



**Caracterização da fração lipídica de frutos secos  
produzidos com diferentes bioestimuladores: Potencial  
atividade hipocolesterolémica**

**LIEGE AGUIAR PASCOALINO**

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança  
e à Universidade Tecnológica Federal do Paraná para obtenção do  
Grau de Mestre em Engenharia Química*

**Orientação:**

João C.M. Barreira

Admilson L. Vieira

Filipa S. Reis

**Bragança**

**2020**



## **Agradecimentos**

Um trabalho de mestrado realizado em outro país é uma longa viagem que inclui uma trajetória permeada por inúmeros desafios, tristezas, incertezas, alegrias e muitos percalços pelo caminho. Apesar do processo solitário, trilhar este caminho só foi possível com o apoio, energia e força de várias pessoas, indispensáveis para encontrar o melhor rumo em cada momento da caminhada. Agora que o objetivo está próximo, gostaria de agradecer a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Minhas primeiras palavras devem ser dirigidas aos meus supervisores, Doutora Filipa Sofia Dinis Reis, Doutor João Carlos Martins Barreira e Doutor Admilson Lopes Vieira. Obrigada pelo desafio e por todo o apoio e dedicação que vocês sempre demonstraram. Agradeço também a orientação, o conhecimento e a confiança que vocês depositaram em mim. Graças a vocês, amadureci como investigadora e pessoa. Vocês sempre serão referências para mim.

Um agradecimento especial à Doutora Lillian Bouçada de Barros. Obrigada por seguir a minha jornada desde o ponto de partida. Obrigada por estar sempre disponível para mim, mesmo quando parecia impossível. Agradeço não apenas por todo o conhecimento que me transmitiu, mas também pelo privilégio de trabalharmos juntas.

Devo um agradecimento à Doutora Joana Amaral pela disponibilidade e pela paciência em ajudar nos momentos que precisei de suporte.

Gostaria de agradecer à Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR-Londrina) pela oportunidade de realizar este projeto de dupla diplomação e por toda a trajetória que me permitiu chegar até aqui. Aos professores, muito obrigada por todo o conhecimento, disponibilidade e pela amizade que construímos por ter algo tão bonito em comum: o amor pela Engenharia Química.

Não posso deixar de agradecer à minha “mamãe científica”, Doutora Priscila S. Curti. Obrigada por me iniciar na pesquisa, por confiar em mim e por toda a paciência e empenho em várias tardes de trabalho no laboratório. Você me incentivou e aflorou o sentimento de inspiração pela investigação; muito obrigada por isso.

Um profundo agradecimento ao Centro de Investigação de Montanha (CIMO), por permitir o desenvolvimento do meu trabalho nas suas instalações e ao Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada e os seus investigadores e funcionários. Obrigada a todos pela ajuda indispensável no laboratório, obrigada por toda a disponibilidade e carinho.

A todos os meus amigos que, mesmo sem perceber, transformam os dias mais cinzentos nos dias mais incríveis que eu sempre lembrarei e terei guardado no meu coração. Não são os laços de sangue que mantêm uma conexão para a vida, mas o amor. Obrigada por serem a minha família. Obrigada por adivinharem quando eu mais preciso de vocês.

À minha irmã, por seu amor incondicional e pelos conselhos preciosos. Mesmo quando tudo parece entrar em colapso e mesmo longe de mim, você sempre está lá para me encorajar e mostrar que tudo ficará bem. Agradeço por sempre cuidar de mim. Você está sempre em meu coração, baixinha.

À minha avó, minha maior inspiração da vida. Não é possível expressar em poucas linhas o quanto eu te amo e quanta gratidão tenho pelo seu amor incondicional. Meu maior orgulho é realmente ser sua neta. Eu não poderia ter um exemplo melhor para admirar.

Finalmente, algumas palavras a quem dedico esta Dissertação, meus pais. É difícil expressar quanta gratidão há em meu coração por confiarem em mim e me encorajarem a seguir meus sonhos. Obrigada por me fazerem a pessoa que sou hoje e por sempre acreditarem em mim. Se hoje estou prestes a terminar uma fase tão importante da minha vida, é principalmente graças a vocês.

**Resumo**

O colesterol elevado é o principal responsável pelo desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV). Atualmente, o controle dos níveis de colesterol é realizado através de inibição farmacológica da sua síntese endógena e absorção intestinal. Contudo, vários estudos demonstram que a dieta é também um fator essencial na proteção contra o desenvolvimento de DCV. Assim, é aconselhado o consumo de alimentos com potencial hipocolesterolémico. Destes alimentos fazem parte os frutos secos, tais como amêndoas, castanhas do Brasil, avelãs, macadâmias, nozes e pistácios, sendo aconselhada a sua inclusão numa dieta saudável e equilibrada, devido ao seu perfil lipídico, em particular os ácidos gordos poliinsaturados e esteróis. Além do mais, os produtos que derivam de matrizes naturais são considerados menos tóxicos, com reduzidos ou nenhum efeito secundário, quando comparados com os seus análogos sintéticos, constituindo uma potencial fonte de coadjuvantes terapêuticos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades nutricionais (metodologias AOAC), compostos bioativos (ácidos gordos: GC-FID; tocoferóis: HPLC-fluorescência; esteróis: GC-MS; açúcares livres: HPLC-RI) e propriedades hipocolesterolémicas (análise espectrofotométrica) de duas matrizes selecionadas: amêndoa e avelã, após diferentes tratamentos biológicos de suplementação do solo. Os perfis de compostos bioativos lipossolúveis demonstraram elevado potencial para a redução das dislipidemias associadas às DCV, em especial pelos níveis de ácidos gordos insaturados (predomínio de ácido oleico e ácido linoleico) e pelo teor em tocoferóis (com destaque para o  $\alpha$ -tocoferol) e esteróis. Os diferentes bioestimulantes aplicados como tratamentos de suplementação do solo induziram algumas diferenças nos teores de tocoferóis, embora em todos os casos tenha sido validado o potencial de ambos os frutos como alimento funcional com efeitos de prevenção de dislipidemias, bem como uma fonte alternativa de compostos de interesse com aplicabilidade em diferentes indústrias (*e.g.*, alimentar, nutracêuticos, cosméticos).

**Palavras-chave:** ácidos gordos; tocoferóis; fitoesteróis; amêndoa; avelã.

**Abstract**

High cholesterol is primarily responsible for the development of cardiovascular disease (CVD). Currently, cholesterol levels are controlled through pharmacological inhibition of their endogenous synthesis and intestinal absorption. However, several studies demonstrate that diet is also an essential factor in protecting against the development of CVD. Thus, it is advisable to consume foods with hypocholesterolemic potential. These foods include dried fruits, such as almonds, Brazil nuts, hazelnuts, macadamias, walnuts and pistachios, being advised to include them in a healthy and balanced diet, due to their lipid profile, in particular polyunsaturated fatty acids and sterols. Also, products derived from natural matrices are considered less toxic, with little or no side effects, when compared to their synthetic analogs, constituting a potential source of therapeutic adjuvants. Thus, this study aimed to evaluate the nutritional properties (AOAC methodologies), bioactive compounds (fatty acids: GC-FID; tocopherols: HPLC-fluorescence; sterols: GC-MS; free sugars: HPLC-RI) and hypocholesterolaemic properties (spectrophotometric analysis) of two selected matrices: almond and hazelnut, after being submitted to different biological treatments of soil supplementation. The profiles of fat-soluble bioactive compounds showed a high potential for the reduction of CVD-associated dyslipidemia, especially due to the levels of unsaturated fatty acids (predominance of oleic acid and linoleic acid) and the content of tocopherols (with emphasis on  $\alpha$ -tocopherol) and sterols. The different biostimulants applied as soil supplementation treatments caused significant differences in tocopherols content, but the potential of both nuts was proved highly promising as a functional food with capacity to prevent dyslipidemia, and as an alternative source of compounds of interest with applicability in different industries (*e.g.*, food, nutraceuticals, cosmetics).

**Keywords:** fatty acids; tocopherols; phytosterols; almond; hazelnut.

## Índice geral

|  |            |
|--|------------|
| <i>Resumo</i> .....  | <i>iii</i> |
| <i>Abstract</i> .....  | <i>iv</i>  |
| <b>I. Introdução</b> .....   | <b>1</b>   |
| <b>1.1 Frutos secos como alimentos funcionais e fonte de compostos de interesse</b> .....        | <b>2</b>   |
| 1.1.1 Compostos bioativos presentes em frutos secos.....   | 2          |
| <b>1.2 Frutos secos e dislipidemias</b> .....  | <b>9</b>   |
| 1.2.1 Metabolismo do colesterol.....   | 9          |
| 1.2.2 Doenças associadas a elevados níveis de colesterol.....                                    | 10         |
| <b>1.3 Extração e caracterização de compostos bioativos lipídicos de matrizes naturais</b> ..... | <b>13</b>  |
| 1.3.1 Cromatografia gasosa (GC).....   | 14         |
| 1.3.2 Cromatografia líquida (LC).....  | 15         |
| 1.3.3 Espetroscopia.....   | 15         |
| <b>1.4 Avelã e amêndoa: propriedades nutricionais e químicas</b> .....                           | <b>16</b>  |
| <b>1.5 Bioestimulantes como tratamento suplementar do solo</b> .....                             | <b>17</b>  |
| <b>II. Objetivos</b> .....   | <b>19</b>  |
| <b>III. Material e Métodos</b> .....   | <b>20</b>  |
| <b>3.1 Amostras</b> .....  | <b>20</b>  |
| <b>3.2 Valor nutricional dos frutos</b> .....  | <b>21</b>  |
| 3.2.1 Humidade.....  | 21         |
| 3.2.2 Teor em gordura total.....   | 22         |
| 3.2.3 Cinzas.....  | 23         |
| 3.2.4 Proteínas.....   | 23         |
| <b>3.3 Açúcares solúveis</b> .....   | <b>26</b>  |
| <b>3.4 Ácidos gordos</b> .....   | <b>27</b>  |
| <b>3.5 Tocoferóis</b> .....  | <b>28</b>  |
| <b>3.6 Esteróis</b> .....  | <b>29</b>  |
| <b>3.7 Atividade Hipocolesterolémica</b> .....   | <b>30</b>  |
| <b>3.8 Análise Estatística</b> .....   | <b>30</b>  |
| <b>IV. Resultados e Discussão</b> .....  | <b>31</b>  |
| <b>4.1 Avaliação Nutricional</b> .....   | <b>31</b>  |
| <b>4.2 Açúcares Solúveis</b> .....   | <b>33</b>  |
| <b>4.3 Ácidos gordos</b> .....   | <b>34</b>  |
| <b>4.4 Tocoferóis</b> .....  | <b>37</b>  |
| <b>4.5 Esteróis</b> .....  | <b>39</b>  |
| <b>4.6 Atividade Hipocolesterolémica</b> .....   | <b>40</b>  |
| <b>V. Conclusões e perspectivas futuras</b> .....  | <b>41</b>  |
| <b>VI. Referências bibliográficas</b> .....  | <b>43</b>  |

## Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> – Fórmula estrutural do ácido oleico.....   | 4  |
| <b>Figura 2</b> – Fórmula estrutural geral das isoformas da vitamina E (a) Tocoferóis ( $\alpha$ -tocoferol: R1 e R2=CH <sub>3</sub> ; $\beta$ -tocoferol: R1=H e R2=CH <sub>3</sub> ; $\gamma$ -tocoferol: R1=CH <sub>3</sub> e R2=H; $\delta$ -tocoferol: R1 e R2=H) (b) Tocotrienóis ( $\alpha$ -tocotrienol: R1 e R2=CH <sub>3</sub> ; $\beta$ -tocotrienol: R1=H e R2=CH <sub>3</sub> ; $\gamma$ -tocotrienol: R1=CH <sub>3</sub> e R2=H; $\delta$ -tocotrienol: R1 e R2=H)..... | 5  |
| <b>Figura 3</b> - Fórmula estrutural básica de um esteroide.....  | 6  |
| <b>Figura 4</b> - Fórmula estrutural do esterol.....  | 7  |
| <b>Figura 5</b> - Fórmula estrutural de um fitoesterol.....   | 8  |
| <b>Figura 6</b> – Fórmula estrutural do colesterol.....   | 9  |
| <b>Figura 7</b> - Liofilizador utilizado para secagem e determinação de humidade das amostras.....  | 21 |
| <b>Figura 8</b> - Equipamento Soxhlet utilizado na determinação do teor de gordura.....   | 22 |
| <b>Figura 9</b> – Mufla utilizada para incinerar as amostras.....   | 23 |
| <b>Figura 10</b> - Equipamento utilizado na determinação do teor de proteínas (a) (b) e (c) digestor e tubos de digestão (d) equipamento de Kjeldahl.....   | 24 |
| <b>Figura 11</b> – Equipamento HPLC-RI utilizado para separação e identificação de açúcares solúveis.....   | 26 |
| <b>Figura 12</b> - Equipamento GC-FID utilizado para separação e identificação de ácidos gordos.....  | 28 |
| <b>Figura 13</b> – Fórmula estrutural da sacarose.....  | 34 |
| <b>Figura 14</b> - Fórmulas estruturais dos ácidos gordos identificados nos óleos extraídos de amostras de amêndoas e avelãs: (a) ácido palmítico (C16:0), (b) ácido esteárico (C18:0), (c) ácido oleico (C18:1n9), (d) ácido linoleico (C18:2n6).....  | 36 |
| <b>Figura 15</b> – Cromatograma de ácidos gordos para as amostras das linhas de controle de (a) amêndoa (b) avelã; .....  | 37 |
| <b>Figura 16</b> - Fórmulas estruturais dos tocoferóis identificados nos óleos extraídos de amostras de amêndoas e avelãs (a) $\alpha$ -tocoferol (b) $\beta$ -tocoferol (c) $\gamma$ -tocoferol.....   | 39 |

## Índice de Tabelas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> - Matrizes naturais e o potencial hipocolesterolémico .....  | 12 |
| <b>Tabela 2</b> - Composição nutricional média de avelãs e amêndoas obtida na literatura. ....   | 17 |
| <b>Tabela 3</b> - Teores médios dos ácidos gordos maioritários (percentagem relativa) e tocoferóis (mg/100 g) de avelãs e amêndoas obtidos na literatura. .... | 17 |
| <b>Tabela 4</b> - Linhas de tratamento para as amostras de amêndoas. ....  | 20 |
| <b>Tabela 5</b> - Linhas de tratamento para as amostras de avelãs .....  | 20 |
| <b>Tabela 6</b> - Avaliação nutricional das diferentes linhas de tratamento de amêndoas (média±desvio padrão). ....  | 32 |
| <b>Tabela 7</b> - Avaliação nutricional das diferentes linhas de tratamento de avelãs (média±desvio padrão). ....  | 32 |
| <b>Tabela 8</b> - Teor de sacarose (g/100 g pf) das amostras de amêndoas (média±desvio padrão).....  | 33 |
| <b>Tabela 9</b> - Teor de sacarose (g/100 g pf) das amostras de avelãs (média±desvio padrão).....  | 33 |
| <b>Tabela 10</b> - Composição em ácidos gordos (percentagem relativa) do óleo extraído de amostras de amêndoas (média±desvio padrão). ....                     | 36 |
| <b>Tabela 11</b> - Composição em ácidos gordos (percentagem relativa) do óleo extraído de amostras de avelãs (média ± desvio padrão). ....                     | 36 |
| <b>Tabela 12</b> - Teor de tocoferóis (mg/100 g pf) do óleo extraído das amostras de amêndoa (média±desvio padrão).....  | 38 |
| <b>Tabela 13</b> - Teor de tocoferóis (mg/100 g pf) do óleo extraído de amostras de avelãs (média ± desvio padrão) .....                                       | 38 |

**Lista de abreviaturas**

|         |   |
|---------|---|
| AACP    | Produtos Contendo Aminoácidos                           |
| AGMI    | Ácidos Gordos Monoinsaturados                           |
| AGPI    | Ácidos Gordos Poliinsaturados                           |
| AOAC    | <i>Association of Official Analytical Chemists</i>      |
| BSTFA   | N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide               |
| CC      | Cromatografia em Coluna                                 |
| CEC     | Eletrocromatografia Capilar                             |
| CMC     | Concentração Micelar Crítica                            |
| DCC     | Doença Cardíaca Coronária                               |
| DCV     | Doenças Cardiovasculares                                |
| DP      | Desvio Padrão   |
| EI      | Impacto de Eletrões                                     |
| ELSD    | Deteção por Espalhamento de Luz Evaporativo             |
| FID     | Detector de Ionização de Chama                          |
| FUFOSE  | <i>Functional Food Science in Europe</i>                |
| GC      | Cromatografia Gasosa                                    |
| HCP     | Produtos Contendo Hormonas                              |
| HDL     | Lipoproteína de Alta Densidade                          |
| HMGR    | Hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase                   |
| HPLC    | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência                |
| HS      | Substâncias Húmicas                                     |
| IDL     | Lipoproteína de Densidade Intermediária                 |
| IR      | Infravermelho   |
| LDL     | Lipoproteína de Baixa Densidade                         |
| LC      | Cromatografia Líquida                                   |
| MS      | Espectrometria de Massas                                |
| MIM     | Monitorização de Múltiplos Iões                         |
| NMR     | Ressonância Magnética Nuclear                           |
| NP-HPLC | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Normal |
| NPK     | Azoto, Fósforo e Potássio                               |
| PF      | Peso Fresco   |

|         |  |
|---------|--|
| RI      | Índice de Refração                                       |
| RP-HPLC | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa |
| SFE     | Extração com Fluido Supercrítico                         |
| SFF     | Fracionamento com Fluido Supercrítico                    |
| SIM     | Monitorização de Ião Único                               |
| SPSS    | <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>       |
| TEER    | Resistência Elétrica Transepitelial                      |
| TLC     | Cromatografia de Camada Fina                             |
| UV      | Ultravioleta   |
| VLDL    | Lipoproteína de Densidade Muito Baixa                    |

## I. Introdução

O estilo de vida influencia diretamente os hábitos alimentares. Nos últimos anos, o tempo destinado às refeições diminuiu, favorecendo o consumo da chamada *fastfood* ou de alimentos com baixo valor nutricional, o que acaba por comprometer o estado de saúde do consumidor. A adoção de dietas desequilibradas, contendo elevadas quantidades de hidratos de carbono, proteína de origem animal, gorduras saturadas e colesterol, assim como pobres em vitaminas e minerais, levam ao desenvolvimento de disfunções metabólicas que podem resultar em diversas patologias (Correa & Poltronieri, 2016).

No entanto, atualmente verifica-se que o consumidor está muito mais atento, preocupado e informado quanto aos riscos associados a dietas desequilibradas e maus hábitos quotidianos. Consequentemente, e procurando dar resposta às novas exigências do consumidor, há uma tendência acentuada na indústria alimentar para a produção de alimentos com valores nutricionais e terapêuticos melhorados, designados de alimentos funcionais. Embora não exista uma definição consistente e universalmente aceite para este tipo de alimentos, a *Functional Food Science in Europe* (FUFOSE) estabeleceu que um alimento funcional é: “um alimento que possui um efeito benéfico numa ou em várias funções específicas do organismo, além dos efeitos nutricionais habituais, que seja relevante para a melhoria do estado de saúde e bem-estar ou para a redução do risco de doença. É consumido como parte de um padrão alimentar normal. Não é uma pílula, uma cápsula ou qualquer forma de suplemento alimentar” (União Europeia, 2010).

O consumo de alimentos funcionais surge assim como uma opção de forma a prevenir o risco de desenvolvimento diversas doenças, nomeadamente dislipidemias, um dos principais fatores que contribui para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV). Existem estudos que comprovam que determinados alimentos (funcionais) ajudam na redução do colesterol (Chen, Jiao, & Ying Ma, 2008; Eussen et al., 2011), prevenindo a utilização de medicamentos e, consequentemente, reduzindo os efeitos secundários associados ao seu consumo (Perez-Calahorra et al., 2019). Em geral, os produtos obtidos de matrizes naturais são frequentemente considerados menos tóxicos, com reduzidos ou sem efeitos secundários, quando comparados com os seus equivalentes sintéticos. Assim, estas matrizes têm sido alvo de estudo da comunidade científica, como fontes de moléculas biologicamente ativas/agentes terapêuticos (Mohammed Cheurfa & Allem, 2015).

## **1.1 Frutos secos como alimentos funcionais e fonte de compostos de interesse**

O principal papel da dieta é fornecer os nutrientes essenciais para as necessidades metabólicas do organismo, evitando a desnutrição e promovendo o estado de saciedade e bem-estar. Desta forma, é garantida uma saúde ideal e diversas doenças podem ser prevenidas (Alkerwi, 2014). Assim, a qualidade da dieta está fortemente relacionada com a qualidade de vida.

Atualmente, está estabelecido que uma dieta nutritiva e saudável deve ser rica em frutas, vegetais, legumes, grãos e frutos secos, enquanto a ingestão de açúcar e sal livres deve ser limitada. Relativamente aos frutos secos, a sua inclusão na dieta é uma alternativa interessante, já que estes são conhecidos como um alimento nutritivo com alto teor de lípidos saudáveis. Além disso, estudos comprovam que a ingestão diária de frutos secos é capaz de diminuir significativamente os níveis de colesterol total e LDL (lipoproteína de baixa densidade) em humanos (Abbey, Noakes, Belling, & Nestel, 1994). Assim, os frutos secos surgem como um alimento com propriedades funcionais inerentes, ou seja, uma excelente opção a incluir em dietas nutritivas e saudáveis.

### **1.1.1 Compostos bioativos presentes em frutos secos**

#### **1.1.1.1 Ácidos gordos**

Os ácidos gordos consistem numa cadeia de hidrocarbonetos de comprimento variável, com um grupo carboxilo (COOH) numa extremidade e um grupo metilo (CH<sub>3</sub>) na outra. Além de variar o comprimento da cadeia, os ácidos gordos podem variar o grau de insaturação, sendo classificados como saturados (sem ligações duplas), monoinsaturados (uma ligação dupla) e poliinsaturados (pelo menos duas ligações duplas) (McGuire & Beerman, 2011; Mensink & Katan, 1992).

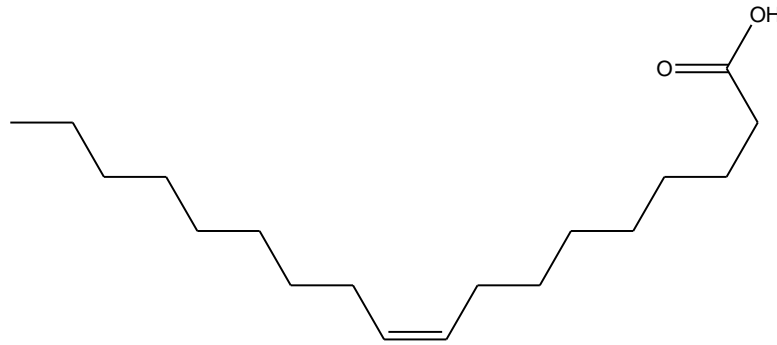
Os ácidos gordos, particularmente os ácidos gordos insaturados (mono e poliinsaturados), desempenham diversos papéis no corpo humano. Embora as suas principais funções estejam associadas ao armazenamento e ao fornecimento de energia, também desempenham funções estruturais e metabólicas, especialmente ao nível da membrana celular. Os ácidos gordos são armazenados na forma de triacilgliceróis (três cadeias de ácidos gordos ligados a uma molécula de glicerol) no tecido adiposo, funcionando como fornecedores de energia em caso de necessidade (Roth, 2013).

Estas moléculas são parte integrante das membranas celulares, nomeadamente na forma de fosfolípidos, exercendo funções estruturais e contribuindo para a flexibilidade, fluidez e permeabilidade da membrana. Os fosfolípidos também podem circular no organismo, formando complexos lipoproteicos que ajudam na digestão, absorção e transporte de compostos lipofílicos como vitamina E, triacilgliceróis ou colesterol (Li et al., 2015; Roth, 2013).

Além de alterações favoráveis no perfil lipídico plasmático, uma dieta rica em ácidos gordos pode melhorar as funções imunológicas do organismo, devido ao seu potencial anti-inflamatório (Bouic, 2001; Calder, 2015; Wall, Ross, Fitzgerald, & Stanton, 2010), reduzindo o risco de desenvolvimento de DCV (Estruch et al., 2013; Gillingham, Harris-Janz, & Jones, 2011; Jogchum Plat & Ronald P, 2001; Schwingshackl & Hoffmann, 2012), aterosclerose (Pérez-Jiménez et al., 1999), ou cancro (Awad & Fink, 2000; Awad, Williams, & Fink, 2001; Jing, Wu, & Lim, 2013; Laviano, Rianda, Molfino, & Fanelli, 2013).

Os óleos de frutos secos, tais como amêndoa e avelã, têm sido alvo de interesse, uma vez que podem ser uma fonte de constituintes bioativos e nutrientes funcionais (Alasalvar, Amaral, & Shahidi, 2006; Kris-Etherton et al., 1999; Ryan, Galvin, O'Connor, Maguire, & O'Brien, 2006). Estes são essencialmente ricos em componentes lipídicos (cerca de 60%), especialmente ácidos gordos monoinsaturados (AGMI), nomeadamente ácido oleico (**Figura 1**), tocoferóis (*p.e.*,  $\alpha$ -tocoferol) e fitosteróis (*p.e.*,  $\beta$ -sitosterol) (Alasalvar, Shahidi, Ohshima, et al., 2003; Amaral, Casal, et al., 2006; Maguire, O'Sullivan, Galvin, O'Connor, & O'Brien, 2004; Savage, McNeil, & Dutta, 1997).

Uma dieta rica em AGMI tende a aumentar o colesterol HDL e diminuir as concentrações de triacilgliceróis (P. J. Jones, 1999; Mensink & Katan, 1987; Mercanligil et al., 2007). Além disso, estudos adicionais comprovam que outros componentes presentes no óleo destes frutos reduzem as concentrações plasmáticas totais de colesterol e de LDL; estes incluem ácidos gordos poliinsaturados (AGPI) (Feldman, 2002; Horrobin & Manku, 1983; P. Jones, MacDougall, Ntanios, & Vanstone, 1997; Weststrate & Meijer, 1998) e tocotrienol (Qureshi et al., 1991).

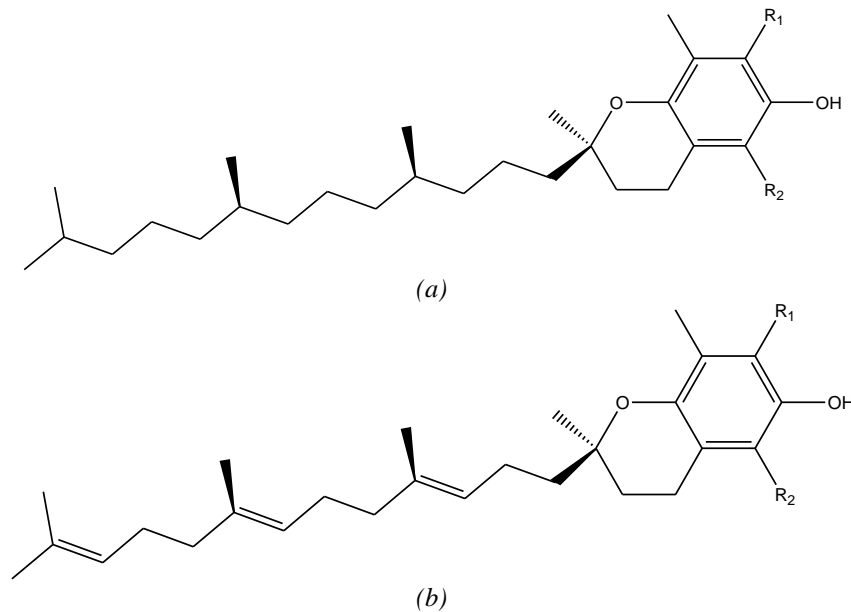


*Figura 1 – Fórmula estrutural do ácido oleico.*

### 1.1.1.2 Vitamina E: tocoferóis e tocotrienóis

Vitamina E é o termo utilizado para uma família de compostos quimicamente relacionados, tocoferóis e tocotrienóis, os quais compartilham uma estrutura comum formada pelo anel de cromanol e uma cadeia lateral de prenilo. A vitamina E é, portanto, constituída por oito compostos químicos: quatro tocoferóis (isoformas  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -) e quatro tocotrienóis (também com isoformas  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -) (**Figura 2**) (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996; Munné-Bosch & Alegre, 2002). Tais moléculas lipossolúveis diferem entre si apenas no grau de saturação de suas cadeias laterais hidrofóbicas do prenilo.

Os tocoferóis são reconhecidos como antioxidantes devido à sua capacidade de proteger as membranas celulares de danos oxidativos induzidos por radicais livres (Arranz, Cert, Pérez-Jiménez, Cert, & Saura-Calixto, 2008; Fang, Yang, & Wu, 2002; McGuire & Beerman, 2011), além de terem potencial anti-inflamatório (Tahan et al., 2011). O  $\alpha$ -tocoferol é considerado a forma mais ativa de vitamina E (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996). No entanto, outras isoformas também foram reconhecidas como bioativas. Por exemplo, o  $\gamma$ -tocoferol tem maior potencial anti-inflamatório e é apontado como sendo mais eficaz na prevenção de processos relacionados com o cancro (Brigelius-Flohé, 2006; Hensley et al., 2004; C. S. Yang, Suh, & Kong, 2012). Embora o mecanismo de ação ainda não esteja claramente entendido, há fortes evidências de que os tocoferóis desempenham um papel importante na prevenção de algumas doenças crônicas, como doenças cardíacas e certos tipos de cancro (Traber & Packer, 1995). Os tocotrienóis possuem a capacidade de atuar de forma positiva no processo de neurodegeneração (Brigelius-Flohé, 2006), tendo propriedades anticancerígenas e redutoras de colesterol (Colombo, 2010).



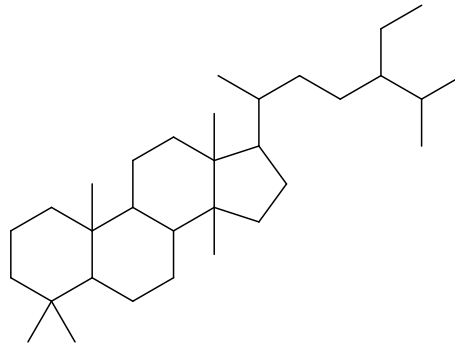
**Figura 2** – Fórmula estrutural geral das isoformas da vitamina E (a) Tocoferóis ( $\alpha$ -tocoferol:  $R_1$  e  $R_2 = CH_3$ ;  $\beta$ -tocoferol:  $R_1 = H$  e  $R_2 = CH_3$ ;  $\gamma$ -tocoferol:  $R_1 = CH_3$  e  $R_2 = H$ ;  $\delta$ -tocoferol:  $R_1$  e  $R_2 = H$ ) (b) Tocotrienóis ( $\alpha$ -tocotrienol:  $R_1$  e  $R_2 = CH_3$ ;  $\beta$ -tocotrienol:  $R_1 = H$  e  $R_2 = CH_3$ ;  $\gamma$ -tocotrienol:  $R_1 = CH_3$  e  $R_2 = H$ ;  $\delta$ -tocotrienol:  $R_1$  e  $R_2 = H$ ).

A vitamina E é hidrolisada e absorvida no intestino e, por ser uma vitamina lipossolúvel, este processo depende do funcionamento do pâncreas, uma vez que requer secreções biliares e pancreáticas para formar micelas que permitirão a absorção de vitamina pelo intestino. Após esse processo, a vitamina E torna-se solubilizada e as micelas resultantes são envolvidas por enterócitos por difusão passiva e incorporadas em conjunto com outros lípidos em quilomícrons que são secretados no sistema linfático (Eggermont, 2006; Litwack, 2007; Rigotti, 2007; Stipanuk & Caudill, 2013; Traber, 2007). A vitamina E não é acumulada e sim metabolizada, de forma que é excretada na urina ou na bile. Estima-se que cerca da metade dos tocoferóis consumidos durante a dieta seja absorvida, sendo o restante excretado nas fezes (Eggermont, 2006; Stipanuk & Caudill, 2013; Traber, 2007). A deficiência de vitamina E pode causar neuropatia periférica ou problemas de doenças do sangue (Roth, 2013; Traber, 2007).

Nos últimos anos, os efeitos na saúde das isoformas da vitamina E ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , e  $\delta$ -tocoferóis e tocotrienóis) foram bem documentados (Esterbauer, Dieber-Rotheneder, Striegl, & Waeg, 1991; Khor & Chieng, 1996). Por exemplo, o óleo de avelã, excelente fonte de tocoferóis, demonstrou reduzir o risco de doença coronária (Rimm et al., 1993). Além disso, os tocoferóis em associação com os polifenóis e outras substâncias, contribuem para a estabilização do óleo de avelã e a sua quantidade pode refletir o estado oxidativo do óleo (Traber & Packer, 1995).

### 1.1.1.3 Esteroides

A estrutura básica de um esteroide possui quatro anéis fundidos, dos quais três são cicloexanos e um ciclopentano (**Figura 3**). Na maioria dos esteróis, os grupos metilo estão presentes em C10 e C13 e uma cadeia alquílica (ou cadeia alquílica substituída) também pode estar presente em C17. Em muitos esteróis, grupos funcionais (OH, CHO, CO ou COOH) também podem estar ligados ao anel ou presentes na cadeia alquílica (Yadav, Chandra, Goyal, & Shim, 2013). O colesterol é o esteroide animal mais conhecido, mas há outros esteróis comuns encontrados em animais, como a testosterona, epitestosterona, progesterona e estradiol (Barreira & Ferreira, 2015).



*Figura 3 - Fórmula estrutural básica de um esteroide.*

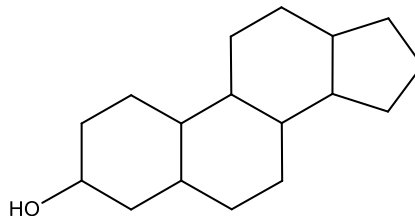
A atividade dos esteróis está diretamente relacionada com a sua estrutura química, a qual possui uma configuração específica. Os ácidos biliares foram os primeiros esteróis a serem obtidos na forma cristalina pura e esses compostos são formados no fígado pela oxidação do colesterol. Também servem como surfactantes para a absorção de gorduras do intestino e para excreção de colesterol e outros compostos hidrofóbicos (Lednicer, 2011).

O  $\beta$ -sitosterol, por exemplo, está principalmente relacionado com a redução dos níveis de colesterol e a prevenção de muitas doenças incluindo vários tipos de cancro, tais como cólon, próstata e mama (Awad et al., 2017).

Os esteróis são geralmente associados a compostos anabólicos androgénicos (principalmente análogos da testosterona) devido ao uso destes medicamentos por atletas que procuram melhorar o seu desempenho (Lednicer, 2011). Nos homens, os andrógenos são essenciais para manter a função reprodutiva, e desempenham um papel importante na manutenção músculo-esquelética, na função cognitiva e na sensação de bem-estar. O andrógeno mais importante é a testosterona (Kicman, 2008).

#### 1.1.1.4 Esteróis

Esteróis, do grego *steros* (sólido), são formas específicas de esteroides, com um grupo hidroxilo (OH) em C3 (**Figura 4**) (Fragkaki et al., 2009) que podem ser encontrados em animais, plantas, fungos e microrganismos (Bernal, Mendiola, Ibáñez, & Cifuentes, 2011). Os esteróis derivam de isopentenóides policíclicos hidroxilados com uma estrutura de 1,2-ciclopentanofenantreno (Abidi, 2001) e compreendem a maior proporção da fração insaponificável de lípidos (Lagarda, García-Llatas, & Farré, 2006).



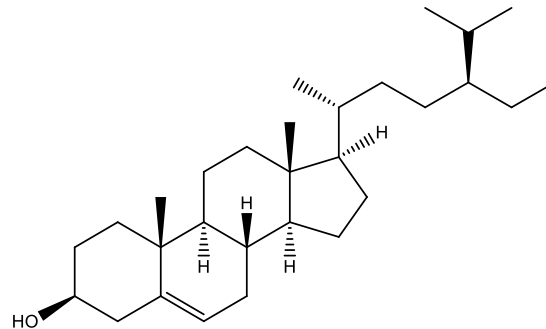
**Figura 4** - Fórmula estrutural do esterol.

Assim como nas células animais, nas plantas a membrana plasmática é muito enriquecida em esteróis em relação a outras membranas celulares. Através da interação com fosfolípidos, os esteróis são capazes de influenciar as funções da membrana tais como difusão simples, fluidez, ou permeabilidade, modulando também atividades de enzimas ou receptores ligados à membrana (Moreau, Whitaker, & Hicks, 2002).

Enquanto o colesterol está presente nos animais em quantidades relativamente elevadas, as plantas produzem quantidades reduzidas destes compostos (Abidi, 2001). Dados de esteróis vegetais reportados para alguns alimentos e óleos vegetais mostraram que os frutos secos e os óleos contêm níveis superiores ( $\geq 1\%$ ) de esteróis comparativamente a frutas e legumes ( $< 0,05\%$ ) (Abidi, 2001). Apesar da porção comestível de algumas plantas cultivadas poder incluir o colesterol como uma porção significativa dos fitoesteróis totais, deve-se notar que é insignificante na dieta humana quando comparada com a quantidade de colesterol presente na carne e produtos lácteos (Moreau et al., 2002). Por isso, os esteróis de origem vegetal (fitoesteróis), têm recebido particular atenção por parte da indústria alimentar e organizações de saúde (Abidi, 2001).

### 1.1.1.5 Fitoesteróis

Os esteróis e estanois de plantas, conhecidos como fitoesteróis (**Figura 5**), são um grupo de álcoois esteróis lipofílicos, quimicamente similares ao colesterol, mas que diferem nas cadeias laterais e na saturação da estrutura cíclica (MacKay & Jones, 2011).



*Figura 5 - Fórmula estrutural de um fitoesterol.*

Os fitoesteróis ocorrem em cinco formas comuns: álcool livre, ésteres de ácidos gordos, glicosídeos de esterilo e glicosídeos de esterilo acilados, sendo as três últimas formas genericamente designadas como conjugados de fitoesterol (Moreau et al., 2002). Os frutos secos (amêndoas, amendoim, avelãs e nozes de macadâmia) e os produtos à base de cereais (centeio, trigo, cevada e aveia) são uma fonte significativa de esteróis vegetais naturais (Lagarda et al., 2006). A ingestão diária de 1,5 a 3 g de fitoesterol é suficiente para reduzir o colesterol LDL em 7-12% (Katan et al., 2003; Ras, Geleijnse, & Trautwein, 2014; Scholz, Wocheslander, Lander, & Engel, 2015).

Estas moléculas são também conhecidas por apresentarem atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral, entre outras atividades biológicas (Liang et al., 2011). De facto, os fitoesteróis são conhecidos por exercerem efeitos de redução das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), vulgarmente designadas de forma pouco rigorosa como “mau colesterol”. Estes compostos são capazes de bloquear os locais de absorção do colesterol no intestino humano, diminuindo o nível de colesterol plasmático associado às LDL.

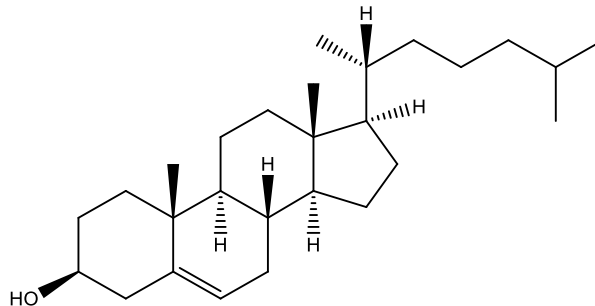
Em diversos estudos não foi possível analisar a composição de fitoesteróis conjugados devido à hidrólise alcalina ou ácida, mas o  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, colesterol, campestanol e sitostanol foram descritos como sendo os fitoesteróis mais abundantes em plantas (Robbins, Shin, Shewfelt, Eitenmiller, & Pegg, 2011; Zhao, Shen, Chang, & Kim, 2013). A única diferença estrutural entre sitosterol e colesterol consiste num grupo etilo adicional presente na posição C24 no sitosterol, o qual provavelmente é responsável pela sua baixa absorção (Marangoni & Poli, 2010).

## 1.2 Frutos secos e dislipidemias

### 1.2.1 Metabolismo do colesterol

O colesterol (**Figura 6**) é encontrado principalmente em gorduras de origem animal, quase totalmente na forma livre (não esterificado). Entre as principais fontes alimentares estão a gema de ovo, leite e derivados, carne bovina, pele e vísceras de aves (Ros, 2009). O colesterol é um componente crucial que mantém a fluidez e permeabilidade da membrana celular nos vertebrados (Sozen & Ozer, 2017). Além disso, é uma substância envolvida em várias funções no organismo, sendo precursor das hormonas esteroidais, dos ácidos biliares e da vitamina D (Ros, 2009). O colesterol essencial é produzido pelo fígado, enquanto o excedente provém de fontes externas, ou seja, da alimentação (Hanning, Lingbeck, & Ricke, 2016). Assim, são necessários mecanismos reguladores para equilibrar a taxa de síntese de colesterol dentro do organismo em proporção com a sua taxa de excreção. Tal equilíbrio depende do balanço entre ingestão, absorção e excreção no qual o fígado possui um papel central na regulação (Ros, 2009).

Um desequilíbrio nesta regulação pode conduzir ao aumento dos níveis de colesterol no plasma, podendo levar à ocorrência de doenças cardiovasculares (Ros, 2009).



*Figura 6 – Fórmula estrutural do colesterol.*

O colesterol livre pode ser armazenado no fígado através da formação de ésteres de colesterol ou associado a lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), juntamente com triacilgliceróis e apolipoproteínas, sendo de seguida secretado para a circulação sanguínea. Durante a circulação no sangue, as VLDL perdem o seu conteúdo em triacilgliceróis, pela lipoproteína lipase e hepatolipase, sendo convertidas em lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e depois LDL (Sozen & Ozer, 2017).

Existem pontos críticos para a manutenção da concentração de colesterol total no organismo: a sua síntese no fígado e a circulação entero-hepática com a secreção do colesterol na bÍlis e a sua reabsorção parcial, em conjunto com o colesterol proveniente da dieta (Marques, 2013).

Sabe-se que, para que ocorra a absorção entérica de colesterol, é necessário que o organismo realize uma emulsificação, na qual há a formação de micelas mistas de sais biliares e lípidos, além da realização de mecanismos passivos baseados no equilíbrio relativamente rápido entre o colesterol e os conjuntos hidrofóbicos dos constituintes micelares (Coreta-Gomes, Vaz, Wasielewski, Geraldles, & Moreno, 2012).

Os produtos alimentares funcionais que têm por objetivo o tratamento da hipercolesterolemia atuam essencialmente a nível da insolubilização do colesterol nas micelas, alterando o equilíbrio entre as concentrações de ácidos biliares e a concentração micelar crítica (CMC) (Woollett et al., 2006).

### **1.2.2 Doenças associadas a elevados níveis de colesterol**

Recentemente, o aumento nos níveis de colesterol no sangue (hipercolesterolemia) tem-se tornado um grave problema de saúde. Sabe-se que a hipercolesterolemia é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, incluindo aterosclerose, enfarte do miocárdio e acidente vascular cerebral (Avci, Kupeli, Eryavuz, Yesilada, & Kucukkurt, 2006). Tal disfunção também aumenta a geração de radicais livres (Prasad & Kalra, 1993), nomeadamente de radicais livres de oxigénio, como o anião superóxido ou o peroxinitrito, os quais possuem um papel significativo na patogénese de muitas doenças como cancro e distúrbios inflamatórios.

Em pacientes hipercolesterolémicos, o excesso de colesterol é depositado nas artérias levando ao seu estreitamento e, dessa forma, restringe o fluxo sanguíneo para o coração. O bloqueio de sangue rico em oxigénio para o coração pode causar angina e levar a um ataque cardíaco (Hanning et al., 2016). Além disso, a hipercolesterolemia tem sido associada a alguns tipos de cancro (Baek et al., 2017) e diabetes tipo 2 (Razi, Forouzanfar, Bandarian, & Nasli-Esfahani, 2017). Os pacientes hipercolesterolémicos recebem tratamento farmacológico, o qual atua na inibição da síntese e absorção do colesterol com a finalidade de reduzir os riscos de ataque cardíaco (Correa & Poltronieri, 2016).

Para inibição da síntese de colesterol, recorre-se ao uso de estatinas, enquanto que para a inibição da absorção intestinal utilizam-se polímeros como a ezetimiba. No entanto, tais métodos possuem eficácia reduzida após uso prolongado. Desta forma, os pacientes devem associar ao tratamento uma dieta equilibrada com baixos níveis de colesterol. Além dos medicamentos sintéticos, outros potentes inibidores, como os peptídeos oriundos da digestão de algumas proteínas de origem vegetal (Fontanari, Batistuti, Cruz, Saldiva, & Arêas, 2012) apresentam efeitos hipocolesterolémicos comprovados e referenciados na literatura (Correa & Poltronieri, 2016).

### **1.2.3 Potencial hipocolesterolémico de matrizes naturais**

As proteínas de origem vegetal, presentes em leguminosas tais como tremçoço, soja, lentilha e feijão, estão descritos como possíveis coadjuvantes no controlo ou prevenção de doenças cardiovasculares, devido seu efeito hipocolesterolémico (Correa & Poltronieri, 2016).

Este efeito é ocasionado por peptídeos bioativos oriundos da hidrólise dessas proteínas, os quais desempenham papel importante na regulação e modulação metabólica do colesterol (Barbana, Claire, & Irene, 2011; Fontanari et al., 2012).

Desta forma, os mecanismos envolvidos em tal efeito resumem-se à redução da absorção do colesterol e reabsorção dos ácidos biliares o que, por consequência, promove o aumento da sua excreção por meio da inibição da solubilização micelar do colesterol, e modulação génica dos seus transportadores. Outro mecanismo relevante sugere a redução da síntese do colesterol por meio da inibição da atividade da enzima HMGR. Ou seja, as proteínas podem atuar tanto em mecanismos exógenos como endógenos (Correa & Poltronieri, 2016).

Os frutos secos são também recomendados como um constituinte importante de dietas saudáveis, devido à presença de quantidades significativas de fitoesteróis. Entre eles, estão as amêndoas, castanhas do Brasil, avelãs, macadâmia, amendoins, nozes, pistácios e castanha de caju como os mais consumidos (Vadivel, Kunyanga, & Biesalski, 2012). Estudos demonstram que a inclusão destes alimentos na dieta resulta na proteção contra a mortalidade devido ao desenvolvimento de doença cardíaca coronária (DCC), acidente vascular cerebral, hipertensão, cancro, entre outros (Orozco-Beltran et al., 2017; Salas-Salvadó et al., 2008).

Na **Tabela 1** estão descritos alguns desenvolvimentos em análises de matrizes naturais aplicadas como potenciais agentes hipocolesterolémicos.

**Tabela 1** - Matrizes naturais e o potencial hipocolesterolémico.

| <b>Matriz natural</b>                      | <b>Efeitos fisiológicos de saúde</b>   | <b>Referência</b>  |
|--|--|--|
| Proteína de soja                           | Há confirmação do efeito hipocolesterolémico e o aumento da excreção fecal de ácidos biliares não contribui para tal efeito.   | (Maki et al., 2010)  |
| Proteína de soja                           | A suplementação da proteína da soja reduz os lípidos séricos em adultos hipercolesterolémicos e o seu consumo pode ter efeito benéfico na prevenção de doenças coronárias.                                     | (Reynolds et al., 2006)                                      |
| Hidrolisado proteico de feijão-caupi       | Os peptídeos bioativos do feijão-caupi demonstraram potencial hipocolesterolémico.   | (Marques, Fontanari, Pimenta, Soares-Freitas, & Arêas, 2015) |
| Avelã                                      | O extrato de avelã utilizado como suplementação na alimentação de coelhos foi capaz de reduzir os níveis de colesterol.  | (Hatipoğlu et al., 2004)                                     |
| Lentilha                                   | A capacidade ligante da proteína da lentilha aos sais biliares sugere propriedades redutoras de colesterol.  | (Barbana et al., 2011)                                       |
| Tremoço                                    | O tremoço apresenta efeitos endógenos no metabolismo do colesterol e um efeito protetor do desenvolvimento de esteatose hepática.  | (Fontanari et al., 2012)                                     |
| Produtos marinhos                          | De todos os produtos marinhos analisados (Bacalhau-do-atlântico, Mexilhão-comum, Molusco do mar, Berbigão, dentre outros), o óleo de fígado de bacalhau é o mais recomendado para pessoas com doença cardíaca. | (Copeman & Parrish, 2004)                                    |
| Sementes de uva                            | Os resultados afirmaram que a suplementação pode diminuir o nível plasmático de colesterol total e triacilglicerol em hamsters.  | (Jiao, Zhang, Yu, Huang, & Chen, 2010)                       |
| Sementes de feno-grego                     | Os resultados mostraram que o extrato de feno-grego reduziu a hipercolesterolemia e regulou o estado antioxidante em ratos alimentados com colesterol.   | (Belguith-Hadriche et al., 2013)                             |
| Sementes de pistácio                       | Os extratos de <i>Pistacia lentiscus</i> mostraram propriedades hipocolesterolémicas.  | (Mohammed Cheurfa & Allem, 2015)                             |
| Coalhada de chá verde fortificada com soja | As proteínas de leite de soja podem ser utilizadas como uma fonte de bioativos que podem ser empregados na prevenção de doenças cardiovasculares.  | (Moumita et al., 2018)                                       |
| Azeite                                     | O estudo mostra que a <i>Olea europaea</i> pode ser considerada como uma alternativa natural efetiva para o controlo da hipercolesterolemia, reduzindo, consequentemente, o risco de aterosclerose.            | (M. Cheurfa et al., 2019)                                    |

### **1.3 Extração e caracterização de compostos bioativos lipídicos de matrizes naturais**

Para que o uso de uma determinada matriz natural como fonte de compostos bioativos seja bem-sucedido, é necessário, em primeiro lugar, selecionar e adequar a metodologia de extração das moléculas. Esta deverá ser eficiente e preservar a integridade dos compostos extraídos (González-Montelongo, Lobo, & González, 2010). É também essencial que se apliquem processos passíveis de adaptação à escala industrial, sem perdas significativas de rendimento (Lu et al., 2007).

Solventes não polares, como o hexano (normalmente utilizado para extrair a maioria dos tipos de óleos vegetais), extraem quantitativamente fitoesteróis e ésteres de ácidos gordos livres (Moreau et al., 2002). No caso dos primeiros, são necessárias técnicas analíticas fiáveis para extração, isolamento, separação, purificação, deteção e análise de dados quantitativos devido à presença de uma diversidade de outros componentes não saponificáveis da fração lipídica (Nordestgaard et al., 2013).

Além da extração com solvente, é comum aplicar a extração com fluido supercrítico (SFE) ou fracionamento com fluido supercrítico (SFF) seguido de vários procedimentos de limpeza e cromatografia (Lagarda et al., 2006).

A fim de caracterizar e quantificar os compostos bioativos, o extrato inicial pode ser purificado e separado por uma ampla variedade de técnicas cromatográficas incluindo cromatografia em coluna (CC), cromatografia gasosa (GC), cromatografia de camada fina (TLC), cromatografia líquida de alta eficiência em fase normal (NP-HPLC), cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) e eletrocromatografia capilar (CEC). Os diferentes compostos bioativos lipídicos podem ser analisados com deteção de ionização de chama (FID), deteção ultravioleta (UV), deteção por espalhamento de luz evaporativo (ELSD), deteção por infravermelhos (IR), deteção por ressonância magnética nuclear (NMR) e espectrometria de massa (MS) (Abidi, 2001).

De referir que, entre os passos mais importantes na análise de compostos de matrizes biológicas está a preparação das amostras, que em muitos casos deve ser feita na ausência de oxigénio (Domeño, Ruiz, & Nerín, 2005).

Na etapa de isolamento, as técnicas dependem em grande parte da natureza da amostra e variam com seu estado físico (Abidi, 2001).

Entre todas as técnicas de isolamento e separação cromatográfica, os procedimentos CC e TLC aplicam os equipamentos mais acessíveis, apesar da sua óbvia inadequação na precisão analítica. Tais técnicas devem ser selecionadas de acordo com a quantidade de amostra a ser processada (Domeño et al., 2005).

A purificação ou fracionamento de extratos lipídicos ou frações não saponificáveis, por exemplo, é normalmente conseguida através de cartuchos de SPE, o que proporciona um fracionamento mais rápido com menores volumes de solvente. Além disso, permite trabalhar em fase normal ou reversa (Lagarda et al., 2006).

A composição de esteróis, por exemplo, pode ser também determinada utilizando as técnicas de GC (a mais utilizada), TLC ou HPLC (Bernal et al., 2011; Nes, 1985), tendo sido desenvolvidos diferentes métodos para separação qualitativa e posterior análise quantitativa.

### **1.3.1 Cromatografia gasosa (GC)**

Na cromatografia gasosa, os picos obtidos são representados pelos seus tempos de retenção em relação a um padrão de referência, eliminando erros analíticos devido a flutuações das condições do equipamento, bem como outras variáveis experimentais. Assim, na cromatografia também é possível prever as características moleculares e identificar componentes desconhecidos em amostras por comparação com padrões (Nes, 1985).

A GC capilar é frequentemente utilizada, já que as colunas capilares oferecem tempos de análise mais curtos e menor interferência de pico, havendo melhoria na resolução de componentes e alta estabilidade térmica em comparação com colunas compactadas (González-Larena, Garcia-Llatas, Clemente, Barberá, & Lagarda, 2015).

Tipicamente, a GC é acoplada a um detetor de ionização de chama (FID) para monitorizar analitos nos efluentes da coluna ou a um detetor de massa (MS) para identificação estrutural e quantificação por monitorização de íon único (SIM) ou monitorização de múltiplos íões (MIM) (Abidi, 2001).

Dependendo da matriz, do número de amostras analisadas e da aplicação específica, as análises de GC podem ser executadas isotermicamente ou por programação de temperatura a várias taxas de fluxo de gás (Abidi, 2001; Moreau et al., 2002).

### **1.3.2 Cromatografia líquida (LC)**

Em comparação com a GC, a HPLC oferece a vantagem de operar sob temperaturas de coluna mais suaves e sob condições de detecção não destrutivas. Portanto, é mais adequada para a análise de compostos termicamente instáveis, como os esteróis. No entanto, a alta lipofilicidade pode dificultar o processamento da amostra e a cromatografia em si. A contaminação potencial na coluna ou no injetor automático pode ser minimizada pelo uso de um alto teor de solvente orgânico (Lagarda et al., 2006).

Em amostras de extratos lipídicos simples e homogêneos, como certos óleos de sementes, a análise direta de esteróis por HPLC pode ser realizada com pouca purificação da amostra para evitar perdas indesejadas. Caso contrário, amostras de matrizes complexas devem passar por CC, TLC ou outro pré-tratamento cromatográfico para eliminar interferências. Assim, os procedimentos de HPLC em funcionamento são muito limitados pela complexidade das matrizes, pelo tipo e concentração de componentes, e separações de escala analítica ou preparativa (Abidi, 2001).

### **1.3.3 Espectroscopia**

A espectroscopia de massa (MS) e ressonância magnética nuclear (RMN) são ferramentas valiosas para identificação de compostos bioativos. Como o padrão de fragmentação dos compostos é diferente quando analisado com cada uma destas técnicas, a identificação estrutural exata só é possível se o espectro do composto desconhecido for combinado com um espectro de base de dados de um composto conhecido na mesma forma (Moreau et al., 2002).

Assim, a técnica de HPLC acoplada com MS ou NMR permite não apenas separações e quantificações simultâneas, mas também fornece um meio útil para a elucidação estrutural e a confirmação da estrutura molecular (Abidi, 2001).

Em geral, os métodos cromatográficos acoplados com MS são amplamente utilizados para alcançar maior sensibilidade e limites de detecção mais baixos (Ahonen et al., 2012; Deshmukh, Barker, Petroczi, & Naughton, 2012).

#### 1.4 Avelã e amêndoa: propriedades nutricionais e químicas

A avelã é uma das espécies mais antigas do reino vegetal, pertencendo ao género *Corylus*, família das Betuláceas. É uma árvore que pode ter o aspecto de um arbusto, de folha caduca, uma altura entre 4 e 5 metros e ramos flexíveis. As suas folhas são geralmente de forma ovada e duplamente serrada. As espécies deste género são indígenas do Hemisfério Norte, localizando-se o seu habitat desde os Himalaias até o extremo norte do Canadá, sendo que a espécie mais importante, cultural e comercialmente – *Corylus avellana* L. – é originária da Europa e Ásia Menor (Azevedo Editor, 2003).

Apesar de Portugal se encontrar numa zona geográfica na qual as condições são propícias para a implantação desta cultura, a produção nacional não é elevada, sendo a Turquia o maior produtor mundial seguida pela Itália e os Estados Unidos da América. Portugal, embora com produção modesta no âmbito europeu (da ordem das 1000 t/ano), aparece como potencial produtor de avelã, especialmente em áreas da Beira Interior, Trás-os-Montes e Minho Interior, onde esta espécie mostra boa adaptação às condições edafoclimáticas e se integra na perspectiva de uma exploração agrícola com a vertente paisagística, cinegética e florestal (Azevedo Editor, 2003).

A amêndoa, fruto da amendoeira - *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb, pertencente à família Rosaceae – é dos frutos secos mais populares em todo o mundo e ocupa o primeiro lugar na sua produção. Os Estados Unidos são o maior produtor de amêndoa do mundo, sendo a maioria da produção proveniente da Califórnia (Sang et al., 2002).

Assim, o mercado das amêndoas é fortemente dominado pelos Estados Unidos (80% da produção mundial), sendo seguidos pela Austrália (6%) e pela Espanha (5%). Em Portugal, dominam os pomares de sequeiro, instalados em solos de reduzida fertilidade natural e conduzidos com uma técnica cultural negligenciada. As condições ecológicas de partida são aceitáveis. Um clima mediterrânico e os solos, ainda que não sejam férteis, apresentam normalmente boa drenagem interna, um aspeto importante no cultivo do amendoal (Arrobas, 2018).

A composição nutricional média e os compostos bioativos de amêndoas e avelãs tem sido estudado por diferentes autores. Na **Tabela 2** apresentam-se os teores médios do valor nutricional (humidade, proteína, gordura total, cinzas e hidratos de carbono) e respectivo valor energético destes frutos. A **Tabela 3** apresenta os teores médios de ácidos gordos e tocoferóis presente nos frutos.

Ambos apresentam os lípidos/gordura como constituinte maioritário, sendo por este motivo alimentos muito energéticos. O constituinte minoritário destes frutos são as cinzas/minerais. Ambos possuem altos teores de AGMI, principalmente ácido oleico.

**Tabela 2** - Composição nutricional média de avelãs e amêndoas obtida na literatura.

|                                | Avelã    |  | Amêndoa |   |
|--------------------------------|----------|--|---------|---|
|                                | Teor     | Referências  | Teor    | Referências   |
| <b>Humidade (%)</b>            | 3,5-7,1  |  | 3-9,5   |   |
| <b>Proteína (%)</b>            | 9,3-20   | (Amaral, Casal, et al., 2006; Freitas & Naves, 2010; Köksal, Artik, Şimşek, & Güneş, 2006; Memon et al., 2019; Özenç, Bender Özenç, & Duyar, 2014) | 21-45,9 | (De Oliveira Sousa, Fernandes, Alves, de Freitas, & Naves, 2011; Freitas & Naves, 2010; Memon et al., 2019) |
| <b>Gordura (%)</b>             | 50-70    |  | 41-62,2 |   |
| <b>Hidratos de Carbono (%)</b> | 8,4-21,1 |  | 2,9-19  |   |
| <b>Cinzas (%)</b>              | 2-3,4    |  | 2,4-4,5 |   |
| <b>Valor energético (kcal)</b> | 587-722  |  | 546-687 |   |

**Tabela 3** - Teores médios dos ácidos gordos maioritários (percentagem relativa) e tocoferóis (mg/100 g) de avelãs e amêndoas obtidos na literatura.

|                    | Avelã     |  | Amêndoa   |   |
|--------------------|-----------|--|-----------|---|
|                    | Teor      | Referências  | Teor      | Referências   |
| <b>C16:0</b>       | 6,2-10,1  | (Alasalvar, Amaral, Satir, & Shahidi, 2009a; Bonvehí & Coll, 1993a; Derewiaka, Szwed, & Wołosiak, 2014; Ebrahim, Richardson, Tetley, & Mehlenbacher, 1994; Taş & Gökmen, 2015) | 5,7-7,3   | (Ebrahim et al., 1994; Nanos, Kazantzis, Kefalas, Petrakis, & Stavroulakis, 2002; Venkatachalan & Sathe, 2006; Zhu, Taylor, Sommer, Wilkinson, & Wirthensohn, 2015) |
| <b>C18:0</b>       | 1,8-3,7   |  | 1,4-2,4   |   |
| <b>C18:1n9</b>     | 71,2-75,8 |  | 68,1-80,8 |   |
| <b>C18:2n6</b>     | 8,4-20,4  |  | 10,4-29,2 |   |
| <b>α-tocoferol</b> | 15,7-42,1 |  | 11,3-24,8 |   |
| <b>β-tocoferol</b> | 0,7-1,4   |  | 0,07-0,15 |   |
| <b>γ-tocoferol</b> | 0,1-0,9   |  | 0,1-0,6   |   |

### 1.5 Bioestimulantes como tratamento suplementar do solo

A palavra bioestimulante foi cunhada por especialistas em horticultura para descrever substâncias que promovem o crescimento das plantas sem serem nutrientes, melhoradores de solo ou pesticidas (du Jardin, 2015). Outros autores definiram bioestimulantes como “materiais que, em quantidades mínimas, promovem o crescimento das plantas” (Zhang & Schmidt, 2000). Ao referir-se às “quantidades mínimas” para descrever bioestimulantes, os autores objetivaram distinguir bioestimulantes de nutrientes e alterações do solo, que também promovem o crescimento de plantas, mas são aplicadas em maiores quantidades (du Jardin, 2015). Apesar de estarem disponíveis em diversas formulações, os bioestimulantes são geralmente classificados em três grupos principais com base em sua fonte e conteúdo: substâncias húmicas (HS), produtos contendo hormonas (HCP) e produtos contendo aminoácidos (AACP).

Em geral, qualquer melhoria no sistema agrícola que resulte em maior produção deve reduzir o impacto ambiental negativo da agricultura e aumentar a sustentabilidade do sistema. Uma dessas abordagens é o uso de bioestimulantes, capazes de aumentar a eficácia dos fertilizantes minerais convencionais (Rathore et al., 2009).

Um bom exemplo de HCP é representado pelas algas marinhas. Alguns estudos relatam que o uso de substâncias bioativas marinhas extraídas de algas em culturas agrícolas e hortícolas provocam muitos efeitos benéficos em termos de aumento de rendimento e qualidade (Blunden, 1991; Crouch & Van Staden, 1993). Os extratos de algas marinhas contêm nutrientes principais e secundários, aminoácidos, vitaminas, citocininas, auxina e ácido abscísico (Mooney & van Staden, 1986), entre outras substância que estimulam o crescimento e rendimento das plantas (Kauffman, Kneivel, & Watschke, 2007), ajudam a desenvolver tolerância ao stresse ambiental (Zhang, Ervin, & Schmidt, 2003; Zhang & Schmidt, 2000), aumentam a captação de nutrientes do solo (Turan & Köse, 2004; Verkleij, 1992) e aumentam as propriedades antioxidantes (Rathore et al., 2009; Verkleij, 1992).

O efeito benéfico causado pela aplicação do extrato de algas marinhas é o resultado de muitos componentes que funcionam sinergicamente embora o modo de ação ainda permaneça desconhecido (Fornes, Sánchez-Perales, & Guardiola, 2002). Nos últimos anos, o uso de extratos de algas marinhas ganhou popularidade devido ao seu potencial uso na agricultura orgânica e sustentável (Russo & Berlyn, 1991). Ao contrário dos fertilizantes químicos, os extratos derivados de algas marinhas são biodegradáveis, não tóxicos, não poluentes e não perigosos para seres humanos e animais (Dhargalkar & Pereira, 2005).

## II. Objetivos

O presente trabalho resulta de um estudo colaborativo que visa a implementação de novas práticas agronómicas, nomeadamente na fertilização dos solos de duas culturas com importância na região do Nordeste Transmontano, a amendoeira e a avelleira. O grupo de investigação responsável por esta parte do projeto procedeu à suplementação do solo com diferentes tratamentos de bioestimulantes.

Este trabalho de dissertação foca-se na avaliação das propriedades fitoquímicas dos frutos obtidos após os diferentes tratamentos de suplementação do solo. Para tal, procedeu-se à avaliação das propriedades nutricionais, determinação de compostos bioativos de interesse (ácidos gordos, tocoferóis, esteróis e açúcares livres) e avaliação das propriedades hipocolesterolémicas dos frutos em estudo, de forma a obter uma produção de frutos de valor acrescentado.

Assim, o **objetivo principal** deste estudo foi a caracterização da fração lipofílica de amostras de avelã e amêndoa obtidas de plantas submetidas a diferentes tipos de suplementação, no sentido de inferir possíveis associações entre diferentes produtividades e perfis em compostos bioativos lipofílicos com potencial atividade hipocolesterolémica.

Desta forma, com a parceria estabelecida e tendo em conta os estudos agronómicos e fitoquímicos efetuados, pretende-se a implementação de novas técnicas de gestão dos solos de cultivo de amendoeira e avelleira, com obtenção de frutos de valor acrescentado.

De forma a efetuar um estudo completo e a validar os resultados obtidos, estabeleceram-se os seguintes **objetivos específicos**:

- Seleção e tratamento de amostras obtidas de *Prunus dulcis* (Miller) D.A. Webb (amendoeira) e *Corylus avellana* L. (avelleira) após diferentes tratamentos de suplementação dos solos;
- Avaliação das propriedades nutricionais dos frutos secos (*i.e.* humidade, gordura total, proteínas, hidratos de carbono, cinzas e valor energético);
- Separação e caracterização da fração lipídica (ácidos gordos, tocoferóis e esteróis) e dos açúcares livres;
- Avaliação da atividade hipocolesterolémica dos extratos obtidos.

### III. Material e Métodos

#### 3.1 Amostras

Foram utilizadas amostras de aveleira (*Corylus avellana* L.) do Nordeste Transmontano provenientes de pomares da região de Travanca, Macedo de Cavaleiros e amostras de amendoeira (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) provenientes de Mogadouro.

Relativamente à amendoeira, as amostras pertenciam à cultivar Vairo, de origem espanhola, com floração tardia e um impacto favorável no aumento do potencial produtivo das novas plantações (Miarnau, Vargas, Montserrat, & Alegre Castellví, 2010). As amostras foram obtidas a partir de plantas submetidas a cinco tratamentos diferentes (compatíveis com o modo de produção de agricultura biológica), descritos na **Tabela 4**.

**Tabela 4** - Linhas de tratamento para as amostras de amêndoas.

|                |  |
|----------------|--|
| <b>Linha 1</b> | Sem tratamento (Controlo)  |
| <b>Linha 2</b> | Fitoalgas green (Bioestimulante à base de <i>Ascophyllum nodosum</i> ) |
| <b>Linha 3</b> | Tradebor (Boro líquido em solução de etanolamina)                      |
| <b>Linha 4</b> | Sprint Plus (Bioestimulante composto de aminoácidos de origem animal)  |
| <b>Linha 5</b> | Boro + borax   |

Relativamente à aveleira, as amostras pertenciam à cultivar Ennis, de origem americana, árvore pequena e boa polinizadora, a qual desenvolve frutos muito grandes e atraentes (Carrilho, n.d.). As amostras distinguem-se em seis linhas de tratamento do solo com bioestimulantes, tal como descrito na **Tabela 5**.

**Tabela 5** - Linhas de tratamento para as amostras de avelãs

|                |  |
|----------------|--|
| <b>Linha 1</b> | Boro (Controlo)                        |
| <b>Linha 2</b> | NPK (azoto, fósforo e potássio) + Boro |
| <b>Linha 3</b> | NPK + Boro + Fitoalgas green           |
| <b>Linha 4</b> | Boro + Sprint Plus                     |
| <b>Linha 5</b> | NPK + Boro + Sprint Plus               |
| <b>Linha 6</b> | Boro + Fitoalgas green                 |

Após a colheita, as amostras dos frutos foram imediatamente congeladas e liofilizadas (Liofilizador Telstar LyoQuest, marca Telstar Life Science), a fim de prevenir a ocorrência de qualquer degradação. Após liofilização, as amostras foram trituradas numa picadora (modelo A327R1, Moulinex, Espanha), homogeneizadas e armazenadas ao abrigo da luz e humidade, até efetuar as análises propostas.

### 3.2 Valor nutricional dos frutos

A composição química das amostras (humidade, gordura total, proteínas, hidratos de carbono e cinzas) foi efetuada utilizando as metodologias AOAC (AOAC, 2016), como descrito nas próximas secções.

#### 3.2.1 Humidade

A determinação da humidade nos frutos foi efetuada comparando o peso antes e após a liofilização. Assim, para a determinação deste parâmetro pesaram-se as amostras (já divididas por grupos) na sua totalidade e, de seguida, estas foram colocadas no liofilizador (modelo referido anteriormente) durante um período de aproximadamente trinta horas (**Figura 7**). Após o período de liofilização, as amostras foram pesadas novamente, de forma a obter o peso seco das mesmas. Os resultados foram expressos em grama/100 gramas peso fresco (g/100g pf), através da seguinte expressão:

$$\%humidade = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

Onde  $m_i$  representa a massa inicial, antes da amostra ser liofilizada, e  $m_f$  representa a massa final, após a sublimação da água por liofilização.



*Figura 7 - Liofilizador utilizado para secagem e determinação de humidade das amostras.*

### 3.2.2 Teor em gordura total

O teor de gordura total dos frutos em estudo foi determinado após extracção em Soxhlet (**Figura 8**) acoplada a refrigeração de refluxo, segundo o método AOAC 948.22. O solvente utilizado foi o éter de petróleo e o tempo médio de extracção foi de sete horas.

Foram pesadas 3,0 g de amostra e colocadas num cartucho de papel de filtro o qual foi colocado no sistema de Soxhlet. Adicionou-se o solvente e deu-se início à extração. Após 7 horas, o solvente foi recuperado e o teor de gordura foi determinado por secagem em estufa a aproximadamente 50 °C até ter peso constante. Os resultados foram apresentados em g/100 g peso fresco (g/100g pf), utilizando-se a seguinte expressão:

$$\%gordura\ total = \frac{m_f}{m_i} \times 100 \quad (2)$$

Onde  $m_i$  representa a massa inicial de fruto seco no cartucho e  $m_f$  representa a massa do extrato obtido após a evaporação do solvente.



**Figura 8** - Equipamento Soxhlet utilizado na determinação do teor de gordura.

### 3.2.3 Cinzas

A determinação do teor em cinzas foi efectuada segundo as normas AOAC 950.49. Pesaram-se para um cadinho, previamente tarado, 0,25 g de amostra. Introduziu-se o cadinho na mufla a  $550\pm 15$  °C, deixando a incinerar durante a noite (**Figura 9**). Após este período, retiraram-se os cadinhos da mufla, e depois de arrefecidos num excicador, foram pesados. Os resultados foram apresentados em g/100 g de peso fresco (g/100g pf), utilizando-se a seguinte expressão:

$$\%cinzas = \frac{m_f}{m_i} \times 100 \quad (3)$$

Onde  $m_i$  representa a massa inicial introduzida no cadinho e  $m_f$  representa a massa final após a incineração na mufla.



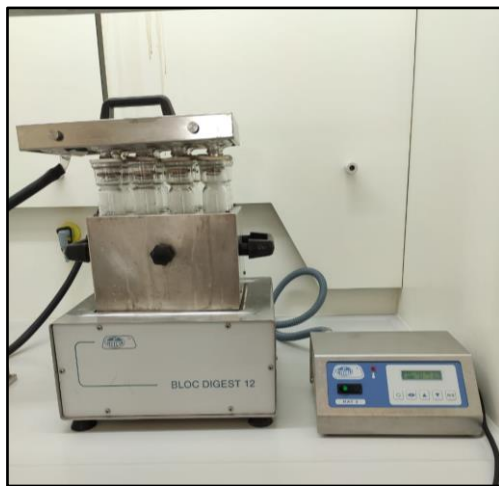
*Figura 9 – Mufla utilizada para incinerar as amostras.*

### 3.2.4 Proteínas

A proteína total foi quantificada seguindo o procedimento AOAC 950.48, segundo a qual o teor em proteína bruta é o resultado que se obtém multiplicando o teor em azoto da amostra, determinado pelo método de macro-Kjeldahl, por um factor convencional. Esta determinação consiste na digestão da matéria orgânica por ácido sulfúrico, em presença de um catalisador de selênio, com transformação do azoto em sal de amónio, libertação do amoníaco em meio alcalino, destilação, recolha em meio ácido e titulação.

Pesaram-se 0,5 g de amostra triturada e introduziram-se no tubo de digestão. Juntaram-se duas pastilhas de catalisador de selênio com 15 mL de ácido sulfúrico e colocou-se o tubo no digestor (Foss™ Digestor) durante setenta minutos a 400 °C. Findo este tempo, após arrefecer, adicionaram-se 25 mL de água destilada (**Figuras 10a, 10b e 10c**).

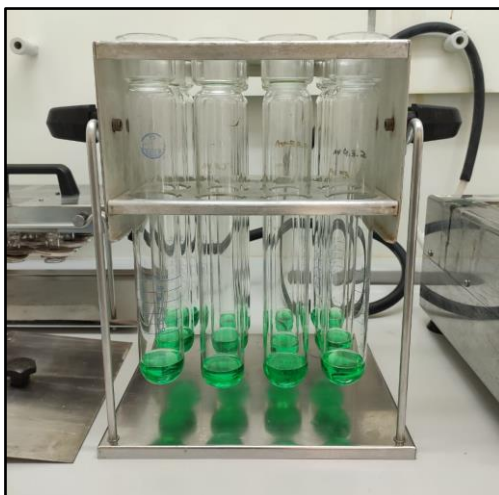
Em seguida, os tubos de digestão foram colocados no Destilador Kjeldahl automático Pro-Nitro A para o processo de destilação e titulação (**Figura 10d**). O processo levou aproximadamente cinco minutos para cada tubo de digestão. Simultaneamente efetuou-se um ensaio em branco, além de uma amostra referência com taxa de proteína conhecida.



(a)



(b)



(c)



(d)

**Figura 10** - Equipamento utilizado na determinação do teor de proteínas (a) (b) e (c) digestor e tubos de digestão (d) equipamento de Kjeldahl.

No equipamento, a amostra foi diluída e neutralizada usando água e uma solução de hidróxido de sódio. Posteriormente, a amónia foi destilada e arrastada para outra solução que continha ácido bórico, verde de bromocresol e vermelho de metilo, onde a amónia foi recolhida. Com a adição de amónia à solução, o ião boro foi formado na mesma quantidade que o azoto. O ião boro foi então titulado com uma solução padrão de ácido clorídrico. O teor em proteína é calculado multiplicando o valor obtido para o azoto pelo fator de conversão de 5,18 para amêndoas e 5,3 para avelãs. Os resultados foram apresentados em grama/100 gramas peso fresco (g/100g pf), utilizando-se a seguinte expressão:

$$\%azoto\ total = \left( \frac{(N - B) \times 100}{P} \right) * FT \quad (4)$$

Onde N representa a quantidade de azoto indicada pelo aparelho, B é a quantidade de azoto no ensaio em branco, P é o peso da amostra e FT é o fator de conversão.

### 3.2.5 Hidratos de carbono

O conteúdo em hidratos de carbono foi calculado por diferença, utilizando-se a seguinte expressão: Hidratos de carbono totais (g/100 g) = 100 - (g gordura total + g proteína + g cinzas). Os resultados foram apresentados em g/100 g de peso fresco (g/100g pf).

### 3.2.6 Valor energético

O valor energético foi calculado multiplicando o valor exacto de cada um dos macronutrientes pelo seu equivalente calórico correspondente, e somando os valores obtidos, de acordo com o Decreto-Lei nº 167/2004 de 7 de Julho, que determina os factores de conversão relativos ao valor energético, sendo para os hidratos de carbono 4 kcal/g, para as proteínas 4 kcal/g e para os lípidos 9 kcal/g.

Assim, o valor energético foi calculado utilizando-se a seguinte expressão: Energia (kcal/100 g) = 4 × (g proteínas + g hidratos de carbono) + 9 × (g gordura total).

### 3.3 Açúcares solúveis

As amostras liofilizadas e trituradas (1 g) foram enriquecidas com melezitose como padrão interno (IS, 25 mg/mL) e extraídas com 40 mL de etanol aquoso 80% a 80 °C, 90 min. A suspensão resultante foi filtrada em papel filtro (Whatman No. 4) e transferida para um balão volumétrico. Em seguida, o etanol foi evaporado no evaporador rotativo (R-210 rotary evaporator, Büchi, Flawil, Switzerland) durante 15 min. A fase aquosa foi lavada numa ampola de decantação utilizando éter dietílico, sendo posteriormente recolhida para um tubo de ensaio e colocada na estufa para evaporar o éter durante a noite. No dia seguinte, o extrato foi aferido a 5 mL com água destilada e filtrado para um vial de HPLC de forma a ser analisado por HPLC acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI). O equipamento HPLC (**Figura 11**) consistiu num sistema integrado com uma bomba Smartline 1000 (Knauer, Berlim, Alemanha), um desgaseificador Smartline manager 5000, com amostrador automático AS-2057 (Jasco, Easton, MD) e um detetor de índice de refração Smartline 2300 (Knauer). Os dados foram analisados no software Clarity 2.4 (DataApex). A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna Eurospher 100-5 NH<sub>2</sub> (5 µm, 4,6 × 250 mm, Knauer) a operar a 30 °C. A fase móvel foi acetonitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v) a uma taxa de fluxo de 1 mL/min. A identificação de açúcares foi feita comparando os tempos de retenção relativos dos picos da amostra com os padrões comerciais. A quantificação foi feita pelo método do padrão interno e os resultados foram expressos em g/100 g de peso fresco (g/100g pf).



**Figura 11** – Equipamento HPLC-RI utilizado para separação e identificação de açúcares solúveis.

### 3.4 Ácidos gordos

Antes da análise do perfil de ácidos gordos, o extrato obtido a partir do Soxhlet foi submetido ao procedimento de derivatização, no qual foram adicionados 5 mL de metanol:ácido sulfúrico 95%:tolueno 2:1:1 (v/v/v) às amostras que foram de seguida colocadas num banho a 50 °C com agitação durante a noite.

Em seguida, adicionaram-se 3 mL de água destilada e 3 mL de éter dietílico aos extratos que foram, posteriormente, levados ao vórtex. Assim que as fases se separaram, o sobrenadante foi retirado com uma pipeta de *Pasteur* para um *vial* previamente identificado e ao qual foi adicionado sulfato de sódio anidro para eliminar qualquer resíduo de água.

De seguida, a amostra foi filtrada para o *vial* final com a ajuda de uma seringa. A detecção de ácidos gordos foi realizada por Cromatografia Gasosa (GC), equipamento composto por um cromatógrafo a gás (DANI 1000, Contone, Suíça), equipado com um injetor split/splitless e um detector de ionização de chama (FID) (**Figura 12**).

A separação foi realizada usando uma coluna de Macherey–Nagel (Düren, Alemanha) (50% de cianopropil-metil-50% de fenilmetilpolisiloxano, 30 m × 0,32 mm i.d. × 0,25 µm df). O programa de temperatura do forno foi o seguinte: a temperatura inicial da coluna foi de 50 °C, mantida por 2 min, depois uma rampa de 30 °C/min até 125 °C, rampa de 5 °C/min até 160 °C, rampa de 20 °C/min até 180 °C, rampa de 3 °C/min até 200 °C, rampa de 20 °C/min até 220 °C, mantida por 15 min. O fluxo do gás portador (hidrogénio) foi de 4,0 mL/min (0,61 bar), medido a 50 °C. A injeção (1:40) foi realizada a 250 °C. A identificação foi realizada comparando os tempos de retenção relativos dos ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) das amostras com os padrões comerciais. A quantificação foi realizada no software Clarity 4.0.1.7 (DataApex), sendo os resultados expressos em percentagens relativas de cada ácido gordo.



*Figura 12 - Equipamento GC-FID utilizado para separação e identificação de ácidos gordos.*

### **3.5 Tocoferóis**

Os extratos foram obtidos após seis ciclos completos de extração em Soxhlet. Do extrato foram retirados 20  $\mu$ L para análise de tocoferóis, 0,25 g para esteróis e 1 mL para avaliação da atividade hipocolesterolémica.

Após retirar o volume necessário, as amostras foram colocadas sob uma corrente de azoto de forma a eliminar resíduos de éter de petróleo. Em seguida, o extrato foi dissolvido em 2 mL de hexano HPLC e filtrado para um vial.

As isoformas da vitamina E foram separadas pelo equipamento de HPLC acima mencionado e descrito (secção 3.3), de acordo com um procedimento previamente descrito por outros autores (Amaral, Casal, Torres, Seabra, & Oliveira, 2005). A análise foi realizada acoplando-se um detector de fluorescência (FP-2020; Jasco, Easton, MD, EUA), programado para excitação a 290 nm e emissão a 330 nm. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna de fase normal de Poliamida II (5  $\mu$ m, 250  $\times$  4,6 mm) da YMC Waters (YMC America, Inc., Allentown, PA, EUA) a operar a 30 °C. A fase móvel utilizada foi uma mistura de *n*-hexano e acetato de etilo (70:30, v/v) com um fluxo de 1 mL/min. Os picos detetados foram comparados com padrões comerciais, sendo a quantificação baseada no sinal de fluorescência, utilizando o método do padrão interno (tocol). Os resultados foram expressos em mg/100 g de peso fresco (mg/100g pf).

### 3.6 Esteróis

A composição em esteróis foi avaliada por GC-MS de acordo com o método NP EN ISO 12228 (12228, 1999). A fração insaponificável foi isolada por separação em coluna de óxido de alumínio (preparada com 10 g de óxido de alumínio, misturados com 20 mL de etanol). Após a decantação do óxido de alumínio, o solvente foi desprezado até ao topo da camada de óxido.

Para a extração da matéria insaponificável, resumidamente, 0,25 g de óleo extraído por Soxhlet foram saponificados com 5 mL de solução etanólica de hidróxido de potássio num balão volumétrico; o conteúdo foi levado à ebulição durante quinze minutos. Após este período, o aquecimento foi interrompido e foram adicionados 5 mL de etanol ao balão volumétrico. Em seguida, foi retirada uma alíquota de 5 mL da solução presente no balão para adicionar ao interior da coluna de óxidos de alumínio; o eluído foi recolhido para um novo balão até que a solução atingisse o topo da camada de óxido de alumínio. A matéria insaponificável foi eluída primeiro com 5 mL de etanol e, depois, com 30 mL de éter dietílico. Por fim, o evaporador rotativo foi utilizado para a remoção de solventes.

Para a preparação dos trimetilsililéteres foram adicionados 2 mL de éter dietílico ao extrato obtido e realizados dois testes (com e sem piridina). Assim, foram colocados em *vials* de reação 500 µL do extrato dissolvido e o solvente foi evaporado em estufa (80 °C, 30 min). De seguida, foi adicionada piridina (125 µL) a dois dos *vials* e 125 µL do reagente de sililação N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA). Nos frascos sem piridina, adicionou-se 1 mL do reagente de sililação. Após preparação dos tubos de reação, as amostras foram injetadas no cromatógrafo gasoso.

O sistema de cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massa, consistiu num GC-2010 Plus (Shimadzu) com injetor automático AOC-20iPlus (Shimadzu), com a coluna SH-RXi-5ms (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm; Shimadzu, USA). O programa de temperatura do forno foi o seguinte: temperatura inicial de 260 °C, em seguida aumentou-se a temperatura 2 °C/min até 300 °C e manteve-se durante 12 min. O volume da amostra injetado correspondeu a 1 µL, com uma razão de split 1:30; utilizou-se hélio como gás de arrasto, com fluxo ajustado a uma velocidade linear de 30 cm/s. A temperatura do injetor foi de 270 °C, a da interface de 270 °C e a temperatura da fonte iónica foi 220 °C. A energia de ionização foi 70 eV, tendo-se utilizado uma faixa de varrimento de 30-600 u, com tempo de varrimento 0,3 s. A identificação dos compostos foi baseada na comparação dos espectros obtidos com os da biblioteca espectral de massa NIST 17.

### 3.7 Atividade Hipocolesterolémica

A atividade inibidora de HMGR do extrato e dos padrões (ergosterol e pravastatina) é determinada com base em medições espectrofotométricas utilizando o kit de ensaio HMGR (Sigma Aldrich). A Pravastatina (Sigma-Aldrich Co.) é utilizada como controlo positivo e o tampão de ensaio como controlo negativo. A inibição da HMGR (%) é calculada utilizando-se a seguinte expressão: % de inibição = (controlo de absorvância - teste de absorvância)/controlo de absorvância × 100 (Baskaran et al., 2015; Silva et al., 2018).

### 3.8 Análise Estatística

Os resultados obtidos ao longo dos diferentes estudos de avaliação foram analisados através da aplicação de diferentes ferramentas estatísticas, selecionadas de acordo com os resultados e considerando os objetivos definidos da pesquisa. Para a comparação entre os efeitos dos diferentes tratamentos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) a um fator, tendo sido utilizado o teste de Tukey ou o de Tamhane's T2, quando se verificou (através do teste de Levene) homogeneidade ou heterogeneidade das variâncias, respetivamente. Antes dos testes de variância, a normalidade das distribuições foi verificada através do teste de Shapiro-Wilks. O software utilizado foi o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 22 (IBM Corporation, Nova York, EUA). Todos os resultados foram expressos como valores médios±desvios padrão (DP), mantendo as casas decimais permitidas pela magnitude do desvio padrão. Todos os testes foram realizados com nível de significância de 5%. Para todos os métodos, três amostras foram misturadas para ter um *pool* representativo e todos os ensaios foram realizados em triplicado.

## IV. Resultados e Discussão

### 4.1 Avaliação Nutricional

A análise da avaliação nutricional dos frutos (**Tabelas 6 e 7**), permite constatar que, tanto as amêndoas quanto as avelãs, são constituídas maioritariamente por gordura, com valores de cerca de 55%, expressos em peso fresco. Em ambos os casos, as linhas de controlo foram as que apresentaram um maior teor em gordura, com  $56 \pm 1$  g/100 g pf para as amêndoas e  $57 \pm 1$  g/100g pf para as avelãs, embora todos valores estejam dentro dos intervalos citados na literatura (**Tabela 2**). Não se registaram diferenças significativas associadas ao tipo de tratamento de suplementação no solo.

O teor em proteína foi semelhante entre os dois frutos avaliados, com valores próximos de 15 g/100 g do peso dos frutos. As cinzas e a humidade são os constituintes presentes em menor quantidade, representando, cada um, cerca de 3 g/100 g pf da composição dos frutos. O teor em hidratos de carbono situou-se próximo dos 24 g/100 g pf, em ambos os frutos.

As avelãs possuem um valor energético elevado, tendo a linha de controlo apresentado o maior valor,  $667 \pm 5$  kcal/100g pf, enquanto a Linha de Tratamento 2 (NPK + Boro) apresentou o menor, com  $638,6 \pm 7,1$  kcal/100g pf. Da mesma forma, as amêndoas possuem um valor energético semelhante, tendo os frutos da linha de controlo apresentado maior energia,  $658,3 \pm 7,4$  kcal/100g pf, enquanto os frutos tratados com fitoalgas green apresentaram menor energia, com  $645 \pm 6$  kcal/100 g pf. As diferenças registadas devem-se, sobretudo, aos teores de gordura das amostras avaliadas. Apesar das amostras provirem de origem geográfica diferente, os resultados obtidos são muito semelhantes aos valores da literatura apresentados na **Tabela 2**.

O baixo teor de humidade encontrado é importante para manter a qualidade e o prazo de validade dos frutos secos, já que a baixa humidade diminui a probabilidade de crescimento microbiano, germinação prematura das sementes e muitas alterações bioquímicas indesejáveis normalmente associadas a esses processos (Venkatachalan & Sathe, 2006). Um estudo recente sobre a composição química de frutos secos observou uma variação considerável no teor de proteínas (variando de 1,4 a 9,6%), dependendo do local de cultivo e da cultivar (Pereira-Lorenzo, Ramos-Cabrer, Díaz-Hernández, Ciordia-Ara, & Ríos-Mesa, 2006).

**Tabela 6** - Avaliação nutricional das diferentes linhas de tratamento de amêndoas (média±desvio padrão).

|                        | <b>Humidade</b><br>(g/100 g pf) | <b>Gordura total</b><br>(g/100 g pf) | <b>Cinzas</b><br>(g/100 g pf) | <b>Proteína Total</b><br>(g/100 g pf) | <b>Hidratos de carbono</b><br>(g/100 g pf) | <b>Energia</b><br>(kcal/100g pf) |
|------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|--|----------------------------------|
| <b>Controlo</b>        | 3,3±0,1 <sup>a</sup>            | 56±1 <sup>a</sup>                    | 2,4±0,2                       | 14,6±0,3 <sup>ab</sup>                | 24±1 <sup>b</sup>                          | 658±7 <sup>a</sup>               |
| <b>Fitoalgas green</b> | 3,5±0,1 <sup>a</sup>            | 54±1 <sup>b</sup>                    | 2,4±0,2                       | 14,1±0,5 <sup>b</sup>                 | 26±1 <sup>a</sup>                          | 645±6 <sup>b</sup>               |
| <b>Tradebor</b>        | 3,1±0,2 <sup>b</sup>            | 55±2 <sup>ab</sup>                   | 2,4±0,2                       | 14,8±0,5 <sup>a</sup>                 | 25±1 <sup>ab</sup>                         | 653±11 <sup>ab</sup>             |
| <b>Sprint Plus</b>     | 3,3±0,2 <sup>a</sup>            | 55±2 <sup>ab</sup>                   | 2,3±0,1                       | 14,1±0,4 <sup>b</sup>                 | 26±1 <sup>ab</sup>                         | 654±9 <sup>ab</sup>              |
| <b>Boro + borax</b>    | 3,3±0,1 <sup>a</sup>            | 55±2 <sup>ab</sup>                   | 2,3±0,2                       | 14,1±0,5 <sup>b</sup>                 | 25±2 <sup>ab</sup>                         | 652±8 <sup>ab</sup>              |

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ );

**Tabela 7** - Avaliação nutricional das diferentes linhas de tratamento de avelãs (média±desvio padrão).

|                                     | <b>Humidade</b><br>(g/100 g pf) | <b>Gordura total</b><br>(g/100 g pf) | <b>Cinzas</b><br>(g/100 g pf) | <b>Proteína Total</b><br>(g/100 g pf) | <b>Hidratos de carbono</b><br>(g/100 g pf) | <b>Energia</b><br>(kcal/100g pf) |
|-------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|--|----------------------------------|
| <b>Boro (Controlo)</b>              | 2,4± 0,2 <sup>ad</sup>          | 57±1 <sup>a</sup>                    | 2,7±0,1 <sup>ab</sup>         | 14,7±0,5 <sup>a</sup>                 | 23±1 <sup>a</sup>                          | 667±5 <sup>b</sup>               |
| <b>NPK + Boro</b>                   | 3,0±0,2 <sup>c</sup>            | 53±1 <sup>b</sup>                    | 3,3±0,2 <sup>b</sup>          | 16,3±0,5 <sup>c</sup>                 | 24±1 <sup>a</sup>                          | 639±7 <sup>a</sup>               |
| <b>NPK + Boro + Fitoalgas green</b> | 3,1±0,1 <sup>c</sup>            | 53±3 <sup>bc</sup>                   | 3,0±0,2 <sup>b</sup>          | 15,1±0,1 <sup>ab</sup>                | 23±1 <sup>a</sup>                          | 642±17 <sup>ac</sup>             |
| <b>Boro + Sprint Plus</b>           | 2,4±0,1 <sup>a</sup>            | 56±2 <sup>a</sup>                    | 3,0±0,2 <sup>b</sup>          | 15,7±0,3 <sup>bc</sup>                | 24±1 <sup>a</sup>                          | 660±12 <sup>b</sup>              |
| <b>NPK + Boro + Sprint Plus</b>     | 2,6±0,1 <sup>bd</sup>           | 55±1 <sup>abc</sup>                  | 2,2±0,1 <sup>a</sup>          | 15,8±0,5 <sup>c</sup>                 | 24±1 <sup>a</sup>                          | 655±7 <sup>bc</sup>              |
| <b>Boro + Fitoalgas green</b>       | 2,7±0,2 <sup>b</sup>            | 56±1 <sup>ac</sup>                   | 3,0±0,1 <sup>b</sup>          | 14,7±0,3 <sup>a</sup>                 | 24±1 <sup>a</sup>                          | 656±7 <sup>bc</sup>              |

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ );

## 4.2 Açúcares Solúveis

Os resultados obtidos para os açúcares solúveis estão apresentados nas **Tabelas 8 e 9**. A sacarose (**Figura 13**) foi o único açúcar identificado em ambos os frutos, sendo que o teor total em açúcares para as amêndoas foi de aproximadamente  $12 \pm 1$  g/100 g pf e para as avelãs  $16 \pm 2$  g/100 g pf. O tratamento com Tradebor resultou num maior teor em sacarose para no caso da amêndoa ( $13 \pm 1$  g/100 g pf), tendo-se verificado um resultado análogo para a avelã ( $18 \pm 1$  g/100 g pf) quando foi utilizado o tratamento com NPK + Boro + Fitoalgas green. A predominância da sacarose nestes frutos também foi encontrada por outros autores (Alasalvar, Shahidi, Liyanapathirana, & Ohshima, 2003; Botta, Gianotti, Richardson, Suwanagul, & Sanz, 1994).

Regra geral, baixos níveis de monossacarídeos (frutose e glucose, por exemplo) nos frutos secos servem como um indicador das boas condições de armazenamento dos produtos (Messerli M. Shejbal J. Vitali F. Keme T. Bioteknisk Inst., 1983).

Sabe-se que o teor de açúcar dos frutos secos varia consideravelmente, dependendo das condições de cultivo, maturidade das sementes, cultivar e local de crescimento (Venkatachalan & Sathe, 2006). O alto teor de sacarose presente nos frutos pode ser devido à formação preferencial deste açúcar com a maturação, ou seja, uma colheita tardia resulta em frutos com maior teor de açúcar devido à acumulação de sacarose com a maturação e a produção preferencial de sacarose a partir de outros açúcares, os quais diminuem significativamente. Portanto, provavelmente a composição do açúcar depende da cultivar e da maturidade (Nanos et al., 2002).

**Tabela 8** - Teor de sacarose (g/100 g pf) das amostras de amêndoas (média±desvio padrão).

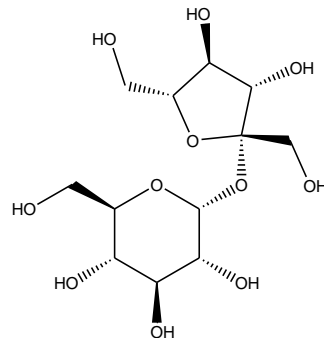
| Amostra         | Sacarose (g/100 g pf) |
|-----------------|-----------------------|
| Controlo        | $11,5 \pm 0,2^b$      |
| Fitoalgas green | $12 \pm 1^c$          |
| Tradebor        | $13 \pm 1^a$          |
| Sprint Plus     | $11,0 \pm 0,3^b$      |
| Boro + borax    | $11,6 \pm 0,5^{bc}$   |

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 9** - Teor de sacarose (g/100 g pf) das amostras de avelãs (média±desvio padrão).

| Amostra                      | Sacarose (g/100 g pf) |
|------------------------------|-----------------------|
| Boro (Controlo)              | $14 \pm 1^d$          |
| NPK + Boro                   | $15,3 \pm 0,4^c$      |
| NPK + Boro + Fitoalgas green | $18 \pm 1^a$          |
| Boro + Sprint Plus           | $17 \pm 1^b$          |
| NPK + Boro + Sprint Plus     | $17 \pm 1^b$          |
| Boro + Fitoalgas green       | $15,0 \pm 0,5^{cd}$   |

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 13** – Fórmula estrutural da sacarose.

### 4.3 Ácidos gordos

A composição média dos ácidos gordos maioritários (**Figura 14**) do óleo extraído das amêndoas e avelãs encontra-se nas **Tabelas 10 e 11**, respectivamente. O ácido oleico (C18:1n9) representa cerca de 70% dos ácidos gordos que compõem o óleo de ambos frutos (**Figura 14c**), seguido do ácido linoleico (C18:2n6) com valores entre os 16% nas amêndoas e os 13,5% nas avelãs (**Figura 14d**). Os ácidos gordos que se seguem são o ácido palmítico (C16:0), o qual variou entre de 8,5% nas amêndoas e 9% nas avelãs (**Figura 14a**) e, por fim, o ácido esteárico (C18:0), com valores de aproximadamente 2% para ambos os frutos (**Figura 14b**). Os resultados incluem somente os ácidos gordos principais; no entanto, outros ácidos gordos foram detetados em percentagens vestigiais (soma total inferior a 2%), sendo estes: ácido mirístico (C14:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido margárico (C17:0), ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3n3), ácido araquidónico (C20:0) e ácido eicosenóico (C20:1) (**Figuras 15a e 15b**). Diferenças significativas foram encontradas entre as concentrações de ácidos gordos das diferentes linhas de tratamento, especialmente nas concentrações de ácido palmítico e esteárico das avelãs ( $p < 0,05$ ).

Não se registaram diferenças significativas associadas ao tipo de tratamento de suplementação no solo nas amostras de amêndoa. Já para as amostras de avelã, o controlo (Boro) apresentou o maior valor de AGMI, nomeadamente ácido oleico (74%), enquanto a o tratamento com NPK + Boro apresentou o maior valor de AGPI (*i.e.*, ácido linoleico), próximo de 15%. Por último, o tratamento com Boro + Sprint Plus apresentou os maiores valores de AGS, com 9,4% para o ácido palmítico e 2,7% para o ácido esteárico.

Os AGMI foram maioritários em todo os casos, seguidos dos AGPI e dos AGS, o que é concordante com outros trabalhos (Alasalvar et al., 2006; Derewiaka et al., 2014; Karaman et al., 2015; Memon et al., 2019; Javier Parcerisa, Richardson, Rafecas, Codony, & Boatella, 1998a).

A composição de ácidos gordos dos extratos de frutos secos pode apresentar uma ligeira, mas natural, variabilidade quando a mesma espécie é considerada. Dessa forma, as oscilações entre os resultados são devidas, provavelmente, às condições edafoclimáticas, uma vez que a composição em ácidos gordos das espécies vegetais pode variar dentro da mesma espécie em função da cultivar, condições ambientais do local de produção, clima, entre outros. Além da cultivar (fatores genéticos), fatores ambientais como o ano de produção e o local de cultivo também influenciam fortemente o perfil lipídico dos extratos (Amaral, Cunha, et al., 2006; O'Brien, 2003; Venkatachalan & Sathe, 2006). Há, também, relatos na literatura de que o aumento da temperatura durante as estações de crescimento, principalmente nos meses de verão, causam alterações na composição de ácidos gordos (Cristofori, Ferramondo, Bertazza, & Bignami, 2008).

Num estudo com cultivares portuguesas de avelã, por exemplo, verificara-se ligeiras variações na composição de ácidos gordos: ácido palmítico (4,8-6,7%), oleico (76,7-82,8%) e linoleico (7,2-11,4%) (Amaral, Casal, et al., 2006).

Já em cultivares gregas de amêndoa obtidas com diferentes métodos de irrigação, a percentagem de ácido oleico variou entre 70 a 80%, uma quantidade superior à encontrada neste estudo (cerca de 69%). O teor em ácido linoleico apresenta maior variabilidade natural, normalmente entre 10 a 17%, intervalo que inclui o valor encontrado neste estudo (16%). Já o ácido palmítico detetado nas amostras de amêndoa ensaiadas foi um pouco superior (aproximadamente 8,5%) ao indicado noutros estudos (5,5 a 6,5%) (Nanos et al., 2002).

Sabe-se que, independentemente do tipo de fruto seco, o ácido oleico e o ácido linoleico são os contribuintes predominantes na composição dos AGMIs e AGPIs, respetivamente, bem como do total de lípidos do fruto (Venkatachalan & Sathe, 2006). O alto teor de ácido oleico torna os frutos secos muito importantes para a dieta humana, já que o ácido oleico é conhecido por reduzir o colesterol LDL, sem alterar os níveis benéficos de HDL (Fraser & Ch, 1999). Assim, devido à alta proporção de ácidos gordos insaturados encontrados nos frutos secos, sua adição aos alimentos processados pode melhorar a qualidade nutricional dos alimentos (Bonvehí & Coll, 1993b; Ebrahim et al., 1994).

A composição de ácidos gordos dos frutos secos é importante sob várias perspetivas, incluindo a qualidade nutricional, os possíveis benefícios para a saúde dos AGMIs e AGPIs, especialmente em relação ao perfil lipídico sérico no sangue (principalmente a diminuição de VLDLs e LDLs), aromas desejáveis e contribuição para a textura (Venkatachalan & Sathe, 2006).

**Tabela 10** - Composição em ácidos gordos (percentagem relativa) do óleo extraído de amostras de amêndoas (média±desvio padrão).

|                | Controlo              | Fitoalgas green       | Tradebor             | Sprint Plus           | Boro + borax         |
|----------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| <b>C16:0</b>   | 8,5±0,5 <sup>ab</sup> | 8,4±0,5 <sup>ab</sup> | 7,9±0,5 <sup>b</sup> | 8,5±0,3 <sup>ab</sup> | 8,8±0,5 <sup>a</sup> |
| <b>C18:0</b>   | 1,9±0,1 <sup>ab</sup> | 1,9±0,1 <sup>ab</sup> | 2,0±0,1 <sup>b</sup> | 1,9±0,1 <sup>ab</sup> | 1,9±0,1 <sup>a</sup> |
| <b>C18:1n9</b> | 69±1                  | 69±1                  | 69±1                 | 69±1                  | 69±1                 |
| <b>C18:2n6</b> | 16,7±0,5              | 16,3±0,3              | 16,5±0,5             | 16,7±0,5              | 16,6±0,1             |

AGS=C16:0 + C18:0; AGMI=C18:1n9; AGPI=C18:2n6;

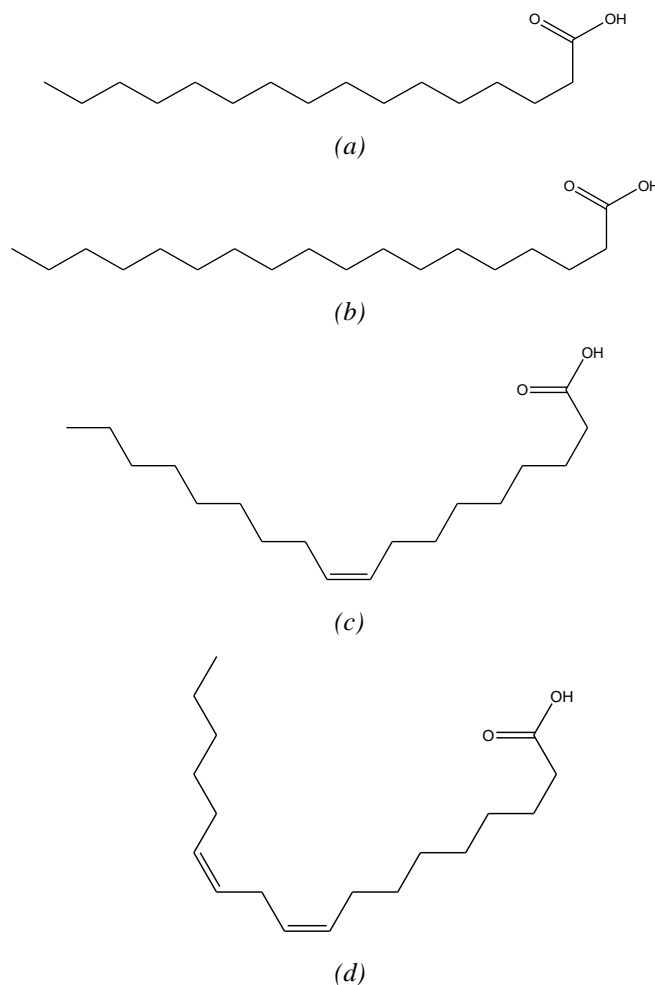
Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) enquanto a ausência indica que não há diferenças;

**Tabela 11** - Composição em ácidos gordos (percentagem relativa) do óleo extraído de amostras de avelãs (média ± desvio padrão).

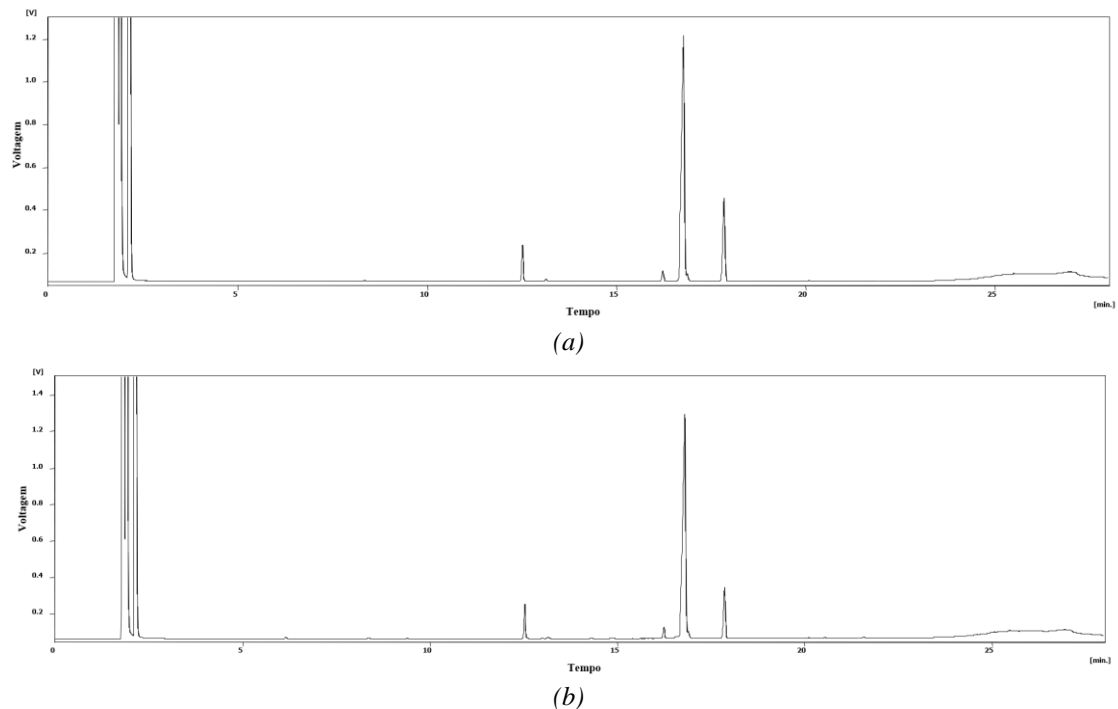
|                | Boro (Controlo)       | NPK + Boro             | NPK + Boro + Fitoalgas green | Boro + Sprint Plus    | NPK + Boro + Sprint Plus | Boro + Fitoalgas green |
|----------------|-----------------------|------------------------|------------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|
| <b>C16:0</b>   | 8,5±0,3 <sup>a</sup>  | 8,8±0,4 <sup>abc</sup> | 8,7±0,3 <sup>ac</sup>        | 9,4±0,5 <sup>b</sup>  | 9,3±0,5 <sup>bc</sup>    | 9,0±0,5 <sup>abc</sup> |
| <b>C18:0</b>   | 2,4±0,1 <sup>c</sup>  | 2,1±0,1 <sup>b</sup>   | 2,3±0,1 <sup>c</sup>         | 2,7±0,1 <sup>a</sup>  | 2,0±0,2 <sup>b</sup>     | 2,4±0,2 <sup>c</sup>   |
| <b>C18:1n9</b> | 74,0±0,3 <sup>a</sup> | 70±2 <sup>b</sup>      | 71±1 <sup>bc</sup>           | 70±1 <sup>b</sup>     | 71±1 <sup>bc</sup>       | 72,3±0,3 <sup>c</sup>  |
| <b>C18:2n6</b> | 11,4±0,4 <sup>b</sup> | 15±1 <sup>a</sup>      | 14±1 <sup>a</sup>            | 14,1±0,5 <sup>a</sup> | 13,9±0,4 <sup>a</sup>    | 12,3±0,3 <sup>b</sup>  |

AGS=C16:0 + C18:0; AGMI=C18:1n9; AGPI=C18:2n6;

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ );



**Figura 14** - Fórmulas estruturais dos ácidos gordos identificados nos óleos extraídos de amostras de amêndoas e avelãs: (a) ácido palmítico (C16:0), (b) ácido esteárico (C18:0), (c) ácido oleico (C18:1n9), (d) ácido linoleico (C18:2n6).



**Figura 15** – Cromatograma de ácidos gordos para as amostras das linhas de controle de (a) amêndoa (b) avelã; (A escala do cromatograma foi alterada para que fosse possível a visualização dos ácidos gordos minoritários – de forma que os ácidos gordos maioritários saem do limite da imagem)

#### 4.4 Tocoferóis

Elevados níveis de tocoferóis foram encontrados nas amostras e, embora o  $\alpha$ -tocoferol seja o vitâmero predominante, também foram detectadas quantidades vestigiais de  $\beta$ -tocoferol e  $\gamma$ -tocoferol (**Figura 16**), conforme apresentado nas **Tabelas 12 e 13**. Devido aos altos níveis de  $\alpha$ -tocoferol nas amêndoas e avelãs, o consumo desses produtos pode aumentar significativamente os níveis de vitamina E na dieta (Hogarty, Ang, & Eitenmiller, 1989). O tratamento com fitoalgas green permitiu o maior nível de todos os vitâmeros (56 mg/100 g pf) para as amêndoas, enquanto o NPK + Boro + Fitoalgas green teve o mesmo efeito para os tocoferóis totais das avelãs (28 mg/100 g pf), embora sem atingir os valores máximos em todos os vitâmeros individuais. De referir que os conteúdos reportados por outros autores são semelhantes (Hogarty et al., 1989; Kodad et al., 2014; J. Parcerisa et al., 1995; Javier Parcerisa, Richardson, Rafecas, Codony, & Boatella, 1998b; Taş & Gökmen, 2015).

Estudos de outros autores revelam que o efeito redutor de colesterol causado pela vitamina E em humanos é consistente com observações anteriores em modelos animais. A magnitude do efeito é menor nos seres humanos, possivelmente devido à falta de controlo da dieta (Qureshi et al., 1991). Sendo assim, é possível que a vitamina E tenha um papel importante no controle de hipercolesterolemia por ser um antioxidante muito eficiente e

inibir a oxidação do LDL. Além disso, são derivados de produtos alimentares naturais, são facilmente administradas e podem ter menos efeitos colaterais do que muitos outros medicamentos (Jun Yang, 2009).

Autores relataram teores totais de tocoferol de cinco variedades nativas de avelã entre 36,3 e 46,9 mg/100 g de óleo, sendo a maior parte  $\alpha$ -tocopherol (Alasalvar, Amaral, Satır, & Shahidi, 2009b). Outros estudos compararam o teor de  $\alpha$ -tocopherol de vários óleos e mostraram que, após o óleo de girassol (40,3-93,5 mg/100 g) e o óleo de milho (23-57,3 mg/100 g), o óleo de avelã ficou em terceiro lugar entre os óleos testados, variando de 32,9 a 44,8 mg/100 g de óleo, obtendo-se valores superiores aos resultados obtidos neste estudo. A razão para a diferença no conteúdo de tocoferóis e tocotrienóis pode ser atribuída aos fatores genéticos e a diferença entre as colheitas afetadas principalmente pelas mudanças climáticas (Benitez-Sánchez, León-Camacho, & Aparicio, 2003; Taş & Gökmen, 2015), origem geográfica, clima, ano de colheita, condições de armazenamento, condições de cultura e tipo de solo (Alasalvar et al., 2006), ou metodologia analítica (Derewiaka et al., 2014).

Estudos compararam o teor de vitamina E em sementes de girassol e alguns frutos secos e, dependendo da metodologia, obtiveram que a saponificação das amostras aumentou o conteúdo de  $\alpha$ -tocopherol e diminuiu outros conteúdos de homólogos (Delgado-Zamarreño, Bustamante-Rangel, Sánchez-Pérez, & Hernández-Méndez, 2001).

**Tabela 12** - Teor de tocoferóis (mg/100 g pf) do óleo extraído das amostras de amêndoa (média±desvio padrão).

|                                       | Controlo             | Fitoalgas green      | Tradebor             | Sprint Plus           | Boro + borax          |
|---------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b><math>\alpha</math>-tocopherol</b> | 44±1 <sup>b</sup>    | 48±4 <sup>a</sup>    | 42±3 <sup>bc</sup>   | 44±3 <sup>b</sup>     | 40±1 <sup>c</sup>     |
| <b><math>\beta</math>-tocopherol</b>  | 0,8±0,1 <sup>a</sup> | 0,8±0,1 <sup>a</sup> | 0,6±0,1 <sup>b</sup> | 0,7±0,1 <sup>ab</sup> | 0,7±0,1 <sup>ab</sup> |
| <b><math>\gamma</math>-tocopherol</b> | 3,5±0,3 <sup>c</sup> | 4,2±0,3 <sup>a</sup> | 3,0±0,3 <sup>b</sup> | 3,3±0,2 <sup>c</sup>  | 3,5±0,3 <sup>c</sup>  |
| <b>Tocopherois Totais</b>             | 47±2 <sup>c</sup>    | 56±5 <sup>a</sup>    | 43±3 <sup>b</sup>    | 48±3 <sup>c</sup>     | 42±2 <sup>b</sup>     |

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ );

**Tabela 13** - Teor de tocoferóis (mg/100 g pf) do óleo extraído de amostras de avelãs (média ± desvio padrão)

|                                       | Boro<br>(Controlo)     | NPK + Boro              | NPK + Boro +<br>Fitoalgas green | Boro + Sprint<br>Plus   | NPK + Boro<br>+ Sprint Plus | Boro +<br>Fitoalgas green |
|---------------------------------------|------------------------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| <b><math>\alpha</math>-tocopherol</b> | 22±1 <sup>b</sup>      | 22±2 <sup>b</sup>       | 26±1 <sup>a</sup>               | 25±2 <sup>a</sup>       | 24±2 <sup>ab</sup>          | 22±1 <sup>b</sup>         |
| <b><math>\beta</math>-tocopherol</b>  | 0,55±0,04 <sup>d</sup> | 0,70±0,04 <sup>b</sup>  | 0,73±0,05 <sup>ab</sup>         | 0,86±0,04 <sup>a</sup>  | 0,66±0,03 <sup>c</sup>      | 0,73±0,05 <sup>ab</sup>   |
| <b><math>\gamma</math>-tocopherol</b> | 0,73±0,02 <sup>c</sup> | 0,82±0,05 <sup>ab</sup> | 0,76±0,05 <sup>bc</sup>         | 0,82±0,04 <sup>ab</sup> | 0,79±0,05 <sup>abc</sup>    | 0,85±0,05 <sup>a</sup>    |
| <b>Tocopherois Totais</b>             | 23±1 <sup>b</sup>      | 23±2 <sup>b</sup>       | 28±1 <sup>a</sup>               | 27±2 <sup>a</sup>       | 26±2 <sup>ab</sup>          | 23±1 <sup>b</sup>         |

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ );



**Figura 16** - Fórmulas estruturais dos tocoferóis identificados nos óleos extraídos de amostras de amêndoas e avelãs (a)  $\alpha$ -tocoferol (b)  $\beta$ -tocoferol (c)  $\gamma$ -tocoferol.

#### 4.5 Esteróis

Testes preliminares qualitativos foram efetuados comprovando-se a presença de colesterol, campesterol,  $\beta$ -sitosterol, isofucosterol e  $\beta$ -sitostanol nas amostras de amêndoa analisadas, mas para as quais não foi possível determinar as quantidades exatas. No caso do presente estudo, o perfil básico de esteróis foi determinado utilizando o reagente BSTFA. No entanto, segundo a bibliografia, o reagente ideal para o uso é o BSTFA+1% TCMS. Sendo assim, o ideal para estudos futuros é otimizar a caracterização com ambos reagentes e aplicá-los às amostras de amêndoa e avelã. No caso da avelã, foi já assinalada a presença de  $\Delta^5$ -avenasterol, clerosterol e estigmasterol, além dos esteróis citados anteriormente, ainda com a predominância da presença de  $\beta$ -sitosterol (Amaral, Casal, Pereira, Seabra, & Oliveira, 2003; Wang, Wang, Xiao, & Xu, 2019). As diferenças de resultados no perfil de esteróis podem ser explicadas porque a distribuição de esterol é bastante típica para cada família de plantas e a avaliação do conteúdo total de esterol e do perfil de esterol pode ser uma boa ferramenta para avaliar a autenticidade (Kamm, Dionisi, Hischenhuber, & Engel, 2001).

A falta de resultados quantitativos não permitiu tirar conclusões sobre qual o melhor bioestimulante, tal como no caso dos tocoferóis. No entanto, o perfil destes compostos será estudado oportunamente, uma vez que os esteróis vegetais, principalmente o  $\beta$ -sitosterol e

o campesterol, são constituintes da membrana das plantas que reduzem efetivamente o risco sérico de colesterol LDL (Bl ha et al., 2003; Lei et al., 2017). Os esteróis vegetais, em geral, são de interesse, devido à sua atividade antioxidante e impacto na saúde, tendo sido recentemente adicionados aos óleos vegetais como um exemplo de um alimento funcional bem-sucedido (Wang et al., 2019).

#### **4.6 Atividade Hipocolesterolémica**

A confirmação da atividade hipocolesterolémica através do ensaio proposto na secção 3.7, não foi possível devido à ocorrência de precipitação dos extratos obtidos por Soxhlet durante a execução do procedimento. Assim, foi dedicada uma parte substancial do trabalho laboratorial à implementação de uma nova metodologia de análise da atividade hipocolesterolémica baseada em linhas celulares, cujos resultados não puderam ser obtidos em tempo útil para incluir nesta dissertação.

Resumidamente, na nova metodologia de análise iria ser utilizada a linha celular Caco2, com o objetivo de avaliar o conteúdo de colesterol absorvido pelas células. O meio de cultura seria substituído a cada 3 dias e as células seriam diferenciadas por 21 dias antes das experiências. A integridade da camada celular seria avaliada medindo a resistência elétrica transepitelial (TEER). A escolha da linha de células Caco2 justifica-se pois estas assemelham-se aos enterócitos que revestem o intestino delgado.

## V. Conclusões e perspectivas futuras

Em conclusão, as análises da composição química das amêndoas e avelãs indicaram que estes frutos possuem tipicamente baixa humidade e alto teor em gorduras e proteínas, além de serem frutos altamente energéticos. Os frutos secos demonstraram ser uma rica fonte de AGMIs e AGPIs, principalmente ácido oleico (cerca de 70%), o qual tem sido associado a efeitos benéficos para saúde, além da vantagem de apresentarem elevado teor de ácidos gordos insaturados. Verificou-se que as amêndoas tratadas com fitoalgas green e as avelãs tratadas com NPK + Boro + Fitoalgas green apresentaram os maiores teores totais em tocoferóis, sendo uma excelente fonte destes compostos. Os frutos secos estudados também contam com a presença de fitoesteróis, geralmente em altas quantidades, os quais são importantes compostos bioativos, devido a capacidade de inibir a absorção intestinal de colesterol. As diferenças observadas entre as linhas de tratamento parecem indicar uma ligeira vantagem decorrente da utilização das fitoalgas green para amêndoa e de NPK + Boro + Fitoalgas para avelã, mas esta conclusão deverá ser reforçada com estudos adicionais. A avaliação dos teores em triacilgliceróis e aminoácidos, por exemplo, poderiam ser úteis para esse fim, além da realização de testes lipofílicos para avaliar a atividade hipocolesterolémica. Além disso, a metodologia de extração de esteróis necessita de ser otimizada com o uso do reagente ideal sugerido pela norma, processo que está a ser efetuado, para obtenção de resultados quantitativos.

De facto, os resultados obtidos confirmam que as amêndoas e avelãs são uma boa fonte de compostos saudáveis, o que poderá aumentar o seu valor comercial. Adicionalmente, a utilização destes frutos como fonte adjuvante dos atuais agentes hipocolesterolémicos poderá trazer vantagens, quer através do seu consumo direto, quer através da extração desses compostos e introdução em novas formulações alimentares ou nutracêuticas. De referir que determinadas condições de cultivo e técnicas de extração podem afetar o valor nutricional e perfil químico no geral dos frutos. Os resultados do presente trabalho e de outros autores demonstram que o perfil lipídico dos frutos pode ser influenciado por diferenças varietais, bem como pelas condições geográficas e climáticas. Portanto, é relativamente imprevisível definir condições climáticas ou características genéticas como fator de influência predominante. Este facto pode assim dificultar o objetivo de definir uma linha de tratamento específica mais adequada.

Contudo, e embora a sua composição química possa diferir em função da variedade e condições edafoclimáticas, o perfil mantém-se mais ou menos constante (*i.e.* predominância de ácidos gordos insaturados e presença de fitosteróis), pelo que os frutos em estudo devem ser considerados como benéficos e redutores do risco crescente de doença cardíaca coronária na população.

Por fim, importa referir que este trabalho também representa uma contribuição para a caracterização das amêndoas e avelãs cultivadas em Portugal, nomeadamente no Nordeste Transmontano, tendo importância a diferentes níveis do ponto de vista nutricional, processos tecnológicos e aplicações. Dessa forma, os dados obtidos também podem ser úteis na atualização ou criação de bases de dados e tabelas de composição disponíveis acerca da composição química destes frutos.

## VI. Referências bibliográficas

- 12228, N. E. I. (1999). *Animal and vegetable fats and oils - Determination of individual and total sterols contents - Gas chromatographic method.*
- Abbey, M., Noakes, M., Belling, G. B., & Nestel, P. J. (1994). Partial replacement of saturated fatty acids with almonds or walnuts lowers total plasma cholesterol and low-density-lipoprotein cholesterol. *American Journal of Clinical Nutrition*, 59(5), 995–999. <https://doi.org/10.1093/ajcn/59.5.995>
- Abidi, S. . (2001). Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *Journal of Chromatography A*, 935(1–2), 173–201. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00946-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00946-3)
- Ahonen, L., Keski-Rahkonen, P., Saarelainen, T., Paviola, J., Ketola, R. A., Auriola, S., ... Kostianen, R. (2012). Comparison of liquid chromatography-microchip/mass spectrometry to conventional liquid chromatography–mass spectrometry for the analysis of steroids. *Analytica Chimica Acta*, 721, 115–121. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2012.01.039>
- Alasalvar, C., Amaral, J. S., Satır, G., & Shahidi, F. (2009a). Lipid characteristics and essential minerals of native Turkish hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.). *Food Chemistry*, 113(4), 919–925. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.019>
- Alasalvar, C., Amaral, J. S., Satır, G., & Shahidi, F. (2009b). Lipid characteristics and essential minerals of native Turkish hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.). *Food Chemistry*, 113(4), 919–925. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.08.019>
- Alasalvar, C., Amaral, J. S., & Shahidi, F. (2006). Functional lipid characteristics of Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 10177–10183. <https://doi.org/10.1021/jf061702w>
- Alasalvar, C., Shahidi, F., Liyanapathirana, C. M., & Ohshima, T. (2003). Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). 1. Compositional characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(13), 3790–3796. <https://doi.org/10.1021/jf0212385>

- Alasalvar, C., Shahidi, F., Ohshima, T., Wanasundara, U., Yurttas, H. C., Liyanapathirana, C. M., & Rodrigues, F. B. (2003). Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). 2. Lipid characteristics and oxidative stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(13), 3797–3805. <https://doi.org/10.1021/jf021239x>
- Alkerwi, A. (2014). Diet quality concept. *Nutrition*, *30*(6), 613–618. <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2013.10.001>
- Amaral, J. S., Casal, S., Citová, I., Santos, A., Seabra, R. M., & Oliveira, B. P. P. (2006). Characterization of several hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars based in chemical, fatty acid and sterol composition. *European Food Research and Technology*, *222*(3–4), 274–280. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0068-0>
- Amaral, J. S., Casal, S., Pereira, J. A., Seabra, R. M., & Oliveira, B. P. P. (2003). Determination of Sterol and Fatty Acid Compositions, Oxidative Stability, and Nutritional Value of Six Walnut (*Juglans regia* L.) Cultivars Grown in Portugal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(26), 7698–7702. <https://doi.org/10.1021/jf030451d>
- Amaral, J. S., Casal, S., Torres, D., Seabra, R. M., & Oliveira, B. P. P. (2005). Simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in hazelnuts by a normal phase liquid chromatographic method. *Analytical Sciences*, *21*(12), 1545–1548. <https://doi.org/10.2116/analsci.21.1545>
- Amaral, J. S., Cunha, S. C., Santos, A., Alves, M. R., Seabra, R. M., & Oliveira, B. P. P. (2006). Influence of cultivar and environmental conditions on the triacylglycerol profile of hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(2), 449–456. <https://doi.org/10.1021/jf052133f>
- AOAC. (2016). Official Methods of Analysis of AOAC International. In *Association of Official Analysis Chemists International* (20th Editi).
- Aparicio, R., & Aparicio-Ruíz, R. (2000, June 9). Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, Vol. 881, pp. 93–104. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00355-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00355-1)

- Arranz, S., Cert, R., Pérez-Jiménez, J., Cert, A., & Saura-Calixto, F. (2008). Comparison between free radical scavenging capacity and oxidative stability of nut oils. *Food Chemistry*, *110*(4), 985–990. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.03.021>
- Arrobas, M. Â. R. A. B. M. (2018). A amendoeira: estado da produção - Revista Voz do Campo. *Voz Do Campo*. Retrieved from <http://vozdocampo.pt/2018/11/12/a-amendoeira-estado-da-producao/>
- Avcı, G., Kupeli, E., Eryavuz, A., Yesilada, E., & Kucukkurt, I. (2006). Antihypercholesterolaemic and antioxidant activity assessment of some plants used as remedy in Turkish folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, *107*(3), 418–423. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.03.032>
- Awad, A. B., Chan, K. C., Downie, A. C., Fink, C. S., Awad, A. B., Chan, K. C., ... Fink, C. S. (2017). Peanuts as a Source of  $\beta$ -Sitosterol, a Sterol With Anticancer Properties. *5581*(September), 5–9. <https://doi.org/10.1207/S15327914NC3602>
- Awad, A. B., & Fink, C. S. (2000). Phytosterols as Anticancer Dietary Components: Evidence and Mechanism of Action. *The Journal of Nutrition*, *130*(9), 2127–2130. <https://doi.org/10.1093/jn/130.9.2127>
- Awad, A. B., Williams, H., & Fink, C. S. (2001). Phytosterols reduce in vitro metastatic ability of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Nutrition and Cancer*, *40*(2), 157–164. [https://doi.org/10.1207/S15327914NC402\\_12](https://doi.org/10.1207/S15327914NC402_12)
- Azevedo Editor, J. (2003). *A Avelã Na Sua Alimentação*, Mirandela.
- Baek, A. E., Yu, Y.-R. A., He, S., Wardell, S. E., Chang, C.-Y., Kwon, S., ... Nelson, E. R. (2017). The cholesterol metabolite 27 hydroxycholesterol facilitates breast cancer metastasis through its actions on immune cells. *Nature Communications*, *8*(1), 864. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00910-z>
- Barbana, C., Claire, A., & Irene, J. (2011). In vitro binding of bile salts by lentil flours, lentil protein concentrates and lentil protein hydrolysates. *FRIN*, *44*(1), 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.045>
- Barreira, J., & Ferreira, I. (2015). Steroids in natural matrices: Chemical features and bioactive properties. In V. K. Gupta, M. G. Tuohy, A. O'Donovan, & M. Lohani

(Eds.), *Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications* (First Edit). John & Wiley & Sons.

Baskaran, G., Salvamani, S., Ahmad, S. A., Shaharuddin, N. A., Pattiram, P. D., & Shukor, M. Y. (2015). HMG-CoA reductase inhibitory activity and phytochemical investigation of *Basella alba* leaf extract as a treatment for hypercholesterolemia. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 509–517.  
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S75056>

Belguith-Hadriche, O., Bouaziz, M., Jamoussi, K., Simmonds, M. S. J., El Feki, A., & Makni-Ayedi, F. (2013). Comparative study on hypocholesterolemic and antioxidant activities of various extracts of fenugreek seeds. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1448–1453. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.11.003>

Benitez-Sánchez, P. L., León-Camacho, M., & Aparicio, R. (2003). A comprehensive study of hazelnut oil composition with comparisons to other vegetable oils, particularly olive oil. *European Food Research and Technology*, 218(1), 13–19.  
<https://doi.org/10.1007/s00217-003-0766-4>

Bernal, J., Mendiola, J. A., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2011). Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55(4), 758–774.  
<https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2010.11.033>

Blaha, V., Hypler, R., Solichov, D., Blaha, M., Solich, P., & Zadák, Z. (2003). 2P-0593 Lathosterol, sitosterol and campesterol as markers of cholesterol homeostasis post LDL-apheresis. *Atherosclerosis Supplements*, 4(2), 170.  
[https://doi.org/10.1016/s1567-5688\(03\)90732-x](https://doi.org/10.1016/s1567-5688(03)90732-x)

Blunden, G. (1991). *Agricultural uses of seaweeds and seaweed extracts*.

Bonvehí, J. S., & Coll, F. V. (1993a). Oil content, stability and fatty acid composition of the main varieties of Catalonian Hazelnuts (*Corylus avellana* L.). *Food Chemistry*, 48(3), 237–241. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(93\)90133-Z](https://doi.org/10.1016/0308-8146(93)90133-Z)

Bonvehí, J. S., & Coll, F. V. (1993b). Oil content, stability and fatty acid composition of the main varieties of Catalonian Hazelnuts (*Corylus avellana* L.). *Food Chemistry*, 48(3), 237–241. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(93\)90133-Z](https://doi.org/10.1016/0308-8146(93)90133-Z)

- Botta, R., Gianotti, C., Richardson, D., Suwanagul, A., & Sanz, C. L. (1994). Hazelnut Variety Organic Acids, Sugars, And Total Lipid Fatty Acids. *Acta Horticulturae*, (351), 693–699. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1994.351.77>
- Bouic, P. J. D. (2001, November). The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: A review of the past 10 years. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, Vol. 4, pp. 471–475. <https://doi.org/10.1097/00075197-200111000-00001>
- Brigelius-Flohé, R. (2006). Bioactivity of vitamin E. *Nutrition Research Reviews*, 19(2), 174–186. <https://doi.org/10.1017/S0954422407202938>
- Calder, P. C. (2015). Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, Vol. 1851, pp. 469–484. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.08.010>
- Carrilho, R. (n.d.). *A AVELEIRA*.
- Cercaci, L., Rodriguez-Estrada, M. T., & Lercker, G. (2003). Solid-phase extraction-thin-layer chromatography-gas chromatography method for the detection of hazelnut oil in olive oils by determination of esterified sterols. *Journal of Chromatography A*, 985(1–2), 211–220. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01397-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01397-3)
- Chen, Z.-Y., Jiao, R., & Ying Ma, K. (2008). Cholesterol-Lowering Nutraceuticals and Functional Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 8761–8773. <https://doi.org/10.1021/jf801566r>
- Chourfa, M., Abdallah, H. H., Allem, R., Noui, A., Picot-Allain, C. M. N., & Mahomoodally, F. (2019). Hypocholesterolaemic and antioxidant properties of *Olea europaea* L. leaves from Chlef province, Algeria using in vitro, in vivo and in silico approaches. *Food and Chemical Toxicology*, 123, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.002>
- Chourfa, Mohammed, & Allem, R. (2015). Study of hypocholesterolemic activity of Algerian *Pistacia lentiscus* leaves extracts in vivo. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(2), 142–144. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.02.011>

- Colombo, M. L. (2010, April). An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienol-perspectives. *Molecules*, Vol. 15, pp. 2103–2113.  
<https://doi.org/10.3390/molecules15042103>
- Copeman, L. A., & Parrish, C. C. (2004). Lipids classes, fatty acids, and sterols in seafood from Gilbert Bay, southern Labrador. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4872–4881. <https://doi.org/10.1021/jf034820h>
- Coreta-Gomes, F. M., Vaz, W. L. C., Wasielewski, E., Geraldes, C. F. G. C., & Moreno, M. J. (2012). Quantification of cholesterol solubilized in bile salt micellar aqueous solutions using <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance. *Analytical Biochemistry*, 427(1), 41–48. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2012.04.028>
- Correa, I. N., & Poltronieri, F. (2016). Hypocholesterolemic action of proteins from legumes. *Revista Da Associação Brasileira de Nutrição*, 7527(2), 79–90.
- Cristofori, V., Ferramondo, S., Bertazza, G., & Bignami, C. (2008). Nut and kernel traits and chemical composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(6), 1091–1098.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.3203>
- Crouch, I. J., & Van Staden, J. (1993). Commercial Seaweed Products as Biostimulants in Horticulture. *Journal of Home & Consumer Horticulture*, 1(1), 19–76.  
[https://doi.org/10.1300/j280v01n01\\_03](https://doi.org/10.1300/j280v01n01_03)
- De Oliveira Sousa, A. G., Fernandes, D. C., Alves, A. M., de Freitas, J. B., & Naves, M. M. V. (2011). Nutritional quality and protein value of exotic almonds and nut from the Brazilian Savanna compared to peanut. *Food Research International*.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.013>
- Delgado-Zamarreño, M. M., Bustamante-Rangel, M., Sánchez-Pérez, A., & Hernández-Méndez, J. (2001). Analysis of vitamin E isomers in seeds and nuts with and without coupled hydrolysis by liquid chromatography and coulometric detection. *Journal of Chromatography A*, 935(1–2), 77–86. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00991-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00991-8)
- Derewiaka, D., Szwed, E., & Wołoskiak, R. (2014). Physicochemical Properties And Composition Of Lipid Fraction Of Selected Edible Nuts. In *Pak. J. Bot* (Vol. 46).

- Deshmukh, N. I. K., Barker, J., Petroczi, A., & Naughton, D. P. (2012). Detection of testosterone and epitestosterone in human hair using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 67–68, 154–158. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2012.04.011>
- Dhargalkar, V. K., & Pereira, N. (2005). Seaweed: Promising Plant Of The Millennium. *Science and Culture*, 71(3-4), 60-66.
- Domeño, C., Ruiz, B., & Nerín, C. (2005). Determination of sterols in biological samples by SPME with on-fiber derivatization and GC/FID. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381(8), 1576–1583. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3056-0>
- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Ebrahim, K. S., Richardson, D. G., Tetley, R. M., & Mehlenbacher, S. A. (1994). Oil Content, Fatty Acid Composition, And Vitamin E Concentration Of 17 Hazelnut Varieties, Compared To Other Types Of Nuts And Oil Seeds. *Acta Horticulturae*, (351), 685–692. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1994.351.76>
- Eggermont, E. (2006, June 21). Recent advances in vitamin E metabolism and deficiency. *European Journal of Pediatrics*, Vol. 165, pp. 429–434. <https://doi.org/10.1007/s00431-006-0084-5>
- Esterbauer, H., Dieber-Rotheneder, M., Striegl, G., & Waeg, G. (1991). Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53(1 Suppl), 314S-321S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/53.1.314S>
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M. I., Corella, D., Arós, F., ... Martínez-González, M. A. (2013). Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *New England Journal of Medicine*, 368(14), 1279–1290. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200303>
- European Union. (2010). *Functional foods*. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- Eussen, S. R. B. M., Feenstra, T. L., Toxopeus, I. B., Hoekstra, J., Klungel, O. H.,

- Verhagen, H., ... Rompelberg, C. J. M. (2011). Costs and health effects of adding functional foods containing phytosterols/-stanols to statin therapy in the prevention of cardiovascular disease. *European Journal of Pharmacology*, 668, S91–S100. <https://doi.org/10.1016/J.EJP HAR.2011.05.081>
- Fang, Y. Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872–879. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(02\)00916-4](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00916-4)
- Feldman, E. B. (2002). The scientific evidence for a beneficial health relationship between walnuts and coronary heart disease. *The Journal of Nutrition*, 132(5), 1062S-1101S. <https://doi.org/10.1093/jn/132.5.1062S>
- Fernandes, L., Pereira, J. A., Lopéz-Cortés, I., Salazar, D. M., Ramalhosa, E., & Casal, S. (2015). Fatty acid, vitamin E and sterols composition of seed oils from nine different pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of Food Composition and Analysis*, 39, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.11.006>
- Firestone, D., & Reina, R. (1996). (*No Title*) (pp. 198–285). pp. 198–285. Chapman & Hall.
- Fontanari, G. G., Batistuti, J. P., Cruz, R. J. da, Saldiva, P. H. N., & Arêas, J. A. G. (2012). Cholesterol-lowering effect of whole lupin (*Lupinus albus*) seed and its protein isolate. *Food Chemistry*, 132(3), 1521–1526. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.11.145>
- Fornes, F., Sánchez-Perales, M., & Guardiola, J. L. (2002). Effect of a seaweed extract on the productivity of “de Nules” clementine mandarin and Navelina orange. *Botanica Marina*, 45(5), 486–489. <https://doi.org/10.1515/BOT.2002.051>
- Fragkaki, A. G., Angelis, Y. S., Koupparis, M., Tsantili-Kakoulidou, A., Kokotos, G., & Georgakopoulos, C. (2009). Structural characteristics of anabolic androgenic steroids contributing to binding to the androgen receptor and to their anabolic and androgenic activities: Applied modifications in the steroidal structure. *Steroids*, 74(2), 172–197. <https://doi.org/10.1016/J.STEROIDS.2008.10.016>
- Fraser, G. E., & Ch, M. B. B. (1999). Nut Consumption, Lipids, and Risk of a Coronary Event. In *Clin. Cardiol* (Vol. 22).

- Freitas, J. B., & Naves, M. M. V. (2010). Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. *Revista de Nutrição*, 23(2), 269–279. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000200010>
- Gillingham, L. G., Harris-Janz, S., & Jones, P. J. H. (2011, March). Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. *Lipids*, Vol. 46, pp. 209–228. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3524-y>
- González-Larena, M., Garcia-Llatas, G., Clemente, G., Barberá, R., & Lagarda, M. J. (2015). Plant sterol oxides in functional beverages: Influence of matrix and storage. *Food Chemistry*, 173, 881–889. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.121>
- González-Montelongo, R., Lobo, M. G., & González, M. (2010). The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. *Separation and Purification Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2009.12.022>
- Hanning, I., Lingbeck, J., & Ricke, S. C. (2016). Cardiovascular Health and Disease Prevention. In *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics* (pp. 793–806). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802189-7.00060-5>
- Hatipoğlu, A., Kanbağlı, Ö., Balkan, J., Küçük, M., Çevikbaş, U., Aykaç-Toker, G., ... Uysal, M. (2004). Hazelnut oil administration reduces aortic cholesterol accumulation and lipid peroxides in the plasma, liver, and aorta of rabbits fed a high-cholesterol diet. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68(10), 2050–2057. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.2050>
- Hensley, K., Benaksas, E. J., Bolli, R., Comp, P., Grammas, P., Hamdheydari, L., ... Floyd, R. A. (2004, January 1). New perspectives on vitamin E:  $\gamma$ -tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 36, pp. 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.10.009>
- Hogarty, C. J., Ang, C., & Eitenmiller, R. R. (1989). Tocopherol content of selected foods by HPLC/fluorescence quantitation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2(3), 200–209. [https://doi.org/10.1016/0889-1575\(89\)90017-3](https://doi.org/10.1016/0889-1575(89)90017-3)

- Horrobin, D. F., & Manku, M. S. (1983). How do polyunsaturated fatty acids lower plasma cholesterol levels? *Lipids*, *18*(8), 558–562.  
<https://doi.org/10.1007/bf02535397>
- Jiao, R., Zhang, Z., Yu, H., Huang, Y., & Chen, Z.-Y. (2010). Hypocholesterolemic activity of grape seed proanthocyanidin is mediated by enhancement of bile acid excretion and up-regulation of CYP7A1. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *21*(11), 1134–1139. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2009.10.007>
- Jing, K., Wu, T., & Lim, K. (2013). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, *13*(8), 1162–1177.  
<https://doi.org/10.2174/18715206113139990319>
- Jogchum Plat, P., & Ronald P, M. (2001). Effects of plant sterols and stanols on lipid metabolism and cardiovascular risk. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases : NMCD*, *11*(1), 31–40.
- Jones, P. J. (1999). Cholesterol-lowering action of plant sterols. *Current Atherosclerosis Reports*, Vol. 1, pp. 230–235. <https://doi.org/10.1007/s11883-999-0037-3>
- Jones, P., MacDougall, D. E., Ntanos, F., & Vanstone, C. A. (1997). Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agents in humans. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *75*(3), 217–227. <https://doi.org/10.1139/y97-011>
- Kamal-Eldin, A., & Appelqvist, L. Å. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, Vol. 31, pp. 671–701.  
<https://doi.org/10.1007/BF02522884>
- Kamm, W., Dionisi, F., Hischenhuber, C., & Engel, K. H. (2001). Authenticity assessment of fats and oils. *Food Reviews International*, *17*(3), 249–290.  
<https://doi.org/10.1081/FRI-100104702>
- Karaman, S., Karasu, S., Tornuk, F., Toker, O. S., Geçgel, Ü., Sagdic, O., ... Gül, O. (2015). Recovery potential of cold press byproducts obtained from the edible oil industry: Physicochemical, bioactive, and antimicrobial properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(8), 2305–2313.  
<https://doi.org/10.1021/jf504390t>

- Katan, M. B., Grundy, S. M., Jones, P., Law, M., Miettinen, T., & Paoletti, R. (2003). Efficacy and Safety of Plant Stanols and Sterols in the Management of Blood Cholesterol Levels. *Mayo Clinic Proceedings*, 78(8), 965–978. <https://doi.org/10.4065/78.8.965>
- Kauffman, G. L., Kneivel, D. P., & Watschke, T. L. (2007). Effects of a Biostimulant on the Heat Tolerance Associated with Photosynthetic Capacity, Membrane Thermostability, and Polyphenol Production of Perennial Ryegrass. *Crop Science*, 47(1), 261–267. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.03.0171>
- Khor, H. T., & Chieng, D. Y. (1996). Effect of dietary supplementation of tocotrienols and tocopherols on serum lipids in the hamster. *Nutrition Research*, 16(8), 1393–1401. [https://doi.org/10.1016/0271-5317\(96\)00146-7](https://doi.org/10.1016/0271-5317(96)00146-7)
- Kicman, A. T. (2008). Pharmacology of anabolic steroids. *British Journal of Pharmacology*, 154(3), 502–521. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.165>
- Kodad, O., Estopañán, G., Juan, T., Alonso, J. M., Espiau, M. T., & Socias i Company, R. (2014). Oil content, fatty acid composition and tocopherol concentration in the Spanish almond genebank collection. *Scientia Horticulturae*, 177, 99–107. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2014.07.045>
- Köksal, A. İ., Artik, N., Şimşek, A., & Güneş, N. (2006). Nutrient composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties cultivated in Turkey. *Food Chemistry*, 99(3), 509–515. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.08.013>
- Kris-Etherton, P. M., Yu-Poth, S., Sabaté, J., Ratcliffe, H. E., Zhao, G., & Etherton, T. D. (1999). Nuts and their bioactive constituents: effects on serum lipids and other factors that affect disease risk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70(3), 504s-511s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/70.3.504s>
- Lagarda, M. J., García-Llatas, G., & Farré, R. (2006). Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1486–1496. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2006.02.052>
- Laviano, A., Rianda, S., Molfino, A., & Fanelli, F. R. (2013, March). Omega-3 fatty acids in cancer. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, Vol. 16, pp. 156–161. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32835d2d99>

- Lednicer, D. (2011). *Steroid chemistry at a glance* (1st ed.). John Wiley & Sons.
- Lei, L., Zhu, H., Zhang, C., Wang, X., Ma, K. Y., Wang, L., ... Chen, Z.-Y. (2017). Dietary  $\beta$ -sitosterol is more potent in reducing plasma cholesterol than sesamin in hypercholesterolemia hamsters. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(7), 1600349. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600349>
- Li, H., Benipal, B., Zhou, S., Dodia, C., Chatterjee, S., Tao, J.-Q., ... Fisher, A. B. (2015). Critical role of peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes following oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 87, 356–365. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2015.06.009>
- Liang, Y. T., Wong, W. T., Guan, L., Tian, X. Y., Ma, K. Y., Huang, Y., & Chen, Z.-Y. (2011). Effect of phytosterols and their oxidation products on lipoprotein profiles and vascular function in hamster fed a high cholesterol diet. *Atherosclerosis*, 219(1), 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.06.004>
- Litwack, G. (2007). Vitamin E: Vitamins and Hormones. In *Elsevier Inc* (Vol. 76, pp. 2-60,531). [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(07\)76024-7](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(07)76024-7)
- Lu, T., Gaspar, F., Marriott, R., Mellor, S., Watkinson, C., Al-Duri, B., ... Santos, R. (2007). Extraction of borage seed oil by compressed CO<sub>2</sub>: Effect of extraction parameters and modelling. *Journal of Supercritical Fluids*. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.10.002>
- MacKay, D. S., & Jones, P. J. H. (2011). Phytosterols in human nutrition: Type, formulation, delivery, and physiological function. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(12), 1427–1432. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100100>
- Maguire, L. S., O'Sullivan, S. M., Galvin, K., O'Connor, T. P., & O'Brien, N. M. (2004). Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55(3), 171–178. <https://doi.org/10.1080/09637480410001725175>
- Maki, K. C., Butteiger, D. N., Rains, T. M., Lawless, A., Reeves, M. S., Schasteen, C., & Krul, E. S. (2010). Effects of soy protein on lipoprotein lipids and fecal bile acid excretion in men and women with moderate hypercholesterolemia. *Journal of*

*Clinical Lipidology*, 4(6), 531–542. <https://doi.org/10.1016/J.JACL.2010.09.001>

Marangoni, F., & Poli, A. (2010). Phytosterols and cardiovascular health.

*Pharmacological Research*, 61(3), 193–199.

<https://doi.org/10.1016/J.PHR.2010.01.001>

Marques, M. R. (2013). *Ação hipocolesterolêmica de hidrolisados de feijões caupi ( Vigna unguiculata L . Walp )* *Ação hipocolesterolêmica de hidrolisados de feijões caupi ( Vigna unguiculata L . Walp )*.

Marques, M. R., Fontanari, G. G., Pimenta, D. C., Soares-Freitas, R. M., & Arêas, J. A. G. (2015). Proteolytic hydrolysis of cowpea proteins is able to release peptides with hypocholesterolemic activity. *Food Research International*, 77, 43–48.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.020>

McGuire, M., & Beerman, K. A. (2011). *Nutritional sciences : from fundamentals to food*. Wadsworth Cengage Learning.

Memon, N. N., Kanwal, S., Talpur, F. N., Afridi, H. I., Memon, G. Z., Samejo, M. Q., ... Khan, H. A. (2019). Nutritional characteristics (fatty acid profile, proximate composition and dietary feature) of selected nuts available in local market. *Pakistan Journal of Analytical and Environmental Chemistry*, 20(1), 39–46.

<https://doi.org/10.21743/pjaec/2019.06.05>

Mensink, R. P., & Katan, M. B. (1987). Effect Of Monounsaturated Fatty Acids Versus Complex Carbohydrates On High-Density Lipoproteins In Healthy Men And Women. *The Lancet*, 329(8525), 122–125. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(87\)91965-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(87)91965-9)

Mensink, R. P., & Katan, M. B. (1992). Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins: A meta- analysis of 27 trials. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 12(8), 911–919. <https://doi.org/10.1161/01.atv.12.8.911>

Mercanligil, S. M., Arslan, P., Alasalvar, C., Okut, E., Akgül, E., Pinar, A., ... Shahidi, F. (2007). Effects of hazelnut-enriched diet on plasma cholesterol and lipoprotein profiles in hypercholesterolemic adult men. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61(2), 212–220. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602518>

- Messerli M. Shejbal J. Vitali F. Keme T. Bioteknisk Inst., K. (Denmark). (1983). The storage of hazelnuts at room temperature under nitrogen, pt. 2. *CCB, Review for Chocolate, Confectionery and Bakery*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DE19850024192#.XpDUimswz9g.mendeley>
- Miarnau, X., Vargas, F. J., Montserrat, R., & Alegre Castellví, S. (2010). Aspectos importantes en las nuevas plantaciones de almendro en regadío. *Revista de Fruticultura, ISSN 2013-5742, N° Extra 10, 2010 (Ejemplar Dedicado a: El Almendro: Mejora Genética En España), Págs. 94-103, (10), 94–103.*
- Mooney, P. A., & van Staden, J. (1986). Algae and Cytokinins. *Journal of Plant Physiology, 123(1), 1–21.* [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(86\)80061-X](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(86)80061-X)
- Moreau, R. A., Whitaker, B. D., & Hicks, K. B. (2002). Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research, 41(6), 457–500.* [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(02\)00006-1](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(02)00006-1)
- Moumita, S., Das, B., Sundaray, A., Satpathi, S., Thangaraj, P., Marimuthu, S., & Jayabalan, R. (2018). Study of soy-fortified green tea curd formulated using potential hypocholesterolemic and hypotensive probiotics isolated from locally made curd. *Food Chemistry, 268, 558–566.* <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.06.114>
- Munné-Bosch, S., & Alegre, L. (2002). The Function of Tocopherols and Tocotrienols in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences, 21(1), 31–57.* <https://doi.org/10.1080/0735-260291044179>
- Nanos, G. D., Kazantzis, I., Kefalas, P., Petrakis, C., & Stavroulakis, G. G. (2002). Irrigation and harvest time affect almond kernel quality and composition. *Scientia Horticulturae, 96(1–4), 249–256.* [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00078-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00078-X)
- Nes, W. R. (1985). [1] A comparison of methods for the identification of sterols. *Methods in Enzymology, 111, 3–37.* [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)11003-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)11003-7)
- Nordestgaard, B. G., Chapman, M. J., Humphries, S. E., Ginsberg, H. N., Masana, L., Descamps, O. S., ... Tybjaerg-Hansen, A. (2013). Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians

to prevent coronary heart disease: Consensus Statement of the European Atherosclerosis Society. *European Heart Journal*, 34(45), 3478–3490.  
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh273>

O'Brien, R. (2003). *Fats and Oils*. <https://doi.org/10.1201/9780203483664>

Orozco-Beltran, D., Gil-Guillen, V. F., Redon, J., Martin-Moreno, J. M., Pallares-Carratala, V., Navarro-Perez, J., ... Tellez-Plaza, M. (2017). Lipid profile, cardiovascular disease and mortality in a Mediterranean high-risk population: The ESCARVAL-RISK study. *PLOS ONE*, 12(10), e0186196.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186196>

Özenç, N., Bender Özenç, D., & Duyar, Ö. (2014). Nutritional composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) as influenced by basic fertilization. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science*, 64(8), 710–721.  
<https://doi.org/10.1080/09064710.2014.953990>

Ozkan, A. S., Polat, N., Akbas, S., Koylu, Z., & Durmus, M. (2017). Difficult airway management of a child with Blepharophimosis Syndrome: Case report. *J Turgut Ozal Med Cent*. <https://doi.org/10.5455/jtomc.2017.11.146>

Parcerisa, J., Rafecas, M., Castellote, A. I., Codony, R., Farràn, A., Garcia, J., ... Boatella, J. (1995). Influence of variety and geographical origin on the lipid fraction of hazelnuts (*Corylus avellana* L.) from Spain: (III) oil stability, tocopherol content and some mineral contents (Mn, Fe, Cu). *Food Chemistry*, 53(1), 71–74.  
[https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)95789-9](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)95789-9)

Parcerisa, Javier, Casals, I., Boatella, J., Codony, R., & Rafecas, M. (2000). Analysis of olive and hazelnut oil mixtures by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry of triacylglycerols and gas-liquid chromatography of non-saponifiable compounds (tocopherols and sterols). *Journal of Chromatography A*, 881(1–2), 149–158.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00352-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00352-6)

Parcerisa, Javier, Richardson, D. G., Rafecas, M., Codony, R., & Boatella, J. (1998a). Fatty acid, tocopherol and sterol content of some hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.) harvested in Oregon (USA). *Journal of Chromatography A*, 805(1–2), 259–268. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00049-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00049-1)

- Parcerisa, Javier, Richardson, D. G., Rafecas, M., Codony, R., & Boatella, J. (1998b). Fatty acid, tocopherol and sterol content of some hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.) harvested in Oregon (USA). *Journal of Chromatography A*, *805*(1–2), 259–268. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00049-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00049-1)
- Pereira-Lorenzo, S., Ramos-Cabrer, A. M., Díaz-Hernández, M. B., Ciordia-Ara, M., & Ríos-Mesa, D. (2006). Chemical composition of chestnut cultivars from Spain. *Scientia Horticulturae*, *107*(3), 306–314. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2005.08.008>
- Perez-Calahorra, S., Laclaustra, M., Marco-Benedí, V., Lamiquiz-Moneo, I., Pedro-Botet, J., Plana, N., ... Civeira, F. (2019). Effect of lipid-lowering treatment in cardiovascular disease prevalence in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.02.003>
- Pérez-Jiménez, F., Castro, P., López-Miranda, J., Paz-Rojas, E., Blanco, A., López-Segura, F., ... Ordovás, J. M. (1999). Circulating levels of endothelial function are modulated by dietary monounsaturated fat. *Atherosclerosis*, *145*(2), 351–358. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(99\)00116-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(99)00116-1)
- Prasad, K., & Kalra, J. (1993). Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis: Effect of vitamin E. *American Heart Journal*, *125*(4), 958–973. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(93\)90102-F](https://doi.org/10.1016/0002-8703(93)90102-F)
- Qureshi, A. A., Qureshi, N., Wright, J. J., Shen, Z., Kramer, G., Gapor, A., ... Peterson, D. M. (1991). Lowering of serum cholesterol in hypercholesterolemic humans by tocotrienols (palmvitee). *The American Journal of Clinical Nutrition*, *53*(4 Suppl), 1021S–1026S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/53.4.1021S>
- Ras, R. T., Geleijnse, J. M., & Trautwein, E. A. (2014). LDL-cholesterol-lowering effect of plant sterols and stanols across different dose ranges: a meta-analysis of randomised controlled studies. *British Journal of Nutrition*, *112*(02), 214–219. <https://doi.org/10.1017/S0007114514000750>
- Rathore, S. S., Chaudhary, D. R., Boricha, G. N., Ghosh, A., Bhatt, B. P., Zodape, S. T., & Patolia, J. S. (2009). Effect of seaweed extract on the growth, yield and nutrient uptake of soybean (*Glycine max*) under rainfed conditions. *South African Journal of Botany*, *75*(2), 351–355. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2008.10.009>

- Razi, F., Forouzanfar, K., Bandarian, F., & Nasli-Esfahani, E. (2017). LDL-cholesterol measurement in diabetic type 2 patients: a comparison between direct assay and popular equations. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, *16*(1), 43.  
<https://doi.org/10.1186/s40200-017-0326-2>
- Reynolds, K., Chin, A., Lees, K. A., Nguyen, A., Bujnowski, D., & He, J. (2006). A Meta-Analysis of the Effect of Soy Protein Supplementation on Serum Lipids. *The American Journal of Cardiology*, *98*(5), 633–640.  
<https://doi.org/10.1016/J.AMJCARD.2006.03.042>
- Rigotti, A. (2007, October). Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E. *Molecular Aspects of Medicine*, Vol. 28, pp. 423–436.  
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2007.01.002>
- Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Ascherio, A., Giovannucci, E., Colditz, G. A., & Willett, W. C. (1993). Vitamin E Consumption and the Risk of Coronary Heart Disease in Men. *New England Journal of Medicine*, *328*(20), 1450–1456.  
<https://doi.org/10.1056/NEJM199305203282004>
- Robbins, K. S., Shin, E.-C., Shewfelt, R. L., Eitenmiller, R. R., & Pegg, R. B. (2011). Update on the Healthful Lipid Constituents of Commercially Important Tree Nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(22), 12083–12092.  
<https://doi.org/10.1021/jf203187v>
- Ros, E. (2009). Doble inhibición del colesterol: papel de la regulación intestinal y hepática. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, *6*(7), 52G-62G.  
[https://doi.org/10.1016/s1131-3587\(06\)75329-8](https://doi.org/10.1016/s1131-3587(06)75329-8)
- Roth, R. A. (2013). *Nutrition & diet therapy*. Canadá: Wadsworth Cengage Learning.
- Russo, R. O., & Berlyn, G. P. (1991). The use of organic biostimulants to help low input sustainable agriculture. *Journal of Sustainable Agriculture*, *1*(2), 19–42.  
[https://doi.org/10.1300/J064v01n02\\_04](https://doi.org/10.1300/J064v01n02_04)
- Ryan, E., Galvin, K., O'Connor, T. P., Maguire, A. R., & O'Brien, N. M. (2006). Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *57*(3–4), 219–228. <https://doi.org/10.1080/09637480600768077>

- Salas-Salvadó, J., Fernández-Ballart, J., Ros, E., Martínez-González, M.-A., Fitó, M., Estruch, R., ... Covas, M.-I. (2008). Effect of a Mediterranean Diet Supplemented With Nuts on Metabolic Syndrome Status. *Archives of Internal Medicine*, 168(22), 2449. <https://doi.org/10.1001/archinte.168.22.2449>
- Sánchez Casas, J., Osorio Bueno, E., Montaña García, A. M., & Martínez Cano, M. (2004). Sterol and erythrodiol + uvaol content of virgin olive oils from cultivars of Extremadura (Spain). *Food Chemistry*, 87(2), 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.11.012>
- Sang, S., Cheng, X., Fu, H.-Y., Shieh, D.-E., Bai, N., Lapsley, K., ... Ho, C.-T. (2002). New type sesquiterpene lactone from almond hulls (*Prunus amygdalus* Batsch). *Tetrahedron Letters*, 43(14), 2547–2549. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)00327-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)00327-1)
- Savage, G. P., McNeil, D. L., & Dutta, P. C. (1997). Lipid composition and oxidative stability of oils in hazelnuts (*Corylus avellana* L.) grown in New Zealand. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(6), 755–759. <https://doi.org/10.1007/s11746-997-0214-x>
- Scholz, B., Wocheslander, S., Lander, V., & Engel, K.-H. (2015). On-line liquid chromatography–gas chromatography: A novel approach for the analysis of phytosterol oxidation products in enriched foods. *Journal of Chromatography A*, 1396, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.03.087>
- Schwingshackl, L., & Hoffmann, G. (2012). Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease: Synopsis of the evidence available from systematic reviews and meta-analyses. *Nutrients*, Vol. 4, pp. 1989–2007. <https://doi.org/10.3390/nu4121989>
- Silva, M. B. de C. e., Souza, C. A. da C., Philadelpho, B. O., Cunha, M. M. N. da, Batista, F. P. R., Silva, J. R. da, ... Ferreira, E. S. (2018). In vitro and in silico studies of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitory activity of the cowpea Gln-Asp-Phe peptide. *Food Chemistry*, 259(November 2017), 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.132>
- Sozen, E., & Ozer, N. K. (2017). Impact of high cholesterol and endoplasmic reticulum stress on metabolic diseases: An updated mini-review. *Redox Biology*, 12, 456–461.

<https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2017.02.025>

Stipanuk, M. H., & Caudill, M. A. (2013). *Biochemical, physiological, and molecular aspects of human nutrition*.

Tahan, G., Aytac, E., AYTEKIN, H., Gunduz, F., Dogusoy, G., Aydin, S., ... Uzun, H. (2011). Vitamin e has a dual effect of anti-inflammatory and antioxidant activities in acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *Canadian Journal of Surgery*, 54(5), 333–338. <https://doi.org/10.1503/cjs.013610>

Taş, N. G., & Gökmen, V. (2015). Profiling triacylglycerols, fatty acids and tocopherols in hazelnut varieties grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 44, 115–121. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2015.08.010>

Traber, M. G. (2007). Vitamin E Regulatory Mechanisms. *Annual Review of Nutrition*, 27(1), 347–362. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093819>

Traber, M. G., & Packer, L. (1995). Vitamin E: beyond antioxidant function. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62(6 Suppl), 1501S-1509S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/62.6.1501S>

Turan, M., & Köse, C. (2004). Seaweed extracts improve copper uptake of grapevine. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science*, 54(4), 213–220. <https://doi.org/10.1080/09064710410030311>

Vadivel, V., Kunyanga, C. N., & Biesalski, H. K. (2012). Health benefits of nut consumption with special reference to body weight control. *Nutrition*, 28(11–12), 1089–1097. <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2012.01.004>

Venkatachalan, M., & Sathe, S. K. (2006). Chemical composition of selected edible nut seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13), 4705–4714. <https://doi.org/10.1021/jf0606959>

Verkleij, F. N. (1992). Seaweed extracts in agriculture and horticulture: A review. *Biological Agriculture and Horticulture*, 8(4), 309–324. <https://doi.org/10.1080/01448765.1992.9754608>

Wall, R., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2010, May). Fatty acids from fish: The anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition*

*Reviews*, Vol. 68, pp. 280–289. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00287.x>

Wang, W., Wang, H. L., Xiao, X. Z., & Xu, X. Q. (2019). Chemical composition analysis of seed oil from five wild almond species in China as potential edible oil resource for the future. *South African Journal of Botany*.

<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.11.009>

Weststrate, J. A., & Meijer, G. W. (1998). Plant sterol-enriched margarines and reduction of plasma total- and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*,

52(5), 334–343. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600559>

Woollett, L. A., Wang, Y., Buckley, D. D., Yao, L., Chin, S., Granholm, N., ... Heubi, J. E. (2006). Micellar solubilisation of cholesterol is essential for absorption in humans. *Gut*, 55(2), 197–204. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.069906>

<https://doi.org/10.1136/gut.2005.069906>

Yadav, S. K., Chandra, P., Goyal, R. N., & Shim, Y.-B. (2013). A review on determination of steroids in biological samples exploiting nanobio-electroanalytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 762, 14–24.

<https://doi.org/10.1016/J.ACA.2012.11.037>

Yang, C. S., Suh, N., & Kong, A. N. T. (2012, May). Does vitamin E prevent or promote cancer? *Cancer Prevention Research*, Vol. 5, pp. 701–705.

<https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-12-0045>

Yang, J. (2009). Brazil nuts and associated health benefits: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 42(10), 1573–1580.

<https://doi.org/10.1016/J.LWT.2009.05.019>

Zhang, X., Ervin, E. H., & Schmidt, R. E. (2003). Plant Growth Regulators Can Enhance the Recovery of Kentucky Bluegrass Sod from Heat Injury. *Crop Science*, 43(3),

952. <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.0952>

Zhang, X., & Schmidt, R. E. (2000). Hormone-Containing Products' Impact on Antioxidant Status of Tall Fescue and Creeping Bentgrass Subjected to Drought.

*Crop Science*, 40(5), 1344–1349. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.4051344x>

Zhao, X., Shen, J., Chang, K. J., & Kim, S. H. (2013). Analysis of Fatty Acids and

Phytosterols in Ethanol Extracts of *Nelumbo nucifera* Seeds and Rhizomes by GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(28), 6841–6847.

<https://doi.org/10.1021/jf401710h>

Zhu, Y., Taylor, C., Sommer, K., Wilkinson, K., & Wirthensohn, M. (2015). Influence of deficit irrigation strategies on fatty acid and tocopherol concentration of almond (*Prunus dulcis*). *Food Chemistry*, 173, 821–826.

<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.10.108>