

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO

**Avaliação da oxidação lipídica em sardinhas (*Sardina pilchardus*) enlatadas
adicionadas de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) como
antioxidante natural**

Carla Fernanda Targueta Barreira

2022



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

AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM SARDINHAS (*Sardina pilchardus*) ENLATADAS ADICIONADAS DE PIMENTA ROSA (*Schinus terebinthifolius* Raddi) COMO ANTIOXIDANTE NATURAL

CARLA FERNANDA TARGUETA BARREIRA

Sob a Orientação da Professora

Dra. Tatiana Saldanha

e Co-orientação da Professora

Dra. Micheli da Silva Ferreira

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.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B272a Barreira, Carla Fernanda Targueta, 1989-
Avaliação da oxidação lipídica em sardinhas (*Sardina pilchardus*) enlatadas adicionadas de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) como antioxidante natural / Carla Fernanda Targueta Barreira. - Seropédica, 2022.
83 f. : il.

Orientadora: Tatiana Saldanha.
Coorientadora: Micheli da Silva Ferreira.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS/PPGCTA, 2022.

1. : Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi). 2. sardinha enlatada. 3. antioxidantes naturais. 4. oxidação lipídica. I. Saldanha, Tatiana, 1971-, orient. II. Ferreira, Micheli da Silva, 1977-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS/PPGCTA. IV. Título.



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



ATA Nº 523/2022 - PPGCTA (12.28.01.00.00.00.41)

Nº do Protocolo: 23083.013161/2022-18

Seropédica-RJ, 02 de março de 2022.

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

CARLA FERNANDA TARGUETA BARREIRA

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre, no Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24/02/2022

Dra. TATIANA SALDANHA, UFRRJ
(orientador)

Dra. LIANIA ALVES LUZIA, USP

Dra. GENI RODRIGUES SAMPAIO, USP

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG.

(Assinado digitalmente em 07/03/2022 20:36)
TATIANA SALDANHA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DTA (12.28.01.00.00.00.46)
Matricula: 2563412

(Assinado digitalmente em 03/03/2022 10:46)
GENI RODRIGUES SAMPAIO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 155.509.348-50

(Assinado digitalmente em 17/03/2022 14:45)
LIANIA ALVES LUZIA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 810.844.637-68

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 523, ano: 2022, tipo: ATA, data de emissão: 02/03/2022 e o código de verificação: 1bc5635286

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças, sabedoria e me guiar até aqui.

Agradeço a minha família e amigos, em especial a minha mãe, Sandra, ao meu padrasto, Marco, a minha irmã Lucia, pelo constante suporte e compreensão. A minha prima Cyntia e a minha amiga Mayara pelo acolhimento e incentivo, dos quais não deixam desistir em nenhum momento. Ao meu pai Carlos João e ao meu Bisavô Carlos, que mesmo do céu, acompanham toda a minha trajetória.

Agradeço a todos do Departamento de Tecnologia de Alimentos que participaram direta ou indiretamente da realização deste trabalho, com ressalva aos caríssimos Ivanilda Maria Augusta e Ormino Domingues Gamallo pelo suporte no laboratório, e por todo conhecimento compartilhado.

Agradeço aos colegas do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo apoio e conhecimentos compartilhados. Obrigada, Barbara, Fernanda e Vavá, por toda ajuda e companheirismo. Agradeço à IC Paulinha, pelo apoio e palavras de incentivo durante as análises experimentais.

Agradeço a minha orientadora Tatiana pela oportunidade e confiança depositada em mim, pela disponibilidade, atenção, paciência, incentivo, orientação e conhecimentos transmitidos, que tornou possível a concretização desse sonho.

Agradeço a Dra. Geni Rodrigues Sampaio pela colaboração com a execução das análises de ORAC e sistema β -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 Instituto de Agronomia, ao Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas do Departamento de Fitotecnia e ao Dr. Pedro Corrêa Damasceno Junior, pela doação da pimenta rosa, sem as quais este trabalho seria inviabilizado.

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

Agradeço a Dra. Micheli Ferreira da Universidade Federal Fluminense, pela intermediação com a Indústria de Conservas Nova Piracema e por todo auxílio durante a preparação das sardinhas enlatadas. A Indústria de Conservas Nova Piracema e a Médica-veterinária, Responsável Técnica Claudia Magalhães, pela doação das sardinhas para realização deste trabalho.

Muito obrigada a todos!

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

RESUMO

BARREIRA, Carla Fernanda Targueta. **Avaliação da oxidação lipídica em sardinhas (*sardina pilchardus*) enlatadas adicionadas de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) como antioxidante natural.** 83p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

A sardinha do Marrocos (*Sardina pilchardus* WALBAUM, 1792) tem notável importância na economia mundial, com benefícios que vão além do seu baixo custo de mercado, uma vez possui um excelente valor nutricional, devido aos significativos teores de ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) da série ômega-3. Entretanto, por ser um alimento altamente perecível, é comum que sejam aplicadas técnicas de processamento, como o enlatamento. Entretanto, durante o processo de esterilização, a temperatura e o tempo utilizados podem contribuir para a degradação dos lipídios insaturados presentes nas sardinhas, visto que, além dos AGPI, estes peixes contêm altos teores de colesterol, compostos extremamente suscetíveis à oxidação, formando os produtos de oxidação do colesterol (POCs) ou óxidos de colesterol. Os óxidos de colesterol são apontados como substâncias aterogênicas e carcinogênicas e foram relacionados ao desenvolvimento de inúmeras doenças degenerativas, além de alterarem as propriedades das membranas celulares. Devido aos riscos ocasionados pela ingestão destes produtos, torna-se vantajoso a adição de extratos naturais ricos em compostos bioativos que apresentem capacidade antioxidante, além de agregarem sabor e aroma as conservas, como a pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição de pimenta rosa a 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0% e controle, frente a oxidação lipídica em sardinhas enlatadas em óleo vegetal como líquido de coberturas. A pimenta rosa foi previamente caracterizada e apresentou relevante potencial nutricional. Determinou-se a presença de compostos bioativos como flavonoides, carotenoides e antocianinas. Compostos como, tetraidroamentoflavona (541 *m/z*), agatisflavona (537 *m/z*), hikinoflavona (539 *m/z*) e cianidina (287 *m/z*), foram identificados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. A atividade antioxidante foi constatada em análises *in vitro*. Quanto a 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 processo de enlatamento promoveu a oxidação lipídica e resultou em uma troca de ácidos graxos, colesterol e óxidos de colesterol entre o músculo do peixe e o líquido de cobertura. O conteúdo de EPA e DHA das sardinhas reduziu

de $18,37 \pm 0,42$ (sardinha crua) para $12,05 \pm 0,76$ g/100 g de sardinha (para controle e sardinha em conserva, respectivamente). Contudo, as adições de 0,75 e 1,0% não apresentaram diferenças significativas em comparação com a amostra crua. Os líquidos de cobertura apresentaram diminuição de aproximadamente 19% e 26%, nos níveis de AGMs e AGPs. O conteúdo total POCs aumentou de $39,53 \pm 2,15$ $\mu\text{g} / \text{g}$ (sardinha crua) para $116,04 \pm 0,78$ $\mu\text{g} / \text{g}$ (sardinha controle). No entanto, níveis mais baixos foram encontrados em amostras contendo pimenta rosa (de $59,46 \pm 0,87$ a $93,26 \pm 1,99$ $\mu\text{g} / \text{g}$). Os resultados encontrados neste trabalho sugerem a aplicação da pimenta rosa como aditivo natural capaz de minimizar a ocorrência de oxidação lipídica, ajudando a preservar a qualidade nutricional das conservas de pescado, e, conseqüentemente, minimizando o consumo de compostos deletérios a saúde.

Palavras-chave: Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi), sardinha enlatada, antioxidantes naturais, oxidação lipídica.

ABSTRACT

BARREIRA, Carla Fernanda Targueta. **Evaluation of lipid oxidation in canned sardines (*Sardina pilchardus*) added with pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) as a natural antioxidant.** 83p. Dissertation (Master in Food Science and Technology). Institute of Technology, Food Technology Department, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

The Moroccan sardine (*Sardina pilchardus* WALBAUM, 1792) has remarkable importance in the world economy, with benefits that go beyond its low market cost, since it has an excellent nutritional value, due to the significant contents of polyunsaturated fatty acids (AGPI s) of the omega-3 series. However, as it is a highly perishable food, it is common for processing techniques such as canning to be applied. However, during the sterilization process, the temperature and time used can contribute to the degradation of unsaturated lipids present in sardines, since, in addition to AGPI s, these fish contain high levels of cholesterol, compounds extremely susceptible to oxidation, forming the products cholesterol oxidation agents (POCs) or cholesterol oxides. Cholesterol oxides are identified as atherogenic and carcinogenic substances and have been related to the development of numerous degenerative diseases, in addition to altering the properties of cell membranes. Due to the risks caused by the ingestion of these products, it is advantageous to add natural extracts rich in bioactive compounds that have antioxidant capacity, in addition to adding flavor and aroma to preserves, such as pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi). In this context, this study aimed to evaluate the effect of adding pink pepper at 0.25, 0.5, 0.75 and 1.0% and control, against lipid oxidation in sardines canned with liquid medium in vegetable oil. Pink pepper was previously characterized and presented relevant nutritional potential. The presence of bioactive compounds such as flavonoids, carotenoids and anthocyanins was determined. Compounds such as tetrahydroamentoflavone (541 m/z), agathisflavone (537 m/z), hykinoflavone (539 m/z) and cyanidin (287 m/z) were identified by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. The antioxidant activity was verified in in vitro analyses. As for the determination of lipid oxidation, the formation of reactive species to thiobarbituric acid (TBA) and changes in the composition of fatty acids and cholesterol were identified, quantifying the formation of cholesterol oxidation products (POCs). The canning process promoted lipid oxidation and resulted in an exchange of fatty acids, cholesterol and cholesterol oxides between the fish muscle and the coating liquid. The EPA and DHA content of sardines reduced from 18.37 ± 0.42 (raw sardines) to 12.05 ± 0.76 g/100 g of sardines (for control and canned sardines,

respectively). However, the additions of 0.75 and 1.0% did not show significant differences compared to the raw sample. Net coverage showed a decrease of approximately 19% and 26%, in the levels of AGMs and AGPI s. The total POCs content increased from $39.53 \pm 2.15 \mu\text{g/g}$ (raw sardines) to $116.04 \pm 0.78 \mu\text{g/g}$ (control sardines). However, lower levels were found in samples containing pink pepper (from 59.46 ± 0.87 to $93.26 \pm 1.99 \mu\text{g/g}$). The results found in this work suggest the application of pink pepper as a natural additive capable of minimizing the occurrence of lipid oxidation, helping to preserve the nutritional quality of canned fish, and, consequently, minimizing the consumption of compounds harmful to health.

Keywords: Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi), canned sardine, natural antioxidants, lipid oxidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sardinha do Marrocos (<i>Sardina pilchardus</i>) (LOURO et al., 2019).	5
Figura 2: Esquema geral para a oxidação de ácidos graxos (Adaptado de: RAMALHO e JORGE, 2006).	10
Figura 3: Fórmula estrutural do colesterol livre, parte polar em vermelho e apolar em cinza (adaptado de GUARDIOLA, 2002).	12
Figura 4: Mecanismo de auto-oxidação do colesterol (SMITH, 1987).....	13
Figura 5: Pimenta rosa coletada na UFRRJ (Fonte: Autor, 2021).	22
Figura 6: Coleta manual da pimenta rosa doada pelo Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).	40
Figura 7: Adição da pimenta rosa à lata contendo sardinha.....	42
Figura 8: Inserção das latas na linha de produção.....	43
Figura 9: Adição do líquido de cobertura em óleo de soja às latas de sardinha.....	43
Figura 10: Fluxograma do processamento das sardinhas em conserva (Adaptado de COSTAMARINE, 2021).	44
Figura 11: Abertura manual das conservas de sardinha.....	45
Figura 12: PP = pimenta rosa. Os valores representam médias ± desvio padrão em triplicado. Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas entre amostras com diferentes concentrações de pimenta rosa pelo teste de Tukey. Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as amostras de sardinha e líquido de cobertura na mesma concentração de pimenta rosa pelo teste t de Student não pareado. Sardinha: "α" indica diferenças significativas em comparação com "Controle" e "β" indica diferenças significativas em comparação com "Raw" pelo teste de Dunnett. Líquido de cobertura: "γ" indica diferenças significativas em comparação com "Controle" e "δ" indica diferenças significativas em comparação com "Raw" pelo teste de Dunnett.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proposta de identificação de compostos bioativos do extrato de pimenta rosa por UHPLC-ESI-MS.....	51
Tabela 2: Composições de ácidos graxos (g/100 g de óleo) das amostras de sardinhas e líquidos de cobertura pré e pós o enlatamento (controle e com pimenta rosa a 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0%).	56
Tabela 3: Teores de colesterol (mg/100 g, base seca) e óxidos de colesterol (µg/g, base seca) das amostras de sardinhas e líquidos de cobertura pré e pós enlatamento (controle e com pimenta rosa a 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0%).	63
Tabela 4: Migrações de compostos bioativos de pimenta rosa para as sardinhas e líquidos de cobertura.	68

MATERIAL COMPLEMENTAR

Tabela 1: Umidade (g/100 g) e teores de lipídios totais (g/100 g, base seca) das amostras de sardinhas pré e pós enlatamento (controle e com pimenta rosa a 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0%).....	81
Tabela 2: Valores de TBARS (mg MDA/kg) das amostras de sardinhas e líquidos de cobertura pré e pós enlatamento (controle e com pimenta rosa a 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0%).....	82

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAPH	2-amidinopropane dihydrochloride
AGM	Ácido graxo monoinsaturado
AGPI	Ácido graxo poli-insaturado
AGS	Ácido graxo saturado
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
BHT	Butilidroxitolueno / Butylhydroxytoluene
DHA	Ácido docosaexaenóico / Docosahexaenoic acid
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidraliza
EPA	Ácido eicosapentaenoico / Eicosapentaenoic acid
ESI	Electrospray Ionization
FAO	Food and Agriculture Organization
FAME	Fatty acid methyl ester
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IU	International Unit
MS	Mass Spectrometry
MDA	Malonaldeído
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PDA	Photo Diode Array
POC	Produto da Oxidação do Colesterol
PPM	Partes por milhão
QE	Quercetin equivalent
SIM	Selected Ion Monitoring
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TBA	Ácido tiobarbitúrico/ Thiobarbituric acid
TCA	Ácido tricloroacético
TE	Trolox equivalente
TEP	1,1,3,3-tetraethoxypropane
TPTZ	2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1. Sardinha do Marrocos (<i>Sardina pilchardus</i>).....	4
2. Conservas de sardinhas	7
3. Oxidação lipídica.....	10
4. Colesterol e óxidos de colesterol.....	12
5. Termo-oxidação do colesterol.....	16
6. Oxidação lipídica em conservas de pescado	17
7. Emprego de antioxidantes naturais em pescado.....	19
8. Pimenta Rosa (<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi).....	21
9. Referências	25
CAPÍTULO I	33
1. Introdução.....	37
2. Material e métodos	39
2.1 Padrões, reagentes e solventes.....	39
2.2 Material vegetal	39
2.3 Análises da pimenta rosa	40
2.3.1 Preparação do extrato	40
2.3.2 Capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	40
2.4 Preparação da amostra e processo de enlatamento.....	41
2.5 Conservas de sardinha e análises do líquido de cobertura.....	45
2.5.1 Umidade e lipídios totais das sardinhas.....	45
2.5.2 Ensaio TBARS: Determinação de malondialdeído em sardinhas e líquido de cobertura.....	46
2.5.3 Determinações de ácidos graxos de sardinha e líquido de cobertura	46
2.5.4 Determinações de colesterol e óxidos de colesterol de sardinhas e líquido de cobertura	46
2.6 Identificações de compostos bioativos por análises UHPLC-ESI-MS.....	47
2.7 Análises estatísticas	47
3. Resultados e discussão	48
3.1. Capacidade antioxidante <i>in vitro</i> do extrato de pimenta rosa.....	48
3.2. Compostos bioativos do extrato de pimenta rosa determinados por UHPLC-ESI-MS.....	49

3.3. Sardinhas	53
3.3.1. Teores de umidade e lipídios totais de amostras de sardinha enlatada.....	53
3.3.2 Ensaio TBARS: teores de malondialdeído em amostras de sardinhas e líquidos de cobertura.....	54
3.3.3 Composição de ácidos graxos de sardinhas enlatadas e líquidos de cobertura	55
3.3.4 Teor de colesterol e óxidos de colesterol de sardinhas enlatadas e líquidos de cobertura	62
3.4 Migrações de compostos bioativos da pimenta rosa durante o enlatamento.....	67
3.5 Análise de componente principal	70
4. Conclusões	72
Conflitos de interesse	73
Reconhecimentos.....	73
Referências	73
CONCLUSÕES GERAIS	79
Material complementar.....	81

INTRODUÇÃO GERAL

O enlatamento é a principal técnica de conservação de peixes, e além de proporcionar praticidade no consumo, também visa garantir a inocuidade e segurança do alimento, facilitando seu acesso e contribuindo para a nutrição humana (BARBOSA et al., 2019).

Os peixes e produtos de pescado são considerados um alimento saudável e fontes valiosas de ácidos graxos poliinsaturados n-3 (AGPIs), especialmente os ácidos eicosapentaenóico (EPA, C20:5) e docosahexaenóico (DHA, C22:6). Esses ácidos têm demonstrado inúmeras atividades biológicas e são frequentemente objeto de estudos relacionados a saúde humana e a prevenção de diversas doenças (DJURICIC; CALDER, 2021).

A sardinha do Marrocos (*Sardina pilchardus*), também conhecida como sardinha do Atlântico ou sardinha Européia, é uma espécie de peixe pelágico de pequeno porte, que se destaca na economia mundial devido ao seu expressivo número de capturas (FAO, 2018). No Brasil, essa espécie é amplamente utilizada pela indústria de conservas, visto que a oferta nacional do produto não consegue atender à demanda da crescente expansão do mercado. Desta forma, para atender às necessidades do mercado e proteger as espécies na costa brasileira, o governo brasileiro promoveu reduções substanciais nas tarifas de importação dessa espécie no ano de 2019.

Contudo, apesar do enlatamento apresentar vantagens pertinentes a praticidade, inocuidade e conservação do pescado, a fabricação das conservas demanda etapas industriais que podem comprometer a qualidade nutricional desse alimento ao degradar ácidos graxos essenciais e causar a formação de compostos nocivos, como os óxidos de colesterol.

Além dos AGPIs, as sardinhas apresentam altos níveis de colesterol que são compostos altamente suscetíveis à oxidação quando expostos fatores favoráveis como o aquecimento (DE CARVALHO et al., 2021), que por sua vez, ocorre durante as etapas de cozimento e esterilização comercial das conservas, tornando-as fontes exógenas de produtos da oxidação do colesterol (POCs).

Em estudo recente realizado por Dantas et al. (2021) que determinou o conteúdo de óxidos de colesterol em amostras comerciais atum em conserva, foi indicado que o pescado enlatado pode ser considerado uma fonte potencial de POCs na dieta.

A ingestão exógena dos POCs é frequentemente relacionada ao desenvolvimento de diversas doenças, como consequência de seus efeitos citotóxicos, aterogênicos, neurodegenerativos, inflamatórios e carcinogênicos (STAURENGHI et al., 2021).

Devido aos riscos gerados pela ingestão de POCs e outros lipídios oxidados, é de extrema importância a utilização de estratégias de controle de sua produção durante o processamento de conservas de pescado. Contudo, os antioxidantes sintéticos amplamente aplicados pela indústria alimentícia, possuem efeitos antinutricionais, tóxicos e cancerígenos, o que estimulou o crescente interesse em antioxidantes naturais obtidos de fontes vegetais (DE CARVALHO et al., 2021; FERYSIUK et al., 2020).

Os antioxidantes naturais são o grupo de substâncias bioativas capazes de apresentar efeitos análogos ou superiores aos sintéticos no retardo ou inibição da oxidação dos lipídios, além de estarem amplamente distribuídos na dieta humana, presentes em frutas, legumes, ervas e especiarias, como a pimenta rosa (DE OLIVEIRA et al., 2020a).

A pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) é um fruto típico da América do Sul, facilmente encontrada pelo território nacional e muito apreciado na culinária como um condimento sofisticado. O fruto apresenta qualidades sensoriais e diversas propriedades benéficas à saúde, com efeitos antimicrobianos, antitumorais e anti-inflamatórios (ARAÚJO GOMES et al., 2020). Além disso, estudos afirmam que os compostos bioativos presentes na pimenta rosa são capazes de inibir ou retardar a oxidação lipídica no pescado (DE OLIVEIRA et al., 2020b), indicando seu potencial para atuar como um importante antioxidante natural.

Diante do exposto, a adição da pimenta rosa como aditivo natural antioxidante em pescado enlatado pode agregar diversos benefícios a esse alimento e contribuir para elaboração de um produto saudável e com maior valor agregado. Além disso, apesar da sardinha enlatada ser frequentemente consumida mundialmente, não foram relatados estudos referentes ao uso de aditivos naturais naturais com o intuito de minimizar os processos oxidativos na mesma, o que justifica a realização do estudo em questão.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o efeito protetor da pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) frente à oxidação lipídica em sardinhas enlatadas em óleo de soja como líquido de cobertura, durante o processo de apertização das mesmas.

Objetivos específicos

- Caracterizar a pimenta rosa quanto à presença de compostos bioativos e capacidade antioxidante;
- Determinar a composição das sardinhas pré e pós apertização a partir das análises de umidade, lipídios totais, composição de ácidos graxos, colesterol e óxidos de colesterol;
- Avaliar o efeito da esterilização comercial na composição lipídica das sardinhas em conserva (controle) e das sardinhas em conserva adicionadas da pimenta rosa nas concentrações 0,25, 0,5, 0,75 e 1%;
- Analisar e correlacionar os dados de forma a avaliar o efeito protetor do acréscimo da pimenta rosa, bem como os níveis de adição nas conservas de sardinha;
- Avaliar a migração dos compostos bioativos presentes na pimenta rosa para as sardinhas (UPLC-MS), visando determinar quais os componentes bioativos, de fato, poderiam contribuir para o efeito antioxidante.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Sardinha do Marrocos (*Sardina pilchardus*)

O consumo e a produção do pescado aumentaram consideravelmente nas últimas décadas, de acordo com o relatório bianual sobre o estado da Pesca e Aquicultura Mundial, divulgado pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), o consumo global de pescados passou de 114,3 milhões de toneladas em 2006 para 171 milhões de toneladas em 2016 (MELGOSA et al., 2020). Em âmbito global é esperado que a produção supere os 178.529 milhões de toneladas de 2018 e alcançando a meta de 195,9 milhões de toneladas em 2025. No Brasil, a expectativa é que o consumo desse alimento alcance 12,7 kg por habitante em no mesmo ano (FAO, 2019).

Os peixes ocupam importante posição na alimentação humana, pois são considerados um suprimento de proteína de boa qualidade para grande contingente populacional. Os dados mais recentes afirmam que o consumo per capita passou de 9 kg para 20,5 kg de 1961 para 2018, e atualmente a média anual de crescimento próxima é de 1,5% (FAO, 2019). O consumo do pescado marinho como sardinha representa 50 a 60% das necessidades diárias proteicas de um adulto, pois fornece 37 g de proteína de alta qualidade, além 17 g de lipídios, dos quais 1,5 g são ácidos graxos ômega-3, que por sua vez são de extrema importância para o desenvolvimento normal do cérebro e para prevenção doenças cardiovasculares, entre outras (FAO, 2014; INNES e CALDER, 2020).

A sardinha do Marrocos (*Sardina pilchardus*), é uma das principais espécies de peixe pelágico, pertencente à família Clupeidae, também é conhecida como sardinha do Atlântico ou sardinha Europeia. Os peixes pelágicos representam 25% dos desembarques mundiais (em toneladas), com predominância de sardinha, sardinhetas, anchova, cavala e arenque. Diferentes gêneros de sardinhas fazem parte do grupo das 25 espécies mais capturadas e de maior importância econômica mundial, com uma produção anual de 10.000 toneladas. A *Sardina pilchardus* se destaca por possuir capturas notificadas com cerca de 1 milhão de toneladas entre os anos de 2004 e 2015 (FAO, 2018).

A *Sardina pilchardus* possui corpo alongado, coberto de escamas, com coloração azul-prateada mais escura no dorso do que nos flancos (figura 1). Apresenta porte pequeno e rápido crescimento, seu tamanho mínimo de captura é de 110 mm comprimento, contudo pode atingir

275 mm ao longo de 15 anos (longevidade máxima) (LEONARDO, 2015; MARTINS e CARNEIRO, 2018; VARGAS-YÁÑEZ et al., 2020).



Figura 1: Sardinha do Marrocos (*Sardina pilchardus*) (LOURO et al., 2019).

De hábitos costeiros, sua distribuição geográfica compreende o Atlântico Nordeste, desde o Senegal ao Mar do Norte, incluindo o Mar Mediterrâneo e Mar Negro (LOURO et al., 2019), onde, frequentemente, forma grandes cardumes que ocorrem em correntes temperadas a profundidades entre os 25 e os 100 metros, e que podem migrar até aos 10-35 metros durante a noite, alimentando-se de crustáceos planctônicos, microalgas e ovos, através de filtração passiva e/ou predação ativa. (HURE; MUSTAC, 2020).

No Brasil, esta espécie em particular é massivamente utilizada pelas indústrias de conserva, visto que a oferta de produto nacional não consegue cumprir com demanda da crescente expansão do mercado de produtos enlatados. No ano de 2018, a fim de manter a oferta de sardinha, as importações originárias principalmente do Marrocos (77,5%) e Omã (22,1%), somaram 90,3 mil toneladas. Além disso, o governo brasileiro reduziu substancialmente as tarifas de importação da mesma no ano de 2019, através da Portaria nº 154/2019 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, com o intuito proteger as espécies da costa brasileira e de suprir as necessidades do mercado brasileiro (MAPA, 2020).

Além do baixo custo de aquisição em relação aos demais peixes, as sardinhas são consideradas um alimento saudável, essa característica remete-se ao seu excelente valor nutricional, uma vez que sua composição apresenta proteínas de alto valor biológico (incluindo todos os aminoácidos essenciais e 20% dos aminoácidos não essenciais) e elevada digestibilidade (devido ao seu alto teor de lisina), vitaminas A, D e B, minerais (cálcio, iodo, zinco, ferro, magnésio, fósforo e selênio) e principalmente pelo seu perfil lipídico composto de altos teores de ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) da família ômega-3, em especial os

ácidos eicosapentaenóico (EPA, C20:5 ômega 3) e o docosaexaenóico (DHA, C22:6 ômega 3). O armazenamento dos lipídios ocorre principalmente como gordura subcutânea, mas também nas vísceras e incorporado no músculo (FAO, 2016; GARCIA et al., 2019).

De acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, última versão) a sardinha crua inteira apresenta 0,2g por 100g por parte comestível de ácidos graxos poli-insaturados (TACO et al., 2011).

Além dos ácidos eicosapentaenóico e docosaexaenóico, outros ácidos graxos são predominantes em sardinhas. Os ácidos graxos frequentemente encontrados são os ácidos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1 ômega 9), linoleico (C18:2 ômega 6) e o araquidônico (C20:4 ômega 6). Contudo, é comum que existam variações na composição das sardinhas por fatores como: espécie, alimentação, fase da vida e época do ano, condições ambientais, local de captura, sexo, idade, desova e estado fisiológico do animal (BANDARRA et al., 2018; MKADEM; KAAANANE 2020; DE CARVALHO et al., 2021).

Diversos efeitos benéficos à saúde foram relacionados ao consumo dos ácidos graxos poli-insaturados da família Ômega 3. Esses compostos apresentam importante papel nas atividades fisiológicas estruturais e regulatórias, além de estarem associados à prevenção doenças degenerativas, doenças cardiovasculares (acidente vascular cerebral, pressão alta e doença cardíaca coronária), distúrbios neuro-cognitivos, diabetes, depressão, e também possuem efeitos favoráveis na inibição de diversas doenças inflamatórias, tais como asma, aterosclerose, artrite reumatoide, psoríase, lúpus e doença inflamatória do intestino) e na prevenção do câncer (mama, próstata e cólon) (LEMAY-NEDJELSKI et al., 2018; SATO et al., 2019; INNES; CALDER, 2020; QURESHI et al., 2020; RAJASINGHE et al., 2020; DJURICIC; CALDER, 2021; RODRIGUES et al., 2021, SAWADA; SAITO-SASAKI; NAKAMURA, 2021).

Nos últimos anos, a comprovação dos efeitos benéficos fomentou a busca dos consumidores por suplementos a base de peixes ou óleos de peixes e derivados de ômega-3, tornando crescente o surgimento de novos produtos e medicamentos à base desses compostos no mercado, principalmente no mercado internacional (ŠIMAT et al., 2020).

Os ácidos graxos poli-insaturados da família Ômega-3 também são fundamentais na saúde infantil, uma vez que atuam no desenvolvimento neurológico de crianças durante a gravidez, amamentação e infâncias. A transferência dos ácidos poli-insaturados da mãe para o feto ocorre através da placenta no decorrer de toda a gravidez, e a inópia desses compostos durante essa fase pode afetar o neurodesenvolvimento do feto (VON SCHACKY, 2021; HEATH et al., 2022). Além disso, pesquisas alegam que o suprimento adequado de DHA na

alimentação dos bebês é essencial para o desenvolvimento da retina (SAENZ DE VITERI et al., 2020).

Devido à expressiva presença desses ácidos graxos poli-insaturados nas sardinhas, seu consumo pode trazer inúmeros benefícios a saúde humana (ABRAHA et al., 2018), contudo por ser um alimento altamente perecível, é necessário a utilização de métodos de conservação que aumentem a vida útil da mesma e favoreçam sua comercialização em larga escala.

2. Conservas de sardinhas

Os métodos de conservação visam aumentar a estabilidade e durabilidade do alimento, facilitando seu armazenamento, transporte e conseqüentemente sua comercialização. Dentre as principais técnicas de conservação da sardinha, a mais utilizada é o enlatamento, que consiste na fabricação de conservas de sardinhas esterilizadas, capazes de serem armazenadas por um período razoável sem o uso de refrigeração, o que além de facilitar seu acesso e contribuir para a nutrição humana, também garante a inocuidade e segurança do alimento (ABRAHA et al., 2018; BARBOSA et al., 2019).

A Instrução Normativa SDA nº22, de 11 de julho de 2011, do Regulamento Técnico fixa a identidade e as características mínimas de qualidade que deve apresentar o produto conservas de sardinhas para a sua comercialização (BRASIL, 2011), define:

Entende-se por conservas de sardinhas os produtos elaborados a partir de matéria-prima de espécies abrangidas por este regulamento, fresca ou congelada, escabeçada, eviscerada, com exceção de gônadas e rins, acrescidos de meio de cobertura, acondicionados em um recipiente hermeticamente fechado e que tenham sido submetidos a um tratamento térmico que garanta sua esterilidade comercial.

A produção das conservas de sardinha se inicia na recepção da matéria prima. Nas indústrias brasileiras as matérias-primas mais utilizadas são: sardinha de origem nacional (*Sardinella brasiliensis*) inteira e fresca, e sardinha importada do Marrocos (*Sardina Pilchardus*) eviscerada e congelada. As sardinhas (frescas ou congeladas) não devem ultrapassar o limite crítico de 4,4°C para formadores de histamina, além das características comuns aos peixes frescos, tais como: superfície do corpo limpa, brilhante sem pigmentação estranha a espécie, olhos brilhantes ocupando toda a cavidade orbitária, guelras róseas ou vermelhas, úmidas e brilhantes com odor suave, abdômen firme, sem deixar impressão duradoura à pressão dos dedos, escamas brilhantes, bem aderentes, vísceras íntegras e bem aderidas a cavidade, ânus fechado e odor suave característico da espécie. O peixe congelado importado chega em contêineres transportados por caminhões, em seguida, é realizada a

conferência de documentos e o registro de temperaturas, bem como a coleta de amostras para análise no laboratório próprio da empresa (BRASIL, 2020; COSTAMARINE, 2021).

Após a aprovação da matéria-prima, a mesma segue para câmara de espera com gelo ou câmara de estocagem de congelado, onde é realizado um controle de temperatura interna do peixe 4 x ao dia. Após a liberação, as sardinhas frescas seguem para linha de processamento, onde são lavadas com água pressurizada e clorada em 0,2 a 2 ppm para diminuição da microbiota superficial, evisceradas (removido cabeças, escamas e vísceras) de forma manual ou automática e lavadas novamente. As sardinhas congeladas seguem para o descongelamento com cascata de água clorada com temperatura máxima de 25°C por aproximadamente 40 minutos. O peixe eviscerado fresco e descongelado segue por esteira até o salmourador, onde o processo de salmouragem é feito por imersão, em processo contínuo, numa solução de cloreto de sódio e água potável, por um período de 15 a 20 minutos, em seguida são resfriados com gelo e encaminhados para o enlatamento. Posteriormente, as sardinhas são colocadas manualmente nas latas e seu enchimento é controlado de acordo com os padrões de peso estipulados. As latas são encaminhadas para as recravadeiras através de esteiras e recebem o líquido de cobertura, que é despejado até que se exceda o limite das mesmas (COSTAMARINE, 2021).

Os líquidos mais utilizados pelas indústrias de processamento brasileiras são: natural (água e sal), óleo comestível, azeite de oliva, óleo comestível com ervas finas e molho de tomates. Esses líquidos têm como principal objetivo a melhoria das características sensoriais do produto, além de facilitar a troca térmica durante o processamento. Contudo, alguns líquidos também possuem efeito protetor perante a oxidação dos produtos, como o exemplo dos óleos que frequentemente são utilizados e assumem um efeito de conservação, além de apresentarem ação protetora pela capacidade de isolar os produtos do ar (CAPONIO et al., 2011; DOMINGUEZ-VIDAL; 2016; GÓMEZ-LIMIA et al., 2020).

De acordo com Gómez-limia et al. (2020) os óleos vegetais são ricos em compostos antioxidantes como polifenóis e tocoferóis, que por sua vez, podem atuar no sequestro de radicais. Entretanto, esses compostos antioxidantes podem ser degradados durante as operações de refino as quais alguns óleos são submetidos.

Após preenchimento, as latas recebem a tampa e passam pelo processo de recravação, que consiste em uma etapa onde ocorre o fechamento hermético obtido pela realização de dobras nas abas da tampa e no corpo da lata. Posteriormente, as mesmas são lavadas externamente e seguem para a apertização (BRASIL, 2020).

A apertização ou esterilização comercial consiste em aquecer o alimento em recipientes hermeticamente fechados em autoclaves pressurizadas, a temperatura de 121°C, por tempo suficiente para destruição de micro-organismos patogênicos e inativação do *Clostridium botulinum*. O tempo empregado durante o processo de esterilização do pescado é determinado pelo fabricante, possuindo a liberdade de padronizar o mesmo, considerando os custos, características sensoriais, segurança do alimento e capacidade de operação de seus equipamentos, exigido-se um F0. O F0 é a variável capaz de expressar as intensidades do binômio tempo x temperatura do tratamento térmico, considerando parâmetros do processo e matriz alimentar avaliada, com mínimo de 3,0 minutos ou a redução de doze ciclos logarítmicos (12 log10) de *Clostridium botulinum* de acordo com Decreto N° 10.468, de 18 de agosto de 2020 do Regulamento de Inspeção Industrial de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (JAY, 2005; BRASIL, 2020).

O binômio tempo-temperatura é um fator de extrema importância no processamento dos alimentos, utilizado mundialmente para controlar, eliminar ou diminuir o número de micro-organismos durante esses procedimentos. O conceito de F0 trata-se de calor letal integrado recebido em todos os pontos de um recipiente durante o processamento onde é padronizado o tempo necessário, em minutos, para destruir esporos ou células vegetativas de um alimento (FDA, 2013).

A temperatura e o tempo utilizados na esterilização também possuem o objetivo de conferir ao produto melhores características sensoriais através do amaciamento da espinha e diferenciação de sabor pelo uso do líquido de cobertura. De acordo com estudo realizado por Nhavoto (2016) o amolecimento da espinha do pescado ocorre em patamares de F0 superiores a 3,0 minutos, apresentando melhores resultados com 30 minutos em 121 C°.

Entretanto, a literatura aponta que a intensidade da temperatura é diretamente proporcional a extensão do processo oxidativo dos alimentos, isto é, dependendo do binômio tempo x temperatura utilizados durante o processamento das conservas, o processo de oxidação dos lipídios de sardinha é acelerado, reduzindo seu valor nutricional e sua qualidade (DEREWIAKA e MOLINSKA, 2015; KUMAR et al., 2015 BARRIUSO et al., 2016; TARVAINEN et al., 2016; XU et al., 2016; LEAL-CASTAÑEDA et al., 2017; GOKOGLU, 2019, DANTAS et al., 2021).

3. Oxidação lipídica

A oxidação lipídica é uma das principais causas de degradação do pescado, e pode ocorrer durante as fases de produção, processamento, armazenamento e preparo do mesmo. Esse processo é responsável pela deterioração da qualidade do produto, pois afeta negativamente na qualidade sensorial (cor, odor, sabor e textura), além de causar perdas de propriedades funcionais, valor nutritivo e de colocar em risco a segurança do alimento, devido à formação de produtos tóxicos (DE OLIVEIRA et al., 2020a).

Este fenômeno pode ocorrer de diferentes formas, em função do meio e dos agentes catalizadores e pode ser influenciada por vários fatores, intrínsecos e extrínsecos, tais como a temperatura de armazenamento e preparo, irradiação, pressão de oxigênio, atividade de água, composição e grau de insaturação dos ácidos graxos, presença de fotossensibilizadores, catalizadores metálicos, compostos antioxidantes e pró-oxidantes. A oxidação dos lipídios varia de acordo com diferentes mecanismos de reação (oxidação enzimática, foto-oxidação e auto-oxidação), que geralmente envolvem radicais livres, além de outras espécies reativas intermediárias (WOOD et al., 2004; SHAHIDI; ZHONG, 2010; FENG et al., 2018).

Nos alimentos, a principal via de oxidação dos lipídios é a auto-oxidação. Esse mecanismo ocorre em três etapas distintas: iniciação, propagação e terminação e está associado à reação de oxigênio com lipídios insaturados através de um mecanismo de reações em cadeia de radicais, que levam a uma série de mudanças químicas complexas demonstradas na figura 3 (SHAHIDI; ZHONG, 2010; KUMAR et al., 2015).

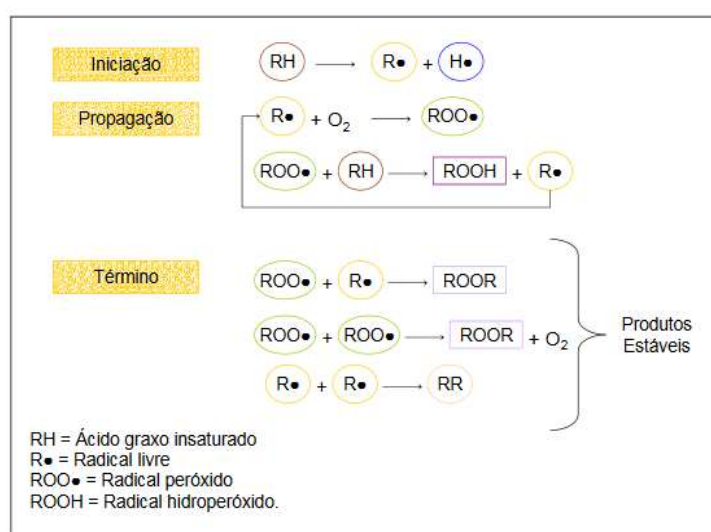


Figura 2: Esquema geral para a oxidação de ácidos graxos (Adaptado de: RAMALHO e JORGE, 2006).

Na etapa de iniciação ou indução, não ocorrem alterações sensoriais, há apenas o aumento da concentração de radicais livres, que por sua vez, são formados quando os ácidos graxos insaturados, na presença de da forma menos reativa do oxigênio ($^3\text{O}_2$) e com a ação de agentes iniciadores como luz, calor ou íons metálicos perdem um átomo de hidrogênio. A perda do átomo de hidrogênio ocorre preferencialmente no grupamento metil, adjacente à ligação dupla, pois nessa posição energia de ligação C-H é mais baixa, deixando um elétron desemparelhado no carbono, formando um radical livre, que reage rapidamente com oxigênio (NIKI et al., 2005; KUMAR et al., 2015; ESKIN; SHAHIDI, 2015; LORENZO et al., 2018).

A fase de propagação é caracterizada pelo alto consumo de oxigênio e início das alterações sensoriais, com aparecimento de odor. Durante essa segunda etapa, o radical livre que foi formado reage com o oxigênio atmosférico e forma um radical peróxido. As reações de formação dos radicais peróxidos requerem baixa energia de ativação, o que rapidamente gera uma elevada concentração destes radicais no meio. Os radicais continuam reagindo com ácidos graxos insaturados e produzem outro radical livre e hidroperóxidos. Essa reação pode ser repetida inúmeras vezes, pois os radicais livres formados atuam como transportadores de uma reação em cadeia ao atacar novas moléculas de ácidos graxos insaturados. Os hidroperóxidos, por sua vez, são instáveis e se decompõem, formando aldeídos, cetonas e álcoois (MEDINA-MEZA, BARNABA e BARBOSA-CÁNOVAS, 2014; KUMAR et al., 2015; LORENZO et al., 2018).

Em seguida, devido a redução dos ácidos graxos no sistema, a etapa de propagação é finalizada, dando ao início da fase de terminação. Durante essa última etapa os radicais passam a reagir entre si e formam compostos estáveis (NIKI et al., 2005; MASUDA et al., 2010). Esta fase é caracterizada diminuição do consumo de oxigênio, da concentração de peróxidos e pela formação de produtos secundários que envolvem reações de decomposição, o que gera fortes alterações na composição do produto e em suas características sensoriais (LAGUERRE, LECOMTE e VILLENEUVE, 2007; LORENZO et al., 2018).

A oxidação dos lipídios da sardinha pode causar alterações negativas e implicar diretamente na qualidade e segurança do seu consumo, pois além de prejudicar as características sensoriais do alimento, a oxidação também é capaz de originar compostos indesejáveis através da oxidação do colesterol, visto que além dos AGPI da série ômega-3 as sardinhas também possuem teores elevados de desse composto (DE OLIVEIRA et al., 2020a; DE CARVALHO et al., 2021).

4. Colesterol e óxidos de colesterol

O colesterol (C₂₇H₄₆O) é um dos mais importantes esteróis existentes nos tecidos animais, e devido ao seu alto peso molecular constitui-se como principal componente da fração insaponificável dos óleos e gordura. Pode apresentar-se na forma livre, combinado com ácidos graxos de cadeia longa ou como ésteres de colesterol, tornando-se componente estrutural essencial das membranas e das lipoproteínas plasmáticas (HARPER; JACOBSON, 1999; MORZYCKI, 2014).

Além disso, o colesterol também é precursor de hormônios esteroidais (testosterona e progesterona) e da vitamina D₃, bem como, apresenta capacidade de auxiliar na de síntese hepática dos ácidos biliares, essenciais para a digestão e para a absorção de gordura e das vitaminas lipossolúveis A, D, E e K. Apenas cerca de 30 % do colesterol são provenientes da dieta, a grande maioria, aproximadamente 70%, é produzido de forma endógena (ESKIN; SHAHIDI, 2015; BRZESKA et al, 2016).

Em sua forma livre, o colesterol apresenta quatro anéis unidos, formando um núcleo policíclico, com três anéis que possuem seis carbonos (A, B e C) e um anel apresentando cinco carbonos (D), com uma cadeia alifática ligada no carbono 17, denominada cadeia lateral. Também possui um grupo hidroxila ligado a parte polar do anel A, na posição C3 e uma instauração na parte apolar na posição C5 e C6 do anel B, como identificado na figura 4 (TALAPATRA; TALAPATRA, 2015).

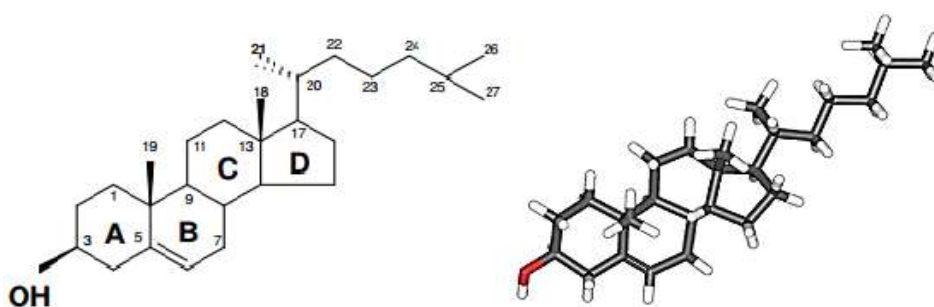


Figura 3: Fórmula estrutural do colesterol livre, parte polar em vermelho e apolar em cinza (adaptado de GUARDIOLA, 2002).

Por ser um composto insaturado, o colesterol é altamente instável e suscetível à oxidação, devido à própria estrutura química, além de fatores extrínsecos como temperatura, pH, oxigênio, luz, presença de íons metálicos, entre outros. Em relação ao processo oxidativo,

o colesterol comporta-se de maneira particular devido à ligação dupla e ao grupamento hidroxila presentes nas posições 5 e 3 da estrutura cíclica, originando os produtos de oxidação do colesterol (POCs) ou óxidos de colesterol (BECKWITH, 1959; BASCOUL et al., 1986; SMITH, 1987; MALDONADO-PEREIRA et al., 2018).

O processo de oxidação do colesterol se assemelha ao dos lipídios insaturados, sendo dividido em três fases (iniciação, propagação e terminação), onde vão ocorrer reações em cadeia complexas, baseadas na formação de radicais livres com oxigênio triplete e singlete. Outras espécies ativas de oxigênio, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxilas ($OH\bullet$), peroxilas ($ROO\bullet$), alcoxilas ($RO\bullet$) e ozônio (O_3) também podem oxidar o colesterol (GUMULKA et al., 1982; SMITH, 1987). Na figura 5 está apresentado o mecanismo de oxidação do colesterol.

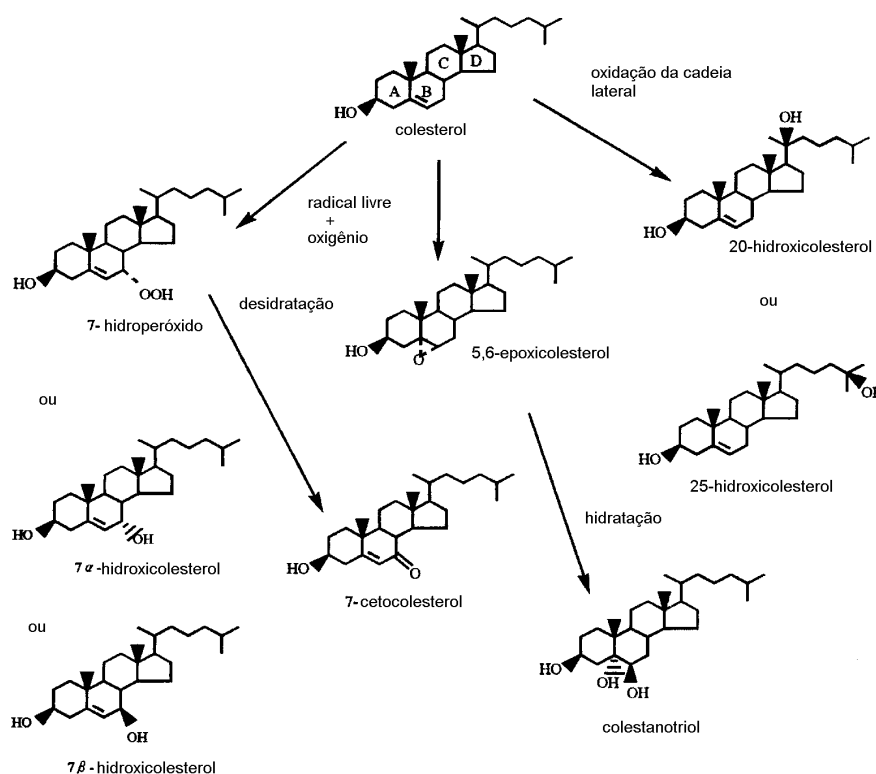


Figura 4: Mecanismo de auto-oxidação do colesterol (SMITH, 1987).

A oxidação do colesterol, ocorre geralmente na posição do carbono 7 da cadeia, devido a presença de uma ligação dupla entre os carbonos 5 e 6 permite a abstração de hidrogênio alélico no C7, reduzindo a energia de ativação necessária. Assim, são formados dois 7-hidroperóxidos (7a- e 7b-hidroperóxidos). Em seguida, com a influência da temperatura são reduzidos a seus álcoois correspondentes (7a- e 7b-hidroxicolesterol) e a 7-cetocolesterol, que

por sua vez, pode ser um marcador da oxidação do colesterol em alimentos, visto que, sua produção é acentuada no início do processo oxidativo (FERREIRA et al., 2017; BROWN; JESSUP, 2009). Além disso, o ataque oxidativo também pode na cadeia lateral, principalmente em C20 e C25, que são sítios reativos, o que resulta na formação de 20 α -hidroxicolesterol e 25-hidroxicolesterol, respectivamente (DEREWIAKA; MOLÍNSKA, 2015; SMITH, 1987).

Os produtos 5 α ,6 α - e 5 β ,6 β -epoxicolesteróis foram identificados como produtos da oxidação do colesterol pelo ar. Entretanto, seu mecanismo de reação é mais complexo, uma vez que não são formados somente pela reação do colesterol com o oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$) e singlete ($^1\text{O}_2$), mas sim por diferentes espécies de oxigênio ativas (GUMULKA et al., 1982, GUARDIOLA et al., 1996; KIM e NAWAR, 1993). Assim, os 5,6-epóxidos apresentam diferentes graus de estabilidade de acordo com o meio e o pH (MAERKER e BUNICK, 1986; KIM e NAWAR, 1993; GUMULKA et al., 1982, GUARDIOLA et al., 1996).

As características do alimento, as interações entre seus componentes e os produtos de decomposição durante o processamento e/ou armazenamento vão definir o perfil de óxidos formados e suas quantidades, entretanto a presença de ácidos graxos insaturados na matriz alimentar pode acelerar a oxidação do colesterol, pois possui a capacidade de gerar um ambiente pró-oxidante, devido à presença de zonas de ressonância, o que vai resultar na formação dos hidroperóxidos (MALDONADO-PEREIRA et al., 2018).

A auto-oxidação do colesterol comporta-se como um sistema dependente, onde o perfil dos produtos e suas concentrações são influenciados por diversos fatores, sendo a termo-oxidação o de maior relevância. À vista disso, é crescente o número de pesquisas relacionadas à formação de produtos da oxidação do colesterol (POCs) durante o preparo térmico de pescado (BARRIUSO et al., 2012; MEDINA-MEZA, BARNABA e BARBOSA-CÁNOVAS, 2014; DEREWIAKA e MOLINSKA, 2015; BARRIUSO et al., 2016; TARVAINEN et al., 2016; XU et al., 2016; LEAL-CASTAÑEDA et al., 2017).

Atualmente, uma gama significativa de óxidos de colesterol foi identificada, dentre estes, 12 foram identificados em pescado, em especial os originados da cadeia lateral, alguns deles pouco relatados em alimentos (SALDANHA; BENASSI; BRAGAGNOLO, 2008; SALDANHA e BRAGAGNOLO, 2010; DANTAS et al., 2015; FERREIRA et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2020a; DE CARVALHO et al., 2021; DANTAS et al., 2021).

Nos animais os POCs são formados basicamente no fígado e nos tecidos que sintetizam hormônios esteroides por via enzimática, contudo, nos alimentos, o processo de oxidação ocorre por vias não-enzimáticas, através da autooxidação, peroxidação lipídica e oxidação fotoquímica (SMITH, 1987).

Apesar dos efeitos fisiológicos relegados aos produtos da oxidação do colesterol, como, transportadores e reguladores da homeostase do colesterol, biomarcadores da oxidação das lipoproteínas e substrato para a síntese de hormônios esteróides e ácidos biliares (KULIG et al., 2016), sua ingestão via exógena causa danos à saúde, visto que alguns desses óxidos são potentes indutores do estresse oxidativo, com desenvolvimento de carcinogênese por consequência de danos ao DNA ou por apresentarem atividade mutagênica e genotóxica, devido a propriedades pró-oxidativas e pró-inflamatórias (LIU et al., 2021), além de exercerem uma forte influência na aterogênese e no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, podendo ser considerados mais aterogênicos que o próprio colesterol (SOTTERO et al., 2019; GROOTVELD et al., 2020).

Os óxidos de colesterol apresentam diversos efeitos nocivos as células, provocando alterações na morfologia e nas suas funções fisiológicas das mesmas. Estes efeitos ocorrem devido a capacidade dos POCs de substituir o colesterol na membrana celular, podendo afetar sua fluidez, permeabilidade e estabilidade, além de causar danos a estrutura estereoquímica das proteínas e fosfolipídios, bem como afetar a homeostase do cálcio nas células, pois podem modificarem o fluxo de cálcio, que é determinado pela relação colesterol/fosfolipídio (GROOTVELD et al., 2020).

Os óxidos de colesterol também podem provocar lesões arteriais, uma vez que, aumentam a permeabilidade vascular à albumina e a outras macromoléculas, o que estimula a agregação de plaquetas devido as alterações no equilíbrio das prostaglandinas, altera a composição lipídica da LDL e inibe a expressão de seus receptores, o que provoca o relaxamento do endotélio arterial (ROSA-FERNANDES et al., 2017; GROOTVELD et al., 2020).

De acordo com estudos (BARRIUSO et al., 2012; BARRIUSO et al., 2016; DANTAS, 2015; LEAL-CASTAÑEDA et al., 2017; FERREIRA et al., 2017) a formação de óxidos de colesterol e a degradação de ácidos graxos poli-insaturados durante o processamento térmico (termo-oxidação) têm um importante papel entre os fatores que diminuem a qualidade dos alimentos, incluindo o pescado, além do potencial de originar danos à saúde humana ao serem ingeridos.

5. Termo-oxidação do colesterol

As sardinhas, além dos lipídios insaturados da série ômega 3, apresentam altos teores de colesterol. Estes compostos são altamente susceptíveis a oxidação quando expostos a condições favoráveis, como ocorre durante o processamento das conservas, visto que os produtos enlatados são submetidos uma variedade de etapas industriais, o que pode resultar na formação de compostos oxidados como os óxidos de colesterol, e assim comprometendo as características sensoriais e principalmente qualidade nutricional desses alimentos (DANTAS et al., 2021; DE OLIVEIRA et al., 2018).

Em dietas ocidentais, apesar do aumento no consumo de pescado cru, o processamento térmico ainda é a forma mais utilizada no preparo culinário dos mesmos. Desta forma, em sistemas alimentares, o processamento térmico acelera o processo oxidativo, isto é, temperaturas elevadas são fatores que estimulam a termo-oxidação, pois atuam na diminuição da energia de ativação necessária para a abstração do hidrogênio que leva a formação óxidos como 7 α - e 7 β -hidroxicolesterol, 5,6 β - e 5,6 α -epoxicolesterol, colestanoetriol e 7-cetocolesterol, sendo isto mais encontrado. O 7-cetocolesterol é comumente caracterizado como principal produto oriundo da termo-oxidação do colesterol, devido a desidratação de 7 α - e 7 β -hidroperóxidos e/ou desidrogenação dos 7 α - e 7 β - hidroxicolesterolis (SMITH, 1987; XU et al., 2011; BARRIUSO et al., 2017).

A formação de POCs é amplamente dependente da temperatura de aquecimento. Em temperaturas próximas ao ponto de fusão do colesterol (147-148°C) inicia-se a termo-oxidação do mesmo, pois seu estado físico possibilita maior contato da molécula com agentes oxidantes (LIU et al., 2021). Contudo a temperatura frequentemente utilizada em pesquisas envolvendo a termo-oxidação do colesterol é de 180°C, pois representa a temperatura normalmente aplicada aos processos térmicos culinários (BARRIUSO et al., 2012).

Saldanha et al. (2008) estudaram os efeitos do preparo térmico de sardinhas na grelha, *in natura* e após armazenagem sob congelamento. Os autores observaram um aumento de 53% do total de óxidos após preparo térmico, além da identificação de seis produtos de oxidação do colesterol (19-hidroxicolesterol, 24(S)-hidroxicolesterol, 22(S)-hidroxicolesterol, 25(R) hidroxicolesterol, 25- hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol).

Em estudo realizado por Leal-Castañeda et al. (2017) verificou-se a formação de óxidos de colesterol em sistemas modelo contendo colesterol e óleo de peixe (2,5 mg de colesterol/g de óleo). Os mesmos foram submetidos ao aquecimento em forno convencional, a 180°C,

durante 20 minutos. Foi observado um aumento expressivo no conteúdo total de óxidos de colesterol, onde os produtos 7 α -hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol foram os predominantes.

De Carvalho et al. (2021) ao avaliar o efeito do suco de limão em sardinhas preparadas termicamente em fritadeira elétrica de ar (Airfryer) por 20 minutos em 220 °C, grelha elétrica por 5 minutos em 175 °C e fritura com óleo de soja em fritadeira elétrica, também por 5 minutos em 185 °C. Os autores puderam observar que as altas temperaturas utilizadas afetou o conteúdo lipídico dos peixes e por consequência seu valor nutricional, visto que alterou os conteúdos de EPA = DHA, com percentuais de degradação de 24,4% (fritadeira de ar), 69,2% (grelha) e 79,1% (fritadeira) nas sardinhas controle. Também observaram redução significativa dos níveis de colesterol das amostras, principalmente as submetidas em aquecimento a grelha (61,1%). Os autores também verificaram um aumento substancial dos óxidos de colesterol, com a identificação nove óxidos de colesterol após preparo térmico.

A termo-oxidação também pode ocorrer durante a fabricação das conservas de pescado, principalmente devido as condições as quais os lipídios desse alimento são expostos na etapa de esterilização comercial, onde são utilizadas temperaturas elevadas por longos períodos. Assim, ocasionando a formação de óxidos de colesterol e na degradação dos ácidos graxos poli-insaturados (ABRAHA et al., 2018; DANTAS et al., 2021).

6. Oxidação lipídica em conservas de pescado

As sardinhas em conserva também são consideradas uma importante fonte AGPIs (ŠIMAT et al., 2020), uma vez que seus teores lipídicos são bioacessíveis. Pesquisas afirmam que a bioacessibilidade de gordura total da sardinha (*Sardina pilchardus*) enlatada apresenta cerca de 60 a 64%, com níveis elevados de ácidos graxos da família ômega-3 como os ácidos EPA e DHA, além de sugerir que o consumo de 47 g de sardinha enlatada é capaz de garantir ingestão diária recomendada de EPA + DHA (GARCIA et al., 2019).

Em estudo recente, os ácidos graxos obtidos de sardinhas (*Sardina pilchardus*) enlatadas através de extração de dióxido de carbono supercrítico (sc-CO₂), demonstram papel positivo na prevenção do câncer colo retal em virtude de suas atividades antiproliferativas e anti-inflamatórias em células intestinais humanas (RODRIGUES et al., 2021).

Contudo, as condições às quais os lipídios dos peixes são expostos durante o preparo das conservas podem induzir a oxidação de ácidos graxos reduzindo seu conteúdo de EPA e DHA (BARBOSA et al., 2019; NASERI; REZAEI, 2012; NAZARI; GOLI, 2017).

Naseri e Rezaei (2012) ao avaliarem o conteúdo lipídico das conservas de espadilha adicionadas de líquido de cobertura em salmoura e em óleo de soja, observaram uma redução do conteúdo de EPA e DHA em aproximadamente 53 e 45%, respectivamente, nas conservas em salmoura comparado ao conteúdo do pescado cru.

O tipo de líquido de cobertura utilizado no enlatamento também pode influenciar no conteúdo de ácidos graxos das conservas de peixe, uma vez que o calor pode promover a troca de ácidos graxos entre o pescado e o líquido de cobertura, como exemplo do ácido linoleico que é comumente encontrado em óleos vegetais, como o óleo de soja e pode se apresentar em concentrações mais altas nas conservas em óleo (LI et al., 2016).

Em estudo realizado por Mesías et al. (2015) que avaliou o conteúdo lipídico do atum enlatado em diferentes líquidos de cobertura (salmoura, óleo de girassol e azeite), foi observado níveis mais altos de ácido linoleico em atum enlatado com óleos vegetais, que apresentaram resultados de 4,1 a 4,4 g / 100 g para atum em salmoura, de 0,9 a 33,8 g / 100 g para o atum em óleo de girassol e de 4,8 a 5,6 g / 100 g para o atum em azeite.

As altas temperaturas utilizadas no processamento das conservas além causar alterações nos os nutrientes lábeis do pescado e comprometer sua qualidade nutricional e sensorial, também pode favorecer a oxidação do colesterol do mesmo, acelerando a formação de compostos indesejáveis e danosos ao organismo como os óxidos de colesterol (ABRAHA et al, 2018; GÓMEZ-LIMIA et al., 2020; DANTAS, et al 2021).

Dantas et al. (2021) em estudo sobre a composição lipídica de amostras comerciais de atuns em conservas, identificou os produtos de oxidação 20 α -hidroxicolesterol (20 α -OH), 22 (R) -hidroxicolesterol (22R-OH), 22 (S) -hidroxicolesterol (22S-OH), 25-hidroxicolesterol (25-OH), 25R-hidroxicolesterol (25R-OH), 7-cetocolesterol (7-ceto), 7 α -hidroxicolesterol (7 α -OH), 7 β -hidroxicolesterol (7 β -OH), 5,6 α -epoxicolesterol (5,6 α -EP), e 5,6 β -epoxicolesterol (5,6 β -EP) e quantificou uma média de 933,14 a 1914,23 μ g / g nas conservas ao natural e 698,24 a 1167,88 μ g / g nas conservas em óleo no total de POCs. O estudo obteve uma diferença significativa nos teores de POCs entre os atuns em salmoura e em óleo comestível, visto que as amostras em salmoura apresentaram maiores quantidades dessas substâncias. Este fato pode ser explicado por Lira et al. (2014) e Mariutti & Bragagnolo (2017) ao afirmarem que, além da exposição do alimento ao calor, o sal presente nas salmouras, pode ser um potente fator pró-oxidante.

É notável que o processo de enlatamento do pescado pode comprometer sua qualidade e gerar compostos indesejáveis ao alimento (GÓMEZ-LIMIA et al., 2020; DANTAS et al., 2021) como os POCs. Assim, é de extrema importância que sejam utilizados aditivos capazes

de inibir a oxidação dos lipídios da sardinha durante o enlatamento. Além disso, existe uma crescente demanda dos consumidores por produtos de fácil consumo e que possuam características de alimento saudável, livres de aditivos sintéticos (MATA et al., 2020).

7. Emprego de antioxidantes naturais em pescado

Os antioxidantes são compostos capazes de inibir ou retardar as reações oxidativas em alimentos (GOKOGLU, 2019; KUMAR et al., 2015), como a peroxidação dos lipídios e a oxidação de outras moléculas, como proteínas (FERYSIUK et al., 2020).

É crescente o interesse em antioxidantes naturais obtidos de fontes vegetais (FERYSIUK et al., 2020), visto que, ao contrario dos antioxidantes sintéticos, os de origem natural podem reduzir o risco de ocorrência de doenças cardiovasculares e do câncer, além de possuírem valor nutricional e propriedades terapêuticas (CALEJA et al., 2016). Pesquisas comprovam que os compostos naturais possuem a capacidade de apresentar efeitos análogos ou superiores aos sintéticos no retardo ou inibição da oxidação dos lipídios (MATUMOTO-PINTRO et al., 2017; ZHANG et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2020a).

Os antioxidantes naturais são o grupo de substâncias bioativas, como compostos fenólicos, flavonoides, taninos e terpenos, amplamente distribuídos na dieta humana, presentes em frutas, legumes, ervas e especiarias (BARBIERI et al., 2017; TIAN et al., 2018; RIBEIRO et al., 2019). Os principais antioxidantes naturais encontrados na dieta humana são os compostos fenólicos (BARBIERI et al., 2017), que, quimicamente, são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com uma ou mais hidroxilas, podendo apresentar outros grupos substituintes em sua estrutura, como ésteres, metil ésteres, metil-ésteres e glicosídeos (BREWER, 2011; KAURINOVIC; VASTAG, 2019). Suas propriedades antioxidantes são de responsabilidade do seu potencial de oxi-redução, que os permitem atuar como agentes redutores, doando um H⁺ e inativando o radical livre.

Diversos estudos comprovam o efeito protetor dos antioxidantes naturais frente à oxidação lipídica, protegendo os lipídios dos iniciadores das reações em cadeia ou inibindo a oxidação na fase de propagação e, com isso, aumentando a vida de prateleira dos alimentos, principalmente nos ricos em lipídios insaturados e colesterol como o pescado (RAEISI, et al., 2016; DE OLIVEIRA, et al., 2018; FERREIRA, et al., 2017; DE OLIVEIRA, et al 2020a; FERREIRA, et al., 2022).

Figueiredo et al. (2015) avaliaram a capacidade antioxidante do urucum em peixes processados sob alta pressão e armazenados por refrigeração por 2 semanas. O autor observou que o uso do urucum reduziu a perda de ácido docosahexaenóico (DHA) de 12% para 7%. Além disso, concluiu que os carotenoides presentes protegeram o colesterol da membrana celular no músculo do peixe.

Tarvainen et al. (2016) estudaram o efeito dos extratos de folhas de alecrim, de orégano e uma mistura de extratos de sete ervas aromáticas (açafraão, orégano, lúpulo, cravo, sálvia tomilho indiano e alcaçuz) contra a oxidação do colesterol em salmão do Atlântico filetado, aquecido a 180°C, durante 20 minutos. Após o processamento, os valores de POCs nas amostras contendo os extratos naturais foram inferiores (<1 µg / g) aos das amostras controle (14 µg / g), comprovando o potencial dos antioxidantes naturais na inibição da formação de óxidos de colesterol.

Ferreira et al. (2017) ao estudarem os efeitos antioxidantes da salsa, cebolinha e cheiro-verde em amostras de sardinhas termicamente preparadas em fritadeira do tipo “Air Fryer”. Os autores observaram que o processamento térmico reduziu significativamente os teores de ácidos graxos poli-insaturados e elevou os níveis de óxidos de colesterol de 61,2 (sardinha crua) a 283 µg / g na amostra controle. Contudo, o uso das ervas como antioxidantes naturais mostraram eficácia nas concentrações de 2% e 4%, com o melhor resultado no efeito protetor da oxidação lipídica na concentração de 4% de cheiro-verde.

Zhang et al. (2017) compararam o efeito antioxidante dos compostos sintéticos butil-hidroxi-tolueno (BHT) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ) com extratos das folhas de *Myrica rubra* frente a oxidação lipídica em emulsão composta por colesterol. 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 20mg/mL.

Leung et al. (2019) compararam os efeitos protetores do óleo de oliva, óleo de oliva extra virgem e óleo de oliva adicionado de alecrim contra a oxidação lipídica em amostras de salmão. Os peixes foram preparados em frigideira convencional, a 200°C, por 4 minutos de cada lado. Apesar de nenhum óleo utilizado no estudo apresentar resposta positiva na proteção dos ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), verificou-se que o óleo de oliva adicionado de alecrim foi capaz de retardar peroxidação e diminuir a produção de 4-HNE, se comparado com os outros óleos.

Em estudo para avaliar o efeito do uso de antioxidantes naturais (extratos de alecrim, manjeriço e orégano) frente a oxidação dos lipídios de filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*),

os resultados positivos indicaram que a expressiva quantidade de compostos fenólicos presentes na composição dos extratos utilizados os tornam excelentes antioxidantes naturais (ALVES et al., 2020).

Ferreira et al. (2022) evidenciaram o potencial antioxidante da salsa (*Petroselinum crispum*), cebolinha (*Allium schoenoprasum* L.) e sua mistura (*cheiro-verde* brasileiro) em sistema alimentar contendo sardinhas assadas em grelha com temperatura interna de $75 \pm 0,5$ °C. Em análises realizadas por cromatografia líquida de ultra-alta performance, os ácidos fenólicos (ácidos cafeico, clorogênico e ferúlico) e flavonoides (apigenina, kaempferol, catequina) foram encontrados nas ervas, que por sua vez, tiveram sua ação antioxidante comprovada através das análises de DPPH e ORAC. Além disso, os autores puderam observar que a adição das ervas reduziu a formação de óxidos de colesterol no sistema alimentar.

Portanto, diversos estudos afirmam a importância do uso de extratos naturais com potencial efeito antioxidante e seu emprego como alternativas no sentido de minimizar a formação de compostos oxidados, ajudando a garantir uma maior segurança no consumo destes alimentos.

8. Pimenta Rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi)

Schinus terebinthifolius Raddi, é uma espécie de planta originária da América do Sul, e que devido à sua capacidade de se adaptar a várias condições ambientais é amplamente distribuída no território brasileiro, com maior frequência ao longo do litoral, desde o Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe) à região sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina), incluindo os cerrados (Mato Grosso do Sul) e a região sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo). Além disso, a presença da planta se estende pela Argentina e Paraguai, e também foi largamente introduzida em outras regiões da América Central, América do Norte, África, Europa e Ásia, principalmente como planta ornamental (SILVA-LUZ; PIRANI, 2012, CARVALHO et al., 2013).

Possui forma de arbusto ou árvore mediana de 5 a 10 m de altura, tronco tortuoso de 30 a 60 cm de diâmetro, revestido por casca grossa. Sua copa é globosa, com folhas verde-escuras, compostas, aromáticas e perenes, medem 10-15 cm de comprimento por 2-3 cm de largura e apresentam de 7 a 13 folíolos verdes, oblongos a elípticos com nervuras claras e proeminentes na parte superior do limbo (LORENZI; FLORA, 2002; LORENZI E MATOS, 2008).

A planta floresce nos meses de setembro a janeiro, apresentando flores pequenas, masculinas e femininas, em panículas piramidais de coloração branca a amarelo. Seus frutos

são pequenas drupas aromáticas e esféricas com 4 a 5 milímetros diâmetro, de coloração brilhante e lustrosa, que vai do rosa claro até o vermelho vibrante, como demonstrado na figura 6. O fruto se apresenta em cachos na extremidade da planta e conferindo uma beleza vultosa à árvore durante a frutificação, que por sua vez, ocorre entre os meses de janeiro a julho (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; PRADO, 2005, CARVALHO et al., 2013).



Figura 5: Pimenta rosa coletada na UFRRJ (Fonte: Autor, 2021).

Apesar de ser uma planta frutífera da família Anacardiaceae, como o caju, manga, cajá-mirim, entre outras, e não ter qualquer parentesco com a família das pimentas, a *S. terebinthifolius* Raddi é popularmente conhecida como “pimenta rosa”, devido a característica dos seus frutos, que quando maduros possuem a aparência de uma pequena pimenta de coloração rosa avermelhada (CAVALCANTI; BRITO, 2009).

Além de pimenta rosa, diversos outros nomes também são popularmente atribuídos a esta espécie do gênero *Schinus* no Brasil, como "aroeira vermelha", “aroeira do sertão”, "aroeira pimenteira", "aroeira de Minas", “aroeira mansa”, "pimenta brasileira", "aroeira da praia", "aroeira negra", “fruto de sabiá”, “aroeira de remédio”, “araguaraíba”, “árvore pimenteira”, “cabuí” e “cambuí”. Internacionalmente a planta é conhecida como “poivre rose” (França), “Christmas-berry” (Estados Unidos), “pimienta de Brasil” (Puerto Rico), “faux poivrier” (Riviera Francesa), “copal” (Cuba), “faux poivrier” (Riviera Francesa), e “chichita” (Argentina) (MORTON, 1978; BAGGIO, 1988; LENZI; ORTH, 2004; SILVA-LUZ; PIRANI, 2012, CARVALHO et al., 2013).

No Brasil, esta espécie é pouco cultivada para fins comerciais, embora possua um grande potencial para exploração e uso, devido a sua alta capacidade de se adaptar a diversos ecossistemas, o que torna fácil seu cultivo. Contudo, na culinária internacional, a pimenta rosa é considerada um condimento sofisticado e muito apreciada na alta gastronomia, o que favoreceu o aumento do seu consumo e consequentemente da demanda destes produtos nas indústrias de especiarias (BARBOSA et al., 2007; SILVA et al., 2017).

Na indústria de alimentos, pimenta rosa é bastante apreciado devido ao seu sabor suave e levemente picante e pode ser empregada em diversas preparações, na forma de grãos moídos ou inteiros. (BARBOSA et al., 2007; GOMES, 2013).

Além das qualidades sensoriais, a pimenta rosa também é frequentemente utilizada pela medicina popular e fitoterápica no tratamento de problemas respiratórios e infecções urinárias, feridas, reumatismo, como agente hemostático e antiinflamatório (BERNARDES et al., 2014).

Recentemente, diversos estudos relatam que devido aos compostos bioativos presentes na planta, a *S. terebinthifolius* possui efeitos antioxidantes, antihiperlipidêmicos, antiaterogênicos, antidiabéticos, anti-inflamatórios, antifúngico, antivirais e antimicrobianas (FAGUNDES, et al. 2020; da ROCHA et al., 2020; De OLIVEIRA et al., 2020b; DE OLIVEIRA et al., 2020b; LINDEN et al., 2020; MACEDO, et al., 2021; MARTINI et al., 2021; MIGUES et al., 2020; SALLES et al., 2021, SILVA et al., 2019; TODIRASCU-CIORNEA et al., 2019).

Migues et al. (2020) afirmam que o extrato da *Schinus terebinthifolius* Raddi pode ser considerado como fitoterápico, por possuir marcadores químicos responsáveis por essa característica. Através das análises de cromatografia líquida e espectrofotometria, os autores puderam identificar seis tipos de polifenóis no extrato da casca da planta, que foram: catequina, ácido gálico, epicatequina, rutina, quercetina e ácido clorogênico.

Segundo análises fotoquímicas a pimenta rosa contém taninos, alcaloides, flavonoides, saponinas, esteróis e terpenos (CARVALHO et al., 2013). Além disso, dentre os flavonoides presentes na pimenta rosa, encontram-se a quercetina, rutina (BERNARDES, 2010; DE LIMA GLÓRIA et al., 2017), apigenina (BERNARDES et al., 2014), naringina (DEGASPARI, et al., 2005), amentoflavona e tetrahydroamentoflavona (SKOPP; SCHWENKER, 1986).

Compostos fenólicos como os flavonoides, determinados na pimenta rosa, possuem a capacidade de inibir processos oxidativos e atuando como agentes redutores, doadores de hidrogênio, sequestradores de oxigênio singlete, radicais superóxidos, radicais hidroxilas e peroxila, bem como, atuam como agentes quelantes de metais (DE OLIVEIRA, 2018).

Em pesquisa realizada por De Oliveira et al. (2020b), a capacidade antioxidante da pimenta rosa foi comprovada, dado que, o extrato do fruto apresentou níveis satisfatórios de flavonoides ($10,33 \pm 0,34$ mg QE / g). Além disso, em análises in vivo pode-se observar a capacidade dos extratos de pimenta rosa de diminuir os danos causados pelo estresse oxidativo promovido pelo H₂O₂ em células de *Saccharomyces cerevisiae*.

As propriedades antioxidantes presentes na pimenta rosa também são capazes de minimizar o estresse oxidativo no cérebro, através da inibição da atividade da acetilcolinesterase, o que possibilita sua atuação no tratamento de déficits de memória (TODIRASCU-CIORNEA et al., 2019). Além disso, os flavonoides inibem a ação das lipoxigenases e as ciclooxigenases, que enzimas responsáveis pelo desenvolvimento da rancidez oxidativa em alimentos (PROCHAZKOVA, BOUŠOVÁ E WILHELMOVÁ, 2011).

Fagundes et al. (2020) caracterizaram o azeite de oliva aromatizado com extrato de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em diferentes tipos de maceração, e puderam observar que as amostras aromatizadas apresentaram maior estabilidade oxidativa, com níveis reduzidos de peróxidos, se comparadas a amostra controle. Os autores concluíram que a pimenta rosa além de aprimorar a qualidade do azeite, também pode ser considerada como um potencial antioxidante natural para a indústria alimentar.

As substâncias fenólicas como a quercetina, presente na pimenta rosa, mostraram eficácia no retardo da oxidação lipídica em alimentos ricos em colesterol e ácidos graxos insaturados, como o exemplo o óleo de sardinhas (VAISALI, et al., 2016). Além disso, esses compostos podem proteger o colesterol dos efeitos da termo-oxidação (CHIEN; HSU; CHEN, 2006).

De Oliveira et al. (2020a) ao avaliar capacidade antioxidante do extrato da pimenta rosa frente a termo-oxidação em sistemas modelo contendo óleo de sardinhas aquecidas a 180°C, comprovou o efeito protetor de 15,51% e 23,22% para das adições referentes a 0,2% e, 0,5%, respectivamente, obtendo redução de $577,5 \pm 2,14$ µg/g para $441,9 \pm 0,61$ µg/g do total de óxidos de colesterol, com adição de 0,5% do extrato. O mesmo foi verificado para os ácidos graxos, a 150°C o efeito protetor ao total de AGPI foi superior se comparado com as amostras controle.

Os estudos comprovaram que a pimenta rosa possui uma quantidade significativa de compostos capazes de trazer benefícios a quem os consome, além de efeito protetor contra a degradação do colesterol e dos ácidos graxos dos alimentos como o pescado.

Contudo, apesar da quantidade expressiva de lipídios insaturados presentes na composição química das sardinhas e dos estudos que comprovam a ação dos processamentos

térmicos frente à oxidação lipídica, comprometendo a qualidade desses produtos, poucos são os estudos relativos à adição de componentes naturais na prevenção da oxidação lipídica do pescado enlatado.

Desta forma, diante do anteriormente exposto, faz-se necessário estudos a respeito de antioxidantes naturais em conservas de sardinha, com o intuito inibir a formação de produtos da oxidação dos lipídios nas mesmas. Assim, garantindo a segurança de quem os consome, além de melhorar a qualidade destes alimentos.

9. Referências

ABRAHA, Bereket et al. Effect of processing methods on nutritional and physico-chemical composition of fish: a review. **Food Processing & Technology**, v. 6, n. 4, p. 376-382, 2018.

ALVES, L. F. D. S. et al. Use of Natural Antioxidants in Sous Vide Tilapia Fillet. **Boletim de Indústria Animal (BIA)**, v. 7, 2020.

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

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.

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

BARBOSA, Roberta G. et al. Preservative Effect of Algae Extracts on Lipid Composition and Rancidity Development in Brine-Canned Atlantic Chub Mackerel (*Scomber colias*). **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 121, n. 8, p. 1900129, 2019.

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, Blanca et al. Solanum sessiliflorum (mana-cubiu) antioxidant protective effect toward cholesterol oxidation: Influence of docosahexaenoic acid. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, n. 8, p. 1125-1131, 2016.

BARRIUSO, Blanca, ANSORENA, Diana., & ASTIASARÁN, Iciar. Oxysterols formation: A review of a multifactorial process. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, 169, 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.

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

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

BRASIL. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) - Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de

novembro de 1989 sob DECRETO Nº 10.468, de 18 de agosto de 2020. **Diário Oficial da União**, Brasil, Brasil, 2020.

BRASIL. Regulamento Técnico que Fixa a Identidade e as Características Mínimas de Qualidade que Deve Apresentar o Produto Conservas de Sardinhas para a Sua Comercialização. Brasília: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº22, de 11 de julho de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasil, Brasil, 2020. Disponível: <<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=12/07/2011&jornal=1&pagina=23&totalArquivos=136>>. Acesso em: 07/01/2022

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.

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

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.

CAPONIO, Francesco, et al. Fatty acid composition and degradation level of the oils used in canned fish as a function of the different types of fish. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24 n.8, p. 1117-1122, 2011.

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

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

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.

COSTAMARINE. **Programa de autocontrole: APPCC**. Costamarine qualidade em pescados. P 110. Julho 2021.

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

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

DA ROCHA, Paola dos Santos et al. Diversity, Chemical Constituents and Biological Activities of Endophytic Fungi Isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Microorganisms**, v. 859, n. 8, p. 1-13, 2020.

DE CARVALHO, Isabella Oliveira Alves Moreira et al. The use of lemon juice and its role on polyunsaturated fatty acids and cholesterol oxides formation in thermally prepared sardines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 104, p. 104087, 2021.

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

DE LIMA GLÓRIA, Lorena et al. Phenolic compounds present *Schinus terebinthifolius* 102 Raddi influence the lowering of blood pressure in rats. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1792, 2017.

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

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

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

DEREWIAKA, D.; MOLIŃSKA, E. Cholesterol transformations during heat treatment. **Food chemistry**, v. 171, p. 233-240, 2015.

DOMINGUEZ-VIDAL, Ana, et al. Authentication of canned fish packing oils by means of Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 190, p. 122-127, 2016.

ESKIN, Michael N. A.; SHAHIDI, Fereidoon. **Bioquímica de alimentos**. 3. ed. New York-USA: Elsevier, 2015.

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

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

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

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Fisheries and aquaculture statistics**. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome, 2019.

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

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

FDA. (FOOD DRUG ADMINISTRATION). **Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies -- Overarching Principles: Kinetics and Pathogens of Concern for All Technologies**. 2013. Disponível em: <<https://pt.slideshare.net/deheij/fda-kinetics-of-microbial-inactivation-for-alternative-food-processing-technologies-pulsed-electric-fields>> Acesso em: 21/09/2021.

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.

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

FERREIRA, Fernanda Silva et al. Bioactive compounds of parsley (*Petroselinum crispum*), chives (*Allium schoenoprasum* L) and their mixture (Brazilian cheiro-verde) as promising antioxidant and anti-cholesterol oxidation agents in a food system. **Food Research International**, v. 151, p. 110864, 2022.

FERYSIUK, Karolina et al. Modification of lipid oxidation and antioxidant capacity in canned refrigerated pork with a nitrite content reduced by half and addition of sweet pepper extract. **LWT**, v. 118, p. 108738, 2020.

FIGUEIRÊDO, Bruno. C., BRAGAGNOLO, Neura., Skibsted, L. H., & Orlie, 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**, 80(8), C1646-C1653, 2015.

GARCIA, T.; CARDOSO, C.; AFONSO, C.; GOMES, A.; MESQUITA, C.; TANNI, S.; BANDARRA, N. M. A Study of Lipid Bioaccessibility in Canned Sardine (*Sardina pilchardus*) and Chub Mackerel (*Scomber japonicus*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 402–412, 2019.

GOKOGLU, Nalan. Novel natural food preservatives and applications in seafood preservation: A review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 5, p. 2068-2077, 2019.

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

GROOTVELD, Martin; PERCIVAL, Benita C.; LEENDERS, Justine; WILSON, Philippe B. Potential adverse public health effects afforded by the ingestion of dietary lipid oxidation product toxins: Significance of fried food sources. **Nutrients**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 1–50, 2020.

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

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.

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

HURE, Marijana; MUSTAĆ, Bosiljka. Feeding ecology of *Sardina pilchardus* considering co-occurring small pelagic fish in the eastern Adriatic Sea. **Marine Biodiversity**, v. 50, n. 3, 2020.

INNES, Jacqueline K.; CALDER, Philip C. Marine omega-3 (N-3) fatty acids for cardiovascular health: an update for 2020. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 4, p. 1362, 2020.

JAY, J. M. Indicadores microbiológicos de qualidade e segurança dos alimentos. **Jay JM. Microbiologia de Alimentos**. 6a ed. Porto Alegre: Artmed, p. 413-33, 2005.

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

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

KULIG, Waldemar, et al. Cholesterol oxidation products and their biological importance. **Chemistry and Physics of Lipids**, 2016, 199: 144-160.

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.

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

LEAL-CASTAÑEDA, Everth J., et al. Formation of cholesterol oxides in lipid medium during microwave heating. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 119, n. 4, p. 1500597, 2017.

LEMAY-NEDJELSKI, Lauren et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids time-dependently reduce cell viability and oncogenic microRNA-21 expression in estrogen receptor-

positive breast cancer cells (MCF-7). **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 244, 2018.

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

LEONARDO, R. **Detecção da substituição de espécies de sardinhas comercializadas no estado do rio de janeiro por técnicas moleculares e avaliação nutricional**. 2015. 94f. Dissertação (Mestrado em ciência dos alimentos) - Centro de Tecnologia, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.

LEUNG, Kin Sum, et al. Limited Antioxidant Effect of Rosemary in Lipid Oxidation of Pan-Fried Salmon. **Biomolecules**, 9.8: 313, 2019.

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

LI, Y.; LIANG, X.; ZHANG, Y.; GAO. JEffects of different dietary soybean oil levels on growth, lipid deposition, tissues fatty acid composition and hepatic lipid metabolism related gene expressions in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) juvenile. **Aquaculture**, v. 451, p. 16–23, 2016.

LIU, Yan et al. Dietary cholesterol oxidation products: Perspectives linking food processing and storage with health implications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2021.

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

LORENZI, Harri; Matos, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil. 2ª edição**. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, 2008.

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

LOURO, Bruno; MORO, Gianluca De; GARCIA, Carlos; COX, Cymon J.; SANTOS, M.; ADELINO, V.; VER, Ana; SABATINO, Stephen J.; CAN, M. A haplotype-resolved draft genome of the European sardine (*Sardina pilchardus*). **GigaScience**, v. 8, n. 5, p. 1–8, 2019.

MACEDO, Nayara Bispo et al. Bioactive Compounds From *Schinus terebinthifolius* Raddi and Their Potential Health Benefits. **Phytopharmaceuticals: Potential Therapeutic Applications**, p. 363-402, 2021.

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

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

MAPA, **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Tarifa de importação de sardinha é eliminada por um ano. AGROEMDIA- Do campo a mesa - 2019. Disponível em: <<https://agroemdia.com.br/2019/02/09/tarifa-de-importacao-de-sardinha-e-eliminada-por-um-ano/>>. Acesso em: 05, setembro de 2020.

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.

MARTINI, Serena et al. Black, green, and pink pepper affect differently lipid oxidation during cooking and in vitro digestion of meat. **Food Chemistry**, v. 350, p. 129246, 2021.

MARTINS R., CARNEIRO M. **Manual de identificação de peixes ósseos da costa continental portuguesa. Principais características diagnosticantes**. IPMA Instituto Português do Mar e da Atmosfera Lisboa: 1-204. 2018. Disponível em: ≤

https://www.ipma.pt/export/sites/ipma/bin/docs/publicacoes/pescas.mar/MI_peixes.osseos_sta.cont.portuguesa.pdf > Acesso em: 03/10/2021.

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.

MATA, Wanniwat et al. Simple PCR-RFLP detection method for genus-and species-authentication of four types of tuna used in canned tuna industry. **Food Control**, v. 108, p. 106842, 2020.

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.

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

MELGOSA, Rodrigo et al. Supercritical CO₂ and subcritical water technologies for the production of bioactive extracts from sardine (*Sardina pilchardus*) waste. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 164, p. 104943, 2020.

MIGUES, Vitor Hugo; DAVID, Jorge Mauricio; DAVID, Juceni Pereira. Determination of polyphenols in *Schinus terebinthifolius* Raddi bark extracts and chemometric analysis. **Analytical Methods**, v. 12, n. 11, p. 1478-1485, 2020.

MKADEM, Hind; KAAANANE, Amar. Seasonal changes in chemical composition and fatty acids of sardines (*Sardina pilchardus*) from the Dakhla coast (Morocco). **Moroccan Journal of Agricultural Sciences**, v. 1, n. 3, 2020.

MONRAIA, Cristina et al. **Código de boas práticas de conservas de sardinha e do tipo sardinha**. Associação da Indústria Alimentar pelo Frio, 2006.

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

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

NAZARI, Forouzan; GOLI, Mohammad. The effect of replacing oil with water and NaCl with KCl on soybean oil hydrolysis and oxidation in canned skipjack tuna fish at the end of the 18-month shelf life. **Food science and biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 49-53, 2017.

NASERI, Mahmood; REZAEI, Masoud. Lipid changes during long-term storage of canned sprat. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 21, n. 1, p. 48-58, 2012.

NHAVOTO, V. M. **Elaboração de Conserva de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) com Envase em Molho de Tucupi**. 2016. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Pesqueiras nos Trópicos) - Programa de Pós-graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas, 2015.

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

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

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

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

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

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

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 extension. **LWT – Food Science and Technology**, v. 65, p. 112-121, 2016.

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

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.

RODRIGUES, Liliana A. et al. Supercritical CO₂ extraction of bioactive lipids from canned sardine waste streams. **Journal of CO₂ Utilization**, v. 43, p. 101359, 2021.

ROSA-FERNANDES, L.; MASELLI, L. M. F.; MAEDA, N. Y.; PALMISANO, G.; BYDLOWSKI, 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.

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

SALDANHA, Tatiana; BRAGAGNOLO, Neura. Efeito do cozimento na formação de óxidos de colesterol e alteração da composição de ácidos graxos em peixes. **Food Science and Technology**, v. 30.2: 385-390, 2010.

SALLES, Tiago S. et al. Chemical composition and anti-Mayaro virus activity of *Schinus terebinthifolius* fruits. **VirusDisease**, p. 1-9, 2021.

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

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

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

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

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

ŠIMAT, Vida et al. Production and characterization of crude oils from seafood processing by-products. **Food Bioscience**, v. 33, p. 100484, 2020.

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

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

SMITH, L. L. Cholesterol autoxidation. *Chem. Physis. Lipids.*, 1987, 44: 87, 1987.

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

STAURENGHI, Erica et al. Oxysterols present in Alzheimer's disease brain induce synaptotoxicity by activating astrocytes: A major role for lipocalin-2. **Redox Biology**, v. 39, p. 101837, 2021.

TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. Versão 4. Unicamp, São Paulo, 2011.

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

TARVAINEN, M.; QUIRIN, K.; KALLIO, H.; YANG, B. CO₂ Plant Extracts Reduce Cholesterol Oxidation in Fish Patties during Cooking and Storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 9653-9662, 2016.

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.

VARGAS-YÁÑEZ, Manuel; GIRÁLDEZ, Ana; TORRES, Pedro; GONZÁLEZ, María; GARCÍA-MARTÍNEZ, Maria del Carmen; MOYA, Francina. Variability of oceanographic and meteorological conditions in the northern Alboran Sea at seasonal, inter-annual and long-term time scales and their influence on sardine (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792) landings. **Fisheries Oceanography**, n., p. 1–14, 2020.

TODIRASCU-CIORNEA, Elena et al. *Schinus terebinthifolius* essential oil attenuates scopolamine-induced memory deficits via cholinergic modulation and antioxidant properties in a zebrafish model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.

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

XU, Guihua et al. Effect of eleven antioxidants in inhibiting thermal oxidation of cholesterol. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, n. 2, p. 215-225, 2016.

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

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.

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

CAPÍTULO I

ARTIGO ENVIADO A REVISTA

“FOOD CHEMISTRY”

Aluna: Carla Fernanda Targueta Barreira

Orientadora: Tatiana Saldanha

Coorientadora: Micheli da Silva Ferreira

Please verify your contribution to The addition of pink pepper (Schinus terebinthifolius Raddi) in canned sardines as a suitable strategy to reduce lipid oxidation and cholesterol oxides formation during thermal processing

De: em@editorialmanager.com

Para: Carla Barreira targuetacarla@outlook.com

Data: sex., 28 de jan. de 2022, 11:00

This is an automated message.

Journal: Food Chemistry

Title: The addition of pink pepper (Schinus terebinthifolius Raddi) in canned sardines as a suitable strategy to reduce lipid oxidation and cholesterol oxides formation during thermal processing

Corresponding Author: Professor Elizabeth AFS Torres

Co-Authors: Carla Barreira; Vanessa de Oliveira; Davy Chávez, PhD; Pedro Damasceno Júnior, PhD; Alexandra Sawaya, PhD; Micheli Ferreira, PhD; Geni Sampaio, PhD; Tatiana Saldanha, PhD

Manuscript Number:

Dear Carla Barreira,

The corresponding author Professor Elizabeth AFS Torres has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for Food Chemistry.

Submission Title: The addition of pink pepper (Schinus terebinthifolius Raddi) in canned sardines as a suitable strategy to reduce lipid oxidation and cholesterol oxides formation during thermal processing

Elsevier asks all authors to verify their co-authorship by confirming agreement to publish this article if it is accepted for publication.

A adição de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em conservas de sardinha como estratégia adequada para reduzir a oxidação lipídica e a formação de óxidos de colesterol durante o processamento térmico

Carla Fernanda Targueta Barreira^a, Vanessa Sales de Oliveira^a, Davy William Hidalgo Chávez^a, Pedro Côrrea Damasceno Júnior^b, Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya^c, Micheli da Silva Ferreira^d, Rosane Nora Castro^e, Geni Rodrigues Sampaio^f, Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres^{*f}, Tatiana Saldanha^a

^aDepartamento de Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia Br 465, Seropédica, RJ, 23890-000, Brasil.

^bDepartamento de Fitotecnia, Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia Br 465, Seropédica, RJ, 23890-000, Brasil.

^cFaculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

^dDepartamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, UFF, Niterói, RJ, Brasil.

^eDepartamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia Br 465, Seropédica, RJ, 23890-000, Brasil.

^fDepartamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo (USP), Av. Dr. Arnaldo, 715, São Paulo, SP, 01246-904, Brasil.

* Autor correspondente

Endereço de trabalho: Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo (USP), Av. Dr. Arnaldo, 715, São Paulo, SP, 01246-904, Brasil.

E-mail: eatorres@usp.br - Telefone: + 55 11 30617857

Resumo: Foram investigados os efeitos da adição de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na adição de 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0%, durante o processamento de conservas de sardinha para minimizar a formação de óxidos de colesterol. O enlatamento promoveu a oxidação lipídica e resultou na troca de ácidos graxos, colesterol e óxidos de colesterol entre o músculo do peixe e o líquido de cobertura. Após o enlatamento, o teor total de óxidos de colesterol aumentou de $39,53 \pm 2,14$ $\mu\text{g/g}$ (sardinha crua) para $116,04 \pm 0,78$ $\mu\text{g/g}$ (sardinha controle). No entanto, as amostras contendo pimenta rosa apresentaram níveis mais baixos (de $59,46 \pm 0,87$ a $93,26 \pm 1,99$ $\mu\text{g/g}$). Em adição, as análises cromatográficas demonstraram a migração de alguns compostos bioativos (ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e terpenos) dos frutos para as sardinhas. Assim, esses achados destacam a pimenta rosa como um aditivo natural adequado para prevenir a ocorrência de oxidação lipídica e reduzir a ingestão de compostos nocivos como óxidos de colesterol, contribuindo para a manutenção da qualidade nutricional de conservas de pescado.

1. Introdução

A falta de tempo e o esforço necessário para o preparo das refeições mudaram a preferência do consumidor, resultando em uma demanda crescente por produtos prontos para consumo. Assim, o consumo de alimentos enlatados, como a sardinha enlatada, aumentou globalmente nas últimas décadas (BARBOSA et al., 2019; GÓMEZ-LIMIA et al., 2020).

Além disso, peixes e produtos de pescado são fontes valiosas de ácidos graxos poliinsaturados n-3 (AGPIs), principalmente os ácidos eicosapentaenóico (EPA, C20:5) e docosahexaenóico (DHA, C22:6), que têm demonstrado várias atividades biológicas (DJURICIC; CALDER, 2021). Portanto, como técnica conservante, o enlatamento representa uma estratégia promissora para melhorar a disponibilidade de produtos estáveis no mercado, facilitando o acesso ao pescado e, conseqüentemente, desempenhando um papel crucial na nutrição humana (BARBOSA et al., 2019; GÓMEZ-LIMA et al., 2020).

A sardinha marroquina (*Sardina pilchardus*), também conhecida como sardinha do Atlântico ou sardinha europeia, é uma espécie de pequeno peixe pelágico, que se destaca na economia mundial pela expressiva quantidade capturada. No Brasil, esta espécie é amplamente utilizada pelas indústrias de conservas. Como resultado, a oferta nacional de produtos tem lutado para acompanhar a crescente expansão dos enlatados (FAO, 2018). Portanto, em 2019, o governo brasileiro reduziu substancialmente as tarifas de importação para proteger as espécies locais e atender às necessidades do mercado (MAPA, 2020).

As conservas de sardinha apresentam vantagens relacionadas à conservação e praticidade; no entanto, o enlatamento envolve uma variedade de etapas industriais (por exemplo, resfriamento, congelamento, cozimento, esterilização, armazenamento) que podem comprometer sua qualidade nutricional ao degradar ácidos graxos essenciais e causar a formação de compostos oxidados nocivos, como óxidos de colesterol (BARBOSA et al., 2019; DANTAS et al., 2021; MESÍAS, et al., 2015; NASERI; REZAEI, 2012; ZUNIN et al, 2001).

Além dos AGPIs, a fração lipídica das sardinhas também contém altos níveis de colesterol, sendo propensa à oxidação quando exposta a fatores como aquecimento (DE CARVALHO et al., 2021; DE OLIVEIRA et al., 2020a). Como as conservas de sardinha são submetidas a altas temperaturas durante o cozimento e esterilização, esses produtos podem ser considerados fontes de produtos exógenos de oxidação do colesterol (POCs) (DANTAS et al., 2021; ZUNIN et al., 2021), que têm sido relacionados ao desenvolvimento de várias doenças, como consequência de seus efeitos citotóxicos, aterogênicos, neurodegenerativos, inflamatórios e carcinogênicos (GARCIA-LLATAS, et al., 2021; LIU et al., 2021).

Estratégias para controlar a formação de POCs durante o processamento de conservas de pescado são de grande importância. Antioxidantes sintéticos são amplamente aplicados pela indústria alimentícia; no entanto, sua ingestão tornou-se um problema de saúde pública devido aos seus efeitos tóxicos e cancerígenos. Como resultado, tem sido relatado um crescente interesse em fontes naturais de antioxidantes (DE CARVALHO et al., 2021; DE OLIVEIRA et al., 2020a,b; FARHOOSH; NYSTRÖM, 2018; ZARANDONA, 2020).

A pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) surgiu como um condimento sofisticado. Além disso, estudos têm descrito as propriedades antioxidantes, antidiabéticas, anti-inflamatórias e antimicrobianas da pimenta rosa (BERNARDES et al., 2014; DE ARAUJO GOMES et al., 2020; DE OLIVEIRA et al., 2020b). Além de apresentar efeitos benéficos à saúde, a pimenta rosa contém compostos antioxidantes (por exemplo, ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, taninos) que podem dificultar a oxidação lipídica, mostrando seu potencial para atuar como antioxidante natural (DE ARAUJO et al., 2020; DE OLIVEIRA et al. 2020a,b; FEUEREISEN et al., 2017).

Um estudo recente realizado por Dantas et al. (2021) determinaram o teor de óxidos de colesterol em amostras comerciais de atum enlatado do mercado brasileiro, revelando o pescado enlatado como uma fonte potencial de POCs na dieta. Este achado destaca a relevância de investigar estratégias para reduzir a oxidação do colesterol durante o enlatamento. Embora a sardinha enlatada seja um dos produtos pesqueiros mais consumidos em todo o mundo, não existem estudos disponíveis sobre o uso de antioxidantes naturais para minimizar os processos oxidativos na mesma.

Nesse contexto, este estudo avaliou os efeitos da adição de pimenta rosa durante o processamento das sardinhas enlatadas para minimizar a formação de óxidos de colesterol. Para isso, frutos de pimenta rosa (0,25, 0,5, 0,75 e 1,0%) foram enlatados juntamente com sardinhas e líquido de cobertura comercial (óleo de soja). A formação de malondialdeído e a degradação de ácidos graxos também foram investigadas. Além disso, análises de UHPLC-ESI-MS foram realizadas com o objetivo de identificar a possível migração de compostos bioativos presentes na pimenta rosa para a musculatura e líquido de cobertura dos peixes.

2. Material e métodos

2.1 Padrões, reagentes e solventes

TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina), DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), Trolox, ácido linoleico, Tween-40, β -caroteno, BHT (hidroxitolueno butilado), TEP (1,1,3,3-tetraetoxipropano), ácido 2-tiobarbitúrico e metóxido de sódio foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). AAPH (dicloridrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)) e fluoresceína foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O ácido tricloroacético foi adquirido da Synth (São Paulo, Brasil). Todos os outros produtos químicos foram adquiridos da Vetec (Sigma, São Paulo, Brasil). O éster metílico undecanóico foi adquirido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) e as misturas de ácidos graxos padrão foram da Supelco TM 37 (FAME Mix 18919, Bellefonte, Pa., EUA). Colesterol e óxidos de colesterol foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os solventes utilizados durante as análises cromatográficas foram obtidos da seguinte forma: ácido fórmico (Synth, São Paulo, Brasil), hexano (Scharlau, Barcelone, Espanha), metanol e 2-propanol (Merck, Darmstadt, Alemanha).

2.2 Material vegetal

As amostras frescas de pimenta rosa foram doadas pelo Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil, em maio de 2020. O genótipo utilizado foi o UFRRJ ARO200-F, que se caracteriza como uma planta fêmea da espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi selecionada para a produção de frutos. A seleção foi feita pelo Programa de Melhoramento Genético do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ.

As amostras de pimenta rosa foram coletadas manualmente (Figura 6), selecionadas, lavadas em água corrente e secas em estufa ventilada (Solab, Brasil) a 40 °C por 48 horas para remoção do excesso de umidade. Em seguida os frutos foram armazenados em dessecador em temperatura ambiente ao abrigo de luz.



Figura 6: Coleta manual da pimenta rosa doada pelo Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

2.3 Análises da pimenta rosa

2.3.1 Preparação do extrato

A pimenta rosa moída (3 g) foi adicionada a 20 mL de uma solução de etanol/água (70:30%, v/v). A mistura foi sonicada em banho sônico (40 kHz) (Elmasonic P, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Alemanha) por 30 min e centrifugada (NI 1813, Nova Instruments, São Paulo, Brasil) a 18.000 x g por 5 min. Os procedimentos foram conduzidos à temperatura ambiente (25°C). Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico âmbar de 50 mL e completado o volume com a solução extratora.

2.3.2 Capacidade antioxidante *in vitro*

2.3.2.1. DPPH ensaio de eliminação de radicais livres

O ensaio DPPH foi realizado conforme descrito por Oliveira et al. (2020b). A absorvância foi medida a 517 nm e a atividade sequestrante de radical DPPH foi calculada da

seguinte forma: %I DPPH = $(A_0 - A) / A_0 \times 100$ (Equação 1), onde A_0 e A são a absorbância do controle (DPPH) e amostra, respectivamente.

2.3.2.2 Ensaio de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC)

O ensaio ORAC foi realizado de acordo com Oliveira et al. (2020b). Trolox foi usado como padrão de controle e uma curva de intensidade de fluorescência relativa foi usada para calcular os resultados, que foram expressos como μM Trolox Equivalent (TE)/g.

2.3.2.3 Ensaio de β -Caroteno/ácido linoleico

Os procedimentos propostos por Oliveira et al. (2020b) foram realizados. As leituras foram realizadas a cada 15 minutos a 50°C e 470 nm. BHT foi usado como controle. A porcentagem de inibição de oxidação (%I) foi calculada conforme mostrado nas seguintes equações (2, 3 e 4), onde A_c e A_s são a absorbância do controle e das amostras, respectivamente:

$$A_c = \text{Absorbância inicial} - \text{Absorbância final} \quad (2)$$

$$A_s = \text{Absorbância inicial} - \text{Absorbância final} \quad (3)$$

$$\%I = (A_c - A_s / A_c) \times 100 \quad (4)$$

2.3.2.4 Ensaio de FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

O reagente FRAP foi preparado misturando tampão de acetato de sódio 300 mM (pH 3,6), solução de TPTZ 10 mM (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina) em ácido clorídrico 40 mM e cloreto férrico 20 mM (10:1:1, v/v/v). A absorbância foi medida a 595 nm (THAIPONG et al., 2006). Os resultados foram expressos em μmol equivalente de Trolox (TE)/g.

2.4 Preparação da amostra e processo de enlatamento

O experimento foi realizado com aproximadamente 10 kg de sardinha (*Sardina pilchardus*) doada pela Nova Piracema (São Gonçalo, Rio de Janeiro, Brasil), em julho de 2020. As conservas de sardinha (cerca de 100 amostras) foram produzidas pela indústria Nova Piracema de acordo com os seguintes tratamentos: amostras sem pimenta rosa (controle, 0,0%

PP) e amostras com pimenta rosa adicionada a 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0% (denominada 0,25% PP, 0,5% PP, 0,75% PP e 1,0% PP, respectivamente).

Como não há estudos na literatura relatando a adição de frutas como pimenta rosa em conservas de pescado, esses percentuais foram determinados de acordo com de Oliveira et al. (2020a), que comprovaram a eficácia da pimenta rosa (0,2 e 0,5%) como antioxidante natural em um sistema modelo contendo óleo de sardinha durante o aquecimento. A adição de pimenta rosa foi calculada de acordo com o peso úmido médio das conservas de sardinha ($125 \pm 0,5$ g), incluindo músculo de peixe e líquido de cobertura.

As amostras de sardinha ($84 \pm 0,5$ g) foram colocadas manualmente em latas retangulares e, em seguida, foram adicionados frutos de pimenta rosa (Figura 7). Posteriormente, as latas devidamente identificadas foram direcionadas para a linha de produção (Figura 8). Eles receberam o líquido de cobertura ($41 \pm 0,5$ g de óleo de soja) (Figura 9) e foram esterilizados (esterilização comercial realizada a 126 °C por 40 min). As conservas de sardinha foram produzidas seguindo os procedimentos padrões aplicados pela indústria Nova Piracema (Figura 10).

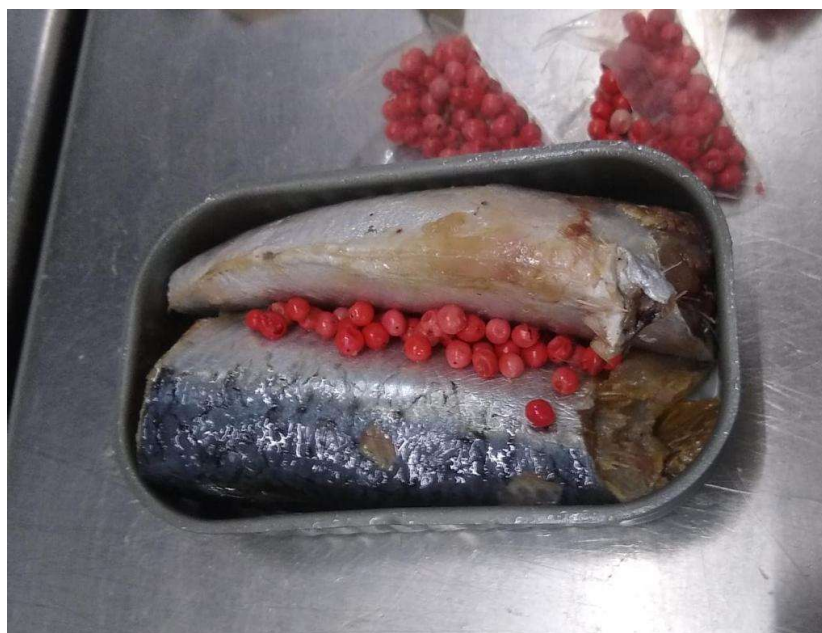


Figura 7: Adição da pimenta rosa à lata contendo sardinha.



Figura 8: Inserção das latas na linha de produção.



Figura 9: Adição do líquido de cobertura em óleo de soja às latas de sardinha.



Figura 10: Fluxograma do processamento das sardinhas em conserva (Adaptado de COSTAMARINE, 2021).

As conservas de sardinha foram encaminhadas à UFRRJ, onde foram utilizadas doze latas de cada tratamento para realização das análises. As latas foram abertas com o auxílio de abridor mecânico (Figura 11) e a parte líquida foi cuidadosamente drenada gravimetricamente com o auxílio de peneiras. Em seguida, o líquido de cobertura foi filtrado em papel filtro e armazenado em frascos âmbar estéreis a 4 °C até as análises. As sardinhas foram moídas em processador doméstico (Cadence, São Paulo, Brasil) e liofilizadas (Modelo L101, Liotop, São Paulo, Brasil) para obtenção dos resultados em base seca.



Figura 11: Abertura manual das conservas de sardinha.

Adicionalmente, um lote contendo doze sardinhas (previamente evisceradas, sem cabeça e cauda, conforme utilizado na indústria) foi transportado em caminhão refrigerado para a UFRRJ. Uma vez no laboratório, as sardinhas também foram moídas e liofilizadas. Em seguida, foram retiradas alíquotas convenientes para análise, correspondentes às amostras brutas. Além disso, alíquotas do líquido de cobertura antes do enlatamento também foram tomadas para análise.

2.5 Conservas de sardinha e análises dos líquidos de cobertura

2.5.1 Umidade e lipídios totais das sardinhas

A umidade e os lipídios totais foram determinados de acordo com AOAC (2006) seguindo os métodos 950, 46 e 991, 36, respectivamente.

2.5.2 Ensaio TBARS: Determinação de malondialdeído em sardinhas e líquidos de cobertura

O método relatado por Oliveira et al. (2020a) foi usado para o líquido de cobertura. Para as sardinhas, as modificações foram realizadas da seguinte forma. Uma mistura contendo 5 g de amostra e 50 mL de solução de ácido tricloroacético a 7,5% foi filtrada em papel filtro, seguida da adição de 5 mL de solução de ácido 2-tiobarbitúrico (0,02 M). A mistura foi aquecida em banho-maria fervente por 15 min e resfriada para determinar a absorvância em 532 nm. Uma curva padrão foi preparada usando TEP (1,1,3,3-tetraetoxipropano) e os resultados foram expressos em mg de malondialdeído (MDA)/kg de amostra.

2.5.3 Determinações de ácidos graxos das sardinhas e líquidos de cobertura

Os lipídios foram convertidos em ésteres metílicos por transesterificação com metóxido de sódio (de Oliveira et al., 2020a). Em seguida, os ésteres metílicos foram analisados em cromatógrafo a gás (Shimadzu GC 2010, Tóquio, Japão) com injetor em modo split (1:50), coluna capilar de sílica fundida CP-SIL 88 (100 mx 0,25 mm di, espessura de 0,20 µm filme) (Chrompack, Middelburg, Holanda) e detector de ionização de chama. As condições cromatográficas foram as descritas por Oliveira, et al. (2020a), usando hidrogênio como gás de arraste (1 mL/min) e nitrogênio como gás de compensação (30 mL/min). Os picos cromatográficos das amostras foram identificados avaliando os tempos de retenção dos padrões FAME. A quantificação foi realizada por padronização interna com o éster metílico undecanóico como padrão.

2.5.4 Determinações de colesterol e óxidos de colesterol de sardinhas e líquidos de cobertura

Colesterol e óxidos de colesterol foram obtidos simultaneamente por saponificação direta das amostras. O método descrito por Oliveira et al. (2020a) foi utilizado para os líquidos de cobertura, enquanto as análises das sardinhas foram realizadas de acordo com de Carvalho et al. (2021).

A identificação e quantificação foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho-Espectrometria de Massa em um HPLC-MS-PDA (Shimadzu LCMS-2020, Tóquio, Japão), equipado com uma coluna Hypersil Cyano (250 mm × 4,6 mm) (Thermo

Scientific, Massachusetts, EUA) e um Photodiode Array Detector (PDA) (SPD-M20A, Shimadzu, Tóquio, Japão). As análises foram realizadas seguindo as condições estabelecidas por Oliveira et al. (2020a): fluxo da bomba de 1 mL/min, temperatura da coluna a 35°C, n-hexano:2-propanol (97:3, v/v) como fase móvel. A detecção de MS foi realizada no modo de íons positivos com Ionização Química por Pressão Atmosférica (APCI) e os cromatogramas foram obtidos no modo de monitoramento seletivo de íons (SIM). Os compostos foram determinados por comparação dos tempos de retenção dos picos nas amostras com os padrões de referência e por m/z. Padronização externa usando curvas de calibração padrão foi usada para quantificação.

2.6 Identificações de compostos bioativos por análises UHPLC-ESI-MS

As análises cromatográficas de sardinhas e líquidos de cobertura foram conduzidas com um cromatógrafo UHPLC Acquity (Waters, Milford, MA, EUA) acoplado a um espectrômetro de massa TQD Acquity triplo quadrupolo (Micromass-Waters), com ionização por eletrospray (ESI) no íon modos negativo e positivo. As análises foram realizadas seguindo as condições relatadas por Oliveira et al. (2020a), com aquisição de dados entre m/z 100 e 900. MS/MS de picos selecionados foram adquiridos via dissociação induzida por colisão (CID) com energia de colisão de 30 V. Para separação cromatográfica, um C18 BEH Waters Acquity (2,1 mm x 50 mm x 1,7 µm) a 30°C. As fases A (0,1% de ácido fórmico) e B (metanol) foram aplicadas (0,2 mL/min) com um gradiente linear começando em 5% B e aumentando até 100% de metanol em 7,5 min, antes de manter até 9 min e retornar às condições iniciais, seguido de reequilíbrio da coluna até 10 min. Os compostos foram supostamente identificados por comparação de seus íons precursores e produtos com dados da literatura.

2.7 Análises estatística

O experimento foi conduzido usando um desenho fatorial 2x5: o fator A foi o tipo de matriz (a1: sardinha e a2: líquido de cobertura) e o fator B foi a porcentagem de adição de pimenta rosa (b1: 0,0%; b2: 0,25%; b3: 0,5%; b4: 0,75% e b5: 1,0%). Além disso, houve dois tratamentos adicionais, que foram o líquido de cobertura e a sardinha sem qualquer adição ou tratamento (pré enlatamento).

Para estatística univariada, uma ANOVA de duas vias foi usada para determinar as diferenças entre os tratamentos. O teste de alcance de Tukey foi usado sempre que a diferença foi detectada. O teste de Dunnett foi usado para comparar: 1) amostras de líquido de cobertura controle contra amostras de líquidos de cobertura tratadas com pimenta rosa, 2) amostras de sardinha controle contra sardinhas tratadas com pimenta rosa, 3) amostras de líquidos de cobertura enlatado contra amostra de líquido de cobertura avaliada antes do enlatamento, e 4) amostras de sardinhas enlatadas contra sardinhas avaliadas antes do enlatamento (cru). Análise de Componentes Principais (PCA) e Agrupamento Hierárquico de Componentes Principais (HCPC) foram usados para estatísticas multivariadas. A PCA foi realizada após a padronização dos dados para evitar a influência da unidade e da ordem de magnitude. O HCPC foi realizado para confirmar os grupos amostrais sugeridos na PCA. Por fim, o teste de correlação de Pearson foi aplicado para avaliar as correlações de ácidos graxos, colesterol e POCs e a força da correlação foi determinada de acordo com Teles et al. (2019).

3. Resultados e discussão

3.1. Capacidade antioxidante *in vitro* do extrato de pimenta rosa

O método DPPH apresentou inibição de $95,03 \pm 0,07\%$, o que está de acordo com estudo realizado por Bernardes et al. (2014) (95,60%). Em contrapartida, um percentual menor foi encontrado por de Oliveira et al. (2020b) (42,68%).

O valor ORAC foi de $77,01 \pm 3,70 \mu\text{M TE/g}$. Valores que variaram de $43,40 \mu\text{M TE/g}$ (Oliveira et al., 2020b) a $158,24 \mu\text{M TE/g}$ (Serrano-León et al., 2018) foram relatados. Em relação ao ensaio de β -caroteno/ácido linoleico, foi determinado 11,46% de inibição oxidativa, resultado inferior ao descrito por Oliveira et al. (2020b) (61,41%).

O ensaio FRAP mostrou $58,51 \pm 1,33 \mu\text{mol TE/g}$, enquanto Oliveira et al. (2020) determinou $488,60 \mu\text{mol TE/g}$. Extratos de pimenta rosa avaliados por outros autores também mostraram potencial antioxidante pelo ensaio FRAP; no entanto, os resultados foram expressos em unidades diferentes, dificultando a comparação (RUSSO et al., 2017).

Os extratos vegetais contêm uma ampla gama de compostos bioativos com diferentes estruturas químicas e características antioxidantes. O uso de um único ensaio não fornece resultados precisos. Assim, métodos baseados em mecanismos distintos foram realizados para insights complementares (GULCIN, 2020). Embora a capacidade antioxidante da pimenta rosa esteja bem documentada, vale a pena caracterizar cada amostra estudada, pois o nível de

compostos antioxidantes é altamente influenciado por fatores como origem, época de colheita, genótipo, condições climáticas, maturidade, entre outros, afetando o potencial antioxidante do extrato. Além disso, a eficácia da extração é diretamente impactada pelos parâmetros e condições utilizados (por exemplo, temperatura, tipo de solvente, proporção de solvente, tempo de extração, método) (GULCIN, 2020; RUSSO et al., 2017).

3.2. Compostos bioativos do extrato de pimenta rosa determinados por UHPLC-ESI-MS

A Tabela 1 apresenta a proposta de identificação dos compostos bioativos do extrato de pimenta rosa. Doze compostos foram identificados, incluindo ácidos orgânicos, ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, galotaninos e terpenos. A maioria deles foi detectada no modo de íons negativos; no entanto, 3 compostos foram encontrados no modo de íon positivo.

No modo de íon negativo, ácidos orgânicos como os ácidos málico e cítrico foram determinados como m/z 133 e 191, respectivamente (Fernández-Fernández et al., 2010). Representando a classe dos ácidos fenólicos, o ácido gálico (m/z 169) foi encontrado no extrato de pimenta rosa, conforme relatado por Araujo Gomes et al. (2020). Um galotanino foi detectado como m/z 539, de acordo com outros autores (DE OLIVEIRA et al., 2020a,b; FEUEREISEN et al., 2017).

Os flavonoides agatisflavona (m/z 537) e tetrahydroamentoflavona (m/z 541) também foram identificados no extrato de pimenta rosa por sua fragmentação MS/MS em comparação com a literatura (DE ARAUJO GOMES et al., 2020; DE OLIVEIRA et al., 2020a,b). Além disso, foi encontrado um ácido triterpeno com m/z 469, assim como os terpenos ácido masticadienólico (m/z 453) e 3α -hidroximasticadienoico (schinol, m/z 455) (DE ARAUJO GOMES et al., 2020; DE OLIVEIRA et al., 2020a).

Antocianinas como cianidina (m/z 287) e 7-O-metilpelargonidina 3-O-galactosídeo (m/z 447) foram determinadas no modo de íon positivo (DE OLIVEIRA ET AL., 2020a,b; FEUEREISEN et al., 2017 ; KOH; YOUN; KIM, 2014), enquanto o biflavonóide hinokiflavona foi detectado como m/z 539 (DE OLIVEIRA et al., 2020a,b; FEUEREISEN et al., 2017).

Tabela 1: Proposta de identificação de compostos bioativos do extrato de pimenta rosa por UHPLC-ESI-MS.

ESI ion mode	RT (min)	Íon precursor (<i>m/z</i>)	Fragmentos principais (<i>m/z</i>)	Identificação proposta	Referência
-	0.803	133	132.7; 131.8; 71.0	Ácido Málico	Fernández-Fernández et al. (2010)
-	0.812	169	168.9; 125.0	Ácido Gálico	De Araujo Gomes et al. (2020)
-	0.878	191	191; 111.2; 87.0; 85.1	Ácido Cítrico	Fernández-Fernández et al. (2010)
+	0.991	447	447; 285.2	7-O-methylpelargonidin 3-O-galactoside	De Oliveira et al. (2020a) De Oliveira et al. (2020b) Feuereisen et al. (2017)
+	1.172	287	287	Cianidina	Koh, Youn, & Kim (2014) De Oliveira et al. (2020a)
+	2.315	539	539	Hinokiflavona	De Oliveira et al. (2020b) Feuereisen et al. (2017)
-	2.534	539	539; 413.2; 387.4; 386.5; 319.2; 150.9	Galotanino	De Oliveira et al. (2020a) De Oliveira et al. (2020b) Feuereisen et al. (2017)
-	2.630	541	415.1; 389.2	Tetra-hidroamentoflavona	De Araujo Gomes et al. (2020) De Oliveira et al. (2020a)

-	5.492	537	537	Agatisflavona	De Oliveira et al. (2020b) De Araujo Gomes et al. (2020) De Oliveira et al. (2020a) De Oliveira et al. (2020b)
-	5.711	469	469	Ácido Triterpeno	De Araujo Gomes et al. (2020) De Oliveira et al. (2020a)
-	7.351	455	455	3 α - Hidroximasticadienolico (schinol)	De Araujo Gomes et al. (2020) De Oliveira et al. (2020a)
-	7.895	453	453	Ácido Masticadienólico	De Araujo Gomes et al. (2020) De Oliveira et al. (2020a)

Os compostos bioativos identificados no extrato de pimenta rosa destacam esta fruta não apenas como intensificador de sabor, mas também como alimento promotor da saúde. Biflavonoides, como agathisflavona, tetrahydroamentoflavona e hinokiflavona, têm demonstrado potencial como agentes terapêuticos contra doenças microbianas (por exemplo, influenza, HIV-AIDS, hepatite) (MENEZES; CAMPOS, 2021). Santos et al. (2020) relataram a neuroproteção da agathisflavona em um modelo de estudo da doença de Parkinson. O papel dos terpenos no tratamento de doenças cardiovasculares e metabólicas foi resumido em uma revisão recente (OLIVEIRA et al., 2021).

As atividades biológicas apresentadas acima estão relacionadas principalmente às propriedades antioxidantes desses compostos. Além de fornecer valor nutricional extra, o uso da pimenta rosa como condimento também pode representar uma alternativa para controlar a oxidação lipídica em alimentos (DE OLIVEIRA et al., 2020a,b; SERRANO-LEÓN et al., 2018). A pimenta rosa contém constituintes antioxidantes, como compostos fenólicos, que são capazes de doar átomos de hidrogênio a radicais lipídicos que iniciam processos oxidativos (GULCIN, 2020).

Farhoosh e Nyström (2018) avaliaram o efeito antioxidante do ácido gálico no óleo de girassol mostrando que o fenólico natural foi mais eficaz que o antioxidante sintético TBHQ na prevenção da oxidação em alta temperatura (120°C). O ácido gálico aumentou a atividade antioxidante dos filmes de quitosana em um estudo realizado por Zarandona et al. (2020), sugerindo sua adequação como embalagens ativas de alimentos. Portanto, considerando a crescente relevância da pimenta rosa para a indústria alimentícia como ingrediente funcional e antioxidante natural, foram investigados seus efeitos contra o impacto do enlatamento na fração lipídica das sardinhas.

3.3. Sardinhas

3.3.1. Teores de umidade e lipídios totais de amostras de sardinhas enlatadas

Os teores de umidade da sardinha crua foi de $68,73 \pm 0,43$ g/100 g. No entanto, um teor menor ($p < 0,05$) de $62,73 \pm 0,61$ g/100 g foi avaliado em amostras controle enlatadas. A adição de pimenta rosa às conservas de sardinha não promoveu alterações nos teores de umidade para a maioria das amostras ($p > 0,05$), com valores variando de $62,49 \pm 0,16$ a $63,99 \pm 0,22$ g/100 g (Material complementar Tabela 1). Isso indica que a umidade foi afetada apenas pelo processo de enlatamento. De fato, o tratamento térmico pode resultar na degradação de proteínas no músculo do peixe, diminuindo a capacidade de retenção de água e, conseqüentemente, causando a perda de água (GÓMEZ-LIMIA et al., 2020).

Em relação aos lipídios, $16,84 \pm 0,72$ e $16,23 \pm 0,70$ g/100 g (base seca) foram encontrados nas amostras bruta e controle, respectivamente. Nas amostras com pimenta rosa, os teores variaram de $15,53 \pm 0,54$ a $17,08 \pm 0,63$ g/100 g ($p > 0,05$) (Material complementar Tabela 1).

Em relação aos efeitos do enlatamento sobre os lipídios totais, estudos anteriores demonstraram níveis mais elevados em peixes enlatados com óleo em comparação com peixes frescos, o que é atribuído à absorção de óleo pelo músculo do peixe (DANTAS et al., 2021; GÓMEZ-LIMIA et al., 2020). No entanto, essa tendência não foi observada no presente estudo. Apesar de terem sido utilizadas amostras de sardinha do mesmo lote durante o experimento, a composição dos peixes é influenciada por fatores como condições ambientais, alimentação, idade, sexo, entre outros (BANDARRA et al., 2018).

3.3.2 Ensaio de TBARS: teores de malondialdeído em amostras de sardinhas e líquidos de cobertura

Os valores de TBARS encontrados na sardinha crua foi de $7,98 \pm 0,72$ mg MDA/kg, enquanto o líquido de cobertura apresentou $1,55 \pm 0,14$ mg MDA/kg (Material complementar Tabela 2). Maiores valores de TBARS foram determinados após o enlatamento ($p < 0,05$), o que reflete a ocorrência de processos oxidativos e formação de produtos secundários da oxidação lipídica, como o malondialdeído.

Após o enlatamento, as amostras controle apresentaram os seguintes valores: $13,19 \pm 0,17$ (sardinha) e $2,59 \pm 0,19$ mg MDA/kg (líquido de cobertura). Níveis aumentados de MDA foram descritos em peixes enlatados, como carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) (Naseri et al., 2011) e enguia (*Anguilla anguilla*) (GÓMEZ-LIMIA et al., 2020). Além disso, níveis mais altos de MDA encontrados nos líquidos de cobertura após o enlatamento também podem indicar sua oxidação. Por outro lado, a fração lipídica do peixe é mais suscetível à oxidação devido à sua maior concentração de AGPIs em relação ao óleo de soja (DE CARVALHO et al., 2021; KOZŁOWSKA; GRUCZYŃSKA, 2018), o que indica a migração do MDA do músculo da sardinha para o líquido de cobertura.

Nas amostras contendo pimenta rosa, os teores de MDA variaram de $8,88 \pm 0,70$ a $9,92 \pm 0,80$ mg MDA/kg (sardinha) e de $1,34 \pm 0,24$ a $2,54 \pm 0,23$ mg MDA/kg (líquido de cobertura) (Material complementar Tabela 2). Nas sardinhas, valores menores ($p < 0,05$) de TBARS foram avaliados nas amostras com pimenta rosa em relação ao controle; no entanto, não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$) entre as concentrações de pimenta rosa. No líquido de cobertura, apenas o tratamento com 0,25% de pimenta rosa não causou redução no teor de MDA em relação ao controle ($p < 0,05$).

As condições às quais os lipídios do peixe são expostos durante o enlatamento podem induzir a oxidação. Por exemplo, as temperaturas aplicadas durante o cozimento e esterilização levam à degradação de hidroperóxidos e promovem a formação de MDA. Isso resulta em maiores valores de TBARS, o que está diretamente associado ao ranço e à perda de qualidade dos alimentos (GÓMEZ-LIMIA et al., 2020; NASERI et al., 2011). Esses achados destacam a relevância dos antioxidantes naturais em conservas de peixe, como demonstrado neste estudo.

3.3.3 Composições de ácidos graxos de sardinhas enlatadas e líquidos de cobertura

Os principais ácidos graxos encontrados na sardinha crua foram: palmítico (C16:0, $20,58 \pm 1,98$ g/100 g de óleo), oleico (C18:1n9c, $17,88 \pm 0,88$ g/100 g de óleo), eicosapentaenóico (EPA, C20:5n3, $11,95 \pm 0,28$ g/100 g de óleo), palmitoleico (C16:1, $11,30 \pm 0,81$ g/100 g de óleo) e ácidos mirísticos (C14:0, $8,91 \pm 0,59$ g/100 g de óleo) (Tabela 2), que está de acordo com o perfil de ácidos graxos da sardinha descrito por Bandarra et al. (2018) e de Carvalho et al. (2021).

Em relação aos grupos de ácidos graxos, os teores de ácidos graxos somados aumentaram na seguinte ordem: poliinsaturados (AGPI) ($31,85 \pm 0,48$ g/100 g de óleo) < monoinsaturados (AGM) ($32,14 \pm 1,44$ g/100 g de óleo) < saturados (AGS) ($37,33 \pm 2,90$ g/100 g de óleo). Além disso, a soma de EPA e DHA foi de $18,37 \pm 0,42$ g/100 g de óleo.

O líquido de cobertura avaliado antes do enlatamento apresentou ácidos linoleico (C18:2n6c, $48,07 \pm 0,69$ g/100 g de óleo), oleico (C18:1n9c, $27,61 \pm 0,02$ g/100 g de óleo) e palmítico (C16:0, $9,53 \pm 0,41$ g/100 g de óleo) como ácidos graxos predominantes, que também foram determinados em níveis elevados no óleo de soja por outros autores (KOZŁOWSKA; GRUCZYŃSKA, 2018; NASSERI et al., 2011).

O processo de enlatamento modificou a concentração de ácidos graxos nas sardinhas controle. Assim, os teores de AGSs e AGMs diminuíram para $24,40 \pm 1,44$ e $24,43 \pm 0,78$ g/100 g de óleo, respectivamente, enquanto a quantidade de AGPIs aumentou para $38,74 \pm 0,77$ g/100 g de óleo. Além disso, a soma de EPA e DHA reduziu ($p < 0,05$) de $18,37 \pm 0,42$ (sardinha crua) para $12,05 \pm 0,76$ g/100 g de óleo (sardinha enlatada controle).

Teores mais baixos de ácidos graxos de peixes também foram determinados após o enlatamento em estudos anteriores, sendo atribuídos principalmente à oxidação (DANTAS et al., 2021; NASSERI et al., 2011; NASERI; REZAEI, 2012). Reduções de 23,26% (AGSs) e 24,49% (AGMs) foram observadas em conservas de peixe (*Hypophthalmichthys molitrix*) comparando os valores obtidos antes e após o enlatamento. Naseri e Rezaei (2012) mostraram que o enlatamento diminuiu a soma de EPA e DHA de 24,84 (peixe cru) para 13,01 g/100 g (peixe enlatado) em espadilha enlatada (*Clupeonella cultriventris*). Resultados relatados por Dantas et al. (2021) sugeriram que reações oxidativas causaram a degradação de ácidos graxos em conservas de atum.

Tabela 2: Composições de ácidos graxos (g/100 g de óleo) das amostras de sardinhas e líquidos de cobertura pré e pós o enlatamento (controle e com pimenta rosa a 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0%).

Sardinhas						
	Pré Enlatamento		Pós enlatamento			
Ácidos Graxos	Crua	Controle (0.0% PP)	0.25% PP	0.5% PP	0.75% PP	1.0% PP
C14:0	8.91 ± 0.59	5.02 ± 0.30 ^{a;β}	5.14 ± 0.10 ^{B;a;β}	4.99 ± 0.17 ^{B;a;β}	5.72 ± 0.09 ^{A;a;β;α}	5.85 ± 0.31 ^{A;a;β;α}
C16:0	20.58 ± 1.98	14.35 ± 1.00 ^{a;β}	15.90 ± 0.23 ^{A;a;β}	15.85 ± 1.01 ^{A;a;β}	15.86 ± 1.09 ^{A;a;β}	16.18 ± 0.41 ^{A;a;β}
C16:1cis	11.30 ± 0.81	4.43 ± 0.59 ^{a;β}	4.82 ± 0.09 ^{BC;a;β}	4.49 ± 0.44 ^{C;a;β}	6.17 ± 0.22 ^{A;a;β;α}	5.70 ± 0.40 ^{AB;a;β;α}
C18:0	5.88 ± 0.51	4.20 ± 0.76 ^{a;β}	4.19 ± 0.38 ^{A;a;β}	3.63 ± 0.46 ^{A;a;β}	4.02 ± 0.63 ^{A;a;β}	4.06 ± 0.51 ^{A;a;β}
C18:1n9t	-	0.31 ± 0.02 ^A	0.32 ± 0.01 ^A	0.38 ± 0.03 ^A	0.37 ± 0.07 ^A	0.34 ± 0.05 ^A
C18:1n9c	17.88 ± 0.88	18.69 ± 1.26 ^b	18.97 ± 0.45 ^{A;b}	19.59 ± 0.81 ^{A;b}	19.83 ± 1.56 ^{A;b}	20.11 ± 0.38 ^{A;b}
C18:2n6t	-	0.46 ± 0.03 ^a	0.51 ± 0.05 ^{A;a}	0.37 ± 0.03 ^{B;a;α}	0.20 ± 0.04 ^{C;b;α}	0.18 ± 0.03 ^{C;b;α}
C18:2n6c	4.80 ± 0.47	20.93 ± 0.80 ^{b;β}	20.50 ± 0.29 ^{B;b;β}	22.06 ± 0.19 ^{A;b;a;β}	21.97 ± 0.27 ^{A;b;β}	22.00 ± 0.48 ^{A;b;β}
C18:3n6	0.56 ± 0.04	0.20 ± 0.03 ^{a;β}	0.22 ± 0.00 ^{A;b;β}	0.22 ± 0.02 ^{A;b;β}	0.24 ± 0.01 ^{A;b;β;α}	0.24 ± 0.02 ^{A;b;β;α}
C20:1n9	1.84 ± 0.09	0.47 ± 0.04 ^{a;β}	0.49 ± 0.02 ^{C;a;β}	0.89 ± 0.04 ^{B;a;β;α}	1.19 ± 0.01 ^{A;a;β;α}	1.24 ± 0.09 ^{A;a;β;α}
C18:3n3	2.82 ± 0.03	2.39 ± 0.21 ^b	2.26 ± 0.28 ^{A;b}	2.1 ± 0.12 ^{A;b;β}	2.29 ± 0.24 ^{A;b;β}	2.30 ± 0.11 ^{A;b;β}
C20:2n6	0.36 ± 0.00	0.15 ± 0.03 ^β	0.17 ± 0.03 ^{AB;β}	0.22 ± 0.05 ^{AB;β}	0.24 ± 0.01 ^{A;β;α}	0.17 ± 0.02 ^{AB;β}
C20:3n6	1.70 ± 0.24	0.75 ± 0.06 ^β	0.63 ± 0.11 ^{A;β}	0.23 ± 0.03 ^{B;β;α}	0.23 ± 0.04 ^{B;β;α}	0.39 ± 0.06 ^{B;β;α}
C22:1n9	0.69 ± 0.00	0.36 ± 0.02 ^{a;β}	0.33 ± 0.06 ^{A;a;β}	0.39 ± 0.08 ^{A;a;β}	0.35 ± 0.04 ^{A;a;β}	0.38 ± 0.08 ^{A;a;β}
C20:3n3	2.45 ± 0.19	1.48 ± 0.09 ^{a;β}	1.53 ± 0.01 ^{A;a;β}	0.83 ± 0.04 ^{B;a;β;α}	0.26 ± 0.03 ^{C;b;β;α}	0.38 ± 0.07 ^{C;b;β;α}

C20:4n6	0.81 ± 0.07	0.33 ± 0.06 ^{a;β}	0.33 ± 0.07 ^{B;b;β}	0.49 ± 0.08 ^{A;a;β;α}	0.34 ± 0.03 ^{B;b;β}	0.46 ± 0.05 ^{AB;a;β;α}
C24:0	1.96 ± 0.06	0.82 ± 0.01 ^{a;β}	0.81 ± 0.03 ^{A;a;β}	0.86 ± 0.05 ^{A;a;β}	0.88 ± 0.10 ^{A;a;β}	0.79 ± 0.10 ^{A;b;β}
C20:5n3	11.95 ± 0.28	8.06 ± 0.76 ^{a;β}	8.51 ± 0.27 ^{A;a;β}	9.18 ± 0.98 ^{A;a;β}	9.63 ± 1.04 ^{A;a;β}	9.98 ± 0.85 ^{A;a;β}
C24:1n9	0.43 ± 0.04	0.17 ± 0.01 ^β	0.16 ± 0.00 ^{B;β}	0.33 ± 0.04 ^{A;β;α}	0.43 ± 0.07 ^{A;α}	0.43 ± 0.07 ^{A;α}
C22:6n3	6.41 ± 0.34	3.98 ± 0.25 ^{a;β}	4.04 ± 0.36 ^{A;a;β}	4.05 ± 0.20 ^{A;a;β}	4.07 ± 0.09 ^{A;a;β}	4.09 ± 0.45 ^{A;a;β}
ΣFA	80.75 ± 2.55	12.05 ± 0.76 ^{a;β}	12.55 ± 0.22 ^{A;a;β}	13.23 ± 1.17 ^{A;a;β}	13.70 ± 1.00 ^{A;a;β}	14.07 ± 1.16 ^{A;a;β}
ΣAGS	37.33 ± 2.90	24.40 ± 1.44 ^{a;β}	26.04 ± 0.65 ^{A;a;β}	25.33 ± 0.96 ^{A;a;β}	26.49 ± 1.18 ^{A;a;β}	26.89 ± 1.29 ^{A;a;β}
ΣAGM	32.14 ± 1.44	24.43 ± 0.78 ^{a;β}	25.09 ± 0.40 ^{B;a;β}	26.07 ± 1.20 ^{AB;a;β}	28.35 ± 1.35 ^{A;a;β;α}	28.21 ± 0.86 ^{A;a;β;α}
ΣAGPI	31.85 ± 0.48	38.74 ± 0.77 ^{a;β}	38.70 ± 0.56 ^{A;b;β}	39.75 ± 0.91 ^{A;b;β}	39.46 ± 0.80 ^{A;b;β}	40.18 ± 1.40 ^{A;b;β}
ΣUFA	64.00 ± 1.82	63.17 ± 1.23 ^a	63.80 ± 0.78 ^{B;b}	65.82 ± 1.94 ^{AB;b}	67.81 ± 0.55 ^{A;b;α}	68.39 ± 1.06 ^{A;b;β;α}
Σω3	23.63 ± 0.23	15.92 ± 0.70 ^{a;β}	16.34 ± 0.48 ^{A;a;β}	16.16 ± 1.09 ^{A;a;β}	16.25 ± 0.82 ^{A;a;β}	16.75 ± 1.09 ^{A;a;β}
Σω6	8.22 ± 0.43	22.82 ± 0.80 ^{a;β}	22.36 ± 0.14 ^{A;b;β}	23.59 ± 0.38 ^{A;b;β}	23.21 ± 0.32 ^{A;b;β}	23.43 ± 0.44 ^{A;b;β}
ω3/ω6	2.88 ± 0.15	0.70 ± 0.05 ^{a;β}	0.73 ± 0.02 ^{A;a;β}	0.68 ± 0.05 ^{A;a;β}	0.7 ± 0.04 ^{A;a;β}	0.71 ± 0.04 ^{A;a;β}
ΣTrans	-	0.77 ± 0.05 ^a	0.83 ± 0.05 ^{A;a}	0.75 ± 0.05 ^{A;a}	0.57 ± 0.09 ^{B;a;α}	0.52 ± 0.04 ^{B;a;α}
EPA+DHA	18.37 ± 0.42	12.05 ± 0.76 ^{a;β}	12.55 ± 0.22 ^{A;a;β}	13.23 ± 1.17 ^{A;a;β}	13.70 ± 1.00 ^{A;a;β}	14.07 ± 1.16 ^{A;a;β}

Líquidos de cobertura

Pós enlatamento

Fatty acid	Pré enlatamento	Controle (0.0% PP)	0.25% PP	0.5% PP	0.75% PP	1.0% PP
C14:0	-	0.36 ± 0.03 ^b	0.46 ± 0.06 ^{CD;b}	0.66 ± 0.12 ^{C;b;γ}	1.06 ± 0.18 ^{B;b;γ}	1.71 ± 0.07 ^{A;b;γ}

C16:0	9.53 ± 0.41	10.25 ± 0.62 ^b	10.46 ± 0.07 ^{B;b}	10.95 ± 0.91 ^{AB;b;δ}	11.32 ± 0.81 ^{AB;b;δ}	12.18 ± 0.02 ^{A;b;δ;γ}
C16:1 cis	-	0.55 ± 0.01 ^b	0.55 ± 0.06 ^{D;b}	0.79 ± 0.07 ^{C;b;γ}	1.64 ± 0.13 ^{B;b;γ}	2.33 ± 0.05 ^{A;b;γ}
C18:0	4.25 ± 0.73	3.37 ± 0.13 ^a	3.44 ± 0.46 ^{A;a}	3.45 ± 0.08 ^{A;a}	3.60 ± 0.32 ^{A;a}	3.74 ± 0.03 ^{A;a}
C18:1 n9t	-	-	-	-	-	-
C18:1 n9c	27.61 ± 0.02	20.94 ± 0.61 ^{a;δ}	22.55 ± 1.08 ^{AB;a;δ;γ}	22.60 ± 0.34 ^{AB;a;δ;γ}	22.74 ± 0.10 ^{A;a;δ;γ}	22.16 ± 0.56 ^{AB;a;δ}
C18:2 n6t	-	0.42 ± 0.06 ^a	0.40 ± 0.03 ^{AB;b}	0.33 ± 0.05 ^{AB;a}	0.30 ± 0.04 ^{B;a;γ}	0.28 ± 0.02 ^{B;a;γ}
C18:2 n6c	48.07 ± 0.69	30.23 ± 5.66 ^{a;δ}	39.62 ± 2.22 ^{A;a;δ;γ}	40.65 ± 2.20 ^{A;a;δ;γ}	38.16 ± 2.16 ^{AB;a;δ;γ}	38.73 ± 1.14 ^{A;a;δ;γ}
C18:3 n6	-	0.28 ± 0.04 ^a	0.31 ± 0.01 ^{A;a}	0.29 ± 0.01 ^{A;a}	0.32 ± 0.04 ^{A;a}	0.31 ± 0.02 ^{A;a}
C20:1n9	-	0.45 ± 0.00 ^a	0.50 ± 0.04 ^{B;a}	0.61 ± 0.04 ^{A;b;γ}	0.60 ± 0.03 ^{A;b;γ}	0.60 ± 0.01 ^{A;b;γ}
C18:3 n3	3.19 ± 0.17	4.43 ± 0.15 ^{a;δ}	4.65 ± 0.27 ^{A;a;δ}	4.63 ± 0.09 ^{A;a;δ}	4.86 ± 0.17 ^{A;a;γ;δ}	4.85 ± 0.00 ^{A;a;γ;δ}
C20:2n6	-	-	-	-	-	-
C20:3n6	-	-	-	-	-	-
C22:1n9	-	0.29 ± 0.01 ^b	0.30 ± 0.05 ^{A;a}	0.24 ± 0.04 ^{A;b}	0.28 ± 0.03 ^{A;a}	0.33 ± 0.02 ^{A;a}
C20:3n3	-	0.41 ± 0.03 ^b	0.56 ± 0.07 ^{C;b;γ}	0.69 ± 0.01 ^{BC;b;γ}	0.76 ± 0.03 ^{B;a;γ}	1.02 ± 0.07 ^{A;a;γ}
C20:4 n6	-	0.41 ± 0.04 ^a	0.45 ± 0.05 ^{AB;a}	0.33 ± 0.05 ^{B;b}	0.51 ± 0.05 ^{A;a}	0.38 ± 0.06 ^{AB;a}
C24:0	-	0.50 ± 0.07 ^b	0.59 ± 0.02 ^{C;b}	0.84 ± 0.09 ^{B;a;γ}	1.02 ± 0.02 ^{AB;a;γ}	1.17 ± 0.11 ^{A;a;γ}
C20:5 n3	-	1.00 ± 0.06 ^b	1.23 ± 0.07 ^{BC;b}	1.49 ± 0.23 ^{B;b;γ}	1.93 ± 0.02 ^{A;b;γ}	2.09 ± 0.10 ^{A;b;γ}
C24:1n9	-	-	-	-	-	-
C22:6 n3	-	0.88 ± 0.05 ^b	1.07 ± 0.21 ^{BC;b}	1.38 ± 0.10 ^{B;b;γ}	1.38 ± 0.10 ^{B;b;γ}	1.71 ± 0.00 ^{A;b;γ}
ΣAG	92.66 ± 1.80	74.77 ± 5.64 ^{a;δ}	87.13 ± 3.08 ^{A;a;γ}	89.72 ± 2.76 ^{A;a;γ}	90.49 ± 1.77 ^{A;a;γ}	93.61 ± 0.88 ^{A;a;γ}
ΣAGS	13.79 ± 1.13	14.48 ± 0.61 ^b	14.94 ± 0.42 ^{C;b}	15.89 ± 1.19 ^{BC;b;δ}	17.00 ± 0.68 ^{AB;b;δ;γ}	18.80 ± 0.10 ^{A;b;δ;γ}

Σ AGM	27.61 ± 0.02	22.23 ± 0.60 ^{b;δ}	23.90 ± 0.97 ^{A;a;δ;γ}	24.25 ± 0.36 ^{A;a;δ;γ}	25.26 ± 0.05 ^{A;b;δ;γ}	25.43 ± 0.59 ^{A;b;δ;γ}
Σ AGPI	51.26 ± 0.83	38.06 ± 5.55 ^{a;δ}	48.29 ± 2.32 ^{A;a;γ}	49.58 ± 2.21 ^{A;a;γ}	48.22 ± 2.26 ^{A;a;γ}	49.38 ± 1.09 ^{A;a;γ}
Σ UFA	78.88 ± 0.82	60.29 ± 5.08 ^{a;δ}	72.19 ± 2.68 ^{A;a;δ;γ}	73.83 ± 1.92 ^{A;a;γ}	73.49 ± 2.23 ^{A;a;γ}	74.81 ± 0.79 ^{A;a;γ}
$\Sigma\omega 3$	3.19 ± 0.17	6.72 ± 0.08 ^{b;δ}	7.52 ± 0.17 ^{C;b;δ;γ}	7.97 ± 0.22 ^{C;b;δ;γ}	8.93 ± 0.26 ^{B;b;δ;γ}	9.67 ± 0.06 ^{A;b;δ;γ}
$\Sigma\omega 6$	48.07 ± 0.69	31.34 ± 5.62 ^{a;δ}	40.77 ± 2.20 ^{A;a;δ;γ}	41.61 ± 2.12 ^{A;a;γ}	39.30 ± 2.09 ^{AB;a;δ;γ}	39.71 ± 1.16 ^{A;a;δ;γ}
$\omega 3/\omega 6$	0.07 ± 0.00	0.22 ± 0.04 ^{b;δ}	0.185 ± 0.01 ^{B;b;δ}	0.19 ± 0.01 ^{B;b;δ}	0.23 ± 0.01 ^{AB;b;δ}	0.24 ± 0.01 ^{A;b;δ}
Σ Trans	-	0.42 ± 0.06 ^b	0.40 ± 0.03 ^{AB;b}	0.33 ± 0.05 ^{AB;b}	0.30 ± 0.04 ^{B;b;γ}	0.28 ± 0.02 ^{B;b;γ}
Σ EPA+DHA	-	1.88 ± 0.11 ^b	2.31 ± 0.25 ^{C;b;γ}	2.66 ± 0.15 ^{C;b;γ}	3.31 ± 0.12 ^{B;b;γ}	3.80 ± 0.10 ^{A;b;γ}

*PP = pimenta rosa; FA = ácidos graxos; AGS = ácidos graxos saturados; AGM = ácidos graxos monoinsaturados; AGPI = ácidos graxos poliinsaturados; AGI = ácidos graxos insaturados; EPA = ácido eicosapentaenóico; DHA = ácido docosahexaenóico. Os valores representam médias ± desvio padrão em triplicado. Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas entre amostras com diferentes concentrações de pimenta rosa pelo teste de Tukey. Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as amostras de sardinhas e líquidos de cobertura na mesma concentração de pimenta rosa pelo teste t de Student não pareado. Sardinha: "α" indica diferenças significativas em comparação com "Controle" e "β" indica diferenças significativas em comparação com "Crua" pelo teste de Dunnett. Líquido de cobertura: "γ" indica diferenças significativas em comparação com "Controle" e "δ" indica diferenças significativas em comparação com "Crua" pelo teste de Dunnett.

A autoxidação é o principal mecanismo descrito para a oxidação de ácidos graxos em alimentos, que ocorre quando os ácidos graxos insaturados reagem com o oxigênio molecular por meio de um mecanismo de radicais livres na presença de iniciadores. Os radicais livres são formados pela abstração de hidrogênio durante a fase de iniciação. Portanto, como o aquecimento reduz a energia de ativação necessária para a captação de hidrogênio, ele acelera a reação em cadeia de gorduras insaturadas durante a oxidação, que pode estar ligada à degradação de ácidos graxos durante o enlatamento (DANTAS et al., 2021; MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2017).

Por outro lado, os teores de AGPIs nas sardinhas controle aumentaram após o enlatamento. Ao considerar cada ácido graxo, é possível observar que o ácido linoleico foi o principal contribuinte para a maior quantidade de AGPIs determinados após o enlatamento. Como o ácido linoleico é o principal ácido graxo presente no óleo de soja, isso pode indicar a absorção de ácidos graxos do líquido de cobertura pelo músculo do peixe, resultando em alterações no perfil lipídico do peixe, o que concorda com outros estudos (DANTAS et al. , 2021; GÓMEZ-LIMIA et al., 2020; Mesías et al., 2015).

Mesías et al. (2015) estudaram atum enlatado conservado em diferentes líquidos de cobertura (salmoura, óleo de girassol e azeite de oliva) e avaliaram maiores teores de ácido linoleico no atum em óleo de girassol, que apresenta o ácido linoleico como seu principal ácido graxo. A contribuição do líquido de cobertura para os lipídios do atum também foi demonstrada por Dantas et al. (2021). Os autores avaliaram diferentes marcas de atum enlatado em salmoura e óleo de soja e encontraram maiores teores de ácido linoleico no atum enlatado em óleo (de 39,03 a 46,49 g/100 g de óleo) do que em salmoura (de 1,62 a 1,72 g/100 g de óleo), revelando a migração do ácido linoleico do óleo do músculo do peixe.

Em relação aos efeitos do processo de enlatamento nos líquidos de cobertura, foram observadas mudanças significativas nos níveis de AGMs e AGPIs, que diminuíram em aproximadamente 19% e 26%, respectivamente ($p < 0,05$). Isso pode ser atribuído tanto à degradação quanto à migração de ácidos graxos. A quantidade de AGMs diminuiu nas sardinhas e nos líquidos de cobertura após o enlatamento, indicando um processo de degradação. Ao contrário, os teores de AGPIs aumentaram nas sardinhas e diminuíram nos líquidos de cobertura, destacando a migração. O nível de ácido linoleico foi menor nos líquidos de cobertura após o enlatamento, o que reforça o princípio de que os ácidos graxos migraram do líquido de cobertura para o músculo.

Além disso, os líquidos de coberturas após o enlatamento apresentaram ácidos graxos que não foram encontrados antes do enlatamento e que são típicos de espécies de peixes, como EPA e DHA. Este fato demonstra a migração de ácidos graxos do músculo do peixe para o líquido de cobertura, sugerindo que as perdas de ácidos graxos das sardinhas após o enlatamento estão relacionadas não apenas aos processos oxidativos, mas também à migração. Portanto, o enlatamento pode comprometer os teores de EPA e DHA nos peixes enlatados, reduzindo seu valor nutricional, uma vez que esses ácidos graxos essenciais são conhecidos por seu potencial para reduzir os riscos de vários distúrbios inflamatórios, metabólicos e neurológicos (DJURICIC; CALDER, 2021).

Nas amostras adicionadas de pimenta rosa, os níveis de AGSs, AGMs e AGPIs nas sardinhas variaram da seguinte forma: de $25,33 \pm 0,96$ a $26,89 \pm 1,29$ g/100 g de óleo (AGS), de $25,09 \pm 0,40$ a $28,35 \pm 1,35$ g/100 g óleo (AGMs) e de $38,70 \pm 0,56$ a $40,18 \pm 1,40$ g/100 g de óleo (AGPIs). Os resultados obtidos para as amostras tratadas com pimenta rosa não foram estatisticamente diferentes dos encontrados nas amostras controle para AGSs e AGPIs ($p > 0,05$). No entanto, maiores teores de AGMs ($p < 0,05$) foram determinados nas amostras com 0,5, 0,75 e 1,0% de pimenta rosa em comparação com as amostras de controle. Em relação à soma de EPA e DHA, a adição de pimenta rosa não afetou os resultados em relação às amostras controle ($p > 0,05$).

Em líquidos de cobertura tratados com pimenta rosa, foram determinados maiores teores de AGSs ($14,94 \pm 0,42 - 18,80 \pm 0,10$ g/100 g de óleo), AGMs ($23,90 \pm 0,97 - 25,43 \pm 0,59$ g/100 g de óleo) e AGPIs ($48,22 \pm 2,26 - 49,58 \pm 2,21$ g/100 g de óleo) em comparação ao controle ($p < 0,05$). Esses resultados sugerem o efeito protetor da pimenta rosa. Para os AGPIs, o nível de ácido linoleico, que é o AGPI mais relevante, no líquido de cobertura das amostras com pimenta rosa aumentou, em comparação com as amostras controle. No entanto, a concentração de ácido linoleico não diminuiu nas sardinhas, mostrando que a adição de pimenta rosa não influenciou na migração. Assim, as maiores quantidades de AGPIs encontradas nos líquidos de cobertura contendo pimenta rosa podem estar ligadas ao efeito antioxidante promovido pela fruta. Além disso, a soma de EPA e DHA também apresentou valores superiores nas amostras contendo o antioxidante natural ($2,31 \pm 0,25 - 3,80 \pm 0,10$ g/100 g de óleo) do que no controle ($1,88 \pm 0,11$ g/100 g de óleo).

A literatura tem demonstrado que o líquido de cobertura aplicado em conservas influencia diretamente na oxidação lipídica, proporcionando um ambiente pró-oxidante ou antioxidante dependendo de sua composição (ATITALLAH et al., 2019; BARBOSA et al., 2019; DANTAS et al., 2021; GÓMEZ-LIMIA et al., 2020; MEDINA et al., 1998). Assim, potencializar o líquido de cobertura com fontes de compostos antioxidantes representa uma estratégia promissora para controlar ou retardar processos oxidativos.

Barbosa et al. (2019) descreveram o efeito protetor da adição de extratos de algas, que contêm constituintes químicos com potenciais propriedades antioxidantes, ao líquido de cobertura sobre a fração lipídica da cavala enlatada (*Scomber colias*). De acordo com Atitallah et al. (2019), hambúrgueres de peixe enlatados fortificados com microalgas apresentaram maiores atividades de eliminação de DPPH (de 66 a 98%) do que hambúrgueres sem microalgas (40%). Os autores também determinaram pigmentos como carotenóides em microalgas,

associando-os ao aumento do potencial antioxidante de hambúrgueres tratados com antioxidante natural.

3.3.4 Teores de colesterol e óxidos de colesterol nas sardinhas enlatadas e líquidos de cobertura

A sardinha crua apresentou nível de colesterol de $143,02 \pm 10,69$ mg/100 g (base seca) (Tabela 3), inferior ao determinado por Carvalho et al. (2021) (323 mg/100 g). Valores variados podem ser atribuídos a condições ambientais e aspectos genéticos (BANDARRA et al., 2018). Em contraste, o líquido de cobertura avaliado antes do enlatamento não apresentou teor de colesterol detectável.

Após o enlatamento, a quantidade de colesterol nas sardinhas reduziu de $143,02 \pm 10,69$ (sardinha crua) para $85,77 \pm 5,07$ mg/100 g, o que corresponde a uma degradação de 40,03% ($p < 0,05$) (Tabela 3). O colesterol é um componente crucial de vários processos biológicos. No entanto, seu conteúdo pode ser altamente afetado durante o processamento térmico (DE CARVALHO et al., 2021; DE OLIVEIRA et al., 2020a). As altas temperaturas induzem a degradação do colesterol por oxidação e polimerização, resultando na formação de óxidos de colesterol, cetonas, aldeídos, hidrocarbonetos, álcoois e ácidos orgânicos voláteis (DEREWIAKA; MOLÍNSKA, 2015).

O líquido de cobertura também foi avaliado após o enlatamento, apresentando um teor de colesterol de $32,41 \pm 6,19$ mg/100 g (Tabela 3), o que revelou a migração do colesterol do músculo da sardinha para o seu líquido de cobertura. Esse achado está de acordo com Dantas et al. (2021), que avaliaram atum enlatado conservado em salmoura e óleo de soja e encontraram colesterol em seu líquido de cobertura. Assim, neste estudo, o menor nível de colesterol avaliado nas sardinhas após o enlatamento pode ser atribuído tanto à degradação do colesterol quanto à migração para os líquidos de cobertura.

Nas amostras de sardinhas com pimenta rosa, os teores de colesterol variaram de $90,52 \pm 1,27$ a $102,76 \pm 0,13$ mg/100 g, onde os maiores valores foram encontrados quando foram aplicados 0,75 e 1,0% de pimenta. Para os líquidos de cobertura foram avaliados teores de $40,14 \pm 1,06$ a $48,94 \pm 9,46$ mg/100 g (Tabela 3).

Tabela 3: Teores de colesterol (mg/100 g, base seca) e óxidos de colesterol ($\mu\text{g/g}$, base seca) das amostras de sardinhas e líquidos de cobertura pré e pós enlatamento (controle e com pimenta rosa a 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0%).

Sardinhas						
Pré enlatamento		Pós enlatamento				
POCs	Crua	Controle (0.0% PP)	0.25% PP	0.5% PP	0.75% PP	1.0% PP
25-OH	-	38.55 ± 1.22^b	$31.25 \pm 0.36^{B;b;\alpha}$	$23.97 \pm 1.19^{C;b;\alpha}$	$6.07 \pm 0.05^{D;b;\alpha}$	-
5,6α-OH	14.98 ± 0.90	$16.24 \pm 0.26^{a;\beta}$	$15.98 \pm 0.28^{A;a;\beta}$	$15.65 \pm 0.51^{A;a}$	$16.12 \pm 0.15^{A;a}$	$15.87 \pm 0.14^{A;a;\beta}$
5,6 β-OH	3.24 ± 0.50	$8.41 \pm 0.30^{a;\beta}$	$8.56 \pm 0.2^{A;a;\beta}$	$8.14 \pm 0.34^{A;a;\beta}$	$7.22 \pm 0.23^{A;a;\beta}$	$6.94 \pm 1.32^{A;a;\beta}$
7-ceto	-	1.91 ± 0.01^b	$1.70 \pm 0.06^{AB;b}$	$1.92 \pm 0.02^{A;b}$	$1.91 \pm 0.01^{A;b}$	$1.55 \pm 0.20^{B;b;\alpha}$
7α-OH	15.16 ± 0.49	$22.08 \pm 0.88^{b;\beta}$	$18.95 \pm 1.21^{B;b;\alpha;\beta}$	$16.55 \pm 0.59^{B;b;\alpha;\beta}$	$18.36 \pm 1.22^{B;b;\alpha;\beta}$	$17.58 \pm 0.88^{B;\alpha;\beta}$
7β-OH	6.14 ± 1.21	$28.86 \pm 0.79^{a;\beta}$	$16.81 \pm 0.21^{D;a;\alpha;\beta}$	$23.10 \pm 1.27^{B;a;\alpha;\beta}$	$9.78 \pm 0.33^{E;a;\alpha;\beta}$	$19.16 \pm 0.98^{C;\alpha;\beta}$
Total POCs	39.53 ± 2.14	$116.04 \pm 0.78^{b;\beta}$	$93.26 \pm 1.99^{B;b;\alpha;\beta}$	$89.33 \pm 1.02^{C;b;\alpha;\beta}$	$59.46 \pm 0.87^{D;b;\alpha;\beta}$	$61.11 \pm 1.42^{D;b;\alpha;\beta}$
Colesterol	143.02 ± 10.69	$85.77 \pm 5.07^{a;\beta}$	$90.52 \pm 1.27^{BC;a;\beta}$	$93.11 \pm 0.70^{B;a;\alpha;\beta}$	$96.45 \pm 0.17^{AB;a;\alpha;\beta}$	$102.76 \pm 0.13^{A;a;\alpha;\beta}$
Líquidos de cobertura						

POCs	Pré enlatamento	Pós enlatamento				
		Controle (0.0% PP)	0.25% PP	0.5% PP	0.75% PP	1.0% PP
25-OH	-	110.89 ± 0.10 ^a	110.67 ± 2.95 ^{A;a}	106.13 ± 0.01 ^{B;a;γ}	96.15 ± 0.01 ^{D;a;γ}	99.85 ± 0.05 ^{C;γ}
5,6 α -OH	-	5.24 ± 0.33 ^b	5.02 ± 0.26 ^{AB;b}	5.11 ± 0.09 ^{AB;b}	4.38 ± 0.01 ^{B;b;γ}	4.34 ± 0.55 ^{B;b;γ}
5,6 β -OH	-	5.04 ± 0.31 ^b	4.78 ± 0.02 ^{A;b}	4.95 ± 0.14 ^{A;b}	3.31 ± 0.45 ^{B;b;γ}	2.16 ± 0.26 ^{C;b;γ}
7-ceto	-	26.41 ± 0.54 ^a	26.93 ± 1.33 ^{A;a}	24.75 ± 0.24 ^{BC;a;γ}	23.15 ± 0.37 ^{C;a;γ}	25.94 ± 0.19 ^{AB;a}
7 α -OH	-	60.86 ± 0.78 ^a	59.47 ± 2.10 ^{A;a}	54.67 ± 0.11 ^{B;a;γ}	30.00 ± 1.53 ^{C;a;γ}	-
7 β -OH	-	9.85 ± 0.76 ^b	9.28 ± 0.11 ^{B;b}	10.72 ± 0.20 ^{A;b}	7.89 ± 0.01 ^{C;b;γ}	-
Total POCs	-	218.28 ± 1.81 ^a	216.16 ± 3.48 ^{A;a}	206.33 ± 0.45 ^{B;a;γ}	164.88 ± 1.82 ^{C;a;γ}	132.30 ± 0.95 ^{D;a;γ}
Colesterol	-	32.41 ± 6.19 ^b	47.09 ± 3.61 ^{A;b;γ}	48.94 ± 9.46 ^{A;b;γ}	44.28 ± 0.79 ^{AB;b}	40.14 ± 1.06 ^{AB;b}

PP = pimenta rosa. 5,6 α -EP (5,6 α -epoxicolesterol), 5,6 β -EP (5,6 β -epoxicolesterol), 7-ceto (7-cetocolesterol), 7 β -OH (7 β -hidroxicoolesterol), 7 α -OH (7 α -hidroxicoolesterol), 25-OH (25-hidroxicoolesterol). Os valores representam médias \pm desvio padrão em triplicado. Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas entre amostras com diferentes concentrações de pimenta rosa pelo teste de Tukey. Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as amostras de sardinhas e líquidos de cobertura na mesma concentração de pimenta rosa pelo teste t de Student não pareado. Sardinha: "a" indica diferenças significativas em comparação com "Controle" e "b" indica diferenças significativas em comparação com "Crua" pelo teste de Dunnett. Líquido de cobertura: "γ" indica diferenças significativas em comparação com "Controle" e "δ" indica diferenças significativas em comparação com "Crua" pelo teste de Dunnett.

Os seguintes POCs foram identificados em sardinhas cruas: 7α -OH (7α -hidroxicolesterol), 7β -OH (7β -hidroxicolesterol), $5,6\alpha$ -EP ($5,6\alpha$ -epoxicolesterol) e $5,6\beta$ -EP ($5,6\beta$ -epoxicolesterol) (Tabela 3). O principal POC determinado foi 7α -OH ($15,16 \pm 0,49 \mu\text{g/g}$, base seca), seguido por $5,6\alpha$ -EP ($14,98 \pm 0,90 \mu\text{g/g}$) e 7β -OH ($6,14 \pm 1,21 \mu\text{g/g}$), respectivamente. Outros autores também encontraram óxidos de colesterol em sardinhas cruas, o que foi atribuído a processos enzimáticos do metabolismo dos peixes (de Carvalho et al., 2021).

Como observado para o colesterol, os POCs não foram determinados no líquido de cobertura antes do enlatamento. No entanto, após o enlatamento foram identificados POCs em ambos os tipos de amostras, sugerindo a migração de POCs da sardinha para o líquido de cobertura. A quantidade total de POCs no líquido de cobertura foi de $218,28 \pm 1,81 \mu\text{g/g}$.

O enlatamento induziu a formação de POCs em sardinhas sem pimenta rosa. O teor total de POCs aumentou de $39,53 \pm 2,14 \mu\text{g/g}$ (sardinha crua) para $116,04 \pm 0,78 \mu\text{g/g}$ (sardinha controle) ($p < 0,05$). Além dos óxidos de colesterol encontrados nas sardinhas cruas, 25 -OH (25 -hidroxicolesterol) e 7 -ceto (7 -cetocolesterol) foram detectados nas amostras controle após o processamento. Além disso, 25 -OH foi identificado como o POC predominante ($38,55 \pm 1,22 \mu\text{g/g}$), seguido por 7β -OH ($28,86 \pm 0,79 \mu\text{g/g}$) e 7α -OH ($22,08 \pm 0,88 \mu\text{g/g}$).

Estudos têm demonstrado a presença de óxidos de colesterol em conservas de peixe. Zunin, Boggia e Evangelisti (2001) determinaram níveis totais de POCs de $37,7$ a $328,9 \mu\text{g/g}$ em atum enlatado em salmoura, enquanto Dantas et al. (2021) relataram valores de $933,14$ a $1914,23 \mu\text{g/g}$ de $698,24$ a $1167,88 \mu\text{g/g}$ em conservas de atum com salmoura e óleo de soja, respectivamente. Além disso, Dantas et al. (2021) também quantificaram POCs no líquido de cobertura, demonstrando a migração de POCs do músculo do peixe.

A oxidação do colesterol nos alimentos é um processo complexo semelhante à oxidação de ácidos graxos insaturados. Além disso, é influenciada por vários fatores (por exemplo, temperatura, tempo de exposição ao calor, oxigênio, luz, concentração inicial de colesterol, pH, presença de metais e sal) e pode ocorrer por diferentes mecanismos, levando à formação de diferentes POCs em níveis variados (DEREWIAKA; MOLIŃSKA, 2015; MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2017; SMITH, 1987).

A presença de uma ligação dupla entre os carbonos 5 e 6 permite a abstração de hidrogênio alílico em C7, reduzindo a energia de ativação necessária. Assim, 7 -ceto, 7α -OH e 7β -OH são formados. A epoxidação leva à formação de $5,6\alpha$ - e $5,6\beta$ -epoxicolesterol. Além disso, a oxidação da cadeia lateral também pode ocorrer principalmente em C20 e C25, que são

sítios mais reativos, resultando em 20-OH e 25-OH (DEREWIAKA; MOLIŃSKA, 2015; SMITH, 1987).

A adição de pimenta rosa também foi eficaz na redução da formação de POCs nas sardinhas. Enquanto as sardinhas controle apresentaram $116,04 \pm 0,78$ de POCs totais, as amostras com pimenta rosa apresentaram teores variando de $59,46 \pm 0,87$ a $93,26 \pm 1,99$ $\mu\text{g/g}$. O menor valor de POCs totais foi determinado em amostras tratadas com 0,75% de pimenta rosa ($59,46 \pm 0,87$ $\mu\text{g/g}$). No entanto, esse resultado foi semelhante ao observado quando a pimenta rosa foi adicionada a 1,0% ($61,11 \pm 1,42$ $\mu\text{g/g}$) ($p > 0,05$), que foi a maior concentração de pimenta aplicada. Portanto, quanto ao efeito protetor do antioxidante natural contra a formação de POCs em sardinha, quanto maior a concentração de pimenta rosa utilizada maior sua eficácia.

Para os líquidos de cobertura, as quantidades de POCs totais nas amostras tratadas com pimenta rosa variaram de $216,16 \pm 3,48$ a $132,30 \pm 0,95$ $\mu\text{g/g}$. Esses valores foram inferiores ($p < 0,05$) ao determinado na amostra controle ($218,28 \pm 1,81$ $\mu\text{g/g}$), exceto nas amostras tratadas com 0,25% de pimenta. A adição de pimenta rosa reduziu a formação de POCs, refletindo em sua presença nos líquidos de cobertura.

Uma vez que altas temperaturas são aplicadas durante o cozimento e esterilização, estas são as principais etapas do processo envolvidas na formação de POCs em produtos enlatados. No entanto, outros aspectos devem ser considerados. Os metais pesados são fortes indutores de oxidação. Assim, os metais estão presentes em ambos os peixes e podem contribuir para a ocorrência de reações oxidativas (EBOH; MEPBA; EKPO, 2006). A pressão aplicada no sistema da retorta promove então a liberação de água e/ou íons metálicos da hemoproteína, aumentando a taxa de oxidação lipídica no músculo do peixe (Mesías et al., 2015). Além disso, a presença de pró-oxidantes como sal e AGPIs nos líquidos de cobertura não pode ser ignorada (DANTAS et al., 2021).

Os resultados deste estudo demonstraram que as sardinhas enlatadas são fontes exógenas de POCs, que desempenham um papel no desenvolvimento de inúmeras doenças devido aos seus efeitos citotóxicos, aterogênicos, neurodegenerativos, inflamatórios e carcinogênicos (GARCIA-LLATAS et al., 2021; LIU et al., 2021). Portanto, devido aos riscos causados pela ingestão desses produtos oxidados, sua formação deve ser evitada. No entanto, a ingestão de antioxidantes sintéticos, que são os principais aditivos utilizados pela indústria alimentícia para controlar a oxidação, tem sido motivo de crescente preocupação. Assim, como mostrado neste estudo, a formação de POCs em conservas de sardinha pode ser reduzida pela incorporação de fontes naturais de antioxidantes como pimenta rosa durante o enlatamento.

3.4 Migrações dos compostos bioativos da pimenta rosa durante o processamento

Doze compostos foram identificados em pimenta rosa (Seção 3.2); no entanto, nem todos foram detectados nas amostras de sardinhas e líquidos de cobertura (Tabela 4).

Como esperado, tanto as amostras controle de sardinha quanto de líquido de cobertura não apresentaram constituintes de pimenta rosa. Seis compostos (ácido málico, ácido gálico, ácido cítrico, galotanina, 3 α -hidroximasticadienóico, ácido masticadienóico) da pimenta rosa foram determinados em sardinhas enlatadas com o fruto, independentemente do nível adicionado. A hinokiflavona e o ácido triterpeno foram observados apenas nas amostras contendo 1,0% de pimenta rosa, sugerindo que os teores presentes nos demais tratamentos não foram suficientes para indicar uma migração. Além disso, a agatisflavona foi determinada em todos os níveis de adição, exceto em 0,25%.

Em relação aos líquidos de cobertura, foram encontrados oito compostos da pimenta rosa (ácido málico, ácido gálico, ácido cítrico, hinokiflavona, galotanina, 3 α -hidroximasticadienóico, agatisflavona, ácido masticadienóico) quando adicionado 1,0%. No entanto, apenas ácido málico e cítrico foram detectados no tratamento com 0,75%. Cianidina, 7-O-metilpelargonidina 3-O-galactosídeo e tetrahydroamentoflavona não migraram do fruto.

As migrações de compostos bioativos foram mais proeminente nas amostras de sardinhas. Os compostos que migraram para as sardinhas também migraram para os líquidos de cobertura, exceto o ácido triterpeno. Por outro lado, nos líquidos de cobertura, essa migração foi observada apenas nas amostras contendo 1,0% de pimenta. As temperaturas aplicadas durante o enlatamento podem degradar as proteínas do pescado, comprometendo sua integridade estrutural e, conseqüentemente, facilitando a difusão dos compostos para o músculo. Assim, mesmo quando menores concentrações de pimenta rosa foram adicionadas às amostras, a migração ocorreu nos músculos da sardinha.

Também é importante considerar a hidrofiliidade/lipofiliidade dos compostos. Em geral, os compostos hidrofílicos, como os ácidos fenólicos, são praticamente insolúveis em óleo e se distribuem principalmente entre as regiões aquosa e interfacial de um sistema alimentar, enquanto os antioxidantes hidrofóbicos são insolúveis em água e se distribuem principalmente entre o óleo e as regiões interfaciais (FREIRÍA-GÁNDARA et al., 2018). No entanto, devido à variedade de estruturas químicas de compostos de ocorrência natural, a natureza hidrofílica e lipofílica de um determinado grupo de compostos não pode ser determinada de forma inequívoca.

Tabela 4: Migrações dos compostos bioativos de pimenta rosa para sardinhas e líquidos de cobertura.

Amostras enlatadas												
Bioactive compound	Sardinhas						Líquidos de cobertura					
	Pimenta rosa (PP)		Controle	0.25% PP	0.5% PP	0.75% PP	1.0 % PP	Control	0.25% PP	0.5% PP	0.75% PP	1.0% PP
	rosa	Controle										
Ácido Málico (m/z 133)	x	-	x	x	x	x	-	-	-	x	x	
Ácido Gálico (m/z 169)	x	-	x	x	x	x	-	-	-	-	x	
Ácido Cítrico (m/z 191)	x	-	x	x	x	x	-	-	-	x	x	
7-O-methylpelargonidin 3-O-galactoside (m/z 447)	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cianidino (m/z 287)	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hinokiflavona (m/z 133)	x	-	-	-	-	x	-	-	-	-	x	

Galotanino (m/z 133)	X	-	X	X	X	X	-	-	-	-	X
Tetra-hidroamentoflavona (m/z 541)	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3α- Hidroimasticadienolico (schinol) (m/z 455)	X	-	X	X	X	X	-	-	-	-	X
Agatisflavona (m/z 537)	X	-	-	X	X	X	-	-	-	-	X
Ácido triterpeno (m/z 469)	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-
Ácido masticadienóico (m/z 453)	X	-	X	X	X	X	-	-	-	-	X

PP = Pimenta rosa. "X" indica a presença do composto bioativo na amostra correspondente. "-" indica ausência do composto bioativo na amostra correspondente.

Além disso, a distribuição de compostos em um meio também depende das condições ambientais particulares (FREIRÍA-GÁNDARA et al., 2018). Moléculas distintas de uma mistura de compostos antioxidantes podem interagir com os constituintes dos alimentos de diferentes maneiras. Assim, mais estudos devem ser realizados para elucidar o comportamento de cada composto em um sistema alimentar como o peixe enlatado.

No entanto, a maioria dos compostos bioativos encontrados na pimenta rosa pertence a grupos hidrofílicos. Portanto, como a oxidação lipídica ocorre na interface água-músculo, devido à alta concentração de oxigênio e pró-oxidantes, o efeito antioxidante da pimenta rosa pode estar relacionado à migração de seus compostos hidrofílicos para essa região.

Segundo Medina e Cols. (1998), o atum enlatado em óleos vegetais apresentou menores taxas de oxidação do que o atum em salmoura, o que foi atribuído à migração de fenóis hidrofílicos dos óleos para a interface água-músculo. Além disso, também observaram interações entre proteínas do atum e compostos fenólicos, ressaltando a importância de avaliar as propriedades antioxidantes dos complexos formados.

Em relação aos compostos que não migraram da pimenta rosa, vários aspectos podem prejudicar sua difusão a partir do fruto (por exemplo, peso molecular, solubilidade, polaridade, arranjo molecular de estruturas, impedimento estérico), sugerindo mais estudos para entender melhor os mecanismos envolvidos em sua migração.

3.5 Análise de componente principal

Os dois primeiros componentes principais (PCs) explicam ~ 73% da variabilidade dos dados (Dim 1: 68,5 %, Dim 2: 18,4 %) (Figuras 12a e 12b), o que pode ser considerado adequado para explicar a variância dos dados experimentais. As sardinhas enlatadas com 0,75 e 1,0% de pimenta rosa (Figura 1a) foram caracterizadas por maiores níveis de colesterol (Figura 1b), sugerindo o efeito protetor da pimenta rosa contra a degradação do colesterol.

Em relação às correlações (Figura 12c), os AGPIs apresentaram forte correlação positiva com $\Sigma n6$ (0,96), o que pode ser atribuído principalmente aos altos teores de ácido linoleico (C18:2n6c) presente nos líquidos de cobertura que também migraram para as sardinhas. Uma forte correlação positiva também foi observada para $\Sigma n3$ vs a soma de EPA e DHA (0,98). Os POCs totais mostraram correlação positiva moderada com 7-ceto (0,88) e correlação negativa com a soma de EPA e DHA (-0,61).

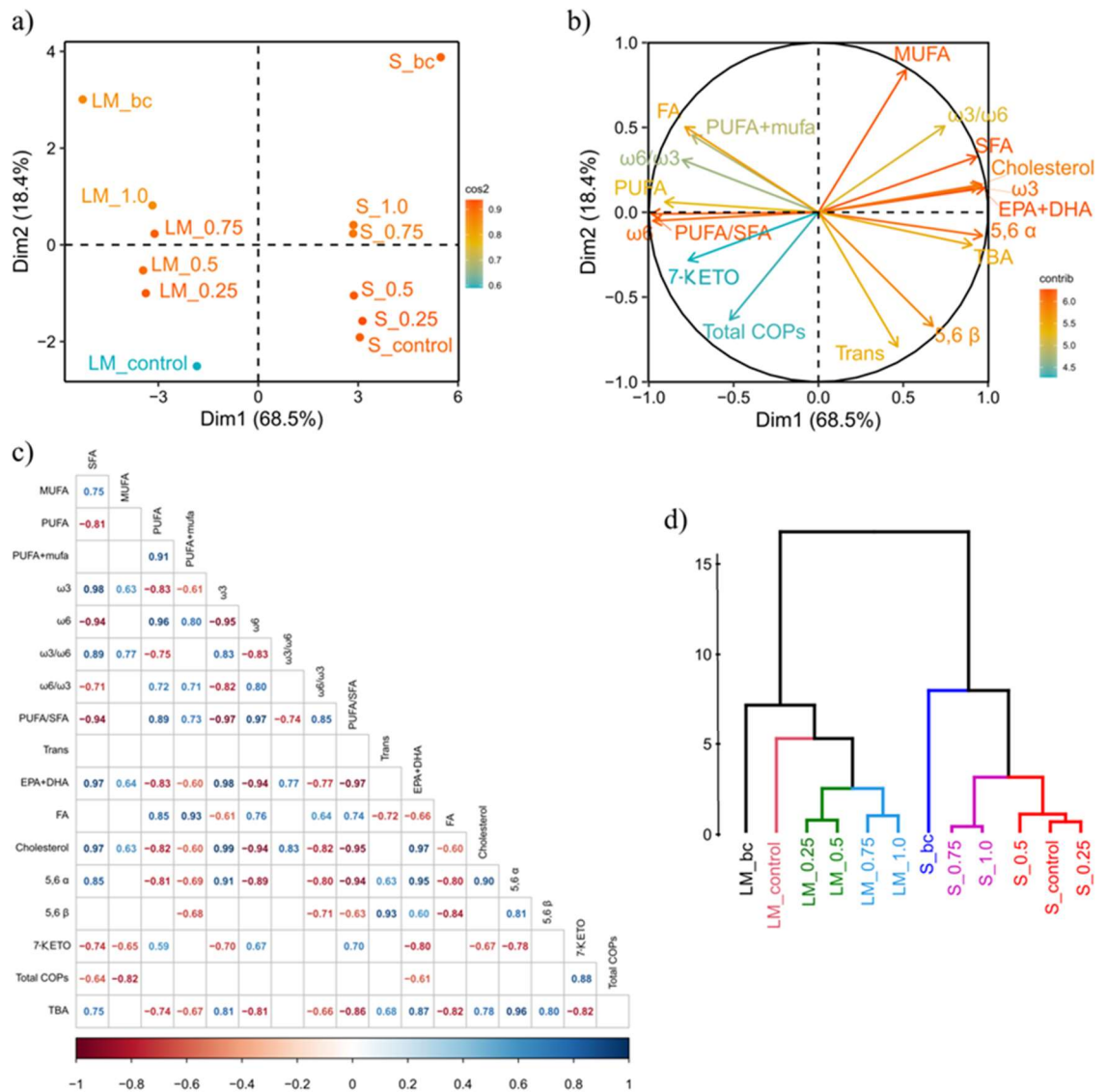


Figura 12: PP = pimenta rosa. Os valores representam médias \pm desvio padrão em triplicado. Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas entre amostras com diferentes concentrações de pimenta rosa pelo teste de Tukey. Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as amostras de sardinhas e líquidos de cobertura na mesma concentração de pimenta rosa pelo teste t de Student não pareado. Sardinha: "α" indica diferenças significativas em comparação com "Controle" e "β" indica diferenças significativas em comparação com "Crua" pelo teste de Dunnett. Líquido de cobertura: "γ" indica diferenças significativas em comparação com "Controle" e "δ" indica diferenças significativas em comparação com "Crua" pelo teste de Dunnett.

Em geral, a Figura 12d mostra quatro grupos formados de acordo com suas semelhanças. O primeiro grupo apresenta apenas o líquido de cobertura avaliado antes do enlatamento (LM_bc), indicando a composição distinta desta amostra (por exemplo, não continha colesterol e POCs). As amostras de líquidos de cobertura avaliadas após enlatamento sem pimenta rosa (LM_controle) e tratadas com o antioxidante natural (LM_0,25, LM_0,5, LM_0,75; LM_1,0) formaram o segundo grupo. O terceiro grupo é composto por amostras de sardinhas antes do enlatamento (S_bc, sardinha crua), enquanto o quarto é formado por sardinhas enlatadas (S_controle, S_0.25, S_0.5, S_0.75, S_1.0).

Além disso, as amostras podem ser divididas em sete subgrupos (um por cor na Figura 12d). A existência de grupos diferentes para cada tipo de amostra (sardinha e líquido de cobertura) contendo apenas a amostra avaliada antes do enlatamento demonstra a grande influência do enlatamento na composição lipídica das amostras. Além disso, no grupo formado pelas conservas de sardinha, as amostras com 0,75 e 1,0% de pimenta rosa podem ser separadas em um subgrupo, sugerindo os efeitos da adição de pimenta rosa nessas concentrações.

4. Conclusões

Este estudo mostrou o impacto do enlatamento nos lipídios das conservas de sardinha. O processamento induziu a oxidação lipídica, que foi comprovada pela formação de malondialdeído e pela degradação de ácidos graxos. Além disso, os resultados revelaram uma troca de ácidos graxos, colesterol e POCs entre o músculo do peixe e o líquido de cobertura. O líquido de cobertura apresentou forte influência no perfil de ácidos graxos das sardinhas, o que se refletiu nos altos teores de ácido linoleico encontrados nas conservas de sardinha. O enlatamento induziu a formação de POCs; no entanto, a adição de pimenta rosa minimizou a oxidação do colesterol. O potencial protetor da pimenta rosa pode estar ligado à capacidade antioxidante de seu extrato e de seus compostos bioativos. Análises de UHPLC-ESI-MS mostraram que alguns constituintes da pimenta rosa migraram para a sardinha, sugerindo seu papel contra a oxidação do colesterol. Assim, os achados deste estudo indicam o potencial uso da pimenta rosa como aditivo natural durante o enlatamento de sardinhas, contribuindo para a manutenção da qualidade nutricional das conservas de peixe. No entanto, mais estudos sobre as condições de processamento e aspectos sensoriais devem ser realizados para subsidiar seu uso pela indústria de conservas.

Conflitos de interesse

Os autores declararam que não há conflitos de interesse.

Reconhecimentos

Os autores agradecem ao Natl. Fundação Brasileira de Amparo à Pesquisa (CAPES) pela bolsa e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) 2008/58035-6 para uso do equipamento UHPLC-MS. Além disso, os autores agradecem à indústria Nova Piracema (São Gonçalo, Rio de Janeiro, Brasil) e sua técnica responsável, a veterinária Claudia Fabiana Augusto Magalhães, pelo apoio na produção das amostras.

Referências

- AOAC (2006). Association of Official Analytical Chemists. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Washington, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Atitallah, A. B., Barkallah, M., Hentati, F., Dammak, M., Hlima, H. B., Fendri, I., ... & Abdelkafi, S. (2019). Physicochemical, textural, antioxidant and sensory characteristics of microalgae-fortified canned fish burgers prepared from minced flesh of common barbel (*Barbus barbus*). *Food Bioscience*, *30*, 100417.
- Bandarra, N. M., Marçalo, A., Cordeiro, A. R., & Pousão-Ferreira, P. (2018). Sardine (*Sardina pilchardus*) lipid composition: Does it change after one year in captivity?. *Food Chemistry*, *244*, 408-413.
- Barbosa, R. G., Trigo, M., Campos, C. A., & Aubourg, S. P. (2019). Preservative Effect of Algae Extracts on Lipid Composition and Rancidity Development in Brine-Canned Atlantic Chub Mackerel (*Scomber colias*). *European Journal of Lipid Science and Technology*, *121*(8), 1900129.
- Bernardes, N. R., Heggdorne-Araújo, M., Borges, I. F., Almeida, F. M., Amaral, E. P., Lasunskiaia, E. B., ... & Oliveira, D. B. (2014). Nitric oxide production, inhibitory, antioxidant and antimycobacterial activities of the fruits extract and flavonoid content of *Schinus terebinthifolius*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *24*, 644-650.
- Dantas, N. M., de Oliveira, V. S., Sampaio, G. R., Chrysostomo, Y. S. K., Chávez, D. W. H., Gamallo, O. D., ... & Saldanha, T. (2021). Lipid profile and high contents of cholesterol

oxidation products (COPs) in different commercial brands of canned tuna. *Food Chemistry*, 352, 129334.

de Araujo Gomes, R. B., de Souza, E. S., Barraqui, N. S. G., Tosta, C. L., Nunes, A. P. F., Schuenck, R. P., ... & Kuster, R. M. (2020). Residues from the Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolia* Raddi) processing industry: Chemical profile and antimicrobial activity of extracts against hospital bacteria. *Industrial Crops and Products*, 143, 111430.

de Carvalho, I. O. A. M., de Oliveira, V. S., Chávez, D. W. H., Gamallo, O. D., Castro, R. N., Sawaya, A. C. H. F., ... & Saldanha, T. (2021). The use of lemon juice and its role on polyunsaturated fatty acids and cholesterol oxides formation in thermally prepared sardines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 104, 104087.

de Oliveira, V. S., Cháves, D. W. H., Gamallo, O. D., Sawaya, A. C. H. F., Sampaio, G. R., Castro, R. N., ... & Saldanha, T. (2020a). Effect of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) fruit against polyunsaturated fatty acids and cholesterol thermo-oxidation in model systems containing sardine oil (*Sardinella brasiliensis*). *Food Research International*, 132, 109091.

de Oliveira, V. S., Augusta, I. M., da Conceicao Braz, M. V., Riger, C. J., Prudêncio, E. R., Sawaya, A. C. H. F., ... & Saldanha, T. (2020). Aroeira fruit (*Schinus terebinthifolius* Raddi) as a natural antioxidant: Chemical constituents, bioactive compounds and *in vitro* and *in vivo* antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 315, 126274.

Derewiaka, D., & Molińska, E. (2015). Cholesterol transformations during heat treatment. *Food Chemistry*, 171, 233-240.

Djuricic, I., & Calder, P. C. (2021). Beneficial outcomes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on human health: An update for 2021. *Nutrients*, 13(7), 2421.

Eboh, L., Mepba, H. D., & Ekpo, M. B. (2006). Heavy metal contaminants and processing effects on the composition, storage stability and fatty acid profiles of five common commercially available fish species in Oron Local Government, Nigeria. *Food Chemistry*, 97(3), 490-497.

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

Farhoosh, R., & Nyström, L. (2018). Antioxidant potency of gallic acid, methyl gallate and their combinations in sunflower oil triacylglycerols at high temperature. *Food Chemistry*, 244, 29-35.

Fernández-Fernández, R., López-Martínez, J. C., Romero-González, R., Martínez-Vidal, J. L., Flores, M. I. A., & Frenich, A. G. (2010). Simple LC–MS determination of citric and malic acids in fruits and vegetables. *Chromatographia*, 72(1), 55-62.

- Feuereisen, M. M., Zimmermann, B. F., Schulze-Kaysers, N., & Schieber, A. (2017). Differentiation of Brazilian peppertree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) and Peruvian peppertree (*Schinus molle* L.) fruits by UHPLC–UV–MS analysis of their anthocyanin and biflavonoid profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(26), 5330-5338.
- Freiría-Gándara, J., Losada-Barreiro, S., Paiva-Martins, F., & Bravo-Díaz, C. (2018). Enhancement of the antioxidant efficiency of gallic acid derivatives in intact fish oil-in-water emulsions through optimization of their interfacial concentrations. *Food & Function*, *9*(8), 4429-4442.
- García-Llatas, G., Mercatante, D., López-García, G., & Rodríguez-Estrada, M. T. (2021). Oxysterols—how much do we know about food occurrence, dietary intake and absorption?. *Current Opinion in Food Science*, *41*, 231-239.
- Gómez-Limia, L., Cobas, N., Franco, I., & Martínez-Suárez, S. (2020). Fatty acid profiles and lipid quality indices in canned European eels: Effects of processing steps, filling medium and storage. *Food Research International*, *136*, 109601.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology*, *94*(3), 651-715.
- Koh, K., Youn, J. E., & Kim, H. S. (2014). Identification of anthocyanins in black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) varieties. *Journal of Food Science and Technology*, *51*(2), 377-381.
- Kozłowska, M., & Gruczyńska, E. (2018). Comparison of the oxidative stability of soybean and sunflower oils enriched with herbal plant extracts. *Chemical Papers*, *72*(10), 2607-2615.
- Liu, Y., Yang, X., Xiao, F., Jie, F., Zhang, Q., Liu, Y., ... & Lu, B. (2021). Dietary cholesterol oxidation products: Perspectives linking food processing and storage with health implications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.
- MAPA (2020). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Tarifa de importação de sardinha é eliminada por um ano. Available from: <https://agroemdia.com.br/2019/02/09/tarifa-de-importacao-de-sardinha-e-eliminada-por-um-ano>. Accessed December 21, 2021.
- Mariutti, L. R., & Bragagnolo, N. (2017). Influence of salt on lipid oxidation in meat and seafood products: A review. *Food Research International*, *94*, 90-100.
- Medina, I., Sacchi, R., Biondi, L., Aubourg, S. P., & Paolillo, L. (1998). Effect of packing media on the oxidation of canned tuna lipids. Antioxidant effectiveness of extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(3), 1150-1157.
- Menezes, J. C., & Campos, V. R. (2021). Natural biflavonoids as potential therapeutic agents against microbial diseases. *Science of The Total Environment*, *769*, 145168.

- Mesías, M., Holgado, F., Sevenich, R., Briand, J. C., Márquez Ruiz, G., & Morales, F. J. (2015). Fatty acids profile in canned tuna and sardine after retort sterilization and high pressure thermal sterilization treatment. *Journal of Food and Nutrition Research*, 54(2), 171–178.
- Naseri, M., & Rezaei, M. (2012). Lipid changes during long-term storage of canned sprat. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 21(1), 48-58.
- Naseri, M., Rezaei, M., Moieni, S., Hosseini, H., & Eskandari, S. (2011). Effects of different filling media on the oxidation and lipid quality of canned silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *International Journal of Food Science & Technology*, 46(6), 1149-1156.
- Oliveira, J. R., Ribeiro, G. H., Rezende, L. F., & Fraga-Silva, R. A. (2021). Plant terpenes on treating cardiovascular and metabolic disease: a review. *Protein and Peptide Letters*, 28(7), 750-760.
- Russo, D., Balistreri, C., Tapanes-Castillo, A., & Pina, M. Preliminary Antioxidant Activity Analysis of Brazilian Pepper Tree (*Schinus terebinthifolius*) Extracts via TLC, FRAP, and DPPH. *International Conference Series on Multidisciplinary Sciences*, 1, 1-3.
- Santos, C. C., Muñoz, P., Almeida, Á. M. A., de Lima David, J. P., David, J. M., Costa, S. L., ... & Silva, V. D. A. (2020). The Flavonoid agathisflavone from *Poincianella pyramidalis* prevents aminochrome neurotoxicity. *Neurotoxicity Research*, 38(3), 579-584.
- Serrano-León, J. S., Bergamaschi, K. B., Yoshida, C. M., Saldaña, E., Selani, M. M., Rios-Mera, J. D., ... & Contreras-Castillo, C. J. (2018). Chitosan active films containing agro-industrial residue extracts for shelf life extension of chicken restructured product. *Food Research International*, 108, 93-100.
- Smith, L. L. (1987). Cholesterol autoxidation 1981–1986. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44(2-4), 87-125.
- Teles, A. S., Chávez, D. W., Oliveira, R. A., Bon, E. P., Terzi, S. C., Souza, E. F., ... & Tonon, R. V. (2019). Use of grape pomace for the production of hydrolytic enzymes by solid-state fermentation and recovery of its bioactive compounds. *Food Research International*, 120, 441-448.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 669-675.
- Zarandona, I., Puertas, A. I., Dueñas, M. T., Guerrero, P., & de la Caba, K. (2020). Assessment of active chitosan films incorporated with gallic acid. *Food Hydrocolloids*, 101, 105486.

Zunin, P., Boggia, R., & Evangelisti, F. (2001). Identification and quantification of cholesterol oxidation products in canned tuna. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(10), 1037-1040.

CONCLUSÕES GERAIS

Este estudo avaliou a oxidação dos lipídios em sardinhas (*sardina pilchardus*) enlatadas e adicionadas de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) como antioxidante natural. Neste contexto, foi determinado o efeito da adição da pimenta rosa a 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0% e controle (sem adição da pimenta), frente a oxidação lipídica em sardinhas enlatadas com líquido de cobertura em óleo vegetal (óleo de soja) durante o processo de apertização das mesmas.

Os dados obtidos neste estudo apontam que as altas temperaturas utilizadas durante a apertização gerou um considerável impacto nos lipídios das conservas. Maiores valores de TBARS foram determinados após o enlatamento, o que reflete a ocorrência de processos oxidativos e formação de produtos secundários da oxidação lipídica, como o malondialdeído.

O processo de apertização também modificou a concentração de ácidos graxos nas sardinhas, diminuindo seus teores de AGSs, AGMs e a soma dos conteúdos de EPA e DHA, contudo houve um aumento quantidade de AGPIs. O ácido linoleico é o principal ácido graxo presente no óleo de soja, foi o principal contribuinte para a maior quantidade de AGPIs, o que indica a absorção de ácidos graxos do líquido de cobertura pelo músculo do peixe.

Nos líquidos de cobertura, houve diminuição dos teores de AGMs e AGPIs, que pode ser atribuído tanto à degradação quanto à migração de ácidos graxos. O nível de ácido linoleico foi menor nos líquidos de cobertura após o enlatamento, o que reforça o princípio de que os ácidos graxos migraram do líquido de cobertura para o músculo. Além disso, os líquidos de cobertura após o enlatamento apresentaram ácidos típicos de espécies de peixes, como EPA e DHA. Este fato demonstra a migração de ácidos graxos do músculo do peixe para o líquido de cobertura, sugerindo que as perdas de ácidos graxos das sardinhas após o enlatamento estão relacionadas não apenas aos processos oxidativos, mas também à migração.

No entanto, maiores teores de AGMs foram determinados nas amostras com 0,5, 0,75 e 1,0% de pimenta rosa em comparação com as amostras de controle. Para os líquidos de cobertura tratados com pimenta rosa, foram observadas maiores quantidades de AGSs, AGMs e AGPIs em comparação ao controle, o que sugere o efeito protetor da pimenta rosa.

Após o enlatamento, a quantidade de colesterol nas sardinhas reduziu, o que também pode ser atribuído tanto à degradação do colesterol quanto à migração para o líquido de cobertura.

Como observado para o colesterol, o estudo sugere que a migração também ocorreu no conteúdo de POCs das sardinhas para os líquidos de cobertura. Contudo, menores valores de POCs totais foram determinados em amostras tratadas com 0,75 e 0,1%.

Os resultados deste estudo demonstraram que as sardinhas enlatadas são fontes exógenas de POCs, que por sua vez, estão relacionados ao desenvolvimento de diversas doenças. Desta forma, devido aos riscos causados pela ingestão desses produtos oxidados, é de extrema importância que sua formação seja inibida.

Doze compostos bioativos foram identificados na pimenta rosa, o que indica seu uso como um potente antioxidante natural. Além disso, os compostos bioativos ácido málico, ácido gálico, ácido cítrico, galotanina, 3 α -hidroximasticadienóico, ácido masticadienóico, foram determinados em sardinhas enlatadas com o fruto. Entretanto, hinokiflavona e o ácido triterpeno foram observados apenas nas amostras contendo a maior porcentagem da pimenta rosa (1,0%), sugerindo que os teores presentes nos demais tratamentos não foram suficientes para indicar uma migração.

A adição da pimenta rosa não interferiu na migração dos lipídios entre as sardinhas em conserva e o líquido de cobertura. Contudo, a adição da mesma nas maiores concentrações (0,75 e 1,0%), apresentou efeito protetor frente a oxidação dos lipídios da conserva, que ocorre principalmente durante a fase de apertização.

Desta forma, o presente estudo sugere o emprego da pimenta rosa como antioxidante natural em conservas de sardinha, indicando que sua adição pode contribuir para produção de um alimento mais seguro e de qualidade elevada. Entretanto, devem ser realizados estudos futuros que avaliem as condições de processamento e aspectos sensoriais, visando sua utilização pela indústria de conservas.

ANEXOS

Material complementar

Tabela 1: Umidade (g/100 g) e teores de lipídios totais (g/100 g, base seca) das amostras de sardinhas antes e após o enlatamento (controle e com pimenta rosa a 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0%).

	Crua	Controle (0.0% PP)	0.25% PP	0.5% PP	0.75% PP	1.0% PP
Umidade (g/100 g)	68.73 ± 0.43	62.73 ± 0.61 ^β	62.49 ± 0.16 ^{c;β}	63.99 ± 0.22 ^{a;α;β}	63.59 ± 0.19 ^{ab;α;β}	63.71 ± 0.24 ^{a;α;β}
Lipídios totais (g/100 g, dry basis)	16.84 ± 0.72	16.23 ± 0.70	16.75 ± 0.34 ^{ab}	16.57 ± 0.31 ^{ab}	17.08 ± 0.63 ^a	15.53 ± 0.54 ^b

PP = pimenta rosa. Os valores representam médias ± desvio padrão em triplicado. Letras diferentes na mesma linha significam resultados estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). "α" indica diferenças significativas em comparação com "Controle" pelo teste de Dunnett. "β" indica diferenças significativas em comparação com "Raw" pelo teste de Dunnett.

Tabela 2: Valores de TBARS (mg MDA/kg) das amostras de sardinhas e líquidos de cobertura pré e pós enlatamento (controle e com pimenta rosa a 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0%).

	Pós enlatamento					
	Pré enlatamento	Controle (0.0% PP)	0.25% PP	0.5% PP	0.75% PP	1.0% PP
Sardinhas	7.98 ± 0.72	13.19 ± 0.17 ^{a;β}	9.92 ± 0.80 ^{B;a;α;β}	9.90 ± 0.06 ^{B;a;α;β}	8.88 ± 0.70 ^{B;a;α;β}	9.62 ± 0.07 ^{B;a;α}
Líquidos de cobertura	1.55 ± 0.14	2.59 ± 0.19 ^{b;δ}	2.54 ± 0.23 ^{A;b;δ}	1.48 ± 0.08 ^{B;b;γ}	1.34 ± 0.24 ^{B;b;γ}	1.66 ± 0.23 ^{B;b;γ}

PP = pimenta rosa. Os valores representam médias ± desvio padrão em triplicado. Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas entre amostras com diferentes concentrações de pimenta rosa pelo teste de Tukey. Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as amostras de sardinhas e líquidos de cobertura na mesma concentração de pimenta rosa pelo teste t de Student não pareado. Sardinha: "α" indica diferenças significativas em comparação com "Controle" e "β" indica diferenças significativas em comparação com "Crua" pelo teste de Dunnett. Líquido de cobertura: "γ" indica diferenças significativas em comparação com "Controle" e "δ" indica diferenças significativas em comparação com "Crua" pelo teste de Dunnett.

