

**UFRRJ**  
**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  
oxidação lipídica em sistemas modelo contendo óleo de sardinhas  
(*Sardinella brasilliensis*)**

**Vanessa Sales de Oliveira**

**2018**



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

**EFEITO PROTETOR DO FRUTO DA AROEIRA (*Schinus*  
*terebinthifolius* Raddi) SOBRE A OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM SISTEMAS**  
**MODELO CONTENDO ÓLEO DE SARDINHAS (*Sardinella brasilliensis*)**

**VANESSA SALES DE OLIVEIRA**

*Sob a Orientação da Professora*

**Tatiana Saldanha**

*e Co-orientação do Professor*

**Ormindo Domingues 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 de concentração em  
Ciência de Alimentos

Seropédica, RJ  
Maio de 2018

Oliveira, Vanessa Sales, 1990-

048e      Efeito protetor do fruto da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) sobre a oxidação lipídica em sistemas modelo contendo óleo de sardinhas (*Sardinella brasilliensis*) / Vanessa Sales Oliveira. - 2018.  
145 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, 2018.

1. oxidação lipídica. 2. óxidos de colesterol. 3. *Schinus terebinthifolius* Raddi. 4. antioxidante natural. 5. óleo de pescado. I. Saldanha, Tatiana, 1971-, orient. II. Gamallo, Ormindo Domingues, -, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

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

**VANESSA SALES DE OLIVEIRA**

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 de concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 21/05/2018

---

Tatiana Saldanha, Dra. UFRRJ  
(Orientadora)

---

Geni Rodrigues Sampaio, Dra. USP

---

Rosane Nora Castro, Dra. UFRRJ

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por estar sempre presente me guiando, iluminando e dando força e sabedoria para trilhar meus caminhos.

Agradeço a minha família e amigos, em especial aos meus pais, Vanderli e Maria Aparecida, pelo constante suporte e acolhimento que não me deixam desistir em nenhum momento. Agradeço ao meu namorado Bruno pela compreensão, presença e incentivo.

Agradeço a todos do Departamento de Tecnologia de Alimentos que participaram direta ou indiretamente da realização deste trabalho, com ressalva a caríssima Ivanilda Maria Augusta. Agradeço aos colegas do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo apoio e conhecimentos compartilhados. Agradeço a Fernanda e as estagiárias do laboratório pelo companheirismo e ajuda.

Agradeço a minha orientadora Tatiana Saldanha e ao meu co-orientador Ormino Gamallo pela oportunidade e confiança depositada em mim, pela disponibilidade, atenção, orientação e conhecimentos transmitidos.

Agradeço a Dra. Geni Rodrigues Sampaio pela colaboração com a execução das análises de ORAC e sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, as quais foram realizadas no Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

Agradeço a Dra. Rosane Nora Castro, do Departamento de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por possibilitar as análises cromatográficas do colesterol e dos óxidos de colesterol ao disponibilizar o equipamento (HPLC-MS-PDA) para a realização das mesmas.

Agradeço ao Dr. Cristiano Jorge Riger pela colaboração com a execução dos experimentos *in vivo*, os quais foram realizados no Departamento de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Agradeço a Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya, docente da UNICAMP, pela realização das análises cromatográficas para determinação dos compostos bioativos nos frutos da aroeira que foram executadas no Instituto de Biologia da UNICAMP.

Muito obrigada a todos!

## RESUMO

OLIVEIRA, Vanessa Sales. **Efeito protetor do fruto da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) sobre a oxidação lipídica em sistemas modelo contendo óleo de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*).** 145p. 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, 2018.

Pescado e produtos de pescado são constantemente caracterizados como funcionais devido ao elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados, entretanto, contêm concentrações apreciáveis de colesterol. Assim, elevadas temperaturas acarretam a degradação destes compostos 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 minimizam os processos termo-oxidativos e atendem a demanda por alimentos isentos de aditivos sintéticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito protetor dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em dois níveis de adição (0,2% e 0,5) frente à oxidação lipídica em sistemas modelo contendo óleo de sardinhas aquecido a diferentes temperaturas (150 °C e 180 °C), além do controle. Os frutos foram previamente caracterizados apresentando relevante potencial nutricional. Determinou-se a presença de ácidos graxos essenciais e compostos bioativos. Entre os compostos bioativos, os flavonoides apresentaram maior teor ( $10,33 \pm 0,34$  mg EQ/g) e compostos como, a tetraidroamentoflavona, a agatisflavona e a hikinoflavona, foram identificados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. A atividade antioxidante foi constatada em análises *in vitro* e *in vivo*. O sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico determinou 61,41% de inibição oxidativa para o extrato dos frutos. Os experimentos *in vivo* demonstraram a baixa toxicidade do extrato aquoso dos frutos da aroeira frente às células de *Saccharomyces cerevisiae* e o pré-tratamento com o extrato (10  $\mu$ g/mL) aumentou a sobrevivência celular em 31,72% frente ao estresse oxidativo devido à presença de  $H_2O_2$ . Para determinação da oxidação lipídica, identificou-se a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) e alterações na composição dos ácidos graxos e colesterol, quantificando-se a formação de produtos da oxidação do colesterol (POCs). O aquecimento acarretou a queda do conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (AGPs) e o aumento do teor de substâncias reativas ao TBA e POCs, principalmente a 180 °C. O conteúdo de AGPs foi reduzido em aproximadamente 7 e 23% nas amostras sem adição de antioxidantes aquecidas a 150 e 180 °C, respectivamente. Entretanto, a adição dos frutos da aroeira minimizou a degradação dos AGPs, reduzindo o percentual de degradação destes compostos em 17,07%, para o tratamento empregando os frutos da aroeira a 0,5% (180 °C). O aquecimento a 180 °C reduziu o conteúdo de colesterol em 84,75%, observando-se o aumento no conteúdo de POCs totais de  $58,9 \pm 0,26$  para  $577,5 \pm 2,14$   $\mu$ g/g de amostra. Entretanto o tratamento com os frutos da aroeira apresentou efeito protetor de 15,51 e 23,22% para as adições a 0,2 e 0,5%, respectivamente. Apesar de o antioxidante sintético ter apresentado ação protetora mais significativa frente à oxidação do colesterol nas condições avaliadas, embora o mesmo tenha sido empregado na concentração limite permitida pela legislação, o efeito protetor exibido pelos frutos da aroeira sugere o emprego dos mesmos como antioxidantes naturais em detrimento aos sintéticos, ajudando a preservar os aspectos nutricionais e disponibilizando alimentos seguros isentos de compostos deletérios a saúde.

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

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Vanessa Sales. **The protective effect of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) fruits against lipid oxidation in model systems containing sardines oil (*Sardinella brasiliensis*)**. 145p. Dissertation (Master in Food Science and Technology). Institute of Technology, Food Technology Department, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Fish and fish products are constantly characterized as functional due to the high content of polyunsaturated fatty acids, however they contain appreciable concentrations of cholesterol. Thus, high temperatures lead to the degradation of these compounds and formation of oxidized compounds, compromising the nutritional quality and safety of these foods. Therefore, it is essential to search for alternative sources of natural antioxidants that minimize the thermo-oxidative processes and attend the demand for food free of synthetic additives. The objective of this work was to evaluate the protective effect of aroeira fruits in two concentration levels (0.2% and 0.5%) against lipid oxidation in a model systems containing sardines oil heated at different temperatures (150 °C and 180 °C), besides the control. The fruits were previously characterized presenting relevant nutritional potential. It was determined the presence of essential fatty acids and bioactive compounds. Among the bioactive compounds, flavonoids presented the higher content ( $10.33 \pm 0.34$  mg QE/g), and compounds such, tetrahydroamentoflavone, agathisflavone and hikinoflavone, were identified by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. The antioxidant activity was verified in *in vitro* and *in vivo* analyzes. The  $\beta$ -carotene/linoleic acid assay determined 61.41% of oxidative inhibition for the fruits extract. *In vivo* experiments demonstrated the low toxicity of the aqueous extracts of aroeira fruits against *Saccharomyces cerevisiae* cells and the pretreatment with the extract (10  $\mu$ g/mL) increased the cell survival by 31.72% against oxidative stress due to the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. For the determination of lipid oxidation, the formation of reactive species to thiobarbituric acid (TBA) and alterations in the fatty acids composition and cholesterol were identified, quantifying the formation of cholesterol oxidation products (COPs). The heating caused the decrease of the polyunsaturated fatty acids (PUFAs) content and the increase in the content of substances reactive to TBA and COPs, mainly at 180 °C. The PUFAs content was reduced by approximately 7 and 23% in the samples without antioxidants addition heated at 150 and 180 °C, respectively. However, the addition of aroeira fruits minimized PUFAs degradation, reducing the percentage of degradation of these compounds in 17.07%, for the treatment using 0.5% of aroeira fruits (180 °C). Heating at 180 °C reduced the cholesterol content by 84.75%, with an increase in the content of total COPs from  $58.9 \pm 0.26$  to  $577.5 \pm 2.14$   $\mu$ g/g of sample. However, the treatment with aroeira fruits showed protective effect of 15.51 and 23.22% for the additions with 0.2 and 0.5%, respectively. Although the synthetic antioxidant presented a more significant protective action against cholesterol oxidation under the evaluated conditions, even though it has been applied at the limit concentration permitted by the legislation, the protective effect exhibited by aroeira fruits suggests the use of these as natural antioxidant, helping to preserve the nutritional aspects and providing safe food free of compounds harmful to health.

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

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Sardinha verdadeira ( <i>Sardinella brasilliensis</i> ).....	3
<b>Figura 2:</b> Esquema geral para a oxidação de ácidos graxos.....	6
<b>Figura 3:</b> Auto-oxidação de ácidos graxos poli-insaturados em função do tempo.....	7
<b>Figura 4:</b> Fórmula estrutural do colesterol .....	8
<b>Figura 5:</b> Posições da molécula de colesterol suscetíveis ao ataque oxidativo.....	9
<b>Figura 6:</b> Vias de formação dos principais óxidos de colesterol.....	10
<b>Figura 7:</b> Formação de óxidos de colesterol em sistemas modelos contendo colesterol puro, em função do tempo.....	11
<b>Figura 8:</b> Folhas e frutos da aroeira ( <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi).....	15
<b>Figura 9:</b> Estrutura química de compostos determinados no fruto da aroeira.....	16
<b>Figura 10:</b> Localização do ponto de coleta dos frutos da aroeira.....	46
<b>Figura 11:</b> Frutos da aroeira.....	47
<b>Figura 12:</b> Estrutura química dos flavonoides identificados nos frutos da aroeira e de um tanino hidrolisável.....	61
<b>Figura 13:</b> Tolerância das células de <i>S. cerevisiae</i> expostas ao extrato aquoso dos frutos da aroeira por 1h e 3h.....	62
<b>Figura 14:</b> Viabilidade das células de <i>S. cerevisiae</i> pré-incubadas com os extratos dos frutos da aroeira sob estresse oxidativo (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	63
<b>Figura 15:</b> Amostras e extração do óleo das sardinhas.....	70
<b>Figura 16:</b> Esquema dos procedimentos para preparo dos sistemas modelo.....	71
<b>Figura 17:</b> Inibição da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nos diferentes tratamentos com antioxidantes a 150 °C e 180 °C.....	75
<b>Figura 18:</b> Degradação de AGPs nos diferentes tratamentos a 150 °C e 180 °C.....	77
<b>Figura 19:</b> Degradação do colesterol em função da temperatura.....	81
<b>Figura 20:</b> Degradação do colesterol nos diferentes tratamentos a 150 °C e 180 °C.....	82
<b>Figura 21:</b> Teores de POCs totais nas amostras de óleos nos diferentes tratamentos a 150 °C e 180 °C.....	85
<b>Figura 22:</b> Curva de calibração para quantificação de fenólicos totais.....	120
<b>Figura 23:</b> Curva de calibração para quantificação de flavonoides totais.....	120
<b>Figura 24:</b> Curva de calibração para análise de DPPH.....	121
<b>Figura 25:</b> Curva de calibração do Trolox (ORAC).....	121
<b>Figura 26:</b> Perfil cromatográfico dos padrões de ésteres metílicos dos ácidos graxos .....	122
<b>Figura 27:</b> Perfil cromatográfico dos frutos da aroeira.....	122
<b>Figura 28:</b> Perfil cromatográfico da amostra de óleo sem aquecimento.....	123
<b>Figura 29:</b> Perfil cromatográfico da amostra de óleo controle aquecida a 150 °C.....	123
<b>Figura 30:</b> Perfil cromatográfico da amostra de óleo com pimenta 0,2% aquecida a 150 °C.....	124
<b>Figura 31:</b> Perfil cromatográfico da amostra de óleo com pimenta 0,5% aquecida a 150 °C.....	124
<b>Figura 32:</b> Perfil cromatográfico da amostra de óleo com BHT aquecida a 150 °C.....	125
<b>Figura 33:</b> Perfil cromatográfico da amostra de óleo controle aquecida a 180 °C.....	125
<b>Figura 34:</b> Perfil cromatográfico da amostra de óleo com pimenta 0,2% aquecida a 180 °C.....	126
<b>Figura 35:</b> Perfil cromatográfico da amostra de óleo com pimenta 0,5% aquecida a 180 °C .....	126
<b>Figura 36:</b> Perfil cromatográfico da amostra de óleo com BHT aquecida a 180 °C.....	127
<b>Figura 37:</b> Padronização externa do colesterol.....	128



<b>Figura 38:</b> Padronização externa do 20 $\alpha$ -hidroxicolesterol.....	128
<b>Figura 39:</b> Padronização externa do 25R-hidroxicolesterol.....	128
<b>Figura 40:</b> Padronização externa do 25-hidroxicolesterol.....	129
<b>Figura 41:</b> Padronização externa do 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol.....	129
<b>Figura 42:</b> Padronização externa do 7 $\beta$ -hidroxicolesterol.....	129
<b>Figura 43:</b> Padronização externa do 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol.....	130
<b>Figura 44:</b> Padronização externa do 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol.....	130
<b>Figura 45:</b> Padronização externa do 7-cetocolesterol.....	130
<b>Figura 46:</b> Cromatograma do Poll de padrões do colesterol e óxidos de colesterol.....	131

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Composição centesimal dos frutos da aroeira.....	54
<b>Tabela 2:</b> Composição de ácidos graxos dos frutos da aroeira.....	55
<b>Tabela 3:</b> Conteúdo de substâncias fenólicas totais, flavonoides totais, antocianinas totais e carotenoides do extrato dos frutos da aroeira.....	56
<b>Tabela 4:</b> Análises antioxidantes <i>in vitro</i> .....	59
<b>Tabela 5:</b> Identificação dos compostos presentes na aroeira.....	60
<b>Tabela 6:</b> Intensidade relativa dos principais íons de colesterol e óxidos de colesterol em HPLC-APCI(+)MS.....	73
<b>Tabela 7:</b> Valores de TBARS das amostras de óleo.....	74
<b>Tabela 8:</b> Composição de ácidos graxos das amostras de óleo.....	79
<b>Tabela 9:</b> Teor de colesterol e óxidos de colesterol nas amostras de óleo.....	87

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAPH	2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) diidrocloreto
AGM	Ácido graxo monoinsaturado
AGP	Ácido graxo poli-insaturado
AGS	Ácido graxo saturado
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
BHA	Butilidroxianisol / Butylhydroxyanisole
BHT	Butilidroxitolueno / Butylhydroxytoluene
CID	Collision-induced Dissociation
COP	Cholesterol Oxidation Product
DHA	Ácido docosaexaenóico / Docosahexaenoic acid
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidraliza
EAG	Equivalente ácido gálico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Ácido eicosapentaenoico / Eicosapentaenoic acid
EQ	Equivalente quercetina
ESI	Electrospray Ionization
FAO	Food and Agriculture Organization
FAME	Fatty acid methyl ester
GAE	Galic acid equivalente
GP	Galato de propila
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IU	International Unit
MS	Mass Spectrometry
MDA	Malonaldeído
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PDA	Photo Diode Array
PG	Propyl gallate
POC	Produto da Oxidação do Colesterol
PPM	Partes por milhão
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acid
QE	Quercetin equivalent
ROS	Reactive Oxygen Specie
SIM	Selected Ion Monitoring
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TBA	Ácido tiobarbitúrico/ Thiobarbituric acid
TBHQ	<i>Terc</i> -butilidroquinona / <i>Tert</i> -butylhydroquinone
TCA	Ácido tricloroacético
TE	Trolox equivalente
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFLC	Ultra-Fast Liquid Chromatography
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Ultravioleta
$\omega 3$ / $n3$	Ômega 3
$\omega 6$ / $n6$	Ômega 6
$\omega 9$ / $n9$	Ômega 9
5,6 $\alpha$ -OH	5,6 $\alpha$ -hidroxicolesterol

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5,6 $\beta$ -OH	5,6 $\beta$ -hidroxicolesterol
7-ceto	7-cetocolesterol
7 $\alpha$ -OH	7 $\alpha$ -hidroxicolesterol
7 $\beta$ -OH	7 $\beta$ -hidroxicolesterol
20 $\alpha$ -OH	20 $\alpha$ -hidroxicolesterol
25 <i>R</i> -OH	25 <i>R</i> -hidroxicolesterol

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>OBJETIVOS</b> .....	2
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
1 Sardinha verdadeira ( <i>Sardinella brasilliensis</i> ) .....	3
2 Oxidação lipídica.....	5
3 Oxidação do colesterol e formação dos óxidos de colesterol .....	7
4 Termo-oxidação do colesterol .....	10
5 Efeitos dos óxidos de colesterol a saúde .....	12
6 Antioxidantes naturais.....	13
7 Aroeira ( <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi).....	15
8 Sistemas modelos contendo colesterol x antioxidantes naturais .....	17
 <b>CAPÍTULO I – Artigo de revisão: Use of natural antioxidants in the inhibition of cholesterol oxidation in foods of animal origin: a review</b>	
<b>ABSTRACT</b> .....	20
<b>1 INTRODUCTION</b> .....	21
<b>2 CHOLESTEROL OXIDATION</b> .....	21
<b>3 EFFECTS OF INGESTION OF OXIDIZED CHOLESTEROL ON HEALTH</b> .....	23
<b>4 ANTIOXIDANTS</b> .....	24
4.1 Natural Antioxidants .....	26
4.1.1 Phenolic compounds .....	26
4.1.2 Carotenoids .....	27
4.1.3 Tocopherols.....	28
4.1.4 Ascorbic Acid.....	28
<b>5 USE OF NATURAL ANTIOXIDANTS IN THE PREVENTION OF CHOLESTEROL OXIDATION IN FOODS</b> .....	29
5. 1 Fish and fish products .....	29
5.2 Meat and meat products .....	31
5.3 Chicken .....	33
5.4 Eggs.....	34
5.5 Milk and dairy products .....	36
5.6 Animal feed supplementation.....	37
5.7 Model systems.....	39
<b>6 CONCLUSION</b> .....	40
 <b>CAPÍTULO 2 - Composição química, identificação dos compostos bioativos por UPLC-ESI-MS e atividade antioxicidante <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> dos frutos da aroeira (<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi)</b>	
<b>RESUMO</b> .....	43

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	45
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	46
2.1 Materiais	46
2.2 Amostras	46
2.3 Composição centesimal	47
2.4 Composição de ácidos graxos	47
2.5 Preparo dos extratos	48
2.6 Compostos bioativos	48
2.6.1 Fenólicos totais	49
2.6.2 Flavonoides totais	49
2.6.3 Antocianinas totais	49
2.6.4 Carotenoides	50
2.6.5 Identificação dos compostos bioativos por UPLC-ESI-MS	50
2.7 Atividade antioxidante do extrato dos frutos da aroeira ( <i>in vitro</i> )	51
2.7.1 DPPH	51
2.7.2 ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)	51
2.7.3 Sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico	52
2.8 Atividade antioxidante do extrato dos frutos da aroeira ( <i>In vivo</i> )	52
2.8.1 Condições de cultivo e crescimento celular	52
2.8.2 Determinação da toxicidade do extrato	53
2.8.3 Determinação da viabilidade celular	53
2.9 Análises estatísticas	53
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	53
3.1 Composição centesimal	53
3.2 Composição de ácidos graxos	54
3.3 Compostos bioativos	56
3.3.1 Fenólicos totais	56
3.3.2 Flavonoides totais	57
3.3.3 Antocianinas totais	57
3.3.4 Carotenoides	58
3.4 Atividade antioxidante do extrato dos frutos da aroeira ( <i>In vitro</i> )	58
3.4.1 DPPH	58
3.4.2 ORAC	59
3.4.3 Sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico	59
3.5 Identificação dos compostos bioativos presentes nos frutos da aroeira utilizando UPLC-ESI-MS	60
3.6 Atividade antioxidante do extrato dos frutos da aroeira ( <i>in vivo</i> )	61
<b>4 CONCLUSÃO</b>	64

**CAPÍTULO III – Efeito protetor dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) frente a termo-oxidação em sistemas modelo contendo óleo de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*)**

<b>RESUMO</b> .....	66
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	68
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	69
2.1 Reagentes e padrões .....	69
2.2 Sardinhas e extração do óleo .....	69
2.3 Obtenção e preparo dos frutos da aroeira .....	70
2.4 Sistemas modelo: preparo das amostras e aquecimento .....	70
2.5 Determinação das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	71
2.6 Determinação dos ácidos graxos .....	72
2.7 Determinação do colesterol e óxidos de colesterol .....	72
2.8 Análises estatísticas .....	73
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	74
3.1 Efeito protetor dos frutos da aroeira sobre a formação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) após a termo-oxidação .....	74
3.2 Efeito protetor dos frutos da aroeira sobre os teores de ácidos graxos após a termo-oxidação .....	76
3.3 Efeito protetor dos frutos da aroeira sobre a degradação do colesterol após a termo-oxidação .....	80
3.4 Efeito dos frutos da aroeira sobre a formação de óxidos de colesterol após termo-oxidação .....	83
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	88
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	89
<b>ANEXOS</b> .....	120

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Os lipídios presentes em pescado são considerados elementos essenciais à nutrição humana, pois apresentam composição lipídica diferenciada devido aos elevados teores de ácidos graxos poli-insaturados da série ômega-3, que estão associados a diversos efeitos benéficos à saúde. Devido às funções vitais que envolvem estes compostos, pescado como a sardinha (*Sardinella brasiliensis*) são comumente reconhecidos como alimentos funcionais.

Além dos ácidos graxos poli-insaturados os óleos de pescado contêm elevados teores de colesterol. Estes compostos são altamente susceptíveis a oxidação quando expostos a tratamentos térmicos usualmente empregados no preparo do pescado para o consumo humano, de forma a comprometer a qualidade sensorial e nutricional destes alimentos. Inúmeros estudos comprovaram alterações em ácidos graxos e colesterol durante tratamento térmico, ocasionando a formação de compostos oxidados como os óxidos de colesterol (SALDANHA, BENASSI e BRAGAGNOLO, 2008; SALDANHA e BRAGAGNOLO, 2010; TARVAINEN et al.; 2016; FERREIRA et al., 2017).

Os óxidos de colesterol ou produtos de oxidação do colesterol (POCs) de origem exógena são associados a diversos efeitos deletérios à saúde como citotoxicidade, aterogênese, carcinogênese e doenças neurodegenerativas, além de alterações das propriedades das membranas celulares e no metabolismo do colesterol (KULIG et al., 2015; KULIG et al., 2016; OLIVIER et al., 2017; ROSA-FERNANDES et al., 2017). Devido aos riscos apresentados pela ingestão destes óxidos, torna-se indispensável o controle das reações de oxidação do colesterol que são efetivamente mediadas pelo uso de compostos antioxidantes.

Os antioxidantes sintéticos são amplamente utilizados pela indústria alimentícia, entretanto, observa-se um crescente interesse pela substituição destes aditivos por extratos naturais ricos em compostos bioativos, que além de apresentarem potencial antioxidante, apresentam aspectos nutricionais benéficos à saúde (EMBUSCADO, 2015; XU et al., 2016; JIANG e XIONG, 2016).

O fruto da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) ou pimenta rosa, pertence à família Anacardiaceae e no Brasil está presente do Nordeste até o Sul do país, apresentando grande potencial para a exploração e uso na culinária e indústria farmacêutica. Nos últimos anos, diversos trabalhos reportaram a diversidade de metabólitos secundários presentes no gênero *Schinus*. Compostos fitoquímicos como alcalóides, esteróis, terpenos e substâncias fenólicas foram determinados em frutos da *Schinus terebinthifolius* Raddi caracterizando assim seu efeito antioxidante (CARVALHO et al., 2013; BERNARDES et al., 2014; ANDRADE, PONCELET e FERREIRA, 2017).

Em resposta ao potencial efeito toxicológico apresentado pelos antioxidantes sintéticos, existe uma demanda dos consumidores e legislação por alimentos isentos de compostos artificiais. Desta forma, pesquisas vêm sendo desenvolvidas em busca de fontes naturais de compostos antioxidantes. Os frutos da aroeira representam uma fonte alternativa de componentes antioxidantes que podem vir a minimizar os danos oriundos dos processos oxidativos. Assim, o conhecimento sobre a composição química e a capacidade antioxidante dos frutos da aroeira possibilita identificar seu potencial para consumo como alimento funcional, além de estender seu uso como conservante natural de alimentos.

Os efeitos da exposição de ácidos graxos poli-insaturados e do colesterol a elevadas temperaturas vem sendo extensivamente pesquisados. No entanto, são inexistentes estudos envolvendo a formação de óxidos de colesterol em óleo de sardinhas quando aquecidos a diferentes temperaturas e empregando os frutos da aroeira como componente antioxidante, justificando assim a realização deste trabalho.



## 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*) submetidos ao tratamento térmico sob diferentes temperaturas.

### Objetivos específicos

1. Caracterizar os frutos da aroeira quanto à composição química, presença de compostos bioativos e atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*;
2. Determinar os compostos bioativos presentes nos frutos da aroeira a partir de análises em UPLC-ESI-MS;
3. Determinar a composição lipídica do óleo de sardinhas logo após a obtenção do mesmo, a partir das análises de ácidos graxos, colesterol e óxidos de colesterol;
4. Preparar sistemas modelo mediante termo-oxidação a 150 e 180 °C, utilizando óleo de sardinhas (controle) e óleo de sardinhas adicionados dos frutos da aroeira (0,2% e 0,5%) e BHT (0,01%);
5. Determinar a composição lipídica do óleo de sardinhas após o aquecimento em sistemas modelo a 150 e 180 °C, a partir das análises de ácidos graxos, colesterol e óxidos de colesterol;
6. Analisar e correlacionar os dados de forma a avaliar o efeito protetor da adição dos frutos da aroeira.

# REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1 Sardinha verdadeira (*Sardinella brasilliensis*)

Nos últimos anos, em nome da melhor qualidade de vida, as pessoas estão mudando seus hábitos alimentares, e conseqüentemente, buscando por alimentos cujo consumo traga benefícios a saúde. Uma dieta saudável deve incluir alimentos com proteínas que contenham todos os aminoácidos essenciais, ácidos graxos, além de vitaminas e minerais, como o pescado (FAO, 2016).

No Brasil tanto a produção quanto o consumo de pescado vem crescendo a cada ano. Segundo a FAO, Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, o consumo de pescado no Brasil alcançará 12,7 kg por habitante em 2025, cerca de 32% a mais do que os 9,6 kg consumidos por ano entre 2013 e 2015. Em âmbito global, a produção de pescado deve crescer até alcançar 195,9 milhões de toneladas em 2025, um aumento de 17% em comparação a produção no período de 2013 a 2015, de 166,8 milhões (FAO, 2016).

A espécie *Sardinella brasilliensis* ou sardinha-verdadeira (figura 1), pertence à família Clupeidae e é um dos mais tradicionais recursos pesqueiros brasileiro. É uma espécie subtropical (19 a 24°C), de pequeno porte (90 a 270 mm de comprimento), capturada em profundidades entre 30 a 100 metros entre os Cabos de São Tomé (Rio de Janeiro, RJ- 22°S) e de Santa Marta (Santa Catarina, SC-28°S). No estado do Rio de Janeiro é pescada principalmente na Ilha Grande (Angra dos Reis), arredores de Cabo Frio e na Baía de Sepetiba (IBAMA, 2013).



**Figura 1:** Sardinha verdadeira (*Sardinella brasilliensis*).

Pescado como as sardinhas caracterizam-se por conter proteínas de fácil digestão e elevado valor biológico (presença de todos os aminoácidos essenciais), vitaminas (vitaminas D, A e B) e minerais (cálcio, iodo, zinco, ferro e selênio), além da rica composição em lipídios insaturados (FAO, 2016). Entretanto, a composição química do pescado depende de diversas variáveis, como por exemplo: espécie, idade, sexo, estado fisiológico, época do ano, região de captura e outras condições ambientais (NUNES et al., 2008; CHITRA SOM e RADHAKRISHNAN, 2013; BANDARRA et al., 2018). Os óleos de pescado são fontes de ácidos graxos poli-insaturados (AGPs) especialmente os da série ômega-3, destacando-se os ácidos eicosapentaenóico (EPA, C20:5  $\omega$ 3) e o docosaexaenóico (DHA, C22:6  $\omega$ 3). Embora estes compostos possam ser sintetizados pelo organismo humano a partir do ácido  $\alpha$ -linolênico, esta conversão é limitada, tornando-se indispensável à ingestão destes por meio da dieta, pois teores reduzidos de EPA e DHA nos tecidos pode acarretar o desenvolvimento de diversas doenças crônicas (GARCÍA- MORENO et al., 2016).

Estes AGPs exercem funções estruturais e regulatórias importantes na fisiologia

humana relacionados a efeitos benéficos à saúde, como prevenção ao desenvolvimento da aterosclerose, embolia, hipertrigliceremia, hipertensão, doenças autoimunes e problemas alérgicos, além de aprimorar as funções cognitivas e aliviar os efeitos da depressão (ZHENG et al., 2013; SHAHIDI, 2015; HAIMEUR et al., 2016; ZOCK et al., 2016; BANNENBERG et al., 2017; FENG et al., 2018; LIU et al., 2018).

LIU et al. (2018) avaliaram pacientes com múltiplos fatores de risco ou com diagnóstico já estabelecido de doenças arteriais coronarianas. Os autores associaram a redução no desenvolvimento destas doenças com a presença de elevadas concentrações de ácidos graxos da série ômega-3 no soro sanguíneo. Os autores identificaram o DHA como fator protetor frente às doenças acima citadas.

Além dos ácidos eicosapentaenóico e docosaexaenóico, outros ácidos graxos são predominantes em pescado. Os ácidos graxos mais comuns em pescado são o ácido mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1  $\omega$ 9), linoleico (C18:2  $\omega$ 6) e o araquidônico (C20:4  $\omega$ 6). Entretanto, o perfil lipídico, assim como os teores destes compostos variam consideravelmente de espécie para espécie e mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie (OGAWA e MAIA, 1999; NUNES et al., 2008; CHITRA SOM e RADHAKRISHNAN, 2013; BANDARRA et al., 2018; STEINRÜCKEN et al., 2018).

De acordo com Chitra Som e Radhakrishnan (2013) a época de captura influencia no conteúdo de ácidos graxos presentes em sardinhas. Os autores avaliaram as espécies *Sardinella fimbriata* e *Sardinella longiceps* capturadas em meses distintos e determinaram EPA como o ácido graxo insaturado predominante nas amostras de *S. longiceps*, enquanto para *S. fimbriata*, o DHA apresentou teores mais elevados. Entretanto, foi possível observar variação nos teores destes compostos em uma mesma espécie em diferentes meses, de forma que em março o conteúdo de EPA correspondeu a 18,23% dos ácidos graxos totais, enquanto em junho, 6,94% foi determinado para *S. fimbriata*.

Alterações sazonais também foram observadas no conteúdo total de colesterol em *Sardina pilchardus* por Zotos e Vouzanidou (2012), onde sardinhas capturadas em setembro apresentaram teores de 67,31 mg/100g, enquanto em dezembro foram quantificados 43,39 mg de colesterol/100g de amostra.

Inúmeros estudos analisaram o perfil lipídico de sardinhas. Ao estudarem amostras de óleo de sardinha comercial refinado, Ganga et al. (1998) encontraram o ácido palmítico como ácido graxo predominante (18,1%), sendo observado um somatório de EPA e DHA de 27,5%. García-Arias et al. (2003) também determinaram conteúdos elevados para os ácidos palmítico e docosaexaenóico em *Sardina pilchardus* fresca.

Teores lipídicos entre 12,5 e 39,3 g/100g de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*) foram determinados por Tarley et al. (2004). Em estudo realizado por Saldanha, Benassi e Bragagnolo (2008), valores inferiores foram quantificados para a mesma espécie, onde foram observados teores de 8,9 g lipídio/100g de sardinha.

Os ácidos eicosapentaenóico e o docosaexaenóico foram identificados como os ácidos graxos insaturados predominantes em amostras de pescado brasileiro como a sardinha-bandeira (*Opisthonema oglinum*), o agulha-preto (*Hemiramphus brasiliensis*), o agulha-branca (*Hyporhamphus unifasciatus*) e a cavala-verdadeira (*Scomberomorus cavala*), onde os maiores teores dos ácidos em questão foram quantificados em sardinha-bandeira (FERNANDES et al., 2014). Os ácidos graxos da série ômega-3 também apresentaram elevada representatividade dentre os ácidos graxos poli-insaturados determinados em *Sardinella longiceps*, correspondendo a 89,9% destes (BAHURMIZ, ADZITEY e NG, 2017). Sardinhas do atlântico (*Sardina pilchardus*) apresentaram conteúdo lipídico de 14 g/100g de amostra, onde os ácidos graxos predominantes foram os ácidos palmítico, docosaexaenóico, oleico e eicosapentaenóico, respectivamente (BANDARRA et al., 2018).

Além de concentrações relevantes de ácidos graxos poli-insaturados, as sardinhas

também apresentam elevados teores de colesterol (SALDANHA, BENASSI e BRAGAGNOLO, 2008; CARDENIA et al., 2013b; DANTAS et al., 2015; TARVAINEN et al., 2016; FERREIRA et al., 2017).

O óleo de sardinha comercial refinado apresentou teor de 480,5 mg de colesterol/100g de amostra (GANGA et al., 1998). Saldanha, Benassi e Bragagnolo (2008) quantificaram 342 mg de colesterol/100g em base seca para sardinha verdadeira (*Sardinella brasiliensis*), enquanto em outro estudo, conteúdo inferior de 327 mg/100g de amostra foi identificado para a mesma espécie (SALDANHA e BRAGAGNOLO, 2010). Em estudo realizado por Ferreira et al. (2017) o conteúdo total de colesterol para *Sardinella brasiliensis* variou de 136,4 a 237,2 mg/100g nas amostras cruas, em base seca.

Apesar do valor nutricional dos óleos de pescado, a presença de compostos insaturados os tornam particularmente suscetíveis aos processos oxidativos acarretando perdas nutricionais e sensoriais. A oxidação lipídica conduz ao desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis que tornam os alimentos impróprios para o consumo, afeta a qualidade nutricional devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, e a integridade e segurança dos alimentos, através da formação de compostos potencialmente tóxicos (MEDINA-MEZA, BARNADA e BARBOSA-CÁNOVAS, 2014; HASSOUN e ÇOBAN, 2017).

## 2 Oxidação lipídica

A oxidação lipídica é uma das principais vias de degradação de lipídios em pescado. Consiste em um fenômeno induzido pelo oxigênio na presença de iniciadores como o calor, luz, radicais, pigmentos fotosensibilizantes ou sensibilizadores e íons metálicos. Os lipídios podem ser oxidados de diferentes formas, em função do meio e dos agentes catalisadores podendo ocorrer via ação enzimática, foto-oxidação e auto-oxidação (LAGUERRE, LECOMTE e VILLENEUVE, 2007; KUMAR et al., 2015; SUÁREZ-JIMÉNEZ et al., 2016; FENG et al., 2018).

A auto-oxidação é o principal mecanismo de oxidação em alimentos. É associada à reação de oxigênio com ácidos graxos insaturados através de um mecanismo de reações em cadeia de radicais, que são espécies químicas instáveis e de alta reatividade que contém um ou mais elétrons não pareados. A auto-oxidação ocorre em três etapas distintas: iniciação, propagação e terminação (HALLIWELL e GUITTERIDGE, 2000; LAGUERRE, LECOMTE e VILLENEUVE, 2007; KUMAR et al., 2015).

Na etapa de iniciação há a formação dos radicais de ácidos graxos. Os radicais são formados devido à abstração de hidrogênio de um ácido graxo, deixando um elétron não pareado no carbono e formando um radical ácido graxo. Entretanto, elevada energia de ativação é requerida para que esta reação ocorra em presença de  $^3\text{O}_2$  (forma menos reativa do oxigênio), sendo necessária a ação de agentes iniciadores como luz, calor ou íons metálicos (NICKI et al., 2005; LAGUERRE, LECOMTE e VILLENEUVE, 2007; KUMAR et al., 2015).

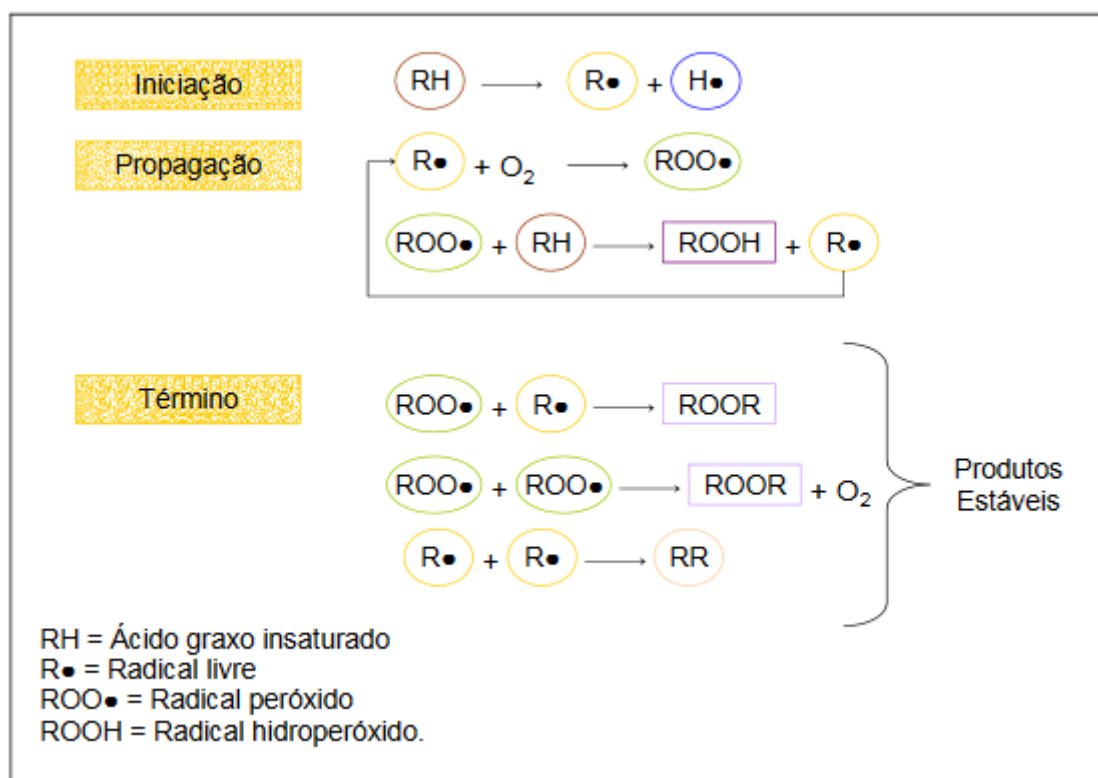
A abstração de hidrogênio ocorre preferencialmente nos átomos de carbono onde a energia de dissociação da ligação é baixa. Os ácidos graxos saturados são bastante estáveis e não se oxidam a uma velocidade significativa. Quando um átomo de carbono é adjacente a uma ligação dupla, a ligação covalente C-H torna-se mais fraca, requerendo menor energia de dissociação (GORDON, 2004).

A retirada seletiva do hidrogênio de ácidos graxos insaturados depende do número de ligações duplas na molécula. A abstração de hidrogênio de um grupo metileno de um sistema

1,4-pentadieno ocorre mais facilmente do que em um simples grupamento alílico, além de que o radical 1,4-dieno gerado é estabilizado de modo mais eficiente por ressonância, isto é, pelo deslocamento de elétrons pelos cinco átomos de carbono. Essas considerações explicam as diferenças nas velocidades de reações de auto-oxidação de ácidos graxos insaturados, justificando o fato de a velocidade de oxidação ser muito maior quando ácidos graxos poli-insaturados estão presentes nos alimentos (LAGUERRE, LECOMTE e VILLENEUVE, 2007; DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

Durante a propagação, o radical proveniente da fase de iniciação, reage rapidamente com o oxigênio atmosférico gerando novas espécies radicais, os radicais peróxidos, que quando oriundos de ácidos graxos poli-insaturados apresentam formas de ressonância estabilizadoras. As reações de formação dos radicais peróxidos ocorrem rapidamente devido a baixa energia de ativação requerida, gerando uma elevada concentração destes radicais no meio. A energia elevada dos radicais peróxil permite que eles promovam a abstração de hidrogênio de outro ácido graxo formando produtos primários da oxidação (peróxidos e hidroperóxidos) e outros radicais em outros ácidos graxos (LAGUERRE, LECOMTE e VILLENEUVE, 2007; MEDINA-MEZA, BARNABA e BARBOSA-CÁNOVAS, 2014; KUMAR et al., 2015).

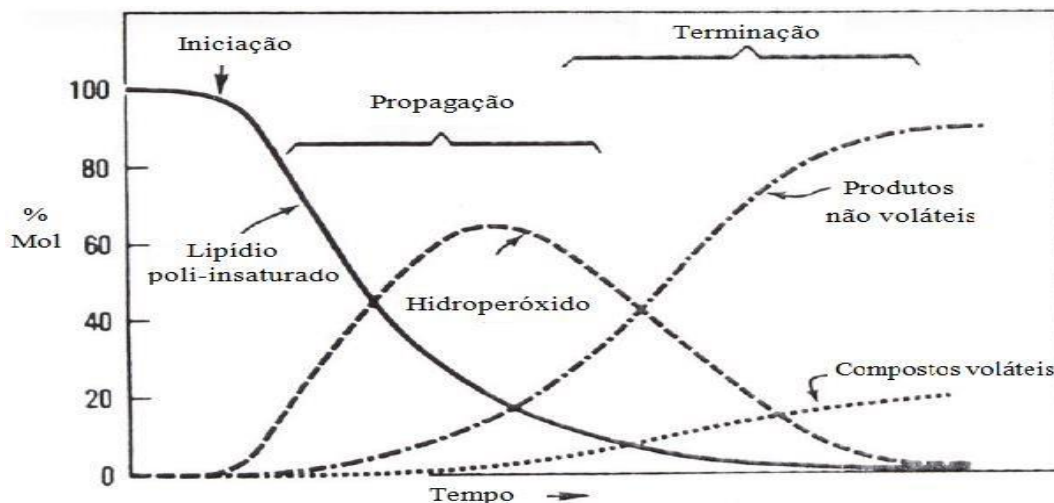
Na etapa de terminação ocorre a interrupção das reações em virtude da redução da quantidade de ácidos graxos no sistema, de forma que os radicais passam a reagir entre si formando compostos estáveis (NICKI et al., 2005; MASUDA et al., 2010). A figura 2 apresenta o esquema geral para a oxidação de ácidos graxos.



**Figura 2:** Esquema geral para a oxidação de ácidos graxos (Adaptado de: RAMALHO e JORGE, 2006).

Durante a terminação, produtos secundários são formados por meio de transformações de hidroperóxidos que envolvem reações de decomposição, principalmente via cisão da

ligação dupla adjacente ao grupo hidroperoxil acarretando a formação de aldeídos, hidrocarbonetos, álcoois, cetonas voláteis e outros compostos não voláteis (LAGUERRE, LECOMTE e VILLENEUVE, 2007). A figura 3 apresenta o perfil geral de distribuição dos produtos da auto-oxidação de ácidos graxos poli-insaturados nas etapas de iniciação, propagação e terminação.



**Figura 3:** Auto-oxidação de ácidos graxos poli-insaturados em função do tempo (Adaptado de: GARDNER, 1983).

Os hidroperoxídeos podem se decompor por meio de diversos esquemas de reações que dependerão do tipo de ácido graxo e da localização do hidroperoxídeo na molécula do ácido graxo. Além disso, os produtos de decomposição podem ser insaturados, apresentando estruturas pentadieno intactas, o que significa que os produtos de oxidação podem ser posteriormente oxidados, resultando na formação de centenas de produtos diferentes de oxidação de ácidos graxos (MCCLEMENTS e DECKER, 2010).

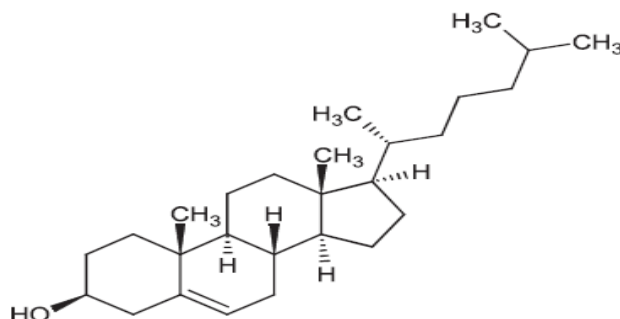
Além dos ácidos graxos insaturados, o colesterol também pode ser degradado por meio de reações oxidativas via auto-oxidação, acarretando a formação de produtos oxidados do colesterol ou óxidos de colesterol.

### 3 Oxidação do colesterol e formação dos óxidos de colesterol

O colesterol ( $C_{27}H_{46}O$ ), por ser um composto insaturado, também é altamente instável e suscetível à oxidação lipídica (SMITH, 1987; DANTAS et al., 2015). É um dos principais esteróis encontrados nos tecidos dos animais. Atua como um componente estrutural das membranas celulares e plasmáticas e precursor de hormônios esteróides e vitamina D (MORZYCKI, 2014). Além disso, atua na síntese hepática dos ácidos biliares que posteriormente são secretados no intestino, essenciais para a digestão normal e para a absorção de gordura e das vitaminas lipossolúveis A, D, E e K (BRZESKA, SZYMCZYK e SZTERK, 2016).

O colesterol pode estar presente em sua forma livre, combinado com ácidos graxos de cadeia longa ou como ésteres de colesterol. Em sua forma livre, o colesterol apresenta um núcleo policíclico formado pela união de quatro anéis, sendo três anéis de seis carbonos e um

com cinco, uma cadeia alifática ligada ao carbono 17 denominada cadeia lateral, um grupo hidroxila ligado ao carbono 3 e uma insaturação no núcleo policíclico na posição C5 e C6 (Figura 4) (MCCLEMENTS e DECKER, 2010; VICENTE et al., 2012b).

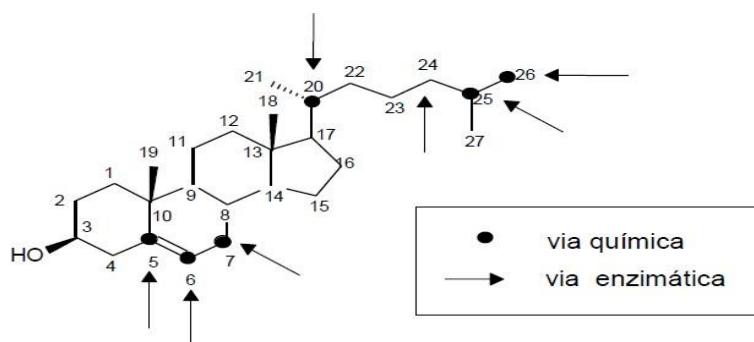


**Figura 4:** Fórmula estrutural do colesterol (BRZESKA, SZYMCZYK e SZTERK, 2016).

A oxidação do colesterol em alimentos ocorre de forma similar à oxidação dos ácidos graxos insaturados, através de reações em cadeia que se baseiam na formação de radicais, resultando na formação de compostos comumente conhecidos como óxidos de colesterol ou produtos da oxidação do colesterol (POCs). Os POCs podem ser formados tanto de forma endógena, basicamente no fígado e nos tecidos geradores de hormônios esteróides, ou formados a partir da oxidação do colesterol presente nos produtos de origem animal (exógena) e ingeridos pela dieta através de alimentos processados (DANTAS et al., 2015; KULIG et al., 2016; BARRIUSO, ANSORENA e ASTIASARÁN, 2017).

Os óxidos de colesterol são esteróis que possuem uma estrutura molecular semelhante a do colesterol, mas que apresentam um grupo hidroxila, cetona ou epóxido adicional no núcleo esteróide ou um grupo hidroxila na cadeia lateral (WASOWICZ, 2003). A complexa mistura de óxidos de colesterol formada na oxidação do colesterol mediada por radicais dificulta a determinação do exato mecanismo de formação de cada óxido, principalmente devido ao caráter aleatório da oxidação por radicais livres e ao subsequente rearranjo dos produtos intermediários (MCCLEMENTS e DECKER, 2010).

A ligação dupla entre os carbonos 5 e 6 torna a molécula de colesterol altamente suscetível a oxidação, sendo o carbono 7 o centro reativo na molécula do colesterol. Os carbonos 4 e 7 apresentam-se no mesmo plano, entretanto, o impedimento estérico provocado pelo grupo hidroxila do carbono 3 que apresenta posição equatorial dificulta as reações oxidativas no carbono 4. O mesmo impedimento estérico ocorre no carbono 5, devido ao substituinte triálquil. A fraca energia de ligação C-H no carbono 7 favorece a reação, pois demanda uma menor energia de ativação para a abstração do hidrogênio. A cadeia lateral também pode ser oxidada, principalmente nos carbonos terciários C20 e C25 (TAI, CHEN e CHEN, 1999; WASOWICZ, 2003). A figura 5 apresenta as posições mais suscetíveis à oxidação na molécula de colesterol.



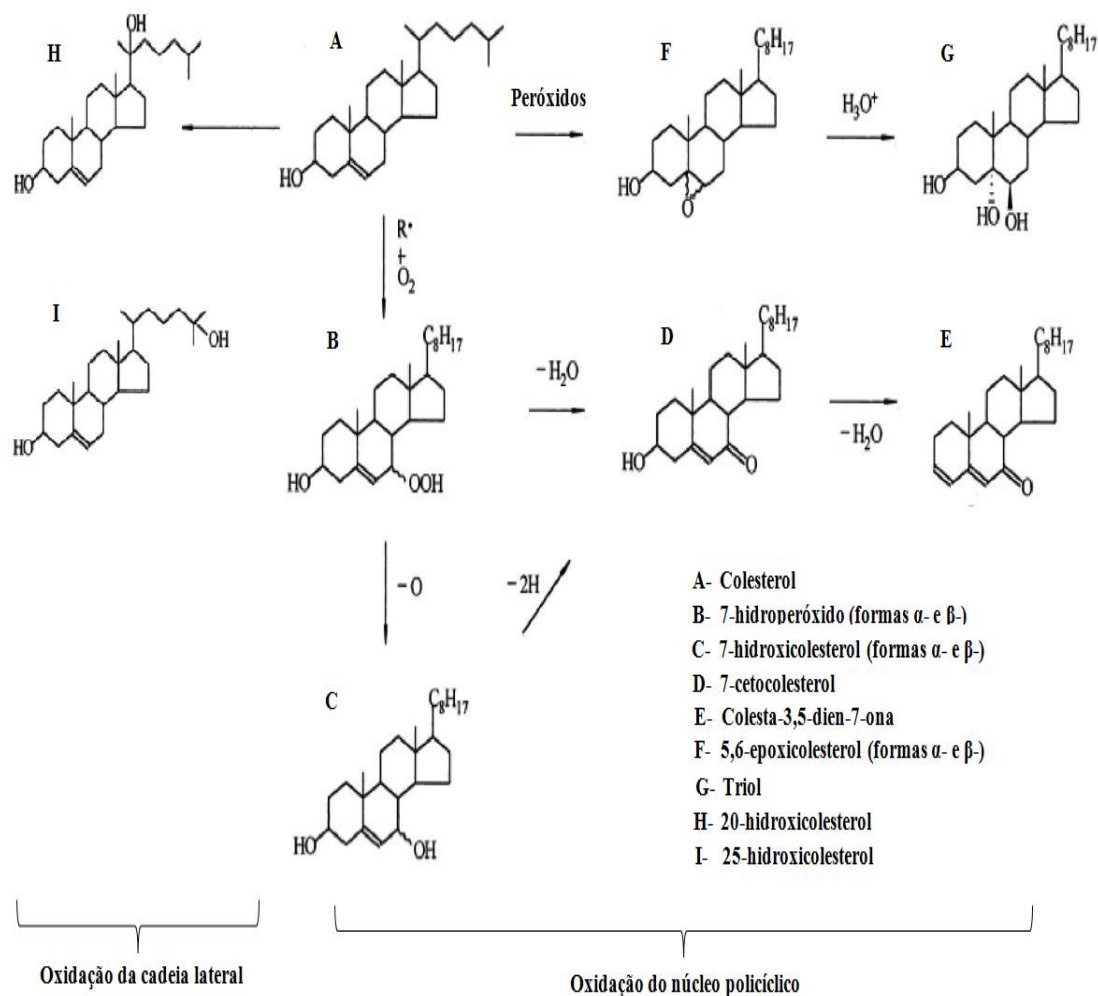
**Figura 5:** Posições da molécula de colesterol suscetíveis ao ataque oxidativo (SMITH, 1987).

A auto-oxidação do colesterol se inicia com a formação de um radical no carbono 7, devido a abstração do hidrogênio ocasionada por radiação ou outros radicais. O radical formado reage com o oxigênio molecular triplete ( $^3\text{O}_2$ ), que acarreta a formação simultânea de  $7\alpha$ - e  $7\beta$ -hidroperóxidos, predominando o  $7\beta$ -hidroperóxido por ser termodinamicamente mais estável devido a sua forma equatorial. Posteriormente, estes compostos são reduzidos aos seus álcoois correspondentes ( $7\alpha$ - e  $7\beta$ - hidroxicolesterol) ou podem originar o 7-cetocolesterol. O 7-cetocolesterol pode ser termicamente degradado a colest-3,5-dien-7-ona em meio básico (MAERKER, 1987; TAI, CHEN e CHEN, 1999).

A epoxidação ou reação de oxidação no carbono acarreta a formação de  $5,6\alpha$ - e  $5,6\beta$ -epoxicolesterol, caracterizados como produtos da oxidação do colesterol pelo ar (GUARDIOLA et al., 1996). Produtos da oxidação da cadeia lateral do colesterol também podem ser formados. A oxidação predominante dos carbonos terciários C20 e C25 acarreta a formação de 20-hidroxicolesterol e 25-hidroxicolesterol, respectivamente (VICENTE et al., 2012b). Por reações de transferência de radicais, outros radicais peroxilas e seus correspondentes hidroperóxidos podem ser formados, como os derivados hidroxilados do colesterol, 24-, 26- e 27-OH (SMITH, 1987; GUARDIOLA et al., 1996). A figura 6 apresenta as vias de formação dos principais óxidos de colesterol.

Além da formação destes compostos, o colesterol pode degradar e desencadear o desenvolvimento de outros produtos como hidrocarbonetos de cadeia curta, aldeídos, cetonas e álcoois (SMITH, 1987).





**Figura 6:** Vias de formação dos principais óxidos de colesterol (TAI, CHEN e CHEN, 1999).

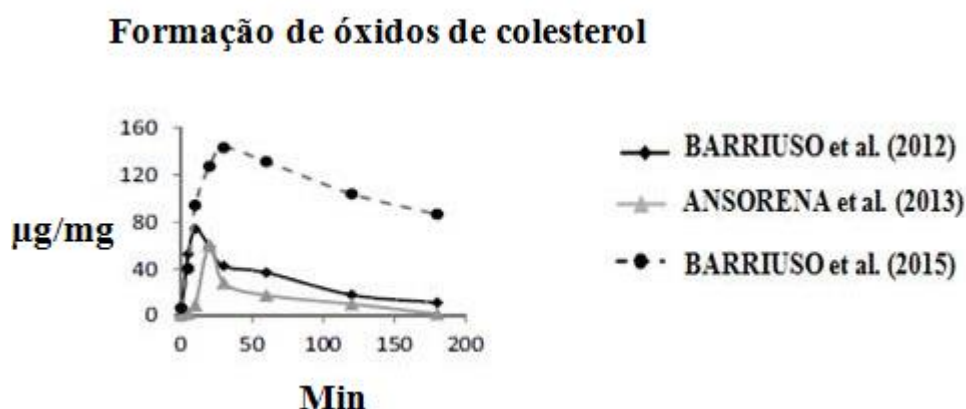
A auto-oxidação do colesterol comporta-se como um sistema dependente, onde o perfil dos produtos e suas concentrações são influenciados por fatores como a atividade de água, pH, exposição à luz e a irradiação, temperaturas elevadas, radiação ionizante, radicais, íons metálicos, o estado físico do colesterol e composição do alimento (MEDINA-MEZA e BARNABA, 2013). Dentre os fatores citados, o mais relevante é a termo-oxidação, desta forma, inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos a cerca da oxidação do colesterol durante a exposição a elevadas temperaturas (BARRIUSO et al., 2012; DEREWIAKA e MOLINSKA, 2015; BARRIUSO et al., 2016; TARVAINEN et al., 2016; XU et al., 2016; LEAL-CASTAÑEDA et al., 2017).

#### 4 Termo-oxidação do colesterol

Temperaturas elevadas são fatores indutores do processo oxidativo, pois atuam diminuindo a energia de ativação necessária para a abstração do hidrogênio que leva a formação de radicais (BARRIUSO, ANSORENA e ASTIASARÁN, 2017). Na termo-oxidação são formados óxidos como o 7-cetocolesterol, 7 $\alpha$ - e 7 $\beta$ -hidroxicolesterol, 5,6 $\beta$ - e 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol e colestanoltriol, sendo o 7-cetocolesterol o óxido mais abundante

(LAMPI et al., 2002; XU et al., 2011).

A termo-oxidação do colesterol ocorre em temperaturas acima de 150 °C, pois em temperaturas próximas ao ponto de fusão do colesterol (147-148 °C), seu estado físico possibilita maior contato desta molécula com agentes oxidantes. Derewiaka e Molinska (2015) não detectaram a formação de óxidos de colesterol ao submeter o colesterol ao aquecimento a 120 °C, por até 180 minutos. Diversos estudos observaram a degradação do colesterol e formação de seus óxidos a 150 °C, entretanto 180 °C é a temperatura mais utilizada em pesquisas envolvendo a termo-oxidação do colesterol, visto que esta representa a temperatura usualmente aplicada em processos térmicos culinários (BARRIUSO et al., 2012). A figura 7 apresenta o perfil de formação de óxidos de colesterol em sistemas modelos a partir da termo-oxidação do colesterol em função do tempo.



**Figura 7:** Formação de óxidos de colesterol em sistemas modelos contendo colesterol puro em função do tempo (Adaptado de: BARRIUSO, ANSORENA e ASTIASARÁN, 2017).

Ao estudar o processo de termo-oxidação do colesterol em sistema modelo, Xu et al. (2005) observaram que não ocorreu formação de 7-cetocolesterol durante o aquecimento a 125 °C, por 30 minutos. Entretanto a formação do óxido em questão foi observada a 125 °C e atingiu nível máximo a temperatura de 175 °C após 30 minutos de aquecimento (2,11 µg/mL).

Amostras de colesterol aquecidas a 180 °C por 360 minutos foram analisadas por Barriuso et al. (2012). Os autores constataram o aumento da degradação do colesterol com o aumento do tempo de aquecimento, obtidas razões de 76,99% e 94,51% de degradação após 60 e 360 minutos de aquecimento, respectivamente. Entretanto, os níveis dos óxidos analisados (7-cetocolesterol, 7 $\alpha$ - e 7 $\beta$ -hidroxicolesterol, 5,6 $\alpha$ -e 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol e triol), apresentaram aumento significativo nos 10 primeiros minutos, sendo determinada uma taxa de degradação do colesterol maior do que de formação destes com o passar do tempo, concluindo-se que a degradação do colesterol não acarreta apenas na formação de seus óxidos.

O aquecimento de amostras de colesterol a 180 °C durante 20 minutos, acarretou a formação de 60,39 µg de POCs/mg de amostra, sendo 7-cetocolesterol,  $\alpha$ -epoxicolesterol e  $\beta$ -epoxicolesterol os óxidos predominantes (ANSORENA et al., 2013). Em estudo realizado por Derewiaka e Molinska (2015) amostras de colesterol foram aquecidas a diferentes temperaturas (120, 150, 180 e 220 °C) em tempos entre 30 a 180 minutos. A maior razão de degradação do colesterol foi observada a temperatura de 220 °C, e após 30 e 180 minutos de aquecimento a perda de colesterol foi entre 96 e 99,5%, respectivamente. Conteúdos mais elevados de óxidos de colesterol foram determinados a 150 °C, sendo observada a formação de outros compostos como polímeros, compostos voláteis, além de fragmentos da molécula de

colesterol. Após aquecimento a 150 °C por 120 minutos, aproximadamente 16,7 % do colesterol foi oxidado, onde predominou a formação de 7- cetocolesterol, 5,6β-epoxicolesterol e 5,6α-epoxicolesterol, respectivamente.

Leal-Castañeda et al. (2017) avaliaram a formação de óxidos de colesterol em sistema modelo contendo colesterol e óleo de peixe (2,5 mg de colesterol/g de óleo) quando submetido ao aquecimento em forno convencional, a 180 °C durante 20 minutos. Os autores observaram um aumento significativo no conteúdo total de óxidos de colesterol, determinando-se um total de 225,4 µg/g de lipídio após o tratamento térmico, onde os óxidos predominantemente formados foram 7α-hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol.

Os estudos apresentados demonstram que a utilização de elevadas temperaturas nos processos térmicos aplicados em matrizes lipídicas ricas em compostos insaturados como o colesterol, acelera o processo de auto-oxidação, com consequente formação de produtos de oxidação do colesterol.

## **5 Efeitos dos óxidos de colesterol a saúde**

Os óxidos de colesterol de origem endógena exercem atividades biológicas importantes e essenciais ao corpo humano. Atuam como substrato para a síntese de hormônios esteroidais e ácidos biliares. Além disso, são importantes transportadores de colesterol pelas membranas celulares e pela barreira hematoencefálica, assim como marcadores da oxidação lipoproteica (KULIG et al., 2016).

A atividade mais notável dos óxidos de colesterol é a regulação da homeostase do colesterol. De acordo com Noguche, Saito e Urano (2014), o 24(S)-hidroxicolesterol que é produzido enzimaticamente no cérebro exerce uma importante função fisiológica como regulador da homeostase do colesterol, também agindo na citotoxicidade do 7-cetocolesterol através de uma resposta adaptativa.

Entretanto, os óxidos de colesterol exógenos presentes nos alimentos, estão relacionados a eventos cardiovasculares e mudanças fisiológicas como inflamações, apoptoses em doenças degenerativas, osteoporose e artrite reumatóide (LUCHETTI et al., 2015; KULIG et al., 2016; OLIVIER et al., 2017; SATO et al., 2017). O 7-cetocolesterol é considerado um indutor potente de apoptose em células como as mesenquimais, mediante concentrações acima de 17µM (LEVY et al., 2014), e neuronais, em concentrações entre 25 e 150 µM (JANG e LEE, 2011), assim como nos fibroblastos e nas células endoteliais (KHATIB e VAYA, 2014).

Estudos indicam a existência de correlação entre os óxidos de colesterol e o mal de Alzheimer (GAMBA et al., 2015; XUE-SHAN et al., 2016), além do mal de Parkinson e doença de Huntington (KREILAUS et al., 2015; LEONI e CACCIA, 2015). Produtos da oxidação do colesterol causam alterações na estrutura e nas propriedades da membrana lipídica (NETO e CORDEIRO, 2016), injúrias ao fígado (SERVIDDIO et al., 2016), são associados ao desenvolvimento de depressão (VAVÁKOVÁ, URAIKOVÁ e TREBATICKÁ, 2015), diabetes (SOTTERO et al., 2015) e de patologias oculares (GAMBERT et al., 2017). Os óxidos atuam na diferenciação de células-tronco mesenquimais, apresentando propriedades osteoindutivas e inibindo a diferenciação de adipócitos (LEVY et al., 2017).

Alguns óxidos de colesterol, como 7-cetocolesterol e 7β-hidroxicolesterol, são potentes indutores do estresse oxidativo que contribui para o desenvolvimento de danos ao DNA e consequente carcinogênese. 5,6α-epoxicolesterol, 5,6β-epoxicolesterol e colestanoltriol, apresentam elevada atividade mutagênica e genotóxica devido suas propriedades pró-oxidativas e pró-inflamatórias, colaborando então para a iniciação e

progressão de câncer como o de cólon, próstata e mama (NELSON, CHANG e MCDONNELL, 2014; THANAN et al., 2014; MARWARHA et al., 2017).

Produtos da oxidação do colesterol são constantemente encontrados em lesões características de aterosclerose nas paredes de artérias. Os óxidos de colesterol são considerados mais aterogênicos que o próprio colesterol, exercendo forte influência na aterogênese e no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (KHATIB e VAYA, 2014; LUCHETTI et al., 2015).

Devido aos diversos malefícios associados à ingestão de produtos oxidados do colesterol e aos impactos nutricionais causados pela degradação de ácidos graxos, é notável a necessidade de controle das reações oxidativas durante o processamento e armazenamento de alimentos. Desta forma, os antioxidantes tornaram-se aditivos indispensáveis à indústria alimentícia.

## **6 Antioxidantes naturais**

Antioxidantes são compostos que retardam ou inibem as reações oxidativas protegendo os lipídios iniciadores destas reações ou travando a oxidação na fase de propagação (LAGUERRE, LECOMTE e VILLENEUVE, 2007; SHAHIDI e ZHONG, 2010; KUMAR et al., 2015). Ramalho e Jorge (2006) classificaram os antioxidantes quanto ao mecanismo de ação em primários ou secundários.

Os antioxidantes primários são capazes de doar elétrons ou hidrogênio para o radical formado durante a oxidação lipídica, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou formando o complexo lipídio-antioxidante, que pode reagir com outro radical. Os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa de iniciação da auto-oxidação, por mecanismos distintos que incluem complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos formando espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete (RAMALHO e JORGE, 2006).

Os antioxidantes podem ser sintéticos ou naturais. Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos são o butilidroxianisol (BHA), butilidroxitolueno (BHT), galato de propila (GP) e *terc*-butilidroquinona (TBHQ) (TAHERI et al., 2014; MATUMOTO-PINTRO et al., 2017). Os antioxidantes naturais compreendem as substâncias bioativas tais como substâncias fenólicas, flavonoides, taninos e terpenos, presentes em diversos alimentos, entre eles, vegetais, frutas, ervas e especiarias (OROIAN e ESCRICHE, 2015; JIANG e XIONG, 2016; BARBIERI et al., 2017; TIAN et al., 2018).

Os antioxidantes sintéticos são amplamente utilizados na indústria de alimentos. Entretanto, a utilização destes compostos vem sendo questionada devido à toxicidade e consequentes efeitos deletérios a saúde associados à ingestão dos mesmos gerando uma nova demanda por conta dos consumidores e da indústria por alimentos isentos deste grupo de aditivos (ESKANDANI, AMISHEHKAR e OLATABADI, 2014; CALEJA et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2016; RAEISI et al., 2016; BALZAN et al., 2017; LORENZO et al., 2017). Desta forma, os antioxidantes naturais representam uma alternativa que vem se destacando junto à comunidade científica (GRANATO, NUNES e BARBA, 2017).

Estudos demonstram que os compostos naturais podem apresentar efeitos equivalentes ou superiores aos sintéticos na inibição da oxidação lipídica (FIGUEIRÊDO et al., 2015; CALEJA et al., 2016; MATUMOTO-PINTRO et al., 2017; MUNEKATA et al., 2017; ZHANG et al., 2017), além de serem efetivamente assimilados pelo organismo e apresentarem potencial valor nutricional promovendo benefícios extras a saúde (EMBUSCADO, 2015; BARBIERI et al., 2017).

Diversos extratos naturais são caracterizados como antioxidantes devido à rica composição em fitoquímicos bioativos (EMBUSCADO 2015; JIANG e XIONG, 2016; LORENZO et al., 2017; TIAN et al., 2018). A propriedade antioxidante é oriunda de uma mistura de componentes ativos, que podem atuar tanto individualmente como em sinergia (OROIAN e ESCRICHE, 2015).

Os antioxidantes naturais presentes em maior quantidade na dieta humana são as substâncias fenólicas, que podem ser quimicamente definidas como substâncias que possuem um anel aromático com uma ou mais hidroxilas. Também podem apresentar outros grupos substituintes em sua estrutura, como ésteres e glicosídeos (HAN, SHEN e LOU, 2007; BREWER, 2011; SHAHIDI e AMBIGAIPALAN, 2015).

As substâncias fenólicas são substâncias amplamente distribuídas na natureza, sendo que mais de 8000 destas substâncias já foram detectadas em plantas. 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. Os grupos mais abundantes nos alimentos são os flavonoides, os ácidos fenólicos, lignanas e estilbenos (HELENO et al., 2015; OROIAN e ESCRICHE, 2015; BARBIERI et al., 2017).

A efetividade antioxidante de muitas substâncias fenólicas é resultado da facilidade com a qual um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) da sua estrutura aromática é doado para um radical, bem como a habilidade da mesma em suportar um elétron não emparelhado através do deslocamento do mesmo ao redor de todo o sistema de elétrons da molécula (MCCLEMENTS e DECKER, 2010). As substâncias fenólicas também podem interferir no processo de oxidação atuando como agentes redutores, sequestradores de oxigênio singlete e agentes quelantes de metais (PROCHAZKOVA, BOUŠOVA e WILHELMOVA, 2011; SHAHIDI e AMBIGAIPALAN, 2015; TIAN et al., 2018).

O potencial antioxidante de substâncias fenólicas depende de sua estrutura molecular e da localização e comportamento dos grupos funcionais na molécula. Em flavonoides, por exemplo, o potencial antioxidante é determinado em função no número e da localização dos grupos hidroxilas na molécula. Estruturas poliméricas contendo mais de um grupamento hidroxila possuem maior potencial antioxidante, enquanto a glicosilação dos grupos funcionais (redução dos grupos -OH) usualmente diminui a efetividade antioxidante destes compostos (KUMAR et al., 2015).

Extratos naturais caracterizados pela presença de substâncias fenólicas são constantemente estudados com o intuito de avaliar o efeito protetor destes na formação de compostos oxidados. Ao comparar a ação antioxidante do BHT e TBHQ com extratos naturais das folhas de acácia-branca (*Moringa oleífera*), Nascimento et al. (2016) constataram melhor efeito protetor frente a oxidação lipídica para os extratos naturais, de forma que o emprego do extrato reduziu a formação de peróxidos e hidroperóxidos em óleo de pescado. Os resultados obtidos demonstraram que o BHT e TBHQ podem ser substituídos pelo extrato natural nas condições analisadas, atendendo a demanda dos consumidores por produtos livres de aditivos sintéticos.

Zhang et al. (2017) compararam o efeito antioxidante de BHT e do TBHQ com extratos das folhas de *Myrica rubra* frente a oxidação lipídica em emulsão modelo. As taxas de inibição da formação do 7-cetocolesterol para os extratos preparados e adicionados no nível de 40 mg/mL foi de aproximadamente 86%, valor equivalente ao determinado para os antioxidantes sintéticos a concentração de 20 mg/mL.

No atual contexto de demanda pela substituição de aditivos sintéticos por naturais, pesquisas são constantemente desenvolvidas a cerca de compostos antioxidantes naturalmente presentes em extratos naturais de plantas como a aroeira.

## 7 Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi)

A aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), também denominada pimenta rosa, pimenta brasileira e aroeira-vermelha, é uma planta nativa da América do Sul, distribuída no território brasileiro desde o Nordeste até o Sul do país, podendo também ser encontrada em partes da América Central, América do Norte, África, Europa e Ásia (CARVALHO et al., 2013). Membro da família Anacardiaceae, a aroeira apresenta um arbusto com folhas pontiagudas estreitas. Cresce cerca de 4 a 10 m e quando frutifica fica recoberta de cachos com frutos pequenos de cor vermelha e brilhante (figura 8) (CERUKS et al., 2007).



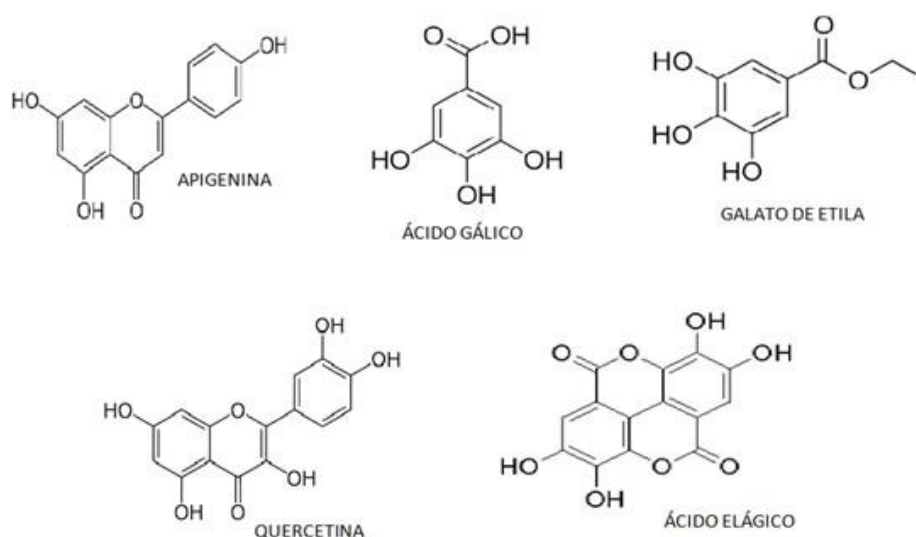
**Figura 8:** Folhas e frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi).

Embora seja uma espécie aparentemente pouco cultivada no Brasil para fins comerciais, a aroeira possui elevado potencial para a exploração e uso. É amplamente utilizada na culinária e pela medicina popular, no tratamento de problemas respiratórios e infecções urinárias, feridas, reumatismo, como agente anti-inflamatório e hemostático (ELMASSARY et al., 2009; SOARES, 2010; BERNARDES et al., 2014). Além disso, sua capacidade de adaptação a diversos habitats possibilita o desenvolvimento da espécie não só na faixa litorânea brasileira, mas também em terrenos secos, habitando diversas formações vegetais (LENZI e ORTH, 2004).

Tais aplicações são decorrentes de importantes propriedades atribuídas à aroeira e seus frutos como: efeito antioxidante (BERNARDES et al., 2014; PAGANI et al., 2014; D'SOUSA' COSTA et al., 2015; DANNENBERG et al., 2016; ENNIGROU et al., 2017), efeito cicatrizante (LUCENA et al., 2006; RIBAS et al., 2006), antitumoral (MATSUO et al., 2011; SILVA et al., 2017a), efeito anti-inflamatório (BERNARDES et al., 2014) e atividade antimicrobiana (MELO et al., 2014; D'SOUSA' COSTA et al., 2015; DANNENBERG et al., 2016).

Inúmeros trabalhos reportaram a diversidade de metabólitos secundários presentes em *Schinus terebinthifolius* Raddi (BERNARDES et al., 2014; CAVALCANTI et al., 2015; DANNENBERG et al., 2016; ANDRADE, PONCELET e FERREIRA, 2017; FEUEREISEN et al. 2017; GLÓRIA et al., 2017). A análise fitoquímica da pimenta rosa determinou a presença de taninos, alcaloides, flavonoides, saponinas, esteróis e terpenos (CARVALHO et al., 2013). A figura 9 apresenta a estrutura química de alguns compostos determinados nos frutos da aroeira.





**Figura 9:** Estrutura química de compostos determinados no fruto da aroeira (CARVALHO et al., 2013).

Em estudo realizado por Feuereisen et al. (2014) com o objetivo de caracterizar a composição fenólica do exocarpo dos frutos da aroeira, foram detectados antocianinas, biflavonoides e taninos. Dentre os flavonoides presentes nos frutos da aroeira, estudos reportam a presença de compostos como: quercetina (BERNARDES, 2010; GLÓRIA et al., 2017), rutina (BERNARDES, 2010), apigenina (DEGASPARI, WASZCZYNSKY e PRADO, 2005; BERNARDES et al., 2014), naringina (DEGASPARI, WASZCZYNSKY e PRADO, 2005), amentoflavona (SKOPP e SCHWENKER, 1986) e tetraidroamentoflavona (SKOPP e SCHWENKER, 1986). Bernardes (2010) quantificou por espectrofotometria de UV-Visível os teores de taninos condensados e hidrolisáveis para os frutos de *S. terebinthifolius*, não sendo possível detectar os hidrolisáveis, enquanto os taninos condensados foram detectados em 2,7 %.

Pagani et al. (2014) ao analisar o perfil de substâncias fenólicas dos frutos da aroeira por UFLC (Ultra-Fast Liquid Chromatography), reportaram os ácidos *p*-coumárico, vanílico e ferúlico como os compostos mais representativos. Morais et al. (2017) determinaram a presença de ácido masticadienóico, galato de etila e ácido gálico, sendo o último composto também determinado por Glória et al. (2017) e Skopp e Schwenker (1986). Outros compostos como o ácido elágico (DEGASPARI, WASZCZYNSKY e PRADO, 2005), ácido ursólico e cardanol (STAHL, KELLER e BLINN, 1983), também foram identificados nos frutos da aroeira.

A composição química dos frutos da aroeira é determinada por fatores genéticos, porém fatores ambientais podem causar variações significativas em seus componentes. Desta forma, o teor de compostos fitoquímicos pode ser afetado pelo tempo de maturação, genótipo, época da colheita, assim como a estocagem e as condições de processamento (ENNIGROU et al., 2017).

Variações no conteúdo de substâncias fenólicas e flavonoides totais durante diferentes estágios de maturação dos frutos da aroeira foram analisadas, com o objetivo de identificar possíveis alterações nas propriedades destes frutos. Teores mais elevados para as substâncias fenólicas totais foram observados no estágio mais avançado de maturação, sendo os menores teores no estágio intermediário. Já o conteúdo de flavonoides totais apresentaram teores mais elevados no estágio intermediário. Os frutos intactos da aroeira também foram comparados com o resíduo hidrodestilado dos frutos, de forma que foram determinados conteúdos quase

semelhantes de substâncias fenólicas e superior ao de flavonoides totais no resíduo, demonstrando que o resíduo do processo de destilação pode representar uma excelente fonte de polifenóis (ENNIGROU et al., 2017).

Apesar dos frutos da aroeira já serem utilizados na culinária e assim ingeridos via oral, poucos estudos foram realizados a cerca da possível toxicidade destes, predominando pesquisas referentes à casca e as folhas da aroeira. Estudos avaliaram a toxicidade dos frutos em animais, onde de acordo com os autores a administração via oral dos extratos não demonstraram risco nas doses e condições determinadas (PIRES et al., 2004; AFFONSO, 2009).

Ensaio clínico toxicológico a cerca da ingestão oral de produto fitoterápico composto por três plantas medicinais, dentre elas o *Schinus terebinthifolius* Raddi, foram realizados por Paulo et al. (2009), que constataram que a ingestão até 45 mL/dia durante dois meses não apresentou alterações clínicas, laboratoriais e nem reações adversas significantes nos voluntários avaliados, sugerindo a baixa toxicidade do produto.

Além do conhecimento da composição química e possível toxicidade de extratos naturais ao organismo humano, pesquisas a cerca da efetividade destes extratos como antioxidantes em alimentos também são primordiais. Devido à complexidade das matrizes alimentares, onde diferentes componentes podem interferir nas análises e resultados, antioxidantes naturais são aplicados primeiramente em sistemas modelos. Os sistemas modelos permitem avaliar e controlar parâmetros que possam influenciar no processo de oxidação e na efetividade do antioxidante (ANSORENA et al., 2013; BARRIUSO et al., 2016).

## **8 Sistemas modelos contendo colesterol x antioxidantes naturais**

Inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de avaliar a ação inibitória de antioxidantes naturais frente à oxidação do colesterol. A ação protetora de tocoferóis no processo de oxidação do colesterol em óleo de peixe termicamente processado foi confirmada por Li et al. (1996). Extrato de alecrim e flavonoides comerciais foram avaliados quanto a capacidade de inibir a termo-oxidação (150 °C) do colesterol previamente adicionado ao óleo de soja. De acordo com os resultados obtidos foi possível constatar que dentre os quatro flavonoides testados (quercetina, rutina, catequina e morina), a quercetina apresentou melhor efeito antioxidante, reduzindo a conteúdo de 7-cetocolesterol de 134 para 47 µg/mL de amostra. O extrato de alecrim reduziu cerca de 40% o conteúdo de 7-cetocolesterol quando comparado à amostra controle, enquanto a rutina não apresentou resultado significativo, reduzindo apenas de 121 para 117 µg/mL de amostra (VALENZUELA et al., 2004).

Amostras de colesterol contendo diferentes óleos de origem vegetal (óleo de canola, soja, oliva, milho e farelo de arroz) foram submetidas ao tratamento térmico e analisadas por Xu et al. (2005). Os óleos utilizados foram capazes de inibir a degradação do colesterol e formação de 7-cetocolesterol durante aquecimento. Após 10 minutos a 150 °C, as amostras controle apresentaram conteúdo de 7-cetocolesterol de 2µg/mL, enquanto nas amostras adicionadas de óleo de farelo de arroz e canola o conteúdo detectado foi de 0,9 e 0,7 µg/mL, respectivamente.

Chien, Hsu e Chen (2006) adicionaram quercetina pura a soluções de colesterol com o objetivo de avaliar o efeito do flavonoide frente a termo-oxidação. A presença de quercetina nas amostras protegeu o colesterol da degradação após 90 minutos a 150 °C, visto que 71,6% do colesterol não foi degradado nas amostras com adição de quercetina, valor superior ao



constatado nas amostras controle (32,2%). De acordo com os autores, a taxa de formação dos óxidos de colesterol aumentou em função do tempo de aquecimento devido à degradação térmica da quercetina ao longo do processo.

O efeito protetor do extrato aquoso de *Melissa officinalis* liofilizada frente à formação de óxidos de colesterol foi avaliado por Barriuso et al. (2015), em sistema modelo de aquecimento a 180 °C. A adição do extrato auxiliou na inibição da formação de compostos oxidados como o 25-hidroxicolesterol. Após 120 minutos de aquecimento, as amostras adicionadas do extrato apresentaram conteúdo de aproximadamente 0,7 µg de 25-hidroxicolesterol/mg de colesterol, enquanto nas amostras controle foi determinado um teor de 10 µg/mg de colesterol.

De acordo com estudo realizado por Barriuso et al. (2016), o extrato de mana-cubiu (*Solanum sessiliflorum*) foi eficiente no controle da oxidação do colesterol nas condições analisadas. Os dados obtidos demonstraram uma redução significativa no conteúdo de óxidos de colesterol das amostras controle para as adicionadas do extrato, 227 e 25 µg de óxidos/mg de colesterol, respectivamente.

O efeito inibitório de onze antioxidantes, dentre estes nove substâncias fenólicas, vitamina E e o antioxidante artificial BHT, foi investigado frente a oxidação do colesterol quando submetido ao aquecimento a 160 °C por uma hora. As amostras controle, sem adição de nenhum antioxidante, apresentaram teores mais elevados de óxidos de colesterol total após o aquecimento (10,64%), confirmando a ação inibitória dos aditivos utilizados. Nas amostras adicionadas de rutina, quercetina, ácido clorogênico e ácido caféico, não foram detectados óxidos de colesterol, sendo o menor efeito inibitório observado nas amostras contendo BHT, naringina e naringenina (XU et al., 2016). Substâncias fenólicas como a quercetina e o ácido caféico, mostraram-se eficazes no retardo da oxidação lipídica em óleo de sardinha (VAISALI, BELUR e REGUPATHI, 2016).

Inúmeras pesquisas demonstram alterações na composição lipídica devido a termo-oxidação, comprometendo a qualidade sensorial e nutricional de alimentos. A presença de óxidos de colesterol em óleos de pescado sugere algumas questões sobre a segurança potencial destes óleos, normalmente considerados benéficos para a saúde. Desta forma, a utilização de extratos naturais com potencial antioxidante apresenta uma alternativa no sentido de minimizar a formação de compostos oxidados, ajudando a garantir a segurança no consumo destes alimentos. Assim, a utilização dos frutos de aroeira em sistemas modelo contendo óleo de sardinhas aquecido a diferentes temperaturas, mostrou-se a forma mais viável de se estudar os efeitos protetores do referido fruto frente à oxidação do colesterol e ácidos graxos insaturados presentes nas amostras.

## **CAPÍTULO I**

**ARTIGO DE REVISÃO ENVIADO A REVISTA  
“Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety”**

**USE OF NATURAL ANTIOXIDANTS IN THE INHIBITION OF  
CHOLESTEROL OXIDATION IN FOODS OF ANIMAL ORIGIN: A  
REVIEW**

## ABSTRACT

Synthetic antioxidants are widely used in the food industry. However, the potential toxicity, carcinogenic effects, and possible health damage caused by the ingestion of synthetic compounds, and also consumer concern about the safety of such additives has motivated the food industry to search for natural alternatives. Natural compounds with antioxidant properties are able to retard or prevent lipid oxidation in food. Animal sources like fish, eggs, meats and dairy products are essential foods for human health due to their lipid fraction with high contents of unsaturated compounds, such as polyunsaturated fatty acids and cholesterol. However, these unsaturated lipids when exposed to favorable factors can become oxidized, which leads to sensory and nutritional losses as well as the formation of oxidized compounds known as cholesterol oxidation products or COPs. COPs are associated with deleterious health effects, such as inflammation, cytotoxicity, atherogenesis, carcinogenesis, and alterations in cell membrane properties, as well as the development of degenerative diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's, osteoporosis, and other chronic diseases. Thus, the use of natural antioxidants can be an alternative to synthetics to prevent the formation of COPs and extend the shelf-life of foods susceptible to oxidative deterioration. This review brings together information concerning the use of natural antioxidants as a strategy to control cholesterol oxidation.

**Keywords:** Natural antioxidants, cholesterol oxides, lipid oxidation, processed food.

## 1 INTRODUCTION

Foods of animal origin are susceptible to oxidation due to their high content of unsaturated compounds such as fatty acids and cholesterol (TAI, CHEN and CHEN, 2000; HUR, PARK and JOO, 2007; ORCZEWSKA-DUDEK et al., 2012). The cholesterol present in these matrices may oxidize when exposed to favorable conditions leading to the formation of cholesterol oxidation products (COPs), thus exposing the consumer to possible adverse effects caused by the ingestion of these compounds (BARRIUSO et al., 2016; XU et al., 2016).

The ingestion of COPs present in food is related to deleterious health effects such as: cytotoxic, atherogenic, mutagenic, neurodegenerative, and carcinogenic diseases (KULIG et al., 2016). COPs are also associated with the development of degenerative diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's, osteoporosis, and eye cataract formation. COP molecules are known to alter cell membrane characteristics and to interfere in cholesterol metabolism (TUBEROSO et al., 2013; LUCHETTI et al., 2015; KULIG et al., 2016, NETO e CORDEIRO, 2016; ROSA-FERNANDES et al., 2017; SATO et al., 2017).

Moreover, cholesterol oxides represent a problem in public health. The incorporation of antioxidants in foods is a strategy to reduce the risks represented by the consumption of these compounds (VALENZUELA, SANHUEZA and NIETO, 2004; PALLOZA et al., 2008; BARRIUSO et al., 2015; ARMENTEROS et al., 2016; BARRIUSO et al., 2016; ISLAM, KHAN and ISLAM, 2017).

Synthetic antioxidants are commonly used in food processing; nevertheless, there is an increasing interest in substituting these additives for natural extracts, such as herbs and spices that are rich in bioactive compounds (XU et al., 2016). The bioactive compounds present in plant extracts possess similar or even higher antioxidant effects when compared with synthetic compounds. Furthermore, they present additional nutritional benefits to health and are rapidly assimilated by the organism (EMBUSCADO, 2015; BARRIUSO et al., 2016). Thus, the addition of natural antioxidants represents an alternative to prevent the loss of the nutritional and sensory quality of foods due to lipid oxidation reactions (VALENZUELA et al., 2004; LEE, CHIEN and CHEN, 2008; SHAHIDI and ZHONG, 2010; KARRE, LOPEZ and GETTY, 2013; MI, GUO and LI, 2016; RAHILA et al., 2017).

The use of natural antioxidants from herbs and spices represents an efficient alternative to control the formation of COPs in processed foods. In addition, the substitution of natural antioxidants protects humans from any possible harmful effects from synthetic substances; besides, they also provide extra benefits due to the action of the bioactive compounds usually present; furthermore, the use of natural antioxidants follows current trends and provides products safe for human consumption. This review presents the use of herbs and spices as natural antioxidants to inhibit cholesterol oxidation.

## 2 CHOLESTEROL OXIDATION

Cholesterol ( $C_{27}H_{46}O$ ) is the main compound of the sterol family and is present in cells of animal origin, representing the most prominent lipid in eukaryotic cells. It acts in the control of the fluidity and permeability of cell membranes and also in the synthesis of bile acids, vitamin D, and steroid hormones. In addition, it is a crucial component in the composition of lipoproteins that are involved in the transport and metabolism of lipids in the body (HARPER and JACOBSON, 1999). Cholesterol may be present in its free form, combined with long-chain fatty acids, or as cholesterol esters (MORZYCKI, 2014). In its free

form, cholesterol is a long-chain polycyclic alcohol with a tetracyclic ring common to the sterols. It has a hydroxyl group at C3 and an unsaturation between the C5 and C6 positions, and an aliphatic side chain (HUR, PARK and JOO, 2007).

The chemical structure of cholesterol is susceptible to oxidative processes that result in the formation of mono- or polyoxygenated compounds, called cholesterol oxidation products or COPs (SMITH, 1987). These sterols differ from cholesterol as they present additional polar groups (KULIG et al., 2016), such as a hydroxyl or epoxide group added to the steroid nucleus or a hydroxyl group added to the side chain of the molecules. The oxidation of cholesterol is system-dependent; that is, the oxides formed as well as their relative concentrations vary depending on the presence of water, the temperature, oxidation time, type of buffer, pH, and the form of substrate (KIM and NAWAR, 1993). The main sites susceptible to oxidation in the cholesterol molecule are the double bond between carbons 5 and 6, carbon 7 due to its allyl rearrangements, and the C20 and C25 tertiary carbons (SMITH, 1987).

Cholesterol may be oxidized either enzymatically in biological systems or through chemical mechanisms (RODRIGUEZ et al., 2014). In foods, cholesterol oxidation occurs non-enzymatically in an auto-oxidative process through complex chain reactions, which are based on the formation of free radicals (SMITH, 1987).

Cholesterol oxidation occurs in a manner similar to the oxidation of other unsaturated lipids, which are susceptible to attack by reactive oxygen species (ROS). ROS are comprised of radical and non-radical molecules, such as hydroxyl (OH) and peroxy (ROOH) groups, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), triplet (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>), and others. These species may be formed enzymatically, chemically, photochemically, by irradiation, and by decomposition of hydroperoxides, and they may also decompose or interact with each other to form new radicals. This process is autocatalytic and forms primary oxidation products, and the subsequent reactions will lead to the formation of a wide variety of secondary oxidation products (TAI, CHEN and CHEN, 1999; MEDINA-MEZA and BARNABA, 2013; DANTAS et al., 2015).

At high temperatures, the oxidation of cholesterol is initiated primarily at carbon 7, forming 7 $\alpha$ - and 7 $\beta$ -hydroperoxides simultaneously, and then, those compounds are reduced to their corresponding alcohols, 7 $\alpha$ - and 7 $\beta$ -hydroxylcholesterol, or they form 7-ketocholesterol, which may be thermally degraded to cholest-3,5-dien-7-one (SMITH, 1987; CHIEN, WANG and CHEN, 1998). Cholesterol may also degrade and lead to the formation of other products such as short-chain hydrocarbons, aldehydes, ketones, and alcohols (SMITH, 1987).

In the presence of air, cholesterol may also form epoxides such as 5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -epoxycholesterol and 5 $\beta$ , 6 $\beta$ -epoxycholesterol, which in the presence of water and under acidic conditions may lead to the opening up of the epoxide ring, thus producing cholestanetriol (CARDENIA et al., 2013b). Besides the reaction of cholesterol with triplet (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>) and singlet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) oxygen, these epoxycholesterols can also be formed by reactions with different species of active oxygen, such as hydroxyl radicals (OH), alkoxyl (RO), peroxy (ROO), ozone (O<sub>3</sub>), and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (GUMULKA, JAN and SMITH, 1982; GUARDIOLA et al., 1996).

Hydroperoxides derived from the side chain of cholesterol such as 20-hydroxycholesterol and 25-hydroxycholesterol can be formed. Oxidation of C20, C24, and C26 may also occur when cholesterol is strongly oxidized by air, leading to the formation of 20-, 24, and 26-hydroperoxides, respectively (SMITH, 1987). Other degradation products may be formed due to the breakdown of the carbon-carbon side chain bond and subsequent molecular rearrangements, producing volatile compounds such as ketones, acetic acid, and others (GUARDIOLA et al., 1996).

In photo-oxidation, wavelengths that are nearly ultraviolet (UVA, 340-400 nm) and visible light (400-700 nm), along with an appropriated sensitizer such as chlorophyll and riboflavin, together with triplet oxygen ( $^3\text{O}_2$ ), lead to oxidative degradation of cholesterol through photodynamic reactions. The oxidation products generated by this process are the epimers  $7\alpha$ - and  $7\beta$ -hydroxycholesterol, epoxides, and cholestanetriol (CARDENIA et al., 2013b).

The most common COPs present in foods are 7-ketocholesterol,  $20\alpha$ -hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol,  $7\alpha,\beta$ -hydroxycholesterol and  $\alpha$ ,  $\beta$ -epoxycholesterol (HUR, PARK and JOO, 2007; ORCZEWSKA-DUDEK et al., 2012). The profile of the products formed and their concentrations are influenced by factors such as water activity, oxidation time, pH, exposure to light and irradiation, elevated temperatures, physical state of cholesterol, and food composition (presence of unsaturated fatty acids) (MEDINA-MEZA and BARNABA, 2013; DANTAS et al., 2015; BARNABA et al., 2016).

The presence of unsaturated fatty acids in the food matrix may accelerate the oxidation of cholesterol, as it generates a pro-oxidant environment, due to the presence of resonance zones, resulting in radicals such as hydroperoxides (BARNABA et al., 2016). However, lipids may compete for oxygen with sterols and reduce sterol oxidation by auto-oxidation (BARRIUSO, ANSORENA and ASTIASARÁN, 2017).

During thermal processing, changes such as a loss of antioxidant enzyme activity, disruption of cell membranes, which bring polyunsaturated fatty acids into contact with pro-oxidants, and thermal decomposition of hydroperoxides to pro-oxidant species are responsible for the increase in cholesterol oxidation rate (HUR, PARK and JOO, 2007). Many authors have investigated the instability of the cholesterol molecule during thermal processing (FREITAS et al., 2015; XU et al., 2016; BARRIUSO, ANSORENA and ASTIASARÁN, 2017).

The physical state of cholesterol also influences its oxidation. For example, the oxidation of the side chain of cholesterol only occurs when it is in a solid state (BECKWITH, 1958; BASCOUL et al., 1986; SMITH, 1987). The C-25 radical can be formed directly from cholesterol or by a radical transfer reaction, so that the formation of 25-hydroxycholesterol is strongly dependent on the physical state of the sample (MEDINA-MEZA and BARNABA, 2013). Storage conditions such as packaging, temperature, and time directly influence the formation of COPs. Room temperature, light, and the presence of oxygen are critical factors in these degradation processes (OTAEGUI-ARRAZOLA et al., 2010).

Most foods are submitted to various processes that expose cholesterol molecules to factors favorable to oxidation. This increases cholesterol oxide contents in foods and the consequent consumption of exogenous COPs, representing a public health problem due to their deleterious effects on human health.

### **3 EFFECTS OF INGESTION OF OXIDIZED CHOLESTEROL ON HEALTH**

Cholesterol oxides, originating from the endogenous oxidation of cholesterol, exert important biological activities essential to the human body. They are intermediates in cholesterol catabolism, mainly in the synthesis of bile acids, and are involved in the elimination of excess cholesterol from the body (BJORKHEM, 2013). They also act as cellular permeability modulators (KULIG et al., 2015), cholesterol homeostasis regulators, lipoprotein oxidation markers (KULIG et al., 2016), and receptors of cells signaling (LEONARDUZZI et al., 2014; VURUSANER et al., 2014). According to Lin et al. (2013), some oxysterols may also exhibit anticancer effects, suppressing the proliferation of cancer

cells in the prostate, breast, colon, and lung. Oxysterols have been described to act on the differentiation of mesenchymal stem cells, exhibiting potent osteoinductive properties, and inhibiting adipocyte differentiation (LEVY et al., 2017).

However, when these compounds are exogenously obtained through diet, they can cause negative effects on other components and structures present in the body. The literature shows the relationship of COPs with various deleterious health effects (ALFONSO-GARCÍA et al., 2014; HUR et al., 2014; KULIG et al., 2015; KULIG et al., 2016; SERVIDDIO et al., 2016).

The presence of COPs also affects the interaction of proteins and peptides with the lipid bilayer, such as the  $\beta$ -amyloid peptides associated with Alzheimer's disease, which present a higher interaction with the lipid bilayer when in the presence of cholesterol oxides (PHAN et al., 2013). Other neurodegenerative diseases, such as Parkinson's and Huntington's, may be associated with the intake of cholesterol oxidation products. Changes in plasma levels of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol were detected in patients with Huntington's disease (LEONI and CACCIA, 2015).

In addition to the deleterious effects cited, COPs also have mutagenic and genotoxic potential. Based on data from cell culture studies using animal and human models, evidence has been found that various organs such as the brain, eyes, heart, colon, pancreas, liver, and prostate can be adversely affected by COPs (ALFONSO-GARCÍA et al., 2014). Moreover, COPs are associated with the development of colon, breast, prostate, skin, and lung cancers, among others (ZARROUK et al., 2014; THANAN et al., 2014; MARWARHA et al., 2017). Also the estrogen receptor modulator 27-hydroxycholesterol has been found to stimulate tumor cell growth in breast cancer (JAVITT, 2015).

Atherosclerosis is one of the major events involved in the deleterious effects of COPs on the human body. It is characterized by the accumulation of cholesterol in macrophages in artery walls, leading to the subsequent formation of atherosclerotic plaques, which gradually contribute to the development of various cardiovascular diseases. The major COPs found in atherosclerotic lesions are 27-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol, followed by  $7\alpha$ - and  $7\beta$ -hydroxycholesterol (KHATIB and VAYA, 2014).

The presence of COPs has also been associated with the development of type 2 diabetes (SOTTERO et al., 2015), sensorineural loss of hearing (MALGRANGE et al., 2015), chronic processes of gallbladder inflammation, renal problems (KULIG et al., 2016), ocular diseases (RODRIGUEZ et al., 2014; GAMBERT et al., 2017), and osteoporosis (SATO et al., 2017).

Oxidation during the processing of animal source foods may cause a loss of food quality and the formation of undesirable compounds. These exogenous COPs are harmful to the human organism (HUR, PARK and JOO, 2007; MEDINA-MEZA and BARNABA, 2013). Consequently, various studies have been carried out to add natural antioxidants in food as a strategy to prevent oxidation during processing and storage and, thus, reduce the intake of oxidized cholesterol or COPs (BRINKERHOFF et al., 2002; BOSELLI et al., 2004; WOJDYŁO et al., 2005; LEE, CHIEN and CHEN, 2008; SAMPAIO et al., 2012; BARRIUSO et al., 2015; FIGUEIRÊDO et al., 2015; BARRIUSO et al., 2016; BIERZUŃSKA et al., 2017).

## 4 ANTIOXIDANTS

Antioxidants are compounds that inhibit or retard oxidation reactions by different mechanisms. They vary according to their chemical structure and can be classified into

synthetic or natural (DE and CHATTERJEE, 2015; EMBUSCADO, 2015).

Synthetic antioxidants are widely used in the food industry. The most commonly used synthetic antioxidants are butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluene (BHT), propyl gallate (PG), and *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) (TAHERI et al., 2014; MI, GUO and LI, 2016). However, due to the potential toxic and carcinogenic effects and possible health damages caused by the ingestion of synthetic compounds (ESKANDANI, HAMISHEHKAR and DOLATABADI, 2014; DE and CHATTERJEE, 2015) there is a noticeable tendency for the substitution of these compounds for natural ones (BARRIUSO et al., 2015; DE and CHATTERJEE, 2015; KUMAR et al., 2015; MI, GUO and LI, 2016).

Adverse effects have been reported with the use of TBHQ, indicating the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine in the calf thymus DNA due to its interaction with TBHQ (NAGAI et al., 1996). Other research demonstrated that high doses of TBHQ could lead to such as precursors to stomach tumors and damage to DNA (OKUBO et al., 2003). Moreover, Kashanian and Dolatabadi (2009) reported that TBHQ was able to be intercalated in the DNA base pairs, where TBHQ binds to CT-DNA, and causing possible damage. Also, these authors strongly recommended that TBHQ should not be used as an additive in the food industry, since the TBHQ concentration used in their study was much lower ( $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ) than the concentration currently used as an additive by the food industry. Budiawan, Purwaningsih and Cahaya (2017) also found DNA binding interactions between DNA and TBHQ in various concentrations. In addition, according to Eskandani, Hamishehkar and Dolatabadi (2014), high levels of TBHQ can stimulate apoptosis and carcinogenesis.

The synthetic antioxidant BHA has been reported to act as a tumor initiator or a tumor promoter in some animal tissues. For example, BHA induced papilloma and carcinoma formation in the stomachs of rats, mice, and hamsters when continuously fed high concentrations. BHA also induced proliferative effects in the esophagus of pigs and primates (YU, TAN and KONG, 1997; BOTTERWECK et al., 2000). Furthermore, *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) is the major metabolite of BHA, which is considered carcinogenic (NAGAI et al., 1996). Other studies have provided quantitative data to estimate the progress of BHA-ctDNA interaction. The binding mode of BHA with ctDNA has been proved to be an intercalation, thus demonstrating the toxicological effects of BHA as a food additive (WANG et al., 2014).

The main side effect of PG is its bitter taste and consequently its use is restricted in some foods. PG induces single strand breaks in the presence of Cu (II) (JACOBI, EICKE and WITTE, 1997). However Kobayashi et al. (2003) reported that PG induced no or little DNA damage in the presence of metal ions. PG may be converted to gallic acid which is known to induce DNA damage in the presence of metal ions such as iron and copper.

Based on the results in all these reports a thorough analysis on the widespread use of synthetic antioxidants in the food industry should be made. In general, natural products appear to be healthier and safer than synthetic antioxidants. In addition to adding characteristic flavors to foods the use of aromatic herbs, spices, and natural extracts also provide nutrients. Moreover, studies have shown their protective effect as natural antioxidants on lipid oxidation, increasing the shelf-life of foods without causing any adverse effects (KUMAR et al., 2015; RAEISI et al., 2016). Natural antioxidants incorporated in foods are effectively assimilated by the organism (EMBUSCADO, 2015; CALEJA et al., 2017) and present potential nutritional value and therapeutic properties providing extra health benefits (CALEJA et al., 2017).

However, the action of the antioxidant also depends on the molecular structure of the compound, and it is also influenced by other factors related to the lipids involved, such as lipid nature, hydrophilic-lipophilic balance of the antioxidant, and interfacial interactions. Antioxidants that are effective in one system may not be applicable in another. Thus,



comparative studies are required among different compounds in order to determine the best antioxidant for each specific system (VAISALI, BELUR and REGUPATHI, 2016).

#### **4.1 Natural Antioxidants**

The plant kingdom represents the major source of natural antioxidants characterized by pigments or products of secondary metabolism of plants, usually derived from defense reactions against environmental aggressions (OROIAN and ESCRICHE, 2015). These compounds are widely distributed in herbs, spices, seeds, essential oils, fruits, and vegetables (KUMAR et al., 2015).

The antioxidants found in natural extracts are represented by a heterogeneous category of molecules, and their antioxidative effectiveness is directly related to the chemical and physical characteristics of these compounds, such as size, number of charges, and degree of hydroxylation and methylation, which differ in quantity and nature depending on the specific source (TUBEROSO et al., 2013; GARCÍA-CASAL, et al., 2016; JIANG and XIONG, 2016).

Natural extracts often contain high concentrations of phenolic compounds that have strong H• donating activity or have high radical-absorbance capacity. The major phenolic constituents are phenolic acids (gallic, caffeic, and rosmarinic acids), phenolic diterpenes (carnosol and carnosic acid), flavonoids (quercetin, catechin, apigenin, kaempferol, naringenin, and hesperetin), and volatile oils (eugenol, carvacrol, thymol, and menthol) (BREWER, 2011).

Another important group of active compounds are the carotenoids. Besides these, some minerals (Se, Zn) and vitamins (vitamin A, vitamin C, and vitamin E) function as co-factors for antioxidant enzymes and are also considered natural antioxidants. In addition, natural peptides are capable of neutralizing free radicals and chelating oxidative metal ions (JIANG and XIONG, 2016).

The principal classes of natural antioxidants are discussed bellow:

##### **4.1.1 Phenolic compounds**

Phenolic compounds are among the main bioactive compounds present in products of plant origin and they are responsible for the antioxidant properties of these plants and plant products. Phenolics vary structurally from a single phenolic molecule to complexes of high-molecular-weight polymers (SHAHIDI and AMBIGAIPALAN, 2015), which have an aromatic ring with one or more hydroxyls and can also have other substituent groups in their structure, such as esters, methyl esters, and glycosides (HAN, SHEN and LOU, 2007). The presence of these chemicals characterizes several natural extracts as antioxidants due to their redox potential, which permits phenolic compounds to act as hydrogen donors, reducing agents, and oxygen and metal ion scavengers in several food matrices (VIJI et al., 2015).

The antioxidant potential of phenolic compounds depends on the number and arrangement of the hydroxyl groups in their molecules (SHAHIDI and AMBIGAIPALAN, 2015). For example, the number and location of free hydroxyl groups in the flavonoid structure define the scavenging potential of reactive radicals. Thus, polymer structures with a high number of hydroxyl groups have higher antioxidant potential (KUMAR et al., 2015). The main and most abundant groups of phenolic compounds present in plants are phenolic acids, flavonoids, lignans, and stilbenes (OROIAN and ESCRICHE, 2015).

Phenolic acids are functional components, which may represent about one-third of the total phenolic compounds present in natural extracts, and they can be divided into two major groups, hydroxybenzoic acids and hydroxycinnamic acids. These components contain at least one aromatic ring in which at least one hydrogen atom is replaced by a hydroxyl group. The substituents attached to the aromatic ring affect the stability and the radical-scavenging ability of these phenolic acids (HELENO et al., 2015). Hydroxybenzoic acids are represented by acids such as: gallic, *p*-hydroxybenzoic, protocatechuic, vanillic, syringic acid, gentisic, and salicylic acids. Among the hydroxycinnamic acids, the *p*-coumaric, ferulic, caffeic, and sinapic acids are the most common in nature (GIADA, 2013). These phenolic acids inhibit the formation of free radicals and inactivate radical species. In addition, they act as metal chelators, acting both in the initial stage and in the propagation of oxidative processes (SHAHIDI and AMBIGAIPALA, 2015).

Phenolic compounds can also be divided into some subclasses based on the variation of the heterocyclic ring C, such as flavones, flavonols, flavanones, catechins, anthocyanins, and isoflavones (ZIBERNA et al., 2014). Flavonoids have a common structure of diphenylpropane (C<sub>6</sub>O<sub>3</sub>C<sub>6</sub>), formed by two aromatic rings joined by three carbons. Their antioxidant action is conferred by the hydroxyl phenolic group attached to the phenolic ring structure, and they can act as reducing agents, hydrogen donors, singlet oxygen scavengers, superoxide radical scavengers, hydroxyl and peroxy radical scavengers, or even as a metal-chelating agent. Flavonoids also activate antioxidant enzymes and inhibit lipoxygenase and cyclooxygenases, enzymes responsible for the development of oxidative rancidity in foods (PROCHAZKOVA, BOUŠOVA and WILHELMOVA, 2011). Some of the major flavonoids identified in natural extracts are flavonols, quercetin, myricetin, kaempferol, flavanone, and naringenin (SHAHIDI and AMBIGAIPALA, 2015).

Lignans are phenolic compounds formed by the coupling of two phenylpropanoid units. They are found in high concentrations in seeds, especially in flaxseed, as well as in leaves, roots, fruits, and other structures of plants and grains (OROIAN and ESCRICHE, 2015).

Another group of phenolic compounds includes the stilbenes. Resveratrol is the most important stilbene due to its antioxidant, anticarcinogenic, and cardioprotective properties. Stilbenes are found in fruits, such as grape, spinach, and black pine, as well as certain herbs (JAGANATH and CROZIER, 2010; PIÑHEIRO et al., 2017). Several investigations into the antioxidant action of natural extracts use the total phenolic compound content as a measure. Some differences in total phenolic content for the same species of herbs or spice may be due to several factors such as climate, temperature, light, seasonal and topographic variations, and the solvent used in the extraction (ALFARO et al., 2013).

#### **4.1.2 Carotenoids**

Carotenoids are the class of pigments that most commonly occurs in nature, and they can be synthesized by animals, vegetables, and microorganisms. The most frequent structure of the carotenoids is the tetraterpenoid type C<sub>40</sub>, which is formed by the union of eight C<sub>5</sub> isoprenoid units. Due to the presence of multiple conjugated double bonds, they are highly colored and lipophilic, presenting a variety of colors from yellow to strong red (OROIAN and ESCRICHE, 2015).

The antioxidant properties of these compounds depend on their chemical structure, especially the system of conjugated double bonds of the polyene chain, which makes the uptake of radicals possible. The antioxidant activity increases with an increasing number of

conjugated double bonds, ketone groups, and the presence of cyclopentane rings in their structure (LI et al., 2014).

Carotenoids are effective scavengers of singlet oxygen and radicals (BÖHM, EDGE and TRUSCOTT, 2012). The main antioxidant property of carotenoids is due to their singlet oxygen-chelating activity, which results in excited carotenoids that dissipate the energy acquired by a series of rotational and vibrational interactions with a solvent, returning to the non-excited state and allowing the scavenging of other radical species (CAROCHO and FERREIRA, 2013). Lycopene, which is abundant in tomatoes, has a singlet-oxygen-scavenging ability as high as that of  $\beta$ -carotene and ten times that of  $\alpha$ -tocopherol (LEE et al., 2017).

The reactions of carotenoids with radicals are more complex and depend mainly on the nature of the radical, in a mechanism involving the transfer of electrons and hydrogen abstraction (BÖHM, EDGE and TRUSCOTT, 2012). Carotenoids can be divided into two major groups: hydrocarbon carotenoids, which are known as carotenes and include lycopene and  $\beta$ -carotene, and oxygenated derivatives, known as xanthophylls, such as lutein (OROIAN and ESCRICHE, 2015).

#### **4.1.3 Tocopherols**

The tocopherol family is composed of eight monophenolic isoforms, with four tocopherols ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -tocopherol) and four tocotrienols ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -tocotrienol). The most potent and abundant isoform in biological systems is vitamin E or the  $\alpha$ -tocopherol (LI et al., 2014).

Tocopherols consist of a 6-chromanol group and an apolar aliphatic chain, so that the prefix used in the nomenclature depends on the number and position of the methyl groups attached to the chromanol aromatic rings. Tocotrienols differ from tocopherols due to the presence of an unsaturated side chain (SEPPANEN, SONG and CSALLANY, 2010). Tocopherols are present mainly in seed oils, leaves, and other green parts of plants. Tocotrienols are found in the bran and germ of wheat, seeds, and cereals (SHAHIDI and AMBIGAIPALAN, 2015).

The  $\alpha$ -tocopherol mechanism of action is the donation of the phenolic hydrogen atom to the peroxy radical, which is converted to hydroperoxide. The tocopherol radical produced is stable and unable to continue the peroxidation cycle. Thus, it reacts with another peroxy radical to form a non-radical product. In addition, they act as singlet oxygen scavengers and can act alone or in synergy with ascorbic acid, regenerating it (LI et al., 2014).

#### **4.1.4 Ascorbic Acid**

Ascorbic acid is the main biologically active form of vitamin C. It has several biological functions and plays an important role as an antioxidant in foods (CAROCHO and FERREIRA, 2013). Vitamin C is recognized as the most important hydrophilic antioxidant, acting in the sequestration of radical superoxide anions, hydroxyl radicals, hydrogen peroxides, reactive nitrogen species, and singlet oxygen, and it has in its structure four hydroxyl groups capable of donating hydrogen (BREWER, 2011).

Due to the acidic nature of ascorbic acid, the ascorbate anion is the predominant form at pH 7 and is oxidized irreversibly, resulting in the formation of dehydroascorbic acid and an

ascorbyl radical, which are both relatively non-reactive, although they can react with other radicals inhibiting the propagation of oxidative processes (OROIAN and ESCRICHE, 2015). Although ascorbic acid does not directly sequester lipophilic radicals, this compound has a synergistic effect when combined with tocopherols in the removal of lipid peroxide radicals (CAROCHO and FERREIRA, 2013).

## 5 USE OF NATURAL ANTIOXIDANTS IN THE PREVENTION OF CHOLESTEROL OXIDATION IN FOODS

### 5.1 Fish and fish products

Fish are noted for their high levels of polyunsaturated fatty acids of the omega-3 series, such as eicosapentaenoic acids (EPA, C20: 5) and docosahexaenoic acids (DHA, C22: 6), which are compounds directly related to health benefits (RAATZ et al., 2013; ZHENG et al., 2013; CALDER, 2015; HAIMEUR et al., 2016). However, the lipid fraction of fish, which is composed mainly of PUFAs and with high levels of cholesterol, is particularly susceptible to oxidation processes when exposed to favorable factors during processing and storage (SALDANHA, BENASSI and BRAGAGNOLO, 2008; DANTAS et al., 2015; FREITAS et al., 2015; MESÍAS et al., 2015). In addition, the presence of pigments, such as myoglobin and hemoglobin, and traces of metal ions in fish makes it more susceptible to oxidation. Hemoglobin is one of the most potent pro-oxidants in these foods and may act as an activated oxygen source due to its auto-oxidation (MAQSOOD et al., 2014).

When fish are in the *post-mortem* state and subjected to processing and storage for a long period of time, their endogenous antioxidants are consumed sequentially (NOLLET and TOLDRÁ, 2010), requiring the addition of exogenous antioxidants in order to minimize the oxidative reactions and formation of COPs, compounds deleterious to health when ingested in food.

Li et al. (1996) evaluated the influence of tocopherols on the oxidation of cholesterol in fish and concluded that the formation of cholesterol oxides in thermally processed foods and during storage can be prevented by the addition of vitamin E or some natural form of tocopherols. Shozen et al. (1997) studied the effects of added BHA and tocopherols on the oxidation of cholesterol during processing and subsequent storage of boiled and dried anchovies. BHA showed better results than tocopherols. The levels of 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol, 7-ketocholesterol, and cholesterol-5,6- $\alpha$ - and  $\beta$ -epoxides in the sample with BHA were lower, protecting almost 50% of the formation of these oxides.

According to Akhtar et al. (1998), a dietary  $\alpha$ -tocopherol supplementation and surface application of rosemary oleoresin on rainbow trout can reduce the formation of COPs. The concentrations of total COPs in fish fed the  $\alpha$ -tocopheryl acetate-supplemented diets increased from the initial range of 0.49-0.94 to 1.03-2.17  $\mu$ g/g after two days of storage, but an application of rosemary oleoresin showed better results.

The formation of cholesterol oxides in frozen horse mackerel (*Trachurus trachurus*) was studied by Lebovics et al. (2009). The fish were previously treated with an aqueous solution of a mixture of plant extracts with antioxidant characteristics such as hyssop (*Hysoppus officinalis*), prunella (*Prunella vulgaris*), lemon balm (*Melissa officinalis*), and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and stored at a temperature of -20 °C for 12 months. During the experiment, analyses revealed the formation and an increase in the concentration of 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol, 7 $\beta$ -hydroxycholesterol, and 7-ketocholesterol during the storage

period. However, the data obtained showed that the formation of 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol was reduced in the samples pre-treated with the solution containing the antioxidant extracts, which caused a partial inhibition in cholesterol degradation.

Hernandez-Becerra et al. (2014) monitored the formation of cholesterol oxidation products and the changes in the content of astaxanthin, a carotenoid responsible for the characteristic color of shrimps, in samples of salt-dried and sun-dried shrimp during the cooking processes and storage. This carotenoid has a high antioxidant potential, however the authors verified a high formation of COPs during the processing and storage stages. Thus, the authors concluded that the process conditions led to astaxanthin degradation, thereby reducing its activity as an antioxidant. After 90 days of storage at room temperature and in polypropylene boxes, the authors observed an 83% degradation of astaxanthin and the total concentration of COPs was approximately 886.6  $\mu\text{g/g}$  lipid, while the total COPs concentration in the raw sample was only 38.9  $\mu\text{g/g}$  lipid.

According to Figuêiredo et al. (2015), seeds of annatto and bixin, the main carotenoid present in annatto seeds, were able to retard the oxidation of cholesterol in samples of minced herring (*Clupea harengus*) and minced mackerel (*Scomber scombrus*) processed under high pressure during storage at 5 °C for 14 days. The total content of COPs in the control samples of mackerel was 28.55  $\mu\text{g/g}$  fish. In the samples with annatto and bixin, the COPs contents were 12.04  $\mu\text{g/g}$  and 12.85  $\mu\text{g/g}$  lipids, respectively.

Annatto was also studied by Sancho et al. (2011). The spice was assessed against cholesterol oxidation alone and in combination with coriander in white hake meatballs cooked in boiling water for 30 min and stored at -18 °C for 120 days. However, the thermal treatment did not significantly influence the formation of COPs, and the spices did not exert any protective effect (SANCHO et al., 2011).

De and Chatterjee (2015) studied the addition of fennel seeds (*Foeniculum vulgare*), black-pepper (*Piper nigrum*), and cinnamon (*Cinnamomum verum*) with samples of tilapia, stored for five weeks under refrigeration. The samples with the spices had a higher total cholesterol concentration than the control sample, without the addition of spices, confirming the effectiveness of these natural extracts to control cholesterol oxidation. The three spices all contributed, however, only cinnamon was stable as an antioxidant through to the end of the experiment, while the fennel and black-pepper seeds lost their efficacy after nearly 25 days.

In a study carried out by Tarvainen et al. (2016), the effect of three different extracts was investigated: rosemary leaf extract, oregano leaf extract, and a mixture of extracts of 7 herbs (turmeric, oregano, hops, cloves, sage, ajowan, and licorice), against oxidation of cholesterol in Atlantic salmon fillets during thermal preparation (180 °C for 20 minutes) and storage at 4 °C. The total COPs determined in the control samples after the heat treatment was 14  $\mu\text{g/g}$  lipid, with lower values in all the samples containing the natural extracts (<1  $\mu\text{g/g}$  lipid) after processing, confirming the potential of these natural antioxidants in retarding the thermo-oxidation of cholesterol. In addition, the samples treated with the natural extracts presented similar COP levels after the heat treatment and after 7 days of storage, except for samples containing rosemary and oregano.

Ferreira et al. (2017) studied the effects of fresh herbs (parsley, chives, and *Brazilian cheiro-verde*) as natural antioxidants in air-fried sardine samples. The authors observed that air-frying significantly decreased the content of essential PUFAs, and increased the levels of COPs from 61.2 (raw) to 283  $\mu\text{g/g}$  in the control sample. However, the use of herbs as natural antioxidants (2 and 4%) proved to be effective in reducing the COP levels in most samples. The addition of 4% of *cheiro-verde* in the air-fried sardines presented the best protective effect against lipid oxidation.

## 5.2 Meat and meat products

Meat is a source of protein, minerals, vitamins, and other micronutrients (BIESALSKI, 2005; JIANG and XIONG, 2016). Fresh meat usually contains only trace amounts of COPs (EDER et al., 2005). However, the temperature and time required for the preparation of these foods, as well as industrial processes such as triturating and mincing, storage conditions, the deficiency of endogenous antioxidants, and the high concentration of pro-oxidants, such as salt and heme and non-heme iron, significantly affect the lipid fraction due to the oxidative processes (KANNER, 1994; SOUZA and SILVA, 2006; HUR, PARK and JOO, 2007; ORCZEWSKA-DUDEK et al., 2012; KARRE, LOPEZ and GETYY, 2013; FALOWO, FAYEMI and MUCHENJE, 2014; JIANG and XIONG, 2016; SABOLOVÁ et al., 2017).

Various research projects involving the addition of natural antioxidants in meat and meat products have been carried out in order to evaluate the reduction in cholesterol oxidation that can be achieved (KIM, GODBER and PRINAYWIWATKUL, 2000; OSADA et al., 2000; MARIUTTI, NOGUEIRA e BRAGAGNOLO, 2011; PRICE et al., 2013; WONG and WANG, 2013; KOBUS-CISOWSKA et al., 2014; MI, GUO and LI, 2016).

The resistance to oxidative degradation was tested in restructured beef roasts. Beef roasts containing rice fiber and rice-bran oil had higher oxidative stability during storage at 4 °C than beef roasts without additives. The 7-ketocholesterol content of beef roasts with the antioxidants was lower. The authors found values of 8.02 µg/g, 2.24 µg/g and 1.91 µg/g for the control, the samples with added rice fiber and the rice-bran oil, respectively (KIM, GODBER and PRINAYWIWATKUL, 2000). In another study, Kim et al. (2003) evaluated the effectiveness of  $\gamma$ -oryzanol as a potential natural antioxidant for precooked beef stored at refrigeration temperatures. The results showed that 100 ppm of  $\gamma$ -oryzanol was a more effective inhibitor against the formation of 7-ketocholesterol during storage than 100 ppm of  $\alpha$ -tocopherol.

Osada et al. (2000) studied sausages produced with or without varying levels of sodium nitrite and apple polyphenol and stored in the refrigerator for 15 days. This study demonstrated that the addition of apple polyphenol may inhibit linoleic acid oxidation in sausages as well as suppress cholesterol oxidation through its radical-scavenging effects. According to the authors, apple polyphenol, which has a large amount of catechin oligomer, may interfere with cholesterol oxidation through its antioxidative action and thus be useful as an antioxidant for meat products.

A study by Flaczyk et al. (2006) showed that enzymatic and acid hydrolysates can be used as a natural antioxidant in pork meatballs. After 7 days of storage at 2 °C, inhibition of formation of the COPs in samples with added crackling hydrolysates was 29–54%. The results showed that the enzymatic hydrolysate had a stronger inhibition activity against the formation of COPs than the acid hydrolysates and BHT.

According to Rudzinska et al. (2007), acid and enzymatic protein hydrolysates prepared from pork cracklings reduced the levels of oxysterols in frozen pork meatballs after 360 days of storage by 20%. Marinated pork was treated with vitamin C and vitamin E. With 0.02% vitamin C, only 7-ketocholesterol was reduced significantly with a loss of 72 µg/g, compared to the control treatment. In the marinated pork with 0.02% vitamin E, all the COPs showed a decline with 25-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol being inhibited the most (LEE, CHIEN and CHEN, 2008).

Lyophilized water extracts of borage (*Borago officinalis* L.) leaves can be used as a good source of natural antioxidants to control the lipid oxidation process in functional dry-fermented sausages enriched with  $\omega$ 3. The lyophilized extract (340 ppm) showed an antioxidant capacity equivalent to 200 ppm of a BHA and BHT mixture. However, the COPs

did not show any significant differences between products with the different antioxidants and the sensory analysis showed that the extracts did not affect the sensory properties of the products (CIRIANO et al., 2009).

Garlic and onion, which are commonly added to meat dishes, were compared for their antioxidant effects against the formation of 7-ketocholesterol and 7-hydroxycholesterol in pork dishes. Both additions caused a decrease in the concentration of these COPs in all the dishes investigated. The addition of onion decreased the concentration of 7-ketocholesterol from 204.49 to 92.05  $\mu\text{g/g}$  in cooked meat, and the addition of garlic dropped the COPs contents from 204.49 to 127.25  $\mu\text{g/g}$  (JANOSZKA, 2010). Rodríguez-Carpena et al. (2012) concluded that phenolic-rich extracts from avocado peel can be used as natural antioxidant against the formation of COPs in porcine patties subjected to cooking and chill storage.

Price et al. (2013) compared the preservative effects of green tea extract, grape seed extract, and sodium ascorbate on cooked pork meatballs stored for 16 days. Among the compounds tested, the synthetic antioxidant sodium ascorbate presented a low antioxidant capacity, inhibiting 69.92% of the formation of 7 $\beta$ -hydroxycholesterol and 55.24% of 25-hydroxycholesterol. The antioxidant activity of green tea and grape seed extract inhibited the formation of all detected COPs by over 97%, except for cholestane-3b, 5 $\alpha$ ,6b-triol and 5-cholestene-3b, 25-diol (25-OHC). These results confirm the feasibility of replacing synthetic antioxidants by the natural extracts discussed in this work. L-ascorbic acid, retinoic acid, and  $\alpha$ -( $\pm$ )-tocopherol each at a concentration of 0.4 mmol in 30 g of beef can inhibit 30–50% of 7-ketocholesterol formation and about 20% of 7 $\alpha$ - and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol formation (WONG and WANG, 2013).

The antioxidant effect of annatto powder and sodium erythorbate against lipid oxidation in pork loin patties was evaluated by Figueirêdo et al. (2014). The meat was stored in the dark for a period of 120 days at -18°C. Throughout the storage no COPs were detected in raw and grilled samples with the antioxidant added; however, in the samples without the addition of antioxidant the authors verified cholesterol oxidation from 60 days of storage in the raw and grilled samples, highlighting 7-ketocholesterol, 7 $\alpha$ - and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol, and 5,6 $\alpha$ - and 5,6 $\beta$ -epoxides.

Extracts of ginkgo tree leaves showed stabilizing effects on both lipid and cholesterol oxidation processes in pork meatballs over 21 days of refrigerated storage (KOBUS-CISOWSKA et al., 2014). The levels of cholesterol oxidation products in meatballs increased with storage time; however, the addition of antioxidants slowed down the process. The dominant oxysterols in the samples were 7 $\beta$ - and 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol. The levels of COPs in the control samples were 3.80 mg/100g lipid, the samples with natural antioxidants had a content of 0.92 and 1.28 mg/100g lipid, respectively. BHT also had an inhibitory effect against lipid oxidation. However, the level of COPs in the sample with BHT amounted to about 1.97 mg/100 g lipid, higher than those detected in samples with the natural extracts.

Mustard seed was used as a natural antioxidant in fresh and stored cooked pork products. The results showed that a low amount (0.5%) of mustard seed was effective in inhibiting the formation of COPs, especially in the case of 7-ketocholesterol and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol. In the control sample without the addition of mustard, a total COP content of 6.77  $\mu\text{g}/100\text{g}$  of product was found after 12 days of chill storage. In the samples with the addition of mustard seeds, 7.53  $\mu\text{g}/100\text{g}$  product and 5.14  $\mu\text{g}/100\text{g}$  product were found in the samples with the addition of 0.2% and 0.5% mustard seed, respectively. Moreover, the sensory evaluation indicated that mustard seed at 0.2 and 0.5% had positive effects on the sensory qualities of the pork products (KARWOWSKA and DOLATOWSKI, 2014).

The effect of an extract rich in phenols obtained from olive vegetation water (an

agricultural by-product) on the lipid oxidation of raw and cooked fresh pork sausages prepared without chemical additives was evaluated before and after aerobic storage at 2 °C for 14 days. The most abundant COP was 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol, followed by 7-ketocholesterol and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol. The addition of the extract (0.075 and 0.15 g/10g) resulted in a decrease in the COPs. The COP levels were 4- and 17-fold lower in raw and cooked sausages, respectively. The cooked control samples exhibited 106.77  $\mu$ g COPs/g of fat after 14 days of storage, against 6.12  $\mu$ g COPs/g of fat in the samples with the addition of the natural extract (0.15 g/100g) (BALZAN et al., 2017).

### 5.3 Chicken

Lipid oxidation is a major factor in the deterioration of fat and fat-containing muscle foods, and it has negative effects on nutritional and sensory qualities. Also, lipid oxidation might be responsible for the production of toxic compounds (GHIRETTI et al., 1997). Due to the lipid composition of chicken meat, rich in cholesterol and other unsaturated lipids (SAMPAIO et al., 2012), favoring oxidation and COP formations, some authors have studied the incorporation of natural antioxidants in order to minimize the occurrence of oxidation and COPs and to increase the shelf-life of the chicken meat (LOPEZ-BOTE et al., 1998; MARIUTTI, NOGUEIRA e BRAGAGNOLO, 2011; SAMPAIO et al., 2012; SHAH, DON BOSCO and MIR, 2014).

Polak et al. (2011) evaluated the addition of coenzyme Q10 and ascorbic acid or  $\alpha$ -tocopherol, either alone or together, to prevent oxidative damage in chicken liver pâté. The samples were separated into four groups of chicken liver pâtés: no supplements (control) or were supplemented with coenzyme Q10 (0.2 g/kg) and either ascorbic acid (2 g/kg) or  $\alpha$ -tocopherol (0.2 g/kg), or both. All products were pasteurized (82 °C) or sterilized (121 °C). Four COPs were found: 7 $\alpha$ -, 7 $\beta$ -, 20 $\alpha$ -, and 25-hydroxycholesterol. The most efficient scavenger was ascorbic acid either alone or together with  $\alpha$ -tocopherol, where the formation of COPs was below the limit of detection with preservation of sensory quality.

Mariutti, Nogueira e Bragagnolo (2011) studied the effects of adding sage and garlic to chicken meat on lipid and cholesterol oxidation, having as pro-oxidant factors the addition of salt, thermal treatment, and frozen storage. Cooking and storage resulted in an increase of total cholesterol oxides. Sage was effective in controlling lipid and cholesterol oxidation; however, garlic had a poor effect as an antioxidant. The amount of 7-ketocholesterol formed in the grilled samples with salt, but without antioxidants, was 40.39  $\mu$ g/g meat (dry basis), whereas the samples with antioxidants added had a lower content of 15.49  $\mu$ g/g meat and 37.54  $\mu$ g/g meat with the addition of sage and garlic, respectively

The effects of colorific (0.4 g/100g) to minced chicken meat on lipid oxidation and degradation of bixin and vitamin E was investigated in raw and grilled patties during storage at -18° C for 120 days. According to the authors the addition of colorific (0.4 g/100g) to minced chicken meat is an alternative for minimizing lipid oxidation during storage of grilled patties at -18 °C for 120 days; however, no effect was observed in the raw patties. The authors observed the antioxidant mechanism that suggested that vitamin E acted along with bixin to protect the unsaturated lipids from oxidation (CASTRO, MARIUTTI and BRAGAGNOLO, 2011).

The effects of the addition of sage, oregano, and honey on lipid oxidation in cooked chicken meat (breast and thigh) during refrigeration at 4 °C for 96 h was evaluated. Quantitative measurements of thiobarbituric acid-reactive substances, conjugated dienes, hexanal, fatty acids, cholesterol, and cholesterol oxides were used as indicators of lipid



oxidation. Acceptability and preference were also evaluated. The authors confirmed the antioxidative effect of oregano, sage, and honey when added prior to processing. These ingredients increased the shelf-life of cooked chicken meat after 96 h of refrigeration at 4 °C, inhibiting the formation of cholesterol oxides and exhibiting good sensory acceptability (SAMPAIO et al., 2012).

## 5.4 Eggs

Eggs are considered to be of great importance for human consumption because they have a high biological value due to their protein contents; they are also a source of polyunsaturated fatty acids of the omega 6 series and of the omega 3 series, especially linoleic and arachidonic acids. However, eggs are also one of the main sources of dietary cholesterol (LERCKER and RODRIGUEZ-ESTRADA, 2000; BOSELLI et al., 2004; HUR, PARK and JOO, 2007; ORCZEWSKA-DUDEK et al., 2012).

Eggs are usually consumed after processes such as frying and cooking and can also be processed and then used as ingredients in several widely consumed food products such as biscuits, cakes, pasta, among others (BOSELLI et al., 2004; ABREU et al., 2017). One of the most common industrial processes in eggs is drying. Several industrialized products use egg powder due to ease of handling and transportation, and especially because of the longer shelf-life (BERGQUIST, 1995; BRINKERHOFF, et al., 2002; ABREU et al., 2017). However, the high temperatures used in the process of powder-egg production by spray-dryer accelerate the reactions between the lipids present in surrounding and molecular oxygen, resulting in the loss of nutritional and sensory properties, as well as the formation of cholesterol oxides (MORGAN and ARMSTRONG, 1992; GUARDIOLA et al., 1995; LAI et al., 1996; CABONI et al., 2005; MEYNIER et al. 2014).

Another important factor in the formation of COPs in eggs and egg products is the storage time of these foods (GUARDIOLA et al., 1997; DU and AHN, 2000; OBARA, OBIEDZINSKI and KOLCZAK, 2006). The level of COPs also depends on the chemical composition of egg yolk and storage conditions of the final product (ORCZEWSKA-DUDEK et al., 2012). Considering the impact of the processing used and the consequent alterations and COPs formation resulting from lipid oxidation, it is necessary to use antioxidants in order to minimize the loss in the quality of this food. Although eggs exhibit natural antioxidants in their composition, compounds such as tocopherols are drastically degraded during heat treatment and inadequate storage conditions (GALOBART et al., 2001; CABONI et al., 2005).

Huber, Pike and Huber (1995) demonstrated the effective antioxidant activity of BHA, ascorbyl palmitate (0.023%), and a tocopherol blend on inhibiting cholesterol oxidation during accelerated ( $\text{CU}^{+2}$ , heat) storage of spray-dried egg yolk. COP levels generally increased during storage with 7-ketocholesterol being predominant. However, the significant antioxidant effects were manifest in a decrease of 7-ketocholesterol, and  $7\alpha$ - and  $7\beta$  hydroxycholesterol contents. All antioxidants showed significant inhibitive effects; however, tocopherols were the most effective relative to the control samples.

The inhibitory effect of antioxidants against cholesterol oxidation during storage of spray-dried egg yolk was evaluated by Brinkerhoff et al. (2002). Equimolar amounts of BHA and a mixture of tocopherols (60 to 65% of  $\delta$ -tocopherol, 15 to 20% of  $\gamma$ -tocopherol, and 15 to 20% of  $\alpha$ -isomers) were added to liquid yolks subsequently submitted to the spray-drier process, resulting in levels of 0.01 and 0.023% (w/w), respectively, based on total yolk lipid. After 3 years of storage at room temperature, it was possible to observe the inhibitory

action of antioxidants against the formation of 7-ketocholesterol, obtaining values of 118 ppm for the control samples (without antioxidant addition), 101 ppm for the samples with the synthetic antioxidant and 100 ppm for the samples with the mixture of tocopherols. However, no significant differences were observed in the formation of 7 $\alpha$ - and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol, cholestane-triol, cholesterol-5,6-epoxide, and 25-hydroxycholesterol.

Boselli et al. (2004) studied the oxidation of cholesterol in commercial samples of mass-produced egg pasta, comparing the results obtained in these products with home-made egg pasta produced with fresh hen eggs and spray-dried eggs. Commercial samples showed a content of 2.2  $\mu\text{g}$  of COPs/g of pasta. The home-made pastas showed contents of 1.7, 3.5 and 3.6  $\mu\text{g/g}$  of pasta, for the pastas prepared with organic eggs, fresh commercial eggs, and spray-dried eggs, respectively. The lowest COPs content was found in the domestic samples prepared with organic eggs, indicating the influence of the hens feeding on vegetables rich in natural antioxidant compounds.

The effect of processing and storage on spray-dried whole egg was evaluated by Caboni et al. (2005). Commercially obtained samples were stored at room temperature and at 4 °C in the dark for 1, 3, 6, and 12 months. At 4 °C no significant change in the concentration of cholesterol oxides was observed; however, storage at 20 °C resulted in an increase in the total content of COPs over time, showing a content of 54.7  $\mu\text{g/g}$  lipid and 167  $\mu\text{g/g}$  lipid right before the storage and after 12 months, respectively. Changes in  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol contents were also observed during storage; at 20 °C a reduction of 14% in the content of these natural antioxidants was recorded after 12 months of storage however; no significant change occurred at 4 °C. Thus, it is possible to correlate the loss of natural antioxidants such as tocopherols with the increase of cholesterol oxidation.

Vitamin C, vitamin E, and BHA were incorporated as antioxidants in marinated eggs. Vitamin E (0.02%) was less effective in inhibiting cholesterol oxidation than vitamin C (0.02%), as evidenced by a larger amount of total COPs generated using the former (4563  $\mu\text{g/g}$ ) than the later (2891  $\mu\text{g/g}$ ). For the total COPs, the inhibition effect of cholesterol oxidation increased with increasing concentrations of vitamin C and BHA. In contrast, a low level of vitamin E showed a better antioxidant activity than a high level, which may act as a pro-oxidant (LEE, CHIEN and CHEN, 2008).

Chen et al. (2010) studied eggs in marinated juice and its relation with the formation and inhibition of COPs as affected by heating time and various ingredients. A total of five COPs including 7-ketocholesterol, 5,6  $\beta$ -epoxycholesterol, 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol, 7 $\beta$ -hydroxycholesterol, and triol, were formed in tea-leaf eggs during marinating, but not in marinated juice. A total of COPs 227.2  $\mu\text{g/g}$  was formed in tea-leaf eggs after 24 h of heating, but reduced to 106.8  $\mu\text{g/g}$  after 48 h. The incorporation of soy sauce or black tea leaf into juice was effective in inhibiting COPs formation in tea-leaf eggs. According to the authors, the presence of total phenolics and total flavonoids in black tea leaf was mainly responsible for the COPs reduction in tea-leaf eggs.

Malagueta pepper (*Aframomum danielli*) antioxidant extract was applied in the control of cholesterol oxidation in mayonnaise. The results showed, on the 60th day of storage, that malagueta pepper antioxidant extracts were better than the synthetic antioxidant extracts with BHA to control cholesterol oxidation in mayonnaise (ETTI, ADEGOKE and ETTI, 2012).

Ren et al. (2013) studied the stability of n-3 PUFA-enriched eggs fortified with antioxidants (vitamin E or organic selenium [Sel-Plex] or both) and subsequent cooking and storage. Cholesterol oxidation was significantly affected by the different cooking methods. Fried eggs contained higher levels of cholesterol oxidation products (COPs), at 13.58  $\mu\text{g/g}$ ; compared to boiled (10.15  $\mu\text{g/kg}$ ) and raw eggs (9.03  $\mu\text{g/kg}$ ), respectively. Supplementation of antioxidants reduced the formation of COPs by 12% in fried eggs. However, the content of COPs was not affected by storage. This research indicated that the n-3 PUFA in enriched eggs

was relatively stable during storage and home cooking in the presence of antioxidants.

According to Matumoto-Pintro et al. (2017) natural antioxidants such as catechin, tocopherol and lycopene can exhibit protective effect against lipid oxidation in egg powders during storage at different temperatures. The results showed that natural compounds can be used in egg powder instead of synthetic compounds to reduce lipid oxidation during storage.

## 5.5 Milk and dairy products

Milk is an important food in human nutrition. Milk and dairy products may be consumed as such or used in the preparation of many other types of food such as pastries, pies, cakes, and others. The milk lipid fraction is composed of several fatty acids and cholesterol, which may undergo chemical and physical changes during processing and storage (RAMALHO, CASAL and OLIVEIRA, 2011)

Cholesterol oxidation products can also be found in dairy products. The probability of COPs forming in fresh milk or fresh dairy products is very low, however a higher concentration of COPs can be found in processed dairy products exposed to harsh storage conditions where the impacts of oxygen, light, low water activity, and heat are possible (SIEBER, 2005). The resistance in fresh milk and dairy products is probably due the low level of polyunsaturated fatty acids, pro-oxidant trace elements such as iron and copper, and modest cholesterol levels (ADDIS and PARK, 1992).

Milk contains approximately 12 mg cholesterol/100 g (WALTE, 1994), however the cholesterol content in milk samples may vary due to the influence of various factors, such as: milk processing, differences in the breeds, and individual characteristics of the animals, milking intervals, lactation phase, composition of feed, as well as seasonal and climatic interferences (BAUER et al., 2014).

Due to a loss of nutritional, sensory and quality aspects caused by the processes usually applied to dairy products, natural antioxidants from plants have been incorporated into these foods in order to minimize losses and improve quality (BERTOLINO et al., 2015; ALENISAN et al., 2017; BARKALLAH et al., 2017; COMUNIAN et al., 2017; MAHAJAN, BHAT and KUMAR, 2017; VITAL et al., 2017).

Wojdyło et al. (2005) evaluated the effects of natural polyphenolic antioxidants isolated from the roots of skullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi) and procyanidins extracted from the bark of hawthorn (*Crataegus oxyacantha*) on butter during storage for 28 days at a temperature of 4 °C and 30 °C in darkness as well as at 50 °C with light. The initial level of cholesterol in the butter was 77.31 mg/100g. During storage, qualitative and quantitative changes of cholesterol were recorded. The greatest degradation of cholesterol was observed after 28 days of storage in the samples treated with 50 °C and light. The results demonstrated the inhibitory action of the polyphenols used compared with the control samples, without the addition of any natural antioxidants, where the cholesterol was totally degraded when exposed to light. Samples containing flavones from *Scutellaria baicalensis* Georgi also showed a significant reduction in cholesterol degradation.

Bierzuńska et al. (2017) found that the health-promoting value of fresh white cheese made from buttermilk can be increased by adding whey protein concentrate, especially because of the antioxidant effect of whey protein concentrate. The COPs content in fresh white cheese made from buttermilk with the whey concentrate was, after 30 days of storage at 4 °C, 4.7-fold lower than in the control cheese; the initial cholesterol contents were similar in both samples (white cheese with and without the whey protein concentrate). Compounds such as 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol, 5,6 $\alpha$ -epoxycholesterol, 25-hydroxycholesterol, and 7-

ketocholesterol were detected only in the samples without the addition of the whey protein concentrate, even under the same conditions.

The effects of rosemary extract as a natural antioxidant in cow milk ghee during deep-frying were investigated by Rahila et al. (2017). Ghee samples did not show any COPs at the beginning of frying, but after 45 minutes the samples without the addition of antioxidants showed the presence of 5,6 $\alpha$ -epoxycholesterol and at 60 min of frying the presence of both 5,6 $\alpha$ -epoxycholesterol and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol. Ghee with 0.02% BHA was also used in this study for comparison. The results showed that BHA could be substituted by the rosemary extract, since ghee with the natural extract inhibited the oxidation of cholesterol throughout the frying process for 60 min.

## 5.6 Animal feed supplementation

In addition to the direct incorporation of antioxidants in eggs, milk, meat, and meat products, natural antioxidants can also be supplemented in animal feed leading to an increase in the content of these compounds in the animal source foods and a decrease of lipid oxidation (ZANARDI, et al., 2000; EDER et al., 2005; SHIRZADEGAN and FALAHPOUR, 2014; LERCH et al., 2015).

Li et al. (1996) studied the effects of feeding flax, sunflower, palm, and fish oils, with and without tocopherols, to laying hens on the oxidative stability of cholesterol in egg yolk powders. The results showed that increasing the intrinsic tocopherol concentration in egg yolk powder may decrease the oxidation of cholesterol during storage and heating. Lai et al. (1996) reported the effects of dietary  $\alpha$ -tocopherol supplementation on cholesterol and carotenoid stability in dried egg powders during processing and subsequent storage.

Cluskey et al. (1997) studied the influence of animal feed quality on lipid and cholesterol oxidation in stored whole milk powder. The animals were treated with a concentrate rich in vitamin E, and the results showed that the supplemented diet had a protective effect against cholesterol oxidation during whole milk powder processing, despite the fact that the animal feed quality had no significant effect on the level of COPs in fresh whole milk powders.

Oxidation of meat from broilers fed on a diet containing 500 mg/kg rosemary and sage extracts was compared to meat oxidation from broilers receiving a control diet (not enriched with antioxidants) and a diet enriched in  $\alpha$ -tocopheryl acetate (200 mg/kg). No differences were observed in the cholesterol contents between the samples, this fact allowed the authors to attribute all differences in the concentrations of cholesterol oxidation products only to differences in oxidation. The meat from broilers fed on the diets containing the spice extracts had lower total of COP concentrations (27.67 and 26.54  $\mu$ g/kg for rosemary and sage, respectively) than meat from the control group (47.04  $\mu$ g/kg) in the white muscle (LOPEZ-BOTE et al., 1998).

Maraschiello, Esteve and García (1998) studied the effect of supplementary levels of natural antioxidants, such as  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene, on chicken meat cholesterol oxidative stability. Cooking increased the oxysterol content of the meat, and levels as high as 5  $\mu$ g/g in muscle tissue were observed. The meat from the chickens fed the olive oil-based diet containing  $\alpha$ -tocopherol presented the best cholesterol oxidative stability, however, a positive effect could not be found for dietary  $\beta$ -carotene administered at levels of 15 and 50 mg/kg of diet.

Grau et al. (2001a) concluded that  $\alpha$ -tocopheryl acetate was highly effective in protecting raw and cooked chicken meat from cholesterol oxidation, contrary to acid ascorbic

supplementation. In another study, Grau et al. (2001b) also confirmed the effectiveness of  $\alpha$ -tocopheryl acetate supplementation (225 mg/kg of feed) on dark chicken meat oxidation. They also tested a dietary fat source (linseed, sunflower, and oxidized sunflower oils and beef tallow) and ascorbic acid, and they observed that there were no significant differences between the cholesterol content of meat from different fat sources supplementation.

The effect of feeding laying hens linseed oil or sunflower oil, with and without  $\alpha$ -tocopheryl acetate and/or canthaxanthin, was evaluated on cholesterol oxidation in spray-dried whole eggs at various storage periods by Galobart et al. (2002).

Kim et al. (2006) examined the effect of dietary  $\alpha$ -tocopheryl acetate on the lipid and cholesterol oxidation in retail-packed chicken meat during refrigerated storage. After 42 days of feeding (five dietary treatments 0, 50, 100, 200, or 400 IU of  $\alpha$ -tocopheryl acetate/kg diet) all the broilers were slaughtered, and the carcasses were packed in polyethylene bags individually, bags similar to those used in the retail trade, and stored for 12 days at 4 °C. The authors observed that the supplementation with 200 or 400 IU of tocopherol was more effective in reducing the level of lipid oxidation and total cholesterol oxidation products formed (7 $\beta$ -hydroxycholesterol; 7-ketocholesterol, and 25-hydroxycholesterol) causing major improvements in the oxidative stability of chicken meats during refrigerated storage.

Souza and Silva (2006) evaluated the protective effect of vitamin E on cooked hams produced from pigs that had received a controlled diet supplemented with different levels of vitamin E. As the vitamin E levels in the diet were increased, there was a reduction in the cholesterol content, and reached approximately 30% when the levels of supplementation were 400 mg of vitamin E/kg diet, and consequently decreasing the formation of COPs during storage.

The effect of animal fat and vegetable oil sources on the composition of lipids in raw chicken and in precooked ready-to-eat fried chicken patties was analyzed. The total cholesterol in the raw chicken was higher for the animal fat-based diet samples than the vegetable oil ones, with values of 55.7 and 36 mg/100g sample, respectively. However, along the cooking processes the COPs contents followed a similar trend and no significant differences were detected between the samples obtained from the two different fat diets. The maximum level of COPs was observed after flash-frying (BONOLI et al., 2007).

According to Mele et al. (2011), the inclusion of extruded linseed in the diet of dairy ewes for a 10-week period resulted in a stable enrichment of bulk milk used to produce pecorino cheese. The results showed that after 30 days of ripening the total of COP contents were 1.08 and 0.79 mg/100g of fat in the control cheese and in the cheese produced with milk from sheep fed the linseed diet, respectively. Ripening increased the ratio of COPs/total cholesterol in the control cheese (28%), whereas this ratio remained roughly constant in the case of cheese produced with milk from sheep fed the linseed diet. According to Abdulla et al. (2015) palm oil can be used as an alternative oil source in broiler diets with a positive effect on cholesterol stability of chicken meat refrigerated for seven days.

Verardo et al. (2017) evaluated the influence among the egg products and between the drying processes on pasta quality. The results confirmed that the ingredients and drying temperatures are important for the quality of dried egg pasta and that higher thermal treatments favored the formation of COPs. However, the authors concluded that eggs from free-range hens contained higher amounts of tocopherols (compared to the eggs obtained by conventional breeding) and therefore were able to decrease the formation of the COPs in the studied samples.

## 5.7 Model systems

Foods are usually complex matrices where interferences among various components may hinder the acquisition of clear data and make the understanding of the mechanisms of cholesterol oxidation and its inhibition more difficult. Therefore, model systems are a very useful tool to evaluate the different parameters that influence the cholesterol oxidation processes and the effectiveness of natural antioxidant compounds (ANSORENA et al., 2013; BARRIUSO et al., 2016).

Kim et al. (2001) investigated the inhibition of cholesterol autoxidation using a non-saponifiable fraction from rice bran oil in an aqueous model system for 16 hours at pH 5.5 and 80 °C. The results showed a loss of cholesterol and the formation of 7-ketocholesterol showed inhibition of cholesterol by the natural antioxidant. After 16 hours of incubation the samples without the non-saponifiable fraction showed a content of 207.78 ppm against 76.69 ppm in the sample with 700 ppm of the antioxidant added. According to the data, the inhibitory effect increases with an increase of the antioxidant concentration. Rice bran oil was also used as an antioxidant by Kim (2005). The author confirmed the antioxidant effect of the vitamin E fraction extracted from rice bran in an emulsified cholesterol system.

Another study evaluated the antioxidant activities of rice bran. Vitamin E and  $\gamma$ -oryzanol components purified from rice bran were investigated in a cholesterol oxidation system accelerated by 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride. The antioxidant activity of the vitamin E and  $\gamma$ -oryzanol components reduced the production of toxic cholesterol oxidation products and all the  $\gamma$ -oryzanol components had activities higher than that of any of the four vitamin E components (XU, HUA and GODBER, 2001).

Valenzuela et al. (2004) tested the ability of tocopherol homologs, rosemary extract, four commercial flavonoids (quercetin, catechin, morin, and rutin), and an alkaloid-derived product (boldine) to inhibit thermal-induced oxidation of cholesterol using soybean oil with added cholesterol, induced under Rancimat test conditions (150 °C and air bubbling). Under the experimental conditions rutin and boldine were devoid of any protective action against COP formations; however, all the other natural antioxidants were efficient in preventing cholesterol oxidation. Quercetin showed the strongest antioxidant behavior among the flavonoids.

The effect of quercetin on cholesterol oxidation during heating was verified by Chien, Hsu and Chen (2006). Standard quercetin was added to samples of cholesterol submitted to heat-induced cholesterol oxidation at 150 °C. The results showed that a low amount (0.002%, w/w) of quercetin was effective in preventing the formation of cholesterol oxidation products during the first 30 minutes. However after this thirty-minute period a low antioxidant activity was observed due to the degradation of quercetin.

The antioxidant activity of  $\beta$ -carotene and oxygenated carotenoids lutein, canthaxanthin, and astaxanthin was investigated during spontaneous and peroxy-radical-induced cholesterol oxidation. All compounds demonstrated high antioxidant activity. The results showed that astaxanthin was much more effective than the other carotenoids in inhibiting 7-ketocholesterol formation. The overall order of effectiveness of these compounds was astaxanthin>canthaxanthin>lutein =  $\beta$ -carotene (PALOZZA et al., 2008).

Xu et al. (2009) investigated cholesterol oxidation in lard, corn oil, and olive oil; and they examined the effectiveness of green tea catechins,  $\alpha$ -tocopherol, and quercetin to prevent cholesterol oxidation compared with BHT. According to the authors, cholesterol was oxidized more slowly in corn oil, lard, and olive oil due to the unsaponified antioxidants present in

these fat and oils. The natural antioxidants, green tea catechins,  $\alpha$ -tocopherol, and quercetin, significantly inhibited the oxidation of cholesterol at 200 ppm and demonstrated a protective effect stronger than that of BHT under the same conditions.

Hydrophilic anthocyanins and lipophilic tocos from black rice bran may prevent cholesterol oxidation in an emulsion system containing either cholesterol or fish oil, showing better results when added to the cholesterol emulsion (ZHANG et al., 2013).

Barriuso et al. (2015) evaluated the protective effect of lyophilized aqueous extract of *Melissa officinalis* against the degradation of cholesterol and the formation of COPs in model systems. Standard cholesterol solutions with the addition of 2 mg extract/ 100 mg cholesterol were heated at 180 °C for different periods, 0, 10, 20, 30, 60, 120, and 180 minutes. The results showed that the concentration applied in the study protected the cholesterol from degradation, since at the end of the experiment the control samples maintained only 23% of the cholesterol and the samples with the natural extract retained 69%. The highest values of COP formations were observed in the 30- and 120-minute heating times, both in the control samples and in the samples under the protective effect of the natural antioxidant, reaching 142.97  $\mu\text{g/g}$  and 93.03  $\mu\text{g/g}$ , respectively.

Xu et al. (2016) investigated the inhibitory effect of eleven antioxidants including nine phenolic compounds (rutin, quercetin, hesperidin, hesperetin, naringin, naringenin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid), vitamin E, and BHT in the oxidation of commercial cholesterol samples submitted to a heat treatment at 160 °C for one hour. All antioxidant compounds evaluated were effective in minimizing the formation of oxidized products. However, rutin, quercetin, chlorogenic acid, and caffeic acid were able to completely inhibit cholesterol degradation.

Barriuso et al. (2016) evaluated the antioxidant capacity of mana-cubiu (*Solanum sessiliflorum*), a plant native to the Amazon, in standard cholesterol solutions. The analysis carried out in solution showed that, after heating, the cholesterol oxides content was much higher in the samples without the natural extract (227  $\mu\text{g}$  cholesterol oxides / mg cholesterol) than in the samples with the mana-cubiu extract (25  $\mu\text{g}$  cholesterol oxides / mg cholesterol).

Three different proanthocyanidin extracts of Chinese bayberry leaves were prepared by different methodologies: a normal extraction method, Sephadex LH-20 column purification, and ultrasound degradation. Then they were tested as antioxidants in an emulsion cholesterol model system. All the extracts were effective against cholesterol oxidation. Ultrasound degradation and Sephadex LH-20 column purification, with an addition of 40 mg/mL, had an equivalent antioxidant activity to BHT and TBHQ with an addition of 20 mg/mL, confirming the feasibility of using them as natural antioxidants (ZHANG et al., 2017).

## 6 CONCLUSION

In conclusion, the formation of cholesterol oxides and the degradation of polyunsaturated fatty acids play a prominent role in the loss of quality and nutritional characteristics of products of animal origin. These losses are caused by factors such as thermal processing (thermo-oxidation) and storage under fluorescent light (photo-oxidation). Furthermore, the consumption of oxidized lipids is the subject of constant investigations in the public health area, since there are correlations between the intake of exogenous cholesterol oxidation products that can be potentially harmful to human health and the development of deleterious health effects such as cytotoxicity, atherogenesis, cardiovascular changes, and carcinogenesis, as well as other chronic degenerative diseases. The formation of

COPs is related to processing temperatures, heating time, storage conditions, and packaging. Fish, meat, eggs, and dairy products are cholesterol-containing foods and when processed they are potential sources of these cholesterol oxides. The application of antioxidants is the main tool used to prevent or to reduce cholesterol oxidation. Generally speaking synthetic antioxidants are widely used in the food industry. However, they have been confirmed to have toxicological and carcinogenic effects. Thus, consumer concern about the safety of these additives has motivated the industry to apply natural products over synthetic ones. Natural antioxidants possess bioactive compounds with antioxidant properties and are able to retard or prevent lipid oxidation in food. This review presented different natural bioactives with various applications as natural antioxidants in food matrices of animal origin, and in model systems, to prevent or minimize COP formations. However, future studies are still necessary to determine the ideal concentration for the use of these natural products on a large scale in order to replace the synthetic antioxidants used in the food industry, and to develop effective strategies to prevent the occurrence of lipid oxidation as well as to maintain and even improve the nutritional quality of these foods.



## **CAPÍTULO II**

### **COMPOSIÇÃO QUÍMICA, IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS POR UPLC-ESI-MS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN* *VIVO* E *IN VITRO* DOS FRUTOS DA AROEIRA (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**

## RESUMO

A aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) é uma planta nativa da América do Sul, amplamente utilizada em pratos culinários e pela medicina popular. Este trabalho apresenta a composição química, a identificação de compostos bioativos e a avaliação da atividade antioxidante dos frutos da aroeira. Os resultados indicaram a seguinte composição nutricional: umidade (13,70%), lipídios (12,52%), proteínas (7,71%), carboidratos (62,49%) e cinzas (3,58%). Os principais ácidos graxos determinados foram: ácido linoleico (C18:2 *n6c*), ácido oleico (C18:1 *n9c*), ácido palmítico (C16:0) e ácido palmitoleico (C16:1). Foi observada a presença de compostos fenólicos ( $13,66 \pm 0,26$  mg EAG/g), principalmente flavonoides. A atividade antioxidante *in vitro* foi avaliada utilizando-se os métodos de DPPH, ORAC e  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Em relação à atividade *in vivo*, extratos aquosos dos frutos da aroeira apresentaram baixa toxicidade e proteção frente ao estresse oxidativo em células de *Saccharomyces cerevisiae*. As análises cromatográficas confirmaram a presença de compostos antioxidantes, identificando compostos como flavonoides, antocianinas e taninos. Este estudo destaca os frutos da aroeira como fonte de compostos de elevado valor nutricional e caracteriza sua atividade antioxidante, sugerindo a potencial utilização destes frutos pela indústria de alimentos, em substituição aos antioxidantes sintéticos.

**Palavras-chave:** *Schinus terebinthifolius* Raddi, compostos bioativos, atividade antioxidante.

## ABSTRACT

Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) is a native plant of South Africa, widely used in culinary dishes and by the folk medicine. This work presents the chemical composition, the identification of bioactive compounds and evaluation of antioxidant activity of aroeira fruits. The results indicated the following nutritional composition: moisture (13.70%), lipids (12.52%), proteins (7.71%), carbohydrates (62.49%), and ash (3.58%). The main fatty acids determined were: linoleic acid (C18:2 *n6c*), oleic acid (C18:1 *n9c*), palmitic acid (C16:0) and palmitoleic acid (C16:1). It was observed the presence of phenolic compounds ( $13.66 \pm 0.26$  mg GAE/g), mainly flavonoids. The *in vitro* antioxidant activity was evaluated by DPPH, ORAC and  $\beta$ - carotene/linoleic acid assays. In relation to the *in vivo* activity, aqueous extracts of aroeira fruits showed low toxicity and protection against oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* cells. The chromatographic analyzes confirmed the presence of antioxidant compounds, identifying compounds such as flavonoids, anthocyanins and tannins. This study highlights aroeira fruits as source of high nutritional value compounds and characterizes their antioxidant activity, suggesting the potential utilization of these fruits by the food industry, as a substitute for the synthetic antioxidants.

**Key-words:** *Schinus terebinthifolius* Raddi, bioactive compounds, antioxidant activity.

## 1 INTRODUÇÃO

Extratos naturais oriundos do reino vegetal tem ganhado proeminência na ciência de alimentos. Além do potencial valor nutricional, as plantas são fontes de compostos bioativos que apresentam numerosos efeitos biológicos, dentre esses, as propriedades antioxidantes (JIANG e XIONG, 2016; BARBIERI et al., 2017; TIAN et al., 2018).

Inúmeros estudos têm sido realizados sobre o emprego de extratos naturais durante o processamento e armazenamento dos alimentos, uma vez que o desenvolvimento de técnicas para utilização dos mesmos, em detrimento aos sintéticos, é uma demanda dos consumidores e da legislação, sendo cada vez maiores as restrições ao uso de substâncias químicas (CALEJA et al., 2016; MATUMOTO-PINTRO et al., 2017; MUNEKATA et al., 2017; FERREIRA et al., 2017).

O gênero *Schinus*, membro da família Anacardiaceae, é uma espécie nativa da flora sul americana. A aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) é amplamente distribuída pela costa brasileira, pode ser encontrada do nordeste ao sul do Brasil, sendo também denominada “pimenta rosa”, “poivre rose”, “felfel aarred”, “pimenta brasileira” (CARVALHO et al., 2013). Seus frutos são amplamente utilizados na culinária internacional devido ao seu leve sabor apimentado (GOMES et al., 2013), e pela medicina popular no tratamento de infecções e feridas (EL-MASSARY et al., 2009; SOARES, 2010; BERNARDES et al., 2014; ROSAS et al., 2015).

Nos últimos anos, diversos estudos vêm demonstrado a diversidade de metabólitos secundários presentes na família Anacardiaceae. Embora a composição química de espécies vegetais varie de acordo com a origem, o grau de maturação, o genótipo, a época de colheita e outras condições de processamento (ZHANG e HAMAUZU, 2003; ENNIGROU et al., 2017), estudos fitoquímicos dos frutos da aroeira determinaram a presença de taninos, alcaloides, flavonoides, saponinas, esteróis, terpenos, lipídios fenólicos e proteínas (EL-MASSARY et al., 2009; MATSUO et al., 2011; CARVALHO et al., 2013; CAVALCANTI et al., 2015; GOIS et al., 2017).

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 reduzir os danos causados pelos processos oxidativos nos alimentos, os frutos da aroeira ampliam seu uso como conservante natural devido às atividades antimicrobianas.

O efeito preservativo do óleo essencial dos frutos da aroeira contra *Listeria monocytogenes* em queijo minas frescal durante estocagem (30 dias/4 °C) foi avaliado por Dannenberg et al. (2016). O óleo natural demonstrou capacidade biopreservativa *in situ*, reduzindo a formação de produtos secundários da oxidação e a população das bactérias em questão.

A exploração de extratos naturais pela indústria alimentícia representa uma alternativa à ciência e tecnologia de alimentos, capaz de minimizar a utilização de preservativos sintéticos e agregar valor nutricional à dieta humana, devido à presença de compostos bioativos antioxidantes. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar e avaliar as propriedades antioxidantes dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi).

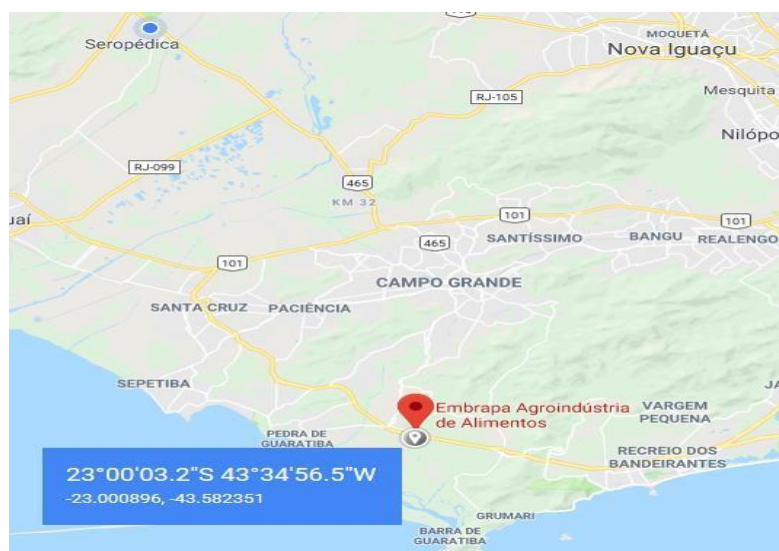
## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

Os reagentes utilizados no experimento foram: carbonato de sódio, hidróxido de sódio, nitrito de sódio, carbonato de cálcio, ácido acético glacial e ácido clorídrico (Vetec); metanol, etanol, hexano e acetona (Neon); reagente *Folin-Ciocalteu*, tricloreto de alumínio, quercetina, ácido gálico, 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox), 2,2-difenil-1-picril-hidraliza (DPPH) e metóxido de sódio (Sigma-Aldrich), Tween-40, clorofórmio e fosfato monossódico (Synth); fluoresceína e 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) diidrocloreto (AAPH) (Merck). O éster metílico do ácido undecanóico e hexano UV-HPLC foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) e o FAME mix de ácidos graxos da Supelco (Supelco TM FAME Mix 18919, Bellefonte, PA, USA). As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (BY4741 *MATa*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*) utilizadas foram da empresa EUROSCARF (Frankfurt, Germany). Para preparo do meio de cultivo foram utilizados: glicose (Vetec, Brasil), peptona (Difco, EUA), extrato de lêvedo (Difco, EUA) e ágar (Difco, EUA).

### 2.2 Amostras

Os frutos maduros da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) foram coletados na Embrapa Agroindústria de Alimentos localizada em Guaratiba, Rio de Janeiro, Brasil, latitude 23°00'0,32"S e longitude 43°34'56,5"W, no mês de junho, 2017 (Figura 10).



**Figura 10:** Localização do ponto de coleta dos frutos da aroeira (Embrapa Agroindústria de Alimentos) (GOOGLE MAPS, 2018).

Os frutos frescos foram secos em estufa ventilada (Solab, SP, Brasil) a 40 °C por 48

horas. Depois de secos, os frutos foram moídos em um processador doméstico (Cadence, Brasil), até apresentar aspecto de pó (Figura 11). Em seguida, os frutos secos e moídos foram armazenados em embalagens de polietileno e mantidos a temperatura ambiente na ausência de luz até o preparo dos extratos e realização das análises. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.



**Figura 11:** Frutos da aroeira.

### **2.3 Composição centesimal**

Os procedimentos da AOAC (AOAC, 2002) foram utilizados para as análises de umidade, cinzas, proteínas e lipídios totais. A umidade foi determinada pela perda de peso em estufa regulada a 105 °C. O conteúdo de proteínas das amostras foi estimado pelo método de micro-kjeldahl, que consiste na determinação do nitrogênio total, utilizando-se o fator 6,25 para converter o resultado em proteína bruta. Os lipídios foram determinados extraíndo-se uma massa conhecida da amostra com éter de petróleo, utilizando o aparelho de Soxhlet. O conteúdo de cinzas foi determinado por incineração de uma quantidade conhecida de amostra, em mufla a 600 °C, até obtenção de peso constante. A determinação do conteúdo total de carboidratos foi realizada por diferença, subtraindo-se a soma da umidade, cinzas, lipídios totais e proteínas de 100. O valor energético foi estimado, considerando-se os fatores de conversão de Atawer, segundo a seguinte equação:  $\text{Energia (Kcal)} = 4 \times (\text{g proteína} + \text{g carboidrato}) + 9 \times (\text{g lipídio})$ .

### **2.4 Composição de ácidos graxos**

Os ácidos graxos presentes nas amostras dos frutos da aroeira (0,05 g) foram convertidos a ésteres metílicos por transesterificação de acordo com Zhu et al. (2011), com modificações. A transesterificação foi realizada no intuito de aumentar a volatilidade e assim permitir a análise por cromatografia gasosa.

Em tubos, 2 mL de solução metanólica de metóxido de sódio 2,5 M foram adicionados às amostras (0,05 g) e sonificados em ultrassom (Elmasonic P, Elma Schmidbauer GmbH) por 10 minutos (40 Hz). Em seguida, 0,1 mL de ácido acético glacial, 2,5 mL de solução saturada de hidróxido de sódio e 1 mL de hexano foram adicionados. Os tubos foram agitados em vortex e a fração hexânica separada. A extração com 1 mL de hexano foi repetida 3 vezes,

perfazendo o total de 4 extrações. Na sequência, tubos contendo as frações hexânicas separadas foram direcionados a secagem em estufa ventilada (Solab, SP, Brasil) a 40 °C. Antes da análise por cromatografia gasosa, as amostras foram ressuspensas com hexano UV-HPLC (700 µL) e o padrão interno (éster metílico do ácido undecanóico, 300 µL) totalizando 1 mL, sendo filtradas na sequência (Millipore, Maryland, MD, USA).

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram determinados de acordo com Saldanha, Benassi e Bragagnolo (2008), com modificações. Utilizou-se um cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC 2010, Tokio, Japão), equipado com injetor split (1:50), detector de ionização em chamas e coluna capilar de sílica fundida CP-SIL 88 (100 m x 0,25 mm x 0,20 µm) (Chrompack, Middelburg, The Netherlands), coluna de alta polaridade e quimicamente não ligada, apresentando fase estacionária de cianopropil. As condições cromatográficas foram: temperatura inicial da coluna, 140 °C (5 minutos); taxa de aquecimento 4°C/min, até temperatura de 230 °C (0 minuto); taxa de aquecimento 5°C/min, até temperatura de 240 °C (18 minutos). As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas em 250 °C e 280 °C, respectivamente. Hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a 30 mL/min, e o nitrogênio como “make-up gas” a 30 mL/min.

Os tempos de retenção dos padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (Supelco TM FAME Mix 37, Bellefonte, PA, USA) foram usados para identificar os picos cromatográficos das amostras. A quantificação foi realizada por padronização interna, utilizando o éster metílico do ácido undecanóico (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), como padrão interno. Na padronização interna adiciona-se uma quantidade conhecida do padrão interno de concentração também conhecida nas amostras, de forma que um gráfico é construído relacionando a razão (área de cada padrão/área do padrão interno) pela concentração de cada padrão. Como na amostra é adicionada a mesma quantidade do padrão interno, através da razão das áreas obtidas no cromatograma da amostra, pode-se obter a concentração do analito (COLLINS e BRAGA, 1992).

## **2.5 Preparo dos extratos**

Os extratos utilizados nas análises das propriedades antioxidantes *in vitro* (DPPH, ORAC e sistema β-caroteno/ácido linoleico) e de compostos bioativos (substâncias Aproximadamente 2 g dos frutos da aroeira secos 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, sendo o extrato avolumado para 50 mL com a solução metanol/água. Todo o processo de preparo do extrato foi realizado a temperatura ambiente e na ausência de luz.

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, e este foi colocado em estufa à 105 °C, por 16 horas, seguido de resfriamento em dessecador e 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 0,0143 g/mL de extrato.

## **2.6 Compostos bioativos**

### 2.6.1 Fenólicos totais

Os fenólicos totais foram determinados utilizando o reagent *Folin–Ciocalteu*, de acordo com SWAIN e HILLIS (1959), com modificações. Em tubos, foram adicionados 10 mL de água destilada e 1 mL do extrato. Em seguida, adicionou-se o reagente de *Folin–Ciocalteu* (1 mL), deixando reagir por 3 minutos, e posterior adição de 1,5 mL da solução de carbonato de sódio (10 % m/v). As soluções foram agitadas e permaneceram em repouso por 2 horas a temperatura ambiente e ausência de luz. Em seguida, a absorbância foi mensurada a 725 nm, utilizando-se espectrofotômetro (Modelo NOVA 2000 UV). A curva de calibração foi preparada utilizando-se o ácido gálico como padrão em concentrações de 5 a 40 µg/mL ( $r=0,9978$ ), e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente (EAG) por grama de amostra.

### 2.6.2 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  $4 \times 10^{-4}$  g/mL ( $r=0,9901$ ). Os resultados foram expressos em mg equivalente quercetina (EQ) por grama de amostra.

### 2.6.3 Antocianinas totais

O conteúdo de antocianinas totais foi determinado pelo método descrito por Fuleki e Francis (1968), com modificações. Uma solução extratora preparada com 85 mL de etanol 95% e 15 mL de solução aquosa de ácido clorídrico 1,5 M foi preparada, sendo realizado o ajuste do pH para 1, utilizando ácido clorídrico e com o auxílio de pHmetro. A extração foi realizada misturando-se 10 g dos frutos da aroeira secos com 50 mL da solução extratora em béquer. O béquer foi coberto com parafilme e mantido por 24 horas a 4 °C. Em seguida, as amostras foram filtradas em papel de filtro e 1 mL do extrato filtrado foi transferido para balão volumétrico de 10 mL, sendo este avolumado com a solução extratora. Após 10 minutos a absorbância foi medida utilizando-se espectrofotômetro (Modelo NOVA 2000 UV) a 520 nm. O conteúdo total de antocianinas foi calculado de acordo com a equação 1:

$$\text{Antocianinas totais mg /100g de amostra} = \text{abs} \times \text{VD} \times 100/\text{VA} \times \text{VET}/\text{PA} \times 1/98,2 \quad (1)$$



onde abs é a absorbância lida, VD é o volume diluído, VA é o volume da amostra, VET é o volume de extrato total e PA é o peso da amostra utilizada na extração.

## 2.6.4 Carotenoides

Os carotenoides foram analisados de acordo com a metodologia proposta por Lichtenthaler (1987), que determina os teores de carotenoides e clorofila *a* e *b* simultaneamente. 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 avolumado 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. As concentrações totais de clorofila *a* e *b*, e carotenoides foram determinadas de acordo com as equações 2, 3 e 4, respectivamente. Os resultados foram expressos em µg/g de amostra.

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

$$\text{Clorofila } b \text{ (Cb)} = [21,50 A_{646.8} - 5,10 A_{663.2}] \quad (3)$$

$$\text{Carotenoides totais} = [100 A_{470} - (1,82Ca - 104,96 Cb)/198] \quad (4)$$

## 2.6.5 Identificação dos compostos bioativos por UPLC-ESI-MS

O extrato dos frutos utilizado nas análises cromatográficas dos frutos da aroeira foi preparado utilizando-se solventes de polaridades diferentes de acordo com os procedimentos a seguir. Os frutos secos (2 g) foram homogeneizados com 10 mL de hexano (solvente 1) por 30 minutos em ultrassom com frequência de 40 Hz (Elmasonic P, Elma Schmidbauer GmbH) a temperatura de 40 °C, em seguida o sobrenadante foi retirado, transferido para balão e o solvente evaporado em evaporador rotatório (Fisatom, SP, Brasil) a 40 °C. A mesma amostra dos frutos foi posteriormente homogeneizada com 10 mL de acetato de etila (solvente 2), assim como descrito anteriormente, e em seguida o sobrenadante foi retirado, transferido para o mesmo balão utilizado anteriormente e o solvente 2 foi evaporado. Os mesmos procedimentos foram empregados com dicloro metano (solvente 3) e metanol (solvente 4), utilizando sempre a mesma amostra de fruto e o mesmo balão para a evaporação do solvente em evaporador rotatório. Para a injeção no cromatógrafo, o extrato foi ressuspensionado em metanol.

As análises cromatográficas dos extratos dos frutos da aroeira foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo UPLC Acquity acoplado a espectrometro de massas TDD Acquity (Micromass-Waters, Manchester, Inglaterra), com fonte de ionização por eletrospray (ESI - “*Electrospray Ionization*”). Utilizou-se uma coluna C18 BEH Waters Acquity (2,1 mm x 50 mm x 1,7 µm) a temperatura de 30 °C. Foram utilizados dois solventes para a fase móvel, fase A (0,1% de ácido fórmico em água Milli-Q® purificada) e fase B (metanol). O fluxo foi de 0,2 mL/min e 5 µL das amostras foram injetadas; com gradiente linear a partir de 5% de B e aumento até 100% (B) em 7,5 minutos, mantendo-se até 9 minutos e retornando às condições iniciais, seguido de reequilíbrio da coluna até 10 minutos.

A ionização por electrospray (ESI) foi realizada sob as seguintes condições: voltagem de 3,00 kV no capilar e 30 V no cone extrator, temperatura da fonte 150 °C, temperatura de

dissolvatação 350 °C e aquisição de dados de  $m/z$  entre 100 e 900. A aquisição dos íons foi realizada no modo positivo e negativo na mesma corrida, de forma que a cada 4 segundos foi feita a alternância automática das condições, onde a voltagem no capilar de 3,00 kV e no cone de 30 V para o modo positivo, é invertida no modo negativo. MS/MS dos picos selecionados foram adquiridos via CID (*Collision-induced dissociation*) com energia de colisão de 30 V.

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

### 2.7.1 DPPH

A atividade antioxidante foi determinada utilizando-se o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) como descrito por Rufino et al. (2010), com modificações. Uma solução metanólica contendo 0,06 mM DPPH foi preparada. Em seguida, 100 µL do extrato foram adicionados a 3,9 mL da solução de DPPH. As misturas foram homogeneizadas e deixadas em repouso por uma hora a temperatura ambiente e ausência de luz. Após 60 minutos, as absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro (Modelo NOVA 2000 UV) a 517 nm. A quantificação foi realizada utilizando-se Trolox em uma curva de calibração variando de 5 – 60 µg/mL Trolox ( $r=0,9977$ ). A atividade antioxidante foi expressa em µmol Trolox equivalente (TE)/g de amostra. O percentual de inibição (I%) foi calculado da seguinte forma:  $\%I = (A_0 - A) / A_0 \times 100$ , onde  $A_0$  é a absorvância do controle (sem extrato) e  $A$  é a absorvância medida com a amostra.

### 2.7.2 ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)

Os procedimentos para a realização do método ORAC foram conduzidos de acordo com o método reportado por Ou, Hampsch-Woodill e Prior (2001) com modificações, utilizando um leitor de microplacas (SpectraMax M5, Molecular Devices, CA, USA). Amostras diluídas em tampão fosfato monossódico 75 mM (50 µL) foram incubadas a 37 °C com 150 µL de fluoresceína (93 mM). Após 15 minutos, 50 µL de AAPH (2,2'-azo-bis(2-amidinopropano)diidrocloreto, 221 mM) foram adicionados ao meio reacional. Durante o período de uma hora, a queda de fluorescência foi mensurada a 37°C ( $\lambda_{excitação} = 493$  nm,  $\lambda_{emissão} = 515$  nm), a cada minuto. Os resultados foram comparados com a área abaixo da curva do padrão Trolox (20 µM). O tampão fosfato 75 mM (pH 7,4) foi utilizado como branco. A área abaixo da curva (AUC) foi determinada pela equação 5.

$$AUC = 1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + \dots + f_{59}/f_0 + f_{60}/f_0 \quad (5)$$

Onde  $f_0$  é a leitura inicial da fluorescência no tempo de 0 e  $f_i$  é a leitura da fluorescência no tempo  $i$ . O valor ORAC (equivalente Trolox) foi determinado pela equação 6, que considera a concentração de Trolox e a área abaixo da curva de decaimento da fluoresceína:

$$ORAC = (AUC_{amostra} - AUC_{branco} / AUC_{Trolox} - AUC_{branco}) * (Molaridade_{Trolox} / Molaridade_{amostra}) \quad (6)$$

### 2.7.3 Sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

O Sistema de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico foi avaliado como descrito por Miller (1971). Uma solução de  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico foi preparada dissolvendo-se 20 mg de  $\beta$ -caroteno em 1 mL de clorofórmio. Em seguida, 28  $\mu$ L desta solução foram adicionados a 28  $\mu$ L de ácido linoleico e 200 mg de Tween® 40 (agente emulsificante). O clorofórmio foi completamente evaporado da solução reativa sob nitrogênio e adicionou-se 140 mL de água destilada saturada com oxigênio (30 minutos, 100 mL de O<sub>2</sub>/minuto). Após vigorosa agitação, 5 mL da mistura reacional foram adicionados a tubos contendo 1 mL do extrato. A mistura foi homogeneizada e em seguida incubada em microplacas a 50 °C com o intuito de acelerar a oxidação e descoloração do  $\beta$ -caroteno, sendo realizada a medida a 470 nm durante 2 horas a cada 15 minutos (SpectraMax M5, Molecular Devices, CA, USA). O padrão (BHT) foi preparado da mesma forma que as amostras, assim como o controle, porém este no lugar da amostra foi adicionado metanol.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da peroxidação calculados pela equação 7.

$$\% \text{ inibição} = 100 - \frac{(\text{ABSi da amostra} - \text{ABSf da amostra})}{(\text{ABSi do controle} - \text{ABSf do controle})} \quad (7)$$

onde ABSi é a absorbância inicial e ABSf é a absorbância final.

### 2.8 Atividade antioxidante do extrato dos frutos da aroeira (*In vivo*)

No presente trabalho, avaliou-se a toxicidade e o efeito protetor do extrato aquoso dos frutos da aroeira frente ao estresse oxidativo em células de *Saccharomyces cerevisiae*, por meio do estudo da viabilidade de células expostas ao estresse oxidativo devido à presença de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Os procedimentos foram realizados de acordo com Sá et al. (2013), com modificações.

#### 2.8.1 Condições de cultivo e crescimento celular

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* foram armazenadas em meio YPD 2% sólido, a temperatura de refrigeração. 24 horas antes de cada experimento foram preparados repiques frescos em meio YPD 2% sólido (2,0% de glicose, 2,0% de peptona, 1,0% de extrato de lêvedo e 2% de ágar) e mantidos em estufa incubadora refrigerada a 30°C (Solab, SP, Brasil). O inóculo celular foi realizado em meio líquido esterilizado e a concentração da suspensão celular foi mensurada por leitura da densidade óptica em espectrofotômetro (Biospectro, Brasil) a 570 nm. Preparou-se uma curva padrão relacionando as absorbâncias medidas para diferentes diluições de inóculo inicial de concentração conhecida, determinando-se o fator de conversão de absorbância em concentração (mg de peso seco de célula/mL de meio de cultura).

### **2.8.2 Determinação da toxicidade do extrato**

Após crescimento, as células (20 mg), na primeira fase exponencial de crescimento (aproximadamente 1 mg/mL), foram incubadas com os extratos em concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL por 1 hora e 3 horas a 28 °C sob agitação de 160 rpm em incubadora tipo shaker (Novatecnica, Brasil). A sobrevivência celular foi determinada pelo plaqueamento celular (40 µg), em meio YPD 2% sólido. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 horas em estufa incubadora refrigerada (BOD, Solab, SP, Brasil), seguida pela contagem das colônias. Os procedimentos foram realizados de acordo com Sá et al. (2013), com modificações. Neste teste de tolerância celular, os resultados obtidos foram comparados com os resultados apresentados por células expostas ao estresse oxidativo mediado pela presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM (28 °C/160rpm) e por células controle, sem nenhum tratamento (28 °C/160 rpm).

### **2.8.3 Determinação da viabilidade celular**

As células foram incubadas com os extratos sob as mesmas condições citadas no item anterior, por 2 horas. Em seguida, as células foram lavadas com água destilada e ressuspensas em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 6,0). A esta suspensão foi adicionada solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM e a mesma foi mantida sob agitação (28 °C/160rpm) por 1 hora. Após esse período, procedeu-se o plaqueamento idêntico ao citado anteriormente. Neste teste de atividade antioxidante contra o estresse oxidativo provocado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foram utilizadas como parâmetro células que não foram pré-tratadas com os extratos expostas ao estresse oxidativo, e células controle, incubadas somente com tampão fosfato.

## **2.9 Análises estatísticas**

As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados foram expressos pelas médias, seguidas do desvio padrão. Os resultados das análises *in vivo* foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey em nível de 95% de significância, utilizando XLSTAT 2016.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Composição centesimal**

A composição centesimal dos frutos da aroeira esta descrita na Tabela 1. Os frutos da aroeira apresentaram um teor de umidade de 13,70%, valor que corresponde aos obtidos por outros autores, onde a umidade variou entre 12,09 e 29,04% (GONÇALVES et al., 2012; VICENTE et al., 2012a; SOUZA, ARTHUR e NOGUEIRA, 2012; LABRE et al., 2013; PAGANI et al., 2014). Os conteúdos de lipídios e proteínas obtidos nos frutos foram de 12,52 ± 0,51 e 7,71 ± 0,09 g/100g, respectivamente. Os carboidratos apresentaram-se como os principais componentes da composição dos frutos avaliados, 62,49 g/100g. Entretanto foram

avaliados somente por diferença em relação aos demais componentes.

**Tabela 1:** Composição centesimal dos frutos da aroeira (g/100g).

Propriedades	Teores (g/100g)
Umidade	13,70 ± 0,99
Lipídios	12,52 ± 0,51
Proteínas	7,71 ± 0,09
Carboidratos	62,49 ± 0,16
Cinzas	3,58 ± 0,01
Valor calórico (Kcal)	358 ± 0,31

Resultados de análises realizadas em triplicatas, média ± desvio padrão.

Estudos anteriores encontraram valores de lipídios variando de 7,91 g/100g a 16,50 g/100g em frutos da aroeira (SOUZA, ARTHUR e NOGUEIRA, 2012; VICENTE et al., 2012a; LABRE et al., 2013). No presente trabalho, foi determinado um conteúdo de proteínas de 7,1 g/100g, valor próximo ao observado por Gonçalves et al. (2012), em farinha dos frutos da aroeira destinada a alimentação animal. Resultado semelhante foi observado por Labre et al. (2013), que determinaram conteúdo de 6,97 g/100g para proteínas em frutos da aroeira secos e moídos. O teor de cinzas foi 3,58%, concordando com valores obtidos em estudos anteriores (GONÇALVES et al., 2012; LABRE et al., 2013; VICENTE et al., 2012a; PAGANI et al., 2014).

### 3.2 Composição de ácidos graxos

Vinte ácidos graxos foram identificados e quantificados nos frutos da aroeira avaliados. Os principais ácidos graxos determinados foram o ácido linoleico (C18:2 *n6c*) 36,33 ± 0,62 g/100g, ácido oleico (C18:1 *n9c*) 18,71 ± 0,32 g/100g, ácido palmítico (C16:0) 9,01 ± 0,03 g/100g e ácido palmitoleico (C16:1 *c*) 7,87 ± 0,33 g/100g. Os conteúdos totais de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados foram 26,29 ± 1,04, 29,39 ± 0,65 e 36,94 ± 0,91 g/100g, respectivamente. A tabela 2 apresenta a composição de ácidos graxos dos frutos da aroeira.

**Tabela 2:** Composição de ácidos graxos dos frutos da aroeira (g/100g de amostra).

Ácido graxo	Conteúdo (g/100g de amostra)
<b>C4:0</b>	5,12 ± 0,31
<b>C6:0</b>	5,60 ± 0,31
<b>C8:0</b>	2,43 ± 0,21
<b>C14:0</b>	0,21 ± 0,03
<b>C15:0</b>	0,28 ± 0,00
<b>C16:0</b>	9,01 ± 0,03
<b>C17:0</b>	0,54 ± 0,06
<b>C18:0</b>	2,44 ± 0,06
<b>C20:0</b>	0,39 ± 0,03
<b>C22:0</b>	0,22 ± 0,09
<b>C23:0</b>	0,06 ± 0,00
<b>C14:1</b>	0,44 ± 0,00
<b>C15:1</b>	0,33 ± 0,03
<b>C16:1</b>	7,87 ± 0,33
<b>C17:1</b>	0,35 ± 0,09
<b>C18:1 <i>n9t</i></b>	2,03 ± 0,06
<b>C18:1 <i>n9c</i></b>	18,71 ± 0,32
<b>C18:2 <i>n6c</i></b>	36,33 ± 0,62
<b>C18:3 <i>n3</i></b>	0,59 ± 0,06
<b>C20:5 <i>n3</i></b>	0,02 ± 0,03
<b>ΣAGS</b>	26,29 ± 1,04
<b>ΣAGM</b>	29,39 ± 0,65
<b>ΣAGP</b>	36,94 ± 0,91
<b>Σ<i>n6</i></b>	36,94 ± 0,60
<b>Σ<i>n3</i></b>	0,61 ± 0,15

Resultados de análises realizadas em triplicatas, média ± desvio padrão. AGS = ácidos graxos saturados, AGM = ácidos graxos monoinsaturados, AGP = ácidos graxos poli-insaturados.

Ao realizar análises cromatográficas de extratos etanólicos dos frutos da aroeira, Silva et al. (2017c) determinaram a presença de ácidos graxos saturados como o ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido eicosanóico (C20:0) e ácido docosanóico (22:0), dentre dos quais o ácido palmítico e o ácido esteárico apresentaram maior representatividade. A composição de ácidos graxos de outras partes da *Schinus terebinthifolius* Raddi, como as folhas e a madeira, foi estudada por Salem, Ali e El-Shanhorey (2014) e Salem, El-Shikh e Ali (2014), respectivamente. Nas folhas, os autores determinaram a presença de ácidos graxos como: ácido heptadecanóico (C17:1) 22,56%, ácido esteárico (C18:0) 11,47%, ácido oleico (C18:1) 11,18%, ácido pentadienóico (C15:0) 5,65%, ácido hexadecanóico (C16:1) 5,28%, ácido eicosanóico (C20:0) 7,57%, ácido mirístico (C14:0) 5,21% e ácido palmítico

(C16:0) 4,06%, dentre outros determinados em concentrações menores. A madeira apresentou os ácidos mirístico (C14:0) e ácido erócico (C22:1, *c*) como majoritários.

Os resultados obtidos neste trabalho identificaram o ácido linoleico como o ácido graxo predominante nas amostras, de forma a apresentar os frutos da aroeira como fonte importante deste ácido graxo essencial. O ácido linoleico apresenta diversas propriedades biológicas e funcionais, dentre as quais se destacam a ação hipocolesterolêmica, antiaterogênica e imunoestimulante (SANHUEZA, NIETO e VALENZUELA, 2002). Além disso, podem ser convertidos em ácido  $\alpha$ -linolênico por meio da ação de enzimas, acarretando também a produção enzimática dos ácidos docosapentaenóico e docosahexaenóico, que desempenham funções vitais ao organismo humano (MARTIN et al., 2006).

### 3.3 Compostos bioativos

#### 3.3.1 Fenólicos totais

A tabela 3 demonstra os teores totais determinados para os compostos bioativos avaliados nos frutos da aroeira.

**Tabela 3:** Conteúdo de substâncias fenólicas totais, flavonoides totais, antocianinas totais e carotenoides do extrato dos frutos da aroeira (base seca).

Composto bioativo	Conteúdo
Fenólicos totais <sup>1</sup>	13,66 $\pm$ 0,26
Flavonoides <sup>2</sup>	10,33 $\pm$ 0,34
Antocianinas <sup>3</sup>	0,13 $\pm$ 0,02
Carotenoides <sup>4</sup>	24,66 $\pm$ 0,05

Resultados de análises realizadas em triplicatas, média  $\pm$  desvio padrão. <sup>1</sup>mg EAG/g, <sup>2</sup>mg EQ/g, <sup>3</sup>mg/g de amostra, <sup>4</sup>  $\mu$ g/g de amostra.

Para fenólicos totais observou-se teores de 13,66  $\pm$  0,26 mg EAG/g amostra. Estudos anteriores reportaram valores bastante variáveis para o conteúdo total de substâncias fenólicas. Costa (2011) avaliou o extrato etanólico dos frutos da aroeira colhidos na Bahia, Brasil, obtido por soxhlet e determinou o teor de 20,21 mg EAG/g de extrato. Ennigrou et al. (2017) reportaram um conteúdo de aproximadamente 270 mg EAG/g de extrato, para o extrato metanólico dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi coletados no norte da Tunísia, obtidos por sonificação e maceração por 30 minutos durante 24 horas, respectivamente.

Andrade, Poncelet e Ferreira (2017) avaliaram o conteúdo de substâncias fenólicas em extratos dos frutos da aroeira coletados em Santa Catarina, Brasil, preparados por metodologias distintas (soxhlet, extração assistida por ultrassom e extração com fluido supercrítico) e solventes (hexano, etanol e acetato de etila), e encontraram valores variando de 2,9  $\pm$  0,4 (extração com fluido supercrítico/150 bar/60 °C) a 60  $\pm$  1 mg EAG/g de extrato (soxhlet/etanol). Extratos do exocarpo e de partes internas dos frutos da aroeira foram analisados por Feuereisen et al. (2017), que utilizaram ácido cafeico para obtenção da curva de calibração e encontraram cerca de 50 e 40 mg de ácido cafeico equivalente/g de extrato,

respectivamente.

As variações entre os valores obtidos neste trabalho e os valores determinados na literatura, sugerem que as diferenças podem ser decorrentes de diversos fatores que acarretam modificações na composição dos frutos, tais como: a origem, as condições climáticas, a época de colheita, o grau de maturação, dentre outros. Métodos de processamento e a metodologia aplicada na obtenção dos extratos, os solventes utilizados e as condições de estocagem (ar, temperatura) também podem influenciar o resultado final.

Embora as substâncias fenólicas sejam as principais responsáveis pela atividade antioxidante de frutos, a determinação destes compostos pelo método de *Folin-Ciocalteu* não é capaz de caracterizar totalmente esta propriedade, representando apenas uma boa estimativa da atividade antioxidante (ROGINSKY e LISSI, 2005). De acordo com GARCÍA-ALONSO et al. (2004), a atividade antioxidante de um extrato natural não pode ser atribuída somente a esta classe de compostos, visto que diversos compostos com características antioxidantes presentes em uma amostra apresentam mecanismos de ação distintos, podendo ainda apresentar efeitos sinérgicos e antagônicos. Carotenoides, por exemplo, são excelentes abstratores de oxigênio singlete, assim como ácido ascórbico que não é um sequestrador direto de radicais lipofílicos, apresenta efeito sinérgico quando em presença de tocoferóis na remoção de radicais peróxidos (CAROCHO e FERREIRA, 2013).

### 3.3.2 Flavonoides totais

O conteúdo de flavonoides totais obtido no extrato dos frutos da aroeira foi  $10,33 \pm 0,34$  mg EQ/g amostra (Tabela 3), contribuindo significativamente para o conteúdo de compostos fenólicos totais. Este valor foi maior do que o conteúdo determinado por Ennigrou et al. (2017) em extratos metanólicos de frutos colhidos na Tunísia, obtidos por sonificação seguida de maceração. Estes autores encontraram cerca de 3 mg EQ/g de extrato. Os dois estudos em questão utilizaram o metanol como solvente no preparo dos extratos, mas em proporções distintas. As diferenças nas metodologias aplicadas no preparo do extrato também podem influenciar nos resultados obtidos. Glória et al. (2017), ao utilizar a rutina como padrão na curva de calibração determinaram conteúdo de 140,69 mg de rutina equivalente/g de extrato metanólico dos frutos da aroeira coletados em Campos dos Goitacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

Flavonoides são metabólitos secundários das plantas que caracterizam a pigmentação de seus tecidos. Além das funções fisiológicas exercidas nas plantas, a ingestão destes compostos é associada a diversos benefícios à saúde como a prevenção de doenças cardiovasculares e atividade anticancerígena, anti-inflamatória e antiviral (CHEN et al., 1996; SANTOS et al., 2014; OROIAN e ESCRICHE, 2015). Estudos reportaram a presença de flavonoides como a miricetina, quercetina (TABALDI et al., 2016), naringenina (DEGASPARI, WASZCZYNSKY e PRADO, 2005; GLÓRIA et al., 2017) e apigenina (DEGASPARI, WASZCZYNSKY e PRADO, 2005; BERNARDES et al., 2014) nos frutos da aroeira.

### 3.3.3 Antocianinas totais

O conteúdo total de antocianinas determinado foi  $0,13 \pm 0,02$  mg/g de amostra (Tabela 3). Antocianinas são compostos pigmentados pertencentes ao grupo dos flavonoides



amplamente distribuídos na natureza. Inúmeros estudos apresentam evidências a cerca do potencial preventivo destes a saúde humana (LILA, 2004; TRIEBEL, TRIEU e RICHLING, 2012; WALLACE, SLAVIN e FRANKENFELD, 2016).

Embora nenhum trabalho tenha sido encontrado na literatura a cerca do teor de antocianinas totais dos frutos da aroeira, estudos cromatográficos do exocarpo de frutos da aroeira determinaram a presença de compostos como: 7-O-metil pelargonidina 3-O-galactosídeo, 7-O-metil cianidina 3-O-galactosídeo e 7-O-metil pelargonidina 3-O-galactopiranosídeo (FEUEREISEN et al., 2014; FEUEREISEN et al., 2017).

Visto que os frutos da aroeira são popularmente denominados pimenta rosa e são utilizados na culinária como um substituinte para diversas pimentas, resultados referentes ao gênero *Capsicum* foram analisados para comparação. *Capsicum annuum* L. foram estudadas por Basiouny e Biswas (1981) e Arnnok et al. (2012), os autores reportaram conteúdos de antocianinas totais de 0,29 mg/g (base seca) para pimentas coletadas nos Estados Unidos e 0,0068 mg/g (base seca) para pimentas coletadas na Tailândia, respectivamente. Carvalho et al. (2015) determinaram valores entre 0,06 e 0,18 mg/g (base seca) para distintos genótipos de *Capsicum* cultivados no Brasil. Estes estudos realizados para o gênero *Capsicum* apresentaram resultados próximos ao obtido neste trabalho.

### **3.3.4 Carotenoides**

O conteúdo total de carotenoides determinado para os frutos da aroeira foi  $24,66 \pm 0,05$  µg/g de amostra. Carvalho et al. (2015) notaram elevada variação no conteúdo de carotenoides em diferentes genótipos de *Capsicum* sp., com valores variando de 59,86 a 1349,97 µg/g. Sankari et al. (2017) reportaram a presença de 2,87µg de carotenoides/g de amostra para *Bixa orellana* L. (urucum). Carotenoides presentes em frutas e vegetais apresentam excelentes propriedades antioxidantes, devido à presença de um sistema de ligações duplas conjugadas que atuam neutralizando os radicais presentes no meio (YOUNG e LOWE, 2001).

## **3.4 Atividade antioxidante do extrato dos frutos da aroeira (*In vitro*)**

### **3.4.1 DPPH**

O extrato dos frutos da aroeira apresentou inibição de  $42,68 \pm 0,05$  %, com 303,35 µmol TE/g (Tabela 4). Glória et al. (2017) e Bernardes et al. (2014), reportaram valores variando entre 69% e 77%, e 95,6%, respectivamente. Os dois trabalhos também analisaram extratos metanólicos dos frutos da aroeira, entretanto os extratos foram obtidos por metodologias distintas, o que pode influenciar a eficiência da extração e consequentemente, o resultado final.

Os 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, enquanto Degaspari, Waszczynsky e Prado (2005) e Costa et al. (2015) determinaram 53 e 60%, respectivamente, para extratos etanólicos dos frutos. Extratos etanólicos também foram analisados por Labre et al. (2013), que determinaram um

percentual de inibição de 35,58%. Andrade, Poncelet e Ferreira (2017) avaliaram extratos dos frutos da aroeira preparados por metodologias distintas (soxhlet, extração assistida por ultrassom, extração com fluido supercrítico) e solventes (hexano, etanol e acetato de etila), e encontraram valores variando entre 1,3% (extração com fluido supercrítico/200 bar/60 °C) e 94% (soxhlet/etanol).

**Tabela 4:** Análises antioxidantes *in vitro*.

Frutos da aroeira	
DPPH (% inibição oxidativo)	42,68 ± 0,05
ORAC (μM TE/g)	43,40 ± 6,22
β-caroteno/ácido linoleico (% inibição oxidativo)	61,41 ± 5,30

Resultados de análises realizadas em triplicatas, média ± desvio padrão.

### 3.4.2 ORAC

ORAC é um método que envolve reações de transferência de átomos de hidrogênio, fornecendo valores a cerca da capacidade antioxidante na presença de radicais peroxil (HUANG et al., 2002). Devido aos radicais peroxil serem os radicais predominantes no sistema biológico humano, o método ORAC também apresenta elevada relevância em condições *in vivo* (PRIOR, 2015). Nesta análise, utiliza-se o AAPH como fonte desses radicais que são gerados após sofrer decomposição térmica. Os radicais peroxila diminuem a fluorescência da fluoresceína. O antioxidante adicionado reage com os radicais, doando átomos de hidrogênio e inibindo a perda da intensidade da fluorescência.

O valor determinado neste trabalho foi 43,40 ± 6,22 μM TE/g de amostra (Tabela 4). Não foi encontrado nenhum trabalho na literatura aplicando o método ORAC em frutos da aroeira. A capacidade antioxidante determinada pelo método ORAC para os frutos da aroeira foi semelhante ou superior aos resultados obtidos para outras frutas como blueberry (46,69 μmol TE/g), goji berry (43,10 μmol TE/g) e morango (43,02 μmol TE/g). Entretanto, outras espécies que também são comumente utilizadas na culinária apresentaram valores superiores como, 196,71 μmol TE/g (pimenta-caiena), 1199,29 μmol TE/g (sálvia) e 1314,20 μmol TE/g (canela) (HAYTOWITZ e BHAGWAT, 2010).

### 3.4.3 Sistema β-caroteno/ácido linoleico

O método de oxidação do β-caroteno/ácido linoleico avalia a capacidade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. O Sistema β-caroteno/ácido linoleico mensura a descoloração sofrida pelo β-caroteno a 470 nm (MILER, 1971). A descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoleico ocorre em função das estruturas

radicais formadas pela oxidação do ácido linoleico que atacam as duplas ligações do  $\beta$ -caroteno, perdendo seu cromóforo, resultando na descoloração do complexo alaranjado característico da solução (HUANG e WANG, 2004).

O presente estudo determinou uma porcentagem de inibição de 61,41% para os frutos da aroeira. O BHT, antioxidante sintético amplamente utilizado pela indústria de alimentos, foi utilizado como controle na concentração de 0,2 mg/mL e apresentou porcentagem de inibição de 81,02%. Silva et al. (2017b) encontraram valores superiores, variando de 70,44 a 86,36 % de inibição para extratos metanólicos das folhas da aroeira. Nenhum trabalho foi encontrado na literatura utilizando este método em frutos de aroeira. Embora faltem trabalhos na literatura utilizando análises como o ORAC e o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico para amostras dos frutos da aroeira, dificultando assim comparações, os resultados obtidos no presente estudo são capazes de demonstrar as propriedades antioxidantes presentes nos mesmos.

### 3.5 Identificação dos compostos bioativos presentes nos frutos da aroeira utilizando UPLC-ESI-MS

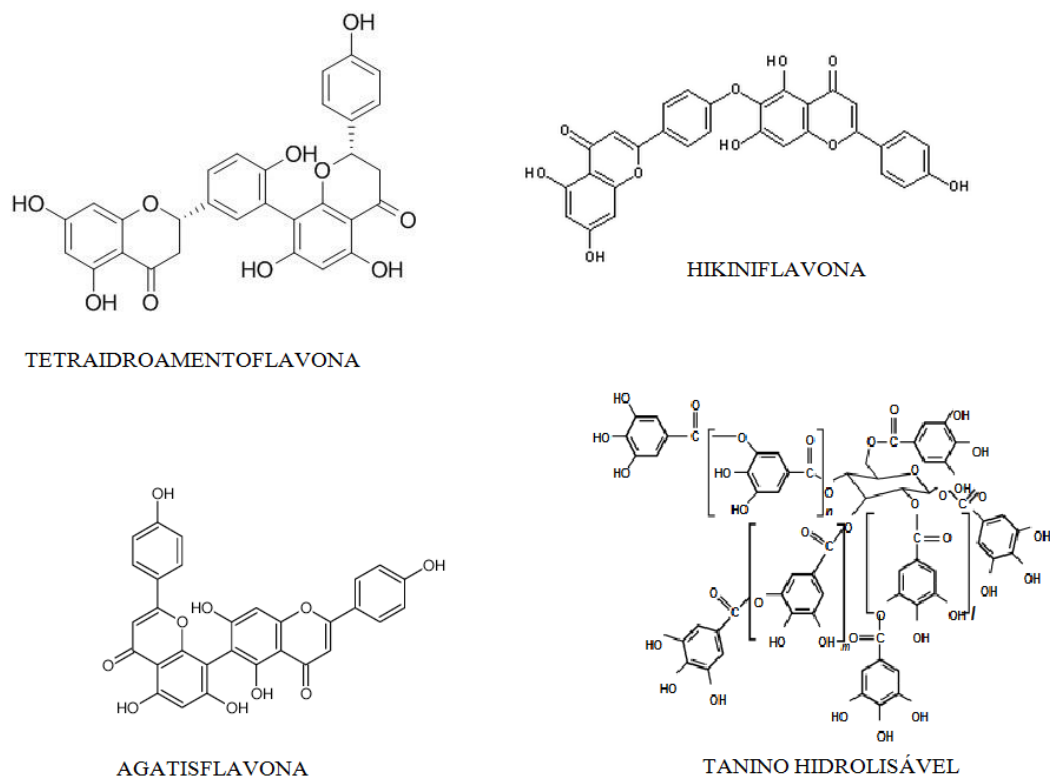
A tabela 5 apresenta os compostos identificados no extrato dos frutos da aroeira para o modo positivo e modo negativo.

**Tabela 5:** Identificação dos compostos presentes na aroeira.

Frutos da aroeira				
Modo positivo				
Tempo de retenção	M+H	ms <sup>2</sup>	Provável identificação	
4,32	447	285	7-O-metil pelargonidina 3-O-galactosídeo	REF 3
4,50	539	403; 375	Biflavona (Hinikoflavona)	REF 3
Modo negative				
Tempo de retenção	M-H	ms <sup>2</sup>	Provável identificação	
2,90	541	415; 389,3	Tetraidroamentoflavona	REF 2
3,20	349	197,2	Galotanino	REF 1
4,35	539	413,1; 387,3; 193,9	Galotanino	REF 1
4,58	537	537,1	Agatisflavona	REF 1
7,53	455	455,6	Ácido 3 $\alpha$ -hidróximasticadienólico	REF 2
REF1 (FEUEREISEN et al., 2014), REF 2 (SILVA et al., 2017c) REF 3 (FEUEREISEN et al., 2017)				

De acordo com a tabela acima foram determinados compostos como taninos, flavonoides e antocianinas que podem apresentar características antioxidantes. Em modo positivo, foram identificados 7-O-metil pelargonidina 3-O- galactosídeo e Hinikoflavona. Os mesmos compostos agrupados como antocianinas e biflavonoides, respectivamente, também

foram identificados em trabalho anterior por Feuereisen et al., (2017). Maior número de compostos foram identificados em modo negativo, sendo determinados flavonoides (Tetraidroamentoflavona, Agatisflavona), ácido 3 $\alpha$ -hidróximasticadienólico e galotaninos, que são taninos hidrolisáveis em que os grupos fenólicos que esterificam o núcleo glicosídico são constituídos por ácido gálico, seu dímero ou um oligômero (HAGERMAN e BUTLER, 1981). Estes mesmos compostos foram identificados anteriormente por FEUEREISEN et al. (2014) e SILVA et al. (2017c). A figura 12 apresenta a estrutura de dos flavonoides identificados nas amostras e de um galatonino (tanino hidrolisável).



**Figura 12:** Estrutura química dos flavonoides identificados nos frutos da aroeira e de um tanino hidrolisável.

Os flavonoides foram as substâncias fenólicas quantificadas em maior teor nas análises referentes aos compostos bioativos dos frutos da aroeira neste trabalho, concordando com a identificação destes compostos pela análise cromatográfica. A ação antioxidante dos flavonoides, assim como de outras substâncias fenólicas identificadas nos frutos, é resultado da facilidade com a qual um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) da sua estrutura é doado para um radical e se mantém estável por meio de estruturas de ressonância (MCCLEMENTS e DECKER, 2010). Além disso, também podem interferir no processo de oxidação atuando como agentes redutores, sequestradores de oxigênio singlete e agentes quelantes de metais (PROCHAZKOVA, BOUŠOVA e WILHELMOVA, 2011; SHAHIDI e AMBIGAIPALAN, 2015).

### 3.6 Atividade antioxidante do extrato dos frutos da aroeira (*in vivo*)

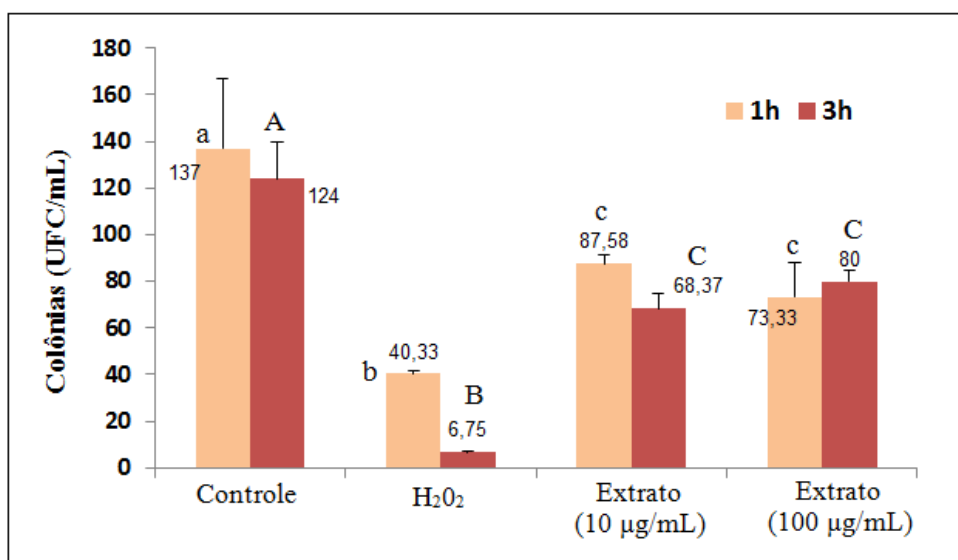
As análises *in vivo* foram realizadas utilizando-se cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), como agente oxidativo. O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é a espécie reativa de oxigênio mais abundante *in vivo*, sendo constantemente produzido como coproduto do metabolismo aeróbico. Desta forma, cepas de *S. cerevisiae* incubadas com extratos dos frutos da aroeira foram submetidas ao estresse oxidativo mediante a presença de peróxido de hidrogênio, com o intuito de observar o efeito antioxidante do extrato natural (CHANAJ-KACZMAREK et al., 2015; JARDIM et al., 2017).

Devido às similaridades bioquímicas e moleculares com as células humanas, a *S. cerevisiae* é considerada um organismo modelo nos estudos e entendimentos de respostas celulares frente ao estresse oxidativo. Além de ser um microrganismo simples e não patogênico, que possui um tempo de geração curto em condições favoráveis e não requer custos elevados para o seu crescimento e manutenção (CHANAJ-KACZMAREK et al., 2015; JARDIM et al., 2017).

As células das leveduras foram analisadas durante a primeira fase exponencial de crescimento, pois neste período as células ainda não possuem um mecanismo de defesa intracelular completamente desenvolvido e apresentam-se mais sensíveis ao ambiente oxidativo. Os ensaios de toxidez visam verificar o potencial que uma substância ou extrato possui para causar a morte das células, através de possíveis danos irreparáveis em suas estruturas e metabolismo celulares. Ao comparar o efeito do extrato com a ação de um agente altamente tóxico ( $H_2O_2$ ), às células da levedura revelaram-se tolerantes à exposição aos extratos, principalmente no tempo de 1 hora.

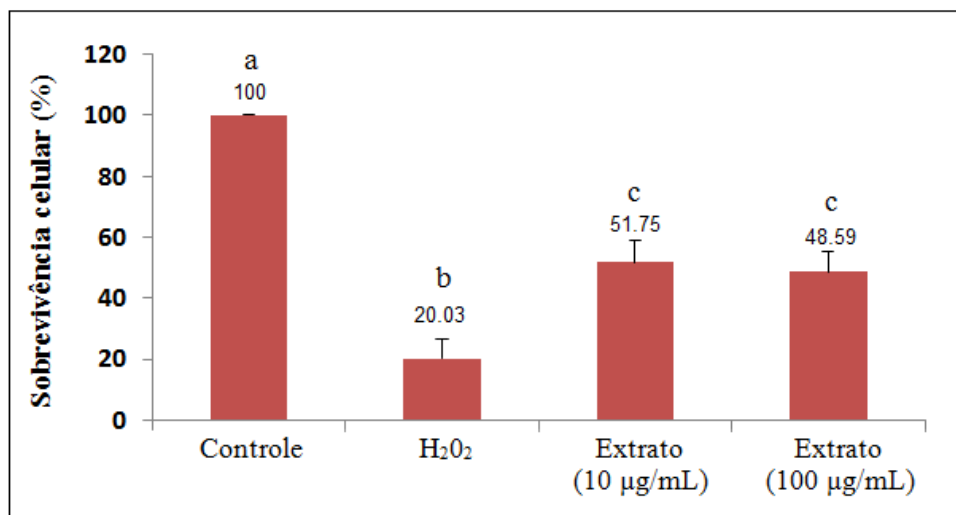
Ao comparar as células controle com as células tratadas com o agente oxidativo, a presença de  $H_2O_2$  reduziu o número de colônias em até 3 vezes, após a exposição pelo período de uma hora, e 17 vezes, após 3 horas. Já o extrato aquoso dos frutos da aroeira, embora tenha reduzido o número de unidades formadoras de colônias (UFC), não apresentou elevada toxicidade às células da levedura, tanto no tempo de 1 hora quanto em 3 horas, e nas duas concentrações avaliadas (10  $\mu\text{g/mL}$  e 100  $\mu\text{g/mL}$ ), sendo que estas não apresentaram diferenças significativas entre si ( $p < 0,05$ ) (Figura 13).



**Figura 13:** Tolerância das células de *S. cerevisiae* expostas ao extrato aquoso dos frutos da aroeira por 1h e 3h.

\*As letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) e as letras maiúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Uma vez realizado o ensaio de toxidez, o próximo passo foi verificar a ação protetora dos extratos em células sob estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio. É interessante ressaltar que a lavagem com água destilada retira o extrato do meio sobrenadante, permitindo assim avaliar apenas a ação dos compostos que provavelmente foram absorvidos pela levedura. A figura 14 demonstra o percentual de sobrevivência celular para os diferentes tratamentos.



**Figura 14:** Viabilidade das células de *S. cerevisiae* pré-incubadas com os extratos dos frutos da aroeira sob estresse oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

\*As letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

De acordo com a figura 13, é possível observar que as células foram drasticamente afetadas pela exposição direta ao peróxido de hidrogênio, apresentando um percentual de sobrevivência celular de 20,03. Entretanto, a exposição das células pré-incubadas com os extratos dos frutos da aroeira aumentou a viabilidade celular em comparação com as células sob estresse oxidativo. Mesmo não atingindo o nível do experimento controle (suspensão celular em tampão fosfato), houve proteção antioxidante dos extratos independente da concentração utilizada, sendo observado um aumento na sobrevivência celular de 20,03% para 51,75% e 48,59%, nos tratamentos em que as células foram pré-incubadas com os extratos dos frutos a 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente.

Nenhum trabalho foi encontrado na literatura para a avaliação da atividade antioxidante *in vivo* dos frutos da aroeira, entretanto diversos extratos naturais e compostos naturais vêm sendo avaliados quanto à toxicidade e atividade antioxidante em experimentos envolvendo a *S. cerevisiae* (SÁ et al., 2013; BAYLIAK et al., 2014; OPREA et al., 2014; FRASSINETTI et al., 2015; STINCO et al., 2015; LINGUA et al., 2016; JARDIM et al., 2017). Em estudo realizado por Sá et al. (2013), o efeito do extrato alcoólico de própolis foi avaliado frente células de *S. cerevisiae* de forma que este não apresentou toxicidade as leveduras em concentrações entre 25 e 100 µg/mL. O pré-tratamento com o extrato natural na concentração de 25 µg/mL antes da exposição a 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 1h foi capaz de aumentar o percentual de sobrevivência celular de aproximadamente 8% para 27%.

Stinco et al. (2015) empregaram a *S. cerevisiae* como modelo celular para avaliar o efeito antioxidante de frações hidrofílicas de suco de laranja. As células foram expostas ao estresse oxidativo pela presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,75 mM) por 1h, de forma que o pré-tratamento com o suco acarretou o aumento entre 23 e 38% na sobrevivência celular. Extratos de uvas

(*Vitis vinifera* L.) também foram avaliados mediante a exposição das células da levedura em questão ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mM) durante 1h, acarretando no aumento entre 14 e 20% na sobrevivência celular quando comparada com o tratamento em que não houve exposição prévia aos extratos (LINGUA et al., 2016).

O estresse oxidativo gerado pela presença de peróxido de hidrogênio induz a ocorrência de danos oxidativos em biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA, que acarretam o desenvolvimento de inúmeras patologias degenerativas (PIMENTEL et al., 2012; JARDIM et al., 2017). Entretanto, compostos fenólicos e outros componentes bioativos presentes em extratos naturais como o do fruto da aroeira podem atuar protegendo contra a ação de oxidantes, embora mecanismos específicos de proteção ainda não sejam caracterizados (LINGUA et al., 2016; JARDIM et al., 2017).

#### 4 CONCLUSÃO

As análises referentes aos frutos da aroeira possibilitaram caracterizar estes frutos quanto à composição centesimal, perfil de ácidos graxos e compostos bioativos. Substâncias fenólicas como os flavonoides foram identificados, determinando as propriedades antioxidantes exibidas pelos frutos da aroeira nas análises *in vitro* e *in vivo*. Visto que, pesquisas envolvendo extratos naturais vêm destacando uma nova tendência na ciência e tecnologia de alimentos, este trabalho sugere a utilização dos frutos da aroeira pela indústria alimentícia de forma a agregar qualidade nutricional e atuar como conservante natural, minimizando o uso de aditivos sintéticos.

## **CAPÍTULO III**

**EFEITO PROTETOR DOS FRUTOS DA AROEIRA (*Schinus terebinthifolius* Raddi) FRENTE A TERMO-OXIDAÇÃO EM SISTEMAS MODELO CONTENDO ÓLEO DE SARDINHAS (*Sardinella brasiliensis*)**



## RESUMO

A degradação de lipídios devido a termo-oxidação acarreta perdas nutricionais e sensoriais nos alimentos, além da formação de produtos da oxidação do colesterol (POCs), reconhecidos pelos seus efeitos citotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos. Este trabalho avaliou o efeito protetor dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) frente à oxidação de ácidos graxos e colesterol em sistemas modelo contendo óleo de sardinhas durante aquecimento. O aquecimento a 150 e 180°C, levou a degradação dos lipídios insaturados contidos no óleo, acarretando a formação de TBARS nas amostras e reduzindo o conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados. Também observou-se o aumento nos teores totais de POCs de  $58,9 \pm 0,26$  µg/g (amostras sem aquecimento) para  $478,2 \pm 0,14$  µg/g e  $577,5 \pm 2,14$  µg/g nas amostras controle aquecidas a 150 e 180 °C, respectivamente. Entretanto, o uso dos frutos da aroeira nas duas concentrações avaliadas (0,2 % e 0,5%) como antioxidante natural reduziu os processos oxidativos em todas as amostras. Embora o antioxidante sintético (BHT) tenha apresentado maior efeito protetor, uma vez que foi utilizado na concentração limite determinada pela legislação, este estudo demonstrou que os frutos da aroeira podem ser utilizados como antioxidantes naturais.

**Palavras-chave:** óleo de sardinha, termo-oxidação, frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi).

## ABSTRACT

Lipids degradation caused by thermo-oxidation leads nutritional and sensorial losses in food, besides the formation of cholesterol oxidation products (COPs), recognized by their cytotoxic, mutagenic and carcinogenic effects. This work evaluated the protective effect of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) fruits against fatty acids and cholesterol oxidation in model systems containing sardines oil during heating. Heating at 150 and 180 °C resulted in the degradation of unsaturated lipids present in the oil, leading to the formation of TBARS in the samples and decreasing the content of polyunsaturated fatty acids. It was also observed the increase of total level of COPs from  $58.9 \pm 0.26 \mu\text{g/g}$  (samples without heating) to  $478.2 \pm 0.14 \mu\text{g/g}$  and  $577.5 \pm 2.14 \mu\text{g/g}$  in control samples heated at 150 and 180 °C, respectively. However, the use of aroeira fruits in both concentrations evaluated (0.2% and 0.5%) as natural antioxidant reduced oxidative processes in all samples. Although the synthetic antioxidant (BHT) had a greater protective effect, since it was used in the limit concentration determined by the legislation, this study demonstrated that aroeira fruits can be applied as natural antioxidant.

**Key-words:** sardine oil, thermo-oxidation, aroeira fruits (*Schinus terebinthifolius* Raddi).

## 1 INTRODUÇÃO

A sardinha brasileira (*Sardinella brasiliensis*), um dos principais recursos marinhos do Brasil, é considerada um importante alimento funcional. O óleo deste pescado é caracterizado pelo rico conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosaexaenóico (DHA), sendo associados à prevenção de doenças cardiovasculares e outros diversos efeitos benéficos à saúde (NASCIMENTO et al., 2016; FERREIRA et al., 2017; FENG et al., 2018; LIU et al., 2018).

Além de serem fonte de ácidos graxos poli-insaturados, os óleos de pescado também apresentam elevados teores de colesterol (SALDANHA, BENASSI e BRAGAGNOLO, 2008; DANTAS et al., 2015). Desta forma, devido à estrutura química destes compostos insaturados, os mesmos são rapidamente oxidados via auto-oxidação quando expostos a fatores como elevadas temperaturas e presença de oxigênio (BARRIUSO et al., 2012; TARVAINEN et al. 2016; FERREIRA et al., 2017). Temperaturas elevadas são indutores relevantes da oxidação lipídica, pois facilitam a formação de radicais ao reduzir a energia de ativação necessária para a abstração do hidrogênio durante as reações oxidativas (BARRIUSO, ANSORENA e ASTIASARÁN, 2017).

O colesterol é relativamente estável em temperaturas abaixo do seu ponto de fusão (147-148 °C), degradando-se a temperaturas em torno de 150 °C, principalmente devido à presença de outros indutores como o oxigênio (BARRIUSO et al., 2012; MEDINA-MEZA e BARNABA, 2013; DEREWIKA e MOLINSKA, 2015). Inúmeros estudos envolvendo a termo-oxidação são realizados a 180 °C, visto que esta representa a temperatura comumente aplicada em processos térmicos culinários (ANSORENA et al., 2013; DEREWIKA e MOLINSKA, 2015; BARRIUSO et al., 2016; FERREIRA et al., 2017; LEAL-CASTAÑEDA et al., 2017).

Os processos oxidativos em alimentos, além de comprometer as características sensoriais destes, também resultam na perda da funcionalidade e produzem compostos que causam efeitos deletérios a saúde, principalmente devido à formação de produtos da oxidação do colesterol (POCs) (DANTAS et al., 2015). Diversos autores reportaram sobre os efeitos citotóxicos, aterogênicos, mutagênicos, neurodegenerativos e carcinogênicos apresentados por POCs de origem exógena, obtidos a partir da ingestão de produtos de origem animal processados (KULIG et al., 2015; KULIG et al., 2016; OLIVIER et al., 2017; ROSA-FERNANDES et al., 2017).

Com o intuito de retardar ou inibir os processos oxidativos, os antioxidantes são amplamente utilizados pela indústria de alimentos. Entretanto, devido aos questionamentos sobre a segurança e toxicidade de aditivos sintéticos como o BHT (butilidroxitolueno), BHA (butilidroxianisol), GP (galato de propila) e TBHQ (*terc*-butilidroquinona), o uso de antioxidantes naturais como ervas, especiarias e frutos vêm se destacando como uma estratégia efetiva no controle da oxidação de ácidos graxos e colesterol (MI, GUO e LI, 2016; VAISALI, BELUR e REGUPATHI, 2016; TARVAINEN et al., 2016; BARRISO et al., 2016; FERREIRA et al., 2017; ZHANG et al., 2017).

A aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) é uma planta nativa da América do Sul, vastamente distribuída entre o norte e sul do Brasil. Apresenta elevado potencial de uso, onde seus frutos são utilizados pela culinária (CARVALHO et al., 2013; GOMES et al., 2013), e pela medicina popular (EL-MASSARY et al., 2009; BERNARDES et al., 2014). Diversos estudos reportaram a aroeira como fonte de compostos bioativos e antioxidantes como taninos, alcaloides, flavonoides, terpenos e outros (EL-MASSARY et al., 2009; CARVALHO et al., 2013; CAVALCANTI et al., 2015; GOIS et al., 2017).

Neste estudo, o efeito protetor dos frutos da aroeira sobre a termo-oxidação do

colesterol e ácidos graxos poli-insaturados foi avaliado em sistemas modelo contendo óleo de sardinhas, a partir de análises de TBARS, determinação de ácidos graxos, degradação do colesterol e formação de POCs, respectivamente.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes e padrões

Os reagentes utilizados no experimento foram: metanol, hexano e etanol (Neon); sulfato de sódio anidro, ácido acético glacial, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, isopropanol, ácido tricloroacético e clorofórmio (Vetec); BHT (butilhidroxitolueno), TEP (1,1,3,3-tetraetoxipropano); metóxido de sódio e hexano UV-HPLC (Sigma-Aldrich); 2-ácido tiobarbitúrico (Merck) e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (Dinâmica Química Contemporânea LTDA). O éster metílico do ácido undecanóico foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) e o FAME mix de ácidos graxos da Supelco (Supelco TM FAME Mix 18919, Bellefonte, PA, USA). 20 $\alpha$ -hidroxicolestero, 22S-hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol, 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol e 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Colesterol e 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol foram obtidos da empresa Steraloids (Wilton, N.H., U.S.A.).

### 2.2 Sardinhas e extração do óleo

As sardinhas (*Sardinella brasilliensis*) foram capturadas em Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil (latitude 23°00'24"S e longitude 44°19'05"W), em abril de 2017. As mesmas foram transportadas a temperatura de refrigeração para a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. Os peixes inteiros foram lavados e imediatamente processados em moedor (Becker, SC, Brasil), com o intuito de obter uma massa homogênea, que foi posteriormente seca em estufa ventilada (Solab, SP, Brasil) a 50 °C por 72 horas.

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. Amostras de 50 g de sardinhas secas foram homogeneizadas com a mistura clorofórmio-metanol-água (400 mL de metanol, 200 mL de clorofórmio e 100 mL de água destilada) por 1 hora. Em seguida, 200 mL de clorofórmio e 100 mL de água destilada foram adicionados, seguido por mais uma hora de homogeneização. Todo o processo de homogeneização foi conduzido à temperatura ambiente e ausência de luz. Após o total de duas horas de homogeneização, a mistura foi filtrada em papel de filtro e separada em funil de separação. A fase de clorofórmio foi escoada para balão passando por filtro de papel coberto por sulfato de sódio anidro, de forma a reter qualquer molécula de água presente no sistema. Na sequência, o solvente foi evaporado em evaporador rotatório (Fisatom, SP, Brasil) a 40 °C e o óleo transferido para frasco âmbar, submetido à atmosfera de nitrogênio (99%, White Martins, RJ, Brasil), sendo armazenado a temperatura de refrigeração (4 °C – 8 °C) até preparo dos sistemas modelo. O conteúdo de lipídios determinado gravimetricamente foi de 10,2 g de lipídios/100g de pescado.



**Figura 15:** Amostras e extração do óleo das sardinhas.

### 2.3 Obtenção e preparo dos frutos da aroeira

Os frutos maduros da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) foram coletados na Embrapa Agroindústria de Alimentos localizada em Guaratiba, Rio de Janeiro, Brasil (latitude 23°00'00,3"S e longitude 43°34'56,7"W), em junho, 2017.

Os frutos frescos coletados foram selecionados, secos em estufa ventilada (Solab, SP, Brasil) a 40 °C por 48 horas e moídos em processador doméstico (Cadence, Brazil) até adquirir aspecto de pó. Em seguida, os frutos moídos foram transferidos para embalagens de polietileno e mantidos a temperatura ambiente e ausência de luz até o preparo dos sistemas modelo.

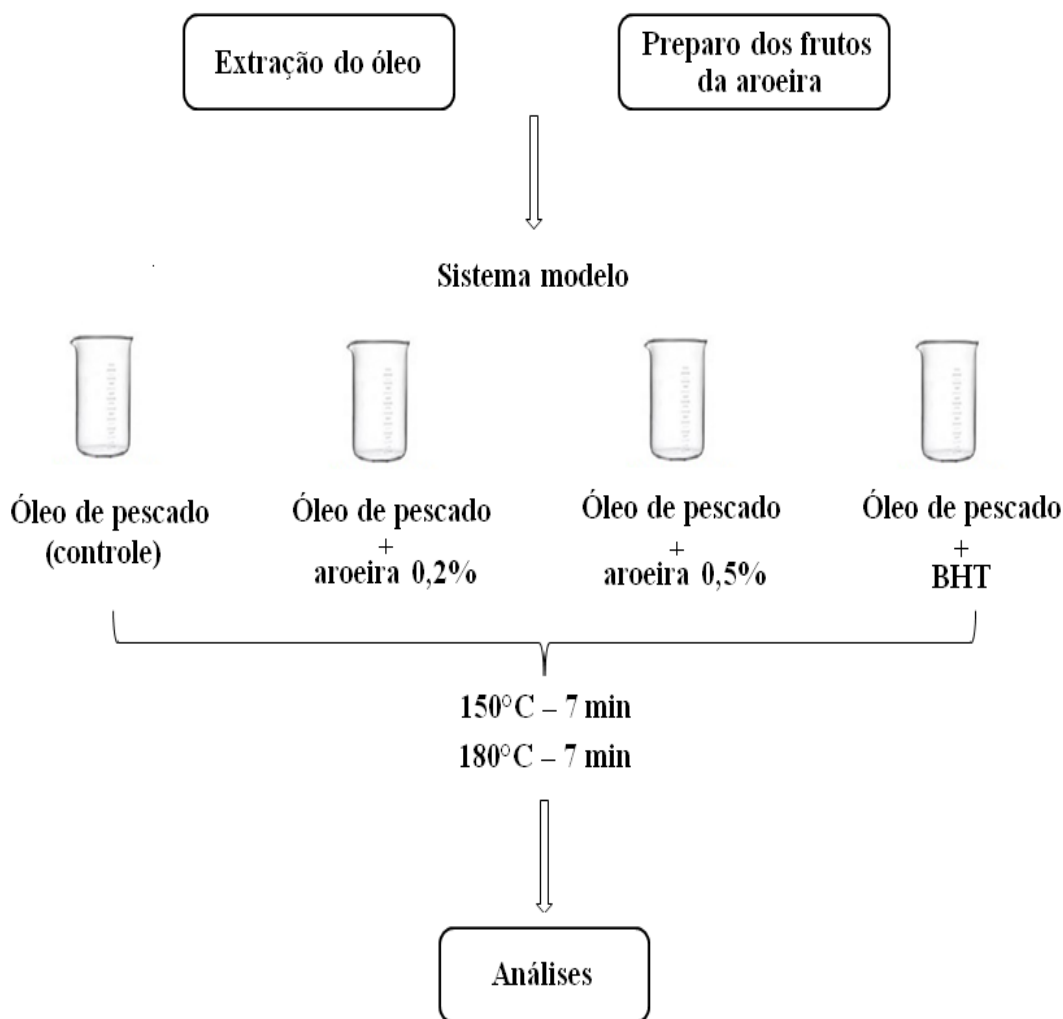
### 2.4 Sistemas modelo: preparo das amostras e aquecimento

Para os sistemas modelo, 4 tratamentos distintos foram preparados. O tratamento controle foi a amostra de óleo puro, sem adições. Os outros tratamentos foram: óleo com adição de 0,2% dos frutos da aroeira secos e moídos, óleo com adição de 0,5% dos frutos da aroeira secos e moídos e óleo com adição de BHT (100 ppm ou 0,01%). A porcentagem dos aditivos adicionados foi calculada de acordo com o peso do óleo.

Os tratamentos com os frutos da aroeira foram preparados de acordo com Karwowska e Dolatowski (2014), onde antioxidantes naturais foram efetivos na prevenção da oxidação do colesterol em carnes nas concentrações utilizadas. Para o tratamento com o antioxidante sintético, a adição de BHT 100 ppm foi realizada de acordo com o conteúdo máximo permitido pela legislação brasileira (BRASIL, 1988).

Alíquotas de 7 mL de óleo foram homogeneizadas com os aditivos (exceto as amostras controle), de acordo com cada tratamento, em béqueres que foram dispostos em estufa (Quimis, SP, Brasil), previamente estabilizada na temperatura estabelecida (150 ou 180 °C). Em seguida, após 7 minutos de aquecimento (modelando o tempo médio de aquecimento de pescado em processos culinários), os béqueres foram retirados da estufa e mantidos em dessecador. As amostras foram transferidas para frascos âmbar e armazenadas a temperatura de refrigeração (4 °C – 8 °C) para posterior realização das análises. A figura 16 apresenta o

delineamento dos procedimentos no preparo dos sistemas modelo.



**Figura 16:** Esquema dos procedimentos para preparo dos sistemas modelo.

## 2.5 Determinação das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A quantificação das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Vyncke (1975), com modificações. Em tubos, 5 mL da solução de TCA (75 g de ácido tricloroacético, 1 g de EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) 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 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).

## 2.6 Determinação dos ácidos graxos

Os ácidos graxos presentes nas amostras de óleo foram convertidos a ésteres metílicos por transesterificação de acordo com Zhu et al. (2011), com modificações. Em tubos, 2 mL de solução metanólica de metóxido de sódio 2,5 M foram adicionados as amostras (0,05 g) e sonificados em ultrassom (Elmasonic P, Elma Schmidbauer GmbH) por 10 minutos (40 Hz). Em seguida, 0,1 mL de ácido acético glacial, 2,5 mL de solução saturada de hidróxido de sódio e 1 mL de hexano foram adicionados. Os tubos foram agitados em vortex e a fração hexânica separada. A extração com 1 mL de hexano foi repetida 3 vezes, perfazendo o total de 4 extrações. Na sequência, tubos contendo as frações hexânicas separadas foram direcionados a secagem em estufa ventilada (Solab, SP, Brasil) a 40 °C. Antes da análise por cromatografia gasosa, as amostras foram ressuspensas com hexano UV-HPLC (700 µL) e o padrão interno (éster metílico do ácido undecanóico, 300 µL) totalizando 1 mL, sendo filtradas na sequência (Millipore, Maryland, MD, USA).

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram determinados de acordo com Saldanha, Benassi e Bragagnolo (2008), com modificações. Utilizou-se um cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC 2010, Tokio, Japão), equipado com injetor split (1:50), detector de ionização em chamas e coluna capilar de sílica fundida CP-SIL 88 (100 m x 0,25 mm x 0,20 µm) (Chrompack, Middelburg, The Netherlands), coluna de alta polaridade e quimicamente não ligada, apresentando fase estacionária de cianopropil. As condições cromatográficas foram: temperatura inicial da coluna, 140 °C (5 minutos); taxa de aquecimento 4 °C/min, até temperatura de 230 °C (0 minuto); taxa de aquecimento 5 °C/min, até temperatura de 240 °C (18 minutos). As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas em 250 °C e 280 °C, respectivamente. Hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a 30 mL/min, e o nitrogênio como “make-up gas” a 30 mL/min.

Os tempos de retenção dos padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (Supelco TM FAME Mix 37, Bellefonte, PA, USA) foram usados para identificar os picos cromatográficos das amostras. A quantificação foi realizada por padronização interna, utilizando o éster metílico do ácido undecanóico (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), como padrão interno. Na padronização interna adiciona-se uma quantidade conhecida do padrão interno de concentração também conhecida nas amostras, de forma que um gráfico é construído relacionando a razão (área de cada padrão/área do padrão interno) pela concentração de cada padrão. Como na amostra é adicionada a mesma quantidade do padrão interno, através da razão das áreas obtidas no cromatograma da amostra, pode-se obter a concentração do analito (COLLINS e BRAGA, 1992).

## 2.7 Determinação do colesterol e óxidos de colesterol

Colesterol e óxidos de colesterol foram obtidos simultaneamente por saponificação direta das amostras (DIONISI et al., 1998). Em tubos, 10 mL da solução etanólica de hidróxido de potássio 1 M foram adicionados a 0,15 g de óleo. A saponificação foi conduzida a temperatura ambiente por 22 horas na ausência de luz. Para a extração da fração insaponificável, 5 mL de água destilada e 10 mL de hexano foram adicionados as amostras, em seguida a mistura foi homogeneizada em vortex e a fração hexânica separada. A extração com 10 mL de hexano foi repetida 3 vezes, perfazendo um total de 4 extrações. Na sequência, a fração hexânica foi seca em evaporador rotatório (Fisatom, SP, Brasil) a 40 °C, e o resíduo ressuspensado em 3 mL de hexano, sendo então transferidos para tubos que foram

direcionados a secagem em estufa ventilada (Solab, São Paulo) a 40 °C. Antes da análise cromatográfica, as amostras foram ressuspensas na fase móvel (hexano/isopropanol, 97:3), filtradas (Millipore, Maryland, MD, USA) e injetadas.

A identificação e quantificação do colesterol e dos óxidos de colesterol foram realizadas utilizando-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas, de acordo com Saldanha et al. (2006), com modificações. O equipamento utilizado neste trabalho consistiu de um HPLC-MS-PDA (Shimadzu LCMS-2020, Tóquio, Japão), equipado com auto-Injetor (modelo SIL-10AF, Shimadzu, Tóquio, Japão), coluna Hypersil Cyano (250 mm x 4,6 mm) (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), controlador de sistema (modelo CBM-20A, Shimadzu, Tóquio, Japão), detector de arranjo de fotodiodos (PDA – “*Photo Diode Array Detector*”, modelo SPD-M20A, Shimadzu, Tóquio, Japão) e detector de massas (Shimadzu LCMS-2020, Tóquio, Japão). A vazão da bomba (modelo LC-20AD, Shimadzu, Tóquio, Japão) utilizada foi de 1 mL/min e a temperatura da coluna 35 °C, forno da coluna modelo CTO-20A (Shimadzu, Tóquio, Japão).

O detector de massas trabalha com interface de ionização química a pressão atmosférica (APCI - “*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*”) modo positivo, módulo de aquisição SIM (“*Selected Ion Monitoring*”) e tempo de aquisição de 32 minutos. Os principais íons foram determinados no modo SIM, a partir das massas apresentadas na tabela 6, de acordo com a ordem de eluição dos compostos. O colesterol e os óxidos de colesterol foram identificados por meio da comparação dos tempos de retenção determinados para os padrões e pela razão  $m/z$ . A quantificação foi realizada por padronização externa através de curvas de calibração ( $r^2 > 0,95$ ), de acordo com Saldanha et al., (2006).

**Tabela 6:** Intensidade relativa dos principais íons de colesterol e óxidos de colesterol em HPLC-APCI(+)-MS.

Composto	Intensidade relativa % (m/z)				
	367	385	369	401	403
Colesterol	5	5	100	-	-
20 $\alpha$ -OH	100	95	10	-	-
25R-OH	100	100	10	-	-
5,6 $\alpha$ -EP	50	100	10	-	20
5,6 $\beta$ -EP	25	100	10	-	10
7-ceto	-	-	-	100	10
7 $\beta$ -OH	100	30	10	-	-
7 $\alpha$ -OH	100	30	10	-	-

\*Espectros de massas do colesterol e seus óxidos de acordo com os íons moleculares: 367, 385, 369, 401 e 403. Os compostos estão listados em ordem de eluição. 20 $\alpha$ -OH (20 $\alpha$ -hidroxicolesterol), 25R-OH (25R-hidroxicolesterol), 5,6 $\alpha$ -EP (5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol), 5,6 $\beta$ -EP (5,6 $\beta$ -epoxicolesterol), 7-ceto (7-cetocolesterol), 7 $\beta$ -OH (7 $\beta$ -hidroxicolesterol), 7 $\alpha$ -OH (7 $\alpha$ -hidroxicolesterol).

## 2.8 Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey em nível de 95% de significância, utilizando o *software* R versão 3.2.4. Os resultados das triplicatas foram expressos por meio de médias seguidas dos desvios padrões. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Os resultados obtidos para a análise de TBARS estão dispostos na tabela 7. O óleo sem aquecimento apresentou um valor de TBARS de  $0,0026 \pm 0,41$  g MDA/100g de óleo. O aquecimento do óleo levou ao aumento do teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Após o aquecimento a  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ , o valor de TBARS aumentou para  $0,0081 \pm 0,45$  g MDA/100g nas amostras controle, entretanto a adição dos antioxidantes foi capaz de minimizar os processos oxidativos.

**Tabela 7:** Valores de TBARS das amostras de óleo (g/100g de amostra).

<b>Sem aquecimento</b>		$0,0026 \pm 0,41$		
<b>150 °C</b>	<b>Controle</b>	<b>Aroeira 0,2%</b>	<b>Aroeira 0,5%</b>	<b>BHT</b>
	$0,0081 \pm 0,45$	$0,0072 \pm 0,24$	$0,0063 \pm 0,20^*$	$0,0062 \pm 0,50^*$
<b>180 °C</b>	<b>Controle</b>	<b>Aroeira 0,2%</b>	<b>Aroeira 0,5%</b>	<b>BHT</b>
	$0,0116 \pm 0,50$	$0,0094 \pm 0,33$	$0,0085 \pm 0,47^{**}$	$0,0084 \pm 0,35^{**}$

\*Tratamentos que não apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\*\*Tratamentos que não apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

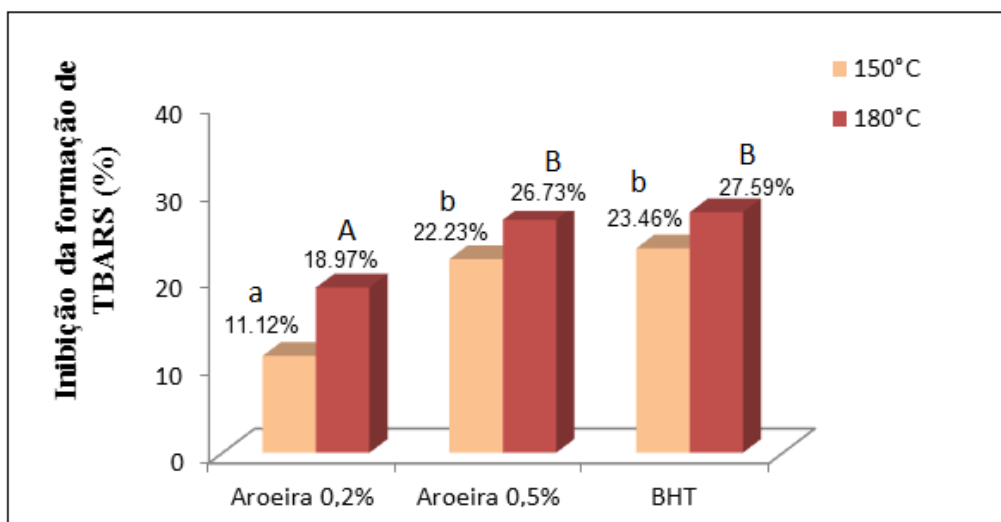
O valor encontrado neste trabalho para o óleo sem aquecimento foi superior ao valor observado em trabalhos anteriores para óleo de sardinhas e pescado sem processamento térmico. Jaswir et al. (2009) encontraram valores variando de  $0,00012$  a  $0,00014$  g MDA/100g de amostra para óleos de 5 espécies de pescado diferentes (*Cynoglossus língua*, *Psettodes crumei*, *Scomberomorus commersoni*, *Pristipomodes typus* e *Scolidon sorrakowah*).

Óleo de sardinhas e óleo de pescado comercial, foram avaliados por Grigorakis et al. (2010), sendo determinado teores de  $0,0005$  e  $0,00096$  g MDA/100g de óleo, nas duas amostras avaliadas, respectivamente. O conteúdo de  $0,0052$  g MDA/100g de amostra foi quantificado em emulsão de óleo de pescado/água (MAQSOOD e BENJAKUL, 2010). Outros estudos envolvendo o pescado *in natura* observaram valores na faixa de  $0,000076$  g MDA/100g de tecido muscular (OZOGUL et al., 2011; RAEISI et al., 2016).

Os valores determinados nos estudos citados apresentam uma grande variação entre si. A formação de malonaldeído em amostras que não foram submetidas a nenhum processamento térmico, pode variar de acordo com a espécie, a composição do pescado e condições ambientais a que estes são expostos, visto que fatores intrínsecos e extrínsecos ao pescado podem influenciar e atuar como pró-oxidantes. A presença de pigmentos como a hemoglobina e a mioglobina, traços de ferro e cobre, sal e ácidos graxos poli-insaturados em pescado aceleram as reações oxidativas (MAQSOOD et al., 2014), que são induzidas na presença de iniciadores como o calor, luz, radicais, pigmentos fotossensibilizantes e íons metálicos (LAGUERRE, LECOMTE e VILLENEUVE, 2007).

O tratamento térmico acarretou o aumento dos valores de TBARS para ambas as temperaturas avaliadas, devido à degradação de hidroperóxidos quando os óleos foram expostos a temperaturas elevadas. Após  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ , o valor de TBARS triplicou. Foram observados teores mais elevados após aquecimento a  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Entretanto, a presença dos

antioxidantes no meio reduziu a formação de malonaldeído. A figura 17 apresenta o efeito protetor dos antioxidantes frente à formação de TBARS a 150 e 180 °C.



**Figura 17:** Inibição da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nos diferentes tratamentos com antioxidantes a 150 °C e 180 °C.

\*As letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) e as letras maiúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

De acordo com o gráfico apresentado acima, é possível observar o efeito protetor dos antioxidantes, tanto o antioxidante natural (aroeira 0,2% e 0,5%) quanto o BHT. No tratamento a 180 °C, a adição dos frutos da aroeira foi capaz de inibir a formação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em 18,97% e 26,73% nas adições a 0,2% e 0,5%, respectivamente. O BHT apresentou um percentual de inibição superior (27,59%), entretanto a diferença entre os tratamentos com o BHT e a aroeira a 0,5% não apresentaram diferenças significativas estatisticamente, em ambas às temperaturas aplicadas.

Os frutos da aroeira nas concentrações testadas exibiram um potencial inibidor próximo ao apresentado pelo BHT, sugerindo assim a substituição do antioxidante sintético pelo natural. O efeito antioxidante observado nos frutos da aroeira é provavelmente associado à presença de compostos bioativos presentes nos frutos, conforme discutido no capítulo 2 do presente estudo (flavonoides, antocianinas, taninos) e outros compostos bioativos (EL-MASSARY et al., 2009; CARVALHO et al., 2013; CAVALCANTI et al., 2015), que podem atuar inibindo as reações em cadeia ao proteger os lipídios por meio da doação de átomos de hidrogênio, ou protegendo os lipídios de iniciadores destas reações (OJAGH et al., 2010).

Nieto et al. (1993) comparam o efeito de 6 flavonoides comerciais (hesperidina, naringina, morina, rutina, catequina e quercetina) com  $\alpha$ -tocoferol frente a oxidação lipídica em óleo de sardinhas a 60 °C. Todos os antioxidantes testados foram eficientes no controle da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, entretanto apenas a quercetina apresentou efeito protetor superior ao  $\alpha$ -tocoferol, nas condições testadas, sendo capaz de reduzir cerca 68% o valor de TBARS.

A presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico é sinal de ocorrência do estágio secundário de oxidação de forma que valores altos são indesejáveis sendo associados ao desenvolvimento de ranço em alimentos. Diversos autores confirmaram o efeito protetor de antioxidantes naturais como alecrim (*Rosmarinus officinalis*), chalota (*Allium ascalonicum* L.), ajowan (*Trachyspermum ammi* (L.) Sprague), sementes de funcho (*Foeniculum vulgare*), pimenta-preta (*Piper nigrum*) e caneleira-verdadeira (*Cinnamomum verum*), frente à formação

de substâncias reativas ao TBA durante a estocagem refrigerada de pescado e óleo de pescado (MAQSOOD e BENJAKUL, 2010; OZOGUL et al., 2011; DE e CHATTERJEE, 2015; MI, GUO e LI, 2016; RAEISI et al., 2016; VAISALI, BELUR e REGUPATHI, 2016).

### **3.2 Efeito protetor dos frutos da aroeira sobre os teores de ácidos graxos após a termo-oxidação**

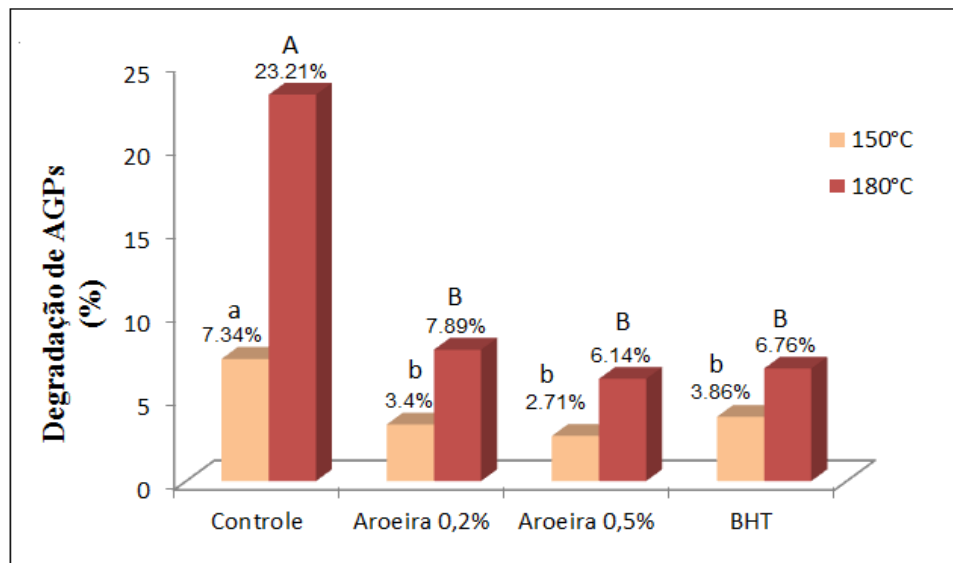
A tabela 8 apresenta a composição de ácidos graxos das amostras de óleo de sardinhas (g/100g de amostra). Foram identificados um total de 29 ácidos graxos nas amostras avaliadas. No óleo de sardinhas, o grupo dos ácidos graxos saturados apresentou teores mais elevados ( $38,02 \pm 2,08$  g/100g) seguido dos ácidos graxos poli-insaturados ( $36,54 \pm 0,68$  g/100g) e monoinsaturados ( $22,06 \pm 1,26$  g/100g), respectivamente.

Os ácidos graxos majoritários identificados foram os ácidos palmítico (C16:0), eicosapentaenóico EPA (C20:5 *n*3), docosaexaenóico DHA (C22:6 *n*3), oleico (C18:1 *n*9c), palmitoleico (C16:1 *n*7), mirístico (C14:0) e esteárico (C18:0).

O ácido palmítico apresentou o maior teor dentre os ácidos graxos identificados ( $21,66 \pm 1,44$  g/100g), seguido pelo EPA ( $15,04 \pm 0,17$  g/100g) e DHA ( $12,61 \pm 0,26$  g/100g), respectivamente. Trabalhos anteriores referentes à composição de ácidos graxos de óleo de pescado e pescado apresentaram resultados semelhantes aos observados (SALDANHA, BENASSI e BRAGAGNOLO, 2008; SAHENA et al., 2009; CHITRA SOM e RADHAKRISHNAN, 2013; BAHURMIZ, ADZITEY e NG, 2017; BANDARRA et al., 2018). Embora DHA seja comumente encontrado em concentrações superiores ao EPA, a composição de pescado é bastante variável em função de fatores ambientais e intrínsecos as espécies, justificando o maior conteúdo de EPA determinado nas amostras deste trabalho, assim como em resultados observados por Kindleysides, Quek e Miller (2012) e Chitra Som e Radhakrishnan (2013).

No presente trabalho foi determinado o teor de  $27,65 \pm 0,21$  g/100g para o somatório de EPA e DHA nas amostras antes do aquecimento. Além disso, também foi determinada a razão  $\omega 3/\omega 6$  de 4,06, demonstrando o maior teor de ácidos graxos da série  $\omega 3$ . A concentração elevada de ácidos graxos da série  $\omega$ 3, principalmente EPA e DHA, é uma característica que vem destacando os óleos marinhos no âmbito global devido às propriedades benéficas destes compostos a saúde humana. Embora os ácidos graxos da série  $\omega$ 6 participem de funções vitais ao organismo, os mesmos atuam no desenvolvimento de processos inflamatórios e uma dieta desequilibrada em excesso de  $\omega 6$ , pode dificultar a conversão do ácido  $\alpha$ -linolênico em DHA e EPA, devido a competição por enzimas que atuam na síntese destes compostos (MARTIN et al., 2006; SIMOPOULOS, 2008).

Entretanto, o aquecimento acarretou a queda do conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados, em aproximadamente 7% e 23% nas amostras controle nos tratamentos a 150 e 180 °C, respectivamente, podendo-se observar a diminuição no conteúdo de ácidos graxos, principalmente nas amostras aquecidas a 180 °C. A figura 18 apresenta o percentual de degradação dos ácidos graxos poli-insaturados (AGPs) nos diferentes tratamentos.



**Figura 18:** Degradação de AGPs nos diferentes tratamentos a 150 °C e 180 °C.

\*As letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) e as letras maiúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O aquecimento acarretou a redução dos teores de EPA e DHA. O conteúdo para o somatório de EPA + DHA reduziu de  $27,65 \pm 0,21$  para  $26,09 \pm 0,24$  g/100g de óleo (tratamento a 150 °C) e  $22,07 \pm 0,18$  g/100g de óleo (tratamento a 180 °C). Após o aquecimento a 180 °C, o conteúdo de ácidos graxos saturados reduziu de  $38,02 \pm 2,08$  para  $36,91 \pm 0,18$  g/100g de óleo, enquanto que para os ácidos graxos poli-insaturados observou-se a redução de  $36,54 \pm 0,68$  para  $28,06 \pm 0,28$  g/100g de óleo, de forma que o percentual de degradação foi superior para os ácidos graxos poli-insaturados (23,21%) quando comparados aos saturados (2,92%).

A adição dos antioxidantes naturais e sintético ao óleo proporcionou efeito protetor frente à degradação dos ácidos graxos. O tratamento com adição dos frutos da aroeira 0,5% foi mais efetivo que o tratamento com a adição de aroeira 0,2% e BHT considerando a degradação dos ácidos graxos poli-insaturados, entretanto a diferença observada não foi significativa ( $p < 0,05$ ).

Neste trabalho, o tratamento a 180 °C sem a adição de nenhum antioxidante, apresentou queda de 9,58% e 32,84% para EPA e DHA, respectivamente, quando comparados com o óleo sem aquecimento. Os frutos da aroeira exibiram atividade antioxidante mantendo 99,04% (aroeira 0,2%) e 99,68% (aroeira 0,5%) de EPA e 94,54% (aroeira 0,2%) e 95,34% (aroeira 0,5%) de DHA. Estes resultados foram bastante similares aos observados no tratamento com BHT, sugerindo que nas concentrações avaliadas os frutos da aroeira podem proteger os ácidos graxos, incluindo EPA e DHA, dos processos oxidativos, atendendo a demanda dos consumidores por alimentos isentos de aditivos artificiais, devido ao potencial tóxico e carcinogênico destes (KUMAR et al., 2015; MI, GUO e LI, 2016; MUNEKATA et al., 2017).

Ácidos graxos poli-insaturados são altamente susceptíveis a oxidação, e a exposição a temperaturas elevadas e ao oxigênio aceleram o processo oxidativo. García-Arias et al. (2003) verificaram que após 22 minutos de cozimento em forno convencional de filés de sardinha a 200 °C, ocorreu a redução do teor total de ácidos graxos poli-insaturados de  $5,82 \pm 0,03$  g/100g (base úmida) para  $5,47 \pm 0,01$  g/100g. Quando as sardinhas foram fritas durante 3 minutos a perda dos ácidos graxos foi maior, chegando ao conteúdo de  $4,30 \pm 0,02$  g/100g.

Leal-Castañeda et al. (2017) constataram a queda de aproximadamente 10% no conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados de óleo de pescado, após 10 minutos de aquecimento utilizando-se forno convencional a 180 °C. A redução no teor de ácidos graxos poli-insaturados em pescado e óleo de pescado após tratamento térmico também foi observada em outros estudos (BHALE et al., 2007; SALDANHA, BENASSI e BRAGAGNOLO, 2008; FERREIRA et al., 2017).

Estudos anteriores também verificaram o efeito protetor de extratos naturais frente à degradação de ácidos graxos em pescado e óleo de pescado (GANGA et al., 1998; HUBER, RUPASINGHE e SHAHIDI, 2009; OZOGUL et al., 2011; FIGUERÊDO et al., 2015; FERREIRA et al., 2017). A quercetina apresentou maior efeito antioxidante que o BHT perante a termo-oxidação induzida de óleo de pescado (WANASUNDARA e SHAHIDI, 1998). De acordo com Bhale et al. (2007), extratos de orégano e alecrim em concentrações distintas (entre 1 e 5%) foram capazes de proteger o DHA de 38,8 % a 65,9%, e EPA de 44,7% a 69,0% frente a degradação térmica (aquecimento a 150 °C por 30 minutos).

**Tabela 8:** Composição de ácidos graxos das amostras de óleo (g/100g de amostra) (continua).

	Controle	Aroeira 0,2%	Aroeira 0,5%	BHT	Controle	Aroeira 0,2%	Aroeira 0,5%	BHT	
Sem aquecimento	150 °C								
C12:0	0,09 ± 0,00	0,08 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,02 <sup>A</sup>	0,08 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>A</sup>
C14:0	8,41 ± 0,41	8,33 ± 0,04 <sup>a</sup>	8,3 ± 0,156 <sup>a</sup>	8,35 ± 0,09 <sup>a</sup>	8,35 ± 0,08 <sup>a</sup>	8,26 ± 0,06 <sup>A</sup>	8,39 ± 0,05 <sup>A</sup>	8,40 ± 0,16 <sup>A</sup>	8,40 ± 0,06 <sup>A</sup>
C15:0	0,96± 0,04	0,90 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,96 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,91 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,89 ± 0,02 <sup>A</sup>	0,91 ± 0,03 <sup>A</sup>	0,94 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,91 ± 0,01 <sup>A</sup>
C16:0	21,66 ± 1,44	21,54 ± 0,05 <sup>a</sup>	21,55 ± 0,02 <sup>a</sup>	21,61 ± 0,15 <sup>a</sup>	21,61 ± 0,24 <sup>a</sup>	21,39 ± 0,23 <sup>A</sup>	21,42 ± 0,4 <sup>A</sup>	21,52 ± 0,26 <sup>A</sup>	21,57 ± 0,26 <sup>A</sup>
C17:0	0,84 ± 0,05	0,81 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,84 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,07 <sup>A</sup>	0,79 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,81 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,82 ± 0,07 <sup>A</sup>
C18:0	5,08 ± 0,23	4,86 ± 0,03 <sup>a</sup>	4,90 ± 0,03 <sup>a</sup>	4,90 ± 0,03 <sup>a</sup>	4,88 ± 0,09 <sup>a</sup>	4,78 ± 0,04 <sup>AB</sup>	4,75 ± 0,03 <sup>B</sup>	5,04 ± 0,07 <sup>A</sup>	5,00 ± 0,06 <sup>AB</sup>
C20:0	0,62 ± 0,02	0,58 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,56 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,61 ± 0,02 <sup>A</sup>	0,62 ± 0,04 <sup>A</sup>	0,61 ± 0,01 <sup>A</sup>
C21:0	0,04 ± 0,004	0,04 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,05 ± 0,02 <sup>A</sup>	0,05 ± 0,02 <sup>A</sup>
C22:0	0,20 ± 0,01	0,17 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,00 <sup>ab</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,16 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,19 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,19 ± 0,00 <sup>A</sup>
C24:0	0,12 ± 0,00	0,11 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,02 <sup>a</sup>	-	-	-	-
C14:1	0,34 ± 0,02	0,33 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,33 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,34 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,34 ± 0,00 <sup>A</sup>
C15:1	0,11 ± 0,02	0,09± 0,01 <sup>a</sup>	0,103 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,11 ± 0,03 <sup>A</sup>	0,09 ± 0,04 <sup>A</sup>
C16:1	8,5 ± 0,52	8,45 ± 0,02 <sup>a</sup>	8,35 ± 0,08 <sup>a</sup>	8,43 ± 0,08 <sup>a</sup>	8,41 ± 0,30 <sup>a</sup>	8,41 ± 0,12 <sup>A</sup>	8,49 ± 0,21 <sup>A</sup>	8,45 ± 0,11 <sup>A</sup>	8,47 ± 0,13 <sup>A</sup>
C17:1	0,99 ± 0,02	0,97 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,97 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,99 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,99 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,93 ± 0,03 <sup>A</sup>	0,98 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,98 ± 0,04 <sup>A</sup>	0,97 ± 0,02 <sup>A</sup>
C18:1 <i>n9t</i>	0,13 ± 0,02	0,11 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>A</sup>
C18:1 <i>n9c</i>	8,55 ± 0,67	7,82 ± 0,09 <sup>a</sup>	8,49 ± 0,11 <sup>a</sup>	8,48 ± 0,06 <sup>a</sup>	8,40 ± 0,10 <sup>a</sup>	7,67 ± 0,55 <sup>A</sup>	8,42 ± 0,05 <sup>A</sup>	8,52 ± 0,23 <sup>A</sup>	8,52 ± 0,13 <sup>A</sup>
C20:1 <i>n9</i>	1,50 ± 0,12	1,42 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,43 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,44 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,44 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,07 <sup>A</sup>	1,10 ± 0,05 <sup>B</sup>	1,33 ± 0,08 <sup>C</sup>	1,34 ± 0,01 <sup>C</sup>
C22:1 <i>n9</i>	1,38 ± 0,15	1,24 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,33 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,35 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,34 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,20 ± 0,03 <sup>A</sup>	1,33 ± 0,03 <sup>AB</sup>	1,37 ± 0,02 <sup>AB</sup>	1,38 ± 0,03 <sup>B</sup>
C24:1 <i>n9</i>	0,56 ± 0,03	0,53 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,02 <sup>A</sup>	0,55 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,56 ± 0,02 <sup>A</sup>	0,55 ± 0,02 <sup>A</sup>
C18:2 <i>n6t</i>	0,15 ± 0,06	0,09 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,14 ± 0,06 <sup>A</sup>	0,13 ± 0,07 <sup>A</sup>
C18:2 <i>n6c</i>	3,06 ± 0,01	2,37 ± 0,12 <sup>a</sup>	2,91 ± 0,06 <sup>b</sup>	2,95± 0,06 <sup>b</sup>	2,90 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,57 ± 0,02 <sup>A</sup>	1,66 ± 0,07 <sup>A</sup>	1,76 ± 0,07 <sup>A</sup>	1,77 ± 0,04 <sup>A</sup>
C18:3 <i>n6</i>	0,24 ± 0,01	0,17 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,23 ± 0,02 <sup>A</sup>	0,24 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,24 ± 0,02 <sup>A</sup>
C18:3 <i>n3</i>	1,47 ± 0,02	1,37 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,41 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,45 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,40 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,09 ± 0,06 <sup>AB</sup>	1,22 ± 0,07 <sup>B</sup>	1,44 ± 0,05 <sup>B</sup>	0,27 ± 0,15 <sup>AB</sup>
C20:2 <i>n6</i>	2,50 ± 0,07	2,42 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,50 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,5 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,47 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,97 ± 0,15 <sup>A</sup>	2,37 ± 0,12 <sup>B</sup>	2,46 ± 0,05 <sup>B</sup>	2,45 ± 0,05 <sup>B</sup>

**Tabela 8:** Composição de ácidos graxos das amostras de óleo (g/100g de amostra) (Continuação).

	Controle	Aroeira 0,2%	Aroeira 0,5%	BHT	Controle	Aroeira 0,2%	Aroeira 0,5%	BHT
Sem aquecimento	150 °C				180 °C			
<b>C20:3 <i>n</i>6</b>	0,12 ± 0,02	0,09 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>B</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>B</sup>	0,13 ± 0,00 <sup>B</sup>
<b>C20:3 <i>n</i>3</b>	0,19 ± 0,01	0,15 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,0 <sup>A</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,15 ± 0,03 <sup>A</sup>
<b>C20:4 <i>n</i>6</b>	1,14 ± 0,06	1,10 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,11 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,11 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,12 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,96 ± 0,08 <sup>A</sup>	1,04 ± 0,01 <sup>A</sup>	1,06 ± 0,01 <sup>A</sup>
<b>C20:5 <i>n</i>3</b>	15,04 ± 0,17	13,82 ± 0,38 <sup>a</sup>	14,32 ± 0,02 <sup>b</sup>	14,31 ± 0,02 <sup>b</sup>	14,10 ± 0,11 <sup>ab</sup>	13,60 ± 0,22 <sup>A</sup>	14,22 ± 0,09 <sup>B</sup>	14,30 ± 0,13 <sup>B</sup>
<b>C22:6 <i>n</i>3</b>	12,61 ± 0,26	12,27 ± 0,37 <sup>a</sup>	12,38 ± 0,11 <sup>a</sup>	12,52 ± 0,09 <sup>a</sup>	12,46 ± 0,16 <sup>a</sup>	8,47 ± 0,16 <sup>A</sup>	12,49 ± 0,03 <sup>B</sup>	12,57 ± 0,13 <sup>B</sup>
<b>ΣAGS</b>	38,02 ± 2,08	37,47 ± 0,14 <sup>a</sup>	37,60 ± 0,24 <sup>a</sup>	37,72 ± 0,16 <sup>a</sup>	37,66 ± 0,33 <sup>a</sup>	36,91 ± 0,18 <sup>A</sup>	37,18 ± 0,45 <sup>A</sup>	37,70 ± 0,17 <sup>A</sup>
<b>ΣAGM</b>	22,06 ± 1,26	20,93 ± 0,10 <sup>a</sup>	21,65 ± 0,15 <sup>a</sup>	21,79 ± 0,16 <sup>a</sup>	21,69 ± 0,45 <sup>a</sup>	19,98 ± 0,63 <sup>A</sup>	21,40 ± 0,17 <sup>AB</sup>	21,79 ± 0,06 <sup>B</sup>
<b>ΣAGP</b>	36,54 ± 0,68	33,86 ± 0,14 <sup>a</sup>	35,30 ± 0,11 <sup>b</sup>	35,55 ± 0,05 <sup>b</sup>	35,13 ± 0,18 <sup>b</sup>	28,06 ± 0,28 <sup>A</sup>	33,66 ± 0,22 <sup>B</sup>	34,30 ± 0,18 <sup>B</sup>
<b>Σn3</b>	29,31 ± 0,46	27,63 ± 0,25 <sup>a</sup>	28,31 ± 0,15 <sup>ba</sup>	28,47 ± 0,07 <sup>b</sup>	28,29 ± 0,30 <sup>ba</sup>	23,32 ± 0,40 <sup>A</sup>	28,08 ± 0,07 <sup>B</sup>	28,51 ± 0,11 <sup>B</sup>
<b>Σn6</b>	7,22 ± 0,21	6,23 ± 0,11 <sup>a</sup>	6,99 ± 0,07 <sup>b</sup>	7,08 ± 0,03 <sup>b</sup>	7,00 ± 0,04 <sup>b</sup>	4,74 ± 0,14 <sup>A</sup>	7,94 ± 0,27 <sup>B</sup>	5,78 ± 0,13 <sup>C</sup>
<b>Σn3/Σn6</b>	4,06 ± 0,32	4,34 ± 0,21 <sup>a</sup>	4,05 ± 0,09 <sup>b</sup>	3,96 ± 0,03 <sup>c</sup>	4,04 ± 0,24 <sup>b</sup>	4,91 ± 0,4 <sup>A</sup>	3,53 ± 0,2 <sup>B</sup>	4,95 ± 0,11 <sup>A</sup>

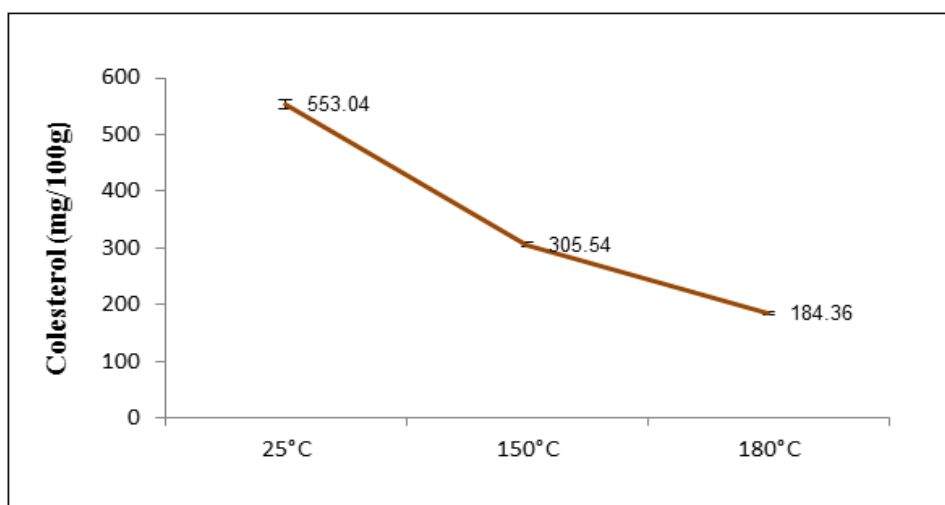
\*As letras minúsculas distintas em uma mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05) e as letras maiúsculas distintas em uma mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey p<0,05). AGS = ácido graxo saturado, AGM = ácido graxo monoinsaturado, AGP = ácido graxo poli-insaturado.

### 3.3 Efeito protetor dos frutos da aroeira sobre a degradação do colesterol após a termo-oxidação

No presente estudo, os teores de colesterol variaram de  $553,04 \pm 7,9$  a  $184,36 \pm 2,13$  mg/100g de óleo de sardinhas nas amostras sem aquecimento e aquecidas a 150 e 180°C. (Tabela 9). Ganga et al. (1998) determinaram um conteúdo inferior de  $480,5 \pm 7,5$  mg de colesterol/100 g de óleo de sardinha comercial refinado, de forma que podem ter ocorrido perdas no conteúdo de colesterol durante o processo de refino. Estudos realizados em amostras de pescado também apresentaram valores inferiores para filés de sardinha-verdadeira cru, como  $342 \pm 2,7$  mg/100g de amostra (SALDANHA, BENASSI e BRAGAGNOLO, 2008) e  $237,2 \pm 3,7$  mg/100g de amostra (FERREIRA et al., 2017).

As variações no conteúdo de colesterol identificado por diferentes autores são esperadas, visto que teores lipídicos variam consideravelmente de espécie para espécie e mesmo entre indivíduos da mesma espécie devido a diversos fatores como idade, sexo, sazonalidade, alimentação, entre outros (CHITRA SOM e RADHAKRISHNAN, 2013; BANDARRA et al., 2018).

O aquecimento afetou os teores de colesterol nas amostras, acarretando a perda de aproximadamente 44,76% (tratamento a 150 °C) e 66,67% (tratamento a 180 °C) nas amostras controle quando comparadas ao óleo sem aquecimento (Figura 19).



**Figura 19:** Degradação do colesterol em função da temperatura.

Outros estudos também constataram a perda do conteúdo de colesterol devido à aplicação de tratamento térmico em pescado e sistemas modelo contendo soluções padrão de colesterol (LI et al., 1996; SALDANHA, BENASSI e BRAGAGNOLO, 2008; ANSORENA et al., 2013; BARRIUSO et al., 2015; DEREWIAKA e MOLINSKA, 2015; FERREIRA et al., 2017). Ao analisar o perfil de degradação do colesterol devido a termo-oxidação, Barriuso et al. (2012) observaram porcentagens de degradação de 41,80 e 55,24 após aquecimento a 180 °C por 5 e 10 minutos, respectivamente. Soluções padrões de colesterol apresentaram aproximadamente 34% de degradação após 10 minutos de tratamento térmico a 180 °C (BARIUSSO et al., 2015).

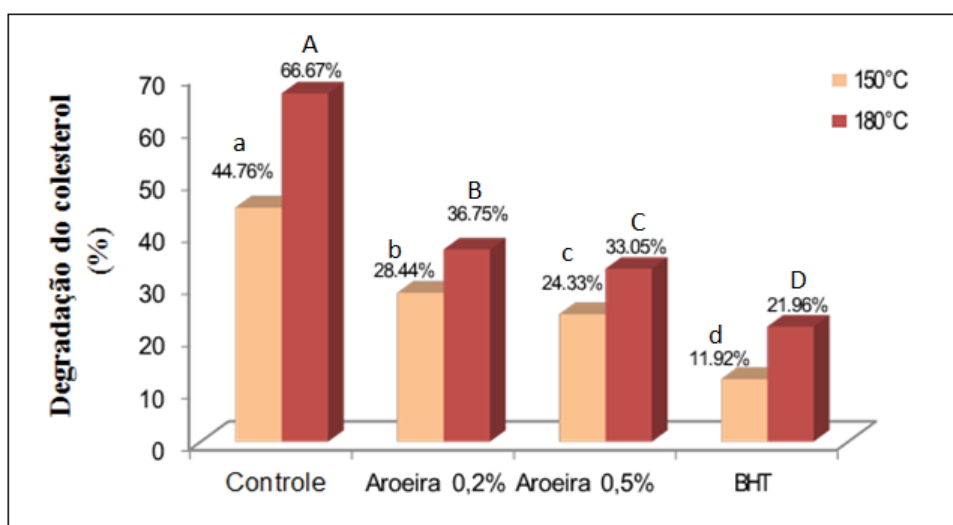
Derewiaka e Molinska (2015) avaliaram o conteúdo de amostras padrão de colesterol



após aquecimento a 150 e 180 °C por 30 minutos. Os autores observaram a redução de 51,4% (150 °C) e 59,3% (180 °C) no teor de colesterol devido a termo-oxidação. As variações encontradas na porcentagem de degradação do colesterol em diferentes trabalhos podem também ser atribuídas aos diferentes equipamentos e metodologias utilizadas durante o aquecimento, que conduzem calor de formas distintas as amostras (LEAL-CASTAÑEDA et al., 2017). Porcentagens de degradação inferiores são comumente observadas em estudos envolvendo soluções padrão, pois a presença de outros compostos no meio interfere diretamente no processo de oxidação, o que não ocorre quando é uma solução padrão é utilizada.

Nas amostras adicionadas dos antioxidantes, tanto os frutos da aroeira como o BHT, também ocorreu à redução do conteúdo do colesterol, entretanto a razão da degradação foi inferior comparando as amostras controle. O aquecimento a 150 °C levou a degradação de 44,76% do colesterol nas amostras controle, observando-se a redução do percentual de degradação do colesterol para 24,33% nas amostras adicionadas dos frutos da aroeira (0,5%). O emprego dos antioxidantes reduziu a degradação do colesterol em todos os tratamentos, apresentando uma diferença significativa entre estes ( $p < 0,05$ ).

Após o aquecimento a 180 °C as amostras adicionadas dos frutos da aroeira 0,2 %, 0,5% e do BHT apresentaram teores de colesterol superiores à amostra controle, 349,81  $\pm$  1,92, 370,28  $\pm$  0,61 e 431, 60  $\pm$  1,07 mg/100g de amostra, respectivamente. O mesmo comportamento pode ser observado nas amostras que foram aquecidas a 150 °C, onde o BHT apresentou melhor efeito protetor, seguido da adição dos frutos da aroeira 0,5 % e 0,2 %, respectivamente. A figura 20 apresenta a variação do conteúdo de colesterol nas amostras após aquecimento para os diferentes tratamentos utilizados.



**Figura 20:** Degradação do colesterol para os diferentes tratamentos a 150 °C e 180 °C.

\*As letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) e as letras maiúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A atividade protetora de diversos extratos naturais vem sendo constantemente pesquisada. Barriuso et al. (2015) avaliaram o efeito protetor da adição de extrato de *Melissa officinalis* em solução padrão de colesterol (2 mg de extrato/100 mg de colesterol) após o aquecimento a 180 °C, observando-se a proteção de 93% do conteúdo de colesterol nas amostras adicionadas do extrato. O efeito protetor observado pela adição dos frutos da aroeira

esta de acordo com outros trabalhos em que foram utilizados compostos naturais em soluções padrão de colesterol, óleo de pescado e pescado aquecidos, atribuindo este efeito a presença de substâncias fenólicas e outros compostos bioativos com características antioxidantes (LI et al., 1996; BARRIUSO et al., 2015; TARVAINEN et al., 2016; FERREIRA et al. 2017).

### **3.4 Efeito dos frutos da aroeira sobre a formação de óxidos de colesterol após termo-oxidação**

No experimento em questão, alguns óxidos de colesterol foram detectados nas amostras de óleo sem aquecimento: 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol, 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol, 7-cetocolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicoesterol e 7 $\alpha$ -hidroxicoesterol. A presença destes óxidos em amostras de óleo de sardinhas e pescado mesmo antes do tratamento térmico também foi observada por outros autores (CARDENIA et al., 2013a; FIGUEIRÊDO et al., 2015; FREITAS et al., 2015; FERREIRA et al., 2017), atribuindo-se a presença dos POCs a uma característica metabólica do pescado (OSADA et al., 1993). A tabela 9 apresenta o conteúdo de óxidos de colesterol formados nas amostras analisadas.

A exposição das amostras a temperaturas elevadas induziu o processo oxidativo, sendo observado um aumento significativo no conteúdo de óxidos após o aquecimento. Ao comparar as amostras sem aquecimento com as amostras controle aquecidas, é possível observar o aumento de  $58,9 \pm 0,26$   $\mu\text{g/g}$  de amostra para  $478,2 \pm 0,14$  e  $577,5 \pm 2,14$   $\mu\text{g/g}$  de amostra, no conteúdo total de POCs para os tratamentos a 150 e 180 °C, respectivamente. O estado físico do colesterol influencia a oxidação de sua molécula, pois no estado líquido o contato do colesterol com os agentes oxidantes é maior. Embora 150 °C esteja acima do ponto de fusão do colesterol (147-148 °C), ainda é uma temperatura próxima deste, sendo esperada a maior formação de produtos oxidados em temperaturas mais elevadas, como 180 °C (DEREWIAKA e MOLINSKA, 2015).

Embora a temperatura elevada tenha acarretado a degradação do colesterol, a formação de POCs foi bem inferior do que a razão de degradação do colesterol, revelando a decomposição do colesterol por outras vias, como a polimerização por exemplo. Além da formação de óxidos durante a degradação térmica, podem ocorrer à formação de outros compostos como hidrocarbonetos, aldeídos, cetonas e álcoois (SMITH, 1987; NAWAR et al., 1991).

Nas amostras aquecidas foram determinados 7-cetocolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicoesterol, 7 $\alpha$ -hidroxicoesterol, 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol, 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol, 20 $\alpha$ -hidroxicoesterol e 25R-hidroxicoesterol. Dentre estes, o 7-cetocolesterol apresentou maior conteúdo, seguido do 7 $\beta$ -hidroxicoesterol e do 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol, respectivamente. Os teores de 7-cetocolesterol nas amostras aquecidas variaram entre  $111,9 \pm 0,27$  e  $250,6 \pm 0,09$   $\mu\text{g/g}$  de óleo, valores superiores aos determinados para as variações de 7 $\beta$ -hidroxicoesterol (entre  $70,5 \pm 0,03$  e  $146,3 \pm 0,28$   $\mu\text{g/g}$  de óleo) e 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol (entre  $30,7 \pm 0,03$  e  $102,8 \pm 0,09$   $\mu\text{g/g}$  de óleo).

Devido a estrutura molecular do colesterol, o carbono 7 é considerado o carbono mais susceptível ao processo oxidativo, sendo o 7-ceto comumente caracterizado como principal óxido oriundo da termo-oxidação devido a desidratação de 7 $\alpha$ - e 7 $\beta$ -hidroperóxidos e/ou desidrogenação dos 7 $\alpha$ - e 7 $\beta$ - hidroxicoesterol (SMITH, 1987). Outros trabalhos também observaram a formação predominante de 7-ceto mediante a termo-oxidação (LI et al., 1996; BARRIUSO et al., 2012; XU et al., 2016; FERREIRA et al., 2017). Foi observado maior conteúdo de 7 $\beta$ - hidroxicoesterol em relação ao 7 $\alpha$ -hidroxicoesterol, pois devido a forma equatorial observada nos 7 $\beta$ -hidroperóxidos, estes compostos são termodinamicamente mais

estáveis e prevalecem frente aos epímeros  $\alpha$ , acarretando a formação predominante de 7 $\beta$ -hidroxicolesterol (SMITH, 1987).

Apesar dos principais óxidos formados na termo-oxidação serem aqueles oriundos de processos oxidativos no carbono 7, a epoxidação no carbono 5 por hidroperóxidos também pode ocorrer formando 5,6 $\alpha$ - e 5,6 $\beta$ -epoxicoolesterol (CHIEN, WANG e CHEN, 1998). Os epóxidos são formados em processos oxidativos pelo ar, logo, as temperaturas elevadas utilizadas e a exposição das amostras de óleo ao oxigênio atmosférico proporcionaram um ambiente favorável à formação destes compostos.

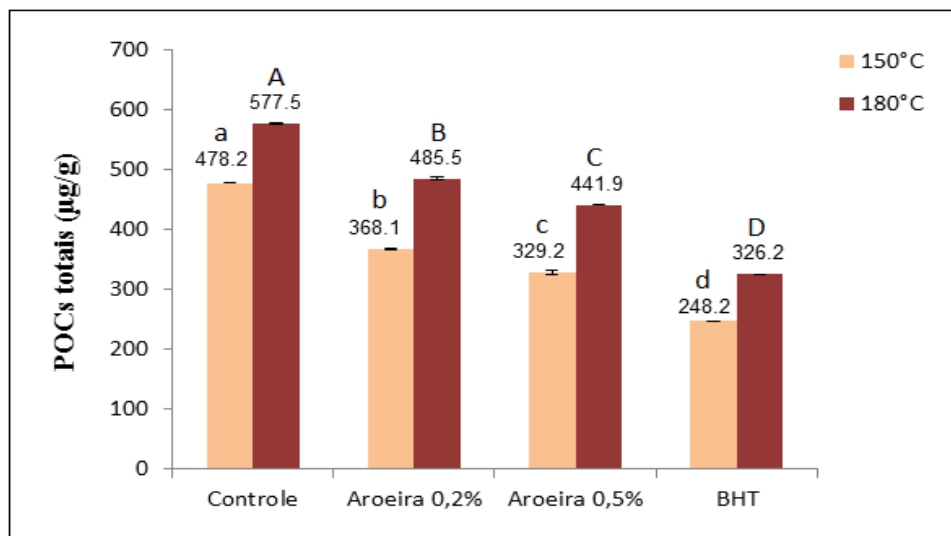
A presença de 20 $\alpha$ -hidroxicolesterol e 25 $R$ -hidroxicolesterol só foi detectada nas amostras aquecidas a 180 °C e em baixas concentrações, em comparação com os outros óxidos formados. Os óxidos oriundos da oxidação da cadeia lateral do colesterol são comumente minoritários (SMITH, 1987), de forma que foram necessárias condições mais drásticas de temperatura para ocorrer a formação destes (20 $\alpha$ -OH e 25 $R$ -OH) em concentrações detectáveis pelo equipamento. Trabalhos anteriores constataram pouca ou nenhuma formação de óxidos da cadeia lateral após tratamento térmico de soluções padrão de colesterol (BARRIUSO et al., 2015; XU et al., 2016).

Filés de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) foram grelhados a temperatura de 175 °C durante 4 minutos, sendo atingida a temperatura de aproximadamente 75 °C no interior do pescado. O conteúdo total de POCs aumentou de  $19,4 \pm 0,4$   $\mu\text{g/g}$  (base seca) para  $41,6 \pm 0,4$  após o processo térmico (SALDANHA, BENASSI e BRAGAGNOLO, 2008). Ansorena et al. (2013) observaram a formação de POCs ao aquecer solução padrão de colesterol a 180 °C. Após 10 minutos de aquecimento, foi determinado um total de 9100  $\mu\text{g/g}$  de colesterol, sendo o 7-cetocolesterol o óxido predominante.

Derewiaka e Molinska (2015) avaliaram o efeito da temperatura na formação de POCs ao aquecer solução padrão de colesterol. Os autores verificaram que após o aquecimento a 180 °C durante 30 minutos o conteúdo de POCs atingiu  $76800 \pm 7,2$   $\mu\text{g/g}$ . Leal-Castañeda adicionaram colesterol (2,5 mg/g de óleo) a óleo de pescado e aqueceram a mistura em forno convencional a 180 °C. Após 20 minutos de aquecimento os autores observaram um conteúdo total de POCs de  $225,4 \pm 41,9$   $\mu\text{g/g}$  de lipídio, onde o 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol ( $179,7 \pm 39$   $\mu\text{g/g}$  de lipídio) foi o óxido predominante, seguido pelo 7-cetocolesterol ( $15,4 \pm 0,1$   $\mu\text{g/g}$  de lipídio).

O perfil e a quantidade de óxidos formados durante a oxidação do colesterol são extremamente variáveis, dependendo de fatores como a temperatura, o tempo de oxidação, pH, a forma do substrato, presença de água, oxigênio e luz, características químicas de outros compostos presentes no meio, a concentração inicial de colesterol, entre outros (KIM e NAWAR, 1993). Tais fatores podem acarretar a formação de diversos óxidos por mecanismos distintos, caracterizando a complexidade deste processo.

Apesar da degradação do colesterol e consequente formação de óxidos observada pelo aquecimento do óleo de sardinhas, a adição dos antioxidantes minimizou a termo-oxidação, diminuindo o conteúdo de POCs formados nas amostras. O efeito antioxidante apresentado pelos aditivos utilizados na ordem crescente foi: frutos da aroeira 0,2% < frutos da aroeira 0,5% < BHT (Figura 21).



**Figura 21:** Teores de POCs totais nas amostras de óleo nos diferentes tratamentos a 150 °C e 180 °C.

\*As letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) e as letras maiúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Ao comparar o conteúdo de óxidos totais nas amostras controle com as amostras adicionadas dos frutos da aroeira aquecidas a 180 °C, foi observado o efeito protetor de 15,51% e 23,22% para as adições referentes a 0,2% e 0,5%, respectivamente. Assim como verificado para os ácidos graxos, a 150 °C o efeito protetor dos frutos foi superior, fato que pode ser decorrente da degradação térmica de compostos com atividade antioxidante presentes no fruto.

Inúmeros compostos com propriedades antioxidantes presentes nos frutos da aroeira contribuem para a atividade protetora observada nos sistemas modelo devido adição dos frutos nas amostras. Compostos fenólicos como os flavonoides determinados nos frutos da aroeira neste trabalho, podem inibir processos oxidativos atuando como agentes redutores, doadores de hidrogênio, sequestradores de oxigênio singlete, radicais superóxidos, radicais hidroxila e peroxila ou ainda como agente quelante de metais. Além disso, os flavonoides também ativam enzimas antioxidantes e inibem a lipoxigenase e as ciclooxygenases, enzimas responsáveis pelo desenvolvimento da rancidez oxidativa em alimentos (PROCHAZKOVA, BOUŠOVA e WILHELMOVA, 2011).

Neste trabalho, a capacidade protetora do antioxidante sintético frente à formação dos óxidos de colesterol foi maior que a apresentada pelos frutos da aroeira. O BHT foi capaz de reduzir conteúdo de POCs totais para de  $577,5 \pm 2,14 \mu\text{g/g}$  (amostras controle) para  $326,2 \pm 0,23 \mu\text{g/g}$  a 180 °C, enquanto a maior concentração dos frutos da aroeira utilizada reduziu para  $441,9 \pm 0,61 \mu\text{g/g}$ .

Embora o antioxidante sintético utilizado tenha apresentado maior efeito protetor ao inibir a formação dos óxidos de colesterol, os frutos da aroeira apresentaram efeito protetor significativo nas duas concentrações utilizadas. Ao adicionar o BHT ao óleo à concentração de 100 ppm, espera-se obter resultados altamente efetivos quanto a redução da oxidação, visto que essa concentração não pode ser aumentada, pois corresponde a concentração máxima permitida pela legislação brasileira. Desta forma, concentrações maiores dos frutos da aroeira podem ser avaliadas no intuito de obter resultados similares ou até superiores ao apresentado pelo BHT.

Trabalhos anteriores também constataram o efeito protetor de extratos naturais e seus

compostos sobre a formação de POCs em soluções padrões de colesterol, óleo de pescado e pescado submetidos ao tratamento térmico (LI et al., 1996; BARRIUSO et al., 2015; TARVAINEN et al., 2016; XU et al., 2016; FERREIRA et al., 2017). A ação antioxidante de tocoferóis sobre a oxidação do colesterol em óleo de pescado durante tratamento térmico foi confirmada por Li et al. (1996). Ao analisar o efeito da adição de quercetina em solução de colesterol, Chien, Hsu e Chen (2006) observaram a redução das constantes de velocidade das reações em cadeia de radicais, epoxidação e degradação térmica.

Barriuso et al. (2015) confirmaram o efeito antioxidante de *Melissa officinalis* em solução padrão de colesterol após 10 minutos de aquecimento a 180 °C, observando-se uma redução significativa no conteúdo de POCs. Ferreira et al. (2017) avaliaram o efeito protetor de salsa (*Petroselinum crispum*), cebolinha (*Allium schoenoprasum* L.) e a mistura das duas ervas denominada cheiro-verde frente a oxidação do colesterol em filés de sardinha aquecidos em air-frying. Todos os tratamentos empregados reduziram o conteúdo total de POCs, sendo a adição da salsa a 4% a mais efetiva, reduzindo de  $282,9 \pm 6,8$  para  $71,8 \pm 4,3$  µg/g (base seca) o conteúdo de POCs.

A oxidação do colesterol forma compostos oxidados reconhecidamente tóxicos, tornando essencial a utilização de antioxidantes no sentido de minimizar os danos oriundos da ingestão de POCs. A crescente demanda dos consumidores por produtos isentos de aditivos sintéticos, as barreiras impostas pela legislação e os riscos a saúde apresentados pelos antioxidantes sintéticos, potencializam a necessidade de novas fontes de antioxidantes naturais. Portanto, devido aos resultados apresentados pelos frutos da aroeira neste estudo, estes podem vir a representar uma alternativa frente a termo-oxidação de óleo de sardinhas.

**Tabela 9:** Teor de colesterol (mg/100g de amostra) e óxidos de colesterol (µg/g de amostra) nas amostras de óleo.

Óxidos de colesterol (µg/g)		Controle	Aroeira 0,2%	Aroeira 0,5%	BHT	Controle	Aroeira 0,2%	Aroeira 0,5%	BHT
	Sem aquecimento	150 °C				180 °C			
<b>5,6α-EP</b>	3,7 ± 0,03	22,2 ± 0,07 <sup>a</sup>	19,4 ± 0,02 <sup>b</sup>	18,6 ± 0,01 <sup>b</sup>	11,1 ± 0,01 <sup>c</sup>	30,3 ± 0,01 <sup>A</sup>	25,5 ± 0,11 <sup>B</sup>	24,2 ± 0,04 <sup>B</sup>	28,1 ± 0,06 <sup>C</sup>
<b>5,6β-EP</b>	14,3 ± 0,08	81,7 ± 0,08 <sup>a</sup>	58,7 ± 0,08 <sup>b</sup>	52,8 ± 0,04 <sup>c</sup>	37,2 ± 0,03 <sup>d</sup>	102,8 ± 0,09 <sup>A</sup>	83,6 ± 0,04 <sup>B</sup>	70,3 ± 0,13 <sup>C</sup>	30,7 ± 0,03 <sup>D</sup>
<b>7-ceto</b>	5,2 ± 0,17	212,6 ± 0,04 <sup>a</sup>	160,0 ± 0,15 <sup>b</sup>	147,0 ± 0,02 <sup>c</sup>	111,9 ± 0,27 <sup>d</sup>	250,6 ± 0,09 <sup>A</sup>	207,2 ± 0,13 <sup>B</sup>	190,2 ± 0,18 <sup>C</sup>	142,2 ± 0,19 <sup>D</sup>
<b>7β-OH</b>	6,4 ± 0,03	123,1 ± 0,06 <sup>ab</sup>	102,4 ± 0,10 <sup>bc</sup>	83,1 ± 2,87 <sup>cd</sup>	75,8 ± 0,07 <sup>cd</sup>	146,3 ± 0,28 <sup>A</sup>	120,3 ± 0,22 <sup>AB</sup>	111,3 ± 0,17 <sup>B</sup>	70,5 ± 0,03 <sup>C</sup>
<b>7α-OH</b>	29,3 ± 0,03	38,6 ± 0,05 <sup>a</sup>	27,7 ± 0,02 <sup>b</sup>	27,7 ± 0,05 <sup>b</sup>	12,2 ± 0,02 <sup>c</sup>	45,3 ± 0,12 <sup>A</sup>	45,5 ± 0,06 <sup>A</sup>	42,8 ± 0,06 <sup>B</sup>	38,1 ± 0,05 <sup>C</sup>
<b>20α-OH</b>	-	-	-	-	-	0,4 ± 0,01 <sup>A</sup>	4,5 ± 0,13 <sup>B</sup>	3,4 ± 0,02 <sup>B</sup>	3,4 ± 0,02 <sup>B</sup>
<b>25R-OH</b>	-	-	-	-	-	2,2 ± 0,04 <sup>A</sup>	3,3 ± 0,05 <sup>A</sup>	3,11 ± 0,05 <sup>A</sup>	16,5 ± 0,29 <sup>B</sup>
<b>POCs totais</b>	58,9 ± 0,26	478,2 ± 0,14 <sup>a</sup>	368,1 ± 0,31 <sup>b</sup>	329,2 ± 2,91 <sup>c</sup>	248,2 ± 0,24 <sup>d</sup>	577,5 ± 2,14 <sup>A</sup>	485,5 ± 1,92 <sup>B</sup>	441,9 ± 0,61 <sup>C</sup>	326,2 ± 0,23 <sup>D</sup>
<b>Colesterol (mg/100g)</b>	553,04 ± 7,90	305,54 ± 3,95 <sup>a</sup>	395,78 ± 0,33 <sup>b</sup>	418,51 ± 0,88 <sup>c</sup>	487,15 ± 3,41 <sup>d</sup>	184,36 ± 2,13 <sup>A</sup>	349,81 ± 1,92 <sup>B</sup>	370,28 ± 0,61 <sup>C</sup>	431,60 ± 1,07 <sup>D</sup>

\*As letras minúsculas distintas em uma mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05) e as letras maiúsculas distintas em uma mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey p<0,05). 5,6α-EP (5,6α-epoxicolesterol), 5,6β-EP (5,6β-epoxicolesterol), 7-ceto (7-cetocolesterol), 7β-OH (7β-hidroxicolesterol), 7α-OH (7α-hidroxicolesterol), 20α-OH (20α-hidroxicolesterol), 25R-OH (25R- hidroxicolesterol).

## 4 CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho demonstraram o impacto da utilização de temperaturas elevadas em óleo de sardinhas, acarretando a perda de ácidos graxos poli-insaturados e formação de compostos oxidados do colesterol, que são reconhecidamente associados a efeitos deletérios à saúde. Visto os efeitos causados pela exposição do óleo a temperaturas elevadas, torna-se indispensável o estudo a cerca de fontes naturais de compostos antioxidantes, como a aroeira. Os frutos da aroeira analisados no capítulo 2 apresentaram atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*. Resultados que foram justificados pela identificação de compostos bioativos com atividade antioxidante nos frutos como flavonoides, antocianinas e taninos. Desta forma, a caracterização dos frutos da aroeira sugere estes frutos como possíveis fontes de antioxidantes naturais, possibilitando o emprego destes como antioxidantes em alimentos de forma reduzir a adição de antioxidantes sintéticos que podem apresentar efeitos adversos a saúde. A adição dos frutos da aroeira provou ser eficiente frente a termo-oxidação em sistemas modelo contendo óleo de sardinhas nas duas concentrações utilizadas (0,2% e 0,5%), ao minimizar a degradação de ácidos graxos e a formação de óxidos de colesterol. Os frutos da aroeira apresentaram efeito protetor semelhante ou inferior ao antioxidante sintético BHT, entretanto, este foi utilizado na concentração máxima permitida pela legislação brasileira (100 ppm). Estes resultados sugerem a substituição deste pelo antioxidante natural, ou ainda, a avaliação de outras concentrações dos frutos da aroeira, que podem vir a exibir atividade protetora similar ou até mesmo superior ao aditivo sintético, devendo-se considerar os aspectos sensoriais e a possível toxicidade dos frutos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLA, N. R.; LOH, T. C.; AKIT, H.; SAZILI, A. Q.; FOO, H. L.; MOHAMAD, R.; RAHIM, R. A.; EBRAHIMI, M.; SABOW, A. B. Fatty acid profile, cholesterol and oxidative status in broiler chicken breast muscle fed different dietary oil sources and calcium levels. **South African Journal of Animal Science**, v. 45, p. 153-163, 2015.

ABREU, V. K. G. A.; PEREIRA, A. L. F. P.; FREITAS, E. R.; TREVISAN, M. T. S.; COSTA, J. M. C.; BRAZ, N. M. Cashew nut shell liquid supplementation and the effect on lipid oxidation and color in fresh and spray-dried eggs. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, p. 1-9, 2017.

ADDIS, P. B.; PARK, S. W. **Cholesterol oxides content of foods**. In *Biological Effects of Cholesterol Oxides*; Peng, S. K., Morin, J. M., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1992; pp 71-88.

AFFONSO, C. R. G. **Avaliação toxicológica do óleo essencial dos frutos da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* raddi) e do impacto sobre a performance reprodutiva e desenvolvimento da prole em ratos**. Dissertação de mestrado - Fundação Universidade Federal do Piauí, 2009.

AKHTAR, P.; GRAY, J. I.; BOOREN, A. M.; GOMAA, E. A. The Effects of Dietary  $\alpha$ -tocopherol and Surface Application of Oleoresin Rosemary on Lipid Oxidation and Cholesterol Oxide Formation in Cooked Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Muscle. **Journal of Food Lipids**, v. 5, p. 59-71, 1998.

ALENISAN, M. A.; ALQATTAN, H. H.; TOLBAH, L. S.; SHORI, A. B. Antioxidant properties of dairy products fortified with natural additives: a review. **Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Science**, v. 24, p. 101-106, 2017.

ALFARO, S.; MUTIS, A.; PALMA, R.; QUIROZ, A.; SEGUEL, I.; SCHEUERMANN E. Influence of genotype and harvest year on polyphenol content and antioxidant activity in murtilla (*Ugni molinae* Turcz) fruit. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 13, p. 67-78, 2013.

ALFONSO-GARCÍA, A.; CILLA, A.; BARBERÁ, R.; ALEGRÍA, A. Evaluation of the Cytotoxicity of Cholesterol Oxides in Human Colon Cancer Caco-2 Cells. **Universal Journal of Food and Nutrition Science**, v. 2, p. 27-32, 2014.

ANDRADE, K. S.; PONCELET, D.; FERREIRA, S. R. S. Sustainable extraction and encapsulation of pink pepper oil. **Journal of Food Engineering**, v. 204, p. 38-45, 2017.

ANSORENA, D.; BARRIUSO, B.; CARDENIA, V.; ASTIASARÁN, I.; LERCKER, G.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T. Thermo-oxidation of cholesterol: Effect of the unsaturation degree of the lipid matrix. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2757-2764, 2013.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 16th ed., Arlington, VA, US, 1995.



AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC international**. 17th. ed., Washington, 2002.

ARMENTEROS, M.; MORCUENDE, D.; VENTANAS, J.; ESTÉVEZ, M. The application of natural antioxidants via brine injection protects Iberian cooked hams against lipid and protein oxidation. **Meat Science**, v. 116, p. 253–259, 2016.

ARNNOK, P.; RUANGVIRIYACHAI, C.; MAHACHAI, R.; TECHAWONGSTIEN, S.; CHANTHAI, S. Determination of total phenolics and the anthocyanin contents in the pericarp of hot chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). **International Food Research Journal**, v. 19, p. 235–243, 2012.

BAHURMIZ, O. M.; ADZITEY, F.; NG, W. K. Nutrient and fatty acid composition of the flesh of oil sardine (*Sardinella longiceps*) and indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) from hadhramout coast of the arabian sea, yemen. **International Food Research Journal**, v. 24, n. 6, p. 2387-2393, 2017.

BALZAN, S.; TATICCHI, A.; CARDAZZO, B.; URBANI, S.; SERVILI, M.; DI LECCE, G.; ZABALZA, I. B.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T.; NOVELLI, E.; FASOLATO, L. Effect of phenols extracted from a by-product of the oil mill on the shelf-life of raw and cooked fresh pork sausages in the absence of chemical additives. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, p. 89-95, 2017.

BANDARRA, N. M.; MARÇALO, A.; CORDEIRO, A. R.; POUSÃO-FERREIRA, P. Sardine (*Sardina pilchardus*) lipid composition: Does it change after one year in captivity?. **Food Chemistry**, v. 244, p. 408-413, 2018.

BANNENBERG, G.; MALLON, C.; EDWARDS, H.; YEADON, D.; YAN, K.; JOHNSON, H.; ISMAIL, A. Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Content and Oxidation State of Fish Oil Supplements in New Zealand. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1488, p. 1-13, 2017.

BARBIERI, R.; COPPO, E.; MARCHESE, A.; DAGLIA, M.; SOBARZO-SÁNCHEZ, E.; NABAVI, S. F.; NABAVI, S. M. Phytochemicals for human disease: An update on plant- derived compounds antibacterial activity. **Microbiological Research**, v. 196, p. 44-68, 2017.

BARKALLAH, M.; DAMMAK, M.; LOUATI, I.; HENTATI, F.; HADRICHI, B.; MECHICHI, T.; AYADI, M. A.; FENDRI, I.; ATTIA, H.; ABDELKAFI, S. Effect of *Spirulina platensis* fortification on physicochemical, textural, antioxidant and sensory properties of yogurt during fermentation and storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 323-330, 2017.

BARNABA, C.; RODRÍGUEZ-ESTRADA, M. T.; LERCKER, G.; GARCÍA, H. S.; MEDINA-MEZA, I. G. Cholesterol photo-oxidation: A chemical reaction network for kinetic modeling. **Steroids**, v. 116, p. 522-59, 2016.

BARRIUSO, B.; OTAEGUI-ARRAZOLA, A.; MENÉNDEZ-CARREÑO, M.; ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D. Sterols heating: Degradation and formation of their ring-structure polar oxidation products. **Food Chemistry**, v. 135, p. 706–712, 2012.

BARRIUSO, B.; ANSORENA, D.; CALVO, M. I.; CAVERO, R. T.; ASTIASARÁN, I. Role of *Melissa officinalis* in cholesterol oxidation: Antioxidant effect in model systems and application in beef patties. **Food Research International**, v. 69, p. 133-140, 2015.

BARRIUSO, B.; MARIUTTI, L. R. B.; ANSORENA, D.; ASTIASAR, I.; BRAGAGNOLO, N. *Solanum sessiliflorum* (mana-cubiu) antioxidant protective effect toward cholesterol oxidation: Influence of docosahexanoic acid. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, p. 1125-1131, 2016.

BARRIUSO, B.; ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I. Oxysterols formation: A review of a multifactorial process. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 169, p. 39-45, 2017.

BASCOUL, J.; DOMERGUE, N.; OLLE, M.; CRASTES DE PAULET, A. Autoxidation of cholesterol in tallows heated under deep frying conditions: evaluation of oxysterols by GLC and TLC-FID. **Lipids**, v. 21, p. 383-7, 1986.

BASIOUNY, F. M.; BISWAS, P. K. Ascorbic acid, pigments and mineral element contents associated with growth and development of pimiento pepper. **Florida State Horticultural Society**, v. 94, p. 268-269, 1981.

BAUER, L. C.; SANTANA, D. A.; MACEDO, M. S.; TORRES, A. G.; SOUZA, N. E.; SIMIONATO, J. I. Method Validation for Simultaneous Determination of Cholesterol and Cholesterol Oxides in Milk by RP-HPLC-DAD. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 161-168, 2014.

BAYLIAK, M. M.; BURDYLIUK, N. I.; IZERSKA, L. I.; LUSHCHAK, V. I. Concentration dependent effects of rhodiola rosea on long-term survival and stress resistance of yeast *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of YAP 1 and MSN2/4 regulatory proteins. **Dose Response**, v. 12(1), 93-109, 2014.

BECKWITH, A. L. J. The oxidation of crystalline cholesterol. **Proc Chem**, v. 154, p. 194-95, 1958.

BERGQUIST, D. H. **Egg deshydration**. In *Egg Science and Technology* (W.J. Stadelman and O.J. Cotterill, eds.) 4th ed., pp. 335-376, Food Product Press, Binghampton, NY. 1995

BERNARDES, N. R. **Estudo da composição química e dos efeitos imunofarmacológicos do extrato dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2010.

BERNARDES, N. R.; HEGGDORNE-ARAÚJOA, M.; BORGESB, I. F. J. C.; ALMEIDA, F. M.; AMARAL, E. P.; LASUNSKAIA, E. B.; MUZITANO, M. F.; OLIVEIRA, D. B. Nitric oxide production, inhibitory, antioxidant and antimycobacterial activities of the fruits extract and flavonoid content of *Schinus terebinthifolius*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 644-650, 2014.

BERTOLINO, M.; BELVISO, S.; BELLO, B. D.; GHIRARDELLO, D.;

GIORDANO, M.; ROLLE, L.; GERBI, V.; ZEPPA, G. Influence of the addition of different hazelnut skins on the physicochemical, antioxidant, polyphenol and sensory properties of yogurt. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 1145-1154, 2015.

BHALE, S. D.; XU, Z.; PRINYAWIWATKUL, W.; KING, J. M.; GODBER, J. S. Oregano and Rosemary Extracts Inhibit Oxidation of Long-Chain n-3 Fatty Acids in Menhaden Oil. **Journal of Food Science**, v. 72, p. 504-508, 2007.

BIERZUŃSKA, P.; CAIS-SOKOLIŃSKA, D.; RUDZIŃSKA, M.; GRAMZA-MICHAŁOWSKA, A. Evaluation of antioxidant activity of whey protein to improve cholesterol oxidation stability in fresh white cheese from buttermilk. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 56, p. 101-108, 2017.

BIESALSKI, H. K. Meat as a component of a healthy diet — Are there any risk or benefits if meat is avoided in the diet?. **Meat Science**, v. 70, p. 509-524, 2005.

BJORKHEM, I. Five decades with oxysterols. **Biochimic**, v. 95, p. 448-454, 2013.

BLIGH, E.; DYER, W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n.8, p. 911-917, 1959.

BÖHM, F.; EDGE, R.; TRUSCOTT, G. Interactions of dietary carotenoids with activated (singlet) oxygen and free radicals: Potential effects for human health. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 56, p. 205-216, 2012.

BONOLI, M.; CABONI, M. F.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T.; LERCKER, G. Effect of feeding fat sources on the quality and composition of lipids of precooked ready-to-eat fried chicken patties. **Food Chemistry**, v. 101, p. 327-1337, 2007.

BOSELLI, E.; CABONI, M. F.; FREGA, N. G.; LERCKER, G. Cholesterol oxidation in pasta produced with eggs of different origin. **European Food Research and Technology**, v. 218, p. 410-414, 2004.

BOTTERWECK, A. A. M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHN, R. A.; KLEINJANS, J.; VAN DEN BRANDT, P. A. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: Results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 599-605, 2000.

BRASIL. Ministério da saúde. **RESOLUÇÃO Nº 04, DE 24 DE NOVEMBRO DE 1988**. Disponível em: <  
[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/1988/res0004\\_24\\_11\\_1988.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/1988/res0004_24_11_1988.html)>. Acesso em: 13 mar. 2018.

BREWER, M. S. Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, p. 221-247, 2011.

BRINKERHOFF, B. E.; HUBER, K. C.; HUBER, C. S.; PIKE, O. A Effect of Antioxidants on Cholesterol Oxidation in Spray-dried Egg Yolk during Extended Ambient Storage. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 67, p. 2857-2859, 2002.

BRZESKA, M.; SZYMCZYK, K.; SZTERK, A. Current Knowledge about Oxysterols: A Review. **Journal of Food Science**, v. 81, p. 299-308, 2016.

BUDIAWAN, S.; PURWANINGSIH, S.; CAHAYA, D. I. The study of DNA adduct 8-hydroxy-2'deoxyguanosine (8-OHdG) formation of butylated hydroxyanisole (BHA) and its metabolite ter-butyl hydroquinone (TBHQ) through *in vitro* reaction with Calf Thymus DNA and 2'deoxyguanosine. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 188, 2017.

CABONI, M. F.; BOSELLI, E.; MESSIA, M. C.; VELAZCO, V.; FRATIANNI, A.; PANFILI, G.; MARCONI, E. Effect of processing and storage on the chemical quality markers of spray-dried whole egg. **Food Chemistry**, v. 92, p. 293–303, 2005.

CALDER, P. C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1851, p. 469–484, 2015.

CALEJA, C.; BARROS, L.; ANTONIO, A. L.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; FERREIRA, I. C. F. R. A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. **Food Chemistry**, v. 216, p. 342-346, 2016.

CALEJA, C.; BARROS, L.; ANTONIO, A. L.; CAROCHO, M.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; FERREIRA, I. C. F. R. Fortification of yogurts with different antioxidant preservatives: A comparative study between natural and synthetic additives. **Food Chemistry**, v. 210, p. 262– 268, 2017.

CARDENIA, V.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T.; BALDACCI, E.; LERCKER, G. Health-related lipids components of sardine muscle as affected by Photooxidation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 32–38, 2013a.

CARDENIA, V.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T.; BOSELLI, E.; LERCKER, G. Cholesterol photosensitized oxidation in food and biological systems. **Biochimie**, v. 95, p. 473-481, 2013b.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CARVALHO, M. G.; MELO, A. G. N.; ARAGÃO, C. F. S.; RAFFIN, F. N.; MOURA, T. F. A. L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: Chemical composition, biological properties and toxicity. **Brazilian Journal of Medicinal Plants**, v. 15, p. 158–169, 2013.

CARVALHO, A. V.; MATTIETTO, R. A.; RIOS, A. O.; MACIEL, R. A.; MORESCO, K. S.; OLIVEIRA, T. C. S. Bioactive compounds and antioxidant activity of pepper (*Capsicum* sp.) genotypes. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 7457-7464, 2015.

CASTRO, W. F.; MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. The effects of colorifico on lipid oxidation, colour and vitamin E in raw and grilled chicken patties during frozen storage. **Food Chemistry**, v. 124, p. 126–131, 2011.

CAVALCANTI, A. S.; ALVES, M. S.; SILVA, L. C. P.; PATROCÍNIO, D. S.; SANCHES, M. N.; CHAVES, D. S. A.; SOUZA, M. A. A. Volatiles composition and extraction kinetics from *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* leaves and fruit. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 356–362, 2015.

CERUKS, M.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A.; LAGO, J. H. G. Estudo fitoquímico da fase em acetato de etila, oriunda do extrato em etanol das folhas de *S. terebinthifolius* com potencial anti-radicalar através do ensaio CCD/DPPH. **Química Nova**, v. 30, p. 597-599, 2007.

CHANAJ-KACZMAREK, J.; WYSOCKI, M.; KARACHITOS, A.; WOJCIN´SKAA, M.; BARTOSZ, G.; MATŁAWSKA, I., & KMITA, H. Effects of plant extract antioxidative phenolic compounds on energetic status and viability of *Saccharomyces cerevisiae* cells undergoing oxidative stress. **Journal of Functional Foods**, v. 16, p. 364–377, 2015.

CHEN, Z. Y.; CHAN, P. T.; HO, K. Y.; FUNG, K. P.; WANG, J. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl group. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.79, p. 157-163, 1996.

CHEN, L. J.; LU, Y. F.; CHIEN, J. T.; CHEN, B. H. Formation and Inhibition of Cholesterol Oxidation Products in Tea-Leaf Eggs during Marinating. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 10467–10474, 2010.

CHIEN, J.; HSU, D.; CHEN, B. Kinetic Model for Studying the Effect of Quercetin on Cholesterol Oxidation during Heating. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1486-1492, 2006.

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, p. 2572–7, 1998.

CHITRA SOM, R. S.; RADHAKRISHNAN, C. K. Seasonal variation in the fatty acid composition of *Sardinella longiceps* and *Sardinella fimbriata*: Implications for nutrition and pharmaceutical industry. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 42, n.2, p. 206-210, 2013.

CIRIANO, M. G.; GARCÍA-HERREROS, C.; LAREQUI, E.; VALENCIA, I.; ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I. Use of natural antioxidants from lyophilized water extracts of *Borago officinalis* in dry fermented sausages enriched in  $\omega$ -3 PUFA. **Meat Science**, v. 83, p. 271– 277, 2009.

CLUSKEY, S. M.; CONNOLLY, J. F.; DEVERY, R.; O'BRIEN, B.; KELLY, J.; HARRINGTON, D.; STANTON, C. Lipid and Cholesterol Oxidation in Whole Milk Powder during Processing and Storage. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 331-337, 1997.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. Ed. Da UNICAMP, Campinas, 1992.

COMUNIAN, T. A.; CHAVES, I. E.; THOMAZINI, M.; MORAES, I. C. M.; FERRO-FURTADO, R.; CASTRO, I. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Development of

functional yogurt containing free and encapsulated echium oil, phytosterol and sinapic acid. **Food Chemistry**, v. 237, p. 948–956, 2017.

COSTA, C. O. D. **Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de *Myracrodruon urundeuva* allemão e *Schinus terebinthifolius* Raddi**. Dissertação de mestrado - Universidade Federal da Bahia, 2011.

COSTA, C. O. D.; RIBEIRO, P. D.; LOUREIRO, M. B.; SIMÕES, R. C.; CASTRO, R. D.; FERNANDEZ, L. G. 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**, 11, 607-614, 2015.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª Edição. Artmed, 2010.

DANNENBERG, G. S.; FUNCK, G. D.; MATTEI, F. J.; SILVA, W. P.; FIORENTINI, A. M. Antimicrobial and antioxidante 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.

DANTAS, N. M.; SAMPAIO, G. R.; FERREIRA, F. S.; LABRE, T. S.; TORRES, E. A. F. S.; SALDANHA, T. Cholesterol Oxidation in Fish and Fish Products. **Journal of Food Science**, v. 80, p. 2627-2639, 2015.

DE, B.; CHATTERJEE, S. Impact of assorted spices on lipid quality alteration of refrigerated fish muscle. **International Food Research Journal**, v. 22, p. 304-310, 2015.

DEGASPARI, C. H.; WASZCZYNSKY, N.; PRADO, M. R. M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Ciências e Agrotecnologia**, v. 29, p. 617-22, 2005.

DEREWIAKA, D.; MOLINSKA, E. Cholesterol transformations during heat treatment. **Food Chemistry**, v. 171, p. 233–240, 2015.

DIONISI, F.; GOLAY, P. A.; AESCHLIMANN, J. M.; FAY, L. B. Determination of cholesterol oxidation products in milk powders: methods comparison and validation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2227-2233, 1998.

D'SOUSA' COSTA, C. O.; RIBEIRO, P. R.; LOUREIRO, M. B.; SIMÕES, R. C.; DE CASTRO, R. D.; FERNANDEZ, L. G. 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, 607-614, 2015.

DU, M.; AHN, D. U. Effects of antioxidants and packaging on lipid and cholesterol oxidation and color changes of irradiated egg yolk powder. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 625-629, 2000.

EDER, K.; GRÜNTAL, G.; KLUGE, H.; HIRCHE, F.; SPILKE, J.; BRANDSCH,

C. Concentrations of cholesterol oxidation products in raw, heat-processed and frozen stored meat of broiler chickens fed diets differing in the type of fat and vitamin E concentrations. **British Journal of Nutrition**, v. 93, p. 633-643, 2005.

EL-MASSARY, K. F.; EL-GHORAB, A. H.; SHAABAN, H. A.; SHIBAMOTO, T. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *S. terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 5265-5270, 2009.

EMBUSCADO, M. E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. **Journal of Functional Food**, v. 18, p. 811-819, 2015.

ENNIGROU, A.; CASABIANCA, H.; LAARIF, A.; HANCHI, B.; HOSNI, K. 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.

ESKANDANI, M.; HAMISHEHKAR, H.; DOLATABADI, J. E. N. Cytotoxicity and DNA damage properties of *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. **Food Chemistry**, v. 153, p. 315-320, 2014.

ETTI, C. J.; ADEGOKE, G. O.; ETTI, I. C. Lipid Oxidation: The Role of *Aframomum danielli* Antioxidant Extracts in Prevention. **IOSR Journal of Engineering (IOSRJEN)**, v.2, p. 46-50, 2012.

FALOWO, A. B.; FAYEMI, P. O.; MUCHENJE, V. Natural antioxidants against lipid– protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. **Food Research International**, v. 64, p. 171–181, 2014.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all**. Rome. p 200. Disponível em: < <http://www.fao.org/fishery/topic/736/en>>. Acesso em: 16 Jan. 2018.

FENG, J.; CAI, H.; WANG, H.; LI, C.; LIU, S. Improved oxidative stability of fish oil emulsion by grafted ovalbumin catechin Conjugates. **Food Chemistry**, v. 241, p. 60-69, 2018.

FERNANDES C. E.; VASCONCELOS, M. A. D. S.; DE ALMEIDA RIBEIRO, M.; SARUBBO, L. A.; ANDRADE, S. A. C.; FILHO, A. B. D. M. Nutritional and lipid profiles in marine fish species from Brazil. **Food Chemistry**, v. 160, p. 67-71, 2014.

FERREIRA, F. S.; SAMPAIO, G. R.; KELLER, L. M.; SAWAYA, A. C. H. F.; CHÁVEZ, D. W. H.; TORRES, E. A. F. S.; SALDANHA, T. 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, M. M.; HOPPE, J.; ZIMMERMANN, B. F.; WEBER, F.; SCHULZE-KAYSERS, N.; SCHIEBER, A. Characterization of phenolic compounds in Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) exocarp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.

62, p. 6219–6226, 2014.

FEUEREISEN, M. M.; BARRAZA, M. G.; ZIMMERMANN, B. F.; SCHIEBER, A.; SCHULZE-KAYSERS, N. Pressurized liquid extraction of anthocyanins and biflavonoids from *Schinus terebinthifolius* Raddi: A multivariate optimization. **Food Chemistry**, v. 214, p. 564–571, 2017.

FIGUEIRÊDO, B. C.; TRAD, I. J.; MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Effect of annatto powder and sodium erythorbate on lipid oxidation in pork loin during frozen storage. **Food Research International**, v. 65, p. 137–143, 2014.

FIGUEIRÊDO, B. C.; BRAGAGNOLO, N.; SKIBSTED, L. H.; ORLIEN, V. 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, p. 1646–1653, 2015.

FLACZYK, E.; RUDZINSKA, M.; WASOWICZ, E.; KORCZAK, J.; AMAROWICZ, R. Effect of cracklings hydrolysates on oxidative stability of pork meatballs fat. **Food Research International**, v. 39, p. 924–931, 2006.

FRASSINETTI, S.; GABRIELE, M.; CALTAVUTURO, L.; LONGO, V.; PUCCI, L. Antimutagenic and antioxidant activity of a selected lectin-free common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in two cell-based models. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 70, p. 35–41, 2015.

FREITAS, M. T.; AMARAL, C. A. A.; COUTRIM, M. X.; AFONSO, R. J. C. F.; JUNQUEIRA, R. G. 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, p. 1141–1147, 2015.

FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative Methods for Anthocyanins. 1. Extraction and Determination of Total Anthocyanin in Cranberries. **Journal of Food Science**, v.33, p. 72–77, 1968.

GALOBART, J.; BARROETA, A. C.; BAUCCELLS, M. D.; CORTINAS, L.; GUARDIOLA, F.  $\alpha$ -tocopherol transfer efficiency and lipid oxidation in fresh and spray-dried eggs enriched with x3-polyunsaturated fatty acids. **Poultry Science**, v. 80, p. 1496–1505, 2001.

GALOBART, J.; GUARDIOLA, F.; BARROETA, A. C.; LÓPEZ-FERRER, S.; BAUCCELLS, M. D. Influence of Dietary Supplementation with  $\alpha$ -Tocopheryl Acetate and Canthaxanthin on Cholesterol Oxidation in  $\omega$ 3 and  $\omega$ 6 Fatty Acid-enriched Spray-dried Eggs. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 2460–2466, 2002.

GAMBA, P.; TESTA, G.; GARGIULO, S.; STAURENGHI, E.; POLI, G.; LEONARDUZZI, G. Oxidized cholesterol as the driving force behind the development of Alzheimer's disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 7, p. 119, 2015.

GAMBERT, S.; GABRIELLE, P.; MASSON, E.; LEGER-CHARNAY, E.; FERRERRO, A.; VANNIER, A.; GENDRAULT, C.; LACHOT, M.; CREUZOT-



GARCHER, C.; BRON, A.; GREGOIRE, S.; LECLERE, L.; MARTINE, L.; LUCCHI, G.; TRUNTZER, C.; PECQUEUR, D.; BRETILLON, L. Cholesterol metabolism and glaucoma: Modulation of Muller cell membrane organization by 24S-hydroxycholesterol. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 207, p. 179–191, 2017.

GANGA, A.; NIETO, S.; SANHUEZ, J.; ROMO, C.; SPEISKY, H.; VALENZUELA, A. Concentration and Stabilization of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids from Sardine Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, p. 733-736, 1998.

GARCÍA-ALONSO, M.; PASCUAL-TERESA, S.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. **Food Chemistry** v.84, p.13-18, 2004.

GARCÍA-ARIAS, M. T.; ÁLVAREZ PONTES, E.; GARCÍA-LINARES, M. C.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, M. C.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. Cooking-freezing-reheating (CFR) of sardine (*Sardina pilchardus*) fillets: effect of different cooking and reheating procedures on the proximate and fatty acid compositions. **Food Chemistry**, v. 83, n. 3, p. 349-356, 2003.

GARCÍA-CASAL, M. N.; PEÑA-ROSAS, J. P.; GÓMEZ-MALAVÉ, H. Sauces, spices, and condiments: definitions, potential benefits, consumption patterns, and global markets. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1379, p. 3–16, 2016.

GARCÍA-MORENO, P. J.; GUADIX, A.; GUADIX, E. M.; JACOBSEN, C. Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized with fish protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 203, p. 124–135, 2016.

GARDNER, H. W. In *Xenobiotics in Foods and Feeds*, J.M. Finley and D.E. Schwass, Editors. **American Chemical Society**. Washington D.C. p. 63-84, 1983.

GHIRETTI, G. P.; ZANARDI, E.; NOVELLI, E.; CAMPANINI, G.; DAZZI, G.; MADARENA, G.; CHIZZOLINI, R. Comparative evaluation of some antioxidants in salame Milano and mortadella production. **Meat Science**, v. 47, p. 167-176, 1997.

GIADA, M. L. R. **Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power**. In: MORALES-GONZALEZ, J. A. *Oxidative stress and chronic degenerative diseases - a role for antioxidants*. Rijeka: InTech, . p. 87–112, 2013.

GLÓRIA, L. L.; ARANTES, M. B. S.; PEREIRA, S. M. F.; VIEIRA, G. S.; MARTINS, C. X.; CARVALHO JUNIOR, A. R.; ANTUNES, F.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C.; CRUZ, L. L.; CHAVES, D. S. A.; FREITAS, S. P.; OLIVEIRA, D. B. Phenolic Compounds Present *Schinus terebinthifolius* Raddi Influence the Lowering of Blood Pressure in Rats. **Molecules**, v. 22, n. 1792, p. 1-11, 2017.

GOIS, F. D.; SBARDELLA, M.; LIMA, C. B.; MIGOTTO, D. L.; CAIRO, P. L. G.; GARBOSSA, C. A. P.; RACANICCI, A. M. C.; COSTA, L. B. Dietary Brazilian red pepper essential oil on pork meat quality and lipid oxidation. **Ciência Rural**, v.47, n. 2, 2017.

GOMES, L. J.; SILVA-MANN, R.; MATTOS, P. P.; RABBANI, A. R. C. **Pensando a Biodiversidade: Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**. UFS, São Cristovão, 2013. Disponível em: <

<http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=964005&biblioteca=vazio&busca=964005&qFacets=964005&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>>. Acesso em: 02 fev 2018.

GONÇALVES, F. G.; ZANINI, S. F.; FEITOSA, M. L.; GONÇALVES, E. P. M.; COLNAGO, G. L. Efeito da pimenta rosa quando associado a diversas doses de antibióticos em frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p.1503-1509, 2012.

GOOGLE MAPS. **Embrapa Agroindústria de Alimentos**. 2010. Disponível em:<<https://www.google.com.br/maps/place/Embrapa+Agroind%C3%BAstria+de+Alimentos/@23.001113543.5844971,17z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x9bef14fe32aa59:0x4a232de47ffa732!8m2!3d-23.0011135!4d-43.5823084>>. Acesso em: 22 mar 2018.

GORDON, M. H. **Factors affecting lipid oxidation. In Understanding and measuring the shelf-life of food**. R. Steel, Ed. CRC Press, Boca Raton, 2004.

GRANATO, D.; NUNES, D. S.; BARBA, F. J. An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 13-22, 2017.

GRAU, A.; CODONY, R.; GRIMPA, S.; BAUCCELLS, M. D.; GUARDIOLA, F. Cholesterol oxidation in frozen dark chicken meat: influence of dietary fat source, and  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid supplementation. **Meat Science**, v. 57, p.197-208, 2001a.

GRAU, A.; GUARDIOLA, F.; GRIMPA, S.; BARROETA, A. C.; CODONY, R. Oxidative Stability of Dark Chicken Meat Through Frozen Storage: Influence of Dietary Fat and  $\alpha$ -Tocopherol and Ascorbic Acid Supplementation. **Poultry Science**, v. 80, p. 1630-1642, 2001b.

GRIGORAKIS, K.; GIOGIOS, I.; VASILAKI, A.; NENGAS, I. Effect of the fish oil, oxidation status and of heat treatment temperature on the volatile compounds of the produced fish feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, p. 73–84, 2010.

GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; MISKIN, D.; REFECAS, M.; BOATELLA, J. Oxysterol formation in egg powder and relationship with other parameters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 1903–1907, 1995.

GUARDIOLA F.; CODONY, R.; ADDIS, P. B.; RAFECAS, M.; BOATELLA, J. Biological effects of oxysterols: current status. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, p. 193–211, 1996.

GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; RAFECAS, M.; GRAU, A.; JORDAN, A.; BOATELLA, J. Oxysterol formation in spray-dried egg processed and storage under various conditions: prevention and relationship with other quality parameters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 229-2243, 1997.

GUMULKA, J.; JAN, S. P.; SMITH, L. L. Interception of discrete oxygen species in aqueous media by cholesterol: formation of cholesterol epoxides and secosterols. **Lipids**, v. 17, p. 197–203, 1982.

HAGERMAN, A.; BUTLER, L.G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, p. 4494-4497, 1981.

HAIMEUR, A.; MIMOUNI, V.; ULMANN, L.; MARTINEAU, A.; MESSAOURI, H.; PINEAU-VICENT, F.; TREMBLIN, G.; MESKINI, N. Fish Oil and Microalga  $\Omega$ -3 as dietary supplements: A comparative study on cardiovascular risk factors in high-fat fed rats. **Lipids**, v. 51, p. 1037-1049, 2016.

HALLIWELL, B.; GUITERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford Science Publications, 3th ed., p. 936, 2000.

HAN, X.; SHEN, T.; LOU, H. Dietary polyphenols and their biological significance. **International Journal of Molecular Science**, v. 8, p. 950-988, 2007.

HARPER, C. R.; JACOBSON, T. A. New perspectives on the management of low levels of high-density lipoprotein cholesterol. **Archives of internal medicine**, v. 159, p. 1049-57, 1999.

HASSOUN, A.; ÇOBAN, O. E. Essential oils for antimicrobial and antioxidant applications in fish and other seafood products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 68, p. 26-36, 2017.

HAYTOWITZ, D. B.; BHAGWAT, S. **Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2**. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2010.

HELENO, S. A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M. J.; FERREIRA, I. C. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Food Chemistry**, v. 173, p. 501-513, 2015.

HERNANDEZ-BECERRA, J. A.; FLORES, A. A. O.; VALERIO-ALFARO, G.; SOTO-RODRIGUEZ, I.; RODRÍGUEZ-ESTRADA, M. T.; GARCÍA, H. S. Cholesterol oxidation and astaxanthin degradation in shrimp during sun drying and storage. **Food Chemistry**, v. 145, p. 832-839, 2014.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.; PRIOR, R. L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4437-4444, 2002.

HUANG, L. H.; WANG, B. G. Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the Qingdao coastline. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4993-4997, 2004.

HUBER, K. C.; PIKE, O. A.; HUBER, C. S. Antioxidant Inhibition of Cholesterol Oxidation in a Spray-Dried Food System during Accelerated Storage. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 909-916, 1995.

HUBER, G. M.; RUPASINGHE, H. P. V.; SHAHIDI, F. Inhibition of oxidation of omega-3 polyunsaturated fatty acids and fish oil by quercetin glycosides. **Food Chemistry**, v.

117, p. 290–295, 2009.

HUR, S. J.; PARK, G. B.; JOO, S.T. Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products. **Food Control**, v. 18, p. 939–947, 2007.

HUR, S. J.; NAM, K. C.; MIN, B.; DU, M.; SEO, K. I.; AHN, D. U. Effects of dietary cholesterol and its oxidation products on pathological lesions and cholesterol and lipid oxidation in the rabbit liver. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

IBAMA. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Relatório de Reunião sobre a pescada de sardinha na região Sul e Sudeste**. Itajaí, p. 1-34, 2013.

ISLAM, R. U.; KHAN, M. A.; ISLAM, S. U. Plant derivatives as promising materials For processing and packaging of meat-based Products – focus on antioxidant and Antimicrobial effects. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, 2017.

JACOBI, H.; EICKE, B.; WITTE, I. DNA strand break induction and enhanced cytotoxicity of propyl gallate in the presence of copper(II). **Free Radical Biology & Medicine**, v. 24, p. 972–978, 1997.

JAGANATH, I. B.; CROZIER, A. **Dietary flavonoids and phenolic compounds**. In C. G. Fraga (Ed.), *Plant phenolics and human health* (pp. 1–49). Hoboken, NJ: JohnWiley & Sons, Inc, 2010.

JANG, E. R.; LEE, C. S. 7-ketocholesterol induces apoptosis in differentiated PC12 cells via reactive oxygen species-dependent activation of NF-kappaB and Akt pathways. **Neurochemistry International** , v. 9, p. 52-58, 2011.

JANOSZKA, B. 7-Ketocholesterol and 7-hydroxycholesterol in pork meat and its gravy thermally treated without additives and in the presence of onion and garlic. **Meat Science**, v. 86, p. 976–984, 2010.

JARDIM, C.; MACEDO, D.; FIGUEIRA, I.; DOBSON, G.; MCDUGALL, G. J.; STEWART, D.; FERREIRA, R. B.; MENEZES, R.; SANTOS, C. N. Polyphenol metabolites from *Arbutus unedo* leaves protect yeast from oxidative injury by activation of antioxidant and protein clearance pathways. **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 333–346, 2017.

JASWIR, I.; OSMAN, F.; KHATIB, A.; CHOWDHURY, A. J. C. Storage Stability of Fish Oil from Langkawi Island, Malaysia. **Food Science and Technology Research**, v.15, p.591- 598, 2009.

JAVITT, N. B. Breast cancer and (25R)-26-hydroxycholesterol. **Steroids**, v. 104, p. 61-64, 2015.

JIANG, J.; XIONG, Y. L. Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: A review. **Meat Science**, v. 120, p. 107-117, 2016.

KANNER, J. Oxidative Processes in Meat and Meat Products: Quality Implications. **Meat Science**, v. 36, p. 169-189, 1994.

KARRE, L.; LOPEZ, K.; GETTY, K. J. K. Natural antioxidants in meat and poultry products. **Meat Science**, v. 94, p. 220-227, 2013.

KASHANIAN, S.; DOLATABADI, J. E. N. DNA binding studies of 2-*tert*-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. **Food Chemistry**, v. 116, p. 743-747, 2009.

KARWOWSKA, M.; DOLATOWSKI, Z. J. Effect of mustard on lipid oxidation in model pork meat product. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, p. 311-318, 2014.

KHATIB, S.; VAYA, J. Oxysterols and symptomatic versus asymptomatic human atherosclerotic plaque. **Biochemistry and Biophysical Research Communications**, v. 446, p. 709-713, 2014.

KIM, J. E. Vitamer Fraction in Rice Bran Inhibits Autooxidation of Cholesterol and Linoleic Acid in Emulsified System during Incubation. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 70, p. 286-291, 2005.

KIM, J. S.; GODBER, J. S.; PRINAYWIWATKUL, W. Restructured Beef Roasts Containing Rice Bran Oil and Fiber Influences Cholesterol Oxidation and Nutritional Profile. **Journal of Muscle Foods**, v. 11, p. 111-127, 2000.

KIM, J.; GODBER, J. S.; KING, J. M.; PRINYAWIWATKUL, W. Inhibition of Cholesterol Autoxidation by the Nonsaponifiable Fraction in Rice Bran in an Aqueous Model System. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, p. 685-689, 2001.

KIM, S. K.; NAWAR, W. W. Parameters Influencing Cholesterol Oxidation. **Lipids**, v. 28, p. 917-922, 1993.

KIM, J. S.; SUH, M. H.; YANG, C. B.; LEE, H. G. Effect of  $\gamma$ -Oryzanol on the Flavor and Oxidative Stability of Refrigerated Cooked Beef. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 2423-2429, 2003.

KIM, B.; RYU, Y.; CHO, Y.; RHEE, M. Influence of Dietary  $\alpha$ -Tocopheryl Acetate Supplementation on Cholesterol Oxidation in Retail Packed Chicken Meat during Refrigerated Storage. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, p. 808-814, 2006.

KINDLEYSIDES, S.; QUEK, S.; MILLER, M. R. Inhibition of fish oil oxidation and the radical scavenging activity of New Zealand seaweed extracts. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1624-1631, 2012.

KOBAYASHI, H.; OIKAWA, S.; HIRAKAWA, K.; KAWANISHI, S. Metal-mediated oxidative damage to cellular and isolated DNA by gallic acid, a metabolite of antioxidant propyl gallate. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 558, p. 111-120, 2003.

KOBUS-CISOWSKA, J.; FLACZYK, E.; RUDZIŃSKA, M.; DOMINIK KMIECIK, D. Antioxidant properties of extracts from *Ginkgo biloba* leaves in meatballs. **Meat Science**,

v. 97, p. 174–180, 2014.

KREILAUS, F.; SPIRO, A. S.; MCLEAN, C. A.; GARNER, B.; JENNER, A. M. Evidence for altered cholesterol metabolism in Huntington's disease post mortem brain tissue. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 42, p. 535-546, 2015.

KULIG, W.; OLZYNSKA, A.; JURKIEWICZ, P.; KANTOLA, A. M.; KOMULAINEN, S.; MANNA, M.; POURMOUSA, M.; VAZDAR, M.; CWIKLIK, L.; ROG, T.; KHELASHVILI, G.; HARRIES, D.; TELKKI, V.V.; HOF, M.; VATTULAINEN, I.; JUNGWIRTH, P. Cholesterol under oxidative stress-how lipid membranes sense oxidation as cholesterol is being replaced by oxysterols. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 84, p. 30–41, 2015.

KULIG, W.; CWIKLIK, L.; JURKIEWICZ, P.; ROG, T.; VATTULAINEN, I. Cholesterol oxidation products and their biological importance. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 199, p. 144-160, 2016.

KUMAR, Y.; YADAV, D. N.; AHMAD, T.; NARSAIAH, K. Recent Trends in the Use of Natural Antioxidants for Meat and Meat Products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, p. 796-812, 2015.

LABRE, T. S.; RODRIGUES, N.; AUGUSTA, I. M.; BARBOSA JUNIOR, J. L.; SALDANHA, T. Composição centesimal e caracterização da atividade antioxidante de frutos e da farinha de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Magistra**, v. 25, p. 1-4, 2013.

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

LAI, S.; GRAY, J. I.; PARTRIDGE, J. A.; FLEGAL, C. J. Stability of Cholesterol and Paprika Carotenoids in Egg Powders as Influenced by Dietary and Processing Treatments. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 72, p. 171-178, 1996.

LAMPI, A.; JUNTUNEN, L.; TOIVO, J.; PIIRONEN, V. Determination of thermooxidation products of plant sterols. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 777, p. 83–92, 2002.

LEAL-CASTAÑEDA, E. J.; HERNÁNDEZ-BECERRA, J.A.; RODRÍGUEZ-ESTRADA, M.T.; GARCÍA, H. S. Formation of cholesterol oxides in lipid medium during microwave heating. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, n. 4, p. 1–13, 2017.

LEBOVICS, V.; LUGASI, A.; HÓVARI, J.; AUBOURG, S. P. Partial inhibition of cholesterol oxides formation in frozen fish pre-treated with a plant extract. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 342-348, 2009.

LEE, H. W.; CHIEN, J. T.; CHEN, B. H. Inhibition of cholesterol oxidation in marinated foods as affected by antioxidants during heating. **Food Chemistry**, v. 108, p. 234–244, 2008.

LEE, M. T.; LIN, W. C.; YU, B.; LEE, T. T. Antioxidant capacity of phytochemicals and their potential effects on oxidative status in animals — A review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 30, p. 299-308, 2017.

LENZI, M.; ORTHI, A. I. Caracterização funcional do sistema reprodutivo da Aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius*) em Florianópolis-SC. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, p. 298-301, 2004.

LEONARDUZZI, G.; GARGIULO, S.; GAMBA, P.; TESTA, G.; SOTTERO, B.; ROSSIN, D.; STAURENGHI, E.; POLI, G. Modulation of cell signaling pathways by oxysterols in age-related human diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 75, p. S5, 2014.

LEONI, V.; CACCIA, C. The impairment of cholesterol metabolism in Huntington disease. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, p. 1095–1105, 2015.

LERCH, S.; FERLAY, A.; GRAULET, B.; CIRI, C.; VERDIER-METZ, I.; MONTEL, M. C.; CHILLIARD, Y.; MARTIN, B. Extruded linseeds, vitamin E and plant extracts in corn silage-based diets of dairy cows: Effects on sensory properties of raw milk and uncooked pressed cheese. **International Dairy Journal**, v. 51, p. 65-74, 2015.

LERCKER, G.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T. Cholesterol Oxidation: Presence of 7- ketocholesterol in Different Food Products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, p. 625-631, 2000.

LEVY, D.; RUIZ, J. L. M.; CELESTINO, A. T.; SILVA, S. F.; FERREIRA, A. K.; ISAAC, C.; BYDLOWSKI, S. P. Shortterm effects of 7-ketocholesterol on human adipose tissue mesenchymal stem cells *in vitro*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 446, p. 720-725, 2014.

LEVY, D.; MELO, T. C.; RUIZ, J. L. M.; BYDLOWSKI, S. P. Review: Oxysterols and mesenchymal stem cell biology. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 207, p. 223–230, 2017.

LI, S. X.; CHERIAN, G.; AHN, D. U.; HARDIN, R. T.; SIM, J. S. Storage, Heating, and Tocopherols Affect Cholesterol Oxide Formation in Food Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 3830-3834, 1996.

LI, S.; CHEN, G.; ZHANG, C.; WU, M.; WU, S.; LIU, Q. Research progress of natural antioxidants in foods for the treatment of diseases. **Food Science and Human Wellness**, v. 3, p. 110–116, 2014.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigment photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 362–385, 1987.

LILA, M. A. Anthocyanins and Human Health: An *In Vitro* Investigative Approach. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 5, p. 306–313, 2004.

LIN, C. Y.; HUO, C.; KUO, L. K.; HIIPAKKA, R. A.; JONES, R. B.; LIN, H. P.;

HUNG, Y. W.; SU, L. C.; TSENG, J. C.; KUO, Y. Y.; WANG, Y. L.; FUKUI, Y.; KAO, Y. H.; KOKONTIS, J. M.; YEH, C. C.; CHEN, L.Y.; YANG, S. D.; FU, H. H.; CHEN, Y. W.; TSAI, K. K. C.; CHANG, J. Y.; CHUU, C. P. Cholestane-3 beta, 5 alpha, 6 beta-triol suppresses proliferation, migration, and invasion of human prostate cancer cells. **PLoS One**, v. 8, 2013.

LINGUA, M. S.; FABANI, M. P.; WUNDERLIN, D. A.; BARONI, M. V. *In vivo* antioxidant activity of grape, pomace and wine from three red varieties grown in Argentina: Its relationship to phenolic profile. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 332–345, 2016.

LIU, W.; XIE, X.; LIU, M.; ZHANG, J.; LIANG, W.; CHEN, X. Serum  $\omega$ -3 Polyunsaturated Fatty Acids and Potential Influence Factors in Elderly Patients with Multiple Cardiovascular Risk Factors. **Scientific Reports**, v.8, p.1-5, 2018.

LOPEZ-BOTE, C. J.; GRAY, J. I.; GOMAA, E. A.; FLEGAL, C. J. Effect of dietary administration of oil extracts from rosemary and sage on lipid oxidation in broiler meat. **British Poultry Science**, v. 39, p. 235-240, 1998.

LORENZO, J. M.; PATEIRO, M.; DOMÍNGUEZ, R.; BARBA, F. J.; PUTNIK, P.; KOVAČEVIĆ, D. B.; SHPIGELMAN, A.; GRANATO, D.; FRANCO, D. Berries extracts as natural antioxidants in meat products: A review. **Food Research International**, v. 106, p.1095-1104, 2017.

LUCENA, P. L. H.; RIBAS FILHO, J. M.; MAZZA, M.; CZECZKO, N. G.; DIETZ, U. A.; CORREA NETO, M. A.; HENRIQUES, G. S.; SANTOS, O. J.; CESCHIN, A. P.; THIELE, E. S. Avaliação da ação da Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p. 46-51, 2006.

LUCHETTI, F.; CANONICO, C.; CESARINI, E.; BETTI, M.; GALLUZZI, L.; GALLI, L.; TIPPINS, J.; ZERBINATI, C.; PAPA, S.; IULIANO, L. 7-ketocholesterol and 5,6-secosterol induce human endothelial cell dysfunction by differential mechanisms. **Steroids**, v. 99, p. 204- 211, 2015.

MAERKER, G. Cholesterol autoxidation current status. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 64, p. 388-392, 1987.

MAHAJAN, D.; BHAT, Z. F. KUMAR, S. Epigallocatechin-3-gallate: An efficient alternative to synthetic antioxidants and preservatives in cheese. **Nutrition & Food Science**, v. 47, p. 191-203, 2017.

MALGRANGE, B.; VARELA-NIETO, I.; DE MEDINA, P.; PAILLASSE, M. R. Targeting cholesterol homeostasis to fight hearing loss: a new perspective. **Front Aging Neuroscience**, v. 7, p. 1-3, 2015.

MAQSOOD, S.; BENJAKUL, S. Comparative studies of four different phenolic compounds on in vitro antioxidative activity and the preventive effect on lipid oxidation of fish oil emulsion and fish mince. **Food Chemistry**, v. 119, p. 123–132, 2010.

MAQSOOD, S.; BENJAKUL, S.; ABUSHELAIBI, A.; ALAM, A. Phenolic Compounds and Plant Phenolic Extracts as Natural Antioxidants in Prevention of Lipid



Oxidation in Seafood: A Detailed Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 1125-1140, 2014.

MARASCHIELLO, C.; ESTEVE, E.; GARCÍA, R. J. A. Cholesterol Oxidation in Meat from Chickens Fed  $\alpha$ -Tocopherol- and  $\beta$ -Carotene-Supplemented Diets with Different Unsaturation Grades. **Lipids**, v. 33, p. 705–713, 1998.

MARIUTTI, L. R. B.; NOGUEIRA, G. C.; BRAGAGNOLO, N. Lipid and Cholesterol Oxidation in Chicken Meat Are Inhibited by Sage but Not by Garlic. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 909-915, 2011.

MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 6, p. 761-770, 2006.

MARWARHA, G.; RAZA, S.; HAMMERA, K.; GHRIBIA, O. 27-hydroxycholesterol: A novel player in molecular carcinogenesis of breast and prostate cancer. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 207, p. 108–126, 2017.

MASUDA, T.; AKIYAMA, J.; FUJIMOTO, A.; YAMAUCHI, S.; MAEKAWA, T.; SONE, Y. Antioxidation reaction mechanism studies of phenolic lignans, identification of antioxidation products of secoisolariciresinol from lipid oxidation. **Food Chemistry**, v. 123, p. 442–450, 2010.

MATSUO, A. L.; FIGUEIREDO, C. R.; ARRUDA, D. C.; PEREIRA, F. V.; SCUTTI, J. A.; MASSAOKA, M. H.; TRAVASSOS, L. R.; SARTORELLI, P.; LAGO, J. H.  $\alpha$ -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 411, n.2, p.449-454, 2011.

MATUMOTO-PINTRO, P. T.; MURAKAMI, A. E.; VITAL, A. C. P.; CROGE, C.; SILVA, D. F.; OSPINA-ROJA, I. C.; GUERRA, A. F. Q. G. Effects of storage time and temperature on lipid oxidation of egg powders enriched with natural antioxidants. **Food Chemistry**, v. 228, p. 463-468, 2017.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. **Componentes principais dos alimentos: Lípidos**. In: DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. *Química de Alimentos de Fennema*, 4 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 131-900, 2010.

MEDINA-MEZA, I. G.; BARNABA, C. Kinetics of cholesterol oxidation in model systems and foods: Current status. **Food Engineering Reviews**, v. 5, p.171–184, 2013.

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

MELE, M.; CONTARINI, G.; CERCACI, L.; SERRA, A.; BUCCIONI, A.; POVOLO, M.; CONTE, G.; FUNARO, A.; BANNI, S.; LERCKER, G.; SECCHIARI, P. Enrichment of Pecorino cheese with conjugated linoleic acid by feeding dairy ewes with

extruded linseed: Effect on fatty acid and triglycerides composition and on oxidative stability. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 365-372, 2011.

MELO, A. D. B.; GOIS, F. D.; ANDRADE, C.; ROSTAGNO, M. H.; COSTA, L. B. Composição e atividade antimicrobiana do óleo essencial da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) com vistas ao uso como antimicrobiano para leitões desmamados. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, Curitiba, v. 12, n. 3, p. 227-232, 2014.

MESÍAS, M.; HOLGADO, F.; SEVENICH, R.; BRIAND, J.C.; MÁRQUEZ RUIZ, G.; MORALES, F. J. Fatty acids profile in canned tuna and sardine after retort sterilization and high pressure thermal sterilization treatment. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 54, p. 171-174, 2015.

MEYNIER, A.; LEBORGNE, C.; VIAU, M.; SCHUCK, P.; GUICHARDANT, M.; RANNOU, C.; ANTON, M. n-3 fatty acid enriched eggs and production of egg yolk powders: An increased risk of lipid oxidation? **Food chemistry**, v. 153, p. 94–100, 2014.

MI, H.; GUO, X.; LI, J. Effect of 6-gingerol as natural antioxidant on the lipid oxidation in red drum fillets during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 70-76, 2016.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 48, p. 91, 1971.

MORAIS, T. R.; COUTINHO, A. P. R.; CAMILO, F. F.; MARTINS, T. S.; SARTORELLI, P.; MASSAOKA, M. H.; FIGUEIREDO, C. R.; LAGO, J. H. G. 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, 492-497, 2017.

MORGAN, J. N.; ARMSTRONG, D. J. Quantification of cholesterol oxidation products in egg yolk powder spray-dried with direct heating. **Journal of Food Science**, v. 57, p. 43–45, 1992.

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

MUNEKATA, P. E. S.; DOMÍNGUEZ, R.; FRANCO, D.; BERMÚDEZ, R.; TRINDADE, M. A.; LORENZO, J. M. Effect of natural antioxidants in Spanish salchichón elaborated with encapsulated n-3 long chain fatty acids in konjac glucomannan matrix. **Meat Science**, v. 124, p. 54–60, 2017.

NAGAI, F.; OKUBO, T.; USHIYAMA, K.; SATOH, K.; KANO, I. Formation of hydroxydeoxyguanosine in calf thymus DNA treated with tertbutylhydroquinone, a major metabolite of butylated hydroxyanisole. **Toxicology Letters**, v. 89, p. 163–167, 1996.

NASCIMENTO, J. A.; MAGNANI, M.; SOUZA, J. M. B.; ARAÚJO, K. L. G. V.; EPAMINONDAS, P. S.; SOUZA, A. S.; SOUZA, A. L.; SILVA, M. C. D.; SOUZA, A. G. Assessment of the Antioxidant Effects of *Moringa oleifera* Lam. Extracts in Fish Oil during Storage. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 40, p. 29-36,

2016.

NAWAR, W. W.; KIM, S. K.; LI, Y. J.; VAIDI, M. Measurement of Oxidative Interactions of Cholesterol. **Journal of The American Oil Chemists'**, v.68, p. 496-498, 1991.

NELSON, E. R.; CHANG, C. Y.; MCDONNELL, D. P. Cholesterol and breast cancer pathophysiology. **Trends Endocrinology and Metabolism**, v. 25, p. 649–655, 2014.

NETO, A. J. P.; CORDEIRO, R. M. Molecular simulations of the effects of phospholipid and cholesterol peroxidation on lipid membrane properties. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1858, p. 2191-2198, 2016.

NICKI, E.; YOSHIDA, Y.; SAITO, Y.; NOGUCHI, N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition and biological effects. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 336, n. 1, p. 1-9, 2005.

NIETO, S.; GARRIDO, A.; SANHEZA, J.; LOYOLA, L. A.; MORALES, G.; LEIGHTON, F.; VALENZUELA, A. Flavonoids as Stabilizers of Fish Oil: An Alternative to Synthetic Antioxidants. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, v. 70, n. 3, p. 773-777, 1993.

NOGUCHI, N.; SAITO, Y.; URANO, Y. Diverse functions of 24S-hydroxycholesterol in the brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 446, v. 3, p. 692–696, 2014.

NOLLET, L. M. L.; TOLDRÁ, F. **Handbook of seafood and seafood products analysis**. CRC Press, p. 69-120, 189-214, 309-326, 395-424, 2010.

NUNES, M. L.; BATISTA, I.; BANDARRA, N. M.; MORAIS, M. G.; RODRIGUES, P. O. **Produtos da Pesca: Valor nutricional e importância para a saúde e bem-estar dos consumidores**. Publicações Avulsas do IPIMAR, n. 18, p. 14-16, 2008.

OBARA, A.; OBIEDZINSKI, M.; KOLCZAK, T. The effect of water activity on cholesterol oxidation in spray and freeze-dried egg powders. **Food Chemistry**, v. 95, p. 173-179, 2006.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual de Pesca – Ciência e Tecnologia do Pescado**. São Paulo: Livraria Varela, v. 1, p. 99-191, 1999.

OJAGH, S. M.; REZAEI, M.; RAZAVI, S. H.; HOSSEINI, S. M. H. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. **Food Chemistry**, v. 120, p. 193-198, 2010.

OKUBO, T.; YOKOYAMA, Y.; KANO, K.; KANO, I. Cell death induced by the phenolic antioxidant *tert*-butylhydroquinone and its metabolite *tert*-butylquinone in human monocytic leukemia U937 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 679–688, 2003.

OLIVIER, E.; DUTOTA, M.; REGAZZETTI, A.; LAPRÉVOTE, O.; RAT, P. 25-Hydroxycholesterol induces both P2X7-dependent pyroptosis and caspase-dependent

apoptosis in human skin model: New insights into degenerative pathways. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 207, p. 171–178, 2017.

OPREA, E.; RUTA, L. L.; NICOLAU, I.; POPA, C. V.; NEAGOE, A. D.; FARCASANU, I. C. *Vaccinium corymbosum* L. (blueberry) extracts exhibit protective action against cadmium toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Food Chemistry**, v. 152, p. 516–521, 2014.

ORCZEWSKA - DUDEK, S.; BEDERSKA - ŁOJEWSKA, D; PIESZKA, M.; PIETRAS, M. P. Cholesterol and lipid peroxides in animal products and health implications – a review\*. **Annals Animal Science**, v. 12, p. 25-52, 2012.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10-36, 2015.

OSADA, K.; HOSHINA, S.; NAKAMURA, S.; SUGANO, M. Cholesterol Oxidation in Meat Products and Its Regulation by Supplementation of Sodium Nitrite and Apple Polyphenol before Processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3823-3829, 2000.

OSADA, K.; KODAMA, T.; CUI, L.; YAMADA, K.; SUGANO, M. Levels and formation of oxidized cholesterol in processed marine foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, 1893–1898, 1993.

OTAEGUI-ARRAZOLA, A.; MENENDEZ CARRENO, M.; ANSORENA, D.; ASTIASARAN, I. Oxysterols: a world to explore. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3289–3303, 2010.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619-4626, 2001.

OZOGUL, Y.; DURMUS, M.; BALIKCI, E.; OZOGUL, F.; AYAS, D.; YAZGAN, H. 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 and Technology**, v. 46, p. 236–242, 2011.

PAGANI, A. A. C.; SOUZA, A. L. G.; SOUZA, D. S.; BATISTA, R.; XAVIER, A. C. R.; PAGANI, G. D. Quantification of Bioactive Compounds of Pink Pepper (*Schinus Terebinthifolius*, Raddi). **International Journal of Engineering and Innovative Technology (IJEIT)**, v. 4, n. 5, p. 37-41, 2014.

PALOZZA, P.; BARONE, E.; MANCUSO, C.; PICCI, N. The protective role of carotenoids against 7-ketocholesterol formation in solution. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 309, p. 61–68, 2008.

PAULO, P. T. C.; DINIZ, M. D. F. F. M.; MEDEIROS I. A. D.; MORAIS, L. C. S. L. D.; ANDRADE, F. B. D.; SANTOS, H. B. Phase I clinical toxicological assays of a complex herbal medicine (*Schinus terebinthifolius* Raddi, *Plectranthus amboinicus* Lour and *Eucalyptus globulus* Labill). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 68-76, 2009.

PHAN, H. T. T.; HATA, T.; MORITA, M.; YODA, T.; HAMADA, T.; VESTERGAARD, M. D. C.; TAKAGI, M. The effect of oxysterols on the interaction of Alzheimer's amyloid beta with model membranes. **Biochimia at Biophysica .Acta-Biomembranes**, v. 1828, p. 2487–2495, 2013.

PIMENTEL, C.; BATISTA-NASCIMENTO, L.; RODRIGUES-POUSADA, C.; MENEZES, R. A. Oxidative stress in Alzheimer's and Parkinson's diseases: insights from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1–9, 2012.

PIÑHEIRO, Z.; MARRUFO-CURTIDO, A.; VELA, C.; PALMA, M. Microwave-assisted extraction of stilbenes from woody vine material. **Food and bioproducts processing**, v. 103, p. 18-26, 2017.

PIRES, O. C.; TAQUEMASA, A. V. C.; AKISUE, G.; DE OLIVEIRA, F.; PULZ ARAUJO, C. E. P. Preliminary comparative analysis of the acute toxicity and median lethal dose (LD50) of the fruit of the Brazilian black pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) and black pepper (*Piper nigrum* L.). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n.2, p. 176-182, 2004.

POLAK, T.; ZLENDER, B.; LUSNIC, M.; GASPERLIN, L. Effects of coenzyme Q10,  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid on oxidation of cholesterol in chicken liver pâté. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 1052-1058, 2011.

PRICE, A.; DÍAZ, P.; BAÑÓN, S.; GARRIDO, M. D. Natural extracts versus sodium ascorbate to extend the shelf life of meat-based ready-to-eat meals. **Food Science and Technology International**, v. 19, p. 427-438, 2013.

PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. **Journal of functional foods**, v. 18, p. 797-810, 2015.

PROCHAZKOVA, D.; BOUŠOVA, I.; WILHELMOVA, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, p. 513–523, 2011.

RAATZ, S. K.; SILVERSTEIN, J. T.; JAHNS, L.; PICKLO, M. J. Review issues of fish consumption for cardiovascular disease risk reduction. **Nutrients**, v. 5, p. 1081-1097, 2013.

RAEISI, S.; SHARIFI-RAD, M.; QUEEK, S. Y.; SHABANPOUR, B.; SHARIFI-RAD, J. Evaluation of antioxidant and antimicrobial effects of shallot (*Allium ascalonicum* L.) fruit and ajwain (*Trachysper mumammi* L.) sprague seed extracts in semi-fried coated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets for shelf-life extention. **LWT – Food Science and Technology**, v. 65, p. 112-121, 2016.

RAHILA, M.P.; NATH, B. S.; NAIK, N. L.; PUSHPADASS, H. A.; MANJUNATHA, M.; FRANKLIN M. E. E. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) extract: A source of natural antioxidants for imparting autoxidative and thermal stability to ghee. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, p. 1-10, 2017.

RAMALHO, H. M. M.; CASAL, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Total Cholesterol and Desmosterol Contents in Raw, UHT, Infant Formula Powder and Human Milks Determined by a New Fast Micro-HPLC Method. **Food Analytical Methods**, v. 4, p. 424–430, 2011.

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

REN, Y.; PEREZ, T. I.; ZUIDHOF, M. J.; RENEMA, R. A.; WU, J. Oxidative Stability of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Enriched Eggs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 11595–11602, 2013.

RIBAS, M. O.; SOUSA, M. H.; SARTORETTO, J.; LANZONI, T. A.; NORONHA, L.; ACRA, L. A. Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Revista Odonto Ciência**, v. 21, n. 53, p. 245-252, 2006.

RODRIGUEZ, I. R.; CLARK, M. E.; LEE, J. W.; CURCIO, C. A. 7-ketocholesterol accumulates in ocular tissues as a consequence of aging and is present in high levels in drusen. **Experimental Eye Research**, v. 128, p. 151-155, 2014.

RODRÍGUEZ-CARPENA, J.; MORCUENDE, D.; PETRÓN, M. J.; ESTÉVEZ, M. Inhibition of Cholesterol Oxidation Products (COPs) Formation in Emulsified Porcine Patties by Phenolic-Rich Avocado (*Persea americana* Mill.) Extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 2224–2230, 2012.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235- 254, 2005.

ROSA-FERNANDES, L.; MASELLI, L. M. F.; MAEDA, N. Y.; PALMISANO, G.; BYDŁOWSKI, S. P. Outside-in, inside-out: Proteomic analysis of endothelial stress mediated by 7-ketocholesterol. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 207, p. 231–238, 2017.

ROSAS, E. C.; CORREA, L. B.; PÁDUA, T. A.; COSTA, T. E. M. M.; MAZZEI, J. L.; HERINGER, A. P.; BIZARRO, C. A.; KAPLAN, M. A. C.; FIGUEIREDO, M. R.; HENRIQUES, M. G. Anti-inflammatory effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi hydroalcoholic extract on neutrophil migration in zymosan-induced arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 490–498, 2015.

RUDZÍŃSKA, M.; FLACZYK, E.; AMAROWICZ, R.; WASOWICZ, E.; KORCZAK, J. Antioxidative effect of crackling hydrolysates during frozen storage of cooked pork meatballs. **European Food Research and Technology**, v. 224, p. 293–299, 2007.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.

SÁ, R. A.; CASTRO, F. A. V.; ELEUTHERIO, E. C. A.; SOUZA, R. M.; SILVA, J. F. M.; PEREIRA, M. D. Brazilian propolis protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against oxidative stress. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 993-1000, 2013.

SABOLOVA, M.; POHORELA, B.; FIŠNAR, J.; KOURIMSKÁ, L.; CHRPOVÁ, D.; PANEKA, J. Formation of oxysterols during thermal processing and frozen storage of cooked minced meat. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p. 5092-5099, 2017.

SAHENA, F.; ZAIDUL, I.; JINAP, S.; SAARI, N.; JAHURUL, H.; ABBAS, K.; NORULAINI, N. PUFAs in fish: Extraction, fractionation, importance in health. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, p. 59-74, 2009.

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, p. 1301- 1309, 2008.

SALDANHA, T.; BRAGAGNOLO, N. Efeito do cozimento na formação de óxidos de colesterol e alteração da composição de ácidos graxos em peixes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 385-390, 2010.

SALDANHA, T.; SAWAYA, A. C. F.; EBERLIN, M. N.; BRAGAGNOLO, N. 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, p. 4107–4113, 2006.

SALEM, M. M. Z.; ALI, H. K.; EL-SHANHOREY, L. A. Identification of fatty acids from *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves using standard fatty acids with C2-C25. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 8, p. 209-214, 2014.

SALEM, M. Z. M.; EL-SHIKH, M. S.; ALI, H. M. Fatty Acids Constituents of Wood from *Schinus terebinthifolius* Raddi using GC Analysis. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 205-209, 2014.

SAMPAIO, G. R.; SALDANHA, T.; SOARES, E.A. M.; TORRES, F. S. Effect of natural antioxidant combinations on lipid oxidation in cooked chicken meat during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v.135, p. 1383–1390, 2012.

SANCHO, R. A. S.; LIMA, F. A.; COSTA, G. G.; MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Effect of Annatto Seed and Coriander Leaves as Natural Antioxidants in Fish Meatballs during Frozen Storage. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 838-845, 2011.

SANHUEZA, J. C.; NIETO, S. K.; VALENZUELA, A. B. Acido linoleico conjugado: un acido graso con isomeria trans potencialmente beneficioso. **Revista chilena de nutrición**, v. 29, p. 98-105, 2002.

SANKARI, M.; HRIDYA, H.; SNEHA, P.; GEORGE PRIYA DOSS, C.; SIVA RAMAMOORTHY. Effect of UV radiation and its implications on carotenoid pathway in *Bixa orellana* L. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, v. 176, p. 136–144, 2017.

SANTOS, E. O.; KABEYA, L. M.; FIGUEIREDO-RINHEL, A. S.; MARCHI, L. F.; ANDRADE, M. F.; PIATESI, F. Flavonols modulate the effector functions of healthy

individuals' immune complex-stimulated neutrophils: A therapeutic perspective for rheumatoid arthritis. **International Immunopharmacology**, v. 21, p. 102–111, 2014.

SATO, Y.; ISHIHARA, N.; NAGAYAMA, D.; SAIKI, A.; TATSUNO, I. 7-ketocholesterol induces apoptosis of MC3T3-E1 cells associated with reactive oxygen species generation, endoplasmic reticulum stress and caspase-3/7 dependent pathway. **Molecular Genetics and Metabolism Reports**, v. 10, p. 56-60, 2017.

SCAPIN, G.; SCHMIDT, M. M.; PRESTES, R. C.; ROSA, C. S. Phenolics compounds, flavonoids and antioxidant activity of chia seed extracts (*Salvia hispanica*) obtained by different extraction conditions. **International Food Research Journal**, v. 23, p. 2341-2346, 2016.

SEPPANEN, C. M.; SONG, Q.; CSALLANY, A. S. The antioxidant functions of tocopherol and tocotrienol homologues in oils, fats, and food systems. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, p. 469–481, 2010.

SERVIDDIO, G.; BELLANTI, F.; VILLANI, R.; TAMBORRA, R.; ZERBINATI, C.; BLONDA, M.; CIACCIARELLI, M.; POLI, G.; VENDEMIALE, G.; IULIANO, L. Effects of dietary fatty acids and cholesterol excess on liver injury: A lipidomic approach. **Redox Biology**, v. 9, p. 296-305, 2016.

SHAH, M. A.; DON BOSCO, S. J.; MIR, S. A. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. **Meat Science**, v. 98, p. 21–33, 2014.

SHAHIDI, F. Omega-3 fatty acids and marine oils in cardiovascular and general health: A critical overview of controversies and realities. **Journal of Functional Foods**, v. 19, 797-800, 2015.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Food**, v. 18, p. 820-897, 2015.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health Promotion. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 930–940, 2010.

SHIRZADEGAN, K.; FALAHPOUR, P. The physicochemical properties and antioxidative potential of raw thigh meat from broilers fed a dietary medicinal herb extract mixture. **Open Veterinary Journal**, v. 4; p. 69-77, 2014.

SHOZEN, K.; OHSHIMA, T.; USHIO, H.; TAKIGUCHI, A.; KOIZUMI, C. Effects of Antioxidants and Packing on Cholesterol Oxidation in Processed Anchovy during Storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 30, p. 2-8, 1997.

SIEBER, R. Oxidised cholesterol in milk and dairy products. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 191–206, 2005.

SILVA, B. G.; FILETI, A. M. F.; FOGLIO, M. A.; RUIZ, A. L. T. G.; ROSA, P. T V. 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, 2017a.

SILVA, M. M.; IRIGUCHI, E. K. K.; KASSUYA, C. A. L.; VIEIRA, M. C.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; SOUZA, K. P.; FORMAGIO, A. S. N. *Schinus terebinthifolius*: phenolic constituents and in vitro antioxidant, antiproliferative and in vivo anti-inflammatory activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 445–452, 2017b.

SILVA, J. H. S.; SIMAS, N. K.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S.; VENTURA, J. A.; LIMA, E. J.; SEABRA, S. H.; KUSTER, R. M. Anti-Escherichia coli activity of extracts from *Schinus terebinthifolius* fruits and leaves. **Natural Product Research**, 2017c.

SIMOPOULOS, A. P. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 17, p. 131–134, 2008.

SKOPP, G.; SCHWENKER, G. Biflavonoids from *Schinusterebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Zeitschrift Für Naturforschung**, v. 41, p. 1479–1482, 1986.

SMITH, L. L. Cholesterol autoxidation. **Chemical Physical Lipids**, v. 44, p. 44–125, 1987. SOARES, D. G. D. S. Avaliação Clínica e Microbiológica do Tratamento da Estomatite Protética com Tintura de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira). **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 10, n. 3, p. 365–370, 2010.

SOTTERO, B.; GARGIULO, S.; RUSSO, I.; BARALE, C.; POLI, G.; CAVALOT, F. Postprandial dysmetabolism and oxidative stress in type 2 diabetes: pathogenetic mechanisms and therapeutic strategies. **Medicinal Research Reviews**, v. 35, p. 968–1031, 2015.

SOUZA, A. R. M.; ARTHUR, V.; NOGUEIRA, D. P. The effects of irradiation in the preservation of pink pepper (*Schinus terenbinthifolius* Raddi). **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, p. 1082–1083, 2012.

SOUZA, V. L. F.; SILVA, R. S. S. F. Dietary Vitamin E Supplementation on Cholesterol and Cholesterol Oxides of Pig Meat and Cooked Ham. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 197–205, 2006.

STAHL, E.; KELLER, K.; BLINN, C. Cardanol, a skin irritant in pink pepper. **Planta Medica**, v. 48, p. 5–9, 1983.

STEINRÜCKEN, P.; PRESTEGARD, S. K.; DE VREE, J. H.; STORESUND, J. E.; PREE, B.; MJØS, S. A.; ERGA, S. R. Comparing EPA production and fatty acid profiles of three phaeodactylumtricornutum strains under western norwegian climate conditions. **Algal Research**, v. 30, p. 11–22, 2018.

STINCO, C. M.; BARONI, M. V.; B, ROMINA D. DI PAOLA NARANJO, R. D. D. P.; WUNDERLIN, D. A.; HEREDIA, F. J.; MELENDEZ-MARTINEZ, A. J.; VICARIO, I. M. Hydrophilic antioxidant compounds in orange juice from different fruit cultivars: Composition and antioxidant activity evaluated by chemical and cellular based (*Saccharomyces cerevisiae*) assays. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 37, 1–

10, 2015.

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

SUÁREZ-JIMÉNEZ, G; M.; LÓPEZ-SAIZ, C. M.; RAMÍREZ-GUERRA, H. E.; 4, JOSAFAT MARINA EZQUERRA-BRAUER, J. M.; RUIZ-CRUZ, S.;TORRES-ARREOLA, W. Role of Endogenous and Exogenous Tocopherols inthe Lipid Stability of Marine Oil Systems: A Review. **International Journal of Molecular Science**, v.17, 2016.

TABALDI, L. A.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H.; FORMAGIO, A. S. N.; PILECCO, M.; SILVA, L. R.; SANTOS, K. P.; SANTOS, L. A. C.; CARDOSO, C. A. L. Biomass Yield and Flavonoid and Phenol Content of *Schinus terebinthifolius* Cultivated in Single or Double Row With Poultry Litter. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n. 3, p. 787-796, 2016.

TAHERI, A.; FARVIN, K. H. S.; JACOBSEN, C.; BARON, C. B. Antioxidant activities and functional properties of protein and peptide fractions isolated from salted herring brine. **Food Chemistry**, v. 142, p. 318-326, 2014.

TAI, C.Y.; CHEN, Y. C.; CHEN, B. H. Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods an overview (part I). **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 7, n. 4, p. 243–57, 1999.

TAI, C. Y.; CHEN, Y. C.; CHEN, B. H. Analysis, Formation and Inhibition of Cholesterol Oxidation Products in Foods: An Overview (Part II). **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 8, p. 1-15, 2000.

TARLEY, C. R. T.; VISENTAINER, J. V.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N. E. Proximate composition, cholesterol and fatty acids profile of canned sardines (*Sardinella brasiliensis*) in soybean oil and tomato juice. **Food Chemistry**, v. 88, p. 1–6, 2004.

TARVAINEN, M.; QUIRIN, K.; KALLIO, H.; YANG, B. CO<sub>2</sub> Plant Extracts Reduce Cholesterol Oxidation in Fish Patties during Cooking and Storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 9653-9662, 2016.

THANAN, R.; OIKAWA, S.; HIRAKU, Y.; OHNISHI, S.; MA, N.; PINLAOR, S.; YONGVANIT, P.; KAWANISHI, S.; MURATA, M. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. **International Journal of Molecular Science**, v. 16, p. 193-217, 2014.

TIAN, Y.; PUGANEN, A.; ALAKOMI, H.; UUSITUPA, A.; SAARELA, M.; YANG, B. Antioxidative and antibacterial activities of aqueous ethanol extracts of berries, leaves, and branches of berry plants. **Food Research International**, v. 106, p. 291-303, 2018.

TRIEBEL, S.; TRIEU, H. L.; RICHLING, E. Modulation of inflammatory gene expression by a bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract and single anthocyanins considering their limited stability under cell culture conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 8902–8910, 2012.

TUBEROSO, C. I. G.; BOBAN, M.; BIFULCO, E.; BUDIMIR, D.; PIRISI, F. M. Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: The case of Cannonau wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey. **Food Chemistry**, v. 140, p. 686–691, 2013.

VAISALI, C.; BELUR, P. 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.

VALENZUELA, A.; SANHUEZA, J.; ALONSO, P.; CORBARI, A.; NIETO, S. Inhibitory action of conventional food-grade natural antioxidants and of natural antioxidants of new development on the thermal-induced oxidation of cholesterol. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 55, n. 2, p. 155-162, 2004.

VALENZUELA, A.; SANHUEZA, J.; NIETO, S. Cholesterol oxidized products in foods: potential health hazards and the role of antioxidants in prevention. **Grasas y Aceites**, v. 55, p. 312-320, 2004.

VAVÁKOVÁ, M.; URAIKOVÁ, Z.; TREBATICKÁ, J. Markers of oxidative stress and neuroprogression in depression. **Disorder Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2015, 2015.

VERARDO, V.; RICIPUTI, Y.; MESSIA, M. C.; MARCONI, E.; CABONI, M. F. Influence of drying temperatures on the quality of pasta formulated with different egg products. **European Food Research and Technology**, v. 243, p. 817–825, 2017.

VICENTE, J.; GUILHOME, P. D.; FERREIRA, M. V. S.; ALVES, M. D.; SALDANHA, T.; BARBOSA Jr., J. L. **Caracterização centesimal, nutricional e avaliação do potencial antioxidante da pimenta rosa e cambuci orgânicas. Uma alternativa de geração de renda para agricultura familiar.** In: III Simpósio Internacional de Plantas Medicinais e Nutracêuticos (3ISMNP) e III Conferência do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Frutos Tropicais, 2012, Aracaju. Simpósio Internacional de Plantas Medicinais e Nutracêuticos (3ISMNP) e III Conferência do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Frutos Tropicais. Aracaju, 2012a.

VICENTE, S. J. V.; SAMPAIO, G.R; FERRARI, C.K.B; TORRES, E.A. F. S. Oxidation of cholesterol in foods and its importance for human health. **Food Reviews International**, v. 28, p. 47-70, 2012b.

VIJI, P.; BINSI, P. K.; VISNUVINAYAGAM, S.; BINDU, J.; RAVISHANKAR, C. N.; GOPAL, T. K. S. Efficacy of mint (*Mentha arvensis*) leaf and citrus (*Citrus aurantium*) peel extracts as natural preservatives for shelf lifeextension of chill stored Indian mackerel. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 6278-6289, 2015.

VITAL, A. C. P.; SANTOS, N. W.; MATUMOTO-PINTRO, P. T. M.; SCAPIM, M. R. S.; MADRONA, G. S. Ice cream supplemented with grape juice residue as a source of antioxidants. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, p. 1-7, 2017.

VURUSANER, B.; GAMBA, P.; TESTA, G.; GARGIULO, S.; BIASI, F.;

ZERBINATI, C.; IULIANO, L.; LEONARDUZZI, G.; BASAGA, H.; POLI, G. Survival signaling elicited by 27- hydroxycholesterol through the combined modulation of cellular redox state and ERK/Akt phosphorylation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 77, p. 376–385, 2014.

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

YOUNG, A.; LOWE, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, p. 20–27, 2001.

WALLACE, T. C.; SLAVIN, M.; FRANKENFELD, C. L. Systematic review of anthocyanins and markers of cardiovascular disease. **Nutrients**, v. 8, 2016.

WALTE, H. G. **Die natürliche Variation des Cholesteringehaltes in der Rohmilch**. Dissertation, Universität Kiel, 1–109, 1994.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Stabilization of marine oils with flavonoids. **Journal of Food Lipids**, v. 5, p. 183–196, 1998.

WANG, L.; ZHANG, G.; PAN, J.; XIONG, C.; GONG, D. Intercalation binding of food antioxidant butylated hydroxyanisole to calf thymus DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 141, p. 253–261, 2014.

WASOWICZ, E. **Cholesterol and phytosterols**. In: SIKORSKI, Z. E.; KOLAKOWSKA, A. Chemical and Functional Properties of Food Lipids, U.S.A: CRC Press LLC, 2003.

WOJDYŁO, A.; OSZMIAŃSKI, J.; SOKÓŁ-ŁĘTOWSKA, A.; KORZENIOWSKA, M. Butter stabilization by plant phenolic antioxidants. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 14, p. 121-127, 2005.

WONG, D.; WANG, M. Inhibitory Activities of Some Vitamins on the Formation of Cholesterol Oxidation Products in Beef Patties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 8471–8476, 2013

XU, G.; GUAN, L.; SUN, J.; CHEN, Z. Oxidation of Cholesterol and  $\beta$ -Sitosterol and Prevention by Natural Antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 9284–9292, 2009.

XU, Z.; HUA, N.; GODBER, S. Antioxidant Activity of Tocopherols, Tocotrienols, and  $\gamma$ - Oryzanol Components from Rice Bran against Cholesterol Oxidation Accelerated by 2,2 $\phi$ - Azobis(2-methylpropionamidine) Dihydrochloride. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2077-2081, 2001.

XU, Z.; ZHANG, T.; PRINYAWIWATKUL, W.; GODBER, S. Capabilities of Different Cooking Oils in Prevention of Cholesterol Oxidation During Heating. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, p. 243-248, 2005.

XU, G. H.; SUN, J. L.; LIANG, Y. T.; YANG, C.; CHEN, Z. Y. Interaction of fatty acids with oxidation of cholesterol and beta-sitosterol. **Food Chemistry**, v. 124, p.162–170, 2011.

XU, G.; LIU, D.; ZHAO, G.; CHEN, S.; WANG, J.; YE, X. Effect of Eleven Antioxidants in Inhibiting Thermal Oxidation of Cholesterol. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, v. 93, p. 215–225, 2016.

XUE-SHAN, Z.; JUAN, P.; QI, W.; ZHONG, R.; LI-HONG, P.; ZHI-HAN, T.; ZHI-SHENG, J.; GUI-XUE, W.; LU-SHAN, L. Imbalanced cholesterol metabolism in Alzheimer's disease. **Clinica Chimica acta**, v. 156, p. 107-114, 2016.

YU, R.; TAN, T. H.; KONG, A. N. T. Butylated hydroxyanisole and its metabolite tert-butylhydroquinone differentially regulate mitogen-activated protein kinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 28962–28970, 1997.

ZANARDI, E.; NOVELLI, E.; GHIRETTI, G. P.; CHIZZOLINI, R. Oxidative stability of lipids and cholesterol in salame Milano, coppa and Parma ham: dietary supplementation with vitamin E and oleic acid. **Meat Science**, v. 55, p. 169-175, 2000.

ZARROUK, A.; VEJUX, A.; MACKRILL, J.; O'CALLAGHAN, Y.; HAMMAMI, M.; O'BRIEN, N.; LIZARD, G. Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes. **Ageing Research Reviews**, v. 18, p. 148–162, 2014.

ZHANG, D.; HAMAUZU, Y. Phenolic compounds, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant properties of green, red and yellow bell peppers. **Journal of Food Agriculture and Environment**, v.1, p. 1-6, 2003.

ZHANG, X.; SHEN, Y.; PRINYAWIWATKUL, W.; KING, J. M.; XU, Z. Comparison of the activities of hydrophilic anthocyanins and lipophilic tocols in black rice bran against lipid oxidation. **Food Chemistry**, v. 141, p. 111–116, 2013.

ZHANG, Y.; YE, X.; XU, Z.; DUAN, J.; WEI, C.; XU, G.; CHEN, S. Inhibitory effect of proanthocyanidins from Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) leaves on the lipid oxidation in an emulsion system. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, p. 517-522, 2017.

ZHENG, J. S.; HU, X. J.; ZHAO, Y. M.; YANG, J.; LI, D. Intake of fish and marine n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of breast cancer: meta-analysis of data from 21 independent prospective cohort studies. **BMJ**, v. 346, p. 3706-3716, 2013.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555-559, 1999

ZHU, X.; SVENDSEN, C.; JAEPELT, K. B.; MOUGHAN, P. J.; RUTHERFURD, S. M. A comparison of selected methods for determining eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in cereal-based foods. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1320–1327, 2011.

ZIBERNA, L.; FORNASARO, S.; ČVOROVIĆ, J.; TRAMER, F.; PASSAMONTI, S.

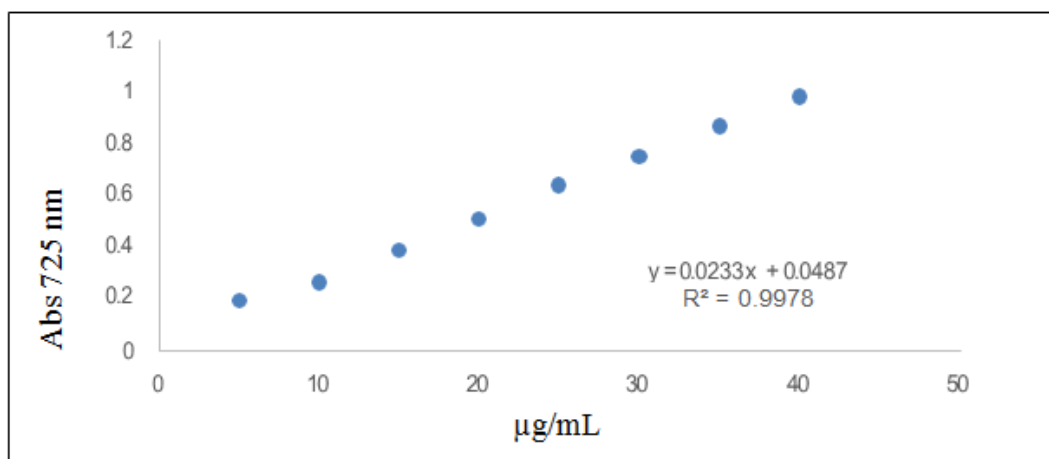
Bioavailability of flavonoids: The role of cell membrane transporters. **Polyphenols in Human Health and Disease**, v. 1, p. 489–511, 2014.

ZOCK, P. L.; BLOM, W. A. M.; NETTLETON, J. A.; HORNSTRA, G. Processing insights into the role of dietary fats in the prevention of cardiovascular disease. **Current Cardiology Reports**, v. 18, p. 1-13, 2016.

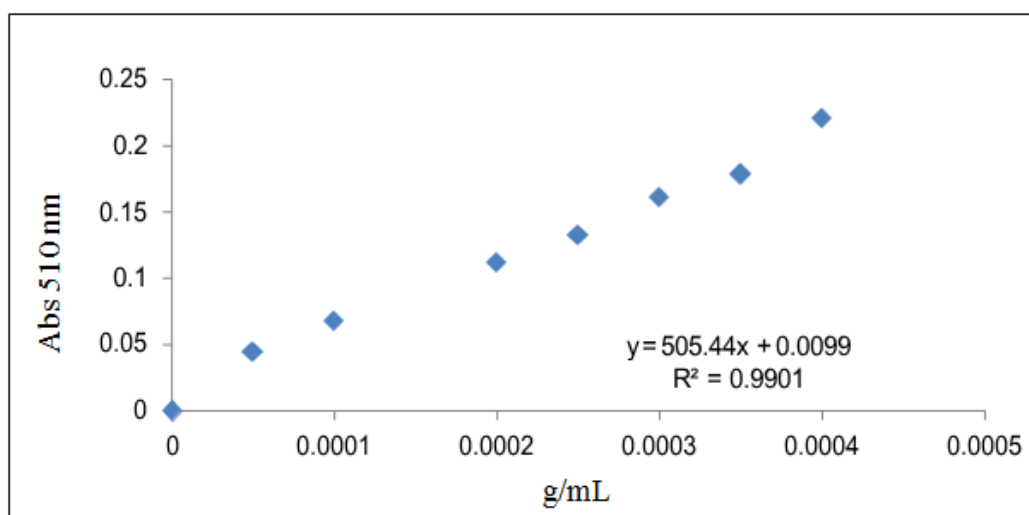
ZOTOS, A.; VOUZANIDOU, M. Seasonal changes in composition, fatty acid, cholesterol and mineral content of six highly commercial fish species of Greece. **Food Science and Technology International**, v. 18, p. 139-149, 2012.

## ANEXOS

### ANEXO A – Curvas de calibração para a determinação dos compostos bioativos

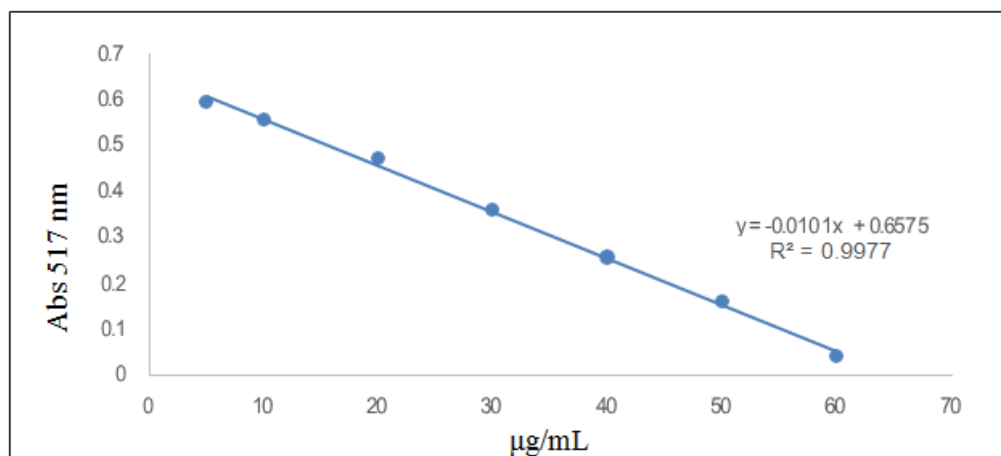


**Figura 22:** Curva de calibração para a quantificação de fenólicos totais.

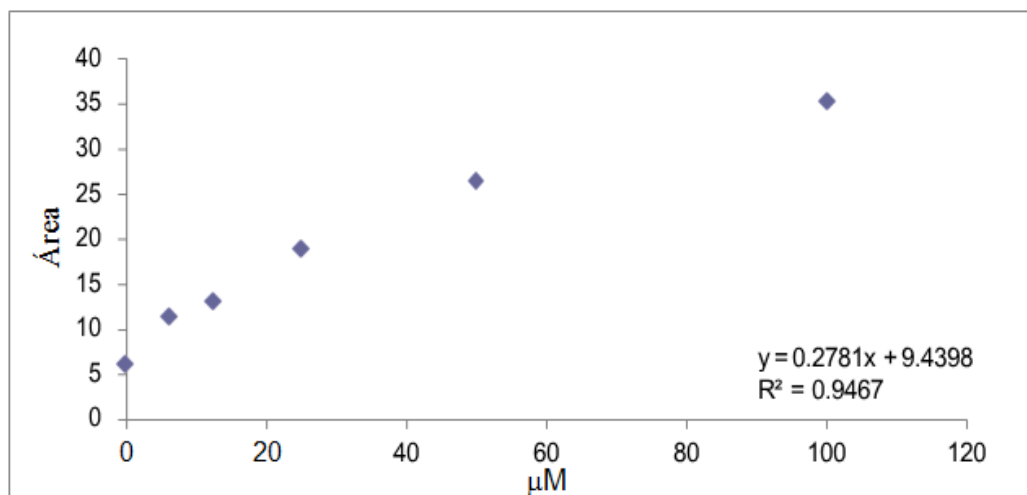


**Figura 23:** Curva de calibração para a quantificação de flavonoides totais.

## ANEXO B – Curvas de calibração para as análises antioxidantes *in vitro*



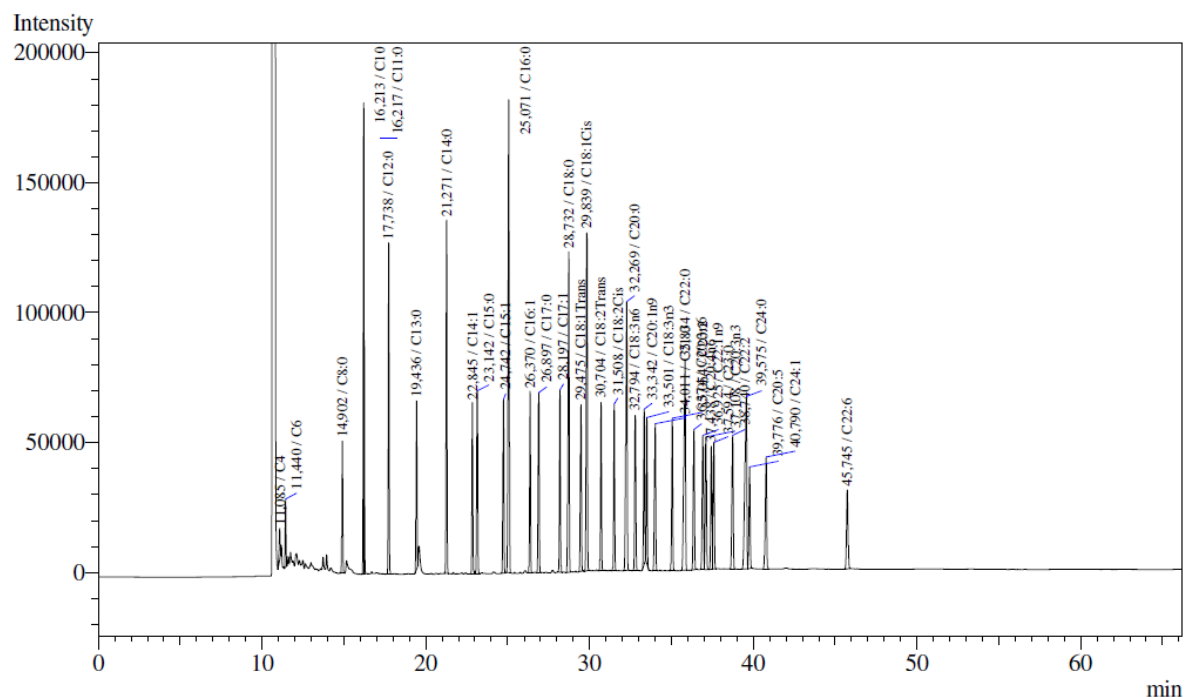
**Figura 24:** Curva de calibração para análise de DPPH.



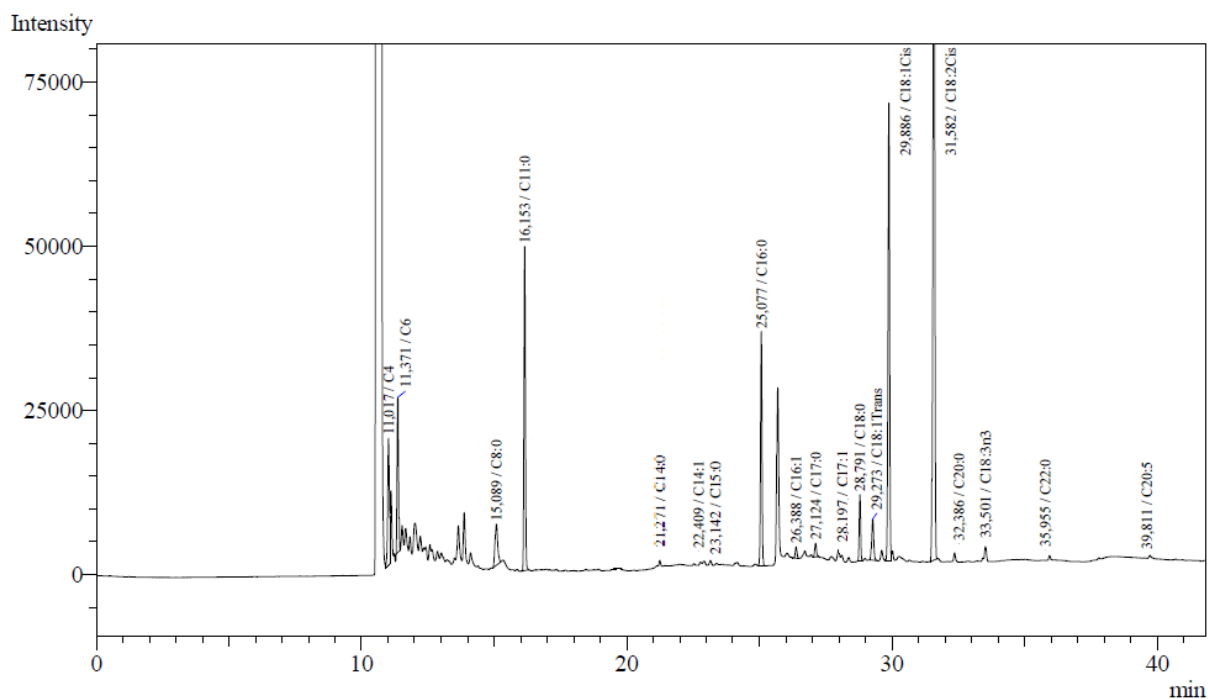
**Figura 25:** Curva de calibração do Trolox (ORAC). Área = Área sob a curva para diferentes concentrações de antioxidante – Área sob a curva para o controle (sem antioxidante).



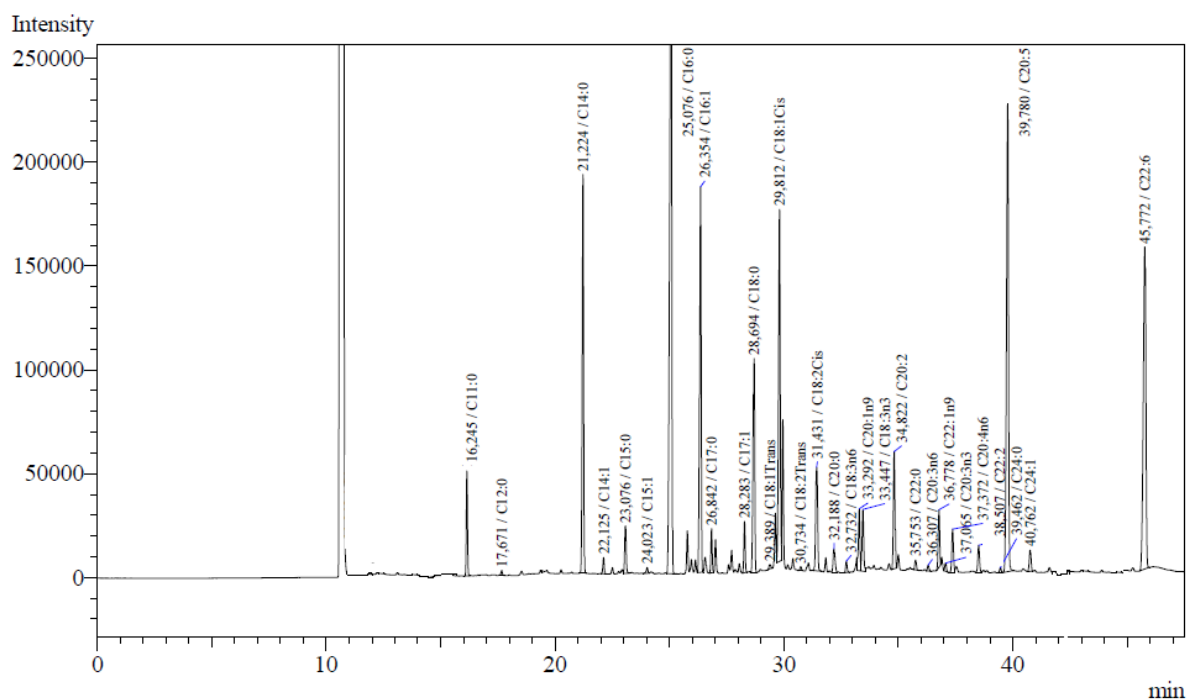
## ANEXO C – Ácidos graxos



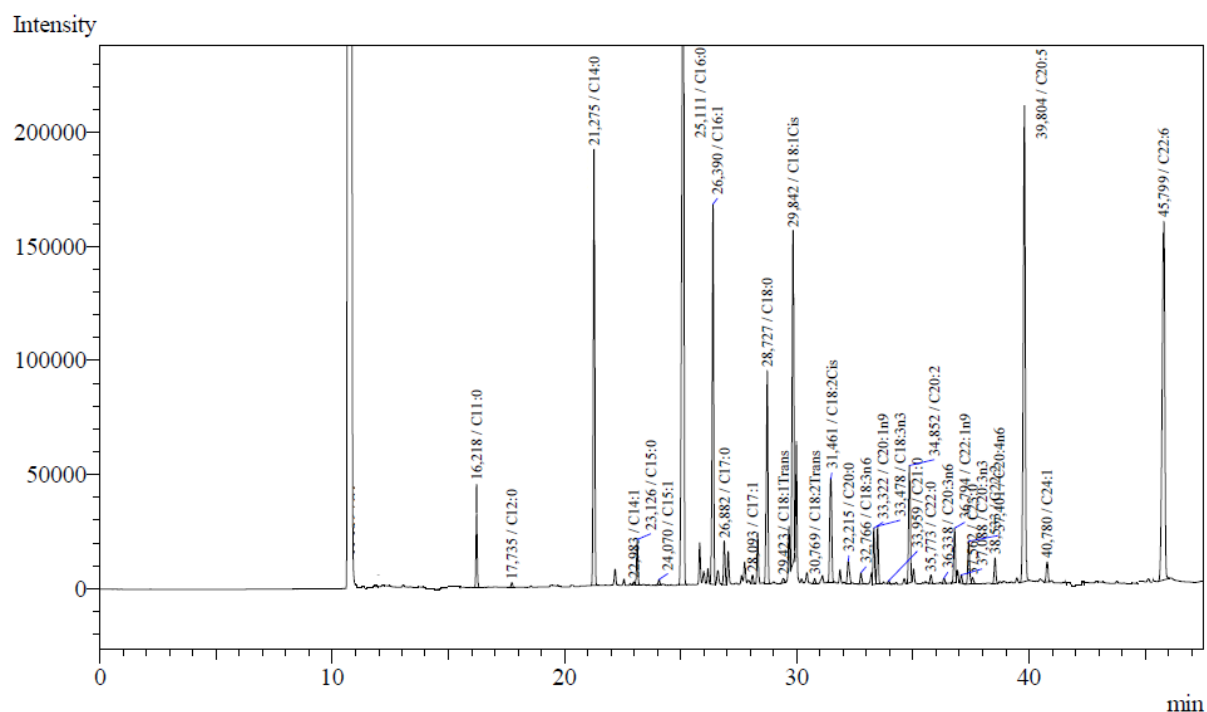
**Figura 26:** Perfil cromatográfico dos padrões de ésteres metílicos dos ácidos graxos.



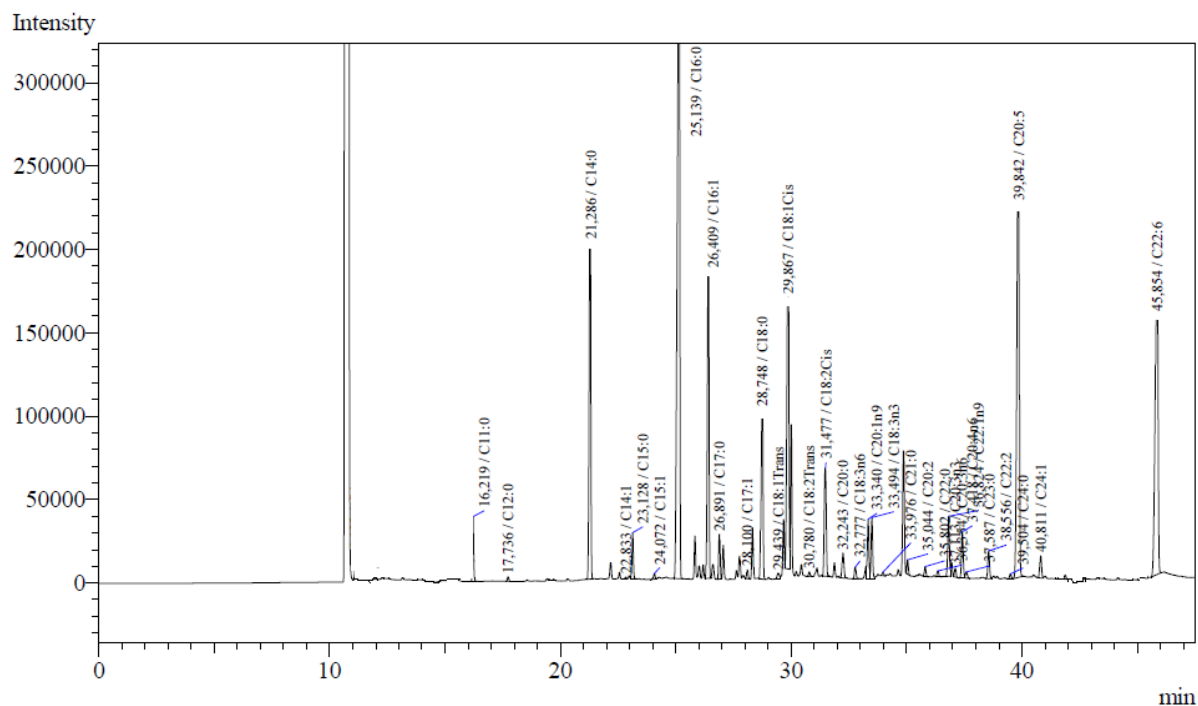
**Figura 27:** Perfil cromatográfico dos frutos da aroeira.



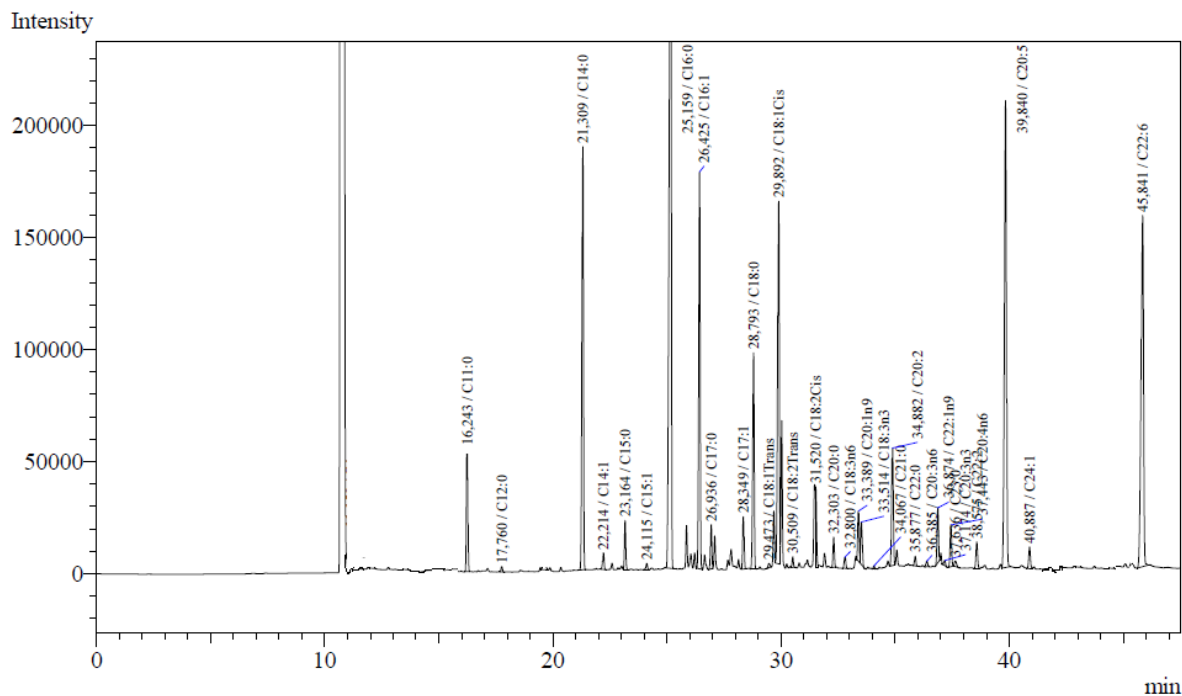
**Figura 28:** Perfil cromatográfico da amostra de óleo sem aquecimento.



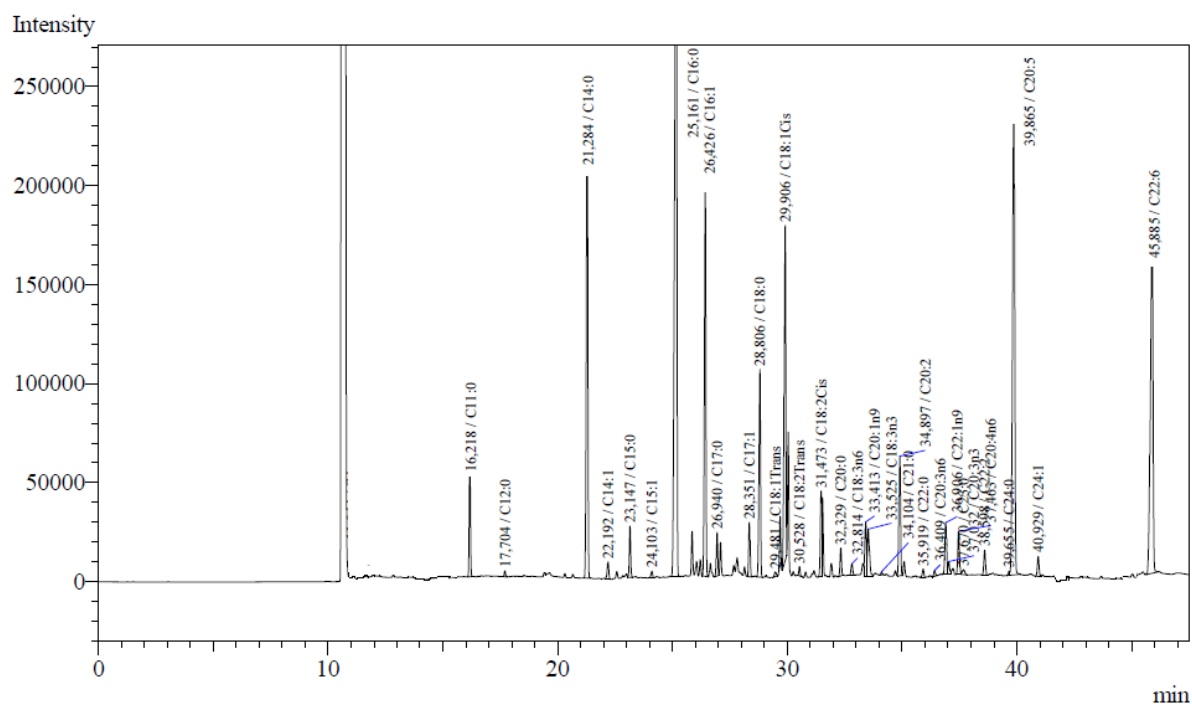
**Figura 29:** Perfil cromatográfico da amostra de óleo controle aquecida a 150 °C.



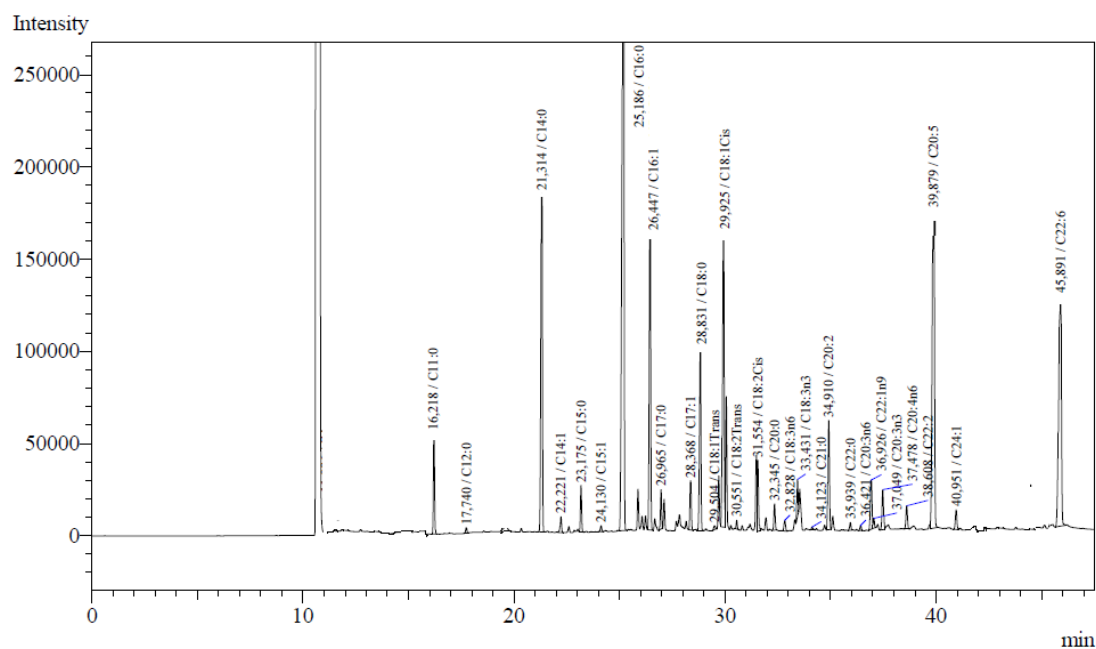
**Figura 30:** Perfil cromatográfico da amostra de óleo com pimenta 0,2% aquecida a 150 °C.



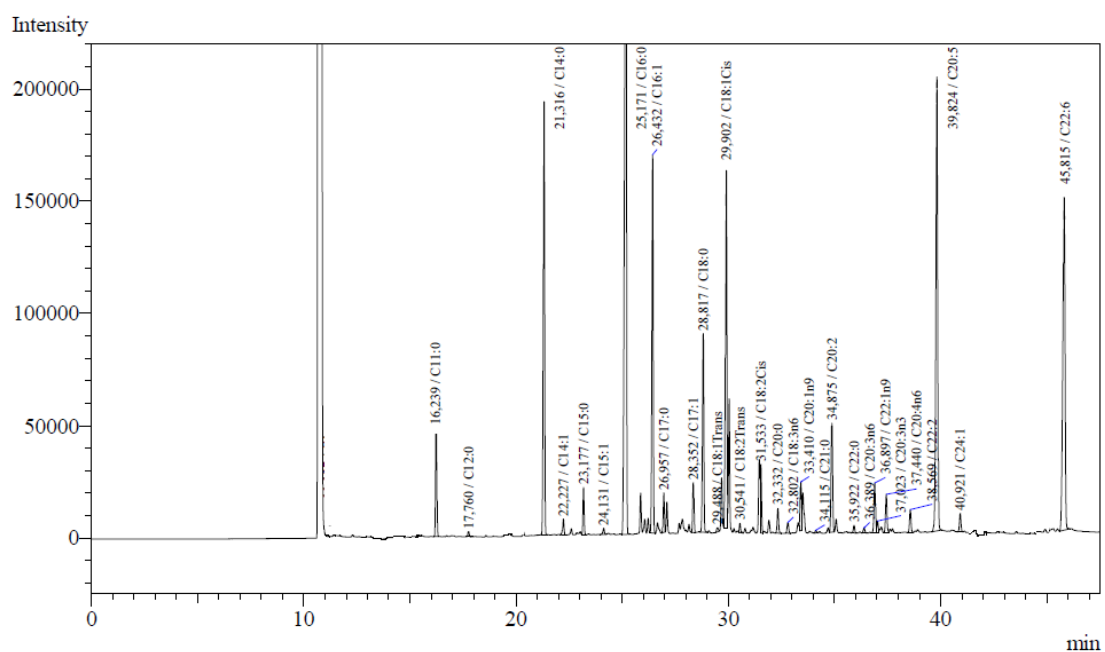
**Figura 31:** Perfil cromatográfico da amostra de óleo com pimenta 0,5% aquecida a 150 °C.



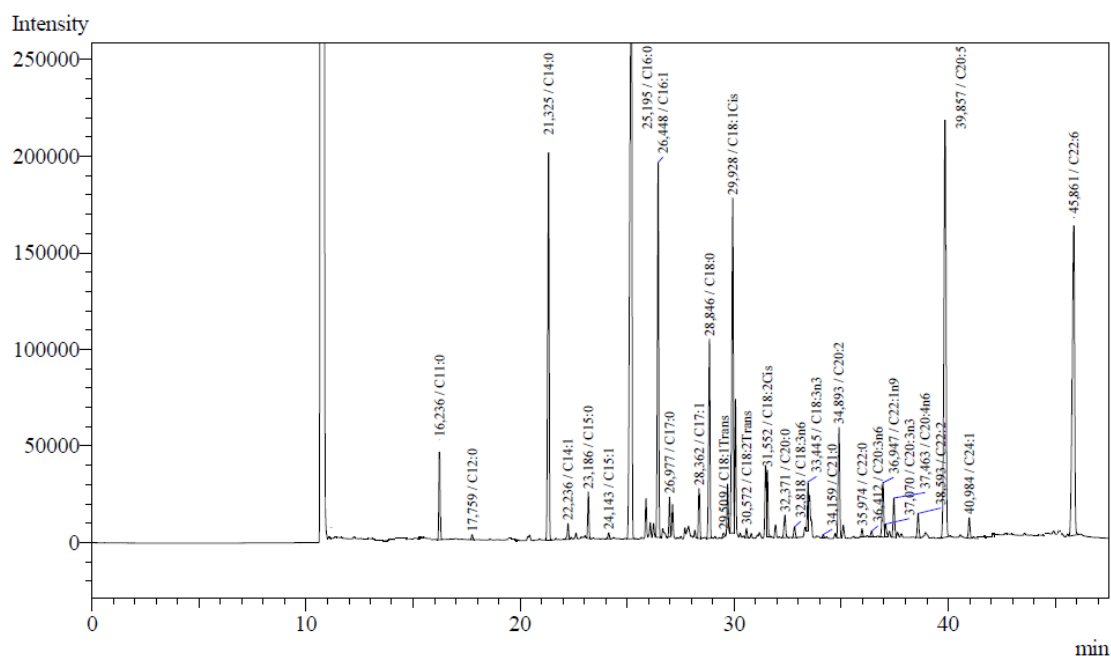
**Figura 32:** Perfil cromatográfico da amostra de óleo com BHT aquecida a 150 °C.



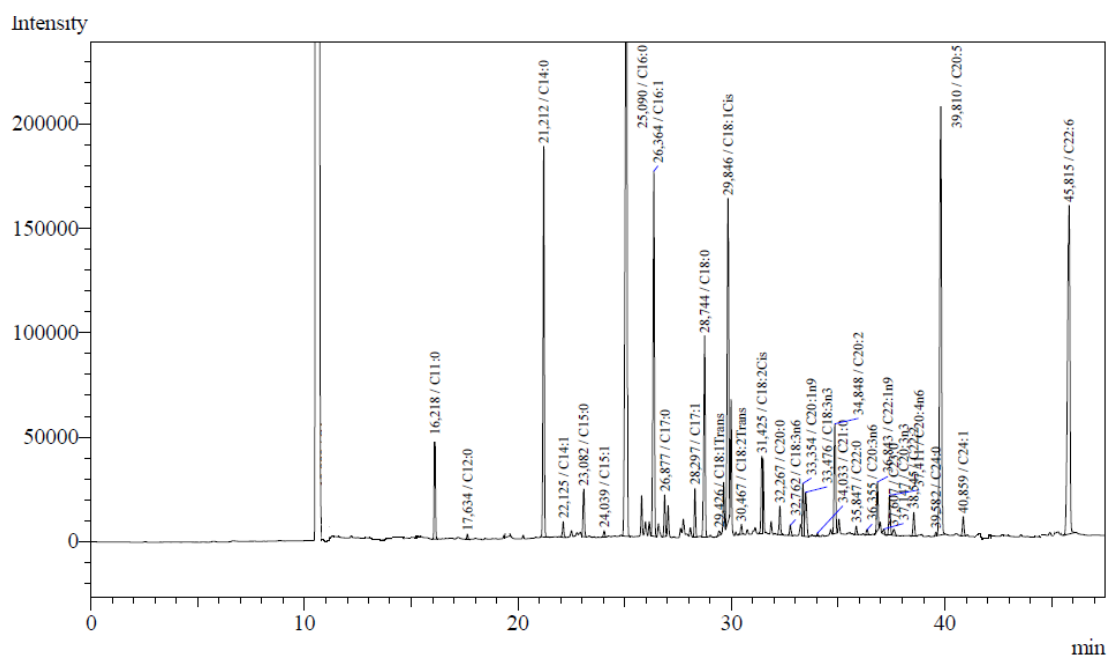
**Figura 33:** Perfil cromatográfico da amostra de óleo controle aquecida a 180 °C.



**Figura 34:** Perfil cromatográfico da amostra de óleo com pimenta 0,2% aquecida a 180 °C.

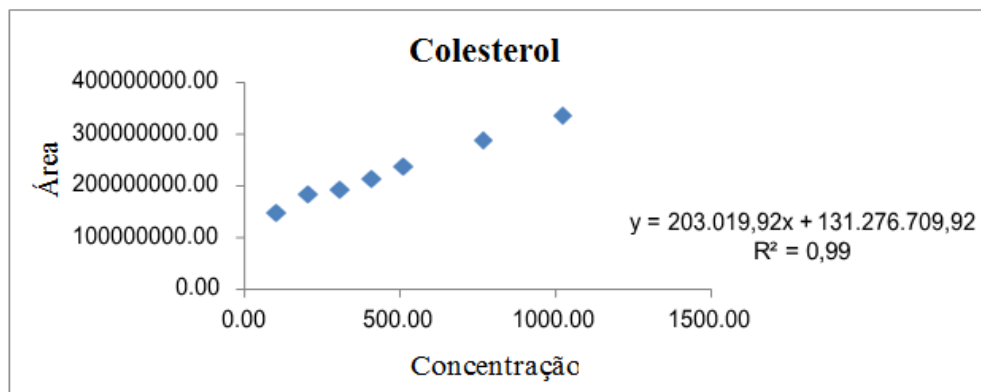


**Figura 35:** Perfil cromatográfico da amostra de óleo com pimenta 0,5% aquecida a 180 °C.

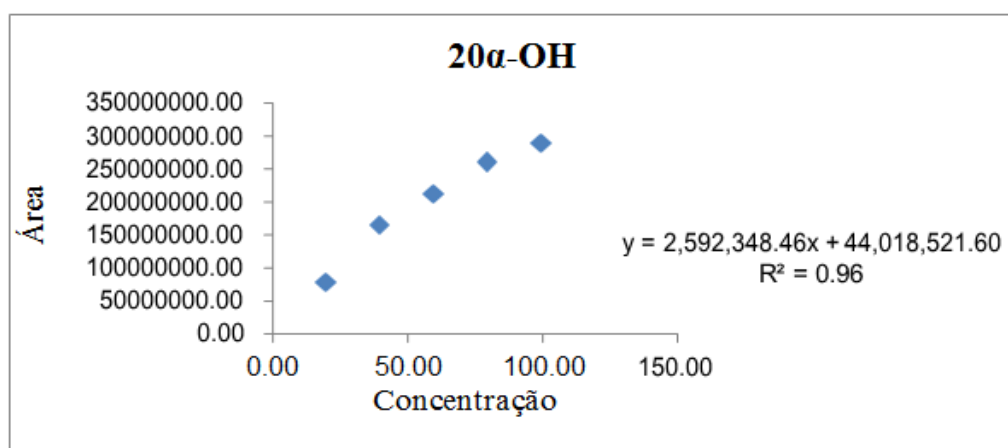


**Figura 36:** Perfil cromatográfico da amostra de óleo com BHT aquecida a 180 °C.

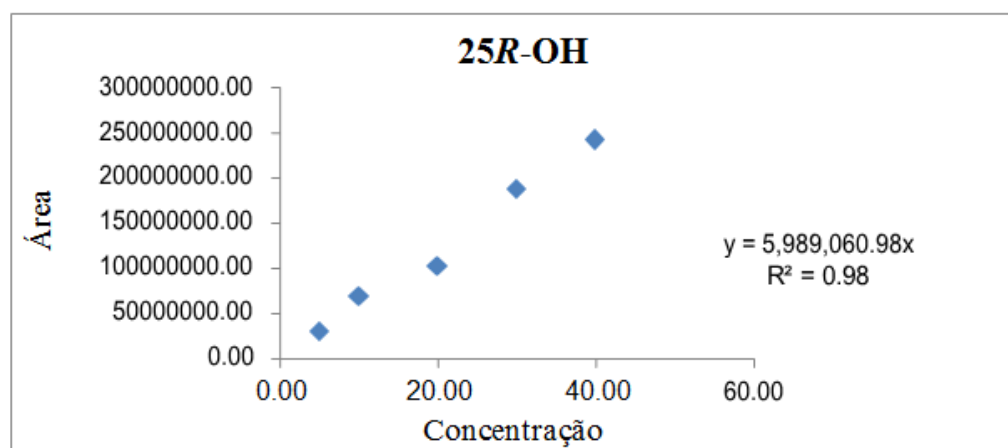
## ANEXO D – Colesterol e óxidos de colesterol



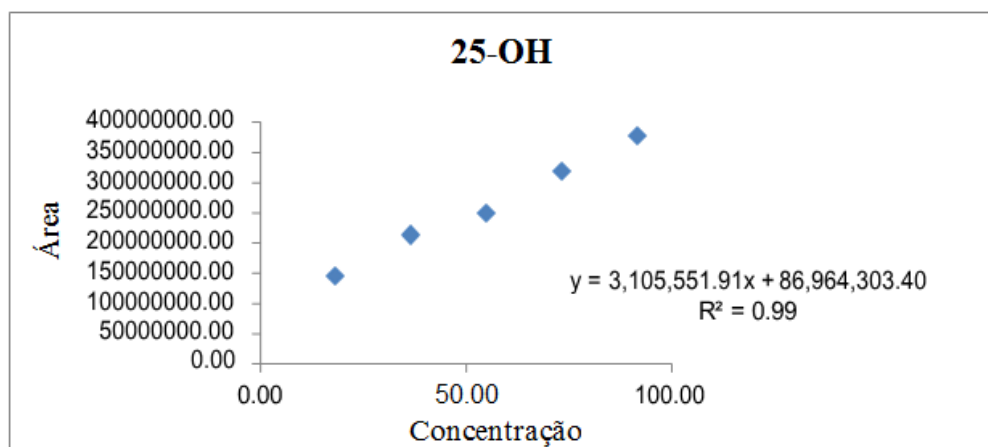
**Figura 37:** Padronização externa do colesterol



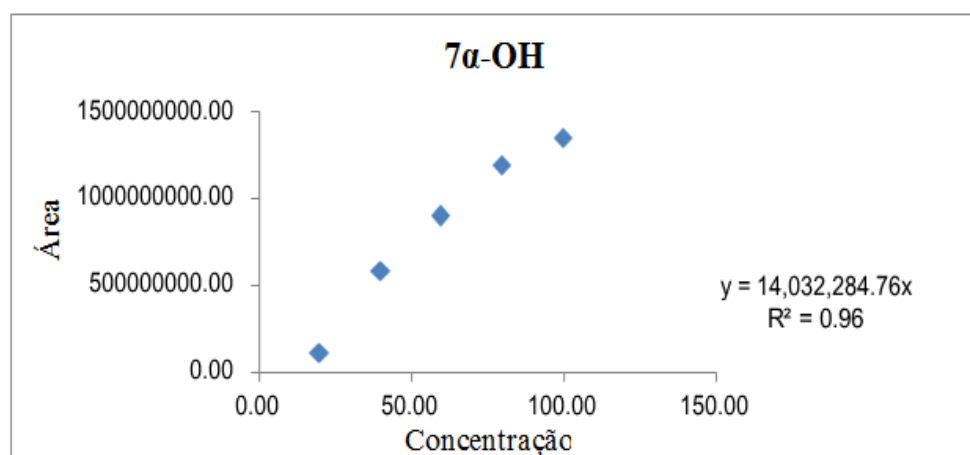
**Figura 38:** Padronização externa do 20 $\alpha$ -hidroxicolesterol.



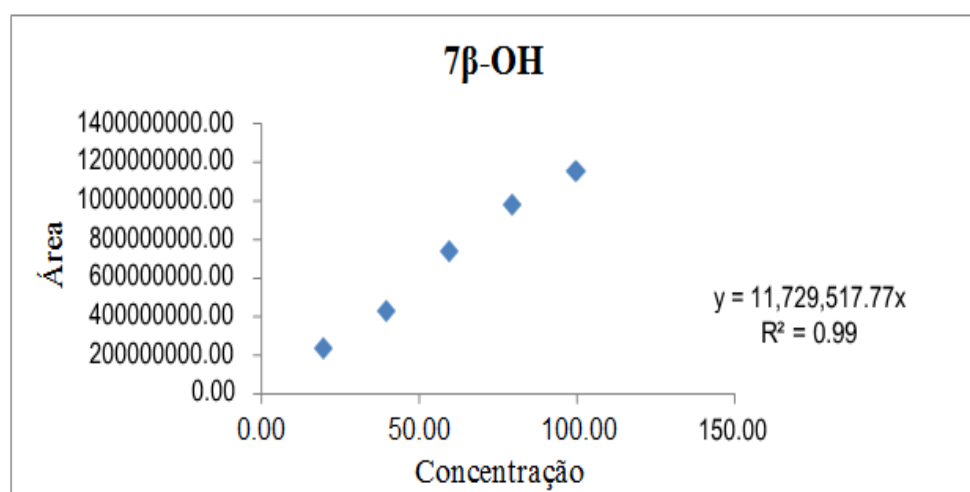
**Figura 39:** Padronização externa do 25R-hidroxicolesterol.



**Figura 40:** Padronização externa do 25-hidroxicolesterol.

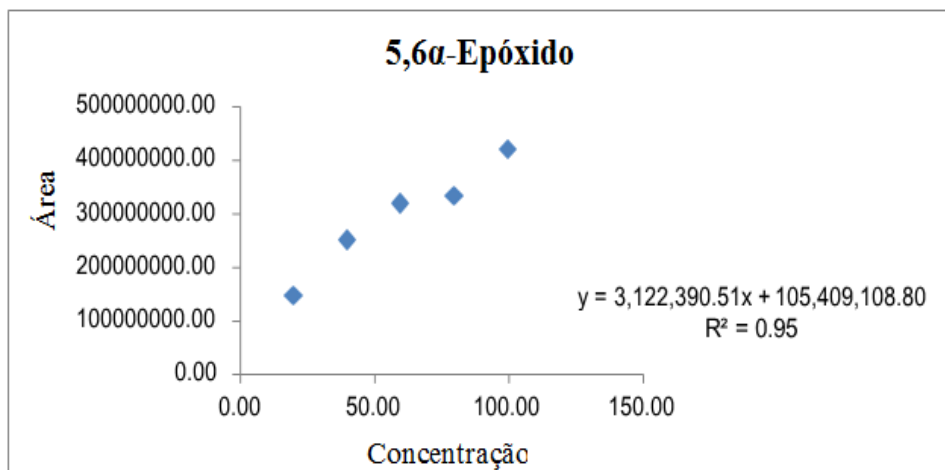


**Figura 41:** Padronização externa do 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol.

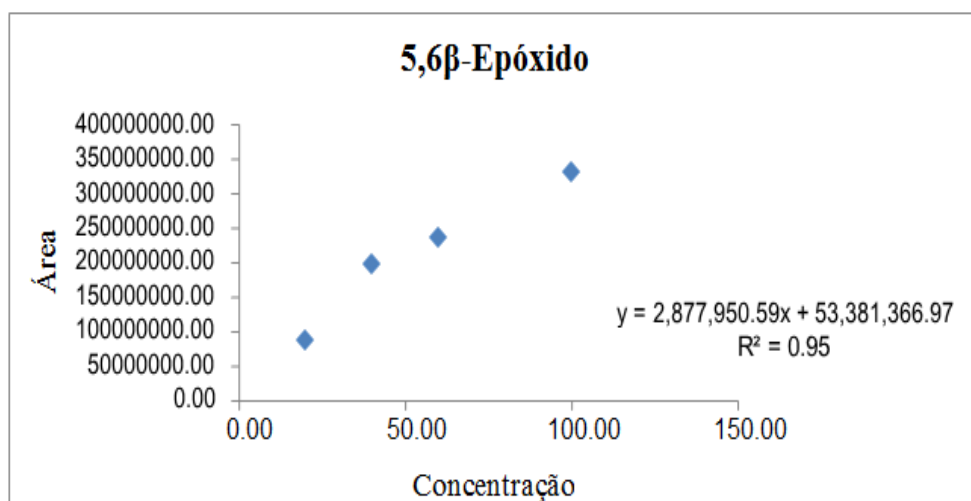


**Figura 42:** Padronização externa do 7 $\beta$ -hidroxicolesterol.

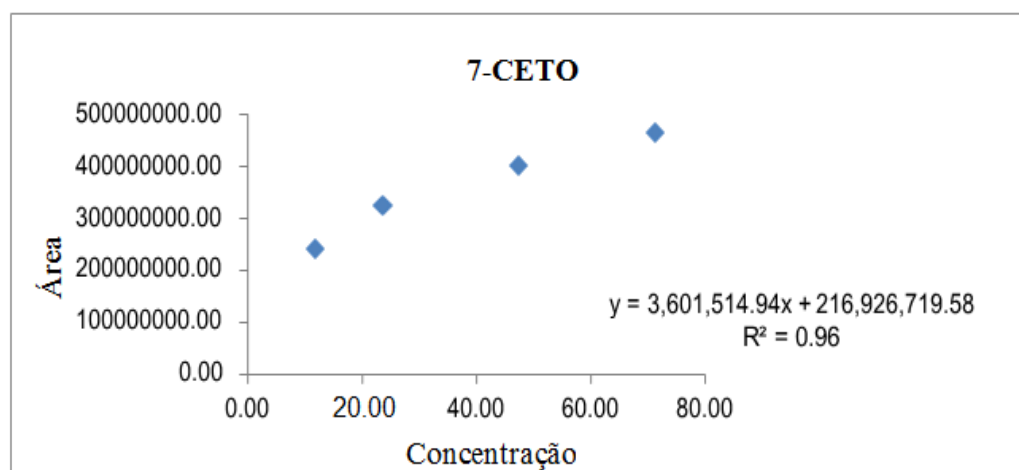




**Figura 43:** Padronização externa do 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol.



**Figura 44:** Padronização externa do 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol.



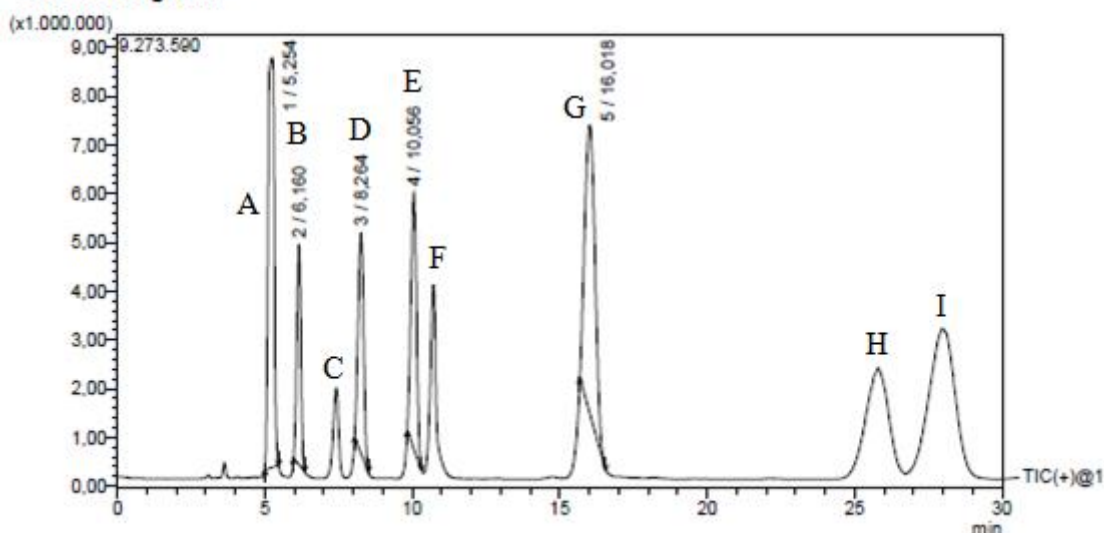
**Figura 45:** Padronização externa do 7-cetocolesterol.

### <Sample Information>

Sample Name : Poll Padroes  
Sample ID : Poll Padroes  
Data Filename : Poll Padroes.lcd  
Method Filename : Método Tatiana.lcm  
Batch Filename : Corrida 07\_12\_2017.lcb  
Vial # : 36  
Injection Volume : 20 uL  
Date Acquired : 08/12/2017 09:35:47  
Date Processed : 08/12/2017 10:05:50

Sample Type : Unknown  
Acquired by : System Administrator  
Processed by : System Administrator

### <Chromatogram>



**Figura 46:** Cromatograma do Poll de padrões do colesterol e óxidos de colesterol. A- Colesterol; B- 20 $\alpha$ -hidroxicolesterol; C- 25-hidroxicolesterol; D- 25R-hidroxicolesterol; E- 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol; F- 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol; G- 7-cetocolesterol; H- 7 $\beta$ -hidroxicolesterol; I- 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol.