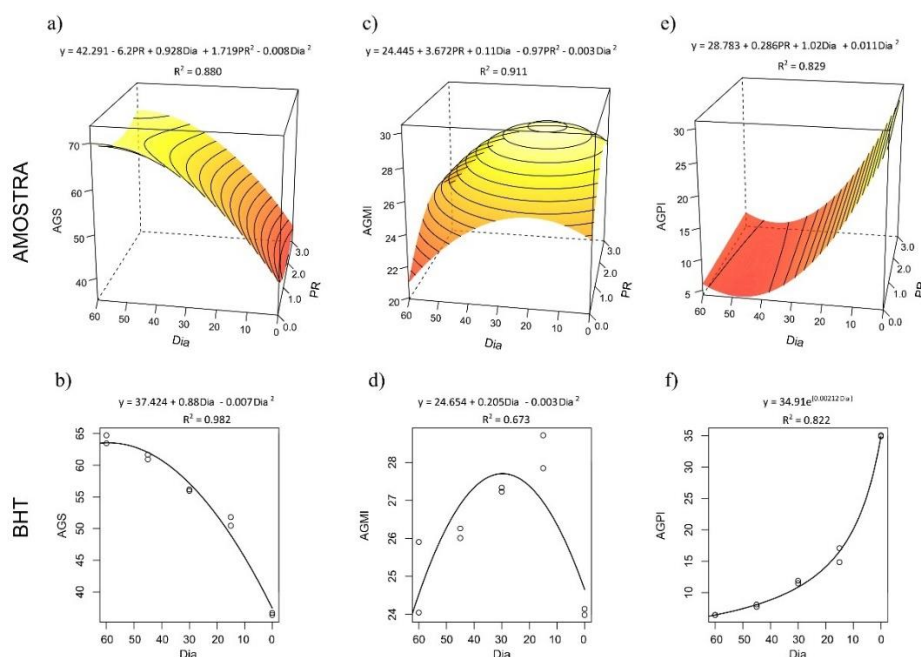


Figura 11: Cinética de degradação dos AGS, AGMI, AGPI para os diferentes níveis de adição do fruto da aroeira e BHT, expostos à luz fluorescente durante os 60 dias.

Os ácidos graxos EPA e DHA, os mais importantes constituintes da fração lipídica das sardinhas, tiveram suas concentrações significativamente reduzidas nas amostras controle, durante o armazenamento na presença de luz. O teor de ácidos graxos $\omega 3$ EPA e DHA reduziu 91,13 e 94,53% (comparação entre amostra sem exposição UV e amostra controle exposta por 60 dias), respectivamente. Em amostras de óleo de salmão expostas à radiação UV durante 8

dias à 20°C, também houve uma redução dos teores de DHA mais acentuada quando comparada ao EPA (27,97 e 18,48%, respectivamente), com um aumento do teor de C16:0 de 27,21% (AKHTAR et al., 2010). Em um estudo utilizando óleo de espadilha do Mar Negro (*Clupeonella cultriventris*), exposto à radiação UV por 12 dias a 18 °C, Vejdan, Ojagh e Abdollahi (2017) também evidenciaram reduções importantes nos teores de EPA (de $5,44 \pm 0,21$ para $0,01 \pm 0,2$) e DHA (de $7,21 \pm 0,23$ para $0,12 \pm 0,05\%$). Também utilizando óleo de espadilha do Mar Negro (*Clupeonella cultriventris*), exposto à radiação UV por 12 dias a 18 °C, Ekrami et al. (2020) evidenciaram um aumento na quantidade de C16:0 da amostra de 19,4 para 27,0%, enquanto as quantidades de EPA e DHA diminuíram de 6,30 para 3,80% e 18,1 para 12,9%, respectivamente. O aumento da quantidade de ácido graxo C16:0 e diminuição do ácido docosahexaenóico (DHA), ácido eicosapentaenóico (EPA) com o tempo representam oxidação nas amostras (AKHTAR et al., 2010).

A adição dos antioxidantes no óleo de sardinha durante a exposição à luz fluorescente causou um efeito protetor significativo sobre a degradação do EPA e DHA em todos os tempos de exposição. O BHT apresentou maior efeito protetor quando comparado ao fruto da aroeira, exceto nas amostras expostas à luz durante 60 dias, onde foi possível verificar que a adição de 3% do fruto da aroeira foi mais efetiva que a adição do antioxidante sintético. Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre o BHT e as adições do fruto da aroeira na proteção sobre a degradação do EPA e DHA maioria dos tratamentos.

A razão de AGPIs $\omega 3/\omega 6$ inicial foi de $9,94 \pm 0,04$ e sofreu uma redução de 79,48% entre a amostra sem exposição UV e a amostra controle exposta por 60 dias, indicando que a diminuição está associada à alta redução do teor total de $\omega 3$ (91,98%). Em um estudo conduzido por de Oliveira et al. (2020a) foi relatada uma razão $\omega 3/\omega 6$ de $4,06 \pm 0,32$ em óleo de sardinha-verdadeira. Saldanha, Benassi e Bragagnolo (2008) relataram uma razão $\omega 3/\omega 6$ de $3,82 \pm 0,2$ em sardinha-verdadeira crua. Uma razão $\omega 3/\omega 6$ mais elevada foi relatada Telahigue (2013) em filé de *Sardinella aurita* ($12,87 \pm 1,39$). Os AGPIs $\omega 3$ estão relacionados com a redução da trigliceridemia, causam modificações favoráveis no metabolismo das lipoproteínas e da sua capacidade de aumentar a fluidez de membranas e diminuição da agregação plaquetária, além de possuir propriedades anti-inflamatórias, anti-agregante, vasodilatador e imunomodulação, também retarda o crescimento da placa aterosclerótica. Já a ingestão de quantidades excessivas de PUFA $\omega 6$ está relacionada com a ocorrência de desordens imunológicas, doenças cardiovasculares e formação de trombos e ateromas, transtornos inflamatórios e alérgicos (ZAMARIA, 2004; JOHNSON; MCELHENNEY; EGNIN, 2019; MIAO et al., 2021).

Tabela 10: Composição de ácidos graxos das amostras de óleo (g/100g de amostra)

Ácido Graxo	0 dias		15 dias				30 dias				45 dias				60 dias						
	Cont	Cont	1%	2%	3%	BHT	Cont	1%	2%	3%	BHT	Cont	1%	2%	3%	BHT	Cont	1%	2%	3%	BHT
C12:0	b _{0,10} ^C	0,15 ^{B:a}	0,14 ^{B:a}	0,15 ^{AB:a}	0,14 ^{A:a}	a _{0,15}	0,15 ^{B:a}	0,13 ^{C:b*}	0,13 ^{B:b}	0,14 ^{A:ab}	a _{0,14}	0,19 ^{A:a*}	0,15 ^{B:b}	0,15 ^{A:b}	0,15 ^{A:b}	a _{0,15}	0,19 ^{A:a}	0,16 ^{A:ab}	0,16 ^{A:b}	0,16 ^{A:ab}	a _{0,16}
C14:0	d _{8,88} ^E	14,04 ^{D:a*}	12,69 ^{D:b*}	13,10 ^{B:b*}	12,73 ^{C:b*}	c _{12,27}	15,27 ^{C:a*}	13,01 ^{C:c}	13,54 ^{B:bc}	14,07 ^{B:Cb}	bc _{13,47}	16,42 ^{B:a*}	14,81 ^{B:b}	14,75 ^{A:b}	14,77 ^{AB:b}	ab _{14,72}	16,92 ^{A:a}	15,30 ^{A:b}	15,05 ^{A:b}	15,52 ^{A:b}	a _{15,83}
C15:0	b _{0,66} ^D	1,09 ^{C:a*}	0,97 ^{D:c}	1,00 ^{B:b*}	0,96 ^{B:c}	ab _{0,95}	1,21 ^{B:a}	1,01 ^{C:c}	1,05 ^{B:c}	1,12 ^{A:b}	a _{1,21}	1,23 ^{B:a*}	1,13 ^{B:b}	1,12 ^{A:b}	1,12 ^{A:b}	a _{1,12}	1,33 ^{A:a}	1,21 ^{A:b}	1,15 ^{A:b}	1,17 ^{A:b}	a _{1,21}
C16:0	d _{21,70} ^E	34,64 ^{D:a*}	31,29 ^{D:c}	32,38 ^{D:b*}	31,43 ^{C:c}	c _{30,31}	38,19 ^{C:a*}	32,48 ^{C:c}	34,08 ^{C:bc}	35,28 ^{B:b*}	b _{33,14}	40,65 ^{B:a*}	36,71 ^{B:b}	36,72 ^{B:b}	37,05 ^{AB:b}	a _{36,54}	41,83 ^{A:a*}	38,34 ^{A:b}	38,26 ^{A:b}	40,19 ^{A:ab*}	a _{36,63}
C17:0	b _{0,53} ^D	0,97 ^{C:a}	0,77 ^{C:b*}	0,86 ^{B:b}	0,80 ^{A:b*}	a _{0,93}	1,00 ^{C:a}	0,88 ^{B:C:b}	0,89 ^{AB:b}	0,88 ^{A:b}	a _{0,88}	1,21 ^{A:a}	1,06 ^{A:a}	1,17 ^{A:a}	1,07 ^{A:a}	a _{1,06}	1,16 ^{B:a}	0,94 ^{B:a}	0,91 ^{AB:a}	0,99 ^{A:a}	a _{0,92}
C18:0	c _{4,31} ^E	6,87 ^{D:a*}	6,19 ^{D:b}	6,42 ^{C:b}	6,14 ^{A:b}	b _{6,10}	7,79 ^{C:a*}	6,55 ^{C:c}	6,82 ^{B:c}	7,22 ^{A:ab*}	ab _{6,73}	7,96 ^{B:a*}	7,23 ^{B:b}	7,13 ^{B:b}	7,14 ^{A:b}	a _{7,20}	8,90 ^{A:a}	7,62 ^{A:a}	7,68 ^{A:a}	8,31 ^{A:a}	a _{7,47}
C20:0	d _{0,33} ^D	0,49 ^{C:a*}	0,44 ^{B:b}	0,46 ^{B:ab*}	0,44 ^{C:c}	c _{0,44}	0,57 ^{B:a*}	0,47 ^{B:b}	0,48 ^{B:b}	0,51 ^{B:ab}	b _{0,49}	0,55 ^{B:C:a*}	0,5 ^{B:b}	0,50 ^{B:b}	0,51 ^{BC:b}	b _{0,50}	2,14 ^{A:a*}	1,76 ^{A:b}	1,82 ^{A:b}	2,04 ^{A:a*}	a _{1,86}
ΣAGS	c_{36,52}^E	58,26^{D:a*}	52,49^{D:c}	54,36^{D:b*}	52,64^{C:c}	d_{51,13}	64,17^{C:a*}	54,52^{C:c}	56,99^{C:c}	59,22^{B:b*}	c_{56,07}	68,19^{B:a*}	61,6^{B:b}	61,55^{B:b}	61,80^{B:b}	b_{61,30}	72,46^{A:a*}	65,33^{A:c}	65,03^{A:c}	68,38^{A:ab*}	a_{64,09}
C14:1 cis	b _{0,03} ^D	0,02 ^{E:b*}	0,04 ^{B:a*}	0,05 ^{B:a*}	0,04 ^{B:a}	b _{0,04}	0,06 ^{B:a*}	0,04 ^{B:b}	0,04 ^{B:b}	0,05 ^{B:b}	b _{0,04}	0,05 ^{C:a}	0,05 ^{B:a}	0,04 ^{B:a}	0,05 ^{B:a}	b _{0,06}	0,19 ^{A:a}	0,18 ^{A:ab}	0,15 ^{A:bc}	0,14 ^{A:c}	a _{0,17}
C16:1 cis	b _{8,45} ^C	9,77 ^{B:b*}	10,67 ^{A:a}	10,80 ^{A:a}	10,66 ^{A:a}	a _{10,81}	10,88 ^{A:a}	10,68 ^{A:a}	10,33 ^{B:a}	10,43 ^{A:a}	a _{10,35}	10,63 ^{A:a*}	10,15 ^{B:b}	9,92 ^{C:b}	10,03 ^{A:b}	a _{10,19}	10,81 ^{A:a}	9,70 ^{A:a}	10,01 ^{BC:a}	9,10 ^{A:a}	a _{10,04}
C17:1	a _{1,00} ^A	0,71 ^{B:d*}	0,86 ^{A:a*}	0,78 ^{A:c*}	0,84 ^{A:b*}	b _{0,92}	0,63 ^{C:b*}	0,73 ^{B:a*}	0,65 ^{B:b*}	0,60 ^{B:c*}	c _{0,76}	0,45 ^{D:b*}	0,53 ^{C:a*}	0,55 ^{C:a}	0,54 ^{B:a}	d _{0,56}	0,29 ^{E:b*}	0,42 ^{D:ab}	0,46 ^{D:a}	0,46 ^{B:a}	e _{0,50}
C18:1 ω6 t	a _{1,33} ^A	0,69 ^{B:b*}	0,89 ^{A:ab}	0,88 ^{A:ab}	0,97 ^{A:a}	b _{1,03}	0,58 ^{C:b*}	0,80 ^{A:a}	0,74 ^{B:a}	0,63 ^{B:b*}	c _{0,83}	0,55 ^{D:b*}	0,74 ^{A:a}	0,70 ^{B:a}	0,70 ^{B:a}	c _{0,75}	0,12 ^{E:c*}	0,17 ^{B:bc}	0,20 ^{C:ab}	0,25 ^{C:a*}	d _{0,18}
C18:1 ω9 cis	b _{10,43} ^B	11,98 ^{A:ab*}	13,20 ^{B:a}	13,58 ^{A:a}	13,18 ^{A:a}	a _{13,52}	10,43 ^{B:b*}	13,71 ^{A:a*}	13,11 ^{AB:a}	13,26 ^{A:a}	a _{12,79}	10,03 ^{C:b*}	13,00 ^{BC:a}	12,89 ^{B:a}	13,10 ^{A:a}	a _{13,02}	9,77 ^{D:b*}	12,83 ^{C:a}	13,15 ^{AB:a}	13,01 ^{A:a}	a _{13,77}
C20:1 ω9	a _{2,10} ^A	1,88 ^{B:a*}	2,06 ^{A:a*}	2,01 ^{A:a*}	1,69 ^{A:a*}	c _{0,86}	1,56 ^{C:a}	2,10 ^{A:a}	2,07 ^{A:a}	0,83 ^{A:a}	b _{1,50}	1,12 ^{D:c*}	1,36 ^{B:ab*}	1,25 ^{B:bc*}	1,40 ^{A:a*}	d _{0,54}	0,02 ^{E:b*}	0,13 ^{C:a*}	0,12 ^{C:a*}	0,13 ^{A:a*}	e _{0,08}
C22:1 ω9	c _{0,15} ^A	0,05 ^{C:a*}	0,09 ^{D:a*}	0,09 ^{C:a*}	0,08 ^{C:a*}	a _{0,32}	0,04 ^{D:c*}	0,23 ^{B:b*}	0,24 ^{A:b}	0,28 ^{A:a*}	b _{0,25}	0,11 ^{B:c*}	0,25 ^{A:a}	0,23 ^{A:b*}	0,26 ^{A:a}	ab _{0,28}	0,03 ^{E:c*}	0,13 ^{C:b}	0,15 ^{B:ab}	0,15 ^{B:a}	c _{0,16}
C24:1 ω9	b _{0,57} ^{AB}	0,61 ^{A:b*}	0,72 ^{A:a}	0,75 ^{A:a}	0,71 ^{A:a}	a _{0,77}	0,52 ^{B:b*}	0,76 ^{A:a}	0,74 ^{A:a}	0,78 ^{A:a}	a _{0,76}	0,57 ^{AB:b*}	0,72 ^{A:a}	0,71 ^{B:a}	0,72 ^{A:a}	a _{0,73}	0,02 ^{C:b*}	0,02 ^{B:b*}	0,07 ^{C:a}	0,08 ^{B:a}	c _{0,08}
ΣAGMI	c_{24,06}^C	25,71^{A:c*}	28,53^{A:ab}	28,94^{A:a}	28,17^{A:ab}	a_{28,28}	24,70^{B:d*}	29,05^{A:a*}	27,91^{B:b*}	26,85^{AB:c*}	ab_{27,28}	23,51^{D:c*}	26,80^{B:a*}	26,31^{C:b}	26,8^{AB:a*}	abc_{26,13}	21,24^{E:a}	23,57^{C:a}	24,32^{D:a}	23,30^{B:a}	bc_{24,98}
C18:2 ω6 t	a _{0,02} ^A	0,01 ^{B:b*}	0,02 ^{B:a}	0,02 ^{B:a}	0,02 ^{A:a}	ab _{0,01}	0,01 ^{B:a}	0,01 ^{B:a}	0,01 ^{BC:a}	1,89 ^{A:a}	ab _{0,01}	0,01 ^{B:b}	0,02 ^{B:a*}	0,01 ^{C:b}	0,02 ^{A:a*}	b _{0,01}	0,01 ^{B:c*}	0,05 ^{A:a*}	0,02 ^{A:b}	0,02 ^{A:bc}	a _{0,02}
C18:2 ω6 cis	a _{1,42} ^A	1,08 ^{B:b*}	1,27 ^{A:a}	1,19 ^{A:a*}	1,27 ^{A:a}	a _{1,33}	0,99 ^{C:a}	1,13 ^{B:a}	1,00 ^{B:a}	0,49 ^{A:a}	b _{1,08}	0,69 ^{D:c*}	0,79 ^{C:b*}	0,82 ^{C:ab}	0,84 ^{A:a}	c _{0,84}	0,38 ^{E:b}	0,55 ^{D:ab}	0,55 ^{D:ab}	0,79 ^{A:a}	d _{0,56}
C18:3 ω6	b _{0,20} ^B	0,08 ^{C:c*}	0,13 ^{B:a}	0,11 ^{B:b}	0,13 ^{B:a}	ab _{0,14}	0,06 ^{D:b*}	0,10 ^{B:a}	0,09 ^{BC:a*}	0,07 ^{B:b*}	bc _{0,11}	0,02 ^{E:b*}	0,07 ^{C:a*}	0,07 ^{C:a}	0,07 ^{B:a*}	c _{0,07}	0,23 ^{A:b*}	0,41 ^{A:a}	0,42 ^{A:a}	0,38 ^{A:a}	a _{0,46}
C18:3 ω3	b _{0,06} ^B	0,03 ^{C:b*}	0,07 ^{C:a}	0,09 ^{B:a}	0,07 ^{B:a}	b _{0,08}	0,03 ^{C:b*}	0,08 ^{B:a}	0,09 ^{B:a}	0,10 ^{B:a}	c _{0,08}	0,02 ^{C:b*}	0,09 ^{B:a}	0,10 ^{B:a}	0,09 ^{B:a}	b _{0,09}	0,19 ^{A:c*}	0,32 ^{A:bc}	0,40 ^{A:ab}	0,46 ^{A:a}	a _{0,40}
C20:2 ω6	b _{0,21} ^A	0,13 ^{B:b*}	0,19 ^{B:a}	0,18 ^{B:a}	0,18 ^{B:a}	bc _{0,20}	0,09 ^{D:c*}	0,18 ^{B:a}	0,16 ^{C:ab}	0,14 ^{BC:b*}	c _{0,18}	0,11 ^{C:b*}	0,12 ^{C:ab}	0,12 ^{D:ab}	0,13 ^{C:a}	d _{0,14}	0,11 ^{C:c*}	0,25 ^{A:b*}	0,26 ^{A:b*}	0,32 ^{A:a*}	a _{0,29}
C20:3 ω6	a _{0,15} ^A	0,11 ^{B:b*}	0,21 ^{A:a*}	0,21 ^{A:a*}	0,19 ^{A:a*}	c _{0,02}	0,00	0,01 ^{B:a}	0,01 ^{C:a}	0,00 ^{C:b}	0,00	0,00	0,00	0,01 ^{C:b}	0,01 ^{BC:a}	d _{0,01}	0,00	0,02 ^{B:b}	0,06 ^{B:a}	0,05 ^{B:a}	b _{0,06}
C20:3 ω3	b _{1,03} ^A	0,89 ^{B:b*}	1,23 ^{B:a}	1,32 ^{A:a}	1,27 ^{A:a}	b _{1,40}	0,81 ^{BC:b*}	1,38 ^{A:a}	1,33 ^{A:a}	1,34 ^{A:a}	a _{1,29}	0,78 ^{C:b*}	1,26 ^{B:a}	1,26 ^{A:a}	1,27 ^{A:a}	a _{1,27}	0,13 ^{D:c*}	0,28 ^{C:a}	0,26 ^{B:a}	0,18 ^{B:b*}	c _{0,28}
C20:4 ω6	a _{1,19} ^A	0,56 ^{B:a*}	0,68 ^{A:a}	0,59 ^{B:a*}	0,59 ^{A:a*}	b _{0,81}	0,44 ^{D:b}	0,56 ^{B:a*}	0,50 ^{C:ab*}	0,27 ^{B:c*}	c _{0,40}	0,21 ^{E:ab}	0,18 ^{C:b*}	0,17 ^{D:b*}	0,23 ^{B:a}	d _{0,25}	0,53 ^{C:b*}	0,70 ^{A:ab}	0,76 ^{A:a}	0,70 ^{A:ab}	b _{0,87}
C20:5 ω3 (EPA)	16,24	3,93 ^{B:c*}	6,12 ^{A:a}	4,90 ^{A:b*}	6,36 ^{A:a}	b _{7,05}	2,79 ^{C:c*}	4,85 ^{B:a}	4,20 ^{A:b*}	2,93 ^{B:c*}	c _{4,93}	2,22 ^{D:b*}	2,60 ^{C:ab*}	2,81 ^{B:a}	2,40 ^{B:ab*}	d _{3,11}	1,44 ^{E:b*}	1,62 ^{D:b*}	1,99 ^{B:ab}	2,43 ^{B:a}	d _{2,26}
C22:6 ω3 (DHA)	14,45	3,21 ^{B:b*}	4,41 ^{A:a}	3,40 ^{A:b*}	4,49 ^{A:a}	b _{4,92}	2,12 ^{C:c*}	3,49 ^{B:a}	3,03 ^{A:b*}	2,02 ^{B:c*}	b _{3,59}	1,23 ^{D:b*}	1,77 ^{C:ab}	1,95 ^{B:a}	1,62 ^{B:ab*}	c _{2,13}	0,79 ^{E:b*}	0,89 ^{D:b}	1,12 ^{B:ab}	1,50 ^{B:a}	c _{1,23}
ΣAGPI	a_{34,97}	12,03^{B:c*}	14,30^{A:a}	12,01^{A:ab*}	14,56^{A:a}	b_{15,96}	7,34^{C:b*}	11,79^{B:a}	10,43^{A:ab}	9,25^{B:ab}	c_{11,68}	5,29^{D:b*}	6,90^{C:a*}	7,31^{B:a}	6,67^{B:a*}	d_{7,91}	3,81^{E:b*}	5,10^{D:ab}	5,83^{B:a}	6,83^{B:a}	d_{6,44}
EPA+DHA	a_{30,69}	7,14^{B:b*}	10,52^{A:a}	8,30^{A:b*}	10,85^{A:a}	b_{11,97}	4,91^{C:c*}	8,33^{B:a}	7,23^{A:b*}	4,95^{B:c*}	c_{8,52}	3,45^{D:b*}	4,37^{C:ab}	4,75^{B:a}	4,02^{B:ab*}	d_{5,24}	2,23^{E:b*}	2,51^{D:b*}	3,11^{B:ab}	3,94^{B:a}	d_{3,49}
ΣTrans	a_{1,35}	0,70^{B:b*}	0,91^{A:ab}	0,90^{A:ab}	0,98^{A:a}	b_{1,05}	0,59^{C:a}	0,81^{A:a}	0,75^{B:a}	2,52^{A:a}	c_{0,84}	0,56^{D:b*}	0,76^{A:a}	0,71^{B:a}	0,72^{A:a}	c_{0,77}	0,13^{E:b*}	0,21^{B:a}	0,22^{C:a}	0,27^{A:a*}	d_{0,21}
Σω6	a_{3,20}	1,97^{B:c*}	2,49^{A:a}	2,30^{A:b*}	2,37^{A:ab*}	b_{2,51}	1,59^{C:a}	2,00^{B:a}	1,78^{C:a}	2,86^{A:a}	d_{1,79}	1,04^{E:c*}	1,18^{C:b*}	1,20^{D:b*}	1,30^{A:a}	e_{1,32}	1,26^{D:b*}	1,99^{B:a}	2,07^{B:a}	2,25^{A:a}	c_{2,26}
Σω3	a_{31,78}	8,06^{B:c*}	11,82^{A:a}	9,71^{A:b*}	12,19^{A:a}	b_{13,45}	5,75^{C:d*}	9,80^{B:a}	8,65^{A:b*}	6,39^{B:c*}	c_{9,89}	4,25^{D:b*}	5,72^{A:a}	6,11^{B:a}	5,38^{BC:a*}	d_{6,59}	2,55^{E:c*}	3,11^{D:bc*}	3,77<		

3.5 Efeito protetor dos frutos da aroeira sobre a degradação do colesterol após a foto-oxidação

Os conteúdos de colesterol e óxidos de colesterol são apresentados na Tabela 11. As amostras não expostas à luz fluorescente apresentaram um nível de colesterol de $1397,17 \pm 7,9$ mg/100g de óleo. Ganga et al. (1998) ao analisarem o óleo de sardinha comercial refinado, determinaram um conteúdo inferior de $480,5 \pm 7,5$ mg de colesterol/100 g de óleo. Esta redução no conteúdo de colesterol pode estar relacionada a perdas durante o processo de refino. Oliveira (2003) estudou o efeito da sazonalidade sobre o conteúdo de colesterol em *Sardinella brasiliensis* capturadas na costa catarinense. O estudo determinou que as sardinhas capturadas na primavera apresentaram um menor conteúdo de colesterol (13,80 mg/100 g de filé cru), enquanto um maior conteúdo foi detectado no pescado capturado no outono (45,60 mg/100 g de filé cru), valores correspondentes à aproximadamente 665,66 e 2246,30 mg/ 100 g de óleo, respectivamente. Outros estudos realizados em filés de sardinha verdadeira cru, também evidenciaram conteúdos variáveis de colesterol. Saldanha determinaram $342 \pm 2,7$ mg de colesterol/100 g de músculo em base seca (correspondente a aproximadamente 3843 mg de colesterol/100 g de óleo), enquanto Ferreira et al. (2017) determinaram $237,2 \pm 3,7$ mg/100 g músculo em base seca (aproximadamente 1437,57 mg de colesterol/100 g de óleo).

As variações no conteúdo de colesterol evidenciadas por diferentes autores são esperadas em virtude da variação nos teores lipídicos do pescado, influenciados por fatores como espécie, maturidade sexual, tamanho, local de captura, sexo, temperatura da água, sazonalidade e especialmente alimentação (ARMSTRONG; LEACH; WYLLIE, 1991; BARRANDA et al., 2018).

O teor de colesterol das amostras controle, após serem expostas à luz fluorescente durante 15, 30, 45 e 60 dias, sofreram reduções em torno de 28,27%, 39,84%, 49,80% e 61,86% quando comparadas ao óleo sem exposição, respectivamente (Figura 12).

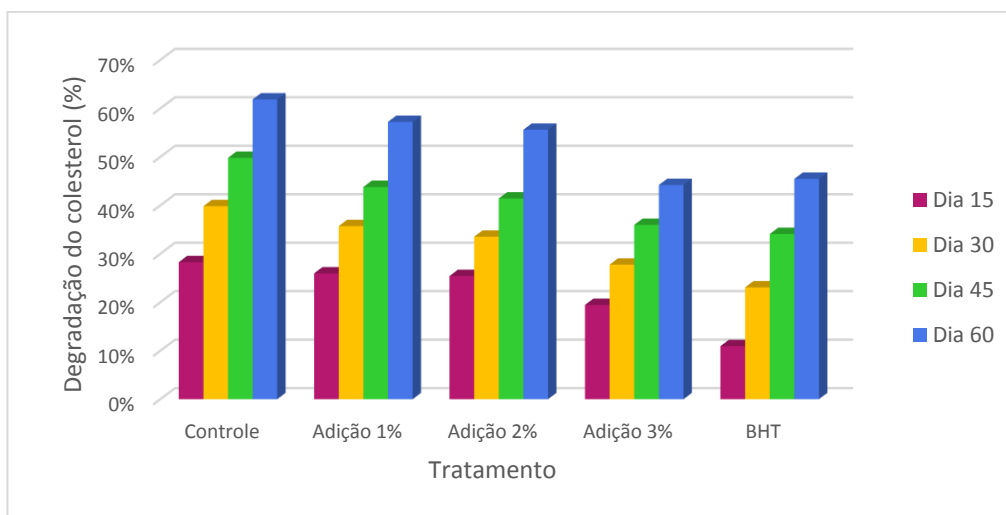


Figura 12: Porcentagem de degradação do colesterol para os diferentes tratamentos.

Outros estudos também relataram perdas no conteúdo de colesterol devido à foto-oxidação em pescado e sistemas modelo contendo soluções padrão de colesterol. Cardenia et al. (2013) observaram uma redução de 15,16% no nível de colesterol em músculo de sardinha exposto à luz fluorescente durante por 4 horas a 4 °C. Medina-Meza et al. (2014) relataram uma redução de 48% no nível de colesterol em um sistema modelo contendo solução padrão de colesterol, submetido a iluminação fluorescente com incidência de 4300 lux sobre as amostras incubadas à 2 ± 1 °C durante 28 dias. Medina-Meza et al. (2012) estudaram o padrão oxidativo do colesterol cristalino exposto à luz fluorescente durante 21 dias e observaram uma redução de 41,29% após a exposição. Hu e Chen (2002) estudaram a degradação do colesterol em soluções padrões contendo 10000 ppm de colesterol combinadas com 3 diferentes ésteres metílicos de ácidos graxos (linoléico, decosaheptaenóico e esteárico), expostas à iluminação fluorescente durante 28 dias a 25 °C. Os autores demonstraram que a concentração do colesterol diminuiu gradualmente à medida em que se aumentava o tempo de exposição, evidenciando razões de degradação do colesterol que variou entre 35,65 e 60,22% nas amostras expostas à luz fluorescente após 28 dias, enquanto a razão de degradação das amostras armazenadas na ausência de luz após 28 dias variou entre 0,82 e 2,17%. Demonstrando que o processo de degradação do colesterol é acelerado pela foto-oxidação.

Mesmo com a adição de antioxidantes aos óleos, tanto dos frutos da aroeira como do BHT, observou-se reduções nos teores de colesterol após a exposição à luz fluorescente, entretanto a razão de degradação do colesterol para estes tratamentos foi inferior em todos os períodos analisados, comparando com o controle.

A exposição à luz fluorescente durante 15 dias levou a degradação de 28,27% do colesterol nas amostras controle, observando uma redução no percentual de degradação do colesterol de 25,96%, 25,42%, 19,45% e 10,94% nas amostras adicionadas 1%, 2%, 3% dos frutos da aroeira e BHT, respectivamente. Já para as amostras expostas por 30 dias, foi possível observar degradação de 39,84% do colesterol nas amostras controle, com uma redução no percentual de degradação do colesterol de 35,72%, 33,53%, 27,76% e 23,07% nas amostras adicionadas 1%, 2%, 3% dos frutos da aroeira e BHT, respectivamente.

Após 45 dias de exposição observou-se uma redução de 49,80% do colesterol das amostras controle e uma redução de 43,80%, 42,43%, 35,98% e 34,09% nas amostras adicionadas 1%, 2%, 3% dos frutos da aroeira e BHT, respectivamente. Um comportamento diferente foi observado após 60 dias de exposição, onde observou-se que a adição de 3% do fruto da aroeira causou uma menor redução no percentual do colesterol (44,21%), quando comparado ao antioxidante sintético (45,47%). Neste período o percentual de degradação do colesterol foi de 61,86%, enquanto a adição de 1% e 2% do fruto da aroeira foi de 57,23% e 55,60%, respectivamente.

Os resultados indicam que emprego dos antioxidantes reduziu a degradação do colesterol em todos os tratamentos. O efeito protetor dos frutos da aroeira sobre a foto-oxidação do colesterol pode estar atribuído a presença de compostos fenólicos como antocianinas e biflavonóides, determinados no fruto da aroeira neste estudo.

Tabela 11: Colesterol (mg/100 g de óleo) e níveis de óxidos de colesterol ($\mu\text{g/g}$ de óleo) das amostras.

Óxidos de colesterol ($\mu\text{g/g}$ de óleo)	Dia 0		Dia 15				Dia 30					Dia 45					Dia 60				
	Cont	Cont	1%	2%	3%	BHT	Cont	1%	2%	3%	BHT	Cont	1%	2%	3%	BHT	Cont	1%	2%	3%	BHT
5,6 α -Ep	3,72 ^E	65,14 ^{D:a*}	54,63 ^{D:b*}	45,56 ^{D:c*}	37,87 ^{D:d}	^d 35,90	85,08 ^{C:a*}	75,33 ^{C:b*}	70,04 ^{C:c*}	48,29 ^{C:d}	^c 45,05	105,02 ^{B:a*}	98,32 ^{B:b*}	92,39 ^{B:c*}	91,20 ^{B:c*}	^b 86,34	124,96 ^{A:a*}	112,02 ^{A:b}	112,87 ^{A:ab}	108,61 ^{A:b}	^a 108,81
5,6 β -Ep	14,34 ^E	141,82 ^{D:a*}	131,75 ^{C:b*}	127,20 ^{D:c*}	113,55 ^{D:c*}	^d 104,86	197,66 ^{C:a*}	178,73 ^{C:b*}	154,51 ^{C:c*}	144,82 ^{C:d*}	^c 132,92	382,13 ^{B:a*}	353,80 ^{B:ab*}	349,89 ^{B:ab*}	326,15 ^{B:b}	^b 315,54	566,61 ^{A:a*}	521,83 ^{A:b*}	500,07 ^{A:bc}	468,30 ^{A:c}	^a 472,61
7-Ceto	29,34 ^E	400,80 ^{D:a*}	280,73 ^{D:b*}	270,34 ^{D:c*}	239,47 ^{D:d*}	^d 225,56	582,99 ^{C:a*}	504,61 ^{C:b*}	507,89 ^{C:b*}	429,48 ^{C:c}	^c 428,51	765,17 ^{B:a*}	687,48 ^{B:b*}	628,77 ^{B:c*}	579,59 ^{B:c}	^b 578,46	947,36 ^{A:a*}	800,81 ^{A:b*}	770,41 ^{A:bc*}	743,29 ^{A:c}	^a 734,18
7 α -OH	5,21 ^E	88,42 ^{D:a*}	72,80 ^{D:b*}	67,86 ^{D:c*}	60,60 ^{D:d*}	^d 54,98	111,95 ^{C:a*}	97,04 ^{C:b*}	95,56 ^{C:b*}	90,59 ^{C:b}	^c 87,56	135,48 ^{B:a*}	130,12 ^{B:ab*}	122,90 ^{B:bc}	119,05 ^{B:c}	^b 117,33	159,01 ^{A:a*}	153,11 ^{A:b*}	145,53 ^{A:c}	137,29 ^{A:c}	^a 138,72
7 β -OH	6,43 ^E	78,43 ^{D:a*}	64,55 ^{D:b*}	60,46 ^{D:c*}	54,27 ^{D:d*}	^d 46,13	94,82 ^{C:a*}	91,32 ^{C:b*}	86,51 ^{C:c*}	83,00 ^{C:d*}	^c 80,50	111,22 ^{B:a*}	99,44 ^{B:b*}	98,50 ^{B:b*}	95,53 ^{B:b*}	^b 84,01	127,61 ^{A:a*}	115,12 ^{A:b*}	109,33 ^{A:bc*}	105,68 ^{A:c}	^a 102,69
25-OH	1,20 ^F	16,98 ^{D:a*}	15,29 ^{C:b*}	13,87 ^{D:c*}	12,63 ^{D:d*}	^d 9,81	19,55 ^{C:a*}	18,04 ^{C:b}	17,71 ^{C:b}	17,91 ^{C:b}	^c 17,26	34,99 ^{B:a*}	33,02 ^{B:a*}	28,63 ^{B:b*}	22,49 ^{B:c}	^b 21,72	50,43 ^{A:a*}	40,57 ^{A:b*}	41,83 ^{A:b*}	34,97 ^{A:c}	^a 32,45
22S-OH	1,30 ^E	23,12 ^{D:a*}	19,38 ^{C:b*}	18,06 ^{C:b*}	13,08 ^{C:c}	^b 11,73	28,04 ^{C:a*}	27,62 ^{B:a*}	27,05 ^{B:a*}	23,58 ^{B:b}	^{ab} 22,53	32,96 ^{B:a*}	30,61 ^{B:ab}	29,22 ^{B:ab}	27,76 ^{B:b}	^a 28,06	37,87 ^{A:a}	37,05 ^{A:a}	36,37 ^{A:a}	35,10 ^{A:a}	^a 35,07
ΣPOCs	61,54^E	814,71^{D:a*}	639,13^{D:b*}	603,36^{D:c*}	531,47^{D:d*}	^d488,97	1120,08^{C:a*}	992,67^{C:b*}	959,28^{C:b}	837,67^{C:c*}	^c814,33	1566,96^{B:a*}	1432,80^{B:b*}	1350,30^{B:bc}	1261,78^{B:c*}	^b1231,46	2013,84^{A:a*}	1780,51^{A:b*}	1716,39^{A:b}	1633,24^{A:c*}	^a1624,54
Colesterol (mg/100 g)	1396,14 ^A	1001,49 ^{B:c*}	1033,65 ^{A:bc*}	1041,25 ^{A:b*}	1124,56 ^{A:a*}	^a 1243,36	839,95 ^{C:d*}	897,43 ^{B:c*}	928,05 ^{B:b*}	1008,51 ^{B:a*}	^b 1074,04	700,80 ^{D:c*}	784,66 ^{C:bc*}	817,78 ^{C:ab*}	893,85 ^{C:a}	^c 920,18	532,48 ^{E:d*}	597,17 ^{D:c*}	619,91 ^{D:b*}	778,96 ^{D:a}	^d 761,26

Letras minúsculas diferentes do lado esquerdo dos números, indicam diferença estatística ($p < 0.05$) entre os dias no tratamento BHT (pelo teste de tukey)

Letras maiúsculas diferentes na direita do número, indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre os dias quando comparados por cada tratamento (pelo teste de tukey)

Letras minúscula diferentes na direita do número, indicam diferença estatística significativa ($p < 0.05$) entre os tratamentos comparados no mesmo dia (pelo teste de tukey)

* indica diferença estatística ($p < 0.05$) dos tratamentos frente ao BHT quando comparados nos mesmos dias (pelo teste de dunnet)

3.6 Efeito protetor dos frutos da aroeira sobre a formação de óxidos de colesterol após a foto-oxidação

Sete produtos de oxidação do colesterol foram determinados nas amostras estudadas: 5,6 α -epoxicolesterol, 5,6 β -epoxicolesterol, 7-cetocolesterol, 7 α -hidroxicolesterol, 7 β -hidroxicolesterol, 22(S)-hidroxicolesterol e 25-hidroperoxicolesterol. Estes óxidos de colesterol foram relatados por outros autores em óleo de *Sardinella brasiliensis* (DE OLIVEIRA et al., 2020), no músculo de *Sardinella brasiliensis* (SALDANHA; BENASSI; BRAGAGNOLO, 2008; FERREIRA et al., 2017) e *Sardinella pilchardus* (CARDENIA et al., 2013) e em outras espécies de pescado, tais como *Clupea harengus* (FIGUEIRÊDO et al., 2015), *Merluccius hubbsi*, *Cynoscion leiarchus* (FREITAS et al., 2015), *Sillago japonica*, *Etrumeus teres* (SHOZEN et al., 1995) e *Litopenaeus vannamei* (BECERRA et al., 2014), atribuindo-se a presença destes POCs a uma característica metabólica do pescado (OSADA et al. 1993). Na Tabela 12 estão apresentados os produtos de oxidação do colesterol encontrados nas amostras de óleo de sardinha expostas à luz fluorescente. Neste estudo, os teores dos POCs foram calculados em $\mu\text{g/g}$ de óleo.

Dentre os óxidos determinados na amostra controle sem exposição à radiação UV (dia 0) destacam-se concentrações elevadas dos derivados da auto-oxidação do carbono C-7 como o 7 α -OH, 7 β -OH e 7-ceto e de 5,6-epóxidos. O POC mais abundante nas amostras foi o 7-ceto ($29,34 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$ de óleo), seguido por 5,6 β -epóxido ($14,34 \pm 0,09 \mu\text{g/g}$ de óleo), 7 β -OH ($6,43 \pm 0,05 \mu\text{g/g}$ de óleo) e 7 α -OH ($5,21 \pm 0,06 \mu\text{g/g}$ de óleo). Esta mesma relação foi observada por Cardenia et al. (2013), em músculo de sardinha armazenadas a 4 °C por 4 horas, sob exposição à luz fluorescente.

Em geral, o 7-ceto é geralmente o POC mais abundante presente no em alimentos de origem animal submetidos à exposição à luz (WHANG; PENG, 1988; ANDERSEN; SKIBSTED, 1991; CHEN; SHI; HO, 1992), no entanto, o tipo e a concentração de POCs podem variar dependendo das características da fonte de iluminação (energia de radiação, distância e tempo de exposição) e das condições de armazenamento (embalagem, temperatura e tempo) (BOSELLI et al., 2005; PANIANGVAIT et al., 1995; BOSELLI et al., 2009; BOSELLI et al., 2010; CADENIA et al., 2013).

Para todos os períodos de exposição à radiação UV das amostras estudadas, foram observadas concentrações elevadas de 7-ceto, seguido por 5,6 β -epóxido e 7 β -OH e 7 α -OH. Também foram detectadas a presença de 22(S) hidroxicolesterol e 25-OH, formados a partir da

cadeia lateral da molécula do colesterol, porém em concentrações baixas. Devido à estrutura molecular do colesterol, o carbono alílico 7 é o mais susceptível ao processo oxidativo. Este carbono forma um radical gerado pela radiação ou outros radicalares. O radical formado interage facilmente com o oxigênio molecular triplete ($^3\text{O}_2$) formando um radical peroxilo que é estabilizado pela fixação de hidrogênio, formando assim 7α e 7β -hidroperóxido de colesterol. Estes epímeros são termicamente instáveis e se decompõem a 7-ceto, 7α -OH e 7β -OH. A elevada formação de 7-ceto é devida, provavelmente, à desidrogenação do 7α -OH e 7β -OH. Além disso, o 7β -OH deve ser formado primeiro que o 7α -OH. O carbono 5 também é susceptível a epoxidação por hidroperóxidos, formando $5,6\alpha$ e $5,6\beta$ -epóxido. A maior formação do $5,6\beta$ -epóxido pode ser atribuída à sua maior estabilidade, quando comparado ao $5,6\alpha$ -epóxido (SMITH, 1981; GUADIOLA et al., 1995; CHEIN et al., 1998). A presença de átomos terciários em C-20 e C-25 na cadeia lateral da molécula de colesterol também a torna sensível à oxidação, e embora os mecanismos de oxidação sejam semelhantes aos da estrutura do anel, a formação de POCs oriundos da cadeia lateral é menos pronunciada (CADENIA et al., 2013).

Após a exposição à luz fluorescente, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) nas concentrações dos óxidos de colesterol em todas as amostras controle avaliadas. Este aumento elevado está relacionado à presença do oxigênio singlete que reage facilmente com a ligação dupla do anel B do colesterol (1500 vezes mais rápido que o oxigênio triplete). Embora observou-se houve um aumento na concentração dos óxidos de colesterol em todas as amostras ao longo dos 60 dias de exposição, foi evidenciado um aumento mais acentuado nos 15 primeiros dias, que pode estar relacionado à presença elevada de ácidos graxos insaturados nas amostras de óleo de sardinhas neste período e estão associados à geração de um ambiente pró-oxidante (radicais livres e hidroperóxidos). Além disso, os ácidos graxos saturados e os radicais peróxidos formados durante o processo foto-oxidativo dos ácidos graxos poli-insaturados também são capazes de interagir com o colesterol, promovendo a oxidação dos esteróis, o que justifica o aumento menor pronunciado da concentração de óxidos de colesterol nas amostras analisadas nos dias 30, 45 e 60 (HU; CHEN, 2002; GIROTTI; KORYTOWSKI, 2019).

Diversos autores relatam que os ácidos graxos funcionam como catalizadores na formação dos POCs. Chein et al. (2003) observaram concentrações elevadas de 7-ceto, seguido por $5,6\beta$ -epóxido, $5,6\alpha$ -epóxido, 7α -OH e 7β -OH em sistemas modelo contendo colesterol, ácidos linoléico e decosahexaenóico (DHA), expostos à luz fluorescente por 28 dias à 25 °C, indicando que os ésteres metílicos de ácidos graxos podem agir como aceleradores da oxidação do colesterol. Em outro estudo, Hu e Chen (2002) evidenciaram que os ácidos graxos induziram

a formação de POCs em um sistema modelo contendo colesterol e os ácidos esteárico, linoléico e decosaheptaenóico, iluminado por 28 dias e incubado a 25 °C. Os autores observaram que os ácidos graxos insaturados (linoléico e decosaheptaenóico) induziram a formação de POCs mais rapidamente que os ácidos graxos saturados (esteárico).

No presente estudo, o teor de POCs totais das amostras de óleo de sardinhas controle elevou-se 1324, 1820, 2546 e 3272% após serem submetidas à presença de luz fluorescente durante 15, 30, 45 e 60 dias, respectivamente. Saldanha (2016) avaliou o teor de POCs em amostras cruas e grelhadas de bacalhau do Pacífico na presença de luz fluorescente durante um período de 120 dias de exposição, indicando uma elevação de 1248 e 1325% após 120 de estocagem nas amostras submetidas à presença de luz fluorescente, grelhadas e cruas, respectivamente. Já entre as amostras armazenadas na ausência de luz observou-se aumento de 682 e 798% para as amostras grelhadas e cruas, indicando que a foto-oxidação contribuiu de forma relevante para a formação de POCs. A suscetibilidade do músculo de sardinha (*Sardina pilchardus*) à foto-oxidação foi avaliada durante o armazenamento em condições comerciais de varejo por Cadenia et al. (2013). As amostras foram armazenadas na ausência de luz e sob exposição à luz fluorescente de 3800 lux por 4 horas a 4 °C. No tempo 0, as sardinhas exibiram baixos níveis de POCs totais ($0,62 \pm 0,16 \mu\text{g/g}$ amostra), porém, estes níveis sofreram um aumento acentuado após a exposição à luz, apresentando concentrações de $2,24 \pm 0,13$, $2,45 \pm 0,25$ e $3,72 \pm 0,32 \mu\text{g/g}$ amostra para as amostras analisadas após 1, 2 e 4 horas de exposição, respectivamente. O maior conteúdo de POCs totais foi detectado em amostras submetidas à exposição à luz de 4 h (correspondendo a 600% da concentração inicial), o que confirma que a oxidação fotossensibilizada afetou a formação de POCs e que a exposição à luz elevou consideravelmente os níveis de POCs quando comparado ao tratamento de armazenamento das amostras na ausência de luz. O aumento elevado dos níveis de POCs do presente estudo pode estar relacionado ao sistema modelo, já que óleo de sardinha foi exposto à uma maior superfície de contato com a luz fluorescente, enquanto os estudos apresentados anteriormente utilizaram o músculo do pescado, que pode ter dificultado a exposição à radiação UV nestas matrizes complexas.

Hu e Chen (2002) estudaram a formação de POCs em soluções padrões contendo 10000 ppm de colesterol em combinação com ésteres metílicos de ácidos graxos expostas à iluminação fluorescente durante 28 dias a 25 °C. Após 28 dias de exposição, os autores evidenciaram um aumento de 2962, 3625 e 3733% no teor de POCs das amostras combinadas com 1000 ppm de ácido linoléico, decosaheptaenóico (DHA) e esteárico, respectivamente.

A razão de oxidação do colesterol (calculada como Σ POCs/colesterol*100) foi de 0,44% para a amostra controle sem exposição à luz fluorescente e variou entre 8,13 e 37,82% para as amostras controle expostas ao longo dos 60 dias (Figura 13). Embora houve um aumento constante na % de oxidação do colesterol nas amostras controle ao longo do tempo, de maneira geral, os antioxidantes foram capazes de reduzir a oxidação do colesterol na seguinte ordem: BHT > adição 3% > adição 2% > adição 1%, exceto no dia 60, onde a adição de 3% do fruto foi capaz de reduzir o percentual de oxidação do colesterol (20,97%) mais que com o BHT (21,34%). Cadenia et al. (2013) ao estudar os efeitos da foto-oxidação sobre o colesterol em amostras de músculo de sardinhas determinaram uma razão de oxidação do colesterol que variou entre 0,1 e 0,9%, após as amostras serem expostas à luz fluorescente durante 4 horas à 4 °C.

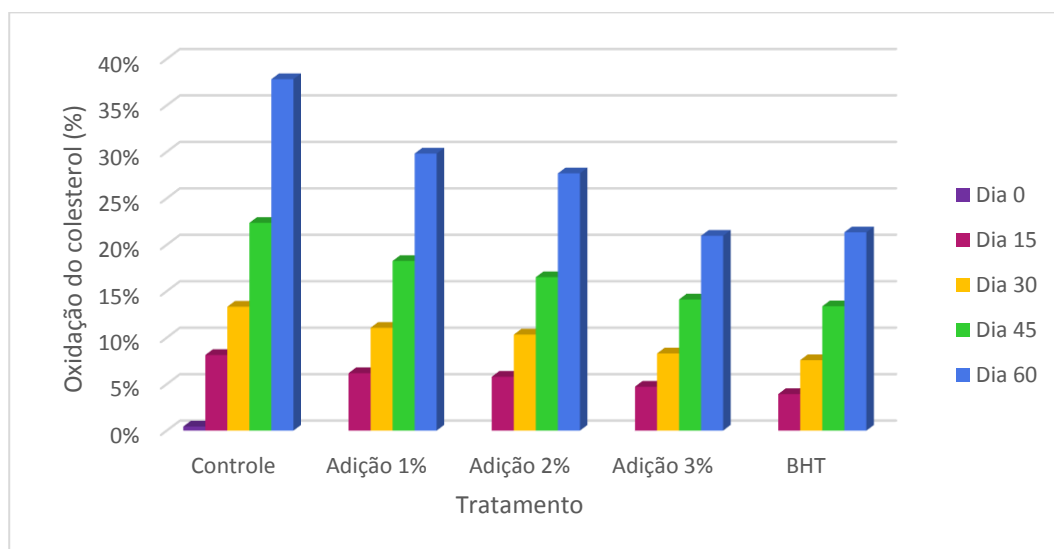


Figura 13: Razão de oxidação do colesterol das amostras de óleo de sardinha submetidas à diferentes tratamentos.

Apesar da degradação do colesterol e consequente formação de óxidos observada durante a exposição do óleo de sardinhas à radiação UV, a adição dos antioxidantes minimizou a foto-oxidação, reduzindo o conteúdo de POCs totais formados nas amostras. A eficácia da adição de antioxidantes na formação total dos óxidos de colesterol diminuiu, em todos os tratamentos, na seguinte ordem: BHT > fruto da aroeira 3% > fruto da aroeira 2% > fruto da aroeira 1% (Figura 14).

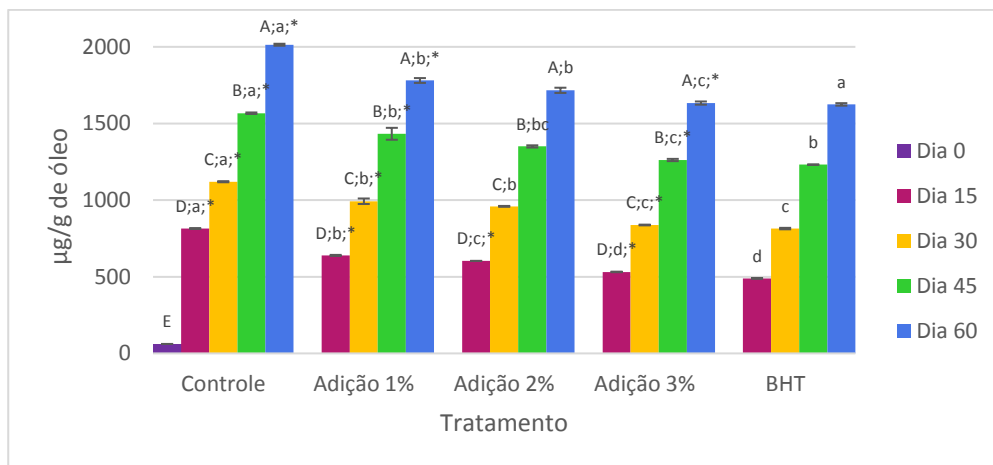


Figura 14: Concentração de POCs totais ($\mu\text{g/g}$ de óleo) nos diferentes tratamentos expostos à radiação durante 15, 30, 45 e 60 dias.

Letras minúsculas diferentes no tratamento BHT indicam diferença estatística ($p < 0.05$) entre os dias (pelo teste de tukey); Letras maiúsculas diferentes do lado direito indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre os dias quando comparados por cada tratamento (pelo teste de tukey); Letras minúsculas diferentes na direita, indicam diferença estatística significativa ($p < 0.05$) entre os tratamentos comparados no mesmo dia (pelo teste de tukey); * indica diferença estatística ($p < 0.05$) dos tratamentos frente ao BHT quando comparados nos mesmos dias (pelo teste de dunnet).

Ao comparar o conteúdo de POCs totais entre as amostras controle e amostras com adição dos frutos da aroeira, quanto ao tempo de exposição à luz fluorescente, foi observado um efeito protetor de 21,55%, 25,94% e 34,77% no dia 15, 11,38%, 14,36% e 25,21% no dia 30, 8,56%, 13,83% e 19,48% no dia 45 e 11,59%, 14,77% e 18,90% no dia 60, para adições referentes a 1%, 2% e 3%, respectivamente (Figura 15). Já a capacidade protetora dos antioxidantes contra a formação total de POCs reduziu com o passar do tempo, fato que pode ser decorrente do esgotamento da capacidade antioxidante dos compostos antioxidantes durante o processo de foto-oxidação, comprometendo sua eficiência, que é determinada pelos grupos funcionais presentes, tamanho da cadeia e pela posição que ocupam no anel aromático (ANGELO; JORGE, 2007).

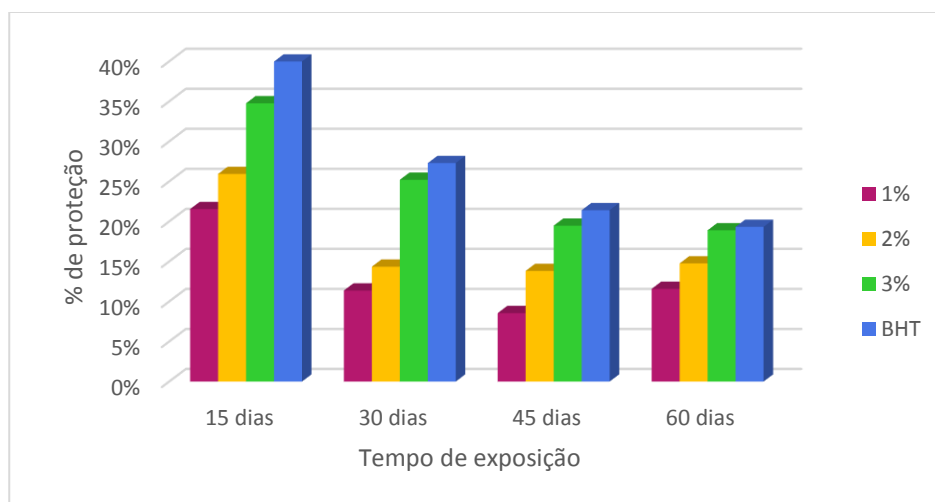


Figura 15: Capacidade protetora dos antioxidantes contra a formação de POCs totais após a foto-oxidação.

De forma geral, a capacidade protetora do antioxidante sintético (BHT) contra a formação de POCs totais foi superior à apresentada pelo fruto moído ($p < 0,05$). Entretanto, a adição de 3% do fruto foi mais eficaz na proteger do óleo contra a formação de 22(S)-OH nas amostras expostas por 45 dias e formação de 5,6 α -epóxido e 5,6 β -epóxido nas amostras expostas por 60 dias, quando comparada com a adição do BHT. O antioxidante sintético foi capaz de reduzir 19,33% do conteúdo de POCs totais em 60 dias de exposição, enquanto a maior concentração dos frutos de aroeira utilizada reduziu 18,90%. Embora o BHT tenha apresentado um efeito protetor maior contra a formação dos POCs, o fruto moído teve um efeito protetor significativo em todas as concentrações.

A atividade protetora observada nos sistemas modelo devido a adição dos frutos da aroeira nas amostras está atribuída aos inúmeros compostos com propriedades antioxidantes presentes nos frutos. Os compostos fenólicos como antocianinas e biflavonóides determinados no fruto da aroeira neste estudo, podem retardar o processo oxidativo por diferentes mecanismos, visto que podem atuar agentes redutores, doadores de hidrogênio, quelantes de metais, sequestradores de oxigênio singlete, radicais superóxidos, hidroxila e peroxila ou ainda podem absorver a radiação ultravioleta (SOUSA et al., 2007).

Embora na literatura não foram relatados estudos sobre o efeito protetor de antioxidantes naturais frente à foto-oxidação do colesterol, alguns estudos relatam a ação antioxidante de compostos naturais na termo-oxidação. De Oliveira et al. (2020) avaliaram o efeito protetor do fruto da aroeira frente a oxidação do colesterol em óleo de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) aquecidos a 150 e 180 °C. As adições de 0,2 e 0,5% do fruto da aroeira foram capazes de reduzir o conteúdo total de POCs em todos os tratamentos, embora um efeito protetor superior foi observado no tratamento a 150 °C (23,02% e 31,16% para as adições de 0,2% e 0,5%, respectivamente), fato que pode estar associado a degradação térmica dos compostos com atividade antioxidante presentes no fruto. Ferreira et al. (2017) confirmaram o efeito antioxidante de cebolinha (*Allium schoenoprasum* L.), salsa (*Petroselinum crispum*) e da mistura das duas ervas frente a oxidação do colesterol em filés de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) aquecidos em fritadeira do tipo *air-fryer*, observando reduções do conteúdo total de POCs em todos os tratamentos empregados, sendo que a adição de 4% de salsa foi o tratamento mais efetivo, reduzindo o conteúdo total de POCs de $282,9 \pm 6,8$ para $71,8 \pm 4,3$ $\mu\text{g/g}$ (base seca).

A modelagem cinética está ganhando cada vez mais interesse na ciência de alimentos, porque fornece a possibilidade de controlar mudanças nos alimentos, ou seja, controlar a

qualidade dos alimentos durante o processamento e armazenamento, além de controlar o prazo de validade. Entretanto, o desenvolvimento da modelagem cinética na foto-oxidação do colesterol puro é limitado, sendo ainda mais limitado em sistemas mais complexos, como nos óleos e alimentos. Um grande número de estudos foi publicado sobre a quantificação de COPs em diferentes produtos alimentícios, no entanto, a abordagem cinética e a aplicação de modelos matemáticos complexos são raramente utilizadas (MEDINA-MEZA; BARNABA, 2013).

Observou-se que a degradação do colesterol e formação dos óxidos nos diferentes tratamentos com adições dos frutos da aroeira nos óleos expostos à luz fluorescente ao longo de 60 dias apresentaram ajuste no modelo de cinética de primeira ordem (Figuras 16a e 16c, respectivamente), enquanto a degradação do colesterol e formação dos óxidos nos tratamentos com BHT apresentaram ajuste no modelo de cinética de primeira ordem (Figura 16b) e ordem zero (Figura 16d), respectivamente. Com relação a degradação do colesterol e formação dos óxidos de colesterol, a adição dos frutos da aroeira moídos nos óleos expostos à luz fluorescente apresentou uma relação linear, enquanto o tempo de exposição apresentou um efeito quadrático. O que poderia indicar que as alterações que ocorrem nos níveis de colesterol e POCs dependem do tempo de exposição à luz fluorescente, e que os antioxidantes podem estar relacionados a reduções constantes na velocidade da reação em cadeia facilitada pela foto-oxidação do colesterol, com consequente redução dos níveis de POCs durante os períodos de exposição à luz fluorescente estudados.

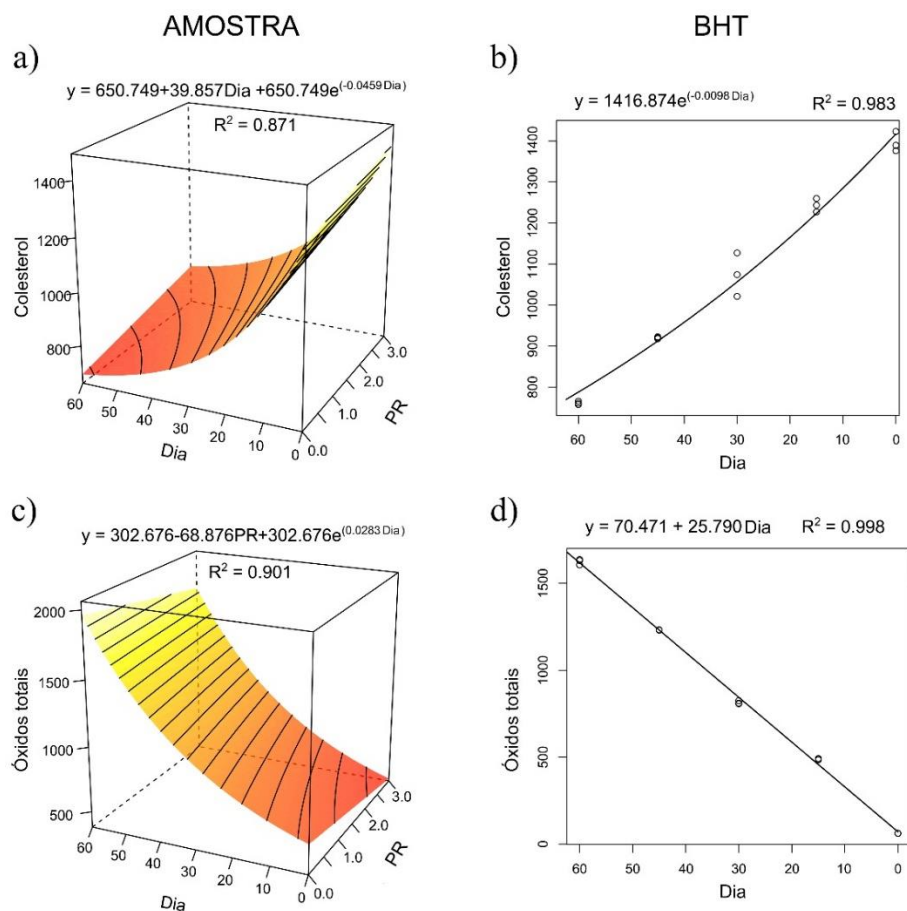


Figura 16: Cinética de degradação do colesterol e de formação de POCs.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos neste trabalho foi possível confirmar que o impacto da exposição à luz fluorescente em óleo de sardinhas acarretou perdas consideráveis nos níveis de ácidos graxos poliinsaturados e elevada formação de produtos provenientes da oxidação do colesterol, reconhecidamente associados a efeitos deletérios à saúde. Portanto, torna-se indispensável o uso de antioxidantes para reduzir os efeitos da foto-oxidação sobre o óleo de sardinhas. De acordo com o capítulo 1, os frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius*) são fontes naturais de compostos bioativos, que apresentam elevada capacidade antioxidante, possibilitando o emprego destes como antioxidantes em alimentos, com o objetivo de reduzir a utilização de antioxidantes sintéticos, que podem estar relacionados à efeitos deletérios a saúde.

Os frutos da aroeira analisados no capítulo 2 apresentam atividade antioxidante, associadas à presença dos compostos bioativos determinados neste estudo, tais como

flavonóides, antocianinas e taninos. A adição dos frutos da aroeira mostrou-se eficiente frente à foto-oxidação em sistemas modelo contendo óleo de sardinha nas três concentrações utilizadas (1%, 2% e 3%) ao reduzir a degradação dos ácidos graxos poli-insaturados e a formação dos produtos da oxidação do colesterol. De maneira geral, a adição dos frutos da aroeira apresentou efeito protetor semelhante ou inferior ao antioxidante sintético (BHT), embora foi possível observar que, em alguns tratamentos, a adição dos frutos demonstrou um efeito protetor superior ao BHT.

Portanto, conclui-se que a adição dos frutos da aroeira pode ser uma alternativa natural aos antioxidantes sintéticos BHT em óleo de sardinha, com o objetivo de preservar valor nutricional e a segurança do produto, devendo-se considerar os aspectos sensoriais e a possível toxicidade dos frutos para ampliar e confirmar estes resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AAL, El-Sayed M.; HUCL, Pierre; RABALSKI, Iwona. Compositional and antioxidant properties of anthocyanin-rich products prepared from purple wheat. **Food chemistry**, v. 254, p. 13-19, 2018.

AKHTAR, Muhammad Javeed et al. Control of salmon oil photo-oxidation during storage in HPMC packaging film: Influence of film colour. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 395-401, 2010.

ALVAREZ-SALA, Andrea et al. Apoptotic effect of a phytosterol-ingredient and its main phytosterol (β -sitosterol) in human cancer cell lines. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 70, n. 3, p. 323-334, 2019.

ANDERSEN, Henrik J.; SKIBSTED, Leif H. Oxidative stability of frozen pork patties. Effect of light and added salt. **Journal of food science**, v. 56, n. 5, p. 1182-1184, 1991.

ANDERSSON, Kristina; LINGNERT, Hans. Influence of oxygen concentration and light on the oxidative stability of cream powder. **LWT-Food Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 169-176, 1998.

ANDRADE, Kátia S.; PONCELET, Denis; FERREIRA, Sandra RS. Sustainable extraction and encapsulation of pink pepper oil. **Journal of Food Engineering**, v. 204, p. 38-45, 2017.

ANGELO, Priscila Milene; JORGE, Neuza. Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Estabelece os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em pescado e produtos de pescado. Resolução - RDC nº 329, de 19 de dezembro de 2019. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26/12/2019, ed. 249, s. 1, p. 83, 2019.

ARAÚJO, J. Química de alimentos: teoria e prática. In: (Ed.). **Química de alimentos: teoria e prática**: UFV, 2004.

ARMSTRONG, SHARYN G.; LEACH, DAVID N.; WYLLIE, S. GRANT. Nutritional evaluation of lipids in fish from temperate Australian waters. **Journal of food science**, v. 56, n. 4, p. 1111-1112, 1991.

ATTA, Emad M.; MOHAMED, Nawal H.; ABDELGAWAD, Ahmed AM. Antioxidants: An overview on the natural and synthetic types. **Eur. Chem. Bull**, v. 6, n. 8, p. 365-375, 2017.

BACELLAR, Isabel OL; BAPTISTA, Mauricio S. Mechanisms of photosensitized lipid oxidation and membrane permeabilization. **Acs Omega**, v. 4, n. 26, p. 21636-21646, 2019.

BAGGIO, Amilton João. Aroeira como potencial para usos múltiplos na propriedade rural. **Embrapa Florestas-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 1988.

BAI, Ningzhu. Advances in the prevention of cardiovascular diseases by phytosterol. In: **Proceedings of the third International Conference on Medical and Health Informatics 2019**. 2019. p. 110-114.

BALOI, M. F. et al. Growth performance, body composition and metabolic response to feeding rates in juvenile Brazilian sardine *Sardinella brasiliensis*. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 6, p. 1458-1466, 2017.

BANDARRA, Narcisa Maria et al. Sardine (*Sardina pilchardus*) lipid composition: Does it change after one year in captivity?. **Food chemistry**, v. 244, p. 408-413, 2018.

BAPTISTA, Maurício S. et al. Type I and type II photosensitized oxidation reactions: Guidelines and mechanistic pathways. **Photochemistry and photobiology**, v. 93, n. 4, p. 912-919, 2017.

BARBOSA, Luiz Cláudio Almeida et al. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1959-1965, 2007.

BARRIUSO, Blanca; ASTIASARÁN, Iciar; ANSORENA, Diana. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. **European food research and technology**, v. 236, n. 1, p. 1-15, 2013.

BECERRA, Josafat A. Hernández et al. Cholesterol oxidation and astaxanthin degradation in shrimp during sun drying and storage. **Food Chemistry**, v. 145, p. 832-839, 2014.

BENDAOU, Houcine et al. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of food Science**, v. 75, n. 6, p. C466-C472, 2010.

BERNARDES, Natalia R. et al. Nitric oxide production, inhibitory, antioxidant and antimycobacterial activities of the fruits extract and flavonoid content of *Schinus terebinthifolius*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 6, p. 644-650, 2014.

BERNARDES, Natália Ribeiro et al. Quantificação dos teores de taninos e fenóis totais e avaliação da atividade antioxidante dos frutos de Aroeira. **Vértices**, v. 13, n. 3, p. 117-28, 2011.

BARONE, Rafael Simões Coelho et al. Fish and fishery products trade in Brazil, 2005 to 2015: A review of available data and trends. **Scientia Agricola**, v. 74, n. 5, p. 417-424, 2017.

BIESALSKI, Hans-Konrad et al. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. **Nutrition**, v. 25, n. 11-12, p. 1202-1205, 2009.

BIRCH, A. E. et al. Antioxidant properties of evening primrose seed extracts. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4502-4507, 2001.

BLIGH, E. Graham; DYER, W. Justin. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOSELLI, Emanuele et al. Cholesterol photosensitized oxidation of horse meat slices stored under different packaging films. **Meat science**, v. 85, n. 3, p. 500-505, 2010.

BOSELLI, Emanuele et al. Cholesterol photosensitized oxidation of beef meat under standard and modified atmosphere at retail conditions. **Meat science**, v. 81, n. 1, p. 224-229, 2009.

BOSELLI, Emanuele et al. Photooxidation of cholesterol and lipids of turkey meat during storage under commercial retail conditions. **Food Chemistry**, v. 91, n. 4, p. 705-713, 2005.

BOSELLI, Emanuele; CARDENIA, Vladimiro; RODRIGUEZ-ESTRADA, Maria Teresa. Cholesterol photosensitized oxidation in muscle foods. **European journal of lipid science and technology**, v. 114, n. 6, p. 644-655, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL, Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**, 2011.

BROWN, Andrew J.; JESSUP, Wendy. Oxysterols: sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. **Molecular aspects of medicine**, v. 30, n. 3, p. 111-122, 2009.

BROWN, Iain et al. Anticancer effects of n-3 EPA and DHA and their endocannabinoid derivatives on breast cancer cell growth and invasion. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 156, p. 102024, 2020.

CALDER, Philip C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 4, p. 469-484, 2015.

CARDENIA, Vladimiro et al. Cholesterol photosensitized oxidation in food and biological systems. **Biochimie**, v. 95, n. 3, p. 473-481, 2013b.

CARDENIA, Vladimiro et al. Health-related lipids components of sardine muscle as affected by photooxidation. **Food and chemical toxicology**, v. 57, p. 32-38, 2013a.

CARNEIRO, M. J. et al. Evaluation of the chemical composition and biological activity of extracts of *Tetragonisca angustula* propolis and *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Journal of Apicultural Research**, v. 55, n. 4, p. 315-323, 2016.

CARVALHO, M. G. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 15, n. 1, p. 158-169, 2013.

CAVALCANTI, N. de B.; BRITO, LT de L. Efeito de diferentes substratos no desenvolvimento de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2009.

CERQUEIRA, Sara Raquel Peixoto. **Os ácidos gordos ómega-3 e os seus efeitos anti-inflamatórios**. Tese de Doutorado, 2013.

CHAIJAN, Manat et al. Changes of lipids in sardine (*Sardinella gibbosa*) muscle during iced storage. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 83-91, 2006.

CHAWLA, Rekha; SIVAKUMAR, S.; GOEL, Nitika. Phytosterol and its esters as novel food ingredients: A review. **Asian Journal of Dairy and Food Research**, v. 35, n. 3, p. 217-226, 2016.

CHEN, Qinyun; SHI, Huang; HO, Chi-Tang. Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 69, n. 10, p. 999, 1992.

CHIEN, J. T.; WANG, H. C.; CHEN, B. H. Kinetic model of the cholesterol oxidation during heating. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2572-2577, 1998.

CHIEN, J.-T. et al. Cholesterol photooxidation as affected by combination of riboflavin and fatty acid methyl esters. **Food chemistry**, v. 81, n. 3, p. 421-431, 2003.

COLE, E. R. et al. Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin. **Brazilian journal of microbiology**, v. 45, n. 3, p. 821-828, 2014.

CÖMERT, Ezgi Doğan; GÖKMEN, Vural. Antioxidants bound to an insoluble food matrix: Their analysis, regeneration behavior, and physiological importance. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 3, p. 382-399, 2017.

D'SOUSA' COSTA, Cinara Oliveira et al. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of extracts prepared from different tissues of *Schinus terebinthifolius*

Raddi that occurs in the coast of Bahia, Brazil. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 43, p. 607, 2015.

DA ROCHA, Paola dos Santos et al. Antioxidant and protective effects of *Schinus terebinthifolius* raddi against doxorubicin-induced toxicity. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 184, n. 3, p. 869-884, 2018.

DA ROCHA, Paola dos Santos et al. Microbiological quality, chemical profile as well as antioxidant and antidiabetic activities of *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 220, p. 36-46, 2019.

DA SILVA DANNENBERG, Guilherme et al. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in vitro and in cheese experimentally contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 36, p. 120-127, 2016.

DA SILVA DANNENBERG, Guilherme et al. Essential oil from pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action. **Food control**, v. 95, p. 115-120, 2019.

DA SILVA, A. C.; JORGE, N. Cogumelos: compostos bioativos e propriedades antioxidantes. **Journal of Health Sciences**, v., n., p., 2015.

DA SILVA, Bruno Guzzo et al. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds from *Schinus terebinthifolius* Raddi fruits: Effects of operating conditions on global yield, volatile compounds, and antiproliferative activity against human tumor cell lines. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 130, p. 10-16, 2017.

DA SILVA, Jessica HS et al. Anti-*Escherichia coli* activity of extracts from *Schinus terebinthifolius* fruits and leaves. **Natural product research**, v. 32, n. 11, p. 1365-1368, 2018.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**: Artmed Editora, 2009.

DANTAS, Natalie Marinho et al. Cholesterol oxidation in fish and fish products. **Journal of food science**, v. 80, n. 12, p. R2627-R2639, 2015.

DANTAS, Natalie Marinho et al. Lipid profile and high contents of cholesterol oxidation products (COPs) in different commercial brands of canned tuna. **Food Chemistry**, v. 352, p. 129334, 2021.

DE ARAUJO GOMES, Rodrigo Borges et al. Residues from the Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolia* Raddi) processing industry: Chemical profile and antimicrobial activity of extracts against hospital bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 143, p. 111430, 2020.

DE CAMPOS BORTOLUCCI, Wanessa et al. *Schinus terebinthifolius* essential oil and fractions in the control of *Aedes aegypti*. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 5, 2019.

DE JESUS, JHF et al. Comportamento térmico e polimorfismo dos antioxidantes: BHA, BHT e TBHQ. **Combustível**, v. 278, p. 118298, 2020.

DE LIMA GLÓRIA, Lorena et al. Phenolic compounds present *Schinus terebinthifolius*

Raddi influence the lowering of blood pressure in rats. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1792, 2017.

DE OLIVEIRA, Rodrigo Fortunato et al. Effect of the fruit aqueous extract of Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) on selected quality parameters of frozen fresh pork sausage. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 2, p. 100055, 2020c.

DE OLIVEIRA, Vanessa Sales et al. Aroeira fruit (*Schinus terebinthifolius* Raddi) as a natural antioxidant: chemical constituents, bioactive compounds and in vitro and in vivo antioxidant capacity. **Food chemistry**, v. 315, p. 126274, 2020b.

DE OLIVEIRA, Vanessa Sales et al. Effect of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) fruit against polyunsaturated fatty acids and cholesterol thermo-oxidation in model systems containing sardine oil (*Sardinella brasiliensis*). **Food Research International**, v. 132, p. 109091, 2020a.

DE OLIVEIRA, Vanessa Sales et al. Use of natural antioxidants in the inhibition of cholesterol oxidation: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 6, p. 1465-1483, 2018.

DE SOUZA, Adriana Regia Marques; ARTHUR, Valter; NOGUEIRA, Danielle Pires. The effect of irradiation in the preservation of pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, n. 8, p. 1082-1083, 2012.

DEGÁSPARI, Cláudia Helena; WASZCZYNSKYJ, Nina; DOS SANTOS, Rodrigo José. Atividade antioxidante de extrato de fruto de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Visão acadêmica**, v. 5, n. 2, 2004.

DEGÁSPARI, Cláudia Helena; WASZCZYNSKYJ, Nina; PRADO, Maria Rosa Machado. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p. 617-622, 2005.

DI VITTORI, Lucia et al. Pre-harvest factors influencing the quality of berries. **Scientia Horticulturae**, v. 233, p. 310-322, 2018.

DIONISI, F. et al. Determination of cholesterol oxidation products in milk powders: methods comparison and validation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 2227-2233, 1998.

DO NASCIMENTO, Aline Fonseca et al. Essential oil composition and acaricidal activity of *Schinus terebinthifolius* from Atlantic forest of Pernambuco, Brazil against *Tetranychus urticae*. **Natural product communications**, v. 7, n. 1, 2012.

DOS SANTOS CAVALCANTI, Adriano et al. Volatiles composition and extraction kinetics from *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* leaves and fruit. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 4, p. 356-362, 2015.

DOS SANTOS OLIVEIRA, Monika BS et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi extracts: From sunscreen activity toward protection of the placenta to Zika virus infection, new uses for a well-known medicinal plant. **Industrial crops and products**, v., n., p. 112503, 2020.

EKRAMI, Mohammad et al. Eco-friendly UV protective bionanocomposite based on Salep-mucilage/flower-like ZnO nanostructures to control photo-oxidation of tilapia fish oil.

International Journal of Biological Macromolecules, v. 168, p. 591-600, 2020.

EMBUSCADO, Milda E. Bioactives from culinary spices and herbs: a review. **Journal of Food Bioactives**, v. 6, 2019.

ENNIGROU, A. et al. Maturation-related changes in phytochemicals and biological activities of the Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) fruits. **South African Journal of Botany**, v. 108, p. 407-415, 2017.

ERKAN, Nuray et al. Nutritional Composition and heavy Metal Concentrations in *Sardinella maderensis* (Lowe, 1838) obtained from the Mauritanian fisheries. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 36, n. 6, p. 906-911, 2020.

FAGUNDES, Mariane Bittencourt et al. Characterization of olive oil flavored with Brazilian pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in different maceration processes. **Food Research International**, v. 137, p. 109593, 2020.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Fisheries and aquaculture statistics**. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome, p. 24-27, 2014.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Fisheries and aquaculture statistics**. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome, 2018.

FERIANI, Anouar et al. HPLC–ESI–QTOF–MS/MS profiling and therapeutic effects of *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* fruits: investigation of their antioxidant, antidiabetic, anti-inflammatory and antinociceptive properties. **Inflammopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 467-481, 2021a.

FERIANI, Anouar et al. Multidirectional insights on polysaccharides from *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* fruits: Physicochemical and functional profiles, in vitro antioxidant, anti-genotoxicity, antidiabetic, and antihemolytic capacities, and in vivo anti-inflammatory and anti-nociceptive properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 2576-2587, 2020.

FERIANI, Anouar et al. *Schinus terebinthifolius* fruits intake ameliorates metabolic disorders, inflammation, oxidative stress, and related vascular dysfunction, in atherogenic diet-induced obese rats. Insight of their chemical characterization using HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 269, p. 113701, 2021b.

FERREIRA, Fernanda S. et al. Impact of air frying on cholesterol and fatty acids oxidation in sardines: Protective effects of aromatic herbs. **Journal of food science**, v. 82, n. 12, p. 2823-2831, 2017.

FEUEREISEN, Michelle M. et al. Characterization of phenolic compounds in Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) Exocarp. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 26, p. 6219-6226, 2014.

FEUEREISEN, Michelle M. et al. Differentiation of Brazilian peppertree (*Schinus terebinthifolius* raddi) and Peruvian peppertree (*Schinus molle* L.) fruits by UHPLC–UV–MS analysis of their anthocyanin and biflavonoid profiles. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 26, p. 5330-5338, 2017b.

FEUEREISEN, Michelle M. et al. Pressurized liquid extraction of anthocyanins and biflavonoids from *Schinus terebinthifolius* Raddi: A multivariate optimization. **Food chemistry**, v. 214, p. 564-571, 2017a.

FIDELIS, Queli C. et al. Ouratea genus: chemical and pharmacological aspects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 1, p. 1-19, 2014.

FIEDOR, Joanna; BURDA, Květoslava. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. **Nutrients**, v. 6, n. 2, p. 466-488, 2014.

FIGUEIRÊDO, Bruno C. et al. Inhibition of cholesterol and polyunsaturated fatty acids oxidation through the use of annatto and bixin in high-pressure processed fish. **Journal of food science**, v. 80, n. 8, p. C1646-C1653, 2015.

FOOTE, Christopher. S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. **Photochemistry and photobiology**, v. 54, n. 5, p. 659-659, 1991.

FORTUNATO, Alice Raquel et al. Effect of Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) extracts on color and oxidative stability of sardine patties stored under refrigeration. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 11, p. e14187, 2019.

FRANKEL, Edwin N. Secondary products of lipid oxidation. **Chemistry and physics of lipids**, v. 44, n. 2-4, p. 73-85, 1987.

FREITAS, Maria Tereza de et al. Effect of cooking method on the formation of 7-ketocholesterol in Atlantic hake (*Merluccius hubbsi*) and smooth weakfish (*Cynoscion leiarchus*) fillets. **LWT-Food Science and Technology**, v. 62, n. 2, p. 1141-1147, 2015.

FULEKI, Tibor; FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. **Journal of food science**, v. 33, n. 1, p. 72-77, 1968.

GIMÉNEZ, Begoña; RONCALÉS, Pedro; BELTRÁN, José A. The effects of natural antioxidants and lighting conditions on the quality characteristics of gilt-head sea bream fillets (*Sparus aurata*) packaged in a modified atmosphere. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 9, p. 1053-1060, 2004.

GIROTTI, Albert W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. **Journal of lipid research**, v. 39, n. 8, p. 1529-1542, 1998.

GIROTTI, Albert W. New trends in photobiology: Photosensitized oxidation of cholesterol in biological systems: Reaction pathways, cytotoxic effects and defense mechanisms. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 13, n. 2, p. 105-118, 1992.

GIROTTI, Albert W.; KORYTOWSKI, Witold. Cholesterol peroxidation as a special type of lipid oxidation in photodynamic systems. **Photochemistry and photobiology**, v. 95, n. 1, p. 73-82, 2019.

GOLDSTEIN, Joseph L.; BROWN, Michael S. A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. **Cell**, v. 161, n. 1, p. 161-172, 2015.

GOMES, Laura Jane et al. Pensando a biodiversidade: aroeira (*Schinus terebinthifolius* RADDI.). **Embrapa Florestas-Livro científico (ALICE)**, 2013.

GONÇALVES, Fabiano Gomes et al. Efeito da pimenta rosa associada a diversas dosagens de antibióticos em frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p. 1503-1509, 2012.

GONÇALVES, Juarez Henrique Teixeira; SANTOS, Adriana Suellen; MORAIS, Harriman Aley. Atividade antioxidante, compostos fenólicos totais e triagem fitoquímica de ervas condimentares desidratadas. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 13, n. 1, p. 486-497, 2015.

GONÇALVES, Renata Menoci et al. Lipid profile and fatty acid composition of marine fish species from Northeast coast of Brazil. **Journal of Food Science and Technology**, p. 1-13, 2020.

GORASSINI, Andrea et al. Rapid determination of cholesterol oxidation products in milk powder-based products by reversed phase SPE and HPLC-APCI-MS/MS. **Food chemistry**, v. 230, p. 604-610, 2017.

GORDON, M. H. et al. Factors affecting lipid oxidation. **Understanding and measuring the shelf-life of food**, p. 128-141, 2004.

GUARDIOLA, Francesc et al. Formación de derivados oxidados del colesterol en alimentos. **Grasas y aceites**, 1995.

GUARDIOLA, Francesc. Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence, and biological effects. **The American Oil Chemists Society**, 2002.

GUINÉ, Raquel PF; HENRIQUES, Francisca. O papel dos ácidos gordos na nutrição humana e desenvolvimentos sobre o modo como influenciam a saúde. **Millenium**, n. 40, p. 7-21, 2011.

GUZZO DA SILVA, Bruno et al. Optimization of hydrodistillation and in vitro anticancer activity of essential oil from *Schinus terebinthifolius* Raddi fruits. **Chemical engineering communications**, v. 206, n. 5, p. 619-629, 2019.

HAIMEUR, Adil et al. Fish Oil and Microalga Omega-3 as Dietary Supplements: A Comparative Study on Cardiovascular Risk Factors in High-Fat Fed Rats. **Lipids**, v. 51, n. 9, p. 1037-1049, 2016.

HAN, Xiuzhen; SHEN, Tao; LOU, Hongxiang. Dietary polyphenols and their biological significance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 8, n. 9, p. 950-988, 2007.

HASSANPOUR, Shahin et al. Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. **International Journal of Forest, Soil and Erosion**, v.1, p. 47-53, 2011.

HSIEH, R. J.; KINSELLA, J. E. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. **Advances in food and nutrition research**, v. 33, p. 233-341, 1989.

HU, Po Chen; CHEN, Bing Huei. Effects of riboflavin and fatty acid methyl esters on cholesterol oxidation during illumination. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3572-3578, 2002.

HUSS, H. H. **Garantia da qualidade dos produtos da pesca**. Food & Agriculture Org., 1997.

HUYUT, Zübeyir; BEYDEMİR, Şükrü; GÜLÇİN, İlhami. Antioxidant and antiradical properties of selected flavonoids and phenolic compounds. **Biochemistry research international**, v. 2017, 2017.

HWANG, Ko-Eun et al. Effects of antioxidant combinations on shelf stability of irradiated chicken sausage during storage. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 106, p. 315-319, 2015.

IBAMA. **Relatório de Reunião sobre a pescada de sardinha na região Sul e Sudeste**. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Itajaí, p. 34, 2013.

ITO, N. et al. Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 10-11, p. 1071-1082, 1986.

JAIN, Mahendra K. et al. Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A2 from berries of *Schinus terebinthifolius*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 3, p. 537-547, 1995.

JERIBI, Chokri et al. Comparative study of bioactive compounds and antioxidant activity of *Schinus terebinthifolius* Raddi fruits and leaves essential oils. **Int J Sci Res**, v. 3, n. 12, p. 452-8, 2014.

JOHNSON, Melissa; MCELHENNEY, Wendell H.; EGNIN, Marceline. Influence of green leafy vegetables in diets with an elevated ω -6: ω -3 fatty acid ratio on rat blood pressure, plasma lipids, antioxidant status and markers of inflammation. **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 301, 2019.

KAISTHA, Krishan K.; KIER, Lemont B. Structural studies on terebinthone from *Schinus terebinthifolius*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 3, p. 245-248, 1962a.

KAISTHA, Krishan K.; KIER, Lemont B. Structural studies on the triterpenes of *Schinus terebinthifolius*. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 51, n. 12, p. 1136-1139, 1962b.

KASSEM, M. E. S.; EL-DESOKY, S. K.; SHARAF, M. Biphenyl esters and biflavonoids from the fruits of *Schinus terebinthifolius*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 40, n. 5, p. 447-450, 2004.

KAURINOVIC, Biljana; VASTAG, Djendji. Flavonoids and phenolic acids as potential natural antioxidants. In: **Antioxidants**. London, UK: IntechOpen, 2019. p. 1-20.

KAZUO, Miyashita. Prevention of fish oil oxidation. **Journal of oleo science**, v. 68, n. 1, p. 1-11, 2019.

KHATIB, Soliman; VAYA, Jacob. Oxysterols and symptomatic versus asymptomatic human atherosclerotic plaque. **Biochemical and biophysical research communications**, v.

446, n. 3, p. 709-713, 2014.

KHOO, Hock Eng et al. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. **Food & nutrition research**, v. 61, n. 1, p. 1361779, 2017.

KLOUDOVA, Alzbeta; GUENGERICH, F. Peter; SOUCEK, Pavel. The role of oxysterols in human cancer. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 7, p. 485-496, 2017.

KORNIENKO, Ju S. et al. High doses of synthetic antioxidants induce premature senescence in cultivated mesenchymal stem cells. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.

KRITCHEVSKY, David; CHEN, Shirley C. Phytosterols—health benefits and potential concerns: a review. **Nutrition Research**, v. 25, n. 5, p. 413-428, 2005.

KULIG, Waldemar et al. Cholesterol oxidation products and their biological importance. **Chemistry and physics of lipids**, v. 199, p. 144-160, 2016.

KUMAR, Naresh; GOEL, Nidhi. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. **Biotechnology Reports**, v. 24, p. e00370, 2019.

KURUTAS, Ergul Belge. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutrition journal**, v. 15, n. 1, p. 1-22, 2015.

LAGUERRE, Mickaël; LECOMTE, Jérôme; VILLENEUVE, Pierre. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in lipid research**, v. 46, n. 5, p. 244-282, 2007.

LEMAY-NEDJELSKI, Lauren et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids time-dependently reduce cell viability and oncogenic microRNA-21 expression in estrogen receptor-positive breast cancer cells (MCF-7). **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 244, 2018.

LENZI, Maurício; ORTH, Afonso Inácio. Caracterização funcional do sistema reprodutivo da Aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi), em Florianópolis-SC, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 2, p. 198-201, 2004.

LEOPOLD, Jane A.; LOSCALZO, Joseph. Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 12, p. 1673-1706, 2009.

LERCKER, G.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T. Cholesterol oxidation: presence of 7-ketocholesterol in different food products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, n. 4, p. 625-631, 2000.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, 148, 350-382, 1987.

LINDEN, Maria et al. Effects of structural differences on the antibacterial activity of biflavonoids from fruits of the Brazilian peppertree (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Food Research International**, v. 133, p. 109134, 2020.

LLOYD, H. A. et al. Terpenes of *Schinus terebinthifolius*. **Phytochemistry**, 1301-1302, 1977.

LOCALI-PEREIRA, Adilson Roberto et al. Modulation of volatile release and antimicrobial properties of pink pepper essential oil by microencapsulation in single-and double-layer structured matrices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 335, p. 108890, 2020.

LORENZI, Harri. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2ª edição, 1998.

LORENZI, Harri; FLORA, I. P. D. E. D. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, p. 544, 2002.

LORENZO, José Manuel et al. Berries extracts as natural antioxidants in meat products: A review. **Food Research International**, v. 106, p. 1095-1104, 2018.

LUZIA, Liania A. et al. The influence of season on the lipid profiles of five commercially important species of Brazilian fish. **Food chemistry**, v. 83, n. 1, p. 93-97, 2003.

MALDONADO-PEREIRA, Lisaura et al. The role of cholesterol oxidation products in food toxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 908-939, 2018.

MARTINS, Amanda Mattos Dias et al. Sardinhas: importância nutricional e econômica para o Brasil. **Semioses**, v. 10, n. 2, p. 51-59, 2016.

MEDINA-MEZA, Ilce Gabriela et al. Kinetics of 25-hydroperoxycholesterol formation during photo-oxidation of crystalline cholesterol. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 8, p. 1543-1551, 2014.

MEDINA-MEZA, Ilce Gabriela et al. Oxidative pattern from fluorescent light exposition of crystalline cholesterol. **Food Biophysics**, v. 7, n. 3, p. 209-219, 2012.

MEDINA-MEZA, Ilce Gabriela; BARNABA, Carlo. Kinetics of cholesterol oxidation in model systems and foods: current status. **Food Engineering Reviews**, v. 5, n. 3, p. 171-184, 2013.

MEDINA-MEZA, Ilce Gabriela; BARNABA, Carlo; BARBOSA-CÁNOVAS, Gustavo V. Effects of high-pressure processing on lipid oxidation: A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 22, p. 1-10, 2014.

MENEGALI, Beatriz Schmidt et al. Pink pepper extract as a natural antioxidant in chicken burger: Effects on oxidative stability and dynamic sensory profile using Temporal Dominance of Sensations. **LWT**, v. 121, p. 108986, 2020.

MERLO, Thais Cardoso et al. Incorporation of pink pepper residue extract into chitosan film combined with a modified atmosphere packaging: Effects on the shelf life of salmon

fillets. **Food Research International**, v. 125, p. 108633, 2019.

MIAO, Zhijuan et al. Role of polyunsaturated fatty acids in ischemic stroke—a perspective of specialized pro-resolving mediators. **Clinical Nutrition**, 1921.

MINTZER, Evan; CHARLES, Grace; GORDON, Sharon. Interaction of two oxysterols, 7-ketocholesterol and 25-hydroxycholesterol, with phosphatidylcholine and sphingomyelin in model membranes. **Chemistry and physics of lipids**, v. 163, n. 6, p. 586-593, 2010.

MISHRA, Sanjukta; MISHRA, Bana Bihari. Study of lipid peroxidation, nitric oxide end product, and trace element status in type 2 diabetes mellitus with and without complications. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 7, n. 2, p. 88, 2017.

MIYOSHI, Noriyuki et al. Implications of cholesterol autoxidation products in the pathogenesis of inflammatory diseases. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 446, n. 3, p. 702-708, 2014.

MONTEIRO, Julio Marcelino et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MORAIS, Thiago R. et al. Application of an ionic liquid in the microwave assisted extraction of cytotoxic metabolites from fruits of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 3, p. 492-497, 2017.

MORRISSEY, P. A. et al. Lipid stability in meat and meat products. **Meat science**, v. 49, p. S73-S86, 1998.

MORTON, Julia F. Brazilian pepper—its impact on people, animals and the environment. **Economic Botany**, v. 32, n. 4, p. 353-359, 1978.

MORZYCKI, Jacek W. Recent advances in cholesterol chemistry. **Steroids**, v. 83, p. 62-79, 2014.

MUHS, Amelia et al. Virulence inhibitors from Brazilian peppertree block quorum sensing and abate dermonecrosis in skin infection models. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2017.

NAYAK, Balunkeswar; LIU, Rui Hai; TANG, Juming. Effect of processing on phenolic antioxidants of fruits, vegetables, and grains—a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 55, n. 7, p. 887-918, 2015.

NIKI, Etsuo et al. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 338, n. 1, p. 668-676, 2005.

OHSHIMA, T. **Formation and content of cholesterol oxidation products in seafood and seafood products**: secondary title: AOAC Press: Champaign, IL, 187-203 p., 2002.

OLIVEIRA, George Layson da Silva. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 36-44, 2015.

OLIVEIRA, Soraya Kobarg et al. Efeito da sazonalidade sobre o valor químico de peixes marinhos do litoral catarinense: sardinha (*Sardinella brasilienses*), atum (*Katsuwonus pelamis*), corvina (*Micropogonias furnieri*) e pescada (*Cynoscion steindacheri*). 2003. Dissertação (mestrado) - **Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, SC**. Disponível em: <<http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/84650>>. Acesso em: 20 maio de 2021.

ORCZEWSKA-DUDEK, Sylwia et al. Cholesterol and lipid peroxides in animal products and health implications-a review. **Annals of Animal Science**, v. 12, n. 1, p. 25-52, 2012.

ORLIEN, Vibeke; HANSEN, Eva; SKIBSTED, Leif H. Lipid oxidation in high-pressure processed chicken breast muscle during chill storage: critical working pressure in relation to oxidation mechanism. **European Food Research and Technology**, v. 211, n. 2, p. 99-104, 2000.

OSADA, Kyoichi et al. Levels and formation of oxidized cholesterols in processed marine foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1893-1898, 1993.

OZOGUL, Yesim et al. The effects of the combination of freezing and the use of natural antioxidant technology on the quality of frozen sardine fillets (*Sardinella aurita*). **International journal of food science & technology**, v. 46, n. 2, p. 236-242, 2011.

PAGANI, Alessandra Almeida Castro et al. Quantification of bioactive compounds of pink pepper (*Schinus Terebinthifolius*, Raddi). **International Journal of Engineering and Innovative Technology**, v. 4, n. 5, p. 37-41, 2014.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of nutritional science**, v. 5, 2016.

PANIANGVAIT, P. et al. Cholesterol oxides in foods of animal origin. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 6, p. 1159-1174, 1995.

PARCHETA, Monika et al. Recent Developments in Effective Antioxidants: The Structure and Antioxidant Properties. **Materials**, v. 14, n. 8, p. 1984, 2021.

PATOCKA, Jiri; DE ALMEIDA, Joyce Diz. Brazilian pepper tree: Review of pharmacology. **Military Medicinal Science Letters**, v. 86, n. 1, p. 32-41, 2017.

PÉRINO-ISSARTIER, Sandrine et al. Microwave turbo hydrodistillation for rapid extraction of the essential oil from *Schinus terebinthifolius* Raddi Berries. **Chromatographia**, v. 72, n. 3, p. 347-350, 2010.

PERUMALLA, A. V. S.; HETTIARACHCHY, Navam S. Green tea and grape seed extracts-Potential applications in food safety and quality. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 827-839, 2011.

PINTO, Jannaína V. da Costa et al. Effect of soil nitrogen and phosphorus on early

development and essential oil composition of *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 19, n. 1, p. 247-257, 2016.

PIRAS, Alessandra et al. Chemical Composition and Biological Activity of Volatile Extracts from Leaves and Fruits of *Schinus terebinthifolius* Raddi from Tunisia. **Records of Natural Products**, v. 11, n. 1, 2017.

PISOSCHI, Aurelia Magdalena et al. Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: a review. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

PIZATO, Nathalia et al. Omega-3 docosahexaenoic acid induces pyroptosis cell death in triple-negative breast cancer cells. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.

PROCHÁZKOVÁ, Dagmar; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 513-523, 2011.

QUEIRES, L. C. S. et al. Polyphenols purified from the Brazilian aroeira plant (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells. **Anticancer research**, v. 26, n. 1A, p. 379-387, 2006.

QURESHI, Abdul Wahid et al. Ageing enhances the shedding of splenocyte microvesicles with endothelial pro-senescent effect that is prevented by a short-term intake of omega-3 PUFA EPA: DHA 6: 1. **Biochemical pharmacology**, v. 173, p. 113734, 2020.

RAEISI, Sara et al. Evaluation of antioxidant and antimicrobial effects of shallot (*Allium ascalonicum* L.) fruit and ajwain (*Trachyspermum ammi* (L.) Sprague) seed extracts in semi-fried coated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets for shelf-life extension. **LWT-Food Science and Technology**, v. 65, p. 112-121, 2016.

RAJASINGHE, Lichchavi D. et al. Omega-3 fatty acid intake suppresses induction of diverse autoantibody repertoire by crystalline silica in lupus-prone mice. **Autoimmunity**, v. 53, n. 7, p. 415-433, 2020.

RAMALHO, Valéria Cristina; JORGE, Neuza. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química nova**, p. 755-760, 2006.

RIBEIRO, Jéssica Souza et al. Natural antioxidants used in meat products: A brief review. **Meat Science**, v. 148, p. 181-188, 2019.

RICHARDSON, Alexandra J.; MONTGOMERY, Paul. The Oxford-Durham study: a randomized, controlled trial of dietary supplementation with fatty acids in children with developmental coordination disorder. **Pediatrics**, v. 115, n. 5, p. 1360-1366, 2005.

RICHTER, Rita; VON REUß, Stephan H.; KÖNIG, Wilfried A. Spirocyclopropane-type sesquiterpene hydrocarbons from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Phytochemistry**, v. 71, n. 11-12, p. 1371-1374, 2010.

ROMANI, Viviane Patrícia; HERNÁNDEZ, Carlos Prentice; MARTINS, Vilásia Guimarães. Pink pepper phenolic compounds incorporation in starch/protein blends and its potential to inhibit apple browning. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 15, p. 151-158, 2018.

RONSEIN, Graziella E. et al. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 563-568, 2006.

ROSA, Juliana Severo et al. Influência dos ácidos graxos ômega 3 e vitamina D na depressão: uma breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 16, n. 2, p. 217-223, 2017.

RUFINO, Maria do Socorro et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

RUSSO, D., Balistreri, C., TAPANES-CASTILLO, A., & Pina, M. Preliminary Antioxidant Activity Analysis of Brazilian Pepper Tree (*Schinus terebinthifolius*) Extracts via TLC, FRAP, and DPPH. **International Conference Series on Multidisciplinary Sciences**, 1, 1-3, 2017.

SAENZ DE VITERI, Manuel et al. Uma maior proporção de ácido eicosapentaenóico (EPA) Quando combinado com o ácido docosahexaenóico (DHA) em suplementos dietéticos ômega-3, proporciona maiores efeitos antioxidantes nas células retiniais humanas. **Antioxidants**, v. 9, n. 9, pág. 828, 2020.

SAINI, Ramesh Kumar; KEUM, Young-Soo. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance—A review. **Life sciences**, v. 203, p. 255-267, 2018.

SALDANHA, T.; BENASSI, M. T.; BRAGAGNOLO, N. Fatty acid contents evolution and cholesterol oxides formation in Brazilian sardines (*Sardinella brasiliensis*) as a result of frozen storage followed by grilling. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 7, p. 1301-1309, 2008.

SALDANHA, Tatiana et al. HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish: comparative study of RI, UV, and APCI-MS detectors. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 12, p. 4107-4113, 2006.

SALDANHA, Tatiana. Fatores que influenciam a formação de oxidos de colesterol em produtos marinhos ricos em ácidos graxos poliinsaturados. 2006. 168 p. Tese (doutorado) - **Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP**. Disponível em: < <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/255272>>. Acesso em: 20 maio de 2021.

SALDAÑA, Erick et al. Sensory and hedonic impact of the replacement of synthetic antioxidant for pink pepper residue extract in chicken burger. **Journal of food science and technology**, v. 57, n. 2, p. 617-627, 2020.

SALEM, M. Z. M. et al. Antibacterial activity of extracted bioactive molecules of *Schinus terebinthifolius* ripened fruits against some pathogenic bacteria. **Microbial pathogenesis**, v. 120, p. 119-127, 2018.

SALEM, Mohamed ZM; HAMED, Safa Abd El-Kader Mohamed; MANSOUR, Maisa. Assessment of efficacy and effectiveness of some extracted bio-chemicals as bio-fungicides on Wood. **Drvna industrija: Znanstveni časopis za pitanja drvne tehnologije**, v. 70, n. 4, p.

337-350, 2019.

SAMADI, Afshin et al. A Comprehensive Review on Oxysterols and Related Diseases. **Current medicinal chemistry**, 2020.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. Actividad antioxidante. **Alimentaria**, n. 329, p. 29-40, 2002.

SANTOS JÚNIOR, Oscar O. et al. A simple, fast and efficient method for transesterification of fatty acids in foods assisted by ultrasound energy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 9, p. 1712-1719, 2014.

SANTOS, Ana Cristina Atti dos et al. Chemical composition of the essential oils from leaves and fruits of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi from Southern Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 12, n. 1, p. 16-25, 2009.

SARTORELLI, Patricia et al. In vitro trypanocidal evaluation of pinane derivatives from essential oils of ripe fruits from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 743-747, 2012.

SASSI, Ahlem Ben et al. Phytochemical Profile and Antiproliferative, Anti-tyrosinase, Antioxidant, and Antibacterial Potential of *Schinus terebinthifolius* Growing in Tunisia. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 26, n. 1, p. 61-76, 2020.

SATO, Tomohito et al. Preferential incorporation of administered eicosapentaenoic acid into thin-cap atherosclerotic plaques. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 39, n. 9, p. 1802-1816, 2019.

SAWADA, Yu; SAITO-SASAKI, Natsuko; NAKAMURA, Motonobu. Omega 3 Fatty Acid and Skin Diseases. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 3818, 2021.

SAWAYA, Alexandra CHF et al. Brazilian propolis of *Tetragonisca angustula* and *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 37, n. 3, p. 398-407, 2006.

SCAPIN, G. et al. Phenolics compounds, flavonoids and antioxidant activity of chia seed extracts (*Salvia hispanica*) obtained by different extraction conditions. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 6, 2016.

SCHERR, Carlos et al. Concentração de ácidos graxos e colesterol de peixes habitualmente consumidos no Brasil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2015.

SCHIMITBERGER, Vanusa Maria Bonatto et al. Volatile compounds profile changes from unripe to ripe fruits of Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolia* Raddi). **Industrial Crops and Products**, v. 119, p. 125-131, 2018.

SEOL, Kuk-Hwan et al. The effect of the water extracts of digestive medicinal plants on the shelf-life of pork patties. **Food Science of Animal Resources**, v. 31, n. 1, p. 54-60, 2011.

SERRANO-LEÓN, Juan S. et al. Chitosan active films containing agro-industrial residue extracts for shelf life extension of chicken restructured product. **Food Research International**, v. 108, p. 93-100, 2018.

SHAHIDI, Fereidoon; AMBIGAIPALAN, Priyatharini. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. **Journal of functional foods**, v. 18, p. 820-897, 2015.

SHAHIDI, Fereidoon; ZHONG, Ying. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. **Chemical society reviews**, v. 39, n. 11, p. 4067-4079, 2010.

SHARANGI, AMIT BARAN. Secondary metabolites in spices and medicinal plants: an overview. **Plant secondary metabolites, biological & therapeutic significance**, v. 1, p. 143-168, 2017.

SHARIFI-RAD, Mehdi et al. Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. **Frontiers in physiology**, v. 11, p. 694, 2020.

SHIRLEY, Brenda W. Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway. **Trends in plant science**, v. 1, n. 11, p. 377-382, 1996.

SHOZEN, Kei-ichi et al. Formation of cholesterol oxides in marine fish products induced by grilling. **Fisheries science**, v. 61, n. 5, p. 817-821, 1995.

SILVA, Bruno Guzzo et al. Effects of different drying conditions on key quality parameters of pink peppercorns (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Journal of Food Quality**, v. 2017, 2017.

SILVA, Marília Lordêlo Cardoso et al. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, Priscila. T. et al. Composição Química do Óleo Essencial Extraído das Folhas dos Indivíduos Macho e Fêmea e Frutos de *Schinus terebinthifolius*. **Revista Virtual Química**, v. 11, 2019.

SILVA, Tatiana et al. Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) Fruit: Chemical Composition and Antioxidant Capacity. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n., p. 1614-1624, 2019.

SILVA-LUZ, C. L.; PIRANI, J. R. Anacardiaceae in lista de espécies da flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2012.

SKOPP, Gisela; SCHWENKER, Gerhard. Biflavonoide aus *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae)/Biflavonoids from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 41, n. 11, p. 1479-1482, 1986.

SKROVANKOVA, Sona et al. Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 10, p. 24673-24706, 2015.

SMITH, Leland L. Cholesterol autoxidation 1981–1986. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 44, n. 2-4, p. 87-125, 1987.

SMITH, Leland L. **Cholesterol autoxidation**. Springer Science & Business Media, 1981.

SOARES, Daniele G.; ANDREAZZA, Ana C.; SALVADOR, Mirian. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 1077-1080, 2003.

SOARES, Denise Josino et al. Processos oxidativos na fração lipídica de alimentos. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 30, n. 2, 2012.

SOARES, Sergio Eduardo. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOBHANI, Mahsa et al. Immunomodulatory; anti-inflammatory/antioxidant effects of polyphenols: a comparative review on the parental compounds and their metabolites. **Food Reviews International**, p. 1-53, 2020.

SOTTERO, Barbara et al. Lipid oxidation derived aldehydes and oxysterols between health and disease. **European journal of lipid science and technology**, v. 121, n. 1, p. 1700047, 2019.

SOUSA, Cleyton Marcos de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA**, v. 37, n. 2, p. 127-135, 2003.

SPIEGEL, Maciej et al. Antioxidant Activity of Selected Phenolic Acids–Ferric Reducing Antioxidant Power Assay and QSAR Analysis of the Structural Features. **Molecules**, v. 25, n. 13, p. 3088, 2020.

STAHL, Egon; KELLER, K.; BLINN, C. Cardanol, a skin irritant in pink pepper. **Planta medica**, v. 48, n. 05, p. 5-9, 1983.

SWAIN, Tony; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 63-68, 1959.

TALAPATRA, Sunil Kumar; TALAPATRA, Bani. Steroids: Cholesterol and Other Phytosterols. In: **Chemistry of Plant Natural Products**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2015. p. 553-583.

TANASE, Corneliu; BUJOR, Oana-Crina; POPA, Valentin I. Phenolic natural compounds and their influence on physiological processes in plants. In: **Polyphenols in plants**. Academic Press, 2019. p. 45-58.

TANG, Huaqiao et al. Triterpenoid acids isolated from *Schinus terebinthifolia* fruits reduce *Staphylococcus aureus* virulence and abate dermonecrosis. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.

TAPAS, Ahmad R.; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. Flavonoids as nutraceuticals: a review. **Tropical journal of Pharmaceutical research**, v. 7, n. 3, p. 1089-1099, 2008.

TELAHIGUE, Khaoula et al. The changes of fatty acid composition in sun dried, oven

dried and frozen hake (*Merluccius merluccius*) and sardinella (*Sardinella aurita*). **African Journal of Biochemistry Research**, v. 7, n. 8, p. 158-164, 2013.

THANAN, Raynoo et al. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 1, p. 193-217, 2015.

TLILI, Nizar et al. *Schinus terebinthifolius* vs *Schinus molle*: A comparative study of the effect of species and location on the phytochemical content of fruits. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 559-565, 2018.

URLIĆ, Marjan et al. Effects of Different n6/n3 PUFAs Dietary Ratio on Cardiac Diabetic Neuropathy. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 2761, 2020.

VAISALI, C.; BELUR, Prasanna D.; REGUPATHI, I. Comparison of antioxidant properties of phenolic compounds and their effectiveness in imparting oxidative stability to sardine oil during storage. **LWT-Food Science and Technology**, v. 69, p. 153-160, 2016.

VALENTINI, Kelly J. et al. The effect of fish oil supplementation on brain DHA and EPA content and fatty acid profile in mice. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 69, n. 6, p. 705-717, 2018.

VAN BOEKEL, M. A. J. S. Statistical aspects of kinetic modeling for food science problems. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 3, p. 477-486, 1996.

VEJDAN, Akbar; OJAGH, Seyed Mahdi; ABDOLLAHI, Mehdi. Effect of gelatin/agar bilayer film incorporated with TiO₂ nanoparticles as a UV absorbent on fish oil photooxidation. **International journal of food science & technology**, v. 52, n. 8, p. 1862-1868, 2017.

VENTER, Pieter B. et al. Analysis of commercial proanthocyanidins. Part 3: The chemical composition of wattle (*Acacia mearnsii*) bark extract. **Phytochemistry**, v. 83, p. 153-167, 2012.

VIANA DA SILVA, Marcondes et al. Synthetic and natural antioxidants used in the oxidative stability of edible oils: an overview. **Food Reviews International**, p. 1-24, 2021.

VICENTE, Silvio JV et al. Oxidation of cholesterol in foods and its importance for human health. **Food Reviews International**, v. 28, n. 1, p. 47-70, 2012.

VIEIRA, Mariana Neves et al. *Schinus terebinthifolius* scale-up countercurrent chromatography (Part I): High performance countercurrent chromatography fractionation of triterpene acids with off-line detection using atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1389, p. 39-48, 2015.

VITORIANO, Ana Paula Garcia et al. Composição lipídica de suplementos alimentares de ômega-3 à base de óleo de peixe comercializados em Maringá. 2019. **Universidade CESUMAR**. XI Encontro Internacional de Produção Científica, 2019.

VON SCHACKY, Clemens. Importance of EPA and DHA blood levels in brain structure and function. **Nutrients**, v. 13, n. 4, p. 1074, 2021.

VYNCKE, W. Evaluation of the direct thiobarbituric acid extraction method for determining oxidative rancidity in mackerel (*Scomber scombrus* L.). **Fette, Seifen, Anstrichmittel**, v. 77, n. 6, p. 239-240, 1975.

WAGNER, Karl-Heinz; ELMADFA, Ibrahim. Biological relevance of terpenoids. **Annals of Nutrition and metabolism**, v. 47, n. 3-4, p. 95-106, 2003.

WANKENNE, M. A. Os tipos e os efeitos da rancidez oxidativa em alimentos. **Food Ingredients Brasil**, v. 29, p. 38-45, 2014.

WHANG, K.; PENG, I. C. Photosensitized lipid peroxidation in ground pork and turkey. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 6, p. 1596-1598, 1988.

WOOD, J. D. et al. Effects of fatty acids on meat quality: a review. **Meat science**, v. 66, n. 1, p. 21-32, 2004.

XUE-SHAN, Zhao et al. Imbalanced cholesterol metabolism in Alzheimer's disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 456, p. 107-114, 2016.

YAN, Yiqing et al. Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. **Immunity**, v. 38, n. 6, p. 1154-1163, 2013.

YU, Hui et al. Antioxidant activities of aqueous extract from *Stevia rebaudiana* stem waste to inhibit fish oil oxidation and identification of its phenolic compounds. **Food chemistry**, v. 232, p. 379-386, 2017.

YUE, Er et al. Anthocyanin is involved in the activation of pyroptosis in oral squamous cell carcinoma. **Phytomedicine**, v. 56, p. 286-294, 2019.

ZAMARIA, Nicolas. Alteration of polyunsaturated fatty acid status and metabolism in health and disease. **Reproduction Nutrition Development**, v. 44, n. 3, p. 273-282, 2004.

ZAMBLIAZI, C. Oxidation reactions of vegetable oils and fats. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciencia e Tecnologia de Alimentos (Brazil)**, v. 33, n. 1, p. 1-7, 1999.

ZEHIROGLU, Cuma; SARIKAYA, Sevim Beyza Ozturk. The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. **Journal of food science and technology**, v. 56, n. 11, p. 4757-4774, 2019.

ZHENG, Wei; WANG, Shioy Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5165-5170, 2001.

ZHISHEN, Jia; MENGCHENG, Tang; JIANMING, Wu. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.

ZHONG, Shanshan et al. An update on lipid oxidation and inflammation in cardiovascular diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 144, p. 266-278, 2019.

ZHU, Xiangqian et al. A comparison of selected methods for determining eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in cereal-based foods. **Food chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1320-1327, 2011.

ZMYSŁOWSKI, Adam; SZTERK, Arkadiusz. Current knowledge on the mechanism of atherosclerosis and pro-atherosclerotic properties of oxysterols. **Lipids in health and disease**, v. 16, n. 1, p. 1-19, 2017.

ANEXOS 1

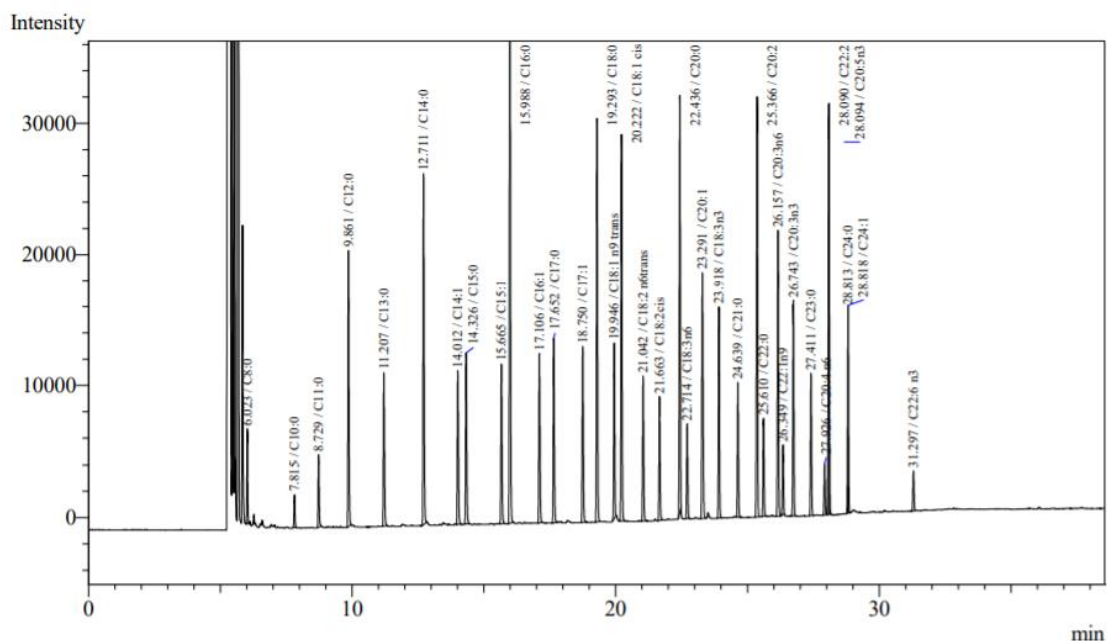


Figura 17: Perfil cromatográfico dos padrões de ésteres metílicos dos ácidos graxos.

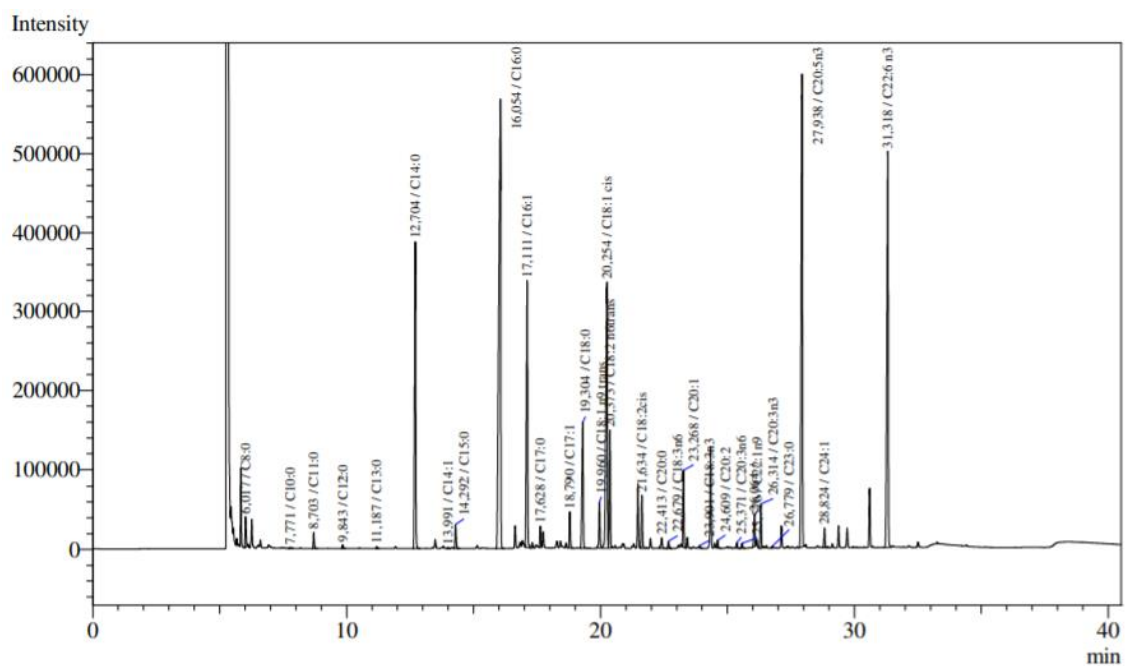


Figura 18: Perfil cromatográfico da amostra controle sem exposição.

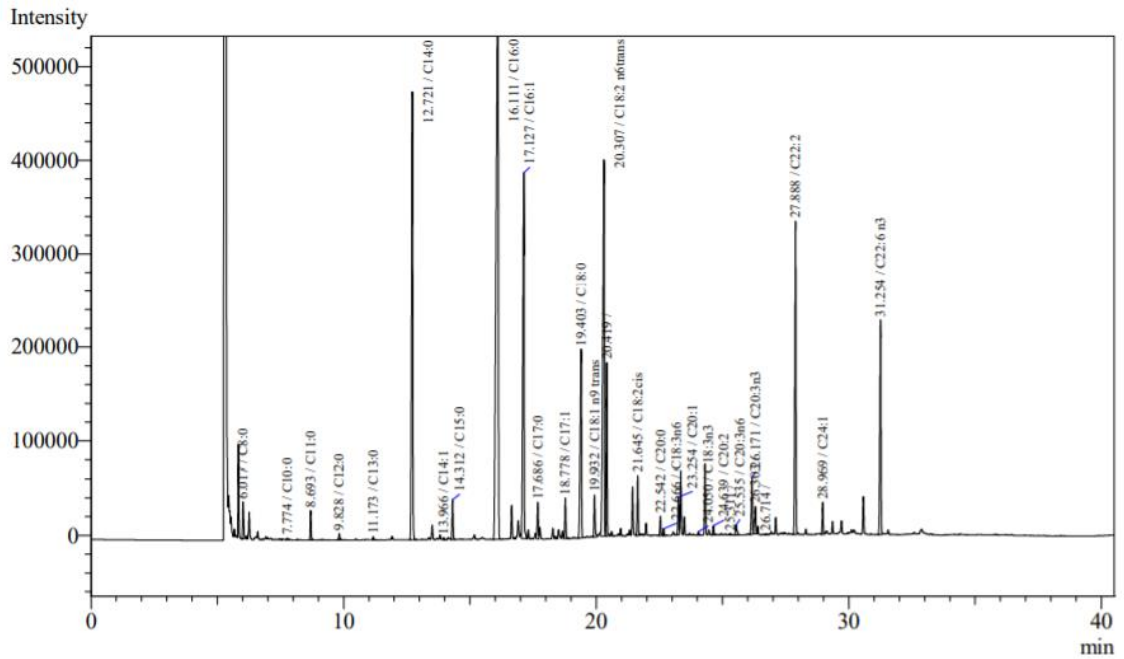


Figura 19: Perfil cromatográfico da amostra de óleo com BHT após 15 dias de exposição.

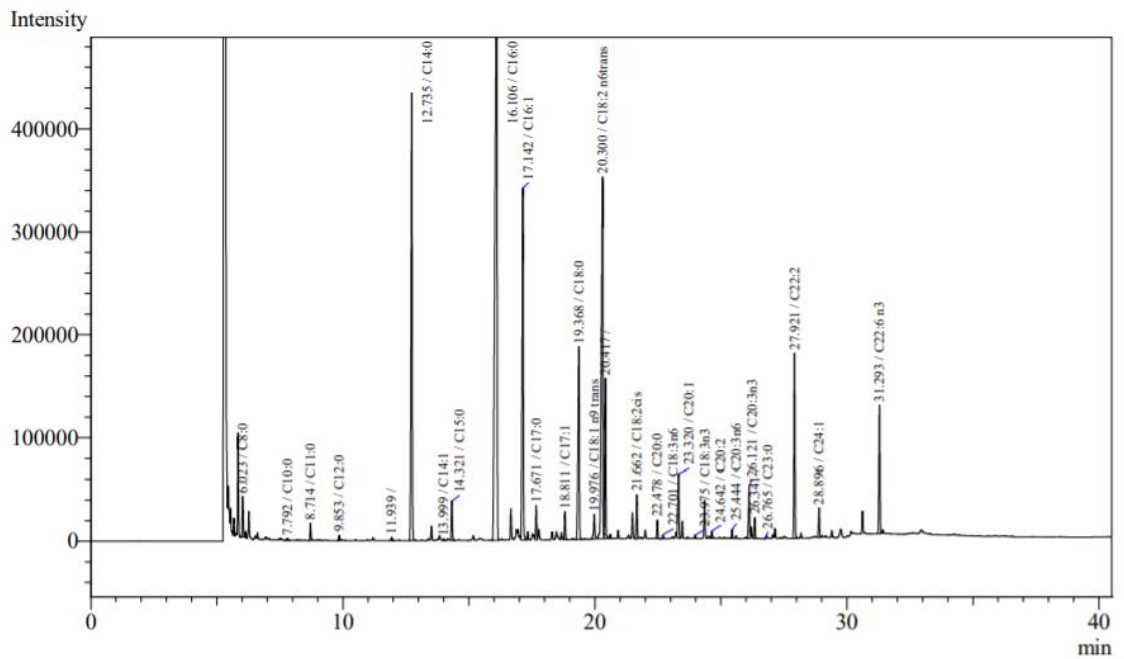


Figura 20: Perfil cromatográfico da amostra de óleo com 1% do fruto da aroeira exposto por 30 dias.

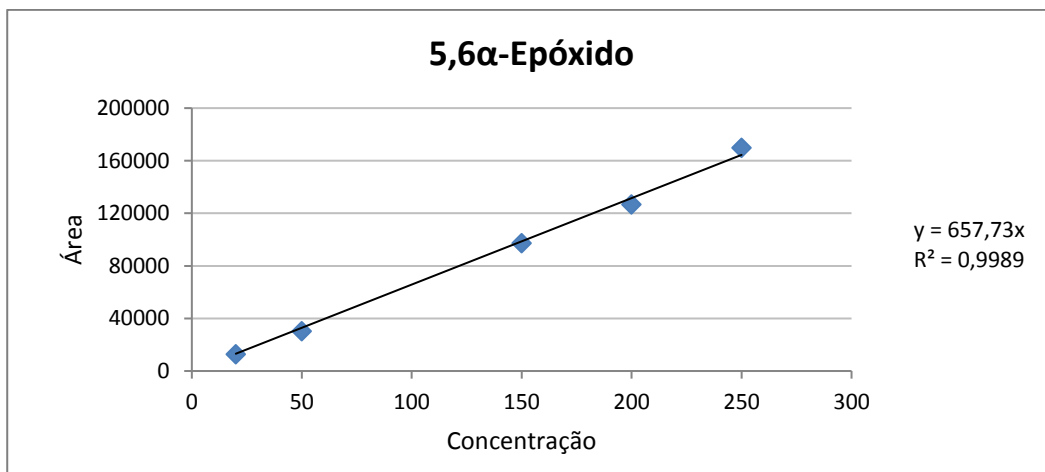


Figura 21: Padronização externa do 5,6 α -epoxicolesterol.

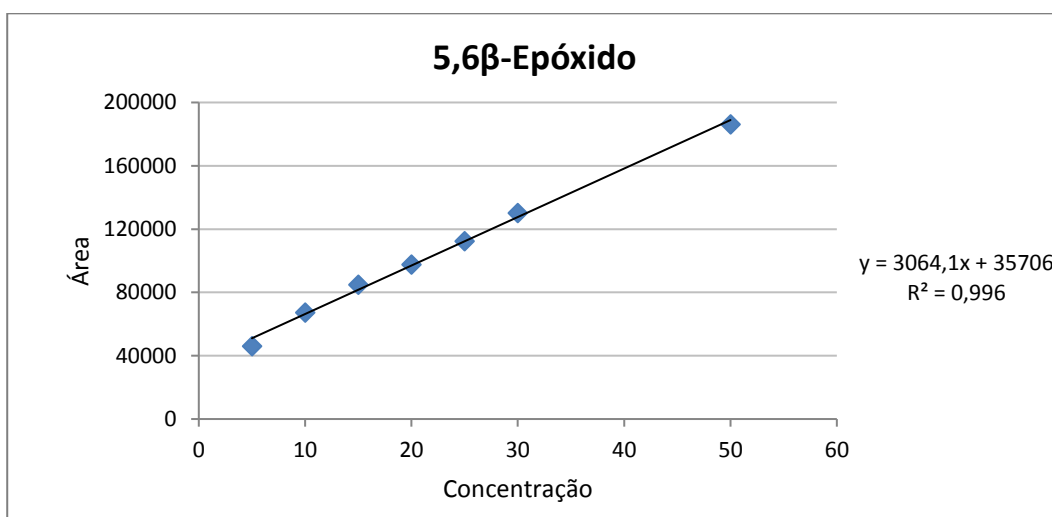


Figura 22: Padronização externa do 5,6 β -epoxicolesterol.

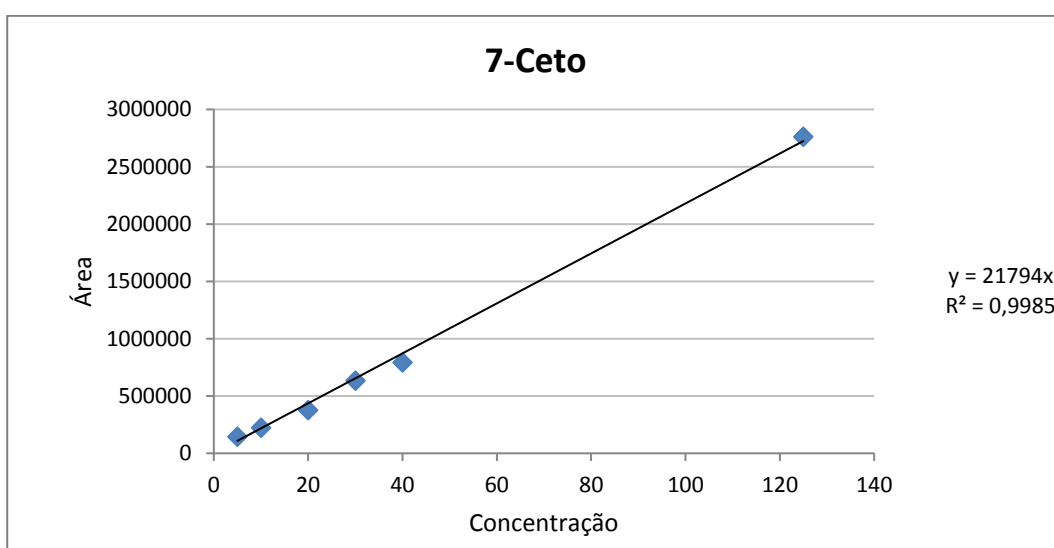


Figura 23: Padronização externa do 7-cetocolesterol.

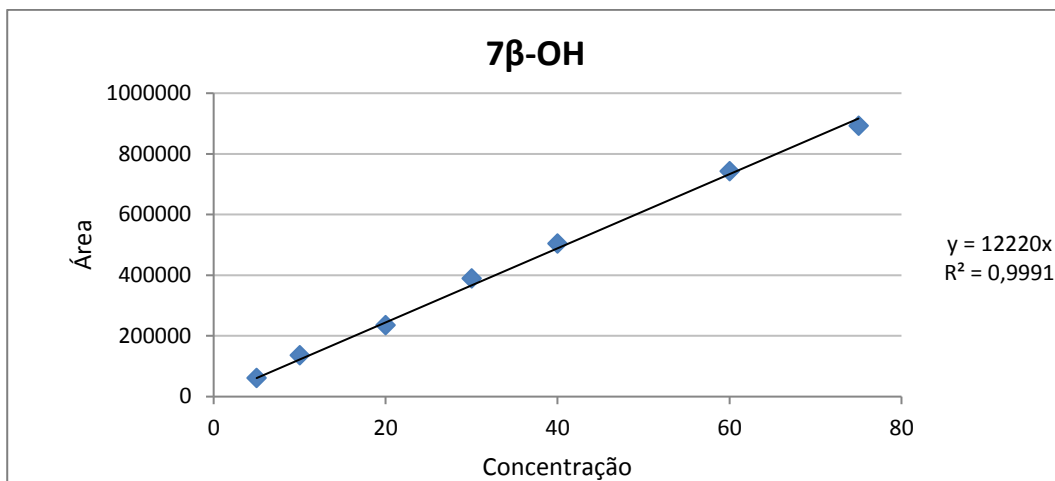


Figura 24: Padronização externa do 7β-hidroxicolesterol.

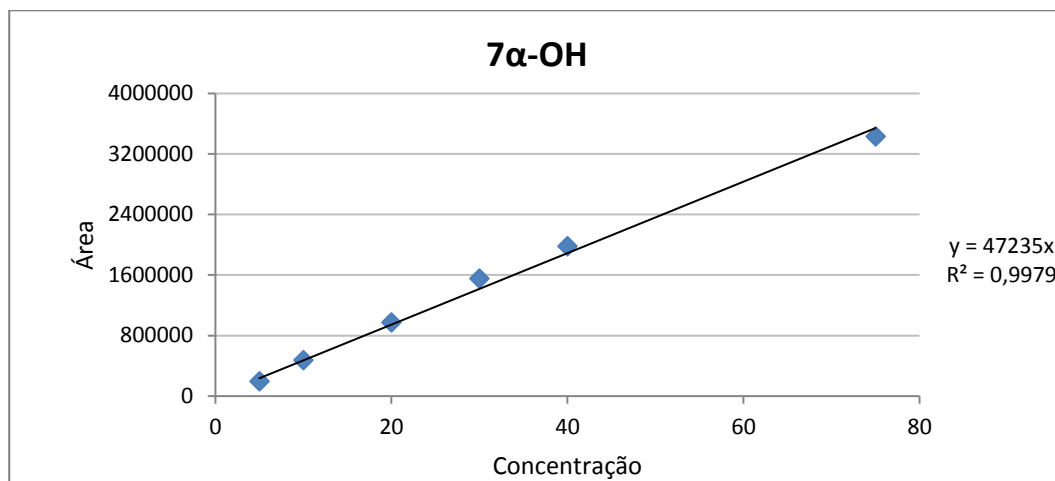


Figura 25: Padronização externa do 7α-hidroxicolesterol.

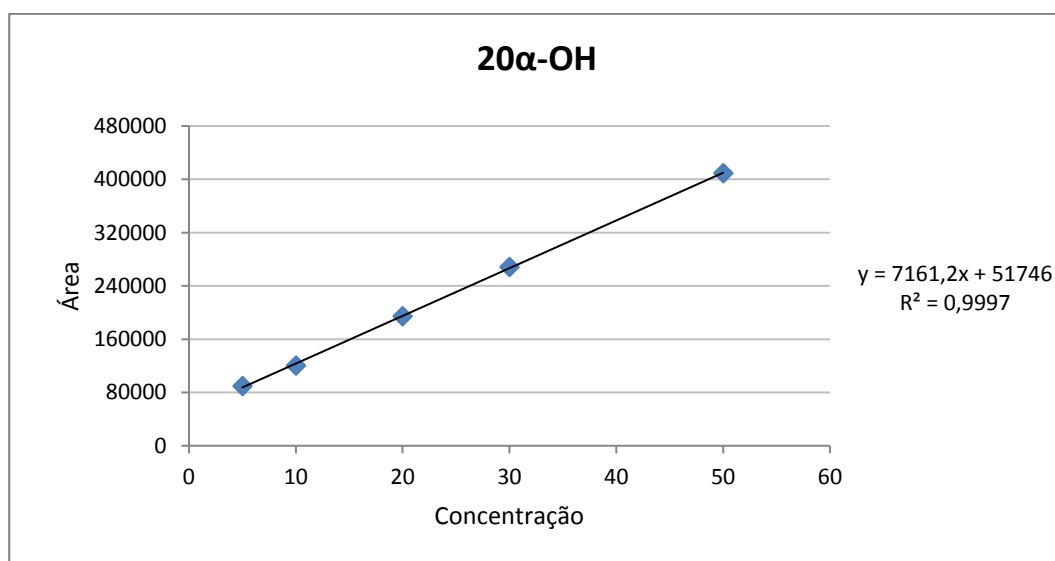


Figura 26: Padronização externa do 20α-hidroxicolesterol.

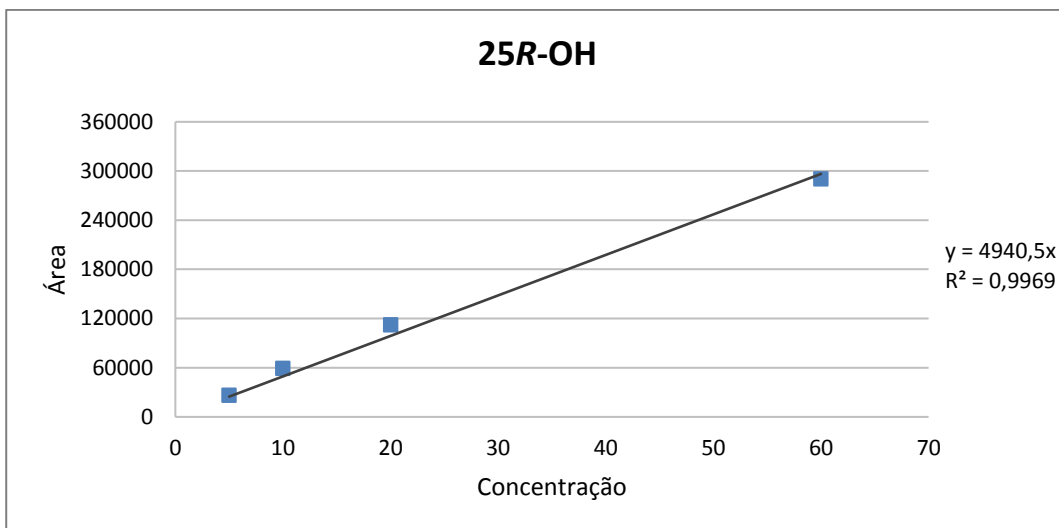


Figura 27: Padronização externa do 25R-hidroxicolesterol.

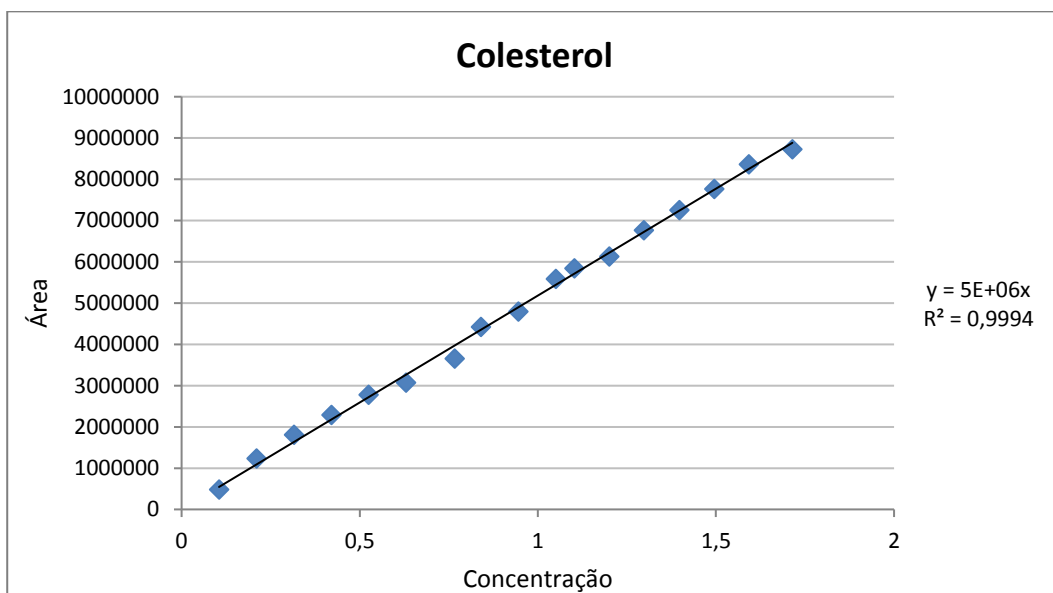
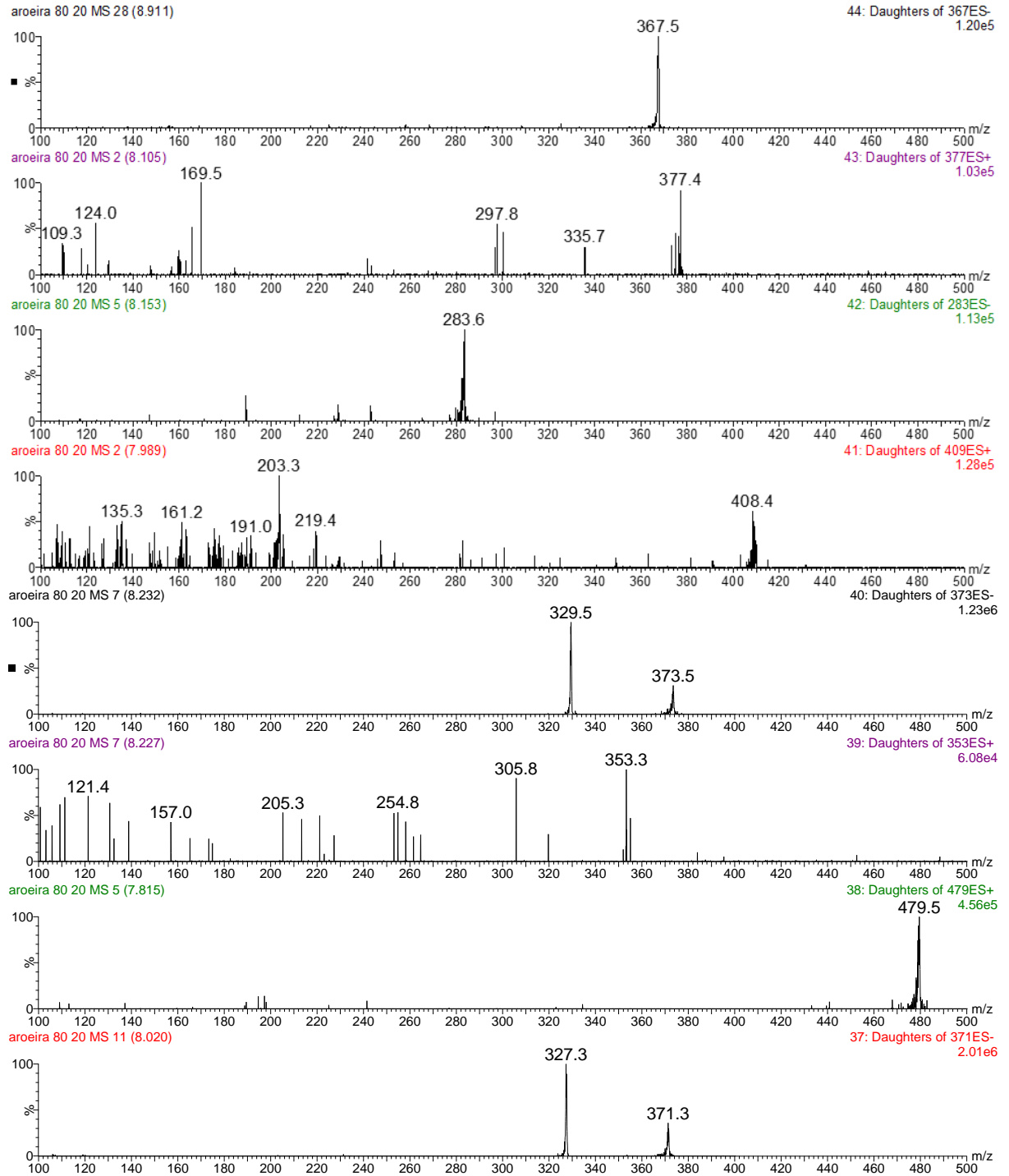
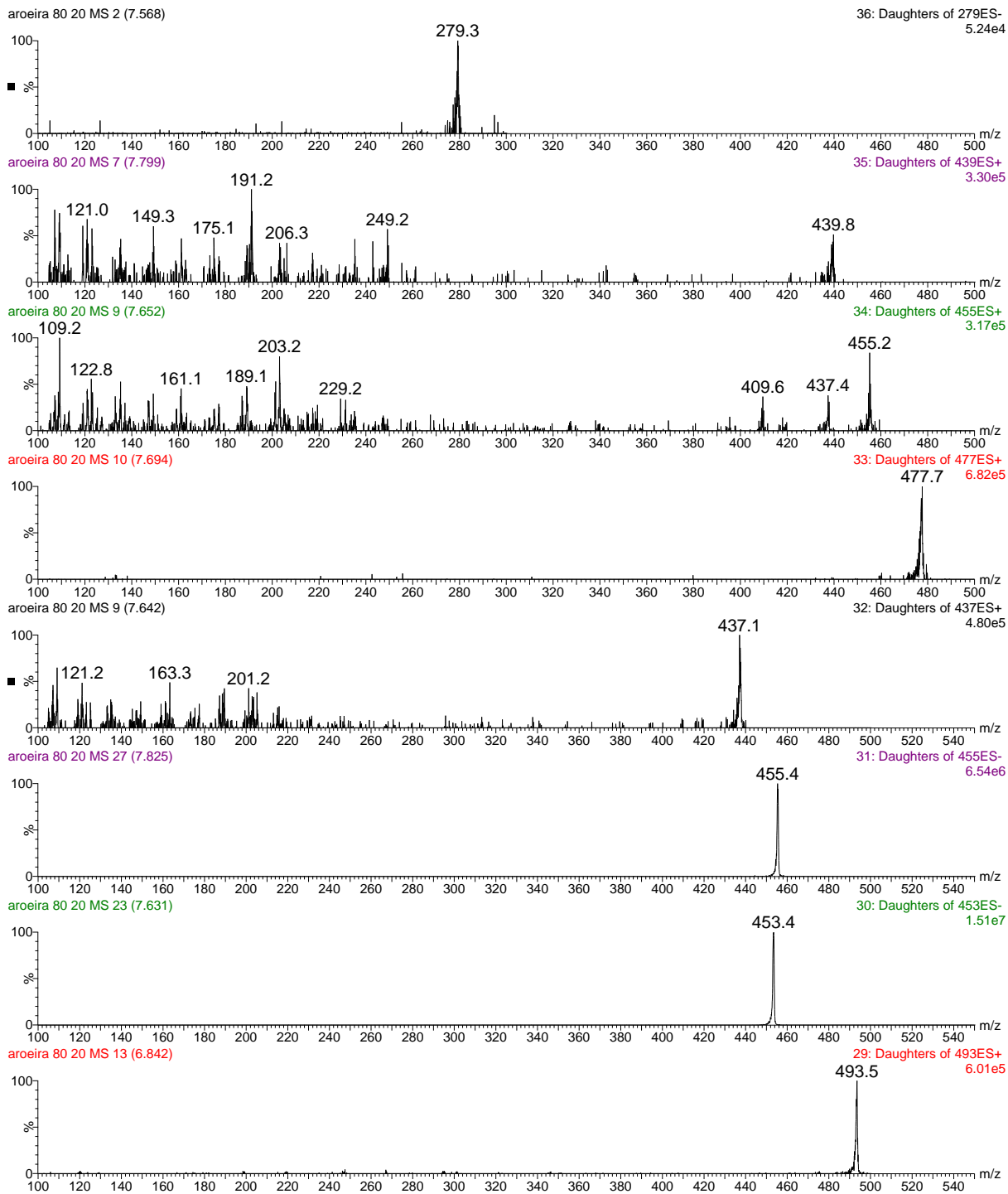


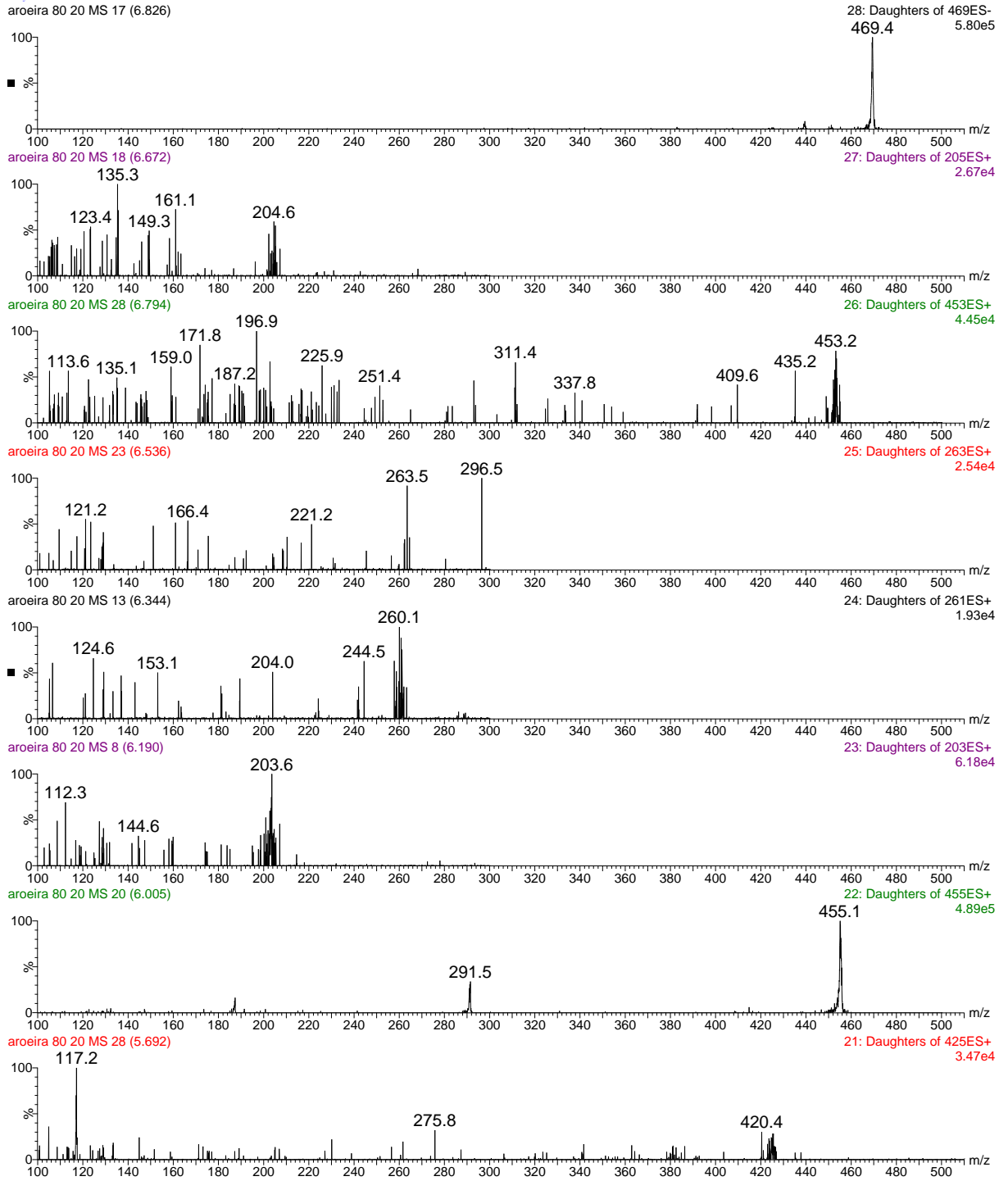
Figura 28: Padronização externa do colesterol.

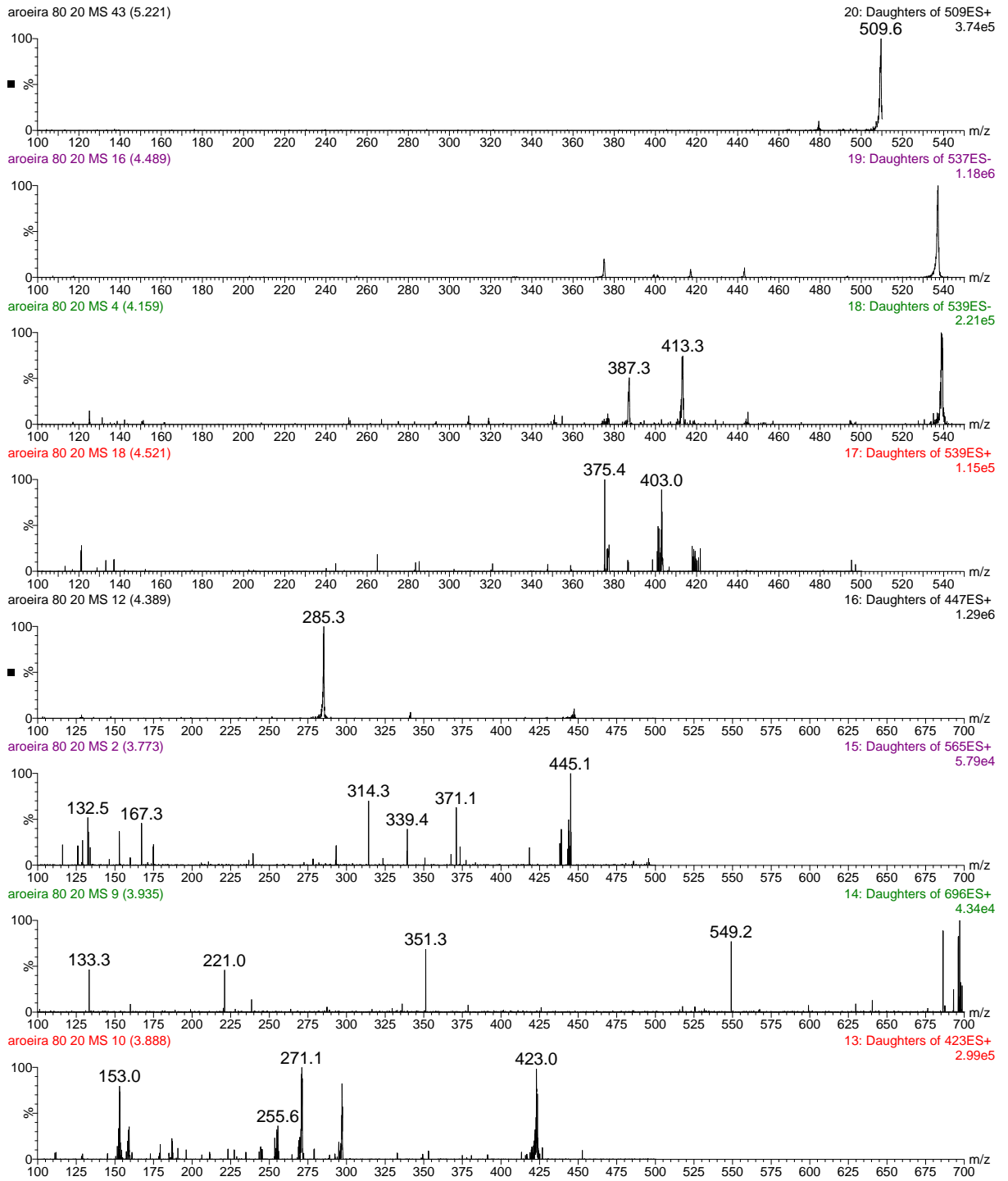
ANEXO 2

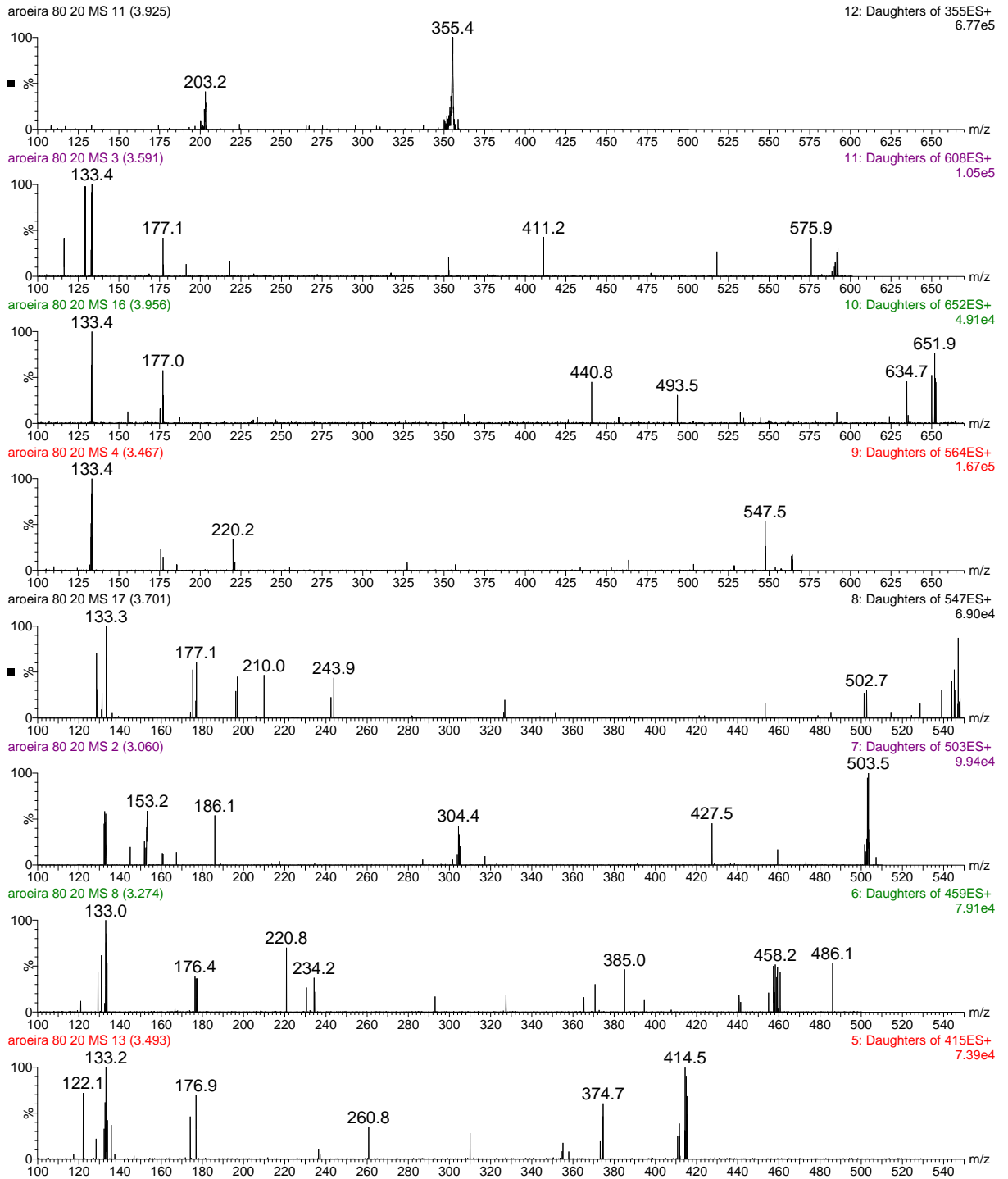
Espectros de massas dos frutos da aroeira moída identificados por UHPLC-ESI-MS/MS com modo de íons positivos e negativos, indicando tempos de retenção (min), íons precursores m/z e fragmentos principais m/z.





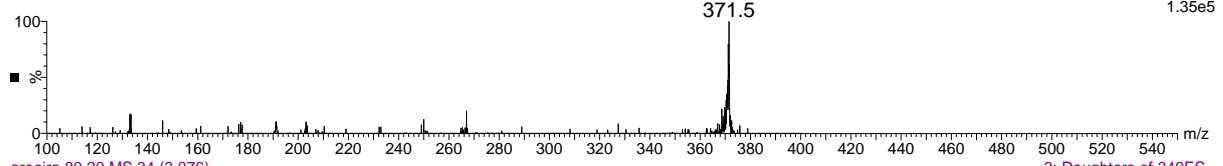






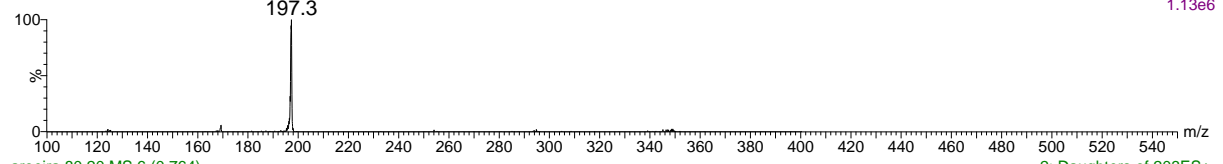
aroeira 80 20 MS 38 (3.227)

4: Daughters of 371ES+
1.35e5



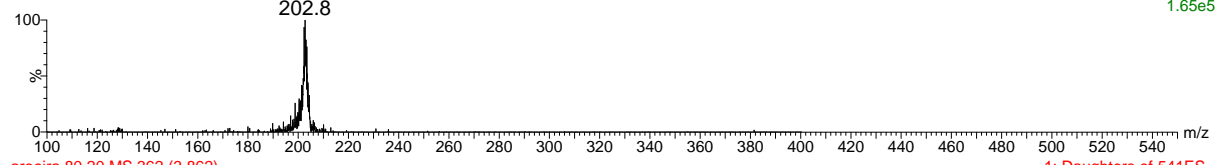
aroeira 80 20 MS 34 (3.076)

3: Daughters of 349ES-
1.13e6



aroeira 80 20 MS 6 (0.764)

2: Daughters of 203ES+
1.65e5



aroeira 80 20 MS 362 (3.862)

1: Daughters of 541ES-
3.64e6

