

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

DISSERTAÇÃO

Pimenta biquinho (*Capsicum chinense*) como antioxidante natural em almôndegas de sardinhas (*Sardina pilchardus*) congeladas e preparadas termicamente em panelas tipo air fryer

Bárbara Jardim Mariano

2021



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

PIMENTA BIQUINHO (*CAPSICUM CHINENSE*) COMO
ANTIOXIDANTE NATURAL EM ALMÔNDEGAS DE SARDINHAS
(*SARDINA PILCHARDUS*) CONGELADAS E PREPARADAS
TERMICAMENTE EM PANEAS TIPO AIR FRYER

BÁRBARA JARDIM MARIANO

Sob a Orientação da Professora
Tatiana Saldanha

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

Seropédica, RJ
Janeiro de 2021

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

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

M333p Mariano, Bárbara Jardim, 1987-
Pimenta biquinho (*Capsicum chinense*) como
antioxidante natural em almôndegas de sardinhas
(*Sardina pilchardus*) congeladas e preparadas
termicamente em panelas tipo air fryer / Bárbara
Jardim Mariano. - Niterói, 2021.
126 f.

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

1. *Capsicum chinense*. 2. antioxidantes naturais.
3. oxidação lipídica. I. Saldanha, Tatiana, 1971-,
orient. II Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos III. Título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
DEPARTº TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



TERMO Nº 217/2021 - DTA (12.28.01.00.00.00.46)

Nº do Protocolo: 23083.015412/2021-18

Seropédica-RJ, 03 de março de 2021.

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

BÁRBARA JARDIM MARIANO

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/02/2021

TATIANA SALDANHA (Drª) UFRRJ

(orientadora)

ORMINDO DOMINGUES GAMALLO (Dr) UFRRJ

Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres (Drª) USP

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

Documento não acessível publicamente

(Assinado digitalmente em 04/03/2021 11:37)

ORMINDO DOMINGUES GAMALLO

CHEFE DE DEPARTAMENTO - TITULAR

CHEFE DE UNIDADE

DTA (12.28.01.00.00.00.46)

Matricula: 8980815

(Assinado digitalmente em 04/03/2021 16:20)

TATIANA SALDANHA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DTA (12.28.01.00.00.00.46)

Matricula: 2563412

(Assinado digitalmente em 04/03/2021 16:36)

ELIZABETH APARECIDA FERRAZ DA SILVA TORRES

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 609.886.907-30

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 217, ano: 2021, tipo: TERMO, data de emissão: 03/03/2021 e o código de verificação: 07d36c3469

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mostrar que está sempre presente em minha vida, colocando pessoas tão importantes e especiais em meu caminho, sem as quais, esta dissertação não teria sido realizada.

Agradeço a minha família, em especial a minha mãe, Margareth, pelo constante suporte. Ao meu irmão, Joaquim, pelos questionamentos que sempre me fizeram buscar mais conhecimento. Aos meus tios, Suzete e Ricardo, pelo acolhimento e compreensão, dos quais não me deixaram desistir em nenhum momento. Aos meus primos/sobrinhos, Felipe e Juliana, pelas brincadeiras e gargalhadas, o que fizeram essa jornada mais leve.

Agradeço a todos do Departamento de Tecnologia de Alimentos que participaram direta ou indiretamente da realização deste trabalho, com ressalva aos queridos Ivanilda, Fernando e Vinicius, pelo suporte no laboratório.

Agradeço aos colegas do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelo companheirismo e ajuda. Obrigada, Bruna, Flora (em memória), Isabella, Jéssica, Layla e Vavá companheiras de laboratório dia, tarde, noite, finais de semana e feriados, pela disposição em ajudar, ensinar, “aprender junto” e por estarem comigo em momentos de alegrias e tristezas, trabalho e preguiça.

Agradeço às IC's Paulinha e Janine, pelo apoio durante as análises experimentais, além da amizade que surgiu durante esse tempo.

Agradeço a minha orientadora Tatiana Saldanha pela oportunidade e confiança depositadas em mim e pelos conhecimentos transmitidos, que sem os quais eu não teria tornado este sonho realidade.

Agradeço a Dra. Geni Rodrigues Sampaio pela colaboração com a execução das análises de ORAC, β -caroteno/ac. Linoleico, Fenólicos Totais e DPPH, as quais foram realizadas no Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

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

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

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

Agradeço ao Instituto de Agronomia, setor de horticultura pela doação da pimenta biquinho, sem as quais este trabalho seria inviabilizado. Ao Dr. Everaldo Zonta, pela colaboração e execução nas análises de minerais. E ao Laboratório de Nutrição de Plantas por disponibilizar o freezer de ultracongelamento que possibilitaram a liofilização das almôndegas de sardinhas.

Agradeço a Dra. Micheli Ferreira da Universidade Federal Fluminense, pela intermediação com a Indústria de Conservas Nova Piracema, e a Médica-veterinária, Responsável Técnica Aline Paranhos, pela doação das sardinhas para realização deste trabalho.

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

E a todos que contribuíram e tornaram possível a realização desta Dissertação.

Muito obrigada!

RESUMO

MARIANO, Bárbara Jardim. **Pimenta biquinho (*Capsicum chinense*) como antioxidante natural em almôndegas de sardinhas (*Sardina pilchardus*) congeladas e preparadas termicamente em panelas tipo air fryer**. 126p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

A sardinha (*Sardina pilchardus*) é um alimento de elevado valor nutricional, principalmente devido aos significativos teores de ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) da série ômega-3, os quais são reconhecidos como componentes cruciais para uma dieta saudável. Além disso, a sardinha também apresenta elevado conteúdo de colesterol, composto altamente susceptível a oxidação lipídica que pode acarretar a formação de óxidos de colesterol comumente reconhecidos como deletérios a saúde. Os óxidos de colesterol podem ser formados durante etapas preliminares ao consumo de alimentos como o armazenamento e preparo térmico, comprometendo a qualidade nutricional e a segurança destes. O emprego de antioxidantes sintéticos é a principal estratégia empregada para minimizar as reações oxidativas, entretanto, existe uma crescente tendência pela substituição de aditivos sintéticos por naturais. O reino das plantas é a principal fonte de compostos naturais com propriedades antioxidantes, apresentando inúmeras possibilidades, como a pimenta biquinho (*Capsicum chinense*), para a indústria de alimentos. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição de pimenta biquinho, na forma de farinha, frente a oxidação lipídica em almôndegas de sardinha armazenadas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (congelamento doméstico) durante 60 dias. A pimenta biquinho foi previamente caracterizada apresentando relevante potencial nutricional. Determinou-se a presença de ácidos graxos essenciais, fitoesteróis, minerais e compostos bioativos como flavonoides, carotenoides e antocianinas. Compostos como capsaicina, di-hidrocapsaicina, homocapsaicina- I, nordihidrocapsaicina e β -caroteno foram identificados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. A atividade antioxidante foi constatada em análises *in vitro* e *in vivo*. Os experimentos *in vivo* demonstraram que o extrato da pimenta biquinho ($170\text{ }\mu\text{g/mL}$) reduziu os danos causados pela presença de H_2O_2 nas células de *Saccharomyces cerevisiae*. Para o estudo da oxidação lipídica, foram preparadas quatro formulações de almôndegas de sardinhas: amostras sem adição de pimenta biquinho e amostras com adição de pimenta biquinho nas concentrações de 0,5%, 0,75% e 1%. Os efeitos da adição da pimenta frente à degradação do colesterol e formação de óxidos de colesterol foram avaliados após 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento. Após 60 dias, as amostras sem adição da pimenta apresentaram um teor de $86,35 \pm 1,11\text{ }\mu\text{g/g}$, enquanto $29,04 \pm 0,98\text{ }\mu\text{g/g}$ foi encontrado em amostras com adição de pimenta a 1%. Considerando a degradação de ácidos graxos, as amostras foram analisadas nos mesmos tempos, cruas e após o processamento térmico em air fryer. A degradação de importantes ácidos graxos foi determinada durante o armazenamento e após o tratamento térmico em todas as amostras. Entretanto, a pimenta biquinho apresentou um efeito protetor mediante a degradação dos AGPIs. O teor de AGPIs reduziu de $17,41 \pm 0,2$ (amostra crua, dia 60) para $11,16 \pm 0,7\text{ g/100 g}$ (amostras tratadas no air fryer, dia 60), correspondendo a uma degradação de 35,9%. Entretanto, a adição da pimenta biquinho (1%) reduziu a perda, apresentando um teor de $13,74 \pm 0,4\text{ g/100 g}$. Desta forma, a pimenta biquinho também demonstrou ser eficaz em minimizar a degradação de ácidos graxos

poli-insaturados. Os resultados encontrados neste trabalho sugerem a aplicação da pimenta biquinho em produtos alimentícios como uma alternativa ao uso de antioxidantes sintéticos, ajudando a preservar os aspectos nutricionais de produtos de pescado e minimizando o consumo de compostos deletérios a saúde.

Palavras-chave: *Capsicum chinense*, antioxidantes naturais, congelamento doméstico, oxidação lipídica.

ABSTRACT

MARIANO, Bárbara Jardim. **Biquinho pepper (*Capsicum chinense*) as a natural antioxidant in frozen sardine meatballs (*Sardina pilchardus*) and thermally prepared in air fryer**. 126p. Dissertation (Master in Food Science and Technology). Institute of Technology, Department of Food Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Sardine (*Sardina pilchardus*) is a food of high nutritional value, mainly due to the significant levels of omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), which are recognized as crucial components for a healthy diet. In addition, sardines also have high cholesterol content, a compound highly susceptible to lipid oxidation that can lead to the formation of cholesterol oxides commonly recognized as harmful to health. Cholesterol oxides can be formed during preliminary stages of food consumption, such as storage and thermal preparation, compromising their nutritional quality and safety. The use of synthetic antioxidants is the main strategy used to minimize oxidative reactions; however, there is an increasing trend towards the replacement of synthetic additives by natural ones. The plant kingdom is the main source of natural compounds with antioxidant properties, presenting numerous possibilities, such as the biquinho pepper (*Capsicum chinense*), for the food industry. In this context, this study aimed to evaluate the effect of adding biquinho pepper, in the form of flour, against lipid oxidation in sardine balls stored at -18°C (domestic freezing) for 60 days. Biquinho pepper was previously characterized showing a relevant nutritional potential. The presence of essential fatty acids, phytosterols, minerals, and bioactive compounds such as flavonoids, carotenoids, and anthocyanins was determined. Compounds like capsaicin, dihydrocapsaicin, homocapsaicin-I, nordihydrocapsaicin, and β -carotene were identified by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. The antioxidant activity was verified by *in vitro* and *in vivo* analyzes. The *in vivo* experiments demonstrated that the extract of the biquinho pepper ($170\ \mu\text{g/mL}$) reduced the damage caused by the presence of H_2O_2 in the cells of *Saccharomyces cerevisiae*. For the study of lipid oxidation, four formulations of sardine balls were prepared: samples without the addition of biquinho pepper and samples with the addition of biquinho pepper at concentrations of 0.5%, 0.75%, and 1%. The effects of adding pepper on the degradation of cholesterol and the formation of cholesterol oxides were evaluated after 15, 30, 45, and 60 days of storage. After 60 days, samples with no addition of pepper had a content of $86.35 \pm 1.11\ \mu\text{g/g}$, while $29.04 \pm 0.98\ \mu\text{g/g}$ was found in samples with 1% of pepper. Considering the degradation of fatty acids, the samples were analyzed at the same time, raw and after thermal processing in air fryer. The degradation of important fatty acids was determined during storage and after the heating treatment in all samples. However, biquinho pepper showed a protective effect against the degradation of PUFAs. The PUFAs content decreased from 17.41 ± 0.2 (raw sample, day 60) to $11.16 \pm 0.7\ \text{g} / 100\ \text{g}$ (samples treated in the air fryer, day 60), corresponding to a degradation of 35.9%. However, the addition of biquinho pepper (1%) reduced the loss, presenting a content of $13.74 \pm 0.4\ \text{g}/100\ \text{g}$. Therefore, biquinho pepper also showed to be effective in minimizing the degradation of polyunsaturated fatty acids. The results found in this work suggest the application of biquinho pepper in food products as an alternative to the use of

synthetic antioxidants, helping to preserve the nutritional aspects of fish products and minimizing the consumption of harmful compounds.

Keywords: *Capsicum chinense*, natural antioxidants, domestic freezing, lipid oxidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sardinha européia (<i>Sardina pilchardus</i>)	25
Figura 2: Distribuição geográfica dos cardumes de <i>Sardina pilchardus</i>	26
Figura 3.: Esquema geral para a oxidação de ácidos graxos	28
Figura 4.: Estrutura plana do EPA e DHA	30
Figura 5.: Estrutura plana e espacial de colesterol	30
Figura 6.: Formação de óxidos de colesterol	31
Figura 7.: Compostos bioativos com ação antioxidante encontrados em vegetais	38
Figura 8: Fruto integro coletado na UFRRJ de <i>Capsicum chinense</i>	42
Figura 9: Fórmula estrutural dos principais carotenoides presentes em pimentas	45
Figura 10: Corte longitudinal de um fruto de pimenta do gênero <i>Capsicum</i>	47
Figura 11.: Estrutura química de capsaicinoides encontrados em <i>Capsicum</i> ssp	48
Figura 12.: Estrutura química do β -sitosterol, campesterol e estigmasterol	49
Figure 13: A - Cellular survival of <i>S. cerevisiae</i> exposure to biquinho pepper extracts after 1 hour. B - Tolerance of <i>S. cerevisiae</i> cells pretreated or not with biquinho pepper extracts, after exposure to H ₂ O ₂ (1mM/1h)	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Teores de EPA e DHA em espécies de peixes brasileiros	21
Tabela 2.: Estudos que identificaram óxidos de colesterol em pescado	33
Tabela 3: Atividade em percentual de alguns carotenoides provitamina A	44
Tabela 4.: Principais classes de flavonoides encontradas em alimentos	45
Tabela 5. Ácidos graxos comuns em tecidos de vegetais superiores	46
Table 6: Proposed identification of bioactive compounds of biquinho pepper extract.	70
Table 7: Antioxidant capacities determined by DPPH, ORAC, and β -carotene/linoleic acid assays of biquinho pepper	74
Table 8: Cholesterol and cholesterol oxides contents of fish meatballs during 60 days of frozen storage	76
Table 9: Chemical composition and mineral composition of <i>biquinho pepper</i> flour	94
Table 10: Fatty acids composition and phytosterol contents of <i>biquinho pepper</i> flour.	97
Table 11: Total content of phenolics, flavonoids, anthocyanins, and carotenoids of <i>biquinho pepper</i> flour.	99
Table 12: Moisture and total lipid contents of fish balls stored and air fried.	101
Table 13: Fatty acid composition of fish balls stored at -18 °C and air fried.	103

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

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

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	3
OBJETIVO GERAL.....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
REVISÃO DE LITERATURA	4
1 PESCADO	4
1.1 Composição química e valor nutricional.....	5
1.2 Produtos da pesca.....	7
1.3 Sardinha Europeia (<i>Sardina pilchardus</i>).....	9
2 OXIDAÇÃO LIPÍDICA	12
3 Colesterol e óxidos de colesterol em pescado	15
3.2 Efeitos dos óxidos de colesterol a saúde	19
4 Oxidação do pescado durante o congelamento	20
5 UTILIZAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS EM PRODUTOS DE PESCADO.....	22
6 PIMENTAS	25
6.1 Pimenta biquinho	26
6.2 Compostos de interesse presentes em pimentas	27
7 REFERÊNCIAS	35
CAPÍTULO I	44
ABSTRACT.....	45
1 INTRODUCTION	47
2 MATERIALS AND METHODS.....	48
2.1 CHEMICALS	48
2.2 PLANT MATERIAL	49
2.3 BIQUINHO PEPPER ANALYSES	49
2.3.1 IDENTIFICATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS BY UHPLC-ESI-MS	49
2.3.2.1 PREPARATION OF EXTRACT	50
2.3.2.2 DPPH RADICAL SCAVENGING ACTIVITY	50
2.3.2.3 OXYGEN RADICAL ABSORBANCE CAPACITY (ORAC).....	51
2.3.2.4 B-CAROTENE/LINOLEIC ACID ASSAY	51

2.3.3 DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY <i>IN VIVO</i> USING YEAST CELLS	51
2.3.3.1 BIQUINHO PEPPER EXTRACTS TOXICITY	51
2.3.3.2 DETERMINATION OF CELL VIABILITY	52
2.4 FISH SAMPLES AND PREPARATION OF FISH BALLS	52
2.6 STATISTICAL ANALYSIS	53
3 RESULTS AND DISCUSSION	54
3.1 IDENTIFICATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS BY UHPLC-ESI-MS	54
3.2 <i>IN VITRO</i> ANTIOXIDANT CAPACITY	57
3.3 <i>IN VIVO</i> ANTIOXIDANT CAPACITY	58
3.4 ANTICHOLESTEROL OXIDATION EFFECT OF BIQUINHO PEPPER	60
4 CONCLUSION	65
5 REFERENCES	65
CAPÍTULO II	71
BIQUINHO PEPPER (<i>CAPSICUM CHINENSE</i>): A NATURAL ANTIOXIDANT AGAINST THE DEGRADATION OF POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN FROZEN AND GRILLED FISH BALLS	71
ABSTRACT	72
1 INTRODUCTION	73
2 MATERIALS AND METHODS	74
2.1. CHEMICALS	74
2.2 BIQUINHO PEPPER FLOUR	75
2.3 CHEMICAL CHARACTERIZATION OF BIQUINHO PEPPER FLOUR	75
2.3.1 CHEMICAL COMPOSITION	75
2.3.2 MINERAL CONTENT	75
2.3.3 PHYTOSTEROLS	76
2.3.4 FATTY ACIDS COMPOSITION	76
2.4 BIOACTIVE COMPOUNDS OF <i>BIQUINHO PEPPER</i> FLOUR	76
2.4.1 PREPARATION OF EXTRACT	76
2.4.2 DETERMINATION OF TOTAL PHENOLICS, FLAVONOIDS, ANTHOCYANINS, AND CAROTENOIDS CONTENTS	77
2.5 FISH BALLS	77
2.5.1 PREPARATION OF FISH BALLS	77
2.5.2 MOISTURE AND TOTAL LIPIDS CONTENT	78
2.5.3 FATTY ACIDS COMPOSITION	78
2.7 STATISTICAL ANALYSIS	78

3 RESULTS AND DISCUSSION	79
3.1 BIQUINHO PEPPER FLOUR ANALYSES	79
3.1.1 CHEMICAL COMPOSITION	79
3.1.2 MINERAL COMPOSITION	80
3.1.3 PHYTOSTEROL COMPOSITION.....	81
3.1.4 FATTY ACIDS COMPOSITION.....	83
3.1.5 CONTENTS OF TOTAL PHENOLICS, FLAVONOIDS, CAROTENOIDS, AND ANTHOCYANINS ...	84
3.2 FISH BALLS ANALYSES.....	85
3.2.1 MOISTURE AND LIPIDS CONTENTS	85
3.4 FATTY ACIDS COMPOSITION.....	87
4 CONCLUSION	96
CONCLUSÕES GERAIS	104
ANEXOS.....	106
ANEXO A - CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA AS ANÁLISES ANTIOXIDANTES <i>IN VITRO</i>	106
ANEXO B – ÁCIDOS GRAXOS.....	108
ANEXO C – COLESTEROL E ÓXIDOS DE COLESTEROL	109

INTRODUÇÃO GERAL

Os peixes apresentam excelente valor nutritivo, pois é fonte de proteínas de alto valor biológico com aminoácidos essenciais, minerais e vitaminas A e D, coadjuvantes na calcificação óssea, além de vitaminas do complexo B, que atuam no metabolismo energético e de macro nutrientes. Os peixes marinhos de água fria, devido à necessidade de manter o metabolismo e a mobilidade corporal, contém elevados teores de ácidos graxos poli-insaturados, especialmente os ácidos eicosapentaenoico (EPA; C20:5) e docosaenoico (DHA; C22:6) da série ômega-3. Entretanto, a composição de ácidos graxos pode variar entre espécies e indivíduos devido a fatores exógenos e endógenos.

Diversos estudos demonstraram que o EPA e o DHA podem ser considerados nutracêuticos, uma vez que desempenham um papel fundamental na manutenção da saúde humana, modulam a imunidade e, portanto, são capazes prevenir e tratar doenças metabólicas, a partir da redução da pressão arterial sistólica e diastólica, riscos de arritmia, processos inflamatórios de placas ateroscleróticas e neoplasias.

A produção anual brasileira de pescado gira em torno de 1,5 milhões de toneladas (FAO, 2019) contudo, estima-se que, em 2030, o Brasil será um dos maiores produtores mundiais, com a estimativa de produção de 20 milhões de toneladas anuais. Entretanto, apesar do aumento no consumo de peixes, a distribuição de pescado fresco sofre em razão da logística, além da oferta de produtos de má qualidade e de procedência duvidosa. Assim, têm surgido novas possibilidades de consumo através de produtos formatados congelados a base de peixe.

O congelamento de peixes é uma das formas de conservação mais empregadas, e nas últimas décadas inúmeros métodos foram desenvolvidos. Entretanto, o frescor dos músculos e a extensão da oxidação lipídica são parâmetros de referência para que o pescado seja aceito mesmo depois de um período determinado. Estudos comprovam que o congelamento, principalmente o doméstico, não inibe a oxidação lipídica, ao contrário, produz compostos deletérios a saúde. Outro fator limitante é a produção de off flavors, impossibilitando assim seu consumo.

Assim como os peixes de água fria, a sardinha contém teores relevantes de colesterol, composto insaturado e quimicamente instável. Sabe-se que os métodos de processamento, condições de transporte e armazenamento, são alguns dos fatores que contribuem para a degradação do mesmo. Além disso, elevadas temperaturas empregadas durante o preparo de pescado também induzem as reações oxidativas. Desta forma, à alta susceptibilidade dos ácidos

graxos poli-insaturados e do colesterol a oxidação lipídica pode acarretar na perda da qualidade sensorial e nutricional de alimentos, assim como na formação de compostos oxidados deletérios a saúde como os produtos de oxidação do colesterol (POCs) ou óxidos de colesterol. Diversos autores reportaram os efeitos citotóxicos, aterogênicos, mutagênicos, neurodegenerativos e carcinogênicos apresentados pelos POCs de origem exógena, obtidos a partir da ingestão de produtos de origem animal processados.

A oxidação pode ser retardada por diversos métodos, como uso de antioxidantes sintéticos. Entretanto, o consumo exagerado destes está associado a efeitos adversos a saúde humana, e em alguns países da Ásia e Europa já é proibida a sua utilização pela indústria. Desta forma, existe uma crescente tendência pela substituição de antioxidantes sintéticos por naturais, os quais são facilmente encontrados em diversas espécies vegetais.

A *Capsicum chinense* é uma espécie herbácea nativa da flora brasileira e popularmente conhecida como pimenta biquinho. Este arbusto da família Solanácea apresenta ciclos curtos de frutificação, cerca de 90 dias, com produção elevada em estações do ano com maiores amplitudes térmicas. De fácil cultivo, é encontrada de norte a sul do Brasil, desde grandes plantações hidropônicas a utilização doméstica como planta ornamental.

Os frutos, em forma de bagas, apresentam capacidade antioxidante significativa, relacionada à presença de compostos bioativos como flavonoides, antocianinas e carotenoides, sendo o β - caroteno, capsorubina e capsantina os mais abundantes, o que torna a pimenta biquinho um potencial corante. Entretanto, apesar da presença de capsaicinoides esta pimenta não apresenta pungência, considerada uma “bell pepper”, o que favorece a sua utilização como antioxidante natural sem as intercorrências de um alimento exclusivo para indivíduos que apreciam o sabor picante das pimentas.

Diante da importância do consumo do pescado e da influência do congelamento doméstico e do preparo térmico destes nas reações de degradação de lipídios, fica evidente a necessidade de buscar novas fontes de antioxidantes naturais com o intuito de manter a qualidade nutricional e reduzir o uso de aditivos sintéticos, justificando assim o trabalho em questão.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o efeito protetor da pimenta biquinho (*Capsicum chinense*) frente à oxidação lipídica em sistemas modelo constituídos por almôndegas de sardinhas (*Sardina pilchardus*) submetidos ao congelamento doméstico ao longo de 15, 30, 45 e 60 dias, e posteriormente processadas termicamente em panela tipo “Air Fryer”.

Objetivos específicos

- Determinar a composição centesimal, ácidos graxos, fitosteróis e capacidade antioxidante *in vivo e in vitro* na farinha da pimenta biquinho;
- Determinar os compostos bioativos presentes na farinha da pimenta biquinho por UHPLC-ESI-MS
- Analisar as almôndegas de sardinha quanto à umidade, lipídios totais, ácidos graxos, colesterol e óxidos de colesterol durante armazenamento doméstico, em diferentes tempos, a – 18 °C;
- Analisar as almôndegas de sardinha quanto à umidade, lipídios totais e ácidos graxos após o preparo térmico em panelas tipo “Air fryer”
- Analisar e correlacionar os dados a fim de avaliar o efeito protetor da pimenta biquinho frente à oxidação lipídica.

REVISÃO DE LITERATURA

1 Pescado

Os peixes são considerados importante fonte alimentar, e de acordo com dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), a sua oferta global tem aumentado consideravelmente nas últimas cinco décadas, com uma taxa média de crescimento de 3,2 % ao ano no período de 1961-2009, superando a taxa de crescimento da população global de 1,7 % (FAO, 2019). O consumo mundial aumentou de 114,3 milhões de toneladas em 2006 para 130,8 milhões de toneladas em 2011 e em 2016 foi de 171 milhões de toneladas, correspondendo anualmente a 20,1 kg per capita (MELGOSA et al., 2020).

Os peixes pelágicos representam 25% dos desembarques mundiais (em toneladas), predominantemente através de anchova, sardineta, sardinha, cavala e arenque (FAO, 2019). No Brasil, os últimos dados estatísticos publicados demonstraram que o consumo anual de peixe é de 10 kg por habitante, entretanto, a meta do Ministério da Saúde é promover um aumento deste consumo para 12 kg de pescado/habitante/ano, equivalente à quantidade recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). De fato, consumo brasileiro de pescado cresce, mas está longe do de países europeus ou asiáticos (IPEA, 2017).

O pescado é uma fonte de nutrientes indispensáveis e pode ser considerado como um alimento que reduz a incidência de doenças crônicas. A carne possui excelente qualidade nutricional, com baixo teor calórico em geral, sendo de 15 a 25 % representados por proteínas de alto valor biológico com aminoácidos essenciais (MELGOSA et al., 2020). Contem minerais como cálcio e vitaminas A e D, importantes coadjuvantes na calcificação óssea, além de vitaminas do complexo B que atuam no metabolismo energético e de macronutrientes (ÖZALP ÖZEN; SOYER, 2018).

Sendo assim, estudos e recomendações de organizações de saúde concluem que a dieta do brasileiro deveria ser incrementada com peixes, frutos do mar e produtos derivados dos mesmos, já que estes são notadamente mais interessantes em relação aos ácidos graxos essenciais do que outras carnes, além de apresentarem proteína de alto valor biológico (SARTORI & AMANCIO, 2012). Esforços deveriam ser feitos para aumentar o consumo de pescado, principalmente em um país como o Brasil, que possui 55.457 km² de águas interiores e 7.408 km de costa marítima, e onde a fome e desnutrição persistem em grau avançado.

1.1 Composição química e valor nutricional

Os peixes apresentam os mesmos componentes químicos que outros produtos de origem animal como: água, proteínas e lipídeos, que no conjunto formam até 98% do peso total da carne, o que irá diferenciar entre os animais são os teores relativos de cada componente (VAZ-PIRES, 2006).

Fatores bio-ecológicos como sexo, idade, fase de reprodução, estação do ano e tipo de alimentação influenciam nos teores de lipídeos contidos no pescado, variando de 0,2 a 23,7%, e estão associados numa relação inversa com a umidade (ŠIMAT et al., 2020). Além disso, a carne do pescado também pode ser considerada um alimento funcional, ou seja, alimento que além dos nutrientes básicos, possui propriedades de prevenção ou diminuição dos sintomas de doenças cardiovasculares, hipertensão, inflamações em geral, asma, artrite, psoríase e câncer (Soldo et al., 2019). Isto se deve principalmente ao conteúdo de EPA (ácido eicosapentaenoico) e DHA (ácido docosaenoico), conhecidos como ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3 (FARABEGOLI et al., 2019)

Os peixes marinhos de água fria, devido à necessidade de manter o metabolismo e mobilidade corporal são abundantes em ácidos graxos poli-insaturados (FARABEGOLI et al., 2019). Maiores concentrações dos ácidos graxos poli-insaturados são devido à manutenção das membranas celulares fluídas em baixas temperaturas. Muitas plantas marinhas, especialmente algas unicelulares no fitoplâncton, realizam a alongação da cadeia e adicional dessaturação do ácido α -linolênico para produzir os ácidos EPA e DHA. A formação desses PUFAs pelas algas marinhas e sua transferência através da cadeia alimentar aos peixes explica a abundância dos mesmos (HURE; MUSTAC, 2020; VARGAS-YÁÑEZ et al., 2020).

Além disso, os ácidos graxos das famílias ômega-3 e ômega-6, atuam em conjunto para regular os processos biológicos do organismo humano na manutenção da saúde com a redução na pressão arterial sistólica e diastólica, riscos de arritmia, processos inflamatórios de placas ateroscleróticas, neoplasias, depressão e modulador celular, que regula o metabolismo afim de evitar uma síndrome metabólica (CALDER, 2015), além de contribuírem no desenvolvimento dos neurônios e influenciarem na transmissão de sinais entre as células nervosas e as sinapses (FERNANDES et al., 2014).

Estes compostos são extremamente benéficos ao organismo humano, o EPA e o DHA são precursores de prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina, grupo de componentes

semelhantes ao hormônio luteinizantes (LH) e tireoestimulante (TSH). Entre estes efeitos fisiológicos o DHA também exerce um papel importante na estrutura ocular e neural, havendo necessidade da suplementação em mulheres grávidas e lactantes para o desenvolvimento destes tecidos nos neonatos (FERNANDES et al., 2014).

É importante existir uma relação adequada de ingestão entre os ácidos graxos n-6 e n-3, uma vez que esses ácidos competem pelas enzimas envolvidas nas reações de dessaturação e alongamento da cadeia. Assim, a razão entre a ingestão diária de alimentos fontes de ácidos graxos n-6 e n-3 assume grande importância na nutrição humana, resultando em várias recomendações que têm sido estabelecidas por autores e órgãos de saúde em diferentes países (GOTTARDI et al., 2016).

Estudos relacionados com dietas suplementares de peixes ou óleos de peixes e derivados de ômega-3 mostraram os efeitos benéficos destes produtos e, nestes últimos anos, vários medicamentos à base de óleo de peixes e/ou derivados surgiram no mercado, principalmente no mercado internacional (ŠIMAT et al., 2020).

Peixes de água doce geralmente contêm porções menores de ácidos graxos poli-insaturados em comparação aos marinhos, mas existem trabalhos demonstrando que peixes de água doce frias contêm altas quantidades de ômega-3. Os peixes de água doce têm a composição em ácidos graxos sensível ao tipo de alimentação de que dispõem, apresentando larga variação qualitativa e quantitativa em ácidos graxos (GÖKOĞLU; YERLIKAYA, 2015; LOURO et al., 2019).

Tabela 1: Teores de EPA e DHA em espécies de peixes brasileiros (PIEIDADE, 2007).

Espécies	Lipídios (%)	EPA (%)	DHA (%)	EPA + DHA (%)
Pescada branca	0,9	5,6	15,4	21
Pescada foguete	4,5	7,22	27,93	35,15
Corvina	1,2	10,93	13,38	24,31
Atum bonito listrado	6,8	5,12	21,37	26,49
Atum (músculo roxo)	6,8	4,33	30,04	34,37
Sardinha	7,7	6,98	15,92	22,9
Sardinha (músculo roxo)	7,7	6,29	16,33	22,62
Goete	5	6,12	17,29	23,41

O teor de lipídios, tabela 1, presente na carne do pescado serve como critério prático para comparações entre as espécies, visto que este composto influi decisivamente na vida útil e na aceitação geral pelos consumidores (CONTRERAS-GUZMAN, 2002). A sardinha e o

bonito apresentaram os maiores teores totais de DHA e EPA em filés comprovando serem uma boa fonte alimentar destes ácidos, especialmente a sardinha pelo preço acessível de comercialização no Brasil (PIEDADE, 2007) .

O músculo do pescado contém geralmente entre 11 e 24% de proteína bruta, dependendo da espécie, do estado nutritivo e tipo de músculo. Três grupos principais de proteínas compõem o músculo: proteínas sarcoplasmáticas, miofibrilares e proteínas dos tecidos conjuntivos, cujo as quantidades relativas dependem do desenvolvimento sexual, variando durante o ciclo anual (MELGOSA et al., 2020).

Os sais minerais mais importantes no músculo do pescado são P, K, Na, Ca, Mg, S, Cl, Fe, Cu, Mn, Mo, Zn, N e Co; os peixes marinhos têm ainda Br e I. Têm função plástica (principalmente o Ca) e auxiliam a ação das vitaminas, enzimas e hormônios. As vitaminas, principalmente as lipossolúveis A e D, estão também presentes, normalmente no fígado do pescado; as hidrossolúveis são mais resistentes à degradação, e por isso também aos processos culinários, sendo muito variável a sua presença no pescado (VAZ-PIRES, 2006).

Em resumo, pode dizer-se que o pescado é um componente importante, ou mesmo indispensável, de dietas equilibradas e variadas, principalmente pelo seu teor elevado em proteínas, lipídios insaturados, vitaminas e sais minerais.

1.2 Produtos da pesca

A carne de peixe apresenta grande potencial de mercado ao atender as exigências do consumidor nos aspectos nutricionais como fonte de proteínas e ácidos graxos insaturados, ser de fácil preparo e do ponto de vista econômico possuem preços acessíveis. Os produtos reestruturados apresentam vantagens, visto que possuem tamanho e forma apropriada, proporcionam menores perdas durante o armazenamento, cozimento e melhor aproveitamento de músculos de menor valor comercial, agregando assim valor a matéria-prima (VILLASANTE et al., 2019).

O estilo de vida da população atual tem imposto a elaboração de produtos de conveniência, que são mais fáceis e rápidos de preparar, e ainda oferecem vantagem do ponto de vista nutricional. Isto é mais aparente no caso dos peixes, com a crescente consciência dos consumidores sobre as implicações positivas na saúde de uma dieta rica em carne branca (NEIVA; GONÇALVES, 2011).

O termo reestruturados começou a ser utilizado na década de 1970 para designar uma variedade de produtos elaborados a partir de porções de carne reduzidas a uma pasta e comercializados como produtos crus, pré-cozidos ou cozidos (ORDÓÑEZ, 2005). A técnica de reestruturação é uma excelente ferramenta para preparação de produtos da pesca uniformes, a partir de porções ou partículas de vários tamanhos. Com essa tecnologia é possível elaborar produtos de qualidade considerável a partir de peixes com texturas diferentes e de difícil comercialização, além de permitir diversificar a oferta no que se refere ao pescado (ESNOZ-NICUESA; SOTO-JOVER, 2016).

Os produtos reestruturados podem ser moldados e comercializados em porções individuais que requerem preparação culinária rápida e simples, com formulações que atendem a exigência de um grupo específico de consumidores que buscam baixo teor de aditivos químicos, baixo teor de sal ou maior quantidade de fibra, por exemplo (FUCHS et al., 2018).

No Brasil, os produtos de origem animal devem seguir o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) elaborado e aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através do Decreto N° 10.468, de 18 de agosto de 2020, porém atualmente, ainda não existe uma legislação específica para hambúrgueres e almôndegas de peixe (RIISPOA,2020). Para além disso, o desenvolvimento de produtos da pesca reestruturados e a aplicação de novos ingredientes alimentares têm sido também usados como um meio de alcançar consumidores jovens e preocupados com a saúde (ESNOZ-NICUESA; SOTO-JOVER, 2016).

Atualmente já existem técnicas bastante avançadas para processo tecnológico de pescado, dentre eles estão: Carne Mecanicamente Separada (CMS), que é a polpa de peixe separada de pele e ossos, em máquina desossadora, o Surimi que significa músculo de pescado picado, cujo processo tecnológico envolve a eliminação de espinhas, tecido conjuntivo e tudo o que pode ser considerado não funcional, para a obtenção de uma massa de actomiosina com conteúdo aquoso similar ao original do músculo de pescado e adicionada de crioprotetores (açúcares e sais de fosfato polimerizado). (NEIVA; GONÇALVES, 2011).

Observa-se que o Surimi é um produto mais refinado que a CMS, devido ao maior número de lavagens em comparação a CMS e adição das etapas de refinação e homogeneização com agentes crioprotetores, durante o processamento. Na obtenção da CMS, portanto, não há remoção efetiva de proteínas sarcoplasmáticas e lipídios (NEIVA; GONÇALVES, 2011). Produtos à base de CMS são tecnologicamente mais antigos e menos complexos que os a base

de Surimi, no entanto estes ocupam uma fatia maior do mercado, apesar da obtenção de CMS ser mais simples e mais viável economicamente (MOUSA; AL-KHATEEB, 2017).

Os óleos de peixe são produzidos através do refino de subprodutos de pescado com o objetivo de classificar os subprodutos como potenciais para a produção de óleo de peixe com alta qualidade e valor nutricional (SOLDO et al., 2019). A utilização de subprodutos como fonte de compostos lipídicos, como o ômega-3, ajuda a melhorar o gerenciamento de resíduos das indústrias de pescado, entretanto este processo por ser totalmente industrial, seus produtos atendem uma pequena parte da população economicamente favorecida em forma de capsulas (ŠIMAT et al., 2020).

Para além disso, existem inúmeras espécies de peixes subutilizadas e de baixo valor comercial devido ao seu tamanho, sabor, odor, cor ou textura. A exemplo é a Sardinha, cujo potencial nutricional já foi exaustivamente estudado e comprovado. Em resumo a elaboração de almôndegas de sardinha seria interessante nutricionalmente, além de não ter necessidade de retirar pele e espinha, o que facilita o preparo e consumo.

1.3 Sardinha Europeia (*Sardina pilchardus*)

No Brasil, a Câmara de Comércio Exterior (Camex) do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, reduziu o imposto de importação sobre a sardinha congelada. A alíquota cobrada sobre o produto caiu de 10% para 2%, em 2013, com o objetivo de evitar o desabastecimento do peixe no mercado brasileiro durante o período do defeso, quando há a proibição da pesca para permitir a reprodução da espécie. Para se beneficiar da alíquota menor, o produto foi incluído na Lista Brasileira de Exceções à Tarifa Externa Comum do Mercosul (AGÊNCIA BRASIL, 2013).

Em 2019 esta taxa de importação foi reduzida a 0%, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Portaria nº 154/2019, que trata da medida. Esta redução teve como base a preservação dos estoques nacionais e os dados de desembarque e consumo dos anos anteriores. A fim de manter a oferta de sardinha as importações somaram 90,3 mil toneladas em 2018, onde as principais origens das importações foram Marrocos (77,5%) e Omã (22,1%), totalizando 99,6% do total (MAPA, 2019).

A sardinha é um peixe pelágico pertencente à família Clupeidae, seu nome vulgar é originário da ilha da Sardenha na Itália, onde já foi abundante. A Sardinha Europeia (*Sardina pilchardus*), figura 1, é um pequeno peixe que ocorre em correntes temperadas, possui hábitos

de formar grandes cardumes a profundidades compreendidas entre os 25 e os 100 metros, migrando até aos 10-35 metros durante a noite (HURE; MUSTAC, 2020). Alimenta-se principalmente de crustáceos planctónicos, microalgas e ovos, através de filtração passiva e/ou predação ativa. De rápido crescimento, tem uma longevidade máxima de 15 anos podendo atingir os 27,5 cm de comprimento. Reproduz-se junto à costa produzindo entre 50.000 a 60.000 ovos com um diâmetro médio de 1,5 mm (VARGAS-YÁÑEZ et al., 2020).



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

A sua distribuição geográfica, figura 2, compreende a faixa costeira do Atlântico Nordeste, desde o Senegal ao Mar do Norte, incluindo o Mar Mediterrâneo e Mar Negro. Várias populações de sardinhas foram identificadas por métodos morfométricos, incluindo até 5 populações no Atlântico Nordeste, 2 na costa marroquina e 1 nas águas do Senegal. Cada uma dessas populações reconhecidas deste teleósteo está sujeita a condições climáticas e oceânicas específicas, principalmente durante o desenvolvimento larval, que influenciam diretamente o recrutamento da pesca de sardinha (LOURO et al., 2019).

O Marrocos tem mais de 3500 km de costa com potencial para recurso pesqueiro estimado em 1,5 milhão de toneladas por ano. Segundo o departamento de pesca marítima da Europa, a capacidade de produção de peixe fresco aumentou notavelmente para 955.190 toneladas nos últimos anos, com um resíduo orgânico avaliado em 40%; e superior a 382 toneladas por ano. Uma das espécies mais pescadas é a sardinha, com uma produção anual de 10.000 toneladas (LOURO et al., 2019; MORALES-MEDINA et al., 2016).

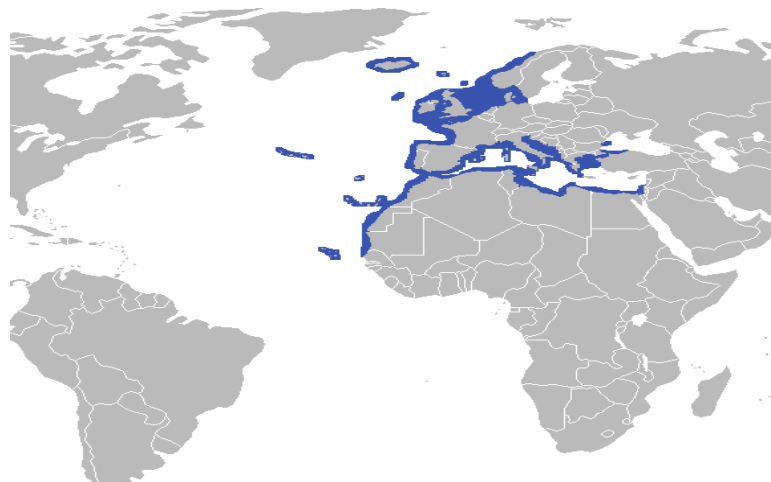


Figura 2: Distribuição geográfica dos cardumes de *Sardina pilchardus*, compreendem a faixa costeira do Atlântico Nordeste, Mar Mediterrâneo e Mar Negro.

A sardinha tem sido um dos mais importantes objetos de estudo desde a década de 70, inicialmente devido a variação da biomassa que afetou diretamente os estoques pesqueiros para satisfazer o crescente consumo sem respeitar a época de reprodução (VARGAS-YÁÑEZ et al., 2020). Anualmente dados são recolhidos por programas de pesca para serem analisados, e foram desenvolvidas técnicas específicas para a captura e transporte, e adicionalmente, foi estudada a capacidade de reação da sardinha à predação ocorrida após liberação na pesca de cerco. Biólogos e políticos procuram soluções para garantir uma pesca sustentável através da regulamentação e aumento do conhecimento biológico desta espécie, o que garantiu a retomada de sua biomassa pesqueira (BAHAMMOU et al., 2019; LOURO et al., 2019).

A *S. pilchardus* é uma fonte de compostos bioativos, como os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3. O armazenamento dos lipídios ocorre principalmente como gordura subcutânea, mas também nas vísceras e incorporado no músculo (GARCIA et al., 2019).

Estudos recentes relataram a bioacessibilidade dos teores lipídicos em sardinha (*Sardina pilchardus*) enlatada. A bioacessibilidade de gordura total ficou na faixa de 60 a 64% e os níveis de EPA, DHA e os ácidos graxos da família ômega-3 foram excelentes, o que sugere um consumo de 47 g de sardinha enlatada garantiria a ingestão diária recomendada de EPA + DHA (GARCIA et al., 2019).

Desta forma, diversos estudos demonstram que os subprodutos da sardinha podem ser utilizados como uma fonte alternativa de PUFA's, contribuindo para a gestão de resíduos da indústria de conservas e a pesca sustentável (ŠIMAT et al., 2020). Também permite que o setor se beneficie economicamente com compostos isolados, a partir de inúmeras aplicações na

produção de alimentos e rações, cosméticos e produtos farmacêuticos (SOLDO et al., 2019).

Além da importância da sua porção lipídica, existem estudos referentes ao efeito da combinação de proteína isolada de *Sardinha pilchardus* e raspas da casca de limão verde (*Citrus latifolia*) em ratos diabéticos e hipertensos. E os resultados sugerem que o consumo de ambos combinados pode reduzir a pressão sanguínea e os danos oxidativos dos tecidos, portanto, ajuda a prevenir complicações cardiovasculares em pacientes diabéticos e hipertensos, uma vez que induziram uma diminuição dos valores da pressão arterial diastólica e da frequência cardíaca, além dos valores de HDL terem sido aumentados e de TBARS diminuíram no fígado e nos rins (KHELLADI; KROUF; TALEB-DIDA, 2018).

Comprovadamente a Sardinha é um excelente alimento, porém pouco valorizada *in natura*, sendo a razão mais significativa, o fato de seu reduzido tamanho e sabor característico, estando presente apenas em produtos enlatados ou comercializada em filés. Entretanto, poderia ser utilizado na obtenção de produtos secundários e que suprisse as necessidades nutricionais das diversas classes sociais.

2 Oxidação lipídica

Em produtos de origem animal a reação de oxidação afeta lipídios, proteínas e pigmentos, resultando em deterioração da cor, sabor, textura e valor nutricional. A oxidação lipídica vem sendo profundamente estudada nas últimas décadas, devido à susceptibilidade às alterações de degradação de produtos com altos teores de lipídios insaturados na presença de sistemas pro-oxidantes como luz, calor, enzimas e metais, sendo que a maioria destes envolvem radicais livres e/ou outras espécies reativas de oxigênio como intermediários (LORENZO et al., 2018).

Os lipídios são nutrientes importantes responsáveis pelo aporte de energia nas dietas, exercem função estrutural, composição e permeabilidade das membranas e paredes celulares e no isolamento e proteção dos órgãos internos do corpo. Contêm em sua estrutura carbono, hidrogênio e oxigênio, em algumas classes são encontrados fósforo, nitrogênio e às vezes, enxofre. São de origem animal, vegetal ou mesmo microbiana, de onde podem ser facilmente extraídos com solventes orgânicos (ESKIN; SHAHIDI, 2015).

O processo de oxidação, representado na figura 3, ocorre em três diferentes etapas, que diferem entre si pelos componentes formados. A primeira etapa é a fase de indução, também conhecida como iniciação, ocorre quando um átomo de hidrogênio é removido do grupo

metileno de um ácido graxo insaturado, levando a formação de um radical livre. Para que a reação ocorra faz-se necessário a presença de oxigênio e de uma certa energia inicial. Esta primeira fase é marcada pelo baixo consumo de oxigênio, baixas concentrações de peróxidos, aumento nas concentrações de radicais livres e ausência de alterações sensoriais (ESKIN; SHAHIDI, 2015; LORENZO et al., 2018).

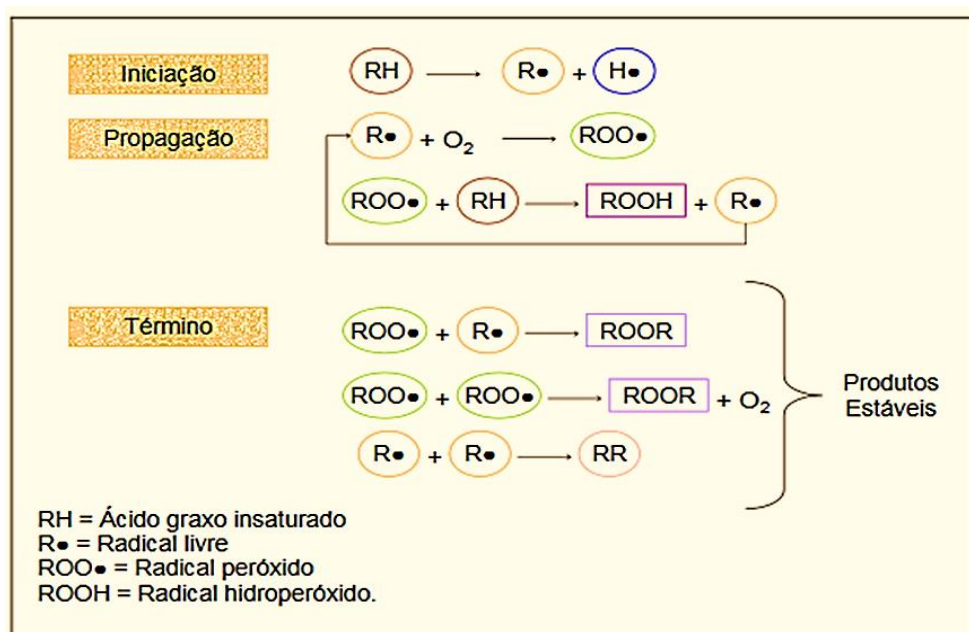


Figura 3: Esquema geral para a oxidação de ácidos graxos (de OLIVEIRA, 2018).

A segunda fase é a da propagação, onde o radical livre que foi formado reage com o oxigênio atmosférico, gerando um radical peróxido. Esses radicais seguem reagindo com outros ácidos graxos insaturados, produzindo outro radical livre e hidroperóxidos, seguindo uma reação em cadeia de radicais livres. Devido à instabilidade dos hidroperóxidos, eles se decompõem gerando aldeídos, cetonas e álcoois, dentre estes estão os agentes indesejáveis de sabor e odor. É caracterizada pelo alto consumo de oxigênio e o início das alterações sensoriais, com aparecimento de odor (LORENZO et al., 2018).

A terceira e última etapa é a fase de terminação, que ocorre quando dois radicais livres interagem entre si, formando produtos estáveis, encerrando a função de propagação. Esta fase é caracterizada pelo decréscimo da concentração de peróxidos, do consumo de oxigênio e pela presença de forte alteração sensorial marcada por sabor e cheiro forte, alteração na viscosidade e na cor, além de alterações na composição do produto (ESKIN; SHAHIDI, 2015; LORENZO et al., 2018).

Além disso, dependendo da molécula envolvida, a oxidação pode ocorrer ainda mais rapidamente, como no caso do EPA e do DHA. Estudos comprovam que a autooxidação destes pode se dar mesmo ao abrigo da luz, em temperaturas que não chegam a 60 °C e durante o armazenamento. Em relação ao consumo de oxigênio, o EPA e DHA também são susceptíveis a rápida deterioração. Isso ocorre porque a velocidade de oxidação de compostos com sistemas polinsaturados e compostos metílicos é muito mais alta do que os compostos que apresentam somente uma dupla ligação, já que este grupamento metílico é ativado pelas duas duplas ligações adjacentes, aumentando assim a velocidade de reação da oxidação (ESKIN; SHAHIDI, 2015; MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2017; SVEINSDÓTTIR et al., 2020).

Em geral, a literatura ressalta, e corrobora, que tanto no grupo controle quanto no grupo de tratamento com antioxidante durante o armazenamento, as concentrações de PUFA diminuem em todos os grupos, porém a maior diminuição é no grupo controle, ou seja, sem adição de antioxidantes. Estes estudos também relatam que os ácidos graxos da família ômega-3, especificamente o eicosapentanoico (EPA) C20:5 - 20 carbonos e 5 insaturações, e o docosahexanoico (DHA) C22:6 - 22 carbonos e 6 insaturações, são os que mais degradam (Figura 4) (ÖZ et al., 2017; ÖZALP ÖZEN; SOYER, 2018; UÇAR, 2020).

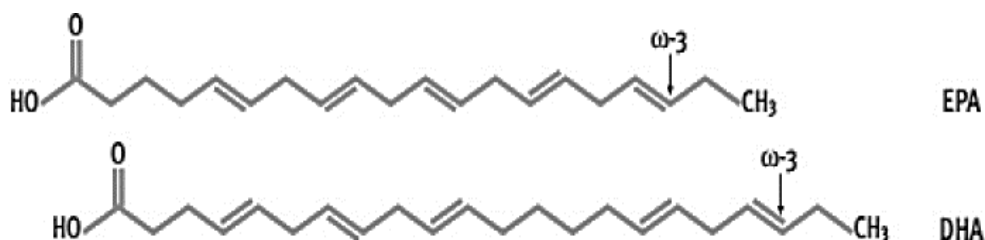


Figura 4: Estrutura plana do EPA e DHA.

Durante a oxidação lipídica, o malonaldeído, um composto volátil responsável pelo odor de ranço, é formado a partir de ácidos graxos com três ou mais ligações duplas, este aldeído é o mais abundante na oxidação e é considerado prejudicial à saúde por reagir com proteínas, DNA, RNA e outras biomoléculas. O 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) é o principal aldeído formado durante a autooxidação de ácidos graxos ômega-6, e o *Trans*-4-hidroxi-2-hexanal (HHE) é derivado da oxidação de ácidos graxos ômega-3, ambos compostos, pela literatura, são considerados citotóxicos (LONG; PICKLO, 2010; MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2017)

Para além disso os lipídios oxidados e produtos da oxidação lipídica podem formar complexos proteína-lipídio, proteína-proteína e aldeídos-grupamentos amino de bases de Schiff, formando polímeros, levando à desnaturação proteica, inibição da atividade enzimática

e diminuição da solubilidade, ou ainda provocar cisão de proteínas (LORENZO et al., 2018; ZAMUZ et al., 2018).

Por outro lado, os ácidos graxos, como já foi dito, apresentam importante papel no tecido biológico, como constituintes lipídicos das membranas celulares, influenciam diretamente em certas propriedades, tais como, integridade, fluidez, permeabilidade e atividades de ligação enzima-membrana. No entanto, de acordo com o tipo de ácido graxo consumido na dieta, importantes implicações para o metabolismo podem ser geradas, aumentando os fatores de risco a doenças cardiovasculares e neoplasias (ESKIN, 2012; SHAHIDI; ZHONG, 2010). Portanto, é muito importante investigar a influência da oxidação lipídica em produtos da pesca, a fim de melhorar sua qualidade nutricional e sensorial durante o armazenamento.

3 Colesterol e óxidos de colesterol em pescado

O colesterol é uma molécula com um grupo hidroxila ligado ao C₃ da parte polar e uma outra parte apolar. Está presente na membrana celular, o que confere fluidez, e é transportado no plasma sanguíneo de todos os animais. Possui funções específicas de síntese de ácidos biliares, hormônios sexuais, hormônios adrenocorticais e na síntese de vitamina D₃. Aproximadamente 70% do colesterol é endógeno, produzido no fígado, enquanto os outros 30% são provenientes da dieta (ESKIN; SHAHIDI, 2015).

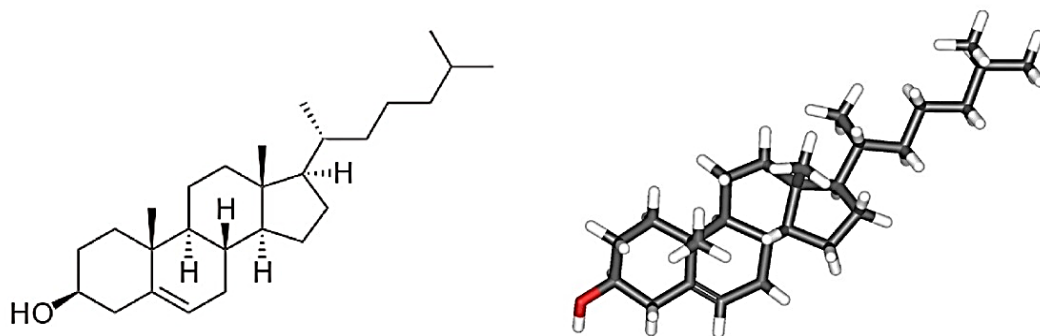


Figura 5: Estrutura plana e espacial de colesterol, em vermelho a parte polar e em cinza a porção apolar.

Assim como os ácidos graxos, o colesterol, por ser um composto insaturado, pode sofrer oxidação, geralmente iniciado no carbono 7, e ser degradado por vias autoxidativas, devido ao fato de que ambas sofrem uma série de reações com radicais livres, formando produtos de degradação, como os produtos oxidados de colesterol (POCs) ou apenas óxidos de colesterol,

que mantem a parte esteroide do composto original, mas ligado a um grupo hidroxil, cetona ou epóxi, conferindo-lhes maior polaridade, figura 4. Estas diferenças estruturais e sua posição entregam propriedades muito importantes nos POCs, que definem em alguns casos, o tipo e a intensidade do efeito biológico (MALDONADO-PEREIRA et al., 2018).

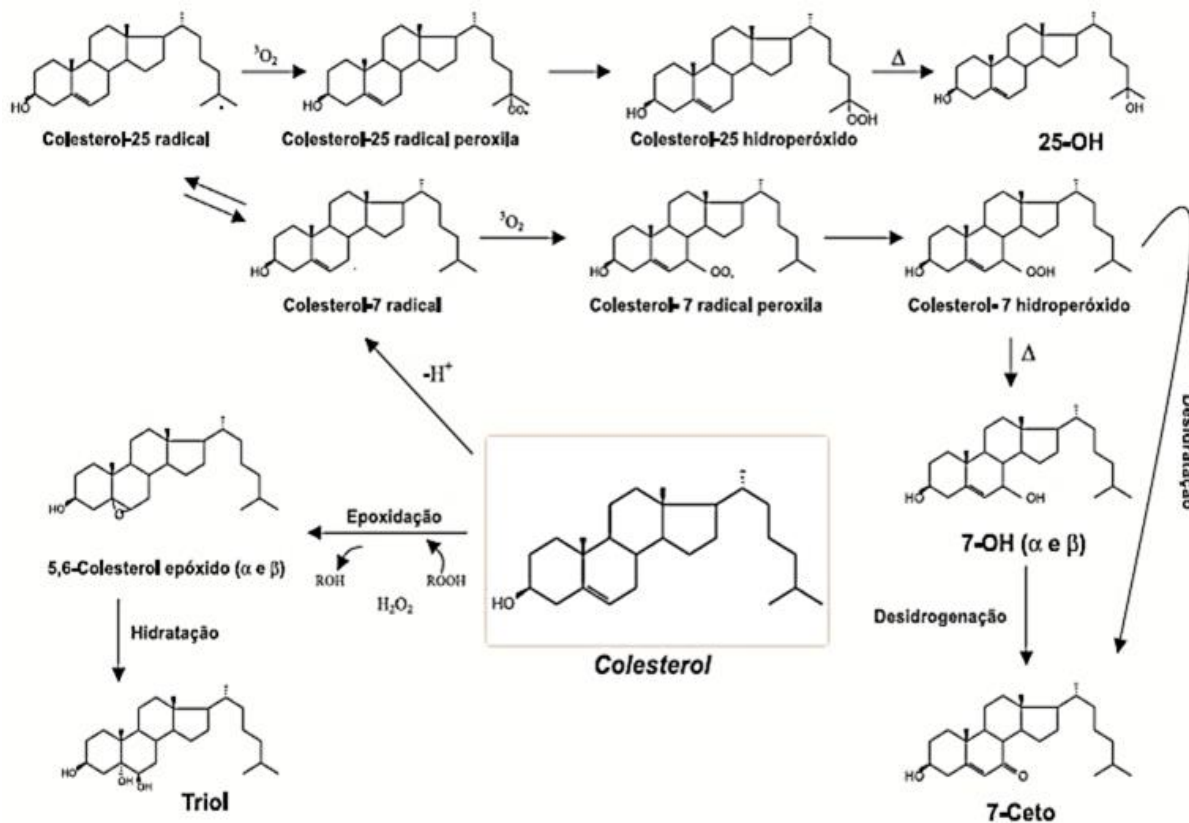


Figura 6: Formação de óxidos de colesterol de maior ocorrência em alimentos (MORALES-AIZPURÚA; TENUTA-FILHO, 2002).

Os óxidos de colesterol são formados por via enzimática nos animais, basicamente no fígado e nos tecidos que sintetizam hormônios esteroides. Nos alimentos, a oxidação ocorre por mecanismos não-enzimáticos, comumente conhecidos como autoxidação, peroxidação lipídica e oxidação fotoquímica, sendo o primeiro o mais conhecido (SMITH, 1987).

O perfil dos óxidos formados e as quantidades correspondentes também são definidos pelas características do alimento e interações entre seus componentes e produtos de decomposição, durante o processamento e/ou armazenamento. Porém já está comprovado que a presença de ácidos graxos insaturados na matriz alimentar pode acelerar a oxidação do colesterol, pois gera um ambiente pró-oxidante, devido à presença de zonas de ressonância,

resultando em radicais como os hidroperóxidos (MALDONADO-PEREIRA et al., 2018).

Os óxidos de colesterol podem substituir o colesterol na membrana celular afetando sua fluidez, permeabilidade e estabilidade, provocando mudanças na morfologia das células e nas funções fisiológicas das mesmas (GROOTVELD et al., 2020). Também afetam a estereoquímica das proteínas e fosfolipídios, alterando as características da membrana. Outra interação nociva é que os POCs podem modificar o fluxo de cálcio, que é determinado pela relação colesterol/fosfolipídio, afetando assim homeostase do cálcio nas células. (ROSA-FERNANDES et al., 2017).

Mais de 80 produtos da oxidação do colesterol foram identificados em diversos organismos e matrizes. Dentre os alimentos de origem animal, o pescado está entre os mais propensos à deterioração oxidativa do colesterol devido à alta proporção de ácidos graxos poli-insaturados em sua fração lipídica e aos níveis elevados de colesterol observados em algumas espécies (DANTAS et al., 2015; MORALES-AIZPURÚA; TENUTA-FILHO, 2002).

O tipo de processamento tecnológico e as condições de armazenamento também contribuem para que o pescado seja susceptível à presença de quantidades significativas de óxidos de colesterol. Como exposto na tabela 2, muitos óxidos de colesterol estão sendo pesquisados e identificados nas últimas décadas, onde os mais frequentemente determinados em produtos da pesca são: o 7-cetocolesterol, 20 α -hidroxicolesterol, 25 -hidroxicolesterol, 7 α , β -hidroxicolesterol e 5,6 α , β -epoxicolesterol (GROOTVELD et al., 2020).

O 7-Cetocolesterol é utilizado como indicador da oxidação do colesterol em alimentos, uma vez que é produzido em maior quantidade e nos estágios iniciais do processo oxidativo. Devido a autooxidação do colesterol, geralmente no C-7 da cadeia, são formados dois 7-hidroperóxidos, que com influência da temperatura desidratam e formam o 7- Ceto, além do 7 α -hidroxicolesterol e do 7 β -hidroxicolesterol que também se decompõem e formam este óxido de colesterol (FERREIRA et al., 2017).

Tabela 2: Estudos que identificaram óxidos de colesterol em pescado.

Objetivos	Óxidos encontrados	Referência
Files de <i>Merluccius hubbsi</i> , embalagem sem oxigênio, cru e grelhado durante armazenamento congelado por 120 dias	19 - OH, 24 s- OH, 22 S- OH, 7-ceto e 25 - OH	(SALDANHA; BRAGAGNOLO, 2007)
Files de <i>Sardinella brasiliensis</i> , cru e grelhado durante armazenamento congelado por 120 dias	19 - OH, 24 s- OH, 22 S- OH, 7-ceto e 25 - OH	(SALDANHA; BENASSI; BRAGAGNOLO, 2008)
Files de <i>Merluccius hubbsi</i> , embalagem com baixo e alto oxigênio, cru e grelhado durante armazenamento congelado por 120 dias	19 - OH, 24 s- OH, 22 S- OH, 7-ceto, 25 - OH, 5,6 α -epóxido e 5,6 β -epóxido	(SALDANHA; BRAGAGNOLO, 2008)
<i>Trachurus trachurus</i> pré-tratamento por imersão em uma solução de antioxidante natural e armazenamento congelado por 12 meses.	7 α - OH, 7 β - OH e 7-ceto	(LEBOVICS et al., 2009)
Almôndegas de <i>Cynoscion ssp</i> adicionadas de antioxidante natural congeladas por 120 dias e cozidas	7-Ceto, 7 α - OH, 7 β - OH, α -epóxido e β -epóxido	(SANCHO et al., 2011)
Rissóis de <i>Clupea harengus</i> e <i>Scomber scombrus</i> com adição de antioxidantes naturais durante o processamento com alta pressão e armazenamento refrigerado por 14 dias.	7-Ceto, 7 α - OH, 7 β - OH, α -epóxido e β -epóxido	(FIGUEIRÊDO et al., 2015)
Rissóis de <i>Salmo salar</i> com adição de extratos supercríticos de CO ₂ de 7 ervas antioxidantes e antimicrobiana durante 14 dias de armazenamento congelado e cocção.	7 α - OH, 7 β - OH e 7- OH	(TARVAINEN et al., 2016)
Files de <i>Sardinella brasiliensis</i> adicionados de antioxidante natural e coccionados em Air Fryer.	20 α - OH, 22 R- OH, 22 S- OH, 7 α - OH, 7 β - OH, 7-ceto, 25 - OH, 25 R-OH, 5,6 α -epóxido e 5,6 β -epóxido	(FERREIRA et al., 2017)
Filés de <i>Scomberomorus cavalla</i> cozidos no leite de coco ou frito em óleo de coco.	7 β - OH	(LIRA et al., 2017)
Sistema modelo utilizando óleo peixe com colesterol adicionado e aquecido por microondas e forno de convecção.	7 α - OH, 7 β - OH, 7-ceto, 5,6 α -epóxido e 5,6 β -epóxido	(LEAL-CASTAÑEDA et al., 2017)
Óleo de <i>Sardinella brasiliensis</i> adicionado de antioxidante natural durante o aquecimento (150 e 180 ° C).	20 α - OH, 7 α - OH, 7 β - OH, 7-ceto, 25 R-OH, 5,6 α -epóxido e 5,6 β -epóxido	(DE OLIVEIRA et al., 2020)

3.2 Efeitos dos óxidos de colesterol a saúde

Nos últimos anos, tem havido grande interesse por parte da comunidade científica, pelos produtos formados pela oxidação do colesterol encontrados nos alimentos. A base desse interesse se deve a ingestão dietética destes óxidos, por meio de estudos populacionais e epidemiológicos, os quais mostraram que o consumo de alimentos processados está associado ao aumento dos coeficientes de comorbidades e mortalidade (GROOTVELD et al., 2020; MALDONADO-PEREIRA et al., 2018).

O colesterol é transportado no sangue de duas formas, o LDL, Lipoproteínas de Baixa Densidade, que é responsável pelo transporte de colesterol produzido pelo fígado, para as células. Já o HDL, Lipoproteínas de Alta Densidade, retira o excesso de colesterol das artérias, ou seja, da grande circulação, levando de volta para o fígado (GUYTON, 2003).

Estudos comprovam que os óxidos de colesterol habitualmente encontrados em alimentos como o 7-Ceto, 25-OH, 7 α -OH, 7 β -OH, 5,6 α -epóxido, 5,6 β -epóxido são citotóxicos e aterogênicos, em diferentes graus, sendo que o colesterol, por si só, não apresenta estes efeitos (GROOTVELD et al., 2020).

Os óxidos de colesterol contribuem para a formação de lesões arteriais, por aumentarem a permeabilidade vascular à albumina e a outras macromoléculas, estimulando a agregação de plaquetas por alterações no equilíbrio das prostaglandinas e alterando a composição lipídica da LDL. Estes compostos também inibem a expressão dos receptores de LDL e reprimem o relaxamento do endotélio arterial (GROOTVELD et al., 2020).

Quantidades de óxidos de colesterol foram identificados em tecidos humanos de aortas, plasma e fígado de indivíduos hipercolesterolêmicos e ateroscleróticos. Estudos etiológicos populacionais têm correlacionado o colestano-3 β -5 α -6 β -triol ao câncer de cólon, 5,6 α -epoxicolesterol e 5,6 β -epoxicolesterol ao de mama e ao de próstata. E cada vez mais estudos relacionam através de evidências a citotoxicidade e o potencial efeito carcinogênico dos “POCs” (FREITAS et al., 2014; SILVENTE-POIROT, 2013; HUR et al, 2014).

Em razão disso, a formação e a ingestão desses compostos precisam ser profundamente examinadas. Não existem conhecimentos suficientes que permitam estabelecer limites seguros para a ocorrência desses óxidos em alimentos, o mesmo acontecendo em relação à ingestão dos mesmos (MALDONADO-PEREIRA et al., 2018). Apesar de evidências patológicas das atividades biológicas destes compostos em humanos, e reconhecendo-se que a produção dos mesmos é inevitável e involuntariamente formada durante o processamento armazenamento,

manuseio e até mesmo preparações domésticas de alimentos, o conteúdo dos “POCs” em fontes alimentares tem sido negligenciado (GROOTVELD et al., 2020).

4 Oxidação do pescado durante o congelamento

Diferentes fatores são responsáveis pela perda de qualidade nos produtos da pesca, sendo os principais o desenvolvimento microbiano, atividade de enzimas endógenas e oxidação de lipídios e proteínas. O congelamento seguido de armazenamento congelado tem sido um dos melhores métodos para garantir a segurança e reter atributos de qualidade e valor dos produtos da pesca expostos a armazenamento prolongado (CROPOTOVA et al., 2020).

No Brasil, os setores de alimentos congelados e desidratados representam somente 8% das indústrias alimentícias no país, ainda é um número irrisório e que deve aumentar consideravelmente nos próximos anos devido à projeção de aumento da produção de alimentos no país (FAO, 2019).

O congelamento baseia-se na redução da temperatura do alimento a temperaturas inferiores ao ponto de congelamento, ocorrendo a mudança de fase da água do estado líquido para estado sólido em forma de cristais de gelo. Com o processo de congelamento, parte da água fica imobilizada em forma de cristais de gelo e ocorre simultaneamente a concentração de solutos dissolvidos na fase líquida, reduzindo a atividade de água do alimento, prevenindo assim o crescimento microbiano e minimizando as velocidades de reações químicas e enzimáticas (BAGNULO, 2006).

No entanto, algumas mudanças físicas e químicas negativas ocorrem durante o processo de congelamento-degelo e armazenamento congelado, como desnaturação de proteínas ou oxidação lipídica, que podem resultar em deterioração do odor e sabor, perda de peso ou mudança na textura do músculo. Isso pode levar a alterações nas propriedades funcionais como a capacidade de retenção de água, reduzindo o valor da matéria-prima para posterior transformação em carne picada utilizada na produção de produtos da pesca (CROPOTOVA et al., 2020; LINKE; WEISS; KOHLUS, 2020).

As reações oxidativas que ocorrem durante o armazenamento congelado se enquadram em duas categorias principais: oxidação de lipídios e de proteínas. A deterioração, principalmente em sabor e textura, é induzida por oxidação, remoção osmótica da desnaturação de água e proteínas (CROPOTOVA et al., 2020). Abaixo de -18 ° C, as lipases podem produzir lipólise e ocorrer a oxidação lipídica devido à sua ação hidrolítica sobre fosfolipídios e triacilgliceróis, com os compostos resultantes causando um odor e sabor rançosos. Por outro

lado, o armazenamento congelado aumenta a oxidação de proteínas devido ao ferro catalítico liberado pela alteração das membranas celulares e a possível concentração de solutos pró-oxidantes em torno das moléculas de proteína na água (SECCI; PARISI, 2016).

Segundo Saldanha & Bragagnolo (2007), o armazenamento em -18°C , durante 120 dias ocasionou mudanças na composição lipídica de filés frescos de pescada do Atlântico (*Merluccius hubbsi*) onde, houve uma redução significativa no conteúdo de EPA e DHA, que chegaram a cerca de 36%, o que também ocorreu em menor grau com os ácidos graxos saturados. Além deste achado, o armazenamento congelado da sardinha brasileira (*Sardinella brasiliensis*) resultou na diminuição dos teores de EPA e DHA ao longo de 120 dias. As perdas destes compostos provavelmente estão relacionados à autooxidação de lipídios e a não utilização de agentes antioxidantes (SALDANHA; BENASSI; BRAGAGNOLO, 2008).

Na produção de alimentos provenientes de pescado como bolinhos, hamburgueses e salsichas, o congelamento, seguido pelo armazenamento congelado, tem sido um dos melhores métodos para garantir a segurança e reter atributos de qualidade e valor nutricional dos produtos de pescado expostos ao armazenamento prolongado, principalmente quando ocorre processamento e a utilização conjunta de antioxidantes (GOKOGLU et al., 2012).

Os efeitos do extrato de folha de *Perilla frutescens* na qualidade de bolinhas de surimi foram investigadas e retardou a oxidação de lipídios e proteínas durante o armazenamento a 4°C por 12 dias, pela redução significativa nos valores de TBARS (ZHAO et al., 2019). A adição de emulsões de tocoferol na oxidação de lipídios em salsichas de peixe (*Trachinotus Blochii*), que obtiveram resultados significativos no que se refere a proporção de PUFA após 16 dias de armazenamento refrigerado, indicando os efeitos protetores do tocoferol para oxidação de ácidos graxos durante o armazenamento. Também foi observado que tocoferol manteve os teores de ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 (FENG et al., 2020).

Ao se processar o músculo do pescado ocorre o aumento da superfície de contato, tornando assim o produto vulnerável, podendo sofrer em curto espaço de tempo alterações de natureza física, química e microbiológica, refletindo na cor, consistência, odor e sabor (ESNOZ-NICUESA; SOTO-JOVER, 2016).

Como resultado da crescente demanda do consumidor por produtos de pescado seguros e com características sensoriais e nutricionais superiores, para preservar a vida útil em armazenamento congelado e evitar a peroxidação lipídica, muitas barreiras antioxidantes são utilizadas, desde a captura até o consumidor. No entanto, preocupações crescentes com nutrição e saúde resultaram em uma tendência para "produtos naturais" livres de aditivos alimentares sintéticos, conhecidos como "rótulo limpo", e são cada vez mais exigidos pelos consumidores.

5 Utilização de antioxidantes naturais em produtos de pescado

Os antioxidantes são definidos pela Portaria da ANVISA nº 540, de 27 de outubro de 1997 como substâncias que em pequenas concentrações tem a capacidade de retardar ou prevenir o aparecimento de alterações oxidativas no alimento (BRASIL, 1997). Os antioxidantes não inibem apenas a peroxidação dos lipídios, mas também a oxidação de outras moléculas, como proteínas (FERYSIUK et al., 2020).

A Resolução - RDC Nº 329, de 19 DE dezembro de 2019, estabelece os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em pescado e produtos de pescado, estes são: Ascorbato de sódio; Ascorbato de cálcio; Ácido eritórbito; Eritorbato de sódio; Etileno diamino tetraacetato (EDTA); BHA; BHT; Sorbatos entre outros. Porém fica expresso na resolução para qual função e quantidade específica cada um destes antioxidantes sintéticos é permitido (BRASIL, 2019).

O butilhidroxianisol (BHA) e o butilhidroxitolueno (BHT), cuja ação consiste na rápida doação de um átomo de hidrogênio para o radical livre, são os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos, no entanto, o problema dos antioxidantes sintéticos está relacionado à sua potencial toxicidade e informações contraditórias sobre seu efeito cancerígeno (ZAMUZ et al., 2018). Por esse motivo, nos últimos anos o uso de antioxidantes sintéticos está sendo restrito em diferentes países e tem havido um interesse crescente em antioxidantes naturais obtidos de fontes vegetais (FERYSIUK et al., 2020).

Nas últimas décadas muitas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, para que possam substituir os antioxidantes sintéticos ou fazer associações entre eles, diminuindo a quantidade adicionada nos alimentos (GOTTARDI et al., 2016). Isso porque a oxidação lipídica é uma das principais reações deteriorativas que podem ocorrer durante o processamento, distribuição, armazenamento e preparo do alimento, sendo que em carnes esse processo de deterioração inicia-se logo após o abate (LORENZO et al., 2018).

A atividade dos antioxidantes em sistemas alimentícios depende não apenas da reatividade química do antioxidante, mas também de fatores como a localização física, a interação com outros componentes do alimento, além das condições ambientais (REGINA; MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007). Além disso, o uso dos antioxidantes naturais deve ser compatível sensorialmente com o produto ao qual foi adicionado, e a ação antioxidante pode

ser afetada devido a quantidade do composto presente, um exemplo são pimentas picantes (FERYSIUK et al., 2020).

Alguns autores apontam ainda dificuldades na introdução das substâncias antioxidantes em peixe inteiro, apenas através de revestimentos comestíveis, o que de fato tem uma ação antirradical sob congelamento, porém ao utilizar aquecimento térmico a sua eficácia é mínima (ÖZALP ÖZEN; SOYER, 2018). Já no musculo triturado há evidências que, individualmente ou em forma de misturas, os vários tipos de inibidores podem ser efetivos, minimizando a oxidação lipídica (VILLASANTE et al., 2019).

A aplicação de antioxidantes naturais melhora significativamente a qualidade do pescado processado, por aumentar o conteúdo de compostos bioativos e retardar a oxidação de peixes, agindo de forma sinérgica (GANIARI et al., 2017). Assim, inúmeros trabalhos têm sido realizados com o intuito de substituir os antioxidantes sintéticos por compostos naturais presentes em frutos, ervas e especiarias juntas e em separado (DE OLIVEIRA et al., 2018). As substâncias antioxidantes mais estudadas são: quercetina (endro), capsaicina (pimentão vermelho), Curcumina (açafrão), Carvacrol (orégano, tomilho, manjerona), timol (orégano, tomilho), piperina (pimenta preta), Gingerol (gingibre, manjerona), entre outros (GOTTARDI et al., 2016).

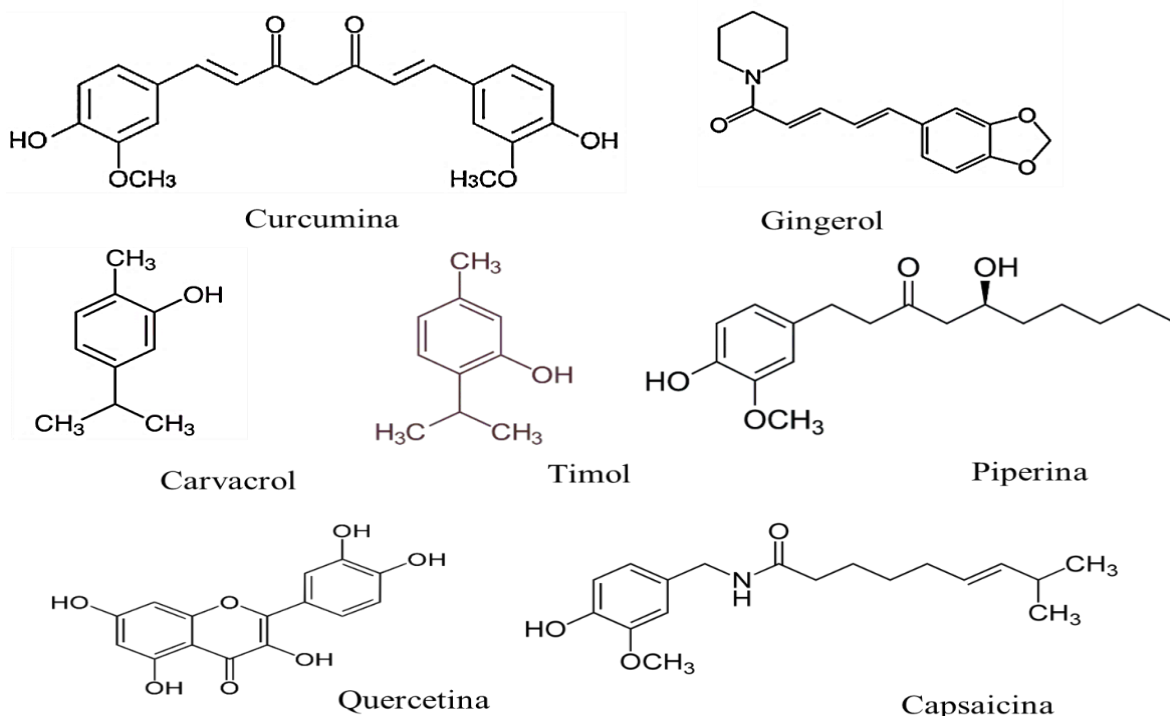


Figura 7: Compostos bioativos com ação antioxidante encontrados em vegetais (GOTTARDI et al., 2016).

Segundo Figueiredo et al. (2015) a utilização do Urucum como antioxidante em peixes, durante o processamento sob alta pressão e armazenamento refrigerado por 2 semanas, reduziu a perda de ácido docosaenoico de 12% para 7% e os carotenoides presentes protegeram o colesterol da membrana celular no músculo do peixe.

Viji et al. (2017), realizaram um estudo utilizando extratos com folha de hortelã e extratos com casca de laranja (*Citrus aurantium*) como antioxidantes naturais frente a oxidação lipídica em amostras de cavala indiana (*Scomber japonicus*) durante 8 meses de armazenamento em freezer a -20 °C. Os autores do estudo sugeriram que o extrato de hortelã é um inibidor muito efetivo da oxidação lipídica.

Outro estudo recente com diferentes extratos vegetais, realizado por Ozen & Soyer (2018), utilizaram chá verde, semente de uvas e cascas de romã, em comparação ao antioxidante sintético BHT em amostras de cavala (*Scomber scombrus*), durante 6 meses de armazenamento, sob congelamento a -18° C. O extrato de casca de romã mostrou-se um excelente antioxidante em comparação ao BHT também utilizado nas amostras.

As altas temperaturas usadas no preparo de peixes podem induzir a oxidação térmica do colesterol. Em estudos de Ferreira et al. (2017), observaram a degradação do colesterol e o efeito protetor de antioxidantes naturais como Salsa (*Petroselinum crispum*) e cebolinha (*Allium schoenoprasum* L.) em files de sardinha preparados em "Air Fryer". Os autores observaram aumento dos níveis de POCs das amostras controle, ou seja, cru para os preparados em "Air Fryer" de 46,24%. O mesmo estudo também relatou a eficácia das ervas naturais na redução dos níveis de POCs na maioria das amostras, onde a adição de 4% de cheiro verde nas sardinhas termicamente preparadas obteve o melhor efeito protetor contra a oxidação lipídica.

A adição de frutos de aroeira (*S. terebinthifolius* Raddi) em sistema modelo contendo óleo de sardinha promoveu efeito inibitório da oxidação do colesterol e dos PUFA's durante o aquecimento a 150 °C e 180 °C por 7 min (DE OLIVEIRA et al., 2020).

Com a exigência constante de autoridades e dos consumidores em garantir uma alimentação cada vez mais saudável, os aditivos artificiais têm sido substituídos por fontes naturais que mantenham e garantam a qualidade dos produtos elaborados, bem como evitar os diversos riscos que o alimento pode trazer aos seus consumidores.

6 Pimentas

As pimentas são especiarias de grande aceitação, devido as suas inúmeras propriedades sensoriais, que se alteram de acordo com cada espécie. Tais características podem ocorrer devido à variedade na coloração, capacidade antioxidante e principalmente a sua picância, fato que torna a pimenta como um produto peculiar. Deste modo, as pimentas que já estão na mesa dos brasileiros há muitos anos, têm ganhado adeptos pelo mundo inteiro e se tornado alvo de pesquisas para um aproveitamento total da produção (CARVALHO et al, 2014).

As pimenteiras pertencem ao mesmo gênero do pimentão (*Capsicum*), sendo estas originárias das regiões tropicais americanas, mais especificamente os primeiros registros datam aproximadamente 900 a.C., sendo confirmado em explorações arqueológicas em Tehuacán, México, onde eram utilizadas pelos nativos indígenas como medicamento, prática comum entre os Maias. Outros indícios foram encontrados no Peru e na Bolívia, que utilizavam algumas variedades como alimento desde o século XVI (ALPIOVEZZA et al., 2015; DA SILVA, 2017).

No Brasil, o cultivo de pimentas já era tradição popular entre os nativos antes mesmo do descobrimento pelos portugueses, tal prática era realizada pelas tribos indígenas e de certa forma, era considerado uma cultura de suma importância. Os europeus, se depararam com uma iguaria bastante utilizada pelos nativos, empregadas como medicamentos e para formulações alimentícias, e assim, a partir deste episódio as pimentas foram disseminadas pelo mundo inteiro, onde na Espanha e Portugal ganharam nomes e características próprias (REIFSCHNEIDER et al., 2014).

Para Austin (2004) e Filgueira (2003), o interesse dos povos do mundo inteiro nas pimentas se deu pela sua elevada pungência, característica derivada da presença da capsaicina, que é acumulada no tecido da superfície da placenta, tão somente liberada ao se cortar o fruto. As pimentas vermelhas (*Capsicum* spp.) são vegetais ricos em capsaicinoides, substâncias responsáveis pela pungência dos frutos, tendo a capsaicina como sua maior representante. Atualmente a capsaicina é empregada no desenvolvimento de novos fármacos por possuir várias propriedades benéficas tais como capacidade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral, além de contribuir com o controle de diabetes e alívio de dores (CERVANTES-HERN et al., 2019).

As pimentas possuem um amplo mercado consumidor, seja na forma de plantas ornamentais, consumidas *in natura* ou servindo de matéria-prima para molhos, compotas e aditivos alimentares como corantes, aromatizantes e óleorresina, substâncias utilizadas em produtos alimentícios com a finalidade de conferir estabilidade oxidativa aos lipídios (PINTO

et al., 2013; EMBRAPA, 2015; NEITZKE et al., 2015). As pimentas, principalmente as mais pungentes são empregadas na composição de medicamentos por indústrias farmacológicas e como matéria da indústria bélica, na produção de “pepper spray” e “pepper foam” fabricados a partir das óleorresina (REIFSCHNEIDER, 2000).

No Brasil o cultivo de pimentas (*Capsicum* sp.) ocorre praticamente em todas as regiões e é um dos melhores exemplos de agricultura familiar e de integração entre o pequeno agricultor e a agroindústria. Devido à produção e comercialização ser realizada principalmente por pequenos produtores é difícil obter dados precisos em relação ao cultivo e consumo de pimentas do gênero *Capsicum*, mas estima-se que o cultivo anualmente seja de aproximadamente cinco mil hectares com produção em torno a 75 mil toneladas (RIBEIRO et al., 2016).

Segundo estimativa da EMATER-DF, o Brasil tem um consumo per capita de *Capsicum* em torno de 2 g por dia, considerando tanto o fruto *in natura* quando em alimentos como temperos. A crescente demanda do mercado tem impulsionado o aumento das áreas cultivadas. Além do mercado interno, parte da produção brasileira de pimentas é exportada em diferentes formas, como páprica, pasta e conservas ornamentais. Entre o gênero *Capsicum*, destacam-se as espécies *Capsicum annuum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum pubescens*, *Capsicum baccatum* e *Capsicum frutescens* (EMBRAPA, 2015; REIFSCHNEIDER et al., 2014).

6.1 Pimenta biquinho

Capsicum chinense é o nome dado a esta espécie por Nikolaus Joseph von Jacquin (1727-1817), um botânico holandês que pensava erroneamente que esta espécie era originária da China, entretanto, todas as plantas do gênero *Capsicum* são originárias da América. Esta espécie inclui algumas das pimentas mais picantes do mundo, como o Habanero ou o Scotch Bonnet. No Brasil, *C. chinense* possui onze variedades que se diferem em aparência e pungência, dentre elas estão às pimentas biquinho, cumari, bode vermelha, bode amarela, cheiro verde, baiana e murupi. Destas, as variedades mais populares são a pimenta-murupi, cultivada nos estados do Amazonas e Pará e a pimenta biquinho, no nordeste e sudeste (DE AGUIAR et al., 2019).

A Pimenta Biquinho, também conhecida como pimenta-de-bico é um fruto pertencente à família *Solanaceae*, das angiospermas eudicotiledôneas, à qual pertencem também a batata, o tomate, a berinjela e o jiló (REIFSCHNEIDER et al., 2010).



Figura 8: Fruto inteiro coletado na UFRRJ de *Capsicum chinense* .

De aparência bem característica a variedade biquinho de *C. chinense*, possui frutos em tons esbranquiçados a verde quando imaturos, enquanto maduros são de cor vermelha intensa, cerosos e brilhantes (NEITZKE et al., 2016). As bagas são ocas formando capsulas obovoides com formato de gota, de acordo com a Figura 3, o tamanho varia de 2,5 a 5 cm de comprimento e até 2-3cm de diâmetro. A forma de propagação da pimenta ocorre por semeadura direta ou podendo ser transplantada após 15 dias, quando já possui caule e folhas bem formadas. Sua forma herbácea pode chegar a 60 cm mesmo quando cultivada em vasos, frutificando a partir de 90 dias após o transplântio das mudas, tende a apresentar alta produtividade e frutos sem picância ou pungência. Pode ser encontrada em cultivos de norte a sul do país, tendo maior produtividade nos estados do Sudeste e Nordeste (EMBRAPA, 2010; REIFSCHNEIDER, 2010; ABUD, 2018).

As pimenta biquinho não contém substâncias pungentes em grandes quantidades (HEINRICH et al., 2015). Porém possui outras substâncias fisiológicas ativas nos frutos, tais como compostos fenólicos, ácido ascórbico, tocoferol e carotenoides. Estas substâncias têm importante ação antioxidante contra os danos oxidativos produzidos por radicais livres (DE AGUIAR et al., 2019)

6.2 Compostos de interesse presentes em pimentas

Desde a antiguidade as plantas são utilizadas pelo homem e transformadas em alimento, bebida, abrigo, ornamentação, produção de têxteis, corantes e como fonte medicinal. Com o avanço da ciência e tecnologia têm-se aprimorado as técnicas para o isolamento dos compostos

de interesse para a indústria de alimentos, cosméticos e fármacos. Esses compostos são produzidos naturalmente pelo metabolismo da planta e utilizados para sua sobrevivência.

Os componentes químicos das pimentas podem ser divididos em dois grupos. O primeiro inclui componentes de valor condimentar que conferem específico sabor, cor e aroma que compreendem a capsaicina e seus análogos estruturais os capsaicinoides, os carotenoides, os polifenóis, vários componentes voláteis e os ácidos orgânicos. O segundo inclui componentes de valor nutricional como carboidratos, lipídeos, proteínas, vitaminas, fibras e sais minerais. Esses componentes são encontrados em concentrações variáveis, de acordo com a espécie, o cultivar, as condições de cultivo e a maturação dos frutos, o manuseio pós-colheita e o armazenamento (GIUFFRIDA et al., 2013; REIFSCHNEIDER; LOPES; RIBEIRO, 2016).

As pimentas (*Capsicum* spp.) são ricas fontes de antioxidantes e compostos benéficos para a saúde humana: carotenoides, vitaminas, flavonoides, compostos fenólicos, como as antocianinas e capsaicinas, porém os níveis destes compostos podem variar devido ao genótipo e maturação da mesma (GOLUBIKNA et al., 2014).

Durante o amadurecimento as pimentas sofrem processos metabólicos que modificam os compostos presentes, um exemplo é a sua coloração, que quando verde a fruta contém predominantemente clorofila e quando madura, três vezes mais carotenoides. Os Carotenoides são substâncias químicas do tipo pigmento que possuem tons de amarelo ao vermelho e sintetizados por plantas, algas fungos e bactérias. São caracterizados por serem lipossolúveis, terem moléculas oxidáveis, estrutura química de tetraterpenoides, propriedade de absorver luz visível em diferentes comprimentos de ondas e estão divididos em duas classes: carotenos e xantofilas (ANUNCIACÃO et al., 2019; CONFORTI; STATTI; MENICHINI, 2007).

Os carotenoides são fundamentais na regulação da saúde humana, sendo essenciais para a visão devido à sua atividade de provitamina A. O β -caroteno, α -caroteno e a β -criptoxantina, são provitaminas A (tabela 3). Além disso, estudos mostram a importância dessas substâncias como antioxidantes, na prevenção de doenças mediadas por radicais livres, contra o câncer e ainda podem atuar como reguladores do sistema imunológico, agindo como sequestradores de espécies reativas de oxigênio, como o radical peroxil ($\text{ROO}\bullet$) e o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), estabilizando o elétron desemparelhado do radical por ressonância (UENOJO; MARÓSTICA; PASTORE, 2007; NELSON 2011).

Tabela 03: Atividade em percentual de alguns carotenoides provitamina A (MACÊDO, 2010).

Carotenoides	Atividade %
β –caroteno	100
α –caroteno	50-54
γ – caroteno	42-50
3,4-deshidroxi- β -caroteno	75
α - caroteno-5,6-epóxido	25
β – caroteno-5,6-epóxido	21
3- hidroxí- β – caroteno (criptoxantina)	50-60
3-oxo- β – caroteno	52
4- hidroxí- β – caroteno	48
β – 2'- apo- carotenal	Ativo
β – 8'- apo- carotenal	72
Licopeno	Inativo
Luteína	Inativo
3,3'-dihidroxi- β – caroteno (zeaxantina)	Inativo

Mais de 50 carotenoides foram identificados em frutos de *Capsicum*, dos quais, β -caroteno e capsantina, figura 9, predominaram em frutos vermelhos, nos frutos amarelos observaram maiores teores de luteína, α -caroteno e β -caroteno, os compostos anteraxantina, capsantina e zeaxantina predominaram em frutos alaranjados e *cis*-criptocapsina em frutos cor de chocolate. A combinação destes compostos e suas diferentes concentrações nos frutos de *Capsicum* levam à variabilidade de coloração do gênero (GIUFFRIDA et al., 2013).

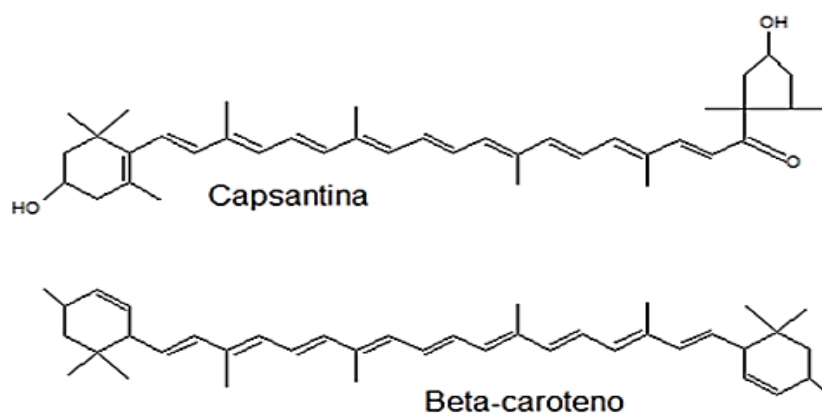


Figura 9: Fórmula estrutural dos principais carotenoides presentes em pimentas vermelhas.

Flavonoides englobam uma classe muito importante de pigmentos naturais encontrados com grande frequência na natureza, unicamente em vegetais. Esses compostos não nutritivos

apresentam atividade antioxidante, antimutagênica e anticancerígena em diferentes sistemas. Todos os flavonoides, na tabela 4, têm a estrutura –C6-C3-C6- sendo que as duas partes da molécula com seis carbonos são anéis aromáticos. São compostos bem caracterizados por medidas espectroscópicas, não só dos próprios compostos, mas também de compostos e complexos formados pela adição de determinados reagentes (RUFINO et al., 2010). Os flavonoides são encontrados na natureza na forma livre ou de glicosídeos associados açúcares e a taninos. O açúcar, quando presente está ligado de preferência nas hidroxilas das posições três a sete das agliconas (FURLAN et al., 2015).

Vários efeitos biológicos têm sido atribuídos aos flavonoides, visto que são capazes, por exemplo, de inibir a peroxidação de lipídeos e a agregação plaquetária, e de ativar sistemas enzimáticos incluindo ciclooxygenases e lipoxigenases (MACÊDO, 2010).

Em relação aos flavonoides, a maioria dos os estudos sobre pimentas concentraram-se apenas em flavonoides agliconas (quercetina e luteolina) obtidas após hidrólise e que a concentração desses constituintes antioxidantes aumentam à medida que as pimentas atingem maturidade (CERECEDO-CRUZ et al., 2018; FURLAN et al., 2015).

Tabela 4: Principais classes de flavonoides encontradas em alimentos.

Classe	Estrutura	Exemplos
Flavonas	C=O na posição 4	luteolina, apigenina, diosmetina
Flavonóis	OH na posição 3 e C=O na posição 4 do anel C	quercetina, kaempferol, miricetina
Flavononas	C=O no C-4, sem dupla ligação entre C-2 e C3	naringina, hesperidina
Flavonóis	OH no C-3, sem dupla ligação entre C-2 e C-3, sem C=O no C-4	catequinas
Antocianidinas	OH no C-3, com ligações duplas conjugadas, sem C=O no C-4	cianidina, pelargonidina
Isoflavonas	anel B na posição C-3	genisteína, daidzeina

OH = grupamento hidroxila; C=O = grupamento carbonila. Fonte: (ARAÚJO, 2016)

Outra variação de pigmentos vegetais, são as antocianinas, responsáveis por uma grande abundância de cores que são observadas em flores e frutos de plantas, que podem variar do vermelho vivo ao violeta/azul. Quimicamente, esses pigmentos são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonoides. São compostos solúveis em água e altamente instáveis em temperaturas elevadas, a cor de uma antocianina varia desde o vermelho (condição ácida)

até o azul ou amarelo (condição alcalina) (FARAHMANDFAR; ASNAASHARI; SAYYAD, 2017).

Segundo Grazioli (2014), a quantificação de antocianinas pode variar de acordo com a forma de processamento, seja por secagem convectiva, congelamento ou liofilização, o que acarretou perdas para os compostos bioativos em pimentas do gênero *Capsicum* de até 26,4 %. As antocianinas apresentam grande importância na dieta humana podendo ser considerada como uma importante aliada na prevenção/retardamento de doenças cardiovasculares, do câncer e doenças neurodegenerativas, devido ao seu poder antioxidante, atuando contra os radicais livres, apresentando propriedades farmacológicas sendo utilizadas para fins terapêuticos (GRAZIOLI, 2014).

As pimentas também possuem atributos em sua parte lipídica, onde utilizam principalmente para armazenar carbono. Na maioria das plantas, os triacilgliceróis são armazenados nas sementes, especificamente no citoplasma das células do cotilédono ou endosperma, em organelas conhecidas como óleosomas ou corpos lipídicos. Depois de germinarem, as sementes metabolizam os triacilgliceróis armazenados, pois não são capazes de transportar gorduras de endosperma para outros tecidos.

Tabela 5: Ácidos graxos comuns em tecidos de vegetais superiores (Taiz & Zeiger, 2013).

Ácido Graxo	Estrutura
Ácido láurico (12:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{H}$
Ácido mirístico (14:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}_2\text{H}$
Ácido palmítico (16:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}_2\text{H}$
Ácido esteárico (18:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}_2\text{H}$
Ácido oleico (18:1)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$
Ácido linoleico (18:2)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$
Ácido linolênico (18:3)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ $(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$

Sendo assim, alguns estudos correlacionam o teor de lipídios com a síntese de capsaicinoides nas pimentas, que utilizam ácidos graxos na rota metabólica para formação dessas substâncias responsáveis pela ardência do fruto e que são exclusivas das espécies do gênero *Capsicum* (Figura 10). Os capsaicinoides são amidas e 90% são produzidos pelas células da placenta dos frutos, liberados quando ocorre dano físico na região placentária (ALPIOVEZZA et al., 2015).

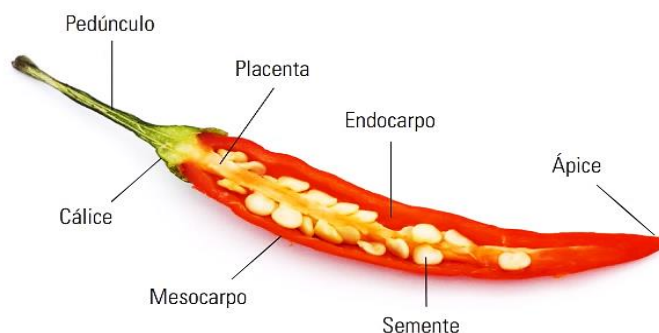


Figura 10: Corte longitudinal de um fruto de pimenta do gênero *Capsicum*.

O capsaicinoide mais estudado é a capsaicina, um dos principais componentes de várias espécies de pimentas. Sua rota Biosintética é através da via dos fenilpropanoides e ácidos graxos (ALPIOVEZZA et al., 2015).

Os efeitos fisiológicos da capsaicina têm sido relatados por diversos pesquisadores, em estudos realizados especialmente em animais, onde o seu uso, em conjunto com uma dieta rica em lipídios reduziu o percentual do tecido adiposo e a concentração de triacilgliceróis sanguíneos, a partir da elevação do metabolismo energético. A capsaicina também tem atividade antihiperlipidêmica, propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e é efetiva no tratamento da dor associada a artrite (MARCUCCI et al., 2018). Pesquisas apontam que a capsaicina reage com uma substância química do cérebro denominada “substância P”, que está diretamente ligada à transmissão da dor, neutralizando-a e conseqüentemente, agindo contra seu efeito (OVANDO-MARTÍNEZ et al., 2018).

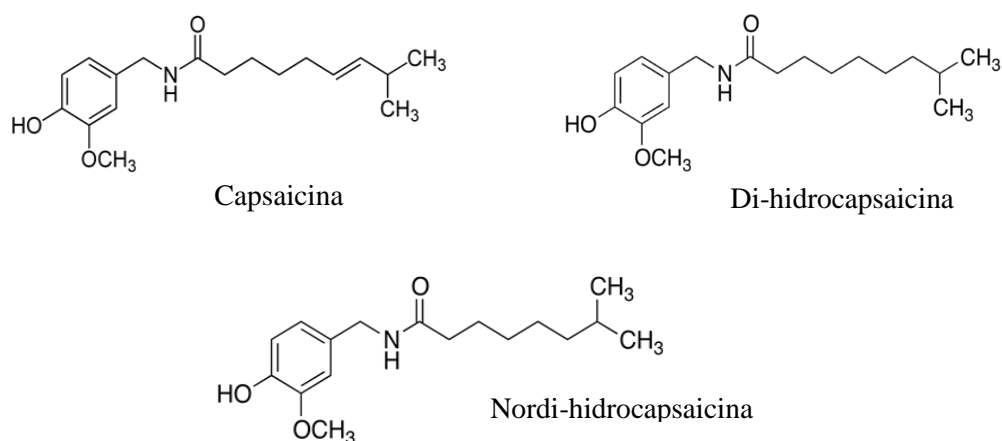


Figura 11: Estrutura química de três capsaicínoides (Capsaicina, Di-hidrocapsaicina e Nordihidrocapsaicina) encontrados em frutos de *Capsicum* ssp (ANTONIOUS & JARRET, 2006).

A capsaicina e a Di-hidrocapsaicina são responsáveis por cerca de 80 a 95% dos capsaicínoides de ocorrência natural nas pimentas. A Scotch Bonnet e a Habanero são consideradas exemplos de formas extremamente pungentes de *Capsicum chinense*, enquanto as pimentas do tipo Bell, como a biquinho são consideradas formas não pungentes. No entanto, as concentrações de capsaicínoides individuais e a proporção de capsaicina/Di-hidrocapsaicina flutuam entre as espécies (PINTO; PINTO; DONZELES, 2013; REIFSCHNEIDER; LOPES; RIBEIRO, 2016).

Outros metabólitos secundários vegetais destacam-se devido a seus efeitos biológicos sobre a saúde humana, como os fitosteróis. Já foram identificados mais de 40 fitosteróis, sendo os mais abundantes em alimentos, o β -sitosterol ($C_{29}H_{50}O$), o campesterol e o estigmasterol ($C_{29}H_{48}O$) (PEREIRA; CARDOSO, 2012) (figura 11).

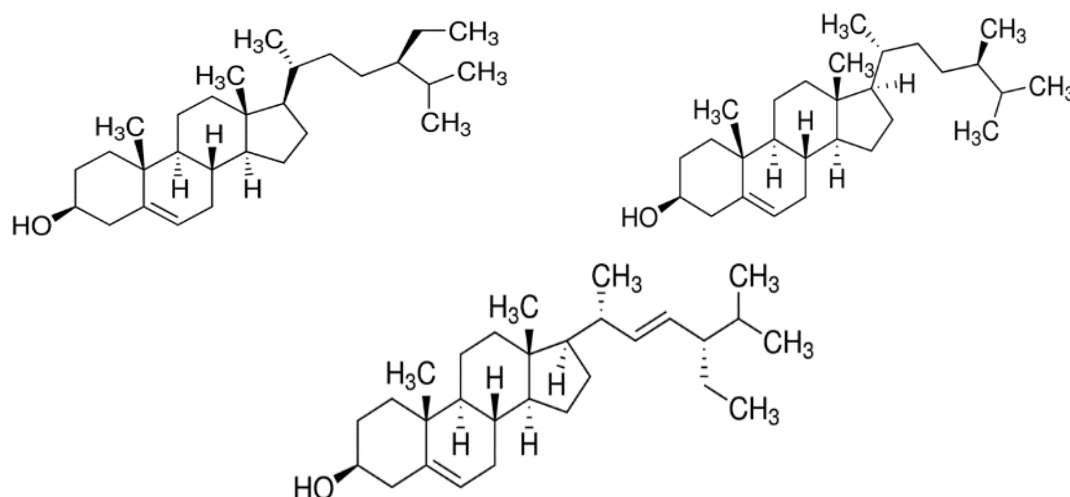


Figura 12: Estrutura química do β -sitosterol, campesterol e estigmasterol, respectivamente.

A pesquisa de consumo diário realizada por Martins et al. (2014) evidenciou a redução dos níveis sanguíneos de colesterol total e LDL-colesterol em cerca de 10%. Dentre seus benefícios à saúde humana destaca-se a redução da absorção do colesterol da dieta, com conseqüente redução dos níveis sanguíneos; a redução do risco de doenças cardiovasculares; e inibição do crescimento de certos tipos de tumores malignos. O mecanismo de ação na diminuição da colesterolemia se deve, possivelmente, à sua semelhança estrutural com o colesterol, o que favorece uma competição na absorção intestinal, entre ésteres de esterol e o colesterol (PEREIRA & CARDOSO, 2012).

Os metabólitos secundários, geralmente de estrutura complexa, baixo peso molecular, possuem atividades biológicas marcantes e diferentemente dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações em determinados grupos de plantas (BERG & LUBERT, 2008). Já foram considerados como produtos de excreção do vegetal no passado. No entanto, sabe-se que muitas dessas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação do produtor a seu meio. Assim, despertam grande interesse, não só pelas atividades biológicas exercidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas também pela imensa atividade farmacológica que possuem (RUFINO et al., 2010).

Além dos efeitos benéficos à saúde, os antioxidantes presentes na pimenta podem também auxiliar na conservação de alimentos. Há grande interesse em encontrar, nas plantas condimentares, princípios ativos que possuam ação antioxidante que possam contribuir para a conservação de alimentos, sendo estes produzidos sem danos ao meio ambiente e à saúde humana (NEITZKE et al., 2015).

Apesar de ser uma área altamente estudada nos dias de hoje, ainda se faz necessário maiores investigações e ensaios biológicos mais abrangentes, para que outras conclusões possam ser tiradas a respeito da atuação dos compostos bioativos de ervas e especiarias sobre o metabolismo lipídico e para assegurar o efeito das mesmas como alimentos funcionais.

Assim, diante do anteriormente exposto, faz-se necessário estudos a respeito de antioxidantes naturais, em substituição aos sintéticos a serem empregados em pescado processado, inibindo a formação de produtos de oxidação lipídica nestas amostras, aumentando sua vida de prateleira e conseqüentemente melhorando seu valor nutricional.

7 Referências

AGÊNCIA BRASIL. Cai imposto de importação da sardinha para garantir abastecimento nacional. **Gazeta do povo**. Setembro, 2018. Disponível em: <<https://www.gazetadopovo.com.br/economia/cai-imposto-de-importacao-da-sardinha-para-garantir-abastecimento-nacional/>>. Acesso em 05, setembro de 2020.

ALPIOVEZZA, Ana Regina; JÚNIOR, Sérgio Luis Alves de Moraes; GONÇALVES, Ivair Donizete; NETTO, Amandio Augusto Lagareiro; MARCUCCI, Maria Cristina. Pimentas do gênero *Capsicum*: ações farmacológicas e propriedades terapêuticas. **Revista de Fitoterapia**, v. 15, n. 2, p. 121–130, 2015.

ANTONIOUS, George F.; JARRET, Robert L. Screening *Capsicum* Accessions for Capsaicinoids Content. **Journal of Environmental Science and Health**, n.2, 2006.

ANUNCIAÇÃO, Pamella Cristine; GIUFFRIDA, Daniele; MURADOR, Daniella Carisa; DE PAULA FILHO, Galdino Xavier; DUGO, Giacomo; PINHEIRO-SANT'ANA, Helena Maria. Identification and quantification of the native carotenoid composition in fruits from the Brazilian Amazon by HPLC–DAD–APCI/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 83, n. August, 2019.

ARAÚJO, Maria Elisa Melo Branco de. **Biossíntese de novos derivados acilados de flavonoides e avaliação in vitro de sua bioatividade**. 2016. Universidade São Francisco, Bragança Paulista- SP, 2016.

BAHAMMOU, Younes; LAMSYEHE, Hamza; KOUHILA, Mounir; LAMHARRAR, Abdelkader. Valorization of co-products of sardine waste by physical treatment under natural and forced convection solar drying. **Renewable Energy**, v. 142, p. 110–122, 2019.

BOSLAND, Paul W.; VOTAVA, Eric J. Peppers: Vegetable and spice capsicums. **Peppers: Vegetable and Spice Capsicums**, v. 2, p. 1–230, 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário oficial da união - RESOLUÇÃO - RDC No 329, DE 19 DE DEZEMBRO DE 2019/2019.

BRASIL. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) - Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989 sob DECRETO Nº 10.468, de 18 de agosto de 2020. **Diário Oficial da União**, Brasil, Brasil, 2020.

CERECEDO-CRUZ, L.; AZUARA-NIETO, E.; HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, A. J.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, C. R.; MELGAR-LALANNE, G. Evaluation of the oxidative stability of chipotle chili (*Capsicum annum* L.) oleoresins in avocado oil. **Grasas y Aceites**, v. 69, n. 1, p. 1–12, 2018.

CERVANTES-HERN, Felipe; ALCAL, Paul; MART, Octavio; ORDAZ-ORTIZ, José Juan. Placenta , Pericarp , and Seeds of Tabasco Chili Pepper Fruits Show a Contrasting Diversity of. **Bioactive Metabolites**, v. 9, n. 10, p. 16, 2019.

CONFORTI, Filomena; STATTI, Giancarlo A.; MENICHINI, Francesco. Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annuum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1096–1104, 2007.

CROPOTOVA, Janna; MOZURAITYTE, Revilija; STANDAL, Inger Beate; OJHA, Shikha; RUSTAD, Turid; TIWARI, Brijesh. Influence of high-pressure processing on quality attributes of haddock and mackerel minces during frozen storage, and fishcakes prepared thereof. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 59, n. October 2019, p. 102236, 2020.

DA SILVA, Everton Vieira. **Potencialidades da Pimenta Biquinho (*Capsicum chinense*) como aditivo natural**. 2017. Universidade Federal da Paraíba, Paraíba- PB, 273 p. 2017.

DANTAS, Natalie Marinho; SAMPAIO, Geni Rodrigues; FERREIRA, Fernanda Silva; LABRE, Silva; APARECIDA, Elizabeth; TORRES, Silva; SALDANHA, Tatiana. Cholesterol Oxidation in Fish and Fish Products. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 12, p. 2627–2639, 2015.

DE AGUIAR, Ana Carolina, et al. Sequential high-pressure extraction to obtain capsinoids and phenolic compounds from biquinho pepper (*Capsicum chinense*). **Journal of Supercritical Fluids**, v. 150, p. 112–121, 2019.

DE OLIVEIRA, Vanessa Sales, et al. Aroeira fruit (*Schinus terebinthifolius Raddi*) as a natural antioxidant: Chemical constituents, bioactive compounds and in vitro and in vivo antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 315, n. April 2019, p. 126274, 2020.

DE OLIVEIRA, Vanessa Sales, et al. Use of Natural Antioxidants in the Inhibition of Cholesterol Oxidation: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, p. 1465–1483, 2018.

DIEL, Maria Inês; LÚCIO, Alessandro Dal Col; SCHMIDT, Denise; VALERA, Oscar Valeriano Sánchez; FONTANA, Daniele Cristina; TARTAGLIA, Francieli de Lima; TISCHLER, André Luís; LAMBRECHT, Darlei Michalski; ZEMOLIN, João Alberto. Relations between fruit chemical components of biquinho pepper cultivars in different crop seasons. *Food Research International*, v. 137, n.07, 2020.

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

ESKIN, Michael N. A. **Biochemistry of Foods**. Second Edition. New York-USA: Elsevier, 2012

ESNOZ-NICUESA, Arturo; SOTO-JOVER, Sonia. Texture, Oil Adsorption and Safety of the European Style Croquettes Manufactured at Industrial Scale. **Food Engineering Reviews**, n. 8, p. 181–200, 2016.

FARABEGOLI, Federica; NESCI, Salvatore; VENTRELLA, Vittoria; BADIANI, Anna; ALBONETTI, Sabrina; PIRINI, Maurizio. Season and Cooking May

Alter Fatty Acids Profile of Polar Lipids from Blue-Back Fish. **Lipids**, v. 54, n. 11–12, p. 741–753, 2019.

FARAHMANDFAR, Reza; ASNAASHARI, Maryam; SAYYAD, Ruhollah. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Capsicum frutescens* Extracted by Supercritical CO₂, Ultrasound and Traditional Solvent Extraction Methods. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 20, n. 1, p. 196–204, 2017.

FENG, Xiao; YAN, Joleen; TJIA, Yi; ZHOU, Yige; LIU, Qin; FU, Caili; YANG, Hongshun. LWT - Food Science and Technology Effects of tocopherol nanoemulsion addition on fish sausage properties and fatty acid oxidation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 118, n. October 2019, p. 108737, 2020.

FERNANDES, Carolina Estevam; VASCONCELOS, Margarida Angélica Da Silva; DE ALMEIDA RIBEIRO, Marisilda; SARUBBO, Leonie Asfora; ANDRADE, Samara Alvachian Cardoso; FILHO, Artur Bibiano De Melo. Nutritional and lipid profiles in marine fish species from Brazil. **Food Chemistry**, v. 160, p. 67–71, 2014.

FERREIRA, Fernanda S.; SAMPAIO, Geni R.; KELLER, Laura M.; SAWAYA, Alexandra C. H. F.; CHÁVEZ, Davy W. H.; TORRES, Elizabeth A. F. S.; SALDANHA, Tatiana. Impact of Air Frying on Cholesterol and Fatty Acids Oxidation in Sardines: Protective Effects of Aromatic Herbs. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 12, p. 2823–2831, 2017.

FERYSIUK, Karolina; WÓJCIAK, Karolina M.; MATERSKA, Małgorzata; CHILCZUK, Barbara; PABICH, Marzena. Modification of lipid oxidation and antioxidant capacity in canned refrigerated pork with a nitrite content reduced by half and addition of sweet pepper extract. **LWT-Food Science and Technology**, v. 118, n. June 2019, 2020.

FIGUEIRÊDO, Bruno C.; BRAGAGNOLO, Neura; SKIBSTED, Leif H.; ORLIEN, Vibeke. Inhibition of Cholesterol and Polyunsaturated Fatty Acids Oxidation through the Use of Annatto and Bixin in High-Pressure Processed Fish. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 8, p. C1646–C1653, 2015.

FUCHS, Renata H. B.; RIBEIRO, Ricardo P.; BONA, Evandro; KITZBERGER, Cíntia S. G.; DE SOUZA, Carolina; MATSUSHITA, Makoto. Sensory characterization of Nile tilapia croquettes enriched with flaxseed flour using free-choice profiling and common components and specific weights analysis. **Journal of Sensory Studies**, v. 33, n. 3, p. 1–6, 2018.

FURLAN, Claudia M. et al. Flavonoids and antioxidant potential of nine Argentinian species of Croton (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, [S. l.], v. 38, n. 4, p. 693–702, 2015.

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

GADEKAR, Y. P.; SHARMA, B. D.; SHINDE, A. K.; MENDIRATTA, S. K. Restructured Meat Products - Production, Processing And Marketing: A Review. **The Indian Journal of Small Ruminants**, v. 21, n. 1, p. 1-12, 2015.

GIUFFRIDA, Daniele; DUGO, Paola; TORRE, Germana; BIGNARDI, Chiara; CAVAZZA, Antonella; CORRADINI, Claudio; DUGO, Giacomo. Characterization of 12 Capsicum varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 140, n. 4, p. 794–802, 2013.

GÖKOĞLU, Nalan; YERLIKAYA, Pinar. Chemical composition of fish. **Seafood Chilling, Refrigeration and Freezing**, [S. l.], p. 5–37, 2015.

GOKOGLU, Nalan; YERLIKAYA, Pinar; TOPUZ, Osman Kadir; BUYUKBENLI, Hanife Aydan. Effects of Plant Extracts on Lipid Oxidation in Fish Croquette during Frozen Storage. **Food Science and Biotechnol**, [S. l.], v. 21, n. 6, p. 1641–1645, 2012.

GOTTARDI, Davide; BUKVICKI, Danka; PRASAD, Sahdeo; TYAGI, Amit K. Beneficial effects of spices in food preservation and safety. *Frontiers in Microbiology*, [S. l.], v. 7, n. SEP, p. 1–20, 2016.

GRAZIOLI, A. S. Análise de antocianinas e carotenoides da pimenta vermelha dedo-de-moça (*capsicum baccatum* var . *pendulum*) sob diferentes condições de armazenamento e processamento. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014** [Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2]., São Paulo: Blucher, n. 2007, p. 4177–4184, 2014.

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

GUYTON, Arthur C. M. D. **Fisiologia Humana**. 11a ed. Mississipi-EUa: Editora Guanabara, 2003.

HEINRICH, A. G.; FERRAZ, R. M.; RAGASSI, C. F.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Characterization and evaluation of salmon-colored biquinhotype pepper progenies | Caracterização e avaliação de progênies autofecundadas de pimenta biquinho salmão. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 465–470, 2015.

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

KHELLADI, Hadj Mostefa; KROUF, Djamil; TALEB-DIDA, Nawal. Sardine proteins (**Sardina pilchardus**) combined with green lemon zest (*Citrus latifolia*) improve blood pressure, lipid profile and redox status in diabetic hypertensive rats. **Nutrition and Food Science**, v. 48, n. 4, p. 654–668, 2018.

LEAL-CASTAÑEDA, Everth J.; HERNÁNDEZ-BECERRA, Josafat A.; RODRÍGUEZ-ESTRADA, Maria Teresa; GARCÍA, Hugo S. Formation of cholesterol

oxides in lipid medium during microwave heating. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 119, n. 4, p. 1–13, 2017.

LEBOVICS, Vera; LUGASI, Andrea; HÓVARI, Judit; AUBOURG, Santiago P. Partial inhibition of cholesterol oxides formation in frozen fish pre-treated with a plant extract. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 342–348, 2009.

LINKE, Annika; WEISS, Jochen; KOHLUS, Reinhard. Oxidation rate of the non-encapsulated- and encapsulated oil and their contribution to the overall oxidation of microencapsulated fish oil particles. **Food Research International**, v. 127, n. October 2019, p. 108705, 2020.

LIRA, Giselda Macena; CABRAL, Caterine Cristine Vasconcelos Quintiliano; DE OLIVEIRA, Ítalo Bruno Araújo; FIGUEIRÊDO, Bruno Chacon; SIMON, Sarah Janaína Gurgel Bechtinger; BRAGAGNOLO, Neura. Changes in the lipid fraction of king mackerel pan fried in coconut oil and cooked in coconut milk. **Food Research International**, v. 101, n. September, p. 198–202, 2017.

LONG, Eric K.; PICKLO, Matthew J. Free Radical Biology & Medicine Trans -4-hydroxy-2-hexenal , a product of n -3 fatty acid peroxidation : Make some room HNE. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 1, p. 1–8, 2010.

LORENZO, José Manuel; PATEIRO, Mirian; DOMÍNGUEZ, Rubén; BARBA, Francisco J.; PUTNIK, Predrag; KOVAČEVIĆ, Danijela Bursać; SHPIGELMAN, Avi; GRANATO, Daniel; FRANCO, Daniel. Berries extracts as natural antioxidants in meat products: A review. **Food Research International**, v. 106, n. September 2017, p. 1095–1104, 2018.

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

MACÊDO, Manuella. **Obtenção de carotenóides e flavonóides a partir do bagaço do pedúnculo do caju por maceração enzimática**. Tese Doutorado. Universidade Federal do Ceará, 2010.

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

MALDONADO-PEREIRA, Lisaura; SCHWEISS, Matthew; BARNABA, Carlo; MEDINA-MEZA, Ilce Gabriela. The role of cholesterol oxidation products in food toxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, n. May, p. 908–939, 2018.

MARCUCCI, Maria Cristina; ALPIOVEZZA, Ana Regina; AUGUSTO, Amandio; NETTO, Lagareiro; CHRISTINE, Alexandra; FRANKLAND, Helena.

Chemical composition, biological properties and antioxidant activity of *capsicum frutescens*. v. 12, n. 4, p. 381–401, 2018.

MARIUTTI, Lilian R. B.; BRAGAGNOLO, Neura. Influence of salt on lipid oxidation in meat and seafood products: A review. **Food Research International**, v. 94, p. 90–100, 2017.

MELGOSA, Rodrigo et al. The Journal of Supercritical Fluids Supercritical CO₂ and subcritical water technologies for the production of bioactive extracts from sardine (*Sardina pilchardus*) waste. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 164, n. 104943, p. 1–10, 2020.

MORALES-AIZPURÚA, Isabel Cristina; TENUTA-FILHO, Alfredo. Óxidos de colesterol: Ocorrência em alimentos, formação e efeitos biológicos. Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/**Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 4, p. 431–442, 2002.

MORALES-MEDINA, Rocío; GARCÍA-MORENO, Pedro J.; PÉREZ-GÁLVEZ, Raúl; MUÑO, María M.; GUADIX, Antonio; GUADIX, Emilia M. Nutritional indexes, fatty acids profile, and regiodistribution of oil extracted from four discarded species of the Alboran Sea: Seasonal effects. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, n. 9, p. 1409–1415, 2016.

MOUSA, Rasha M. A.; AL-KHATEEB, Lateefa A. Influence of Binary and Ternary Mixtures of Spices on the Inhibition of Lipid Oxidation and Carcinogenic Heterocyclic Amines in Fried Hamburger Patties. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 3, p. 1–12, 2017.

NEITZKE, Raquel S.; FISCHER, SÍntia Z.; VASCONCELOS, Carla S.; BARBIERI, Rosa L.; TREPTOW, Rosa O. Pimentas ornamentais: Aceitação e preferências do público consumidor. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n. 1, p. 102–109, 2016.

NEITZKE, Raquel S.; VASCONCELOS, Carla S.; BARBIERI, Rosa L.; VIZZOTTO, Márcia; FETTER, Mariana R.; CORBELINI, Diandra D. Genetic variability for antioxidant compounds in landraces of pepper (*Capsicum baccatum*). **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 415–421, 2015.

NEIVA, Cristiane; GONÇALVES, Alex Augusto. **Carne mecanicamente separada de pescado (CMS) e Surimi**. In: ATHENEU (org.). Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação. 1. ed. São Paulo. p. 197–208. 2012.

OVANDO-MARTÍNEZ, Maribel, et al. Simulated Gastrointestinal Digestion, Bioaccessibility and Antioxidant Capacity of Polyphenols from Red Chiltepin (*Capsicum annum L. Var. glabriusculum*) Grown in Northwest Mexico. **Plant Foods for Human Nutrition**, n. 73, p. 116–121, 2018.

ÖZ, Mustafa; DIKEL, Suat; DURMUŞ, Mustafa; ÖZOĞUL, Yeşim. Effects of Black Cumin Oil (*Nigella sativa*) on Sensory, Chemical and Microbiological Properties of Rainbow Trout During 23 Days of Storage at 2 ± Effects of Black Cumin Oil (*Nigella*

sativa) on Sensory, Chemical. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 26, n. 6, p. 665–674, 2017.

ORDÓÑEZ, J.A. **Tecnologia de Alimentos: Componentes dos Alimentos e Processos**. Porto Alegre: Artmed; 2005.

ÖZALP ÖZEN, Berna; SOYER, Ayla. Effect of plant extracts on lipid and protein oxidation of mackerel (*Scomber scombrus*) mince during frozen storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 120–127, 2018. DOI: 10.1007/s13197-017-2847-6.

PEREIRA, Renata Junqueira; CARDOSO, Maria das Graças. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. November, p. 146–152, 2012.

PIEIDADE, Karen Rother, et al. Uso de ervas aromáticas na estabilidade oxidativa de filés de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) processados. [S. l.], 2007.

PINTO, Cleide Maria Ferreira; PINTO, Cláudia Lúcia de Oliveira; DONZELES, Sérgio Mauricio Lopes. Pepper Capsicum: Chemical, Nutrition, Pharmacology and Medical Properties and Its Potential for Agribusiness. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 3, n. 2, p. 108–120, 2013.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; LOPES, C. A.; RIBEIRO, C. S. C. Continuity, focus and impact: A commented historical perspective on embrapa vegetables' extended capsicum breeding program | Continuidade, foco e impacto: Uma perspectiva histórica comentada do programa estendido de melhoramento de Capsicum na Embrapa Hor. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 155–160, 2016.

REIFSCHNEIDER, Francisco J. B. et al. **Na Mesa Dos Brasileiros**. 1. ed. [s.l.]: CDD 641.3, 2014.

RISPOOA. DECRETO No 9.013, DE 29 DE MARÇO DE 2017. Regulamenta a Lei no 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei no 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Diário Oficial da União - **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Sistema Nacional de Vigilância Sanitária - SNVS**, Brasil, 2017.

RUFINO, Maria do Socorro M.; ALVES, Ricardo E.; DE BRITO, Edy S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara; SAURA-CALIXTO, Fulgencio; MANCINI-FILHO, Jorge. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.

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

SALDANHA, Tatiana; BRAGAGNOLO, Neura. Cholesterol oxidation is increased and PUFA decreased by frozen storage and grilling of atlantic hake fillets (*Merluccius hubbsi*). **Lipids**, v. 42, n. 7, p. 671–678, 2007.

SALDANHA, Tatiana; BRAGAGNOLO, Neura. Relation between types of packaging, frozen storage and grilling on cholesterol and fatty acids oxidation in Atlantic hake fillets (*Merluccius hubbsi*). **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 619–627, 2008.

SANCHO, Renata Aparecida Soriano; DE LIMA, Fabíola Aliaga; COSTA, Gabriel Guerra; MARIUTTI, Lilian Regina Barros; BRAGAGNOLO, Neura. Effect of annatto seed and coriander leaves as natural antioxidants in fish meatballs during frozen storage. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, 2011.

SARTORI, Alan Giovanini de Oliveira; AMANCIO, Rodrigo Dantas. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 19, n. 2, p. 83–93, 2012.

SECCI, Giulia; PARISI, Giuliana. From farm to fork: Lipid oxidation in fish products. A review. **Italian Journal of Animal Science**, v. 15, n. 1, p. 124–136, 2016.

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

ŠIMAT, Vida; VLAHOVIĆ, Jelena; SOLDI, Barbara; GENERALIĆ MEKINIĆ, Ivana; ČAGALJ, Martina; HAMED, Imen; SKROZA, Danijela. Production and characterization of crude oils from seafood processing by-products. **Food Bioscience**, v. 33, n. November 2019, 2020.

SMITH LM, Dunkley WL, Franke A, Daiiking T. Measurement of trans and other isomeric insaturated fatty acid in butter and margarine. **J Am Oil Chem.Soc** 1978, 55: 257-61.

SMITH, Leland L. Cholesterol Autoxidation. **Chemistry and Physics of lipids**, [S. l.], v. 44, p. 87–125, 1987.

SOLDI, Barbara; SIMAT, Vida; SKROZA, Danijela; LJUBENKOV, Ivica; GENERALIĆ MEKINIĆ, Ivana. High Quality Oil Extracted from Sardine By-Products as an Alternative to Whole Sardines: Production and Refining. **European Food Research and Technology**, v. 121, n. 1800513, p. 1–10, 2019.

SVEINSDÓTTIR, Hildur Inga et al. Effect of antioxidants on the sensory quality and physicochemical stability of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) fillets during frozen storage. **Food Chemistry**, v. 321, n. October 2019, p. 126744, 2020.

TARVAINEN, Marko; QUIRIN, Karl Werner; KALLIO, Heikki; YANG, Baoru. CO₂ Plant Extracts Reduce Cholesterol Oxidation in Fish Patties during Cooking and Storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 51, p. 9653–9662, 2016.

UÇAR, Yılmaz. Antioxidant Effect of Nanoemulsions Based on Citrus Peel Essential Oils: Prevention of Lipid Oxidation in Trout. v. 1900405, p. 1–14, 2020.

UENOJO, Mariana; MARÓSTICA, Mário Roberto; PASTORE, Gláucia Maria. Carotenóides: Propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Quimica Nova*, v. 30, n. 3, p. 616–622, 2007.

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

VAZ-PIRES, Paulo. **Tecnologia do pescado**. 1. ed. Porto-PT.

VILLASANTE, Juliana; GIRBAL, Marina; METÓN, Isidoro; ALMAJANO, María Pilar. Effects of Pecan Nut (*Carya illinoensis*) and Roselle Flower (*Hibiscus sabdariffa*) as Antioxidant and Antimicrobial Agents for Sardines (*Sardina pilchardus*). *Molecules*, v. 24, n. 85, p. 13, 2019.

ZAMUZ, Sol; LÓPEZ-PEDROUSO, María; BARBA, Francisco J.; LORENZO, José M.; DOMÍNGUEZ, Herminia; FRANCO, Daniel. Application of hull, bur and leaf chestnut extracts on the shelf-life of beef patties stored under MAP: Evaluation of their impact on physicochemical properties, lipid oxidation, antioxidant, and antimicrobial potential. *Food Research International*, v. 112, n. June, p. 263–273, 2018.

ZHAO, Yueliang; KONG, Hongyun; ZHANG, Xu; HU, Xiaoqian; WANG, Mingfu. The effect of Perilla (*Perilla frutescens*) leaf extracts on the quality of surimi fish balls. *LWT- Food Science and Technology*. N.01, p. 2083–2090, 2019.

CAPÍTULO I

ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA “Food & Function”

***IN VIVO* AND *IN VITRO* ANTIOXIDANT CAPACITY, BIOACTIVE
COMPOUNDS AND POTENTIAL APPLICATION OF *BIQUINHO* PEPPER
(*Capsicum chinense*) AGAINST CHOLESTEROL OXIDATION IN FISH BALLS
DURING FROZEN STORAGE**

ABSTRACT

Biquinho pepper (*Capsicum chinense*) contains bioactive compounds, which are responsible for its nutritional and antioxidant potential. This study reports the presence of antioxidant constituents, such as carotenoids, capsaicinoids, and capsinoids, by UHPLC-ESI-MS. Biquinho pepper showed an antioxidant potential in DPPH (33.17 ± 0.08 %), ORAC (32.35 ± 0.02 $\mu\text{M TE/g}$), and β -carotene/linoleic acid (55.80 ± 1.30 %) assays. *In vivo* antioxidant analyses demonstrated that the pepper extract (170 $\mu\text{g/mL}$) decreased the damage promoted by H_2O_2 in *Saccharomyces cerevisiae* cells. Additionally, fish balls were prepared using biquinho pepper (0.5%, 0.75%, 1%) to investigate its anticholesterol oxidation effects during frozen storage. After 60 days, samples with no addition presented a COPs level of 86.35 ± 1.11 $\mu\text{g/g}$, while 29.04 ± 0.98 $\mu\text{g/g}$ was found in samples added with pepper (1%). Indeed, the overall results indicate the potential application of biquinho pepper as a natural agent against cholesterol oxidation in frozen fish products.

Keywords: antioxidant capacity, bioactive compounds, *Capsicum chinense*, cholesterol oxidation, frozen storage.

1 INTRODUCTION

Capsicum chinense (Solanaceae family), also known as "biquinho pepper", is the most produced and consumed domesticated pepper in Brazil. Its fruits are appreciated due to their color, flavor, and aroma, being used as a food ingredient both industrially and in the traditional cuisine (da Silva Ribeiro et al., 2019; de Aguiar et al., 2019).

Besides its commercial and economic value, biquinho pepper has a significant health-promoting potential. This pepper is recognized due to its antioxidant potential that is related to the presence of bioactive compounds such as phenolic compounds like flavonoids and capsaicinoids, carotenoids, and others (de Aguiar et al., 2019; Mohd Hassan et al., 2019; Ramírez-Gómez et al., 2016).

Nowadays, there is a great demand for food products with additional nutritional value and minor contents of synthetic additives, indicating the use of natural resources widely found in the plant kingdom (de Oliveira et al., 2018). In addition, the consumption of fish products is growing worldwide as consumers realize the potential of this food in a healthy diet, which is mainly attributed to the presence of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (Li et al., 2020).

Regarding a new lifestyle and lack of time for food preparation, numerous consumers seek practicality and more convenient products in their meals. In this perspective, restructured seafood products represent an alternative not only to improve the availability of products in market, but also to attend this demand for fast food (Moreno et al., 2016). However, different steps applied in processed food may compromise their safety and quality, and may even cause the formation of harmful oxidized compounds.

Cholesterol, a sterol widely found in fish products, is an unsaturated compound highly prone to oxidation, from which cholesterol oxidation products (COPs) are formed. Cholesterol oxidation in food occurs via an autoxidation mechanism similar to that observed in unsaturated fatty acids, where the formation of free radicals initiates the oxidative process (Hur, Park, & Joo, 2007; Medina-Meza & Barnaba, 2013).

The presence of COPs has been widely reported in fish and fish products, even during frozen storage. Although frozen storage is one of the most widespread methods of fish preservation, lipid oxidation still occurs under low temperatures (Figueirêdo et al., 2015; Guizzellini et al., 2020; Tarvainen et al., 2016).

Recent studies have shown the potential of exogenous COPs to affect human physiological activities. COPs have been found to contribute to the development of several human pathologies since they possess atherogenic, carcinogenic, cytotoxic, mutagenic, and neurodegenerative properties (Anderson et al., 2020; Kloudova-Spalenko et al., 2020). Indeed, COPs represent a concern for the public health area, and their formation must be avoided.

Natural sources of antioxidants in fish and fish products have been the subject of investigations (de Oliveira et al., 2018; de Oliveira et al., 2020a; Guizzellini et al., 2020; Sancho et al., 2011), and the antioxidant capacity of dietary natural products is commonly assessed by *in vitro* analysis. However, results obtained from these assays may be questionable when considering their application in humans. Therefore, *in vivo* assays based on cell or organism models must be considered, since they mimic the cellular physiological conditions (Gao et al., 2019; Lingua et al., 2016).

In this context, this study identified bioactive compounds present in biquinho pepper by UHPLC-MS analyses and evaluated its antioxidant capacity by *in vivo* and *in vitro* assays. In addition, the effect of biquinho pepper addition against cholesterol oxidation in fish balls stored at -18 °C for 60 days was investigated.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

Tween-40, monobasic sodium phosphate, and chloroform were obtained from Synth (São Paulo, Brazil). AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) and fluorescein were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Linoleic acid, β -carotene, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), and Trolox were acquired from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). All other chemicals were purchased from Vetec (Sigma, São Paulo, Brazil). Cholesterol and cholesterol oxides were acquired from Sigma Chemical Company (St. Luis, USA), except for 25R-hydroxycholesterol (25R-OH) and 7 α -hydroxycholesterol (7 α -OH) that were from Steraloids (Wilton, NH, USA). The solvents used in chromatographic analyses were of HPLC grade as follows: formic acid (Synth, São Paulo, Brazil), *n*-hexane and 2-propanol (Vetec, Sigma, São Paulo, Brazil), methanol, acetonitrile, and ethanol (Merck, Darmstadt, Germany). The *Saccharomyces cerevisiae*

strain (BY4741 *MATa*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*) was purchased from EUROSCARF (Frankfurt, Germany) and culture media components were from Vetec (São Paulo, Brazil) and Difco (USA).

2.2 Plant material

Fresh fruits of biquinho pepper were collected at the Institute of Agronomy of the University Federal Rural of Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil, in February 2019. The botanical identification was carried out and a voucher specimen was deposited in the Herbarium of UFRRJ (RBR 39516).

The ripe fruits were manually harvested and selected considering their red color, firmness, and absence of injuries. The fruits were ground in a domestic processor (Cadence, Brazil) and dried in a ventilated oven (Solab, Brazil) at 40 °C for 12 hours to remove the excess of moisture. Subsequently, the peppers were packaged in polyethylene bags and stored at ambient temperature.

2.3 Biquinho pepper analyses

2.3.1 Identification of bioactive compounds by UHPLC-ESI-MS

The identification of the bioactive compounds was conducted using two different extractions and analytical methods: a general method and one focused on carotenoids.

For the general method, the extracts were prepared by mixing 100 mg of dried pepper with 1 mL of ethanol. The mixture was centrifuged (NI 1813, Nova Instruments, Brazil) at 34,200 rpm for 20 min at 4 °C. Then, the supernatant was filtered through a filter (0.22 μm) and 10 μL were injected. Chromatographic analyses were conducted with an UHPLC Acquity chromatographer coupled with a triple quadrupole TQD Acquity mass spectrometer (Micromass-Waters), with Electrospray Ionization (ESI) in the negative and positive ion modes. The conditions were established as reported by de Oliveira et al. (2020b), using a C18 BEH Waters Acquity (2.1 mm x 50 mm x 1.7 μm) column at 30 °C and a binary system of mobile phases, phase A (0.1% formic acid) and B (methanol).

For the carotenoid analyses, the extraction followed the procedures described by Petry and Mercadante (2018). Then, their saponification was conducted as previously performed by de Rosso and Mercadante (2007). The dried extract of carotenes was dissolved in 1 mL of ethanol and 10 μ L were injected. Chromatographic analyses were conducted in the same equipment with Eletrospray Ionization (ESI) in the positive ion mode. The capillary and the drying gas were maintained at 150 and 400 $^{\circ}$ C, respectively. The conditions were: cone + 30 V, capillary + 4.00 kV, corona +4.0 μ A, with data acquisition between m/z 200 and 800. MS/MS of selected peaks were acquired via CID and collision energy + 25 V, as adapted from Chisté and Mercadante (2012). The chromatographic conditions were: C18 BEH Waters Acquity (2.1 mm x 50 mm x 1.7 μ m) column, mobile phase A (formic acid (0.1%) and methanol (99.9%)) and B (acetonitrile (80%) and 2-propanol (20%)) at a flow rate of 0.25 mL/min with a linear gradient starting at 0% B and increasing to up 100% in 7 min, before holding until 8.5 min, and returning to the initial conditions, followed by column re-equilibration until 10 min.

2.3.2 Determination of antioxidant capacity by *in vitro* assays

2.3.2.1 Preparation of extract

Biquinho pepper (1 g) was homogenized with 10 mL of an ethanol and water solution (70:30, % v/v) in Turrax for 1 min at 140 rpm. The mixture was stirred on a shaker for 30 min and extracted in a sonic bath for 20 min (40 Hz) (Elmasonic P, Elma Schmidbauer GmbH). Then, it was centrifuged (34200 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 20 min) (NI 1813, Nova Instruments), and the supernatant was filtered through paper to a volumetric flask. The remaining residue was centrifuged again with 7.5mL of the solvent solution. The supernatants were combined and adjusted to a final volume of 50mL.

2.3.2.2 DPPH radical scavenging activity

The DPPH radical scavenging was determined according to Fukumoto and Mazza (2000). The extract (20–120 μ L) was mixed with a methanolic solution of DPPH (150 μ M, 200 μ L). The mixture was incubated in the absence of light for 30 min, and the absorbance was measured at 520 nm. The DPPH scavenging activity was determined as

follows: I% (inhibition of free radical DPPH) = (Absorbance of control - Absorbance of extract/ Absorbance of control) x 100.

2.3.2.3 Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

Diluted samples in 75 mM phosphate buffer (50 μ L) were incubated at 37 °C with fluorescein (93 mM, 150 μ L). After 15 minutes, AAPH (221 mM, 50 μ L) was added to the reaction. During 1 hour, the fluorescence decay was measured at 37 °C (λ excitation = 493 nm, λ emission = 515 nm) every minute (Ou, Hampsch-Woodill, & Prior, 2001). The results were calculated with the curve of relative fluorescence intensity and expressed as μ molar Trolox Equivalent/g (μ M TE/g).

2.3.2.4 β -carotene/linoleic acid assay

A stock solution of β -carotene/linoleic acid mixture was prepared by dissolving 20 mg of β -carotene in 1 mL of chloroform. Then, 28 μ L of this solution was mixed with 28 μ L of linoleic acid and 200 mg of Tween® 40. Chloroform was evaporated and distilled water saturated with oxygen (140 mL) was added. After shaking, the reaction mixture (5 mL) was mixed with the extract (1 mL). The absorbance was monitored every 15 minutes at 50°C and 470 nm (Miller, 1971). Results were expressed as % of oxidation inhibition (%I) as follows: $\%I = ((A_{c_i} - A_{c_f}) - (A_{s_i} - A_{s_f}) / (A_{c_i} - A_{c_f})) \times 100$, where A_{c_i} and A_{c_f} are the initial and final absorbance of the control, respectively, and A_{s_i} and A_{s_f} are the initial and final absorbance of samples.

2.3.3 Determination of antioxidant capacity *in vivo* using yeast cells

Saccharomyces cerevisiae strains were kept on solid 2% YPD at 4 °C. The cells were grown in a liquid 2% YPD medium composed of 1% of yeast extract, 2% of peptone, and 2% of glucose, using an orbital shaker at 30 °C and 160 rpm. The experimental procedures were performed according to de Oliveira et al. (2020b).

2.3.3.1 Biquinho pepper extracts toxicity

The cells (20 mg) at the first exponential phase (around 2.5 mg/mL) were incubated with the extracts at 1.7 (E1), 17.0 (E2), and 170.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (E3) (28 °C/160 rpm) for 1 hour. These concentrations were determined based on previous studies where the genus *Capsicum* was evaluated by its toxicity against fungi (Maracahipes et al., 2019) and antibacterial effect (Bacon et al, 2017). Cell survival was assessed by plating cells (40 μg) on solidified 2% YPD medium. The plates were incubated at 30 °C for 48 hours, followed by the colonies count. The results were compared with those obtained for cells exposed to stress with a hydrogen peroxide solution 1 mM (positive control), and cells without any treatment (negative control). Cells were also exposed to ethanol in the same percentage present in the extract to determine the toxicity of the solvent.

2.3.3.2 Determination of cell viability

The cells were incubated with biquinho pepper extracts under the same conditions described in item 2.3.3.1 for 2 hours. The cells were washed with distilled water (2 times), resuspended in sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.0), and incubated with a solution of hydrogen peroxide (H_2O_2 , 1 mM) (28 °C/160 rpm) for 1 hour. After plating, the plates were incubated and colonies were counted as cited above (item 2.3.3.1). The results obtained were compared with those of cells without the treatment with the natural extracts exposed only to H_2O_2 (positive control), and cells treated only with phosphate buffer (negative control).

2.4 Fish samples and preparation of fish balls

Around 10 kg of fresh sardines (*Sardina pilchardus*) (SIF/DISPOA Registration No.0003 / 5042, lot 007) were donated by Nova Piracema located in Niterói, Rio de Janeiro, Brazil, in the month of March 2019. The tail, fin, and head were removed. Then, the fish samples were ground in a domestic processor (Philco, Brazil) to obtain a homogeneous mass.

The fish ball samples were prepared according to the following treatments: no addition of antioxidant and addition of biquinho pepper at 0.5%, 0.75%, and 1% (0.5% BP, 0.75% BP, and 1% BP, respectively). These percentages were determined based on a previous study performed by de Oliveira et al. (2020a), where the authors applied

ground *aroeira* fruit in concentrations of 0.2 and 0.5% in fish oil to evaluate the fruit antioxidant effect.

Biquinho pepper was added to the minced fish meat, according to each treatment, and the mass was homogenized with a hand mixer. Then, the fish balls (40 ± 1 g) were manually prepared, totaling 85 samples. The percentage of addition of biquinho pepper was calculated according to the weight of each fish ball.

The samples were separated according to the treatment applied, packed in polyethylene bags (five samples of each treatment per bag), and stored at -18 °C. The fish balls were analyzed at the same day they were prepared (day 0, control) and after 15, 30, 45, and 60 days. They were removed from storage, thawed, ground, and homogenized in a processor (Walita Master, Brazil) to obtain a homogeneous mass, then convenient aliquots were taken for the analyses.

2.5 Determination of cholesterol and cholesterol oxides

Cholesterol and cholesterol oxides were obtained by direct saponification (Saldanha, Benassi, & Bragagnolo, 2008). Chromatographic analyses were performed using a HPLC-MS-PDA (Shimadzu LCMS-2020, Tokyo, Japan) equipped with an autoinjector and a photodiode array detector (PDA). The column was a Hypersil Cyano (250×4.6 mm) (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). The chromatographic conditions were established according to Guizellini et al. (2020), using *n*-hexane:2-propanol (97:3, v/v) as mobile phase. MS detection was performed in the positive ion mode with Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) and the chromatograms were obtained in the selective ion monitoring (SIM) mode, where the selected ions were *m/z* 367, 369, 385, 401, and 403. The cholesterol and cholesterol oxides were identified by comparing the retention times of peaks in samples with those of reference standards and by *m/z*. The quantification was done by external standardization with calibration curves using the PDA detector (Saldanha et al., 2006).

2.6 Statistical analysis

All analyses were carried out in triplicate and the results were expressed as mean \pm standard deviation. One-way variance analysis (ANOVA) and Tukey test were applied in variables that statistical differences were detected ($p < 0.05$). Statistical analyses were performed using software R language.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Identification of bioactive compounds by UHPLC-ESI-MS

The compounds identified in the extracts obtained from biquinho pepper can be seen in Table 6. The proposed identification of the compounds was based on the m/z of their precursor ion and MS/MS fragmentation patterns (product ion) in comparison to data from the literature.

In the analytical conditions applied, the biquinho pepper extract showed the presence of fifteen compounds, representing the classes of phenolic compounds and carotenoids. They were: nordihydrocapsaicin (m/z 294), nornorcapsiate (m/z 301), capsaicin (m/z 306), dihydrocapsaicin (m/z 308), nordihydrocapsiate (m/z 317), homocapsaicin-I (m/z 320), β -carotene (m/z 537), phytofluene (m/z 543), phytoene (m/z 545), lutein (m/z 551), zeaxanthin (m/z 569), antheraxanthin (m/z 585), cryptoxanthin (m/z 735), capsanthin (m/z 767), and capsorubin (m/z 811).

Nordihydrocapsaicin, capsaicin, dihydrocapsaicin, and homocapsaicin-I are grouped in a specific type of chemical compounds known as capsaicinoids. The capsaicinoids are the main constituents of peppers, being responsible for the overall pungency of the genus *Capsicum*. Numerous studies have described the presence of these capsaicinoids in peppers (Cervantes-Hernández et al., 2019; Ovando-Martínez et al., 2018; Schweiggert, Carle, & Schieber, 2006), mainly in hot peppers.

Table 6: Proposed identification of bioactive compounds of biquinho pepper extract.

ESI - Positive Mode				
RT (min)	[M+H]⁺ (m/z)	Fragment ions (m/z)	Proposed identification	Reference
3.94	545	545; 281.4	Phytoene	Gentili et al. (2019) Giuffrida et al. (2013) Giuffrida et al. (2020)
5.29	294	294.1; 170.3; 137.2	Nordihydrocapsaicin	Cervantes-Hern et al. (2019) Liu et al. (2013)
5.35	306	306.4; 182.3; 137.1	Capsaicin	Cervantes-Hern et al. (2019) Liu et al. (2013) Ovando-Martínez et al. (2018)
5.57	735	735; 717.6; 616.0; 469; 534.5	Cryptoxanthin	Giuffrida et al. (2020) Cervantes-Hern et al. (2019)
5.63	308	308.3; 184.1; 137.1	Dihydrocapsaicin	Liu et al. (2013) Ovando-Martínez et al. (2018)
6.05	301	301.3; 245.2; 140.5	Nornorcapsiate	Fayos et al. (2019)
6.36	317	317.1; 190.3; 143.5; 123.4	Nordihydrocapsiate	Fayos et al. (2019)
6.37	320	319.9; 167.1; 137.5	Homocapsaicin-I	Schweiggert et al. (2006)
6.64	537	537.2; 444.6; 223.3; 135.4	β -carotene	do Nascimento et al. (2020)
6.81	543	543.2; 484.6; 376.4; 258.8; 136.0	Phytofluene	Gentili et al. (2019) Giuffrida et al. (2020)
7.24	551	551.6; 373.3; 270.3; 239.4; 122.4	Lutein	Gentili et al. (2019) Giuffrida et al. (2020)
7.42	585	585.9; 582.8; 567.4; 415.3; 376.1	Antheraxanthin	Petry et al. (2019)
APCI - Positive Mode				
6.18	585	584.4; 539.6; 522.8	Antheraxanthin	Giuffrida et al. (2013) Giuffrida et al. (2020)
7.38	569	569.8; 569.6; 552.1; 537.4; 536.6; 533.5	Zeaxanthin	Gentili et al. (2019) Giuffrida et al. 2013 Schweiggert et al. (2006)
7.42	767	585.7; 567.5	Capsanthin	Giuffrida et al. (2013)
8.31	811	793.9; 765.8; 583.5; 568.5; 537.5	Capsorubin	Schweiggert et al. (2005)

*RT= retention time.

Peppers may also contain capsinoids, which are the non-pungent analogs of capsaicinoids. Capsaicinoids are amides of vanillylamine with branched-chain fatty acids, while capsinoids are esters of vanillyl alcohol also with branched-chain fatty acids. Therefore, their chemical structures differ by their central linkage, resulting in the lower stability and pungency of capsinoids (Fayos et al., 2019).

Capsinoids are less irritating and pungent than capsaicinoids. Capsaicinoids and capsinoids are found in both hot and sweet peppers; as a result, the characteristic burning sensation of peppers depends on the levels of these compounds. In the present study, the capsinoids nornorcapsiate and nordihydrocapsiate were found in biquinho pepper extract, as reported in a previous study where the authors determined capsinoids in different cultivars of *C. chinense*, *C. annuum*, and *C. frutescens* (Fayos et al., 2019).

Despite the distinct sensory attributes, both capsaicinoids and capsinoids have demonstrated great biological activities. They are recognized due to their anti-inflammatory, antioxidant, and antitumoral, and weight-loss properties, which suggest that their regular intake may be beneficial for health (Janyou et al., 2020; Xu et al., 2018; Yokoyama et al., 2020).

Capsaicin presented anticancer properties against human papillary thyroid carcinoma cells, inhibiting various stages of metastasis without affecting the viability of benign cells (Xu et al., 2018). The results obtained by Janyou et al. (2020) revealed that dihydrocapsaicin may induce angiogenesis and increase functional recovery after cerebral ischemia and reperfusion in a rat model. A study developed by Yokoyama et al. (2020) suggested that the continuous oral ingestion of capsinoids (a mixture of capsiate, dihydrocapsiate, and nordihydrocapsiate) could improve the physical activity by presenting an anti-inflammatory effect in the brain; as well reduced fat accumulation and chills in inactive and older humans.

β -carotene, lutein, antheraxanthin, zeaxanthin, capsanthin, capsorubin, phytoene, phytofluene, and cryptoxanthin were also found in biquinho pepper extract. These compounds are commonly found as components of several edible plant materials (do Nascimento et al., 2020; Giuffrida et al., 2020; Petry et al., 2019) including hot and sweet peppers (Gentili et al., 2019; Giuffrida et al., 2013; Schweiggert et al., 2005).

Considering the carotenoids determined in this study, β -carotene belongs to the carotene subgroup. On the contrary, most carotenoids (lutein, antheraxanthin, zeaxanthin, capsanthin, capsorubin, and cryptoxanthin) represent the xanthophylls. The red/orange

color of numerous species of peppers is attributed to the presence of carotenoids. Besides, they are also considered to be essential in the maintenance of human health (Mohd Hassan et al., 2019).

Guo, Lu, and Jin (2020) evaluated the causality of micro-nutrients concentrations and the risk of ovarian cancer using a robust statistical method, the Mendelian randomization approach, and showed that increased concentrations of β -carotene can lower the risk of low malignant potential tumors. Xanthophylls have been studied for their effects against neurologic and immune disorders, as well as cancer (Aziz et al., 2020). Capsanthin has drawn researches attention due to its photoprotection properties (Fernández-García, Carvajal-Lérida, & Pérez-Gálvez, 2016).

The biological activities of such components identified in biquinho pepper are mainly due to their antioxidant capacity. Carotenoids consist of a series of conjugated C=C bonds, on the same space plane and this characteristic is responsible for the ability of quenching singlet molecular oxygen and scavenging free radicals, which are the main reactive species involved in oxidation (Young & Lowe, 2018). Phenolic compounds also scavenge free radicals and their structures allow their stabilization by means of resonance. Moreover, they may interact with pro-oxidants like metal ions and oxygen (Embuscado, 2019).

Due to the great combination of health-promoting potential, sensory attributes, and antioxidant properties, biquinho pepper may be highlighted as a prominent functional food additive, providing advantageous properties to food products and representing an alternative to the substitution of the synthetic antioxidants.

3.2 *In vitro* antioxidant capacity

Peppers present a diversity of bioactive compounds with distinct chemical structures and antioxidant characteristics that makes it difficult to measure their extract antioxidant capacity. Therefore, the use of different methods is a suitable strategy to achieve more accurate results. Table 7 presents the antioxidant capacity determined by DPPH, ORAC, and β -carotene/linoleic acid assays.

Table 7: Antioxidant capacities determined by DPPH, ORAC, and β -carotene/linoleic acid assays of biquinho pepper.

Methods	Values
DPPH % inhibition percentage	33.17 ± 0.08
ORAC μmolTE/g	32.35 ± 0.02
β-carotene/linoleic acid % oxidative inhibition	55.80 ± 1.30

Results presented as mean ± standard deviation, n=3

The inhibition percentage against the DPPH radical was 33.17 ± 0.08 %. Results in the same range were found in previous studies on biquinho pepper. da Silva Ribeiro et al. (2019) reported percentages varying from 23.40 to 66.36 % for extracts prepared with ethanol and an ethanol/water solution (50:50, %v/v), respectively. In addition, inhibition percentages from 14 to 35% were determined in methanolic extracts of fresh biquinho pepper fruits (Umoh et al., 2020).

Considering the ability of an antioxidant to scavenge a free radical, the ORAC value indicates the peroxy radical scavenging activity. A value of 32.35 ± 0.02 μmol/TE g was assessed by the ORAC method. As is commonly demonstrated in the literature, de Aguiar et al. (2019) observed the influence of the extraction (temperature and percentage of solvent) on the antioxidant capacity of *biquinho* pepper fruit, where results ranged from 75 to 362 μmol/TE g.

The β-carotene/linoleic acid exhibited a percentage of oxidative inhibition of 55.80 ± 1.30 %, which was lower than the one published by Jorge, Veronezi, and Pereira (2016) for biquinho pepper fruits (9.50%). Methanolic extracts from two genotypes of biquinho pepper presented results varying from 17 to 40% of inhibition (Ramírez-Gómez et al., 2016). Menichini et al., (2009) revealed that the inhibition potential is affected by the maturation stage, with percentages ranging from 4.47 to 5.31% (mature fruits) and from 14.4 to 28.1% (immature fruits).

3.3 *In vivo* antioxidant capacity

Plants are known as dietary sources of bioactive compounds with antioxidant properties, which indicate the possible use of some plants as food additives. Although many plants are already commonly consumed, certain plant materials may present

cytotoxicity activities; pointing out the importance of evaluating the possible toxic effects of natural extracts.

The toxic effect of *biquinho* pepper extract on *S. cerevisiae* cells was evaluated in comparison to the toxic effect of H₂O₂ (positive control). Due to the similarities observed in *Saccharomyces cerevisiae* and human cells, from the biochemical and molecular point of view, this species is recognized as a eukaryotic model organism for biological studies (Lingua et al., 2016).

In the present study, exposure to H₂O₂ during 1 hour significantly affected the percentage of cell survival (16.20%, positive control), in comparison with the negative control (no treatment) ($p < 0.05$). However, exposure to *biquinho* pepper extract did not show such high toxicity under the evaluated conditions (Figure 1a). Percentages of cell survival were 80.63, 76.13, and 85.29% for E1 (1.7 µg/mL), E2 (17 µg/mL), and E3 (170 µg/mL), respectively. Results obtained for E3 were similar to those of cells not exposed to oxidative stress. When different extract concentrations were evaluated, cell viability showed statistically similar values ($p > 0.05$). Additionally, the same effects on cell survival were determined after exposure to ethanol when compared to the extracts ($p > 0.05$).

H₂O₂ is the most abundant reactive oxygen species present *in vivo*, being naturally found in cells under normal conditions (Lingua et al., 2016). Thus, since *biquinho* pepper extracts did not show pronounced toxicity, their antioxidant potential was worthwhile investigated.

S. cerevisiae cells were sensitive to the presence of H₂O₂ in all treatments ($p < 0.05$) (Figure 1b). The positive control (H₂O₂) showed a reduction of approximately 59% in colonies, while in cells previously exposed to the extracts the reduction varied from 45 to 74%. Only the treatment with E3 minimized the effects of the oxidative stress promoted by H₂O₂.

These results revealed the ability of *biquinho* pepper extract (E3) to decrease the damage on the yeast cells; however, the mechanisms involved in this process are not well elucidated. Bioactive compounds present in the extracts may activate the endogenous protective system or act directly on free radicals (de Oliveira et al., 2020b). Besides, supported by the antioxidant capacity assessed by the *in vitro* assays and the rich composition of bioactive compounds with antioxidant properties, these results suggest

further studies using extracts with higher concentrations of *biquinho* pepper to better evaluate the antioxidant potential of this fruit.

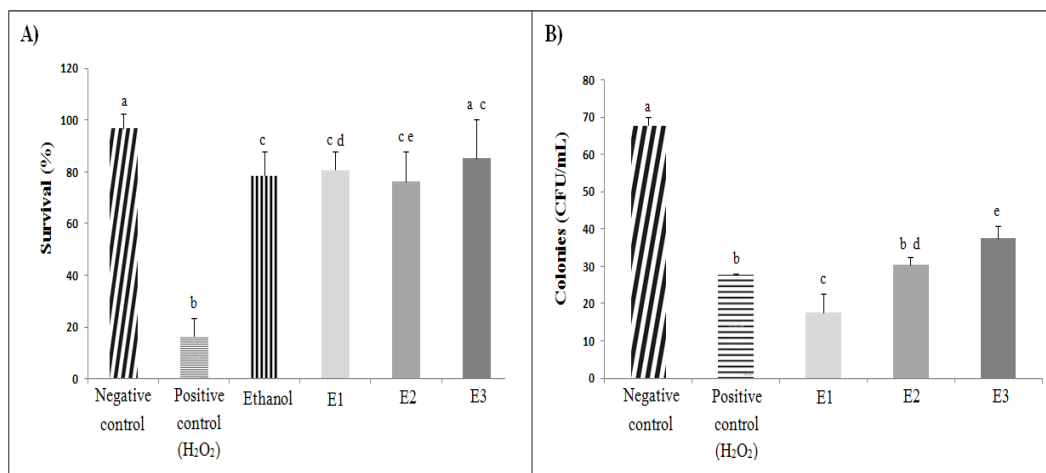


Figure 13: A- Cellular survival of *S. cerevisiae* exposure to biquinho pepper extracts after 1 hour. Cells were exposed to H₂O₂ (1mM, positive control), ethanol, biquinho pepper extracts (E1- 1.7 µg/mL; E2- 17 µg/mL; E3- 170 µg/mL), and incubated with any treatment (negative control). B- Tolerance of *S. cerevisiae* cells pretreated or not with biquinho pepper extracts, after exposure to H₂O₂ (1mM/1h). Cells were directly treated with H₂O₂ (positive control), previously treated with biquinho pepper extracts (E1- 1.7 µg/mL; E2- 17 µg/mL; E3- 170 µg/mL) before exposition to H₂O₂, and just treated with phosphate buffer (negative control). Different letters mean statistically different results ($p < 0.05$).

The potential of natural extracts to protect yeast cells against oxidants have been reported. An *in vivo* method with yeasts was performed to compare the antioxidant property of acerola extracts with synthetic antioxidants (da Cruz et al., 2019). The antioxidant activity of the dietary flavonoid hyperoside was evaluated using *S. cerevisiae* as a model (Gao et al., 2019). In a study performed by de Oliveira et al. (2020b) with pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi), the authors showed that extracts of 10 and 100 µg/mL did not present toxicity to *S. cerevisiae* cells. Moreover, the pretreatments with pink pepper extracts increased the cell survival from 20.03% to 51.75% (10 µg/mL) and 48.59% (100 µg/mL).

3.4 Anticholesterol oxidation effect of biquinho pepper

The cholesterol and cholesterol oxides levels of fish balls added with biquinho pepper at three different concentrations (0.5% PB, 0.75% PB, and 1% PB) and fish balls with no addition of antioxidant (control) during 60 days of frozen storage are shown in Table 8.

Table 8: Cholesterol (mg/100 g, dry basis) and cholesterol oxides contents ($\mu\text{g/g}$, dry basis) of fish meatballs during 60 days of frozen storage.

Samples		20 α -OH	5,6 β -EP	25-OH	7-keto	7 α -OH	7 β -OH	Total COPs	Cholesterol
Control	Day 0	1.27 \pm 0.14 ^D	0.81 \pm 0.02 ^D	-	2.96 \pm 0.15 ^{BC}	0.19 \pm 0.02 ^C	0.31 \pm 0.02 ^C	5.55 \pm 0.24 ^E	342.20 \pm 3.57 ^A
No addition	Day 15	3.58 \pm 0.04 ^{C:a}	9.21 \pm 0.95 ^{C:a}	-	3.74 \pm 0.10 ^{A:a}	0.25 \pm 0.01 ^{C:a}	0.70 \pm 0.02 ^{C:a}	17.48 \pm 0.91 ^{D:a}	302.31 \pm 3.08 ^{B:c}
0.5% BP		2.75 \pm 0.07 ^{B:b}	7.17 \pm 0.09 ^{C:b}	-	2.50 \pm 0.11 ^{A:b}	0.22 \pm 0.01 ^{C:ab}	0.33 \pm 0.02 ^{D:b}	12.98 \pm 0.18 ^{D:b}	304.08 \pm 3.24 ^{A:c}
0.75% BP		2.74 \pm 0.06 ^{A:b}	4.56 \pm 0.32 ^{C:c}	-	2.50 \pm 0.12 ^{A:b}	0.20 \pm 0.01 ^{C:b}	0.21 \pm 0.03 ^{C:c}	10.22 \pm 0.23 ^{D:c}	318.10 \pm 3.41 ^{A:b}
1% BP		2.39 \pm 0.10 ^{A:c}	3.08 \pm 0.41 ^{C:d}	-	1.40 \pm 0.02 ^{B:c}	0.21 \pm 0.02 ^{B:b}	0.10 \pm 0.01 ^{C:d}	7.18 \pm 0.50 ^{D:d}	328.42 \pm 3.32 ^{A:a}
No addition	Day 30	4.54 \pm 0.18 ^{B:a}	13.31 \pm 0.55 ^{B:a}	2.94 \pm 0.05 ^{C:a}	3.22 \pm 0.10 ^{B:a}	0.31 \pm 0.01 ^{C:a}	1.02 \pm 0.09 ^{C:a}	25.34 \pm 0.58 ^{C:a}	296.17 \pm 3.20 ^{B:a}
0.5% BP		2.75 \pm 0.08 ^{B:b}	8.85 \pm 0.68 ^{B:b}	2.28 \pm 0.18 ^{B:b}	2.47 \pm 0.12 ^{A:b}	0.30 \pm 0.02 ^{C:a}	0.79 \pm 0.09 ^{C:b}	17.44 \pm 0.86 ^{C:b}	302.46 \pm 3.21 ^{A:a}
0.75% BP		1.92 \pm 0.03 ^{B:c}	6.47 \pm 0.81 ^{B:c}	0.46 \pm 0.05 ^{C:c}	2.07 \pm 0.06 ^{B:c}	0.27 \pm 0.02 ^{C:a}	0.50 \pm 0.05 ^{C:c}	11.69 \pm 0.75 ^{C:c}	303.74 \pm 3.43 ^{A:a}
1% BP		1.32 \pm 0.14 ^{B:d}	3.43 \pm 0.31 ^{C:d}	0.35 \pm 0.01 ^{C:c}	1.68 \pm 0.04 ^{A:d}	0.21 \pm 0.02 ^{B:b}	0.34 \pm 0.03 ^{C:c}	7.34 \pm 0.20 ^{C:d}	307.04 \pm 3.14 ^{A:a}
No addition	Day 45	5.25 \pm 0.07 ^{A:a}	14.19 \pm 0.32 ^{B:a}	6.46 \pm 0.69 ^{B:a}	3.09 \pm 0.13 ^{BC:a}	2.24 \pm 0.06 ^{B:a}	8.90 \pm 0.60 ^{B:a}	40.14 \pm 1.67 ^{B:a}	286.10 \pm 2.86 ^{C:b}
0.5% BP		4.11 \pm 0.14 ^{A:b}	9.10 \pm 0.16 ^{B:b}	1.40 \pm 0.14 ^{C:b}	2.22 \pm 0.06 ^{B:b}	1.26 \pm 0.04 ^{B:b}	7.04 \pm 0.13 ^{B:b}	25.13 \pm 0.40 ^{B:b}	287.21 \pm 2.89 ^{B:ab}
0.75% BP		2.72 \pm 0.15 ^{A:c}	7.54 \pm 0.09 ^{B:c}	1.37 \pm 0.11 ^{B:b}	1.86 \pm 0.08 ^{B:c}	1.17 \pm 0.02 ^{B:c}	5.53 \pm 0.22 ^{B:c}	20.20 \pm 0.26 ^{B:c}	289.49 \pm 2.92 ^{C:ab}
1% BP		0.89 \pm 0.08 ^{C:d}	6.01 \pm 0.37 ^{B:d}	0.93 \pm 0.05 ^{B:b}	1.52 \pm 0.09 ^{B:d}	0.94 \pm 0.03 ^{A:d}	4.13 \pm 0.06 ^{B:d}	14.42 \pm 0.37 ^{B:d}	294.82 \pm 3.16 ^{C:a}
No addition	Day 60	4.74 \pm 0.14 ^{B:a}	50.8 \pm 0.48 ^{A:a}	9.71 \pm 0.33 ^{A:a}	2.88 \pm 0.10 ^{C:a}	3.60 \pm 0.14 ^{A:a}	14.63 \pm 0.51 ^{A:a}	86.35 \pm 1.11 ^{A:a}	277.31 \pm 2.89 ^{D:b}
0.5% BP		2.03 \pm 0.12 ^{C:b}	29.09 \pm 0.90 ^{A:b}	7.80 \pm 0.15 ^{A:b}	1.18 \pm 0.06 ^{C:b}	2.67 \pm 0.15 ^{A:b}	9.38 \pm 0.26 ^{A:b}	52.16 \pm 1.18 ^{A:b}	281.07 \pm 2.99 ^{B:b}
0.75% BP		1.56 \pm 0.23 ^{B:c}	17.93 \pm 0.71 ^{A:c}	6.99 \pm 0.17 ^{A:c}	1.06 \pm 0.03 ^{C:b}	2.22 \pm 0.15 ^{A:c}	8.17 \pm 0.26 ^{A:c}	37.93 \pm 0.30 ^{A:c}	282.72 \pm 2.98 ^{C:b}
1% BP		1.00 \pm 0.10 ^{C:d}	13.72 \pm 0.74 ^{A:d}	5.66 \pm 0.26 ^{A:d}	0.98 \pm 0.12 ^{C:b}	1.00 \pm 0.06 ^{A:d}	6.67 \pm 0.41 ^{A:d}	29.04 \pm 0.98 ^{A:d}	291.30 \pm 3.30 ^{C:a}

(-) Not detected. Results of triplicates expressed as mean \pm standard deviation. Averages with different capital letters in the same column indicate significant differences at storage time ($p < 0.05$). Different lower letters in the same column indicate significant differences among the treatments.

The initial cholesterol content determined in samples at day 0 was 342.20 ± 3.56 mg/100 g, in dry basis. However, the amount of cholesterol decreased in samples during storage. In control samples (no addition of antioxidants), the cholesterol amount reduced from 342.20 ± 3.57 (day 0) to 277.31 ± 2.89 mg/100 g (day 60), which corresponds to a reduction of approximately 19%. Other studies have also reported losses in the content of cholesterol during frozen storage (Guizzellini et al., 2020; Saldanha, Benassi, & Bragagnolo, 2008; Sancho et al., 2011). Guizzellini et al. (2020) found a reduction of 40.7% in the cholesterol level of fish burgers during 90 days of storage at -18 °C.

In samples added with biquinho pepper, the cholesterol levels at day 60 were: 281.07 ± 2.99 mg/100 g (0.5% PB), 282.72 ± 2.98 mg/100 g (0.75% PB), and 291.30 ± 3.30 mg/100 g (1% PB). These results revealed the lower degradation of cholesterol in samples added with the natural antioxidant. One of the main via of cholesterol degradation is the oxidation; however, the cholesterol molecule can also be affected by other mechanisms and form compounds such as ketones, aldehydes, hydrocarbons, and alcohols (Smith, 1987). Therefore, the rate of cholesterol degradation does not have to follow the COPs formation.

Regarding the cholesterol oxides, six COPs were identified in the fish balls samples: 20α -OH, $5,6\beta$ -EP, 25 -OH, 7 -keto, 7β -OH, and 7α -OH. However, 25 -OH was determined only after 30 days of storage.

At day 0, the main cholesterol oxide found was 7 -keto (2.96 ± 0.15 μ g/g), followed by 20α -OH (1.27 ± 0.14 μ g/g) and $5,6\beta$ -EP (0.81 ± 0.02 μ g/g), showing a content of total COPs of 5.55 ± 0.24 μ g/g. Although COPs are mainly formed during food processing and storage, COPs can also be determined in fresh samples of fish since they are endogenously formed in animals by enzymatic or non-enzymatic reactions (Hur et al., 2007). This can explain the presence of COPs in fish balls at day 0, as well as the conditions to which samples were exposed before their preparation.

After 60 days of storage, the content of total COPs increased and achieved a value of 86.35 ± 1.11 μ g/g in control samples, which was approximately 15 times higher than the one assessed at day 0. The longer the time of storage higher the concentration of COPs, with a significant increase after each period of time evaluated ($p < 0.05$). Moreover, a great increase in the level of COPs was already noticed after 30 days of storage (17.48 ± 0.91 μ g/g).

5,6 β -EP was the most abundant cholesterol oxide at day 60 ($50.80 \pm 0.48 \mu\text{g/g}$), followed by 7 β -OH ($14.63 \pm 0.51 \mu\text{g/g}$) and 25-OH ($9.71 \pm 0.33 \mu\text{g/g}$). As reported by other authors, storage under low temperatures, a usual conservative method, does not interrupt the oxidative processes in food (Guizzellini et al., 2020; Sancho et al., 2011; Saldanha et al., 2008).

The cholesterol epoxides are commonly formed in the presence of air by the epoxidation route. Oxides originated from the oxidative process at C7 (7 α -OH, 7 β -OH, and 7-keto) are the most reported ones in food. 7 β -hydroperoxide is reduced to its corresponding alcohol, forming 7 β -OH, which is commonly predominant due to the higher stability of the 7 β -hydroperoxide in comparison with 7 α -hydroperoxide. And representing the COPs originated from the side chain, 25-OH is formed by oxidative reactions on the tertiary carbon C25 (Smith, 1987). Indeed, several factors such as temperature, time of storage, initial cholesterol concentration, presence of antioxidants and pro-oxidants, and exposure to light and oxygen may influence the formation of COPs (Medina-Meza & Barnaba, 2013).

Similar trends were noticed in samples added with biquinho pepper, where greater levels of COPs were assessed at day 60 than at day 0, indicating the cholesterol oxidation during storage. However, the addition of biquinho pepper minimized COPs formation and lower contents of COPs were found in samples added with the natural antioxidant than in samples with no addition ($86.35 \pm 1.11 \mu\text{g/g}$). Samples treated with pepper presented the following amounts of cholesterol oxides: 0.5% PB ($52.16 \pm 1.18 \mu\text{g/g}$), 0.75% PB ($37.93 \pm 0.30 \mu\text{g/g}$), and 1% PB ($29.04 \pm 0.98 \mu\text{g/g}$). The increments in COPs content in samples containing pepper ranged from 80.89 (1% PB) to 89.36% (0.25% PB), while in samples with no addition the increment was around 94%.

These values demonstrated the protective effect of biquinho pepper against cholesterol oxidation. The main strategy to minimize oxidation processes in food is the addition of antioxidants. Moreover, there is a high demand for phytochemicals in the global market that highlights the use of plant species in processed food, representing an alternative to the substitution of synthetic additives (de Oliveira et al., 2018). Numerous authors investigated and proved the anticholesterol oxidation action of natural sources as garlic and leek (Guizellini et al., 2020), pink pepper (de Oliveira et al., 2020a), annatto and bixin (Figueirêdo et al., 2015), annatto seed and coriander leaves (Sancho et al., 2011), among others.

Unlike most peppers, the variety biquinho has a strong pepper aroma without the burning sensation, being well appreciated as a culinary condiment. Furthermore, the addition of biquinho pepper to food products may be attractive to consumers not only due to its sensory attributes but also due to its potential to reduce the oxidation of cholesterol and consequent COPs formation.

The literature has shown the relation of COPs with pathogenesis and progression of human diseases. The carcinogenic effect of cholesterol oxides contributes to the initiation and progression of colon, pancreas, prostate, and breast cancer (Kloudova-Spalenkova et al., 2020). 7-ketocholesterol is widely found in the blood and arterial plaques of patients with coronary artery diseases (Anderson et al., 2020). COPs induce inflammations at neuronal levels causing neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's disease (Malaguti et al., 2019). Therefore, reduce the ingestion of COPs is a crucial and challenging task that drives the search for new sources of natural antioxidants to act against cholesterol oxidation.

4 CONCLUSION

The chromatographic analyses of *biquinho* pepper indicated the presence of important bioactive compounds, which are known for their antioxidant properties and biological value. The antioxidant potential of this fruit was demonstrated by *in vitro* and *in vivo* assays. Additionally, *biquinho* pepper extract showed low toxicity to *Saccharomyces cerevisiae* cells under the evaluated conditions. When tested as a natural food additive in fish balls storage at -18°C for 60 days, *biquinho* pepper proved to be effective in reducing COPs formation. Therefore, the findings of the present study suggest the possible use of *biquinho* pepper as an agent to protect cholesterol from oxidation in processed food, attending the growing demand for healthier food with lower levels of chemical additives and additional nutritional value. Moreover, future studies are needed to properly establish the condition of process and sensorial aspects for industrial applications.

5 REFERENCES

- ANDERSON, A., Campo, A., FULTON, E., CORWIN, A., Jerome III, W. G., & O'CONNOR, M. S. 7-Ketocholesterol in disease and aging. **Redox Biology**, 29, 101380, 2020.
- AZIZ, E., Batool, R., AKHTAR, W., Rehman, S., SHAHZAD, T., Malik, A., ... & Rauf, A. Xanthophyll: health benefits and therapeutic insights. **Life Sciences**, 240, 117104, 2020.
- BACON, K., Boyer, R., DENBOW, C., O'Keefe, S., NEILSON, A., & Williams, R. Antibacterial activity of jalapeño pepper (*Capsicum annuum* var. *annuum*) extract fractions against select foodborne pathogens. **Food science & nutrition**, 5(3), 730-738, 2017.
- CERVANTES-HERNÁNDEZ, F., Alcalá-González, P., MARTÍNEZ, O., & ORDAZ-ORTIZ, J. J. Placenta, Pericarp, and Seeds of Tabasco Chili Pepper Fruits Show a Contrasting Diversity of Bioactive Metabolites. **Metabolites**, 9(10), 206, 2019.
- CHISTÉ, R. C., & MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of carotenoids and phenolic compounds from the Amazonian fruit *Caryocar villosum*. **Journal of agricultural and food chemistry**, 60(23), 5884-5892, 2012.
- DA CRUZ, R. G., Beney, L., GERVAIS, P., De Lira, S. P., de SOUZA VIEIRA, T. M. F., & Dupont, S. Comparison of the antioxidant property of acerola extracts with

synthetic antioxidants using an in vivo method with yeasts. **Food chemistry**, 277, 698-705, 2019.

DA SILVA RIBEIRO, M., Melo, C. M. T., Almeida, E. S., & DOS ANJOS QUEIROZ, C. R. A. Extraction of total phenolic content and antioxidant activity of *Capsicum chinense* and *Capsicum spp* in different solvents and extraction time. **Bioscience Journal**, 35(4), 2019.

DE AGUIAR, A. C., da Fonseca Machado, A. P., ANGOLINI, C. F. F., de MORAIS, D. R., BASEGGIO, A. M., Eberlin, M. N., & MARTINEZ, J. Sequential high-pressure extraction to obtain capsinoids and phenolic compounds from biquinho pepper (*Capsicum chinense*). **The Journal of Supercritical Fluids**, 150, 112-121, 2019.

DE OLIVEIRA, Vanessa. S., FERREIRA, Fernanda. S., COPLE, Maria. Clara. R., LABRE, T. D. S., AUGUSTA, I. M., Gamallo, O. D., & SALDANHA, Tatiana. Use of Natural Antioxidants in the Inhibition of Cholesterol Oxidation: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 17(6), 1465-1483, 2018.

DE OLIVEIRA, Vanessa. S., CHÁVES, Davy. W. H., GAMALLO, Ormino. D., SAWAYA, Alexandra. C. H. F., SAMPAIO, G. R., CASTRO, Rosane. N., & SALDANHA, Tatiana. Effect of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) fruit against polyunsaturated fatty acids and cholesterol thermo-oxidation in model systems containing sardine oil (*Sardinella brasiliensis*). **Food research international**, 109091. 2020a.

DE OLIVEIRA, Vanessa. S., AUGUSTA, Ivanilda. M., da Conceição Braz, M. V., Riger, C. J., Prudêncio, E. R., SAWAYA, Alexandra. C. H. F., & SALDANHA, Tatiana. Aroeira fruit (*Schinus terebinthifolius* Raddi) as a natural antioxidant: Chemical constituents, bioactive compounds and in vitro and in vivo antioxidant capacity. **Food Chemistry**, 315, 126274, 2020b.

DE ROSSO, V. V., & MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 5062–5072, 2007.

DO NASCIMENTO, T. C., CAZARIN, C. B. B., MARÓSTICA Jr, M. R., Mercadante, A. Z., Jacob-Lopes, E., & ZEPKA, L. Q. Microalgae carotenoids intake: influence on cholesterol levels, lipid peroxidation and antioxidant enzymes. **Food Research International**, 128, 108770, 2020.

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

FAYOS, O., Savirón, M., ORDUNA, J., Barbero, G. F., MALLOR, C., & GARCÉS-CLAVER, A. Quantitation of capsiate and dihydrocapsiate and tentative identification of minor capsinoids in pepper fruits (*Capsicum spp.*) by HPLC-ESI-MS/MS (QTOF). **Food chemistry**, 270, 264-272, 2019.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E., CARVAJAL-LÉRIDA, I., & PÉREZ-GÁLVEZ, A. Carotenoids exclusively synthesized in red pepper (capsanthin and capsorubin) protect human dermal fibroblasts against UVB induced DNA damage. **Photochemical & Photobiological Sciences**, 15(9), 1204-1211, 2016.

FIGUEIRÊDO, Bruno. C., BRAGAGNOLO, Neura., Skibsted, L. H., & Orlien, V. Inhibition of cholesterol and polyunsaturated fatty acids oxidation through the use of annatto and bixin in high-pressure processed fish. **Journal of Food Science**, 80(8), C1646-C1653, 2015.

FUKUMOTO, L. R., & MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48, 3597-3604, 2000.

Gao, Y., Fang, L., Wang, X., Lan, R., Wang, M., Du, G., & Brennan, C. Antioxidant activity evaluation of dietary flavonoid hyperoside using *Saccharomyces cerevisiae* as a model. **Molecules**, 24(4), 788, 2019.

GENTILI, A., Dal Bosco, C., FANALI, S., & FANALI, C. Large-scale profiling of carotenoids by using non aqueous reversed phase liquid chromatography–photodiode array detection–triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry: Application to some varieties of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, 164, 759-767, 2019.

GIUFFRIDA, Daniele., Dugo, P., TORRE, Gabriela., Bignardi, C., CAVAZZA, A., Corradini, C., & Dugo, G. Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. **Food Chemistry**, 140(4), 794-802, 2013.

GIUFFRIDA, Daniele., MARTÍNEZ, N., Arrieta-Garay, Y., FARIÑA, L., Boido, E., & DELLACASSA, E. (2020). Valorisation of *Schinus molle* fruit as a source of volatile compounds in foods as flavours and fragrances. **Food Research International**, 133, 109103, 2020.

GUIZELLINI, G. M., Torres, E. A. F. D. S., Freitas, R. A. M. S., SALDANHA, Tatiana., Sawaya, Aalexandra. C. H. F., GAMALLO, Ormind. D., & Sampaio, Geni. R. The anticholesterol oxidation effects of garlic (*Allium sativum* L.) and leek (*Allium ampeloprasum* L.) in frozen fish burgers submitted to grilling. **Journal of Food Science**. 07, 2020.

GUO, Y., LU, Y., & JIN, H. Appraising the role of circulating concentrations of micro-nutrients in epithelial ovarian cancer risk: A Mendelian randomization analysis. **Scientific Reports**, 10(1), 1-9, 2020.

HUR, S. J., Park, G. B., & Joo, S. T. (2007). Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products. **Food Control**, 18(8), 939-947, 2007.

JANYOU, A., Wicha, P., SEECHAMNANTURAKIT, V., Bumroongkit, K., Tocharus, C., SUKSAMRARN, A., & TOCHARUS, J. Dihydrocapsaicin-induced angiogenesis and improved functional recovery after cerebral ischemia and reperfusion in a rat model. **Journal of Pharmacological Sciences**. 1(18), 2020.

JORGE, N., Veronezi, C. M., & Pereira, D. C. Extracts of red peppers: antioxidant activity and sensory evaluation. **Nutrition & Food Science**. 2016.

KLOUDOVA-SPALENKOVA, A., Ueng, Y. F., Wei, S., KOPECKOVA, K., GUENGERICH, F. P., & SOUCEK, P. Plasma oxysterol levels in luminal subtype breast cancer patients are associated with clinical data. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, *197*, 105566., 2020.

LI, N., Wu, X., ZHUANG, W., Xia, L., CHEN, Y., Wu, C., & Wan, Q. Fish consumption and multiple health outcomes: Umbrella review. **Trends in Food Science & Technology**. 2020.

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

LIU, A., Han, C., ZHOU, X., Zhu, Z., HUANG, F., & Shen, Y. Determination of three capsaicinoids in *Capsicum annuum* by pressurized liquid extraction combined with LC-MS/MS. **Journal of separation science**, *36*(5), 857-862., 2013.

MALAGUTI, M., Cardenia, V., RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T., & Hrelia, S. Nutraceuticals and physical activity: Their role on oxysterols-mediated neurodegeneration. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, *193*, 105430., 2019.

MARACAHIPIES, Á. C., TAVEIRA, G. B., SOUSA-MACHADO, L. Y., Machado, O. L. T., Rodrigues, R., Carvalho, A. O., & Gomes, V. M. Characterization and antifungal activity of a plant peptide expressed in the interaction between *Capsicum annuum* fruits and the anthracnose fungus. **Bioscience reports**, *39*(12), 2019.

MEDINA-MEZA, I. G., & BARNABA, C. Kinetics of cholesterol oxidation in model systems and foods: current status. **Food Engineering Reviews**, *5*(3), 171-184., 2013.

MENICHINI, F., Tundis, R., BONESI, M., LOIZZO, M. R., Conforti, F., STATTI, G., ... & MENICHINI, F. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. **Food chemistry**, *114*(2), 553-560., 2009.

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

MOHD HASSAN, N., Yusof, N. A., Yahaya, A. F., Mohd Rozali, N. N., & Othman, R. Carotenoids of capsicum fruits: Pigment profile and health-promoting functional attributes. **Antioxidants**, *8*(10), 469. 2019.

MORENO, Helena. M., HERRANZ, B., Pérez-Mateos, M., SÁNCHEZ-ALONSO, I., & Borderías, J. A. New alternatives in seafood restructured products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, *56*(2), 237-248., 2016.

OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., & PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as

the fluorescent probe. **Journal of agricultural and food chemistry**, 49(10), 4619-4626., 2001.

OVANDO-MARTÍNEZ, M., GÁMEZ-MEZA, N., MOLINA-DOMÍNGUEZ, C. C., Hayano-Kanashiro, C., & MEDINA-JUÁREZ, L. A. Simulated gastrointestinal digestion, bioaccessibility and antioxidant capacity of polyphenols from red Chiltepin (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) grown in Northwest Mexico. **Plant foods for human nutrition**, 73(2), 116-121., 2018.

PETRY, Fabiane. C., de Nadai, F. B., CRISTOFANI-YALY, M., Latado, R. R., & MERCADANTE, Adriana. Z. Carotenoid biosynthesis and quality characteristics of new hybrids between tangor (*Citrus reticulata* x *C. sinensis*) cv. 'Murcott' and sweet orange (*C. sinensis*) cv. 'Pêra'. **Food research international**, 122, 461-470. 2019.

PETRY, Fabiane. C., & MERCADANTE, Adriana. Z. New method for carotenoid extraction and analysis by HPLC-DAD-MS/MS in freeze-dried Citrus and mango pulps. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 29(1), 205–215., 2018.

RAMÍREZ-GÓMEZ, K., MOGUEL-ORDOÑEZ, Y., SEGURA-CAMPOS, M. R., Ruiz-Ruiz, J. C., Chel-Guerrero, L. A., & BETANCUR-ANCONA, D. A. Antioxidant Capacity of *Capsicum chinense* Genotypes. **In Functional Properties of Traditional Foods** (pp. 241-249). Springer, Boston, MA., 2016.

SALDANHA, Tatiana., SAWAYA, Alexandra. C. H. F., Eberlin, M. N., & BRAGAGNOLO, Neura. HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish: comparative study of RI, UV, and APCI-MS detectors. **Journal of agricultural and food chemistry**, 54(12), 4107-4113., 2006.

SALDANHA, Tatiana., BENASSI, Marta. T., & BRAGAGNOLO, Neura. Fatty acid contents evolution and cholesterol oxides formation in Brazilian sardines (*Sardinella brasiliensis*) as a result of frozen storage followed by grilling. **LWT-Food Science and Technology**, 41, 1301-1309., 2008.

SANCHO, Renata Soriano., de LIMA, Fabiana., COSTA, Gabriela, MARIUTTI, Lilian Regina, & BRAGAGNOLO, Neura. Effect of annatto seed and coriander leaves as natural antioxidants in fish meatballs during frozen storage. **Journal of food science**, 76(6), C838-C845., 2011.

SCHWEIGGERT, U., KAMMERER, D. R., Carle, R., & SCHIEBER, A. Characterization of carotenoids and carotenoid esters in red pepper pods (*Capsicum annuum* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry**, 19(18), 2617-2628., 2005.

SCHWEIGGERT, U., CARLE, R., & SCHIEBER, A. Characterization of major and minor capsaicinoids and related compounds in chili pods (*Capsicum frutescens* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 557(1-2), 236-244. 2006.

SMITH, L. L. Cholesterol autoxidation 1981–1986. **Chemistry and Physics of Lipids**, 44(2-4), 87-125., 1987.

TARVAINEN, M., Quirin, K.W., KALLIO, H., & YANG, B. CO₂ plant extracts reduce cholesterol oxidation in fish patties during cooking and storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 64(51), 9653-9662., 2016.

UMOH, O. T., Uyoh, V. E., Ette, A. P., Eyibio, E. E., Oghenekevwe, A. O., Osaro-Odin, E. P., & Ikotidem, S. A. (2020). Phytochemical and Antioxidant Evaluation of Varieties of Pepper Fruits in Akpan Andem Market in Uyo Akwa Ibom State, Nigeria. **European Journal of Nutrition & Food Safety**, 85-93.

YOKOYAMA, K., Yamada, Y., AKAMATSU, Y., Yoshinaka, Y., YAMAMOTO, A., Koizumi, T., & KIMURA, M. Effects of Capsinoids on Daily Physical Activity, Body Composition and Cold Hypersensitivity in Middle-Aged and Older Adults: A Randomized Study. **Nutrients**, 12(1), 212. 2020.

YOUNG, A. J., & Lowe, G. L. Carotenoids—antioxidant properties. **Antioxidants**, 557(1-2), 236-244. 2018.

XU, S., ZHANG, L., Cheng, X., Yu, H., BAO, J., & Lu, R. Capsaicin inhibits the metastasis of human papillary thyroid carcinoma BCPAP cells through the modulation of the TRPV1 channel. **Food & function**, 9(1), 344-354. 2018.

CAPÍTULO II

**ARTIGO EM PREPARAÇÃO PARA SER ENVIADO A REVISTA
“JOURNAL OF FOOD SCIENCE”**

**BIQUINHO PEPPER (*Capsicum chinense*): A NATURAL
ANTIOXIDANT AGAINST THE DEGRADATION OF
POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN FROZEN AND GRILLED
FISH BALLS**

ABSTRACT

Concerns on the toxicological effects of synthetic additives have motivated the replacement of synthetic antioxidants by natural ones. Therefore, this study evaluated the effects of biquinho pepper (*Capsicum chinense*) flour on the degradation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) during frozen storage and after cooking. Biquinho pepper flour (0.5%, 0.75%, and 1%) was incorporated into the fish balls, which were analyzed during frozen storage time on days 15, 30, 45 and 60, and after the thermal preparation in air fryer. The degradation of important PUFAs was determined during frozen storage, as well as after air frying. However, biquinho pepper flour significantly protected PUFAs from degradation. The content of PUFAs reduced by 26.85 % in raw samples not treated with biquinho pepper flour after 60 days of storage, while lower degradations percentages were determined in samples incorporated with the flour at 0.5% (23.20%), 0.75% (23.66 %), and 1% (22.02%). The levels of PUFAs decreased from 17.41 ± 0.2 (raw samples, day 60) to 11.16 ± 0.7 g/100 g (air fried samples, day 60), corresponding to a degradation of 35.9%. Nevertheless, lower losses were observed in samples containing biquinho pepper flour: 11.76 ± 0.5 g/100 g (0.5%), 12.29 ± 0.6 g/100 g (0.75%), and 13.74 ± 0.4 g/100 g (1%). Therefore, biquinho pepper flour proved to be effective in minimizing PUFAs degradation, which suggests its use by the food industry in order to add extra nutritional value and act as a natural preservative, minimizing the use of synthetic additives.

Keywords: bioactive compounds, *Capsicum chinense*, polyunsaturated fatty acids, lipid oxidation, frozen storage, air fryer.

1 INTRODUCTION

Peppers have gained increasing attention as a food ingredient due to their great combination of sensory and nutritional attributes. These fruits belong to the genus *Capsicum* (Solanaceae) that comprises many species, of which *Capsicum chinense* is the most popular among the domesticated peppers in Brazil (Ramírez-Gómez et al., 2016; de Aguiar et al., 2019).

C. chinense, which is commonly known as *biquinho pepper*, has different forms, colors, sizes, and pungency levels. Peppers are recognized due to their unique pungent flavor; however, the variety *biquinho* has a strong pepper aroma without the burning sensation, being well appreciated as a culinary condiment (Garruti et al., 2013).

Besides, people have taken up the increasing concept of using food to manage health. Studies have reported the beneficial effects of numerous bioactive compounds present in plant materials such as biquinho pepper (Embuscado, 2019; de Aguiar et al., 2019; Madala & Nutakki, 2020). These phytochemicals are vital nutritional antioxidants and play a role against oxidative damage of human cells. It is well established that oxidative stress triggers several pathological processes, and although humans present an endogenous antioxidant system, it is crucial to reinforce it through the diet (Embuscado, 2019).

The high demand for phytochemicals in the global market highlights the use of plant species in processed food. It allows producing new products enriched with natural materials, which may be more attractive to consumers not only due to their sensory attributes but also from the nutritional point of view (Kuna et al., 2018). Moreover, natural sources of antioxidants have shown a remarkable potential to replace the use of synthetic additives in food systems (de Oliveira et al., 2018; Embuscado, 2019).

Lipid oxidation is among the factors that most compromise the safety and quality of fish and fish products, which generally present high levels of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (Saldanha, Benassi, & Bragagnolo, 2008; Hematyar et al., 2019; de Oliveira et al., 2020a). PUFAs, mainly the ones from the *n*-3 serie (eicosapentaenoic acid-EPA and docosahexaenoic acid-DHA), are crucial to many physiological functions in humans (Innes & Calder, 2020).

Recent studies have demonstrated the association between higher intakes of marine n-3 fatty acids and cardiovascular mortality. This cardioprotective effect of EPA and DHA is mainly due to their potential to modulate numerous risk factors for heart diseases such as blood lipids and pressure, platelet aggregation, endothelial function, inflammation, among others (Punia, Sandhu, Siroha, & Dhull, 2019; Innes & Calder, 2020). However, processes to which fish dishes are submitted before consumption may cause the loss of essential fatty acids (Saldanha, Benassi, & Bragagnolo, 2008; Ferreira et al., 2017; Rahimzade et al., 2019; de Oliveira et al., 2020a).

The literature has reported the occurrence of oxidative reactions in fish during frozen storage. The use of low temperatures is the most common strategy used to conserve fish; however, it does not protect lipids from oxidation (Saldanha, Benassi, & Bragagnolo, 2008; Sancho et al., 2011; Rahimzade et al., 2019; Guizzellini et al., 2020). Moreover, the use of high temperatures during the thermal preparation of fish may also induce oxidation, even when using methods that are considered healthier, such as air fryer. Air fryers are alternative technologies to fry food without oil; nevertheless, it may also result in lipids degradation (Ferreira et al., 2017).

In this context, this study aimed to evaluate the effectiveness of biquinho pepper as a natural antioxidant in frozen fish balls. Biquinho pepper flour was incorporated into fish balls, which were storage for 60 days at -18 °C, being analyzed raw and after the thermal preparation in air fryer. Additionally, the chemical composition of biquinho pepper flour was characterized.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals

Methanol, ethanol, hexane, glacial acetic acid, sodium nitrite, sodium hydroxide, sodium carbonate potassium acetate, anhydrous sodium carbonate, and hydrochloric acid were achieved from Vetec (São Paulo, Brazil). Quercetin, galic acid, and Folin-Ciocalteu reagent were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other chemicals were purchased from Vetec (Sigma, São Paulo, Brazil). Stigmasterol, β -sitosterol, and Undecanoic methyl ester were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The

standard mixtures of fatty acids were from Supelco TM 37 (FAME Mix 18919, Bellefonte, Pa., U.S.A.).

2.2 Biquinho pepper flour

Fresh fruits of *biquinho* pepper were collected at the Institute of Agronomy of the University Federal Rural of Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil, in February 2019. The plant material was authenticated, and a voucher specimen was deposited in the Herbarium of UFRRJ under the following identification: RBR 39516.

After harvesting, the whole fruits were used to prepare the *biquinho* pepper flour. The fruits were ground in a domestic processor (Cadence, Brazil) and dried in a ventilated oven (Solab, Brazil) at 40 °C for 12 hours. Then, the dried fruits were milled using an analytical mill (A11 Basic, IKA) to pass through a 710 µm sieve (mesh 24, TPL, Brazil). The flour was packaged in polyethylene bags and stored at ambient temperature until analyses and sample preparation.

2.3 Chemical characterization of biquinho pepper flour

2.3.1 Chemical composition

AOAC procedures were used to perform the analyses as follows: moisture (method 925.10), protein (method 960.52), lipids (method 963.15), ash (method 923.03), and crude fiber (Weende method) (AOAC, 2002). The total carbohydrate content was calculated by difference of mean values: $100 - (\text{moisture \%} + \text{ash \%} + \text{lipid \%} + \text{protein \%} + \text{fiber \%})$. Total energy was calculated by considering the conversion factors of 4 kcal/g (protein or carbohydrate) and 9 kcal/g (lipid) (FAO/INFOOD, 2012).

2.3.2 Mineral content

Sodium, phosphorus, calcium, magnesium, and potassium levels were determined following the procedures reported by Carmo (2000). For this purpose, the samples were previously digested with concentrated nitric acid (65%) and perchloric acid (70%). A flame photometer (TKS model 1382) was used.

2.3.3 Phytosterols

Phytosterols were extracted by direct saponification as reported by Saldanha et al. (2006). HPLC analyses were carried out with a Waters equipment (Waters, Milford, MA, EUA), equipped with Photodiode Array (PDA)/Refractive Index Detector (RID) detectors, rheodyne injector with a 20 μ L loop, an oven heated column at 32 °C, and a Waters X-Terra® MSC18 column (250 mm \times 4.6 mm \times 3.5 μ m). The mobile-phase was acetonitrile:2-propanol (85:15, % v/v) at a flow rate of 0.8 mL/min.

The identification was done by comparison of retention times of peaks in samples with those of reference standards. Quantification was performed by external standardization using stigmasterol (from 25 to 500 μ g/mL) and β -Sitosterol (from 20 to 200 μ g/mL) as standards.

2.3.4 Fatty acids composition

The samples were submitted to transesterification and fatty acids were converted into methyl esters (Zhu et al., 2011). Subsequently, analyses were conducted using a gas chromatographer (Shimadzu GC 2010, Tokio, Japan), equipped with a split injector (1:50), fused silica CP-SIL 88 capillary column (100 m \times 0.25 mm i.d., 0.20 μ m film thickness) (Chrompack, Middelburg, The Netherlands), and a flame ionization detector. The chromatographic conditions were established as described by de Oliveira et al. (2020b), using hydrogen as the carrier gas (1 mL/min) and nitrogen as the make-up gas (30 mL/min). Identification of the chromatographic peaks of the samples was performed by comparing the retention times of FAME standards and quantification was done by internal standardization using the undecanoic methyl ester as standard.

2.4 Bioactive compounds of *biquinho* pepper flour

2.4.1 Preparation of extract

The extract was prepared by homogenizing 1 g of *biquinho* pepper flour with 10 mL of an ethanol and water solution (70:30, % v/v) using a Turrax (1 min; 140 rpm).

Then, the mixture was stirred on a shaker for 30 min and extracted in a sonic bath for 20 min (40 Hz). Subsequently, it was centrifuged (34200 rpm, 4 °C, 20 min) in a bench centrifuge (NI 1813, Nova Instruments) and the supernatant was filtered to a volumetric flask. The remaining residue was centrifuged again with 7.5 mL of the extracting solution. The supernatants were combined and adjusted to a final volume of 50 mL.

2.4.2 Determination of total phenolics, flavonoids, anthocyanins, and carotenoids contents

The total phenolic content was obtained by using the Foulin-Ciocalteu reagent method described by Swain and Hillis (1959). The flavonoids level was determined by the aluminum chloride colorimetric method (Scapin, Schmidt, Prestes, & Rosa, 2016). Carotenoids were analyzed using a methodology that determines carotenoids and chlorophylls simultaneously (Lichtenthaler, 1987). The total anthocyanins content was assessed by using the procedures proposed by Fuleki and Francis (1968). The modifications were performed according to de Oliveira et al. (2020b).

2.5 Fish balls

2.5.1 Preparation of fish balls

Around 10 kg of fresh sardines (*Sardina pilchardus*) were donated by Nova Piracema located in Niterói, Rio de Janeiro, Brazil, in March 2019. The tail, fin, and head were removed, and the fish samples were ground in a domestic processor (Philco, Brazil) to obtain a homogeneous mass.

The formulation of the fish balls included minced fish and *biquinho pepper* flour. Therefore, the samples were prepared as follows: no addition of antioxidant and addition of *biquinho pepper* flour at 0.5%, 0.75%, and 1% (0.5% BP, 0.75% BP, 1% BP), according to de Oliveira et al. (2020a). The percentage of the addition of pepper was calculated according to the weight of each ball (40 ± 1 g).

The mass was homogenized with a hand mixer and manually formed, totaling 170 samples. The samples were separated according to each formulation, packed in

polyethylene bags (five samples of each treatment per bag), and stored in a domestic freezer (CVU26E, Consul) at -18 °C for 60 days.

The samples of fish balls were analyzed raw and cooked on the same day they were prepared (day 0, control) and after 15, 30, 45, and 60 days. For this, the frozen fish balls were removed from storage and thawed, one half being submitted to the thermal preparation in air fryer (George Foreman AF 2000, U.S.A) at 200 °C for 20 minutes, and the other analyzed raw. The internal temperature ($72\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) was monitored using a digital thermometer (Incoterm 6132, Brazil). Before analyses, all samples were ground and homogenized in a domestic processor.

2.5.2 Moisture and total lipids content

The AOAC procedures were used to perform the analyses as follows: moisture (method 925.10) and lipids (method 963.15) (AOAC, 2002).

2.5.3 Fatty acids composition

The samples were submitted to transesterification and fatty acids were converted into methyl esters (Zhu et al., 2011). Subsequently, analyses were conducted using a gas chromatographer (Shimadzu GC 2010, Tokio, Japan), equipped with a split injector (1:50), fused silica CP-SIL 88 capillary column (100 m x 0.25 mm i.d., 0.20 µm film thickness) (Chrompack, Middelburg, The Netherlands), and a flame ionization detector. The chromatographic conditions were established as described by de Oliveira et al. (2020a), using hydrogen as the carrier gas (1 mL/min) and nitrogen as the make-up gas (30 mL/min). Identification of the chromatographic peaks of the samples was performed by comparing the retention times of FAME standards and quantification was done by internal standardization using the undecanoic methyl ester as standard.

2.7 Statistical analysis

All analyses were carried out in triplicate and the results were expressed as mean \pm standard deviation. All quantitative results were submitted to mean variance sample comparison using ANOVA test (to compare more than two samples), and the differences

were detected using a multiple mean pairwise-comparison by Tukey's test, at a significance level of 5%.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Biquinho pepper flour analyses

3.1.1 Chemical composition

The chemical composition of *biquinho pepper* flour is presented in Table 9. The samples showed a moisture level of $9.49 \pm 0.11/100$ g, which corresponds to values previously determined in dried pepper fruits (from 5.54 to 13.01 g/100 g) (Orellana-Escobedo et al., 2013; Akinyemi, Obasi, & Faajir, 2018).

Table 9: Chemical composition (g/100 g) and mineral composition (mg/100 g) of biquinho pepper flour.

Properties	g/100 g
Moisture	9.49 ± 0.11
Protein	8.37 ± 0.08
Lipid	5.09 ± 0.25
Crude fiber	20.21 ± 0.28
Ash	5.60 ± 0.05
Carbohydrate*	51.22 ± 0.78
Total energy (Kcal)	284.20 ± 0.41
Mineral	mg/100 g
Calcium	176.05 ± 0.05
Phosphorus	0.04 ± 0.08
Magnesium	239.60 ± 0.04
Potassium	0.66 ± 0.36
Sodium	Trace

Results presented as mean \pm standard deviation, n=3.*Calculated by difference. Trace: ≤ 0.005 mg/100 g.

The carbohydrate content was 51.22 ± 0.78 g/100 g. Biquinho pepper flour also presented high amounts of fiber, with 20.21 ± 0.28 g/100 g. Lower values were obtained in previous studies, where the authors found 2.24 g/100 g (Akinyemi, Obasi, & Faajir, 2018) and 11.58 g/100 g (Malakar et al., 2018) in biquinho pepper. In general, peppers

are important sources of fiber, showing contents considerably higher than the levels of some fruits and cereals (Pinto et al., 2013).

The protein and lipid contents of samples were 8.37 ± 0.08 and 5.09 ± 0.25 g/100 g, respectively. Other authors reported higher levels of proteins (from 11.29 to 16.37 g/100 g) and lipids (from 4.63 to 11.72 g/100 g) in biquinho pepper fruit (Escobedo et al., 2013; Akinyemi, Obasi, & Faajir, 2018; Ananthan, Subhash, & Longvah, 2018). The ash amount was 5.60 ± 0.05 g/100 g, which was lower than the result assessed by Malakar et al. (2018) (7.04 g/100 g) and higher than the one determined by Akinyemi, Obasi, and Faajir (2018), who found 4.13 g/100 g in biquinho pepper. The caloric value presented by biquinho pepper flour was 284.20 ± 0.41 kcal, which is in agreement with the value described by Malakar et al. (2018) (276.04 kcal).

As can be noticed above, these components are found in varying concentrations in the literature. However, it is well established that the composition of plant materials depends on factors such as the agronomic procedures, maturation degree of fruits, genotypes, soil composition, climatic conditions, post-harvest handling, storage, among others (Loizzo et al., 2015; Akinyemi, Obasi, & Faajir, 2018; Sarpras et al., 2019).

3.1.2 Mineral composition

Five macro-minerals were assessed in the current study (Table 9). The most abundant mineral present in biquinho pepper flour was magnesium (239.60 ± 0.04 mg/100 g), followed by calcium (176.05 ± 0.05 mg/100 g). Potassium and phosphorus showed lower contents with 0.66 ± 0.36 and 0.04 ± 0.08 mg/100 g, respectively. Sodium was determined in trace levels (≤ 0.005 mg/100 g).

These minerals were previously found in pepper species, including *C. chinense* (Lutz & Freitas, 2008; Abdou Bouba et al., 2012; Saprás et al., 2019). Similar amounts of magnesium (254 mg/100 g) and calcium (173 mg/100 g) were reported in *C. frutescens*, while higher levels of potassium and sodium were determined by Abdou Bouba et al. (2012). In biquinho pepper, potassium was described as the predominant mineral (351.7 mg/100 g) (Lutz & Freitas, 2008). Saprás et al. (2019) evaluated the mineral profile of biquinho pepper during different stages of maturation and determined higher levels of potassium, followed by phosphorous and magnesium. The variable results determined by

these authors showed that among many factors that may influence the mineral content, the fruit maturity is pivotal.

Functionalities and biological potential of minerals in the human organism have been documented. Magnesium, the most representative mineral of biquinho pepper flour, is a crucial cofactor for numerous metabolic reactions that regulate muscle and myocardial contraction, glycemic levels, and blood pressure (Alonso et al., 2020). Calcium, also determined in high amounts in this study, is the main mineral in the body and plays a role in structural properties, nerve functioning, immune system, and blood pressure regulation (Gharibzahedi & Jafari, 2017).

Lack of minerals can result in a wide range of disorders due to the key functions of these compounds on health. However, increased sodium intake is associated with hypertension and cardiovascular diseases (Du et al., 2020). Therefore, considering the higher content of sodium commonly found in processed food, diets characterized by the consumption of fruits and vegetables may contribute to balance sodium ingestion.

3.1.3 Phytosterol composition

The phytosterol profile of biquinho pepper flour is shown in Table 10. The amounts of stigmasterol and β -sitosterol were 21.18 ± 0.64 and 40.29 ± 0.83 mg/100 g, respectively. Studies regarding the phytosterol composition of biquinho pepper were not found available in the literature. In a study performed with *Capsicum annuum* L., the authors evaluated five different cultivars and determined contents varying from 8.22 to 11.08 mg/100 g for β -sitosterol and from 2.26 to 3.28 mg/100 g for stigmasterol (Bhandari et al., 2013). *Capsicum annuum* L. was studied by Piironen et al. (2003), showing values of 0.2 mg/100 g (stigmasterol) and 16.4 mg/100 g (β -sitosterol). Jun-Hua et al. (2008) reported the presence of β -sitosterol (2.2 mg/100 g), while stigmasterol was not found in *Capsicum annuum* L. fruits.

Table 10: Fatty acids composition (g/100 g) and phytosterol contents (mg/100 g) of biquinho pepper flour.

Fatty acids	g/100 g
C6:0	0.29 ± 0.03
C8:0	0.19 ± 0.02
C10:0	0.04 ± 0.00
C12:0	0.15 ± 0.01
C14:0	0.88 ± 0.05
C15:0	0.07 ± 0.00
C15:1	0.06 ± 0.01
C16:0	13.67 ± 0.29
C16:1	0.51 ± 0.02
C17:0	0.10 ± 0.01
C17:1	0.02 ± 0.00
C18:0	2.34 ± 0.05
C18:1 <i>n9c</i>	6.48 ± 0.04
C18:2 <i>n6t</i>	0.01 ± 0.00
C18:2 <i>n6c</i>	61.29 ± 0.66
C20:0	0.38 ± 0.00
C18:3 <i>n6</i>	0.02 ± 0.00
C20:1<i>n9</i>	3.09 ± 0.23
C18:3 <i>n3</i>	1.60 ± 0.12
C20:2<i>n6</i>	0.07 ± 0.00
C22:0	0.32 ± 0.01
C20:4 <i>n6</i>	0.06 ± 0.01
C20:5 <i>n3</i>	0.36 ± 0.01
C22:6 <i>n3</i>	0.09 ± 0.01
ΣSFA	18,76
ΣMUFA	10,18
ΣPUFA	63,55
ΣPUFA/ ΣSFA	3.38
Σ<i>n6</i>	2,08
Σ<i>n3</i>	61,47
Σ<i>n6</i>/ Σ<i>n3</i>	29.50
Phytosterol	mg/100 g
β-Sitosterol	40.29 ± 0.83
Stigmasterol	21.18 ± 0.64

Results presented as mean ± standard deviation, n=3. SFA= saturated fatty acids, MUFA= monounsaturated fatty acids, PUFA= polyunsaturated fatty acids.

Dietary sterols that occur in food from vegetal origin have received growing attention, mainly due to their hypocholesterolemic properties. Phytosterols influence cholesterol absorption and lower its serum concentration, contributing to the prevention of cardiovascular diseases (Bay, 2019). Moreover, phytosterols may act as cancer chemopreventive and therapeutic agents against breast, colorectal, and cervical cancer (Alvarez-Sala et al. 2019). Therefore, since they are exclusively found in the plant kingdom, the addition of different sources of phytosterols to several food products and dishes may represent an alternative to increase the consumption of these important compounds.

3.1.4 Fatty acids composition

Twenty-four fatty acids were identified and quantified in biquinho pepper flour. The main fatty acids were linoleic (57.66 ± 0.66 g/100 g; C18:2 n6c), palmitic (12.95 ± 0.29 g/100 g; C16:0), and oleic acids (5.71 ± 0.04 g/100 g, C18:1 n9c) (Table 10). Close fatty acid profile was determined by Ananthan, Subhash, and Longvah (2018), who reported linoleic (60.43 g/100 g), palmitic (15.66 g/100 g), and oleic acids (8.22 g/100 g) as predominant in biquinho pepper.

Regarding the different groups of fatty acids, the sum fatty acid levels decreased in the order of polyunsaturated (PUFA, 59.79 g/100 g), saturated (SFA, 17.66 g/100 g), and monounsaturated (MUFA, 9.58 g/100 g). The PUFA/SFA ratio was 3.38. This relation is a relevant parameter to characterize the nutritional value of food; however, each saturated and polyunsaturated fatty acid present different effects on human metabolism (Melo et al., 2019).

The higher level of PUFAs is attributed to the presence of linoleic acid, the most representative fatty acid in the human diet. A recent review showed that data obtained from clinical studies suggest that high dietary intake or tissue levels of linoleic acid contribute to reduce the incidence of cardiovascular diseases. Besides, it may also improve long-term glycemic control and insulin resistance, playing a role in metabolic syndromes like type 2 diabetes (Marangoni et al., 2020).

3.1.5 Contents of total phenolics, flavonoids, carotenoids, and anthocyanins

The results obtained for the total phenolic compounds, flavonoids, carotenoids, and anthocyanins contents of biquinho pepper flour are shown in Table 11. The total phenolic content was 16.03 ± 0.02 mg GAE/g. Lower levels were found in extracts from dried biquinho pepper fruit (from 1.92 to 5.44 mg GAE/g) prepared with different extracting solutions (da Silva Ribeiro et al., 2019).

de Aguiar et al. (2019) evaluated extracts of biquinho pepper obtained using different methods (pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction), temperatures (45, 55, and 65 °C), and percentages of ethanol (50, 75, and 100%), and found values ranging from 8.0 (45°C, 100% ethanol, supercritical fluid extract) to 31.5 mg GAE/g (65°C, 100% ethanol, supercritical fluid extraction followed by pressurized liquid extraction). This variation highlights the great influence of the extraction procedures and conditions, as well as the solvents applied.

Table 11: Total content of phenolics, flavonoids, anthocyanins, and carotenoids of biquinho pepper flour.

Compounds	Contents
Total phenolics (mg GAE/g)	16.03 ± 0.02
Total flavonoids (mg EQ/g)	6.04 ± 0.13
Total carotenoids ($\mu\text{g/g}$)	145.30 ± 0.00
Total anthocyanins (mg/g)	76.06 ± 0.06

Results presented as mean \pm standard deviation, n=3.

The total flavonoids level determined was 6.04 ± 0.13 mg QE/g, which was higher than the one reported by Loizzo et al. (2015) for extracts of biquinho pepper (around 2.5 mg QE/g). On the contrary, Sarpras et al. (2019) assessed the flavonoids content of extracts obtained from biquinho pepper fruit in different stages of maturation and appointed amounts of approximately 40, 48, and 51 mg QE/g for mature, breaker, and immature fruits, respectively.

Regarding carotenoids, biquinho pepper flour showed an amount of 145.30 ± 0.00 $\mu\text{g/g}$. In a previous study, a level of 141.2 $\mu\text{g/g}$ was determined by Olguín-Rojas et al. (2019). Seven genotypes of biquinho pepper presented contents varying from 10 to 12.6 $\mu\text{g/g}$ (Ramírez-Gómez et al., 2016). The studies above described lower values than the one determined in this study; however, higher levels were reported by Gayathri, Gopalakrishnan, and Sekar (2016) (approximately 1200 $\mu\text{g/g}$). Besides their nutritional values, carotenoids are the chemical constituents responsible for the intense red color of this fruit and are mainly present in the mature ones (Menichini et al., 2009).

For anthocyanins, a value of 76.06 ± 0.06 mg/g was determined. Carvalho et al. (2015) analyzed the content of bioactive compounds in *Capsicum* sp. and reported a level of 0.05 mg/g (dry basis) in biquinho pepper fruit. This was the lower content among the species studied. Since violet to black pigmentations are commonly attributed to the presence of anthocyanins, most researches concerning this chemical group focus on other species of peppers (Aza-González & Ochoa-Alejo, 2012).

The plant kingdom is the main source of bioactive compounds such as the ones determined in biquinho pepper. The denomination “bioactive” indicates that the substance may exert positive effects on living organisms, tissues, or cells, playing an important role in human health (Embuscado, 2019). Therefore, besides the culinary attributes of biquinho pepper as an aroma, flavor, and color enhancer, it may also present a remarkable health-promoting potential.

3.2 Fish balls analyses

3.2.1 Moisture and lipids contents

Table 12 presents the moisture and total lipids levels of the fish balls added with biquinho pepper flour (0.5, 0.75, and 1%) and fish meatballs with no addition of antioxidants stored at -18 °C for 60 days. The moisture content determined in the raw samples at day 0 was 70.16 ± 0.36 $\text{g}/100$ g . Regarding all treatments, significant differences in the moisture levels were not observed during the 60 days of storage ($p > 0.05$). Previous studies reported values in the same range for raw fish, with contents ranging from 66.00 to 74.00 $\text{g}/100$ g (Le et al., 2015; Zotos, Gotsis, & Tsolakis, 2016).

Table 12: Moisture and total lipid contents (g/100 g dry basis) of fish balls stored at -18 °C at days 0, 15, 30, 45, and 60 (raw and air-fried samples).

Sample		Moisture		Lipids	
		Raw	Air Fryer	Raw	Air Fryer
Control	0 day	70.16 ± 0.36 ^A	52.85 ± 0.87 ^A	22.90 ± 0.89 ^A	18.06 ± 0.37 ^A
No addition	15 days	70.12 ± 0.37 ^{A;a}	52.5 ± 0.59 ^{A;a}	22.56 ± 0.52 ^{A;a}	18.0 ± 0.29 ^{A;a}
0.5% BP		70.12 ± 0.46 ^{A;a}	52.46 ± 0.59 ^{A;a}	22.35 ± 0.45 ^{A;a}	17.95 ± 0.47 ^{A;a}
0.75% BP		70.14 ± 0.51 ^{A;a}	52.16 ± 0.52 ^{A;a}	22.23 ± 0.82 ^{A;a}	17.91 ± 0.41 ^{A;a}
1% BP		70.16 ± 0.44 ^{A;a}	52.84 ± 0.55 ^{A;a}	22.37 ± 1.00 ^{A;a}	18.13 ± 0.45 ^{A;a}
No addition	30 days	70.09 ± 0.28 ^{A;a}	52.47 ± 0.50 ^{A;a}	22.01 ± 0.67 ^{A;a}	18.01 ± 0.54 ^{A;a}
0.5% BP		70.11 ± 0.26 ^{A;a}	52.44 ± 0.51 ^{A;a}	22.28 ± 0.45 ^{A;a}	17.93 ± 0.48 ^{A;a}
0.75% BP		70.12 ± 0.39 ^{A;a}	52.08 ± 0.24 ^{A;a}	22.01 ± 0.45 ^{A;a}	17.95 ± 0.70 ^{A;a}
1% BP		70.13 ± 0.55 ^{A;a}	52.86 ± 0.36 ^{A;a}	22.79 ± 0.76 ^{A;a}	18.15 ± 0.35 ^{A;a}
No addition	45 days	70.04 ± 0.22 ^{A;a}	52.50 ± 0.56 ^{A;a}	22.16 ± 0.87 ^{A;a}	18.02 ± 0.42 ^{A;a}
0.5% BP		70.10 ± 0.28 ^{A;a}	52.46 ± 0.69 ^{A;a}	22.07 ± 0.41 ^{A;a}	17.97 ± 0.56 ^{A;a}
0.75% BP		70.08 ± 0.38 ^{A;a}	52.07 ± 0.39 ^{A;a}	22.22 ± 0.69 ^{A;a}	17.98 ± 0.39 ^{A;a}
1% BP		70.09 ± 0.30 ^{A;a}	53.52 ± 1.26 ^{A;a}	22.12 ± 0.67 ^{A;a}	18.42 ± 0.19 ^{A;a}
No addition	60 days	70.03 ± 0.30 ^{A;a}	52.78 ± 1.20 ^{A;a}	22.14 ± 0.66 ^{A;a}	18.05 ± 0.43 ^{A;a}
0.5% BP		70.03 ± 0.50 ^{A;a}	52.42 ± 0.90 ^{A;a}	22.17 ± 0.60 ^{A;a}	17.99 ± 0.63 ^{A;a}
0.75% BP		70.03 ± 0.30 ^{A;a}	52.06 ± 1.49 ^{A;a}	22.15 ± 0.84 ^{A;a}	17.94 ± 0.34 ^{A;a}
1% BP		70.04 ± 0.11 ^{A;a}	52.20 ± 1.05 ^{A;a}	22.16 ± 1.07 ^{A;a}	17.92 ± 0.65 ^{A;a}

Results presented as mean ± standard deviation, n=3. Averages with different capital letters in the same column indicate significant differences at storage time ($p < 0.05$). Different lower letters in the same column indicate significant differences among the treatments.

The amount of lipids varied from 22.90 ± 0.89 (day 0) to 22.01 g/100 g (day 30). As observed for moisture, the contents did not show significant differences among samples (containing biquinho pepper flour or not) during storage ($p > 0.05$). These levels were higher than the ones assessed by Le et al. (2015) (13.5 g/100 g) and Zotos et al. (2016) (5.5 g/100 g) in raw sardines. Indeed, the fish composition may be influenced by several factors such as feeding and environmental conditions, age, catching season, location, among others (Bandarra et al., 2018).

For the air-fried samples, the moisture content determined at day 0 was 52.85 ± 0.87 g/100 g, which was equivalent to a loss of 24.67% in comparison with the moisture found in the raw samples. In a study performed by Ferreira et al. (2017), the authors observed a reduction of 20% in sardines after air frying. Similar trends were noticed for the lipid levels, where the content decreased from 22.90 ± 0.89 g/100 g (day 0; raw) to 18.06 ± 0.37 g/100 g (day 0; air fryer), representing a reduction of 21.13%.

Regardless of the storage time and treatment, the moisture and lipids levels in air-fried samples were maintained in the same range ($p > 0.05$). However, the results indicate the effect of heating on samples, since the high temperatures applied during cooking affected the fish musculature leading to the release of water and lipids (Saldanha et al., 2008; Ferreira et al., 2017).

3.4 Fatty acids composition

The main fatty acids found in raw fish ball samples with no addition of biquinho pepper flour at day 0 were: palmitic (C16:0, 28.86 ± 0.4 g/100 g oil), oleic (C18:1n9c, 12.92 ± 0.7 g/100 g oil), palmitoleic (C16:1, 12.35 ± 0.3 g/100 g oil), and eicosapentanoic (EPA, C20:5 n3, 12.22 ± 0.2 g/100 g oil). Other fatty acids such as myristic (C14:0) and stearic acids (C18:0) also presented high levels (Table 13). These findings were close to those obtained by other authors (Benguendouz et al., 2017; Bandarra et al., 2018).

Table 13: Fatty acid composition (g/100 g oil) of fish balls stored at -18 °C at days 0, 15, 30, 45, and 60 (raw and air fried samples).

Raw samples									
Fatty acids	Control	No Addition				0.5% <i>biquinho pepper flour</i>			
		T 15	T 30	T 45	T 60	T 15	T 30	T 45	T 60
C4:0	0.36 ± 0.0 ^A	0.35 ± 0.0 ^{A;a}	0.32 ± 0.0 ^{AB;a}	0.27 ± 0.0 ^{BC;a}	0.23 ± 0.0 ^{C;a}	0.33 ± 0.0 ^{A;a}	0.32 ± 0.0 ^{A;a}	0.32 ± 0.0 ^{A;a}	0.27 ± 0.1 ^{A;a}
C6:0	0.23 ± 0.0 ^A	0.25 ± 0.0 ^{A;a}	0.25 ± 0.0 ^{A;ab}	0.26 ± 0.0 ^{A;a}	0.24 ± 0.0 ^{A;ab}	0.25 ± 0.0 ^{A;a}	0.21 ± 0.0 ^{B;b}	0.16 ± 0.0 ^{C;b}	0.14 ± 0.0 ^{C;c}
C8:0	0.34 ± 0.0 ^A	0.33 ± 0.0 ^{A;a}	0.32 ± 0.0 ^{AB;a}	0.28 ± 0.0 ^{B;a}	0.17 ± 0.0 ^{C;ab}	0.21 ± 0.0 ^{A;b}	0.15 ± 0.0 ^{B;c}	0.24 ± 0 ^{A;b}	0.23 ± 0.0 ^{A;a}
C10:0	0.38 ± 0.0 ^A	0.37 ± 0.0 ^{A;a}	0.39 ± 0.1 ^{A;a}	0.36 ± 0.0 ^{A;ab}	0.35 ± 0.0 ^{A;a}	--	--	0.37 ± 0.0 ^{A;a}	0.17 ± 0.0 ^{B;c}
C12:0	0.28 ± 0.0 ^A	0.27 ± 0.0 ^{AB;a}	0.24 ± 0.0 ^{AB;b}	0.22 ± 0.0 ^{B;a}	0.15 ± 0.0 ^{C;b}	0.25 ± 0.0 ^{A;a}	0.24 ± 0.0 ^{A;b}	0.24 ± 0.0 ^{A;a}	0.27 ± 0.1 ^{A;a}
C14:0	10.67 ± 0.3 ^A	10.51 ± 0.2 ^{A;a}	10.42 ± 0.3 ^{A;a}	8.14 ± 0.2 ^{B;b}	7.27 ± 0.2 ^{C;c}	10.93 ± 0.6 ^{A;a}	10.72 ± 0.3 ^{A;a}	9.38 ± 0.2 ^{B;a}	8.09 ± 0.4 ^{C;b}
C15:0	0.42 ± 0.1 ^A	0.36 ± 0.0 ^{AB;a}	0.26 ± 0.0 ^{B;c}	0.4 ± 0.1 ^{A;ab}	0.4 ± 0.0 ^{A;a}	0.4 ± 0.0 ^{A;a}	0.36 ± 0.0 ^{AB;b}	0.33 ± 0.0 ^{B;b}	0.33 ± 0.0 ^{B;b}
C16:0	28.86 ± 0.4 ^A	27.82 ± 0.4 ^{B;a}	27.57 ± 0.4 ^{B;a}	26.49 ± 0.4 ^{C;b}	26.31 ± 0.4 ^{C;a}	28.41 ± 0.4 ^{A;a}	28.24 ± 0.4 ^{AB;a}	27.14 ± 0.6 ^{BC;ab}	26.07 ± 0.3 ^{C;a}
C16: 1	12.35 ± 0.3 ^A	10.88 ± 0.7 ^{B;a}	10.23 ± 0.2 ^{BC;b}	9.28 ± 0.7 ^{CD;a}	8.33 ± 0.1 ^{D;a}	10.53 ± 0.3 ^{A;a}	10.13 ± 0.3 ^{AB;b}	9.39 ± 0.2 ^{AB;a}	8.98 ± 0.9 ^{B;a}
C17:1	0.43 ± 0.1 ^A	0.43 ± 0.0 ^{A;a}	0.26 ± 0.0 ^{B;b}	0.26 ± 0.0 ^{B;ab}	0.12 ± 0.0 ^{C;b}	0.5 ± 0.1 ^{A;a}	0.21 ± 0.0 ^{B;c}	0.21 ± 0.0 ^{B;b}	0.18 ± 0.0 ^{B;b}
C18:0	5.83 ± 0.2 ^A	5.59 ± 0.1 ^{AB;a}	5.46 ± 0.2 ^{AB;a}	5.16 ± 0.1 ^{AB;a}	4.98 ± 0.5 ^{B;a}	5.41 ± 0.5 ^{A;a}	5.37 ± 0.2 ^{A;a}	5.1 ± 0.4 ^{A;a}	4.53 ± 0.4 ^{A;a}
CI8:1 <i>n9t</i>	--	--	0.6 ± 0.1 ^{A;a}	0.63 ± 0.0 ^{A;a}	0.73 ± 0.1 ^{A;a}	--	0.15 ± 0.0 ^{C;b}	0.37 ± 0.0 ^{B;b}	0.56 ± 0.0 ^{A;b}
C18: 1 <i>n9c</i>	12.92 ± 0.7 ^A	12.24 ± 0.2 ^{AB;a}	11.79 ± 0.3 ^{B;a}	10.44 ± 0.3 ^{C;b}	9.71 ± 0.2 ^{C;b}	12.24 ± 0.6 ^{A;a}	12.06 ± 0.2 ^{A;a}	11.5 ± 0.4 ^{A;a}	9.88 ± 0.2 ^{B;b}
CI8:2 <i>n6c</i>	1.77 ± 0.1 ^A	1.51 ± 0.0 ^{B;a}	1.43 ± 0.0 ^{B;a}	1.21 ± 0.1 ^{C;a}	1.18 ± 0.1 ^{C;b}	1.69 ± 0.2 ^{A;a}	1.51 ± 0.1 ^{A;a}	1.44 ± 0.1 ^{A;a}	1.39 ± 0.0 ^{A;ab}
C20:0	0.12 ± 0.0 ^A	0.15 ± 0.0 ^{A;a}	0.14 ± 0.0 ^{A;a}	0.14 ± 0.0 ^{A;a}	0.12 ± 0.0 ^{A;b}	0.08 ± 0.0 ^{C;b}	0.11 ± 0.01 ^{AB;a}	0.09 ± 0.0 ^{BC;b}	0.13 ± 0.0 ^{A;b}
C18:3 <i>n6</i>	1.64 ± 0.0 ^A	1.53 ± 0.1 ^{AB;b}	1.34 ± 0.0 ^{B;b}	1.39 ± 0.1 ^{B;ab}	1.35 ± 0.1 ^{B;a}	1.56 ± 0.0 ^{A;b}	1.42 ± 0.0 ^{A;b}	1.32 ± 0.0 ^{A;b}	1.36 ± 0.2 ^{A;a}
C20: 1 <i>n9</i>	0.6 ± 0.1 ^A	0.38 ± 0.1 ^{B;b}	0.33 ± 0.0 ^{BC;b}	0.28 ± 0.0 ^{BC;bc}	0.26 ± 0.0 ^{C;b}	0.34 ± 0.0 ^{A;b}	0.33 ± 0.0 ^{A;b}	0.26 ± 0 ^{B;c}	0.23 ± 0.0 ^{B;b}
C18:3 <i>n3</i>	2.86 ± 0.1 ^A	2.64 ± 0.2 ^{A;a}	2.49 ± 0.2 ^{A;ab}	1.91 ± 0.2 ^{B;a}	1.65 ± 0.3 ^{B;a}	2.7 ± 0.1 ^{A;a}	2.58 ± 0.1 ^{A;ab}	2.14 ± 0.1 ^{B;a}	1.99 ± 0.1 ^{B;a}
C21:0	--	--	--	0.53 ± 0.0 ^{A;a}	0.36 ± 0.1 ^{B;bc}	--	--	0.56 ± 0.1 ^{A;a}	0.48 ± 0.0 ^{A;ab}
C20:2 <i>n6</i>	0.73 ± 0.0 ^A	0.74 ± 0.1 ^{A;a}	0.56 ± 0.1 ^{B;a}	0.46 ± 0.0 ^{B;a}	0.43 ± 0.1 ^{B;a}	0.72 ± 0.0 ^{A;a}	0.65 ± 0.0 ^{B;a}	0.47 ± 0.0 ^{C;a}	0.45 ± 0.0 ^{C;a}
C22:0	--	--	--	--	--	--	--	0.12 ± 0.0 ^{B;a}	0.15 ± 0.0 ^{A;b}
C20:3 <i>n6</i>	0.52 ± 0.0 ^A	0.47 ± 0.1 ^{AB;a}	0.46 ± 0.1 ^{AB;ab}	0.4 ± 0.1 ^{AB;a}	0.34 ± 0.1 ^{B;a}	0.5 ± 0.1 ^{A;a}	0.35 ± 0.1 ^{B;b}	0.31 ± 0.0 ^{B;a}	0.27 ± 0.0 ^{B;ab}

C22:1 n9	0.25 ± 0.0 ^A	0.21 ± 0.0 ^{A;a}	0.13 ± 0.0 ^{B;b}	0.12 ± 0.0 ^{B;c}	0.11 ± 0.0 ^{B;b}	0.25 ± 0.0 ^{A;a}	0.11 ± 0.0 ^{BC;b}	0.13 ± 0.0 ^{B;c}	0.08 ± 0.0 ^{C;b}
C20:3 n3	0.42 ± 0.0 ^A	0.42 ± 0.0 ^{A;a}	0.4 ± 0.0 ^{AB;ab}	0.34 ± 0.0 ^{B;b}	0.39 ± 0.1 ^{AB;ab}	0.41 ± 0.0 ^{A;a}	0.41 ± 0.0 ^{A;ab}	0.36 ± 0.0 ^{AB;b}	0.34 ± 0.0 ^{B;b}
C20:4 n6	0.37 ± 0.0 ^A	0.27 ± 0.0 ^{B;a}	0.24 ± 0.0 ^{B;a}	0.17 ± 0.0 ^{C;b}	0.14 ± 0.0 ^{C;b}	0.27 ± 0.0 ^{A;a}	0.28 ± 0.1 ^{A;a}	0.27 ± 0.0 ^{A;a}	0.22 ± 0.0 ^{A;ab}
C20:5 n3	12.22 ± 0.2 ^A	11.36 ± 0.2 ^{B;a}	11.22 ± 0.1 ^{B;a}	10.42 ± 0.2 ^{C;b}	10.27 ± 0.2 ^{C;a}	11.55 ± 0.6 ^{A;a}	11.24 ± 0.2 ^{AB;a}	10.64 ± 0.2 ^{AB;ab}	10.47 ± 0.3 ^{B;a}
C24:1 n9	0.38 ± 0.0 ^A	0.36 ± 0.0 ^{A;a}	0.19 ± 0.0 ^{B;b}	0.14 ± 0.0 ^{B;b}	0.07 ± 0.0 ^{C;c}	0.43 ± 0.1 ^{A;a}	0.25 ± 0.0 ^{B;a}	0.15 ± 0.0 ^{C;b}	0.12 ± 0.0 ^{C;b}
C22:6 n3	3.26 ± 0.2 ^A	2.34 ± 0.1 ^{B;a}	2.04 ± 0.1 ^{C;a}	1.78 ± 0.0 ^{CD;a}	1.66 ± 0.1 ^{D;a}	2.34 ± 0.2 ^{A;a}	2.23 ± 0.2 ^{AB;a}	1.81 ± 0.2 ^{B;a}	1.79 ± 0.2 ^{B;a}
∑SFA	47.5 ± 0.8^A	46 ± 0.4^{AB;a}	45.36 ± 0.1^{B;a}	42.24 ± 0.5^{C;b}	40.74 ± 0.9^{C;b}	46.27 ± 0.5^{A;a}	45.72 ± 0.2^{A;a}	44.06 ± 0.4^{B;a}	40.88 ± 0.6^{C;b}
∑MUFA	26.69 ± 0.4^A	24.29 ± 0.9^{B;a}	23.4 ± 0.1^{B;ab}	21.02 ± 0.8^{C;b}	19.23 ± 0.4^{D;b}	24.03 ± 0.9^{A;a}	23.14 ± 0.4^{AB;b}	21.89 ± 0.6^{BC;ab}	19.95 ± 1.0^{C;b}
∑PUFA	23.8 ± 0.3^A	21.27 ± 0.5^{B;a}	20.19 ± 0.2^{C;b}	18.08 ± 0.4^{D;b}	17.41 ± 0.2^{D;b}	21.73 ± 0.6^{A;a}	20.68 ± 0.2^{B;b}	18.77 ± 0.2^{C;ab}	18.28 ± 0.2^{C;ab}
∑PUFA+MUFA	50.48 ± 0.5^A	45.56 ± 1.2^{B;a}	43.59 ± 0.2^{C;c}	39.11 ± 0.7^{D;c}	36.65 ± 0.2^{E;c}	45.76 ± 1.4^{A;a}	43.81 ± 0.3^{A;bc}	40.66 ± 0.4^{B;b}	38.23 ± 0.9^{C;bc}
∑ω3	18.76 ± 0.3^A	16.76 ± 0.4^{B;a}	16.15 ± 0.3^{B;b}	14.46 ± 0.3^{C;b}	13.97 ± 0.1^{C;b}	17 ± 0.7^{A;a}	16.45 ± 0.2^{A;b}	14.95 ± 0.2^{B;ab}	14.59 ± 0.1^{B;a}
∑ω6	5.03 ± 0.0^A	4.51 ± 0.1^{B;a}	4.03 ± 0.0^{C;c}	3.63 ± 0.2^{D;a}	3.45 ± 0.1^{D;a}	4.73 ± 0.2^{A;a}	4.22 ± 0.0^{B;bc}	3.82 ± 0.1^{BC;a}	3.69 ± 0.2^{C;a}
ω3/ω6	3.73 ± 0.1^A	3.72 ± 0.1^{A;a}	4 ± 0.1^{A;a}	4 ± 0.2^{A;a}	4.05 ± 0.1^{A;a}	3.6 ± 0.2^{A;a}	3.89 ± 0.0^{A;a}	3.92 ± 0.2^{A;a}	3.96 ± 0.3^{A;a}
∑Trans	--	--	0.6 ± 0.1^{A;a}	0.63 ± 0.0^{A;a}	0.73 ± 0.1^{A;a}	--	0.15 ± 0.0^{C;b}	0.37 ± 0.0^{B;b}	0.56 ± 0.0^{A;b}
∑EPA+DHA	15.48 ± 0.3^A	13.7 ± 0.2^{B;a}	13.26 ± 0.1^{B;b}	12.2 ± 0.1^{C;b}	11.93 ± 0.2^{C;b}	13.89 ± 0.7^{A;a}	13.47 ± 0.2^{AB;ab}	12.45 ± 0.3^{BC;ab}	12.26 ± 0.2^{C;ab}
Fatty acids	Control	T 15	T 30	T 45	T 60	T 15	T 30	T 45	T 60
		0.75% biquinho pepper flour				1 % biquinho pepper flour			
C4:0	0.36 ± 0.0 ^A	0.36 ± 0.0 ^{A;a}	0.33 ± 0.0 ^{A;a}	0.26 ± 0.1 ^{A;a}	0.26 ± 0.1 ^{A;a}	0.33 ± 0.0 ^{AB;a}	0.35 ± 0.0 ^{A;a}	0.26 ± 0.0 ^{B;a}	0.26 ± 0.0 ^{B;a}
C6:0	0.23 ± 0.0 ^A	0.22 ± 0.0 ^{A;a}	0.28 ± 0.0 ^{A;a}	0.33 ± 0.1 ^{A;a}	0.32 ± 0.1 ^{A;a}	0.26 ± 0.0 ^{A;a}	0.25 ± 0.0 ^{A;ab}	0.25 ± 0.0 ^{A;a}	0.17 ± 0.0 ^{B;bc}
C8:0	0.34 ± 0.0 ^A	0.24 ± 0.1 ^{A;b}	0.22 ± 0.0 ^{AB;b}	0.27 ± 0.0 ^{A;a}	0.16 ± 0.0 ^{B;ab}	0.16 ± 0.0 ^{A;b}	0.14 ± 0.0 ^{A;c}	0.15 ± 0.0 ^{A;c}	0.14 ± 0.0 ^{A;b}
C10:0	0.38 ± 0.0 ^A	0.31 ± 0.0 ^{A;b}	--	0.36 ± 0.1 ^{A;ab}	0.37 ± 0.0 ^{A;a}	0.34 ± 0.0 ^{A;ab}	--	0.3 ± 0.0 ^{A;b}	0.27 ± 0.0 ^{A;b}
C12:0	0.28 ± 0.0 ^A	0.24 ± 0.0 ^{AB;a}	0.28 ± 0.0 ^{A;a}	0.23 ± 0.0 ^{B;a}	0.23 ± 0.0 ^{B;a}	0.26 ± 0.0 ^{A;a}	0.25 ± 0.0 ^{A;b}	0.25 ± 0.0 ^{A;a}	0.19 ± 0.0 ^{B;ab}
C14:0	10.67 ± 0.3 ^A	10.54 ± 0.6 ^{A;a}	10.47 ± 0.2 ^{A;a}	9.88 ± 0.2 ^{A;a}	8.43 ± 0.2 ^{B;b}	10.74 ± 0.9 ^{A;a}	10.52 ± 0.4 ^{A;a}	10.16 ± 0.7 ^{A;a}	9.48 ± 0.4 ^{A;a}
C15:0	0.42 ± 0.1 ^A	0.44 ± 0.0 ^{A;a}	0.35 ± 0.0 ^{B;b}	0.33 ± 0.0 ^{B;b}	0.4 ± 0.0 ^{AB;a}	0.44 ± 0.0 ^{A;a}	0.44 ± 0.0 ^{A;a}	0.45 ± 0.0 ^{A;a}	0.45 ± 0.0 ^{A;a}
C16:0	28.86 ± 0.4 ^A	28.58 ± 0.4 ^{A;a}	28.16 ± 0.4 ^{A;a}	27.53 ± 0.4 ^{AB;ab}	26.54 ± 0.4 ^{B;a}	28.75 ± 0.5 ^{A;a}	28.48 ± 0.4 ^{A;a}	27.94 ± 0.5 ^{A;a}	26.42 ± 0.3 ^{B;a}
C16:1	12.35 ± 0.3 ^A	10.93 ± 1.2 ^{A;a}	10.72 ± 0.3 ^{A;ab}	9.95 ± 0.2 ^{AB;a}	9.16 ± 0.3 ^{B;a}	11.3 ± 0.5 ^{A;a}	10.94 ± 0.2 ^{A;a}	9.89 ± 0.4 ^{B;a}	9.2 ± 0.3 ^{B;a}
C17:1	0.43 ± 0.1 ^A	0.44 ± 0.1 ^{A;a}	0.39 ± 0.0 ^{A;a}	0.22 ± 0.0 ^{B;b}	0.18 ± 0.0 ^{B;b}	0.58 ± 0.2 ^{A;a}	0.41 ± 0.0 ^{AB;a}	0.29 ± 0.0 ^{B;a}	0.33 ± 0.0 ^{B;a}

C18:0	5.83 ± 0.2 ^A	5.72 ± 0.15 ^{A;a}	5.46 ± 0.4 ^{AB;a}	5.21 ± 0.2 ^{AB;a}	4.91 ± 0.9 ^{B;a}	5.78 ± 0.3 ^{A;a}	5.51 ± 0.3 ^{AB;a}	5.31 ± 0.2 ^{AB;a}	5.12 ± 0.1 ^{B;a}
C18:1 n9t	--	--	--	0.37 ± 0.0 ^{B;b}	0.68 ± 0.0 ^{A;ab}	--	--	0.35 ± 0.0 ^{B;b}	0.59 ± 0.0 ^{A;b}
C18:1 n9c	12.92 ± 0.7 ^A	12.73 ± 0.1 ^{A;a}	12.34 ± 0.3 ^{A;a}	11.5 ± 0.2 ^{B;a}	9.98 ± 0.3 ^{C;b}	12.5 ± 0.3 ^{A;a}	12.34 ± 0.4 ^{AB;a}	11.64 ± 0.23 ^{BC;a}	11.3 ± 0.2 ^{C;a}
C18:2 n6c	1.77 ± 0.1 ^A	1.54 ± 0.0 ^{A;a}	1.53 ± 0.1 ^{A;a}	1.35 ± 0.27 ^{A;a}	1.46 ± 0.1 ^{A;a}	1.54 ± 0.0 ^{AB;a}	1.61 ± 0.2 ^{A;a}	1.35 ± 0.1 ^{AB;a}	1.22 ± 0.1 ^{B;ab}
C20:0	0.12 ± 0.0 ^A	0.03 ± 0.0 ^{B;b}	--	0.09 ± 0 ^{B;b}	0.26 ± 0.1 ^{A;a}	--	--	--	--
C18:3 n6	1.64 ± 0.0 ^A	1.59 ± 0.0 ^{A;ab}	1.54 ± 0.0 ^{A;b}	1.42 ± 0.1 ^{A;ab}	1.58 ± 0.2 ^{A;a}	1.93 ± 0.1 ^{A;a}	1.78 ± 0.2 ^{A;a}	1.71 ± 0.2 ^{A;a}	1.53 ± 0.2 ^{A;a}
C20:1 n9	0.6 ± 0.1 ^A	0.56 ± 0.0 ^{A;a}	0.44 ± 0.0 ^{B;a}	0.44 ± 0.0 ^{B;a}	0.38 ± 0.0 ^{B;a}	0.42 ± 0.0 ^{A;b}	0.41 ± 0.1 ^{A;ab}	0.38 ± 0.1 ^{A;ab}	0.28 ± 0.0 ^{A;b}
C18:3 n3	2.86 ± 0.1 ^A	2.66 ± 0.1 ^{A;a}	2.29 ± 0.3 ^{AB;b}	1.86 ± 0.5 ^{AB;a}	1.57 ± 0.2 ^{B;a}	2.74 ± 0.3 ^{A;a}	2.73 ± 0.1 ^{A;a}	1.9 ± 0.1 ^{B;a}	1.61 ± 0.2 ^{B;a}
C21:0	--	--	--	0.27 ± 0.1 ^{B;b}	0.66 ± 0.1 ^{A;a}	--	--	0.37 ± 0.0 ^{A;b}	0.27 ± 0.0 ^{B;c}
C20:2 n6	0.73 ± 0.0 ^A	0.68 ± 0.0 ^{A;a}	0.57 ± 0.1 ^{A;a}	0.55 ± 0.1 ^{A;a}	0.47 ± 0.0 ^{A;a}	0.74 ± 0.0 ^{A;a}	0.71 ± 0.1 ^{A;a}	0.56 ± 0.1 ^{A;a}	0.5 ± 0.1 ^{A;a}
C22:0	--	--	--	0.08 ± 0.0 ^{B;b}	0.15 ± 0.0 ^{A;b}	--	--	--	--
C20:3 n6	0.52 ± 0.0 ^A	0.56 ± 0.1 ^{A;a}	0.51 ± 0.1 ^{AB;a}	0.38 ± 0.1 ^{B;a}	0.1 ± 0.0 ^{C;c}	0.39 ± 0.0 ^{A;a}	0.17 ± 0.0 ^{B;c}	0.17 ± 0.0 ^{B;b}	0.19 ± 0.0 ^{B;b}
C22:1 n9	0.25 ± 0.0 ^A	0.22 ± 0.0 ^{A;a}	0.2 ± 0.1 ^{A;a}	0.23 ± 0.0 ^{A;a}	0.22 ± 0.0 ^{A;a}	0.28 ± 0.1 ^{A;a}	0.13 ± 0.0 ^{B;b}	0.19 ± 0.0 ^{AB;b}	0.2 ± 0.0 ^{AB;a}
C20:3 n3	0.42 ± 0.0 ^A	0.43 ± 0.0 ^{A;a}	0.39 ± 0.1 ^{A;b}	0.35 ± 0.0 ^{AB;b}	0.31 ± 0.0 ^{B;b}	0.41 ± 0.0 ^{A;a}	0.5 ± 0.7 ^{A;a}	0.51 ± 0.0 ^{A;a}	0.44 ± 0.0 ^{A;a}
C20:4 n6	0.37 ± 0.0 ^A	0.26 ± 0.1 ^{A;a}	0.22 ± 0.1 ^{A;a}	0.25 ± 0.0 ^{A;a}	0.16 ± 0.0 ^{A;b}	0.38 ± 0.0 ^{A;a}	0.24 ± 0.0 ^{B;a}	0.23 ± 0.0 ^{B;ab}	0.28 ± 0.1 ^{AB;a}
C20:5 n3	12.22 ± 0.2 ^A	11.86 ± 0.2 ^{A;a}	11.43 ± 0.5 ^{AB;a}	10.64 ± 0.4 ^{B;ab}	10.59 ± 0.2 ^{B;a}	12.12 ± 0.8 ^{A;a}	11.84 ± 0.6 ^{A;a}	11.27 ± 0.3 ^{A;a}	10.94 ± 0.4 ^{A;a}
C24:1 n9	0.38 ± 0.0 ^A	0.32 ± 0.1 ^{A;a}	--	0.16 ± 0.0 ^{B;b}	0.16 ± 0.0 ^{B;a}	0.38 ± 0.0 ^{A;a}	--	0.28 ± 0.0 ^{B;a}	0.17 ± 0.0 ^{C;a}
C22:6 n3	3.26 ± 0.2 ^A	2.3 ± 0.3 ^{A;a}	2.32 ± 0.3 ^{A;a}	2.11 ± 0.7 ^{A;a}	1.92 ± 0.2 ^{A;a}	2.28 ± 0.2 ^{A;a}	2.25 ± 0.3 ^{A;a}	1.85 ± 0.3 ^{A;a}	1.87 ± 0.2 ^{A;a}
ΣSFA	47.5 ± 0.8^A	46.67 ± 0.2^{A;a}	45.56 ± 0.7^{A;a}	44.85 ± 0.8^{A;a}	42.68 ± 0.5^{B;a}	47.08 ± 0.9^{A;a}	45.92 ± 0.97^{A;a}	45.44 ± 0.4^{A;a}	42.76 ± 0.4^{B;a}
ΣMUFA	26.69 ± 0.4^A	24.98 ± 1.4^{A;a}	23.88 ± 0.2^{AB;a}	22.65 ± 0.4^{B;a}	20.55 ± 0.2^{C;ab}	25.19 ± 0.5^{A;a}	24.1 ± 0.33^{A;a}	22.84 ± 0.5^{B;a}	21.87 ± 0.1^{B;a}
ΣPUFA	23.8 ± 0.3^A	21.9 ± 0.4^{A;a}	20.79 ± 0.3^{A;b}	18.92 ± 0.7^{B;ab}	18.17 ± 0.5^{B;ab}	22.52 ± 1.7^{A;a}	21.82 ± 0.3^{A;a}	19.56 ± 0.6^{B;a}	18.56 ± 0.6^{B;a}
ΣPUFA+MUFA	50.48 ± 0.5^A	46.88 ± 1.0^{A;a}	44.67 ± 0.5^{B;b}	41.57 ± 0.4^{C;ab}	38.71 ± 0.6^{D;b}	47.72 ± 1.1^{A;a}	45.92 ± 0.4^{A;a}	42.4 ± 0.6^{B;a}	40.43 ± 0.5^{C;a}
Σω3	18.76 ± 0.3^A	17.26 ± 0.5^{A;a}	16.42 ± 0.2^{A;b}	14.97 ± 0.4^{B;ab}	14.4 ± 0.2^{B;ab}	17.56 ± 1.3^{A;a}	17.33 ± 0.4^{A;a}	15.54 ± 0.3^{B;a}	14.85 ± 0.3^{B;a}
Σω6	5.03 ± 0.0^A	4.64 ± 0.1^{A;a}	4.37 ± 0.1^{AB;ab}	3.95 ± 0.3^{AB;a}	3.77 ± 0.4^{B;a}	4.97 ± 0.3^{A;a}	4.49 ± 0.1^{AB;a}	4.03 ± 0.3^{BC;a}	3.71 ± 0.3^{C;a}
ω3/ω6	3.73 ± 0.1^A	3.71 ± 0.2^{A;a}	3.76 ± 0.1^{A;a}	3.79 ± 0.2^{A;a}	3.83 ± 0.3^{A;a}	3.53 ± 0.0^{A;a}	3.86 ± 0.2^{A;a}	3.87 ± 0.2^{A;a}	4.02 ± 0.3^{A;a}
ΣTrans	--	--	--	0.37 ± 0.0^{B;b}	0.68 ± 0.0^{A;ab}	--	--	0.35 ± 0.0^{B;b}	0.59 ± 0.1^{A;b}
ΣEPA+DHA	15.48 ± 0.3^A	14.15 ± 0.53^{A;a}	13.75 ± 0.4^{AB;ab}	12.75 ± 0.5^{BC;ab}	12.51 ± 0.0^{C;ab}	14.4 ± 1.0^{A;a}	14.09 ± 0.3^{AB;a}	13.13 ± 0.4^{AB;a}	12.81 ± 0.4^{B;a}

Air-fried samples

Fatty acids	Control	No Addition				0.5% <i>biquinho</i> pepper flour			
		T 15	T 30	T 45	T 60	T 15	T 30	T 45	T 60
C4:0	0.17 ± 0.0 ^A	0.17 ± 0.0 ^{A;a}	0.15 ± 0.0 ^{A;c}	0.17 ± 0.0 ^{A;a}	0.16 ± 0.0 ^{A;a}	0.16 ± 0.0 ^{A;a}	0.17 ± 0.0 ^{A;bc}	0.18 ± 0.0 ^{A;a}	0.18 ± 0.0 ^{A;a}
C6:0	0.15 ± 0.0 ^A	0.13 ± 0.0 ^{A;b}	0.14 ± 0.0 ^{A;b}	0.14 ± 0.0 ^{A;b}	0.13 ± 0.0 ^{A;b}	0.14 ± 0.0 ^{A;ab}	0.17 ± 0.0 ^{A;b}	0.16 ± 0.0 ^{A;b}	0.14 ± 0.0 ^{A;b}
C8:0	0.13 ± 0.0 ^A	0.14 ± 0.0 ^{A;a}	0.13 ± 0.0 ^{A;b}	0.13 ± 0.0 ^{A;b}	0.11 ± 0.0 ^{A;b}	0.14 ± 0.0 ^{AB;a}	0.17 ± 0.0 ^{A;b}	0.16 ± 0.0 ^{AB;b}	0.12 ± 0.0 ^{B;b}
C10:0	0.37 ± 0.0 ^A	0.35 ± 0.0 ^{AB;a}	0.33 ± 0.0 ^{AB;a}	0.35 ± 0.0 ^{AB;a}	0.31 ± 0.0 ^{B;a}	--	--	0.27 ± 0.0 ^{A;b}	0.21 ± 0.0 ^{A;b}
C12:0	0.24 ± 0.0 ^A	0.24 ± 0.0 ^{A;a}	0.24 ± 0.1 ^{A;a}	0.24 ± 0.0 ^{A;a}	0.18 ± 0.0 ^{B;a}	0.15 ± 0.0 ^{A;b}	0.13 ± 0.0 ^{B;b}	0.12 ± 0.0 ^{BC;c}	0.1 ± 0.0 ^{C;b}
C14:0	8.33 ± 0.4 ^A	7.32 ± 0.3 ^{B;b}	7.2 ± 0.2 ^{B;b}	6.63 ± 0.5 ^{B;b}	5.67 ± 0.2 ^{C;b}	8.8 ± 0.0 ^{A;a}	8.62 ± 0.2 ^{A;a}	7.58 ± 0.5 ^{B;ab}	7.17 ± 0.5 ^{B;a}
C15:0	0.35 ± 0.0 ^A	0.36 ± 0.0 ^{AB;a}	0.35 ± 0.0 ^{B;a}	0.25 ± 0.0 ^{C;c}	0.41 ± 0.0 ^{A;a}	0.37 ± 0.0 ^{A;a}	0.36 ± 0.0 ^{A;a}	0.35 ± 0.0 ^{A;b}	0.33 ± 0.0 ^{A;b}
C16:0	27.62 ± 0.6 ^A	26.44 ± 0.1 ^{AB;b}	26.33 ± 0.1 ^{ABC;c}	25.83 ± 0.5 ^{BC;b}	24.94 ± 1.0 ^{C;a}	27.66 ± 0.2 ^{A;a}	27.57 ± 0.2 ^{A;a}	26.7 ± 0.3 ^{B;a}	25.5 ± 0.3 ^{C;a}
C16: 1	10.68 ± 0.3 ^A	9.47 ± 0.9 ^{AB;a}	9.42 ± 0.5 ^{AB;a}	8.6 ± 0.3 ^{B;a}	8.22 ± 0.2 ^{B;a}	10.52 ± 0.1 ^{A;a}	9.51 ± 0.9 ^{AB;a}	8.61 ± 1.0 ^{B;a}	8.22 ± 0.1 ^{B;a}
C17:1	0.17 ± 0.0 ^A	0.12 ± 0.0 ^{AB;c}	0.14 ± 0.0 ^{A;c}	0.1 ± 0.0 ^{BC;c}	0.14 ± 0.0 ^{A;b}	0.2 ± 0.0 ^{B;bc}	0.16 ± 0.0 ^{B;bc}	0.15 ± 0.0 ^{B;bc}	0.39 ± 0.1 ^{A;a}
C18:0	4.8 ± 0.1 ^A	4.53 ± 0.1 ^{AB;b}	4.44 ± 0.3 ^{AB;a}	4.15 ± 0.1 ^{BC;a}	4.03 ± 0.0 ^{C;b}	4.72 ± 0.1 ^{A;ab}	4.4 ± 0.1 ^{B;a}	4.16 ± 0.0 ^{C;a}	4.05 ± 0.0 ^{C;b}
C18:1 n9t	--	0.55 ± 0.0 ^B	0.65 ± 0.0 ^{B;a}	0.88 ± 0.2 ^{A;a}	0.77 ± 0.1 ^{AB;a}	--	0.16 ± 0.0 ^{C;c}	0.61 ± 0.1 ^{B;b}	0.76 ± 0.0 ^{A;a}
C18: 1 n9c	11.58 ± 0.3 ^A	8.54 ± 0.4 ^{B;b}	8.3 ± 1.1 ^{B;a}	7.82 ± 0.1 ^{B;a}	7.54 ± 0.2 ^{B;a}	8.09 ± 0.1 ^{AB;b}	8.76 ± 0.1 ^{A;a}	8.14 ± 0.6 ^{AB;a}	7.5 ± 0.2 ^{B;a}
C18:2 n6c	1.45 ± 0.0 ^A	1.12 ± 0.1 ^{B;a}	1.02 ± 0.1 ^{BC;b}	0.89 ± 0.1 ^{CD;a}	0.79 ± 0.0 ^{D;b}	1.33 ± 0.2 ^{A;a}	1.12 ± 0.1 ^{AB;ab}	1.04 ± 0.1 ^{B;a}	0.93 ± 0.1 ^{B;ab}
C20:0	--	--	--	--	--	--	--	--	--
C18:3 n6	1.18 ± 0.1 ^A	0.73 ± 0.2 ^{B;b}	0.7 ± 0.1 ^{B;b}	0.61 ± 0.1 ^{B;b}	0.57 ± 0.1 ^{B;b}	1.15 ± 0.1 ^{AB;a}	1.37 ± 0.1 ^{A;a}	1.08 ± 0.1 ^{BC;a}	0.86 ± 0.1 ^{C;ab}
C20: 1 n9	0.45 ± 0.0 ^A	0.35 ± 0.1 ^{B;a}	0.36 ± 0.0 ^{B;ab}	0.34 ± 0.0 ^{B;a}	0.34 ± 0.0 ^{B;a}	0.37 ± 0.1 ^{A;a}	0.4 ± 0.1 ^{A;a}	0.32 ± 0.1 ^{A;a}	0.35 ± 0.1 ^{A;a}
C18:3 n3	1.66 ± 0.2 ^A	1.08 ± 0.1 ^{B;b}	0.88 ± 0.1 ^{BC;b}	0.79 ± 0.1 ^{BC;b}	0.71 ± 0.1 ^{C;b}	1.43 ± 0.0 ^{A;a}	1.55 ± 0.1 ^{A;a}	1.03 ± 0.2 ^{B;ab}	0.93 ± 0.2 ^{B;ab}
C21:0	--	--	0.49 ± 0.1 ^B	1.8 ± 0.1 ^{A;a}	1.73 ± 0.1 ^{A;a}	--	--	0.32 ± 0.0 ^{A;b}	0.34 ± 0.0 ^{A;b}
C20:2 n6	0.51 ± 0.0 ^A	0.46 ± 0.0 ^{AB;b}	0.42 ± 0.1 ^{B;c}	0.41 ± 0.0 ^{B;ab}	0.39 ± 0.0 ^{B;a}	0.43 ± 0.0 ^{A;b}	0.39 ± 0.0 ^{A;c}	0.37 ± 0.0 ^{A;b}	0.36 ± 0.0 ^{A;a}
C22:0	--	--	--	0.13 ± 0.0 ^{A;b}	0.14 ± 0.0 ^{A;a}	--	--	0.14 ± 0.0 ^{A;b}	0.14 ± 0.0 ^{A;a}
C20:3 n6	0.17 ± 0.0 ^A	0.18 ± 0.0 ^{A;a}	0.13 ± 0.0 ^{AB;a}	0.12 ± 0.0 ^{B;a}	0.08 ± 0.0 ^{B;a}	0.15 ± 0.0 ^{A;a}	0.11 ± 0.0 ^{A;ab}	0.11 ± 0.0 ^{A;a}	0.1 ± 0.1 ^{A;a}
C22:1 n9	0.19 ± 0.0 ^A	0.16 ± 0.0 ^A	0.16 ± 0.0 ^A	0.16 ± 0.0 ^A	0.16 ± 0.0 ^{A;a}	0.24 ± 0.0 ^{A;a}	0.32 ± 0.1 ^{A;a}	0.13 ± 0.0 ^{B;a}	0.07 ± 0.0 ^{B;c}
C20:3 n3	0.32 ± 0.0 ^A	0.27 ± 0.0 ^{A;b}	0.27 ± 0.0 ^{A;a}	0.27 ± 0.0 ^{A;b}	0.34 ± 0.0 ^{A;a}	0.3 ± 0.0 ^{A;b}	0.27 ± 0.0 ^{A;a}	0.18 ± 0.0 ^{B;c}	0.16 ± 0.0 ^{B;c}

C20:4 n6	0.2 ± 0.0 ^A	0.16 ± 0.0 ^{B;b}	0.24 ± 0.0 ^{A;a}	0.14 ± 0.0 ^{B;c}	0.14 ± 0.0 ^{B;bc}	0.33 ± 0.1 ^{A;a}	0.15 ± 0.0 ^{B;b}	0.24 ± 0.0 ^{AB;b}	0.23 ± 0.0 ^{AB;b}
C20:5 n3	9.56 ± 0.2 ^A	8.52 ± 0.1 ^{AB;b}	8.04 ± 0.6 ^{BC;a}	7.49 ± 0.5 ^{BC;a}	7.26 ± 0.7 ^{C;a}	8.41 ± 0.2 ^{A;b}	7.76 ± 0.2 ^{AB;a}	7.29 ± 0.4 ^{B;a}	7.25 ± 0.2 ^{B;a}
C24:1 n9	--	--	--	--	--	--	--	--	--
C22:6 n3	1.78 ± 0.1 ^A	1.28 ± 0.0 ^{B;b}	1.04 ± 0.2 ^{BC;b}	0.88 ± 0.1 ^{C;c}	0.91 ± 0.1 ^{C;b}	1.43 ± 0.2 ^{A;b}	1.36 ± 0.1 ^{A;ab}	1.08 ± 0.1 ^{AB;bc}	0.93 ± 0.2 ^{B;b}
∑SFA	42.17 ± 0.6^A	39.68 ± 0.3^{B;b}	39.8 ± 0.3^{B;b}	39.81 ± 0.7^{B;a}	37.81 ± 1.1^{C;a}	42.14 ± 0.3^{A;a}	41.58 ± 0.2^{A;a}	40.13 ± 0.7^{B;a}	38.3 ± 0.8^{C;a}
∑MUFA	22.96 ± 0.1^A	19.03 ± 0.7^{B;b}	18.87 ± 1.6^{B;a}	17.75 ± 0.2^{B;a}	17.01 ± 0.4^{B;a}	19.17 ± 0.1^{A;ab}	18.99 ± 1.0^{A;a}	17.83 ± 1.1^{A;a}	17.22 ± 0.3^{A;a}
∑PUFA	16.85 ± 0.1^A	13.79 ± 0.1^{B;c}	12.73 ± 0.5^{B;c}	11.6 ± 0.4^{C;c}	11.16 ± 0.7^{C;b}	14.96 ± 0.4^{A;b}	14.07 ± 0.2^{A;b}	12.42 ± 0.6^{B;bc}	11.76 ± 0.5^{B;b}
∑PUFA+MUFA	39.81 ± 0.1^A	32.81 ± 0.7^{B;c}	31.6 ± 1.5^{B;b}	29.35 ± 0.6^{C;b}	28.17 ± 0.4^{C;c}	34.13 ± 0.4^{A;bc}	33.05 ± 1.1^{A;ab}	30.25 ± 1.0^{B;ab}	28.98 ± 0.5^{B;bc}
∑ω3	13.33 ± 0.0^A	11.15 ± 0.1^{B;c}	10.23 ± 0.5^{BC;c}	9.42 ± 0.5^{C;b}	9.21 ± 0.7^{C;b}	11.57 ± 0.3^{A;bc}	10.94 ± 0.3^{A;bc}	9.58 ± 0.6^{B;b}	9.27 ± 0.5^{B;b}
∑ω6	3.52 ± 0.1^A	2.64 ± 0.2^{B;b}	2.5 ± 0.1^{B;b}	2.18 ± 0.1^{C;b}	1.95 ± 0.1^{C;b}	3.39 ± 0.2^{A;a}	3.13 ± 0.2^{AB;a}	2.83 ± 0.1^{BC;a}	2.49 ± 0.2^{C;ab}
ω3/ω6	3.79 ± 0.1^B	4.24 ± 0.3^{AB;a}	4.1 ± 0.3^{AB;a}	4.33 ± 0.4^{AB;a}	4.73 ± 0.4^{A;a}	3.42 ± 0.2^{A;b}	3.5 ± 0.3^{A;a}	3.39 ± 0.3^{A;b}	3.75 ± 0.4^{A;ab}
∑Trans	--	0.55 ± 0.0^B	0.65 ± 0.0^{B;a}	0.88 ± 0.2^{A;a}	0.77 ± 0.1^{AB;a}	--	0.16 ± 0.0^{C;c}	0.61 ± 0.1^{B;b}	0.76 ± 0.0^{A;a}
∑EPA+DHA	11.35 ± 0.2^A	9.8 ± 0.2^{B;b}	9.08 ± 0.5^{BC;b}	8.37 ± 0.6^{C;a}	8.17 ± 0.7^{C;a}	9.84 ± 0.4^{A;b}	9.11 ± 0.3^{AB;b}	8.37 ± 0.4^{B;a}	8.18 ± 0.4^{B;a}

Fatty acids	Control	0.75% <i>biquinho</i> pepper flour				1 % <i>biquinho</i> pepper flour			
		T 15	T 30	T 45	T 60	T 15	T 30	T 45	T 60
C4:0	0.17 ± 0.0 ^A	0.21 ± 0.0 ^{A;a}	0.2 ± 0.0 ^{A;ab}	0.19 ± 0.0 ^{AB;a}	0.15 ± 0.0 ^{B;a}	0.16 ± 0.1 ^{A;a}	0.23 ± 0.0 ^{A;a}	0.15 ± 0.0 ^{A;a}	0.16 ± 0.0 ^{A;a}
C6:0	0.15 ± 0.0 ^A	0.16 ± 0.0 ^{A;ab}	0.19 ± 0.0 ^{A;b}	0.21 ± 0.0 ^{A;a}	0.21 ± 0.0 ^{A;a}	0.17 ± 0.0 ^{B;a}	0.35 ± 0.0 ^{A;a}	0.14 ± 0.0 ^{B;b}	0.15 ± 0.0 ^{B;b}
C8:0	0.13 ± 0.0 ^A	0.15 ± 0.0 ^{B;a}	0.23 ± 0.0 ^{A;a}	0.2 ± 0.0 ^{AB;a}	0.17 ± 0.0 ^{B;a}	0.18 ± 0.0 ^{A;a}	0.15 ± 0.0 ^{A;b}	0.15 ± 0.0 ^{A;b}	0.1 ± 0.0 ^{B;b}
C10:0	0.37 ± 0.0 ^A	--	--	0.24 ± 0.0 ^{B;b}	0.37 ± 0.0 ^{A;a}	--	--	0.35 ± 0.0 ^{A;a}	0.24 ± 0.0 ^{B;b}
C12:0	0.24 ± 0.0 ^A	0.25 ± 0.0 ^{A;a}	0.24 ± 0.0 ^{A;a}	0.21 ± 0.0 ^{A;b}	0.21 ± 0.0 ^{A;a}	0.17 ± 0.0 ^{C;b}	0.27 ± 0.0 ^{A;a}	0.23 ± 0.0 ^{AB;a}	0.2 ± 0.0 ^{BC;a}
C14:0	8.33 ± 0.4 ^A	8.83 ± 0.1 ^{A;a}	8.35 ± 0.1 ^{AB;a}	7.86 ± 0.1 ^{BC;a}	7.41 ± 0.5 ^{C;a}	8.66 ± 0.1 ^{A;a}	8.26 ± 0.0 ^{B;a}	7.57 ± 0.3 ^{C;ab}	6.94 ± 0.0 ^{D;a}
C15:0	0.35 ± 0.0 ^A	0.26 ± 0.0 ^{A;b}	0.3 ± 0.1 ^{A;a}	0.25 ± 0.0 ^{A;c}	0.23 ± 0.0 ^{A;c}	0.27 ± 0.1 ^{B;b}	0.34 ± 0.0 ^{AB;a}	0.42 ± 0.0 ^{A;a}	0.41 ± 0.0 ^{A;a}
C16:0	27.62 ± 0.6 ^A	27.59 ± 0.5 ^{A;a}	27.25 ± 0.0 ^{A;b}	26.38 ± 0.3 ^{B;ab}	25.66 ± 0.3 ^{B;a}	27.59 ± 0.1 ^{A;a}	27.33 ± 0.0 ^{B;ab}	26.63 ± 0.1 ^{C;ab}	26.18 ± 0.1 ^{D;a}
C16: 1	10.68 ± 0.3 ^A	10.57 ± 0.5 ^{A;a}	9.95 ± 0.6 ^{A;a}	8.6 ± 0.6 ^{B;a}	8.32 ± 0.2 ^{B;a}	10.69 ± 0.7 ^{A;a}	9.35 ± 0.1 ^{B;a}	8.84 ± 0.6 ^{B;a}	8.48 ± 0.4 ^{B;a}
C17:1	0.17 ± 0.0 ^A	0.21 ± 0.0 ^{A;b}	0.21 ± 0.0 ^{A;b}	0.19 ± 0.0 ^{A;b}	0.18 ± 0.0 ^{A;b}	0.45 ± 0.1 ^{A;a}	0.45 ± 0.0 ^{A;a}	0.35 ± 0.1 ^{AB;a}	0.32 ± 0.0 ^{B;a}
C18:0	4.8 ± 0.1 ^A	4.7 ± 0.2 ^{A;ab}	4.66 ± 0.1 ^{A;a}	4.26 ± 0.1 ^{B;a}	4.04 ± 0.0 ^{B;b}	4.87 ± 0.1 ^{A;a}	4.57 ± 0.2 ^{AB;a}	4.35 ± 0.1 ^{BC;a}	4.16 ± 0.1 ^{C;a}
C18:1 n9t	--	--	0.32 ± 0.0 ^{B;b}	0.68 ± 0.0 ^{A;ab}	0.8 ± 0.1 ^{A;a}	--	0.12 ± 0.0 ^{C;c}	0.57 ± 0.1 ^{B;b}	0.77 ± 0.0 ^{A;a}
C18: 1 n9c	11.58 ± 0.3 ^A	8.71 ± 0.3 ^{A;ab}	8.51 ± 0.4 ^{A;a}	7.93 ± 0.1 ^{A;a}	7.84 ± 0.7 ^{A;a}	9.45 ± 0.3 ^{A;a}	9.17 ± 0.1 ^{A;a}	7.71 ± 0.3 ^{B;a}	7.32 ± 0.3 ^{B;a}

C18:2 n6c	1.45 ± 0.0 ^A	1.29 ± 0.0 ^{A;a}	1.2 ± 0.1 ^{AB;a}	1 ± 0.2 ^{AB;a}	0.94 ± 0.2 ^{B;ab}	1.27 ± 0.0 ^{A;a}	1.05 ± 0.0 ^{A;b}	1.1 ± 0.3 ^{A;a}	1.14 ± 0.2 ^{A;a}
C20:0	--	--	--	--	--	--	--	--	--
C18:3 n6	1.18 ± 0.1 ^A	1.27 ± 0.1 ^{A;a}	1.21 ± 0.2 ^{AB;a}	1.03 ± 0.2 ^{AB;a}	0.9 ± 0.1 ^{B;a}	1.2 ± 0.1 ^{A;a}	1.21 ± 0.2 ^{A;a}	1.04 ± 0.1 ^{A;a}	0.99 ± 0.2 ^{A;a}
C20: 1 n9	0.45 ± 0.0 ^A	0.37 ± 0.0 ^{A;a}	0.34 ± 0.0 ^{A;ab}	0.26 ± 0.0 ^{A;a}	0.38 ± 0.1 ^{A;a}	0.34 ± 0.0 ^{A;a}	0.3 ± 0.0 ^{A;b}	0.33 ± 0.0 ^{A;a}	0.3 ± 0.1 ^{A;a}
C18:3 n3	1.66 ± 0.2 ^A	1.51 ± 0.1 ^{A;a}	1.42 ± 0.2 ^{A;a}	1.04 ± 0.1 ^{B;ab}	0.98 ± 0.1 ^{B;ab}	1.57 ± 0.1 ^{A;a}	1.51 ± 0.1 ^{A;a}	1.3 ± 0.1 ^{AB;a}	1.09 ± 0.2 ^{B;a}
C21:0	--	--	--	0.35 ± 0.0 ^{A;b}	0.36 ± 0.0 ^{A;b}	--	--	0.36 ± 0.0 ^{A;b}	0.29 ± 0.1 ^{A;b}
C20:2 n6	0.51 ± 0.0 ^A	0.69 ± 0.1 ^{A;a}	0.71 ± 0.0 ^{A;a}	0.48 ± 0.1 ^{B;ab}	0.51 ± 0.1 ^{B;a}	0.63 ± 0.1 ^{A;a}	0.55 ± 0.0 ^{AB;b}	0.5 ± 0.0 ^{AB;a}	0.45 ± 0.1 ^{B;a}
C22:0	--	--	0.13 ± 0.0 ^A	0.06 ± 0.0 ^{B;c}	0.14 ± 0.0 ^{A;a}	--	--	0.24 ± 0.1 ^{A;a}	0.09 ± 0.0 ^{B;b}
C20:3 n6	0.17 ± 0.0 ^A	--	0.1 ± 0.0 ^{A;bc}	0.08 ± 0.0 ^{B;b}	0.05 ± 0.0 ^{C;a}	--	0.08 ± 0.0 ^{A;c}	0.06 ± 0.0 ^{AB;b}	0.06 ± 0.0 ^{B;a}
C22:1 n9	0.19 ± 0.0 ^A	0.18 ± 0.0 ^{A;b}	0.15 ± 0.0 ^{A;b}	0.16 ± 0.0 ^{A;a}	0.16 ± 0.0 ^{A;a}	0.14 ± 0.0 ^{A;c}	0.14 ± 0.0 ^{A;b}	0.13 ± 0.0 ^{A;a}	0.09 ± 0.0 ^{B;b}
C20:3 n3	0.32 ± 0.0 ^A	--	0.15 ± 0.0 ^{B;b}	0.37 ± 0.0 ^{A;a}	0.35 ± 0.0 ^{A;a}	0.39 ± 0.0 ^{A;a}	0.29 ± 0.0 ^{B;a}	0.25 ± 0.0 ^{C;b}	0.25 ± 0.0 ^{C;b}
C20:4 n6	0.2 ± 0.0 ^A	0.04 ± 0.0 ^{B;c}	--	0.09 ± 0.0 ^{A;d}	0.1 ± 0.0 ^{A;c}	0.25 ± 0.0 ^{B;ab}	0.25 ± 0.1 ^{B;a}	0.37 ± 0.0 ^{A;a}	0.37 ± 0.1 ^{A;a}
C20:5 n3	9.56 ± 0.2 ^A	8.65 ± 0.1 ^{A;b}	8.1 ± 0.6 ^{AB;a}	7.86 ± 0.1 ^{AB;a}	7.39 ± 0.5 ^{B;a}	9.37 ± 0.2 ^{A;a}	8.63 ± 0.3 ^{AB;a}	8.02 ± 0.6 ^{B;a}	7.88 ± 0.7 ^{B;a}
C24:1 n9	--	--	--	0.09 ± 0.0 ^{A;b}	0.19 ± 0.1 ^A	--	--	--	--
C22:6 n3	1.78 ± 0.1 ^A	1.72 ± 0.0 ^{A;a}	1.54 ± 0.2 ^{AB;a}	1.22 ± 0.2 ^{BC;b}	1.05 ± 0.2 ^{C;b}	1.68 ± 0.1 ^{A;a}	1.59 ± 0.1 ^{AB;a}	1.54 ± 0.0 ^{AB;a}	1.52 ± 0.0 ^{B;a}
∑SFA	42.17 ± 0.6^A	42.16 ± 0.6^{A;a}	41.55 ± 0.1^{A;a}	40.19 ± 0.2^{B;a}	38.95 ± 0.1^{C;a}	42.07 ± 0.2^{A;a}	41.52 ± 0.2^{B;a}	40.6 ± 0.2^{C;a}	39.34 ± 0.1^{D;a}
∑MUFA	22.96 ± 0.1^A	19.87 ± 0.8^{A;ab}	19.33 ± 0.8^{AB;a}	17.74 ± 0.5^{B;a}	17.71 ± 0.7^{B;a}	20.94 ± 0.8^{A;a}	19.39 ± 0.3^{AB;a}	18.08 ± 0.9^{BC;a}	17.19 ± 0.1^{C;a}
∑PUFA	16.85 ± 0.1^A	15.18 ± 0.1^{A;b}	14.42 ± 0.3^{A;ab}	13.17 ± 0.5^{B;ab}	12.29 ± 0.6^{B;b}	16.36 ± 0.5^{A;a}	15.17 ± 0.5^{AB;a}	14.18 ± 0.7^{BC;a}	13.74 ± 0.4^{C;a}
∑PUFA+MUFA	39.81 ± 0.1^A	35.04 ± 0.9^{A;b}	33.76 ± 0.6^{A;ab}	30.91 ± 0.2^{B;ab}	30 ± 0.4^{B;ab}	37.3 ± 1.0^{A;a}	34.56 ± 0.2^{B;a}	32.26 ± 1.5^{BC;a}	30.93 ± 0.5^{C;a}
∑ω3	13.33 ± 0.0^A	11.89 ± 0.1^{A;b}	11.21 ± 0.3^{AB;ab}	10.49 ± 0.3^{BC;ab}	9.77 ± 0.5^{C;ab}	13.01 ± 0.3^{A;a}	12.03 ± 0.2^{AB;a}	11.12 ± 0.7^{BC;a}	10.73 ± 0.5^{C;a}
∑ω6	3.52 ± 0.1^A	3.29 ± 0.1^{A;a}	3.22 ± 0.1^{AB;a}	2.68 ± 0.3^{BC;ab}	2.52 ± 0.2^{C;a}	3.34 ± 0.2^{A;a}	3.14 ± 0.3^{A;a}	3.07 ± 0.1^{A;a}	3.01 ± 0.3^{A;a}
ω3/ω6	3.79 ± 0.1^B	3.62 ± 0.2^{A;b}	3.49 ± 0.1^{A;a}	3.95 ± 0.5^{A;ab}	3.9 ± 0.4^{A;ab}	3.89 ± 0.1^{A;ab}	3.84 ± 0.3^{A;a}	3.63 ± 0.3^{A;ab}	3.59 ± 0.4^{A;b}
∑Trans	--	--	0.32 ± 0.0^{B;b}	0.68 ± 0.0^{A;ab}	0.8 ± 0.1^{A;a}	--	0.12 ± 0.0^{C;c}	0.57 ± 0.1^{B;b}	0.77 ± 0.0^{A;a}
∑EPA+DHA	11.35 ± 0.2^A	10.38 ± 0.1^{A;b}	9.64 ± 0.4^{AB;ab}	9.08 ± 0.2^{BC;a}	8.44 ± 0.4^{C;a}	11.05 ± 0.2^{A;a}	10.22 ± 0.2^{AB;a}	9.57 ± 0.6^{B;a}	9.39 ± 0.7^{B;a}

Results presented as mean ± standard deviation, n=3. Averages with different capital letters in the same row indicate significant differences at storage time ($p < 0.05$). Different lower letters in the same row indicate significant differences among the treatments. SFA= saturated fatty acids, MUFA= monounsaturated fatty acids, PUFA= polyunsaturated fatty acids, EPA = eicosapentaenoic acid, DHA= docosahexaenoic acid.

The fatty acid contents decreased in the order of saturated (SFA) (47.5 ± 0.8 g/100 g oil) > monounsaturated (MUFA) (26.69 ± 0.4 g/100 g oil) > polyunsaturated (PUFA) (23.8 ± 0.3 g/100 g oil). The profile of fatty acids, regarding the main fatty acids, was maintained independent of time of storage. However, during storage, the content of some fatty acids decreased. After 60 days, reductions around 14.24, 27.96, and 26.85 % were determined for SFAs, MUFAs, and PUFAs, respectively, even if there is no reduction in total lipids, analyzed on a dry basis. The sum of important PUFAs of the *n*3-serie such as eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic acids (DHA) decreased from 15.48 ± 0.3 (day 0) to 11.93 ± 0.3 g/100 g oil (day 60), showing a degradation of 22.94%. Saldanha et al. (2008) and Sancho et al. (2011) also reported the degradation of fatty acids during frozen storage.

Samples containing biquinho pepper flour also presented palmitic, oleic, palmitoleic, and eicosapentanoic acids as majorities. Frozen storage affected the fatty acid contents of samples added with biquinho pepper flour by reducing their values; however, the degradation of fatty acids was much higher in samples not treated with the natural antioxidant.

After 60 days, the raw samples added with biquinho pepper flour showed the following contents of PUFAs: 18.28 ± 0.2 g/100 g oil (0.5%), 18.17 ± 0.5 g/100 g oil (0.75%), and 18.56 ± 0.6 g/100 g oil (1%). Therefore, lower degradation percentages were observed: 23.20% (0.5%), 23.66 (0.75%), and 22.02% (1%). Biquinho pepper flour also contributed to maintain the contents of EPA and DHA. A degradation percentage of 22.94% was assessed in samples with no addition of pepper, while in samples added with biquinho pepper (1% PB) the degradation percentage was 17.25% (day 60).

As well as storage, the heat treatment in air fryer also resulted in the degradation of fatty acids. After 60 days, air frying caused a degradation of 35.9% in the PUFAs level of samples not incorporated with biquinho pepper flour. The content of PUFAs decreased from 17.41 ± 0.2 (raw samples, day 60) to 11.16 ± 0.7 g/100 g (air fried samples, day 60). Regarding EPA and DHA, losses of approximately 32% were determined. In a previous study performed by Ferreira et al. (2017), the authors evaluated the effect of air frying in sardine fillets and observed a significant decrease of PUFAs (70.2%), mainly DHA (85%).

During air frying, the lipid fraction of food is exposed to pro-oxidants factors such as heat and oxygen, which induce the loss of important fatty acids, mainly unsaturated fatty acids that are more susceptible to oxidation (Saldanha et al., 2008; Barriuso et al., 2017). It is well known that high temperatures reduce the activation energy necessary for hydrogen abstraction and lead to the formation of radicals that accelerate the chain reaction of lipid oxidation (Barriuso et al., 2017).

On the other hand, the supplementation of fish ball samples with biquinho pepper flour showed a protective effect against the fatty acids degradation. In samples treated with biquinho pepper flour (day 60), the levels of PUFAs were: 11.76 ± 0.5 g/100 g (0.5%), 12.29 ± 0.6 g/100 g (0.75%), and 13.74 ± 0.4 g/100 g (1%). Therefore, lower losses were detected in samples incorporated with biquinho pepper flour (0.5, 0.75, and 1%).

The addition of natural additives has proved to be an effectiveness strategy to control or minimize degradative reactions such as the oxidation of fatty acids. Biquinho pepper flour contains bioactive compounds with health-promoting effects attributed mainly to their antioxidant potential. These constituents present different mechanisms of action that result in the inhibition of free radical chain reactions. Moreover, they may also protect lipids from the initiators of the oxidative reactions (de Oliveira et al., 2018; Embuscado, 2019).

Additionally, fish and fish products are commonly characterized as functional food due to their contents of essential fatty acids as the ones of the n-3-serie, which can be reduced during frozen storage and air frying. Therefore, the use of natural additives such as biquinho pepper flour may present numerous advantages regarding not only the sensorial and nutritional point of view but also the maintenance of food quality and safety.

4 CONCLUSION

The results revealed the nutritional and biological attributes of biquinho pepper flour, which presents several bioactive compounds with health-promoting effects. Compounds such as phenolics and carotenoids were quantified, contributing to the antioxidant proprieties of biquinho pepper, which was confirmed during the experiment. Lipids oxidation and consequent degradation of fatty acids were determined during frozen storage, as well as after air frying. However, the incorporation of biquinho pepper flour minimized the oxidative processes in fish ball samples, mainly in the treatment with 1%, which was the highest concentration of flour evaluated. Therefore, regarding the current scenario, where food industries are making efforts to attend the consumer's demand for healthier food with lower levels of chemical additives, the incorporation of biquinho pepper flour may represent a promising alternative to the replacement of synthetic antioxidants in fish products.

5 REFERENCES

ABDOU BOUBA, Armand., NJINTANG, Yanou Nicolas., FOYET, Harquin., SIMPLICE, Scher Joel., MONTET, Didier., MBOFUNG, Carl Moses. Proximate composition, mineral and vitamin content of some wild plants used as spices in Cameroon. **Food and Nutrition Sciences**, 3 (4): pp. 423-432., 2012.

AKINYEMI, B. K., OBASI, M. O., & FAAJIR, A. Effects of Storage Period on Nutritional Properties of Three Species of Fresh Pepper. **Asian Journal of Agricultural and Horticultural Research**, v.1 n.4 (7)., 2018.

ALONSO, A., Chen, L. Y., RUDSER, K. D., Norby, F. L., ROONEY, M. R., & Lutsey, P. L. Effect of magnesium supplementation on circulating biomarkers of cardiovascular disease. **Nutrients**, 12(6), 1697., 2020.

ALVAREZ-SALA, A., Attanzio, A., TESORIERE, L., Garcia-Llatas, G., Barberá, R., & Cilla, A. Apoptotic effect of a phytosterol-ingredient and its main phytosterol (β -sitosterol) in human cancer cell lines. **International journal of food sciences and nutrition**, 70(3), 323-334., 2019.

ANANTHAN, R., Subhash, K., & LONGVAH, T. (2018). Capsaicinoids, amino acid and fatty acid profiles in different fruit components of the world hottest Naga king chilli (*Capsicum chinense* Jacq). **Food chemistry**, 238, 51-57., 2018.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists. 17th. ed., 2002.

AZA-GONZÁLEZ, César., & OCHOA-ALEJO, Neftali. Characterization of anthocyanins from fruits of two Mexican chili peppers (*Capsicum annuum* L.). **Journal of the Mexican Chemical Society**, 56(2), 149-151., 2012.

BAI, Ningzhu. Advances in the Prevention of Cardiovascular Diseases by Phytosterol. In **Proceedings of the third International Conference on Medical and Health Informatics 2019** (pp. 110-114).05., 2019.

BANDARRA, Narcisa Maria., MARÇALO, Ana., CORDEIRO, Ana Rita, & POUSÃO-FERREIRA, Pedro. Sardine (*Sardina pilchardus*) lipid composition: Does it change after one year in captivity. **Food Chemistry**, 244, 408-413., 2018.

BARRIUSO, Blanca, ANSORENA, Diana., & ASTIASARÁN, Iciar. Oxysterols formation: A review of a multifactorial process. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, 169, 39-45., 2017.

BENGUENDOZ, A., BOUDEROUA, K., Bouterfa, A., BELABES, M., Bekada, A., SIORIKI, E., & ZABETAKIS, I. Fatty acid profile and assessment of heavy metals content of *Sardina pilchardus* captured in the Algerian coast. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, 16(3), 1021-1029., 2017.

BHANDARI, S. R., Jung, B. D., Baek, H. Y., & Lee, Y. S. Ripening-dependent changes in phytonutrients and antioxidant activity of red pepper (*Capsicum annuum* L.) fruits cultivated under open-field conditions. **HortScience**, 48(10), 1275-1282., 2013.

CARMO, C. D. S., DE ARAUJO, W. S., BERNARDI, A. D. C., & SALDANHA, M. F. C. Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na Embrapa Solos. **Embrapa Solos-Circular Técnica (INFOTECA-E)**.2000.

CARVALHO, A. V., DE ANDRADE MATTIETTO, R., DE OLIVEIRA RIOS, A., de Almeida Maciel, R., MORESCO, K. S., & de Souza Oliveira, T. C. Bioactive compounds and antioxidant activity of pepper (*Capsicum* sp.) genotypes. **Journal of Food Science and Technology**, 52(11), 7457-7464., 2015.

DA SILVA RIBEIRO, M., Melo, C. M. T., ALMEIDA, E. S., & dos Anjos Queiroz, C. R. A. Extraction of total phenolic content and antioxidant activity of *Capsicum chinense* and *Capsicum* spp in different solvents and extraction time. **Bioscience Journal**, 35(4)., 2019.

DE AGUIAR, A. C., DA FONSECA MACHADO, A. P., ANGOLINI, C. F. F., de Moraes, D. R., Baseggio, A. M., Eberlin, M. N. & MARTINEZ, J. Sequential high-pressure extraction to obtain capsinoids and phenolic compounds from biquinho pepper (*Capsicum chinense*). **The Journal of Supercritical Fluids**, 150, 112-121., 2019.

DE OLIVEIRA, Vanessa. S., Ferreira, Fernanda. S., Cople, Maria. Clara. R., Labre, T. D. S., Augusta, Ivanilda. Maria., Gamallo, Ormino. D., & Saldanha, Tatiana. Use of Natural Antioxidants in the Inhibition of Cholesterol Oxidation: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 17(6), 1465-1483., 2018.

DE OLIVEIRA, Vanessa. S., Cháves, Davy. W. H., Gamallo, Ormino. D., Sawaya, Aalexandra. C. H. F., Sampaio, Geni. R., Castro, Rosane. N., & Saldanha, Tatiana. Effect of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) fruit against polyunsaturated fatty acids and cholesterol thermo-oxidation in model systems containing sardine oil (*Sardinella brasiliensis*). **Food Research International**, 109091., 2020a.

DU, S., Wang, H., ZHANG, B., & POPKIN, B. M. Dietary Potassium Intake Remains Low and Sodium Intake Remains High, and Most Sodium is Derived from Home Food Preparation for Chinese Adults, 1991–2015 Trends. **The Journal of Nutrition**, 150(5), 1230-1239., 2020.

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

FAO/INFOOD. 2012. Guidelines for converting units, denominators and expressions. **FAO**, Rome.

FERREIRA, F. S., SAMPAIO, Geni. R., Keller, L. M., SAWAYA, Alexandra. C., Chávez, D. W., Torres, Elizabete. A., & SALDANHA, Tatiana. Impact of air frying on cholesterol and fatty acids oxidation in sardines: Protective effects of aromatic herbs. **Journal of food science**, 82(12), 2823-2831., 2017.

FULEKI, T., & FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. **Journal of food science**, 33(1), 72-77. 1968.

GARRUTI, D. D. S., PINTO, N. D. O. F., ALVES, V. C. C., PENHA, M. F. A. D., TOBARUELA, E. D. C., & ARAÚJO, Í. M. D. S. Volatile profile and sensory quality of new varieties of *Capsicum chinense* pepper. **Food Science and Technology**, 33, 102-108., 2019.

GAYATHRI, N., GOPALAKRISHNAN, M., & SEKAR, T. Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Capsicum chinense* Jacq. **International Journal of Advances in Pharmaceutics**, 5(1), 12-20.. 2016.

GHARIBZAHEDI, S. M. T., & JAFARI, S. M. The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation. **Trends in Food Science & Technology**, 62, 119-132., 2017.

GUIZELLINI, G. M., TORRES, Elizabete. A. F. D. S., FREITAS, R. A. M. S., SALDANHA, Tatiana., SAWAYA, Alexandra. C. H. F., GAMALLO, Ormino. D., & Sampaio, Geni. R. The anticholesterol oxidation effects of garlic (*Allium sativum* L.) and leek (*Allium ampeloprasum* L.) in frozen fish burgers submitted to grilling. **Journal of Food Science**, 85(8), 2416-2426., 2020.

HEMATYAR, N., Rustad, T., SAMPELS, S., & KASTRUP DALSGAARD, T. Relationship between lipid and protein oxidation in fish. **Aquaculture Research**, 50(5), 1393-1403., 2019.

INNES, J. K., & CALDER, P. C. Marine omega-3 (n-3) fatty acids for cardiovascular health: an update for 2020. **International Journal of Molecular Sciences**, 21(4), 1362., 2020.

JUN-HUA, H. A. N., YUE-XIN, Y. A. N. G., & MEI-YUAN, F. E. N. G. Contents of phytosterols in vegetables and fruits commonly consumed in China. **Biomedical and Environmental Sciences**, 21(6), 449-453., 2008.

KUNA, A., Sahoo, M. R., SOWMYA, M., Mayengbam, P. D., DASGUPTA, M., Sreedhar, M., & Tholemhuang, S.. Nutrient and Antioxidant Properties of Value Added King Chilli (*Capsicum chinense*) Products. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, 7(6), 1-8., 2018.

LE, C. M., Donnay-Moreno, C., BRUZAC, S., Baron, R., THI MY NGUYEN, H., & Pascal Bergé, J. Proteolysis of sardine (*Sardina pilchardus*) and anchovy (*Stolephorus commersonii*) by commercial enzymes in saline solutions. **Food Technology and Biotechnology**, 53(1), 87-90., 2015.

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

LOIZZO, M. R., Pugliese, A., BONESI, M., Menichini, F., & TUNDIS, R. Evaluation of chemical profile and antioxidant activity of twenty cultivars from *Capsicum annum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chacoense* and *Capsicum chinense*: a

comparison between fresh and processed peppers. **LWT-Food Science and Technology**, 64(2), 623-631., 2015.

LUTZ, D.L.; FREITAS, S.C. RIBEIRO, C.S. da C. et al. Pimentas Capsicum: Valor Nutricional. Brasília: **Embrapa Hortaliças**. cap.4, p.31-38, 2008.

MADALA, N., & NUTAKKI, M. K. Hot Pepper-History-Health and Dietary Benefits & Production. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, 9(4), 2532-2538., 2020.

MALAKAR, S., Sarkar, S., KUMAR, N., JAGANMOHAN, R. Studies of biochemical characteristics and identification of active phyto-compounds of king chili (*Capsicum chinense* Jacq.) using GC-MS. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, 7(3), 3100-3104., 2018.

MARANGONI, F., Agostoni, C., BORGHI, C., CATAPANO, A. L., Cena, H., Ghiselli, A., RICCARDI, G. Dietary linoleic acid and human health: Focus on cardiovascular and cardiometabolic effects. **Atherosclerosis**, 292, 90-98., 2020.

MELO, Jonathas., FERREIRA, Fernanda., SILVA, T. L. D., NASCIMENTO, K., OLIVEIRA, Vanessa. D., BARBOSA Junior, J. L. SALDANHA, Tatiana. Calidad alimenticia y lípidos funcionales en las yemas de gallina del campo de agricultores de familias Brasileñas. **Revista chilena de nutrición**, 46(4), 420-428., 2019.

MENICHINI, F., Tundis, R., BONESI, M., LOIZZO, M. R., Conforti, F., Statti, G., MENICHINI, F. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. **Food Chemistry**, 114(2), 553-560., 2019.

ORELLANA-ESCOBEDO, L., GARCIA-AMEZQUITA, L. E., Olivas, G. I., Ornelas-Paz, J. J., SEPULVEDA, D. R. Capsaicinoids content and proximate composition of Mexican chili peppers (*Capsicum* spp.) cultivated in the State of Chihuahua: Contenido de capsaicinoides y composición proximal de chiles mexicanos (*Capsicum* spp.) cultivados en el estado de Chihuahua. **CyTA-Journal of Food**, 11(2), 179-184., 2013.

PIIRONEN, V., Toivo, J., PUUPPONEN - PIMIÄ, R., Lampi, A. M. Plant sterols in vegetables, fruits and berries. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 83(4), 330-337., 2003.

PINTO, C. M. F., de OLIVEIRA PINTO, C. L., DONZELES, S. M. L. Pimenta Capsicum: propriedades químicas, nutricionais, farmacológicas e medicinais e seu potencial para o agronegócio. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**. 2013.

PUNIA, S., Sandhu, K. S., SIROHA, A. K., & Dhull, S. B. Omega 3-metabolism, absorption, bioavailability and health benefits – A review. **PharmaNutrition**, 10, 100162., 2019.

RAHIMZADE, E., Bahri, A. H., Moini, S., & Nokhbe Zare, D. (2019). Influence of vacuum packaging and frozen storage time on fatty acids, amino acids and ω -3/ ω -6

ratio of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 18(4), 1083-1092.

RAMÍREZ-GÓMEZ, K., Moguel-Ordoñez, Y., SEGURA-CAMPOS, M. R., Ruiz-Ruiz, J. C., CHEL-GUERRERO, L. A., & Betancur-Ancona, D. A. (2016). Antioxidant Capacity of *Capsicum chinense* Genotypes. In **Functional Properties of Traditional Foods** (pp. 241-249). Springer, Boston, MA., 2016.

SALDANHA, Tatiana., Sawaya, Alexandra. C. H. F., EBERLIN, M. N., Bragagnolo, Neura. HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish: comparative study of RI, UV, and APCI-MS detectors. **Journal of agricultural and food chemistry**, 54(12), 4107-4113., 2006.

SALDANHA, Tatiana., BENASSI, Monica. T., & BRAGAGNOLO, Neura. Fatty acid contents evolution and cholesterol oxides formation in Brazilian sardines (*Sardinella brasiliensis*) as a result of frozen storage followed by grilling. **LWT-Food Science and Technology**, 41, 1301-1309., 2008.

SANCHO, R. A. S., DE LIMA, F. A., COSTA, G. G., MARIUTTI, L. R. B., & BRAGAGNOLO, N. Effect of annatto seed and coriander leaves as natural antioxidants in fish meatballs during frozen storage. **Journal of food science**, 76(6), C838-C845., 2011.

SARPRAS, M., Ahmad, I., RAWOOF, A., & RAMCHIARY, N. Comparative analysis of developmental changes of fruit metabolites, antioxidant activities and mineral elements content in Bhut jolokia and other Capsicum species. **LWT-Food Science and Technology**, 105, 363-370., 2019.

SCAPIN, G., Schmidt, M. M., Prestes, R. C., Rosa, C. S. Phenolics compounds, flavonoids and antioxidant activity of chia seed extracts (*Salvia hispanica*) obtained by different extraction conditions. **International Food Research Journal**, 23(6), 2341. 2016.

SWAIN, T., & HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 10(1), 63-68., 1959.

ZHU, X., Svendsen, C., JAEPELT, K. B., Moughan, P. J., RUTHERFURD, S. M. (2011). A comparison of selected methods for determining eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in cereal-based foods. **Food chemistry**, 125(4), 1320-1327., 2011.

ZOTOS, A., Gotsis, D., & TSOLAKIS, M. (2016). The Effect of Prior Frozen Storage (− 20° C) on the Quality of Oven-Baked Sardines (*Sardina pilchardus*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, 25(2), 240-250., 2016.

CONCLUSÕES GERAIS

O acesso a alimentos de qualidade adequada às necessidades nutricionais humanas está se tornando cada vez mais difícil devido a urgência do dia a dia, com a necessidade de refeições rápidas. Entretanto, na contramão desta alimentação desequilibrada e inadequada, atualmente há uma crescente parte da população que busca uma alimentação prática, porém saudável, rica em nutrientes funcionais, naturais e isentas de aditivos sintéticos. Neste contexto, este estudo avaliou a utilização da pimenta biquinho como fonte alternativa de antioxidante natural, visando minimizar a degradação de ácidos graxos e a formação de produtos de oxidação do colesterol (POCs) em almôndegas de sardinhas.

Os dados obtidos neste estudo apontam o elevado valor nutricional da pimenta biquinho que é fonte de compostos bioativos associados a diversos benefícios a saúde humana. Compostos como fitosteróis, ácidos graxos, minerais, carotenoides e compostos fenólicos foram determinados, bem como análises de UHPLC-ESI-MS, para confirmar a presença de compostos importantes, como: capsaicina; di-hidrocapsaicina; homocapsaicina- I e Nordihydrocapsaicina, entre outros. Além disso, a pimenta também apresentou potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo*. Desta forma, tais informações contribuem e motivam o emprego deste fruto como aditivo natural em produtos alimentícios.

Neste contexto, avaliou-se o efeito da adição de pimenta biquinho a almôndegas de sardinha. Diferentes concentrações de pimenta biquinho (0,5%, 0,75% e 1%) foram empregadas, de forma que a adição de 1% obteve resultados mais expressivos e significantes. Conforme apresentado no capítulo 1, os resultados para degradação do colesterol e conseqüente formação de óxidos de colesterol foram crescentes ao longo dos 60 dias de armazenamento congelado. Entretanto, a adição de pimenta biquinho provou ser eficaz, minimizando a formação de óxidos de colesterol nas almôndegas, compostos reconhecidamente associados a efeitos deletérios à saúde. A mesma tendência foi observada para a degradação dos ácidos graxos insaturados como apresentado no capítulo 2, onde os teores de importantes ácidos graxos como o EPA e DHA reduziram durante a estocagem e após o tratamento térmico em air fryer. Comportamento semelhante foi determinado nas amostras adicionadas de pimenta biquinho, entretanto, a adição deste

antioxidante natural minimizou a degradação, reduzindo a perda de ácidos graxos poli-insaturados e contribuindo assim para a manutenção do valor nutricional destes alimentos.

Desta forma, os resultados encontrados sugerem o emprego da pimenta biquinho como aditivo natural, não só com o intuito de agregar valor sensorial e nutricional, mas também como uma alternativa a substituição de antioxidantes sintéticos. Entretanto, estudos futuros devem ser conduzidos para avaliar diferentes concentrações de pimenta e seus efeitos, assim como os aspectos sensoriais e comparações com antioxidantes sintéticos comumente empregados pela indústria, visando a possível utilização da pimenta pela indústria de alimentos.

ANEXOS

ANEXO A - Curvas de calibração para as análises antioxidantes *in vitro*

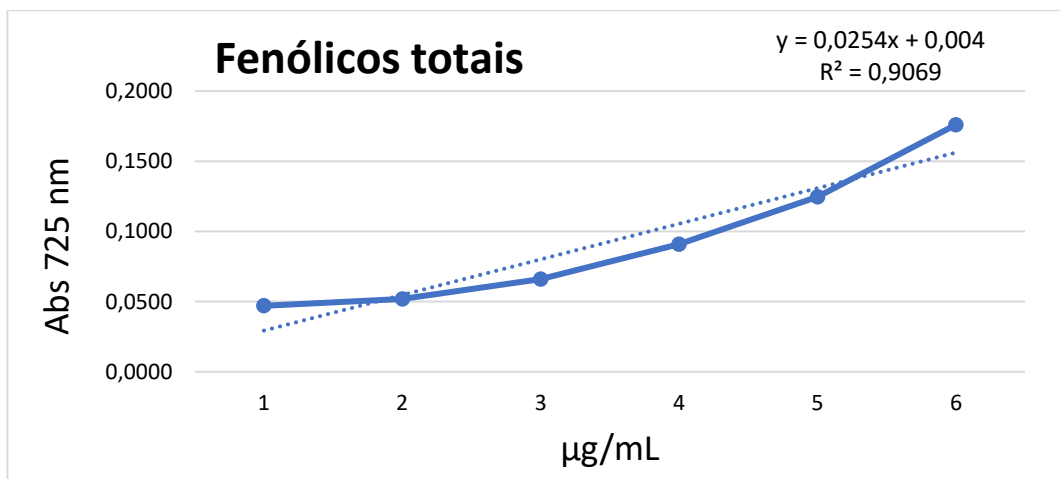


Figura 22: Curva de calibração para a quantificação de fenólicos totais.

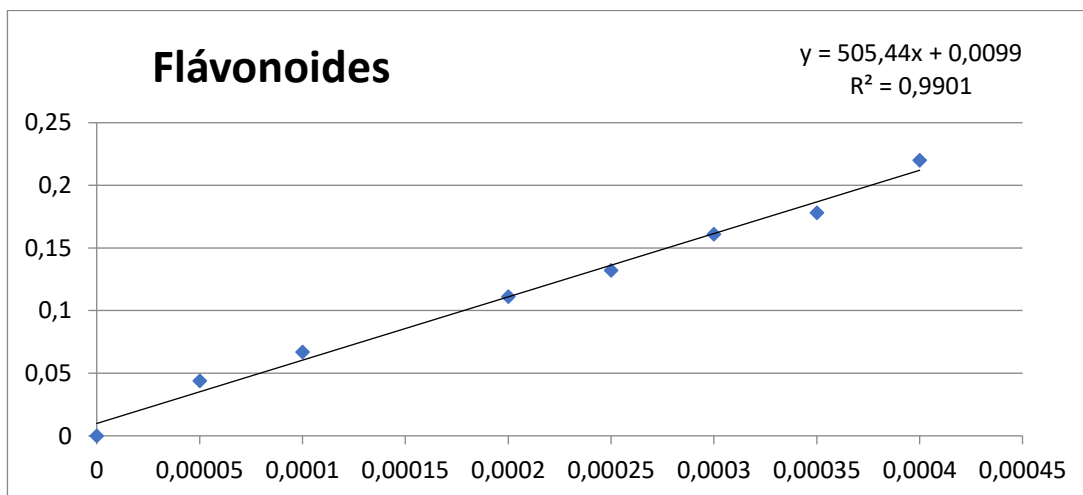


Figura 23: Curva de calibração para a quantificação de flavonoides totais.

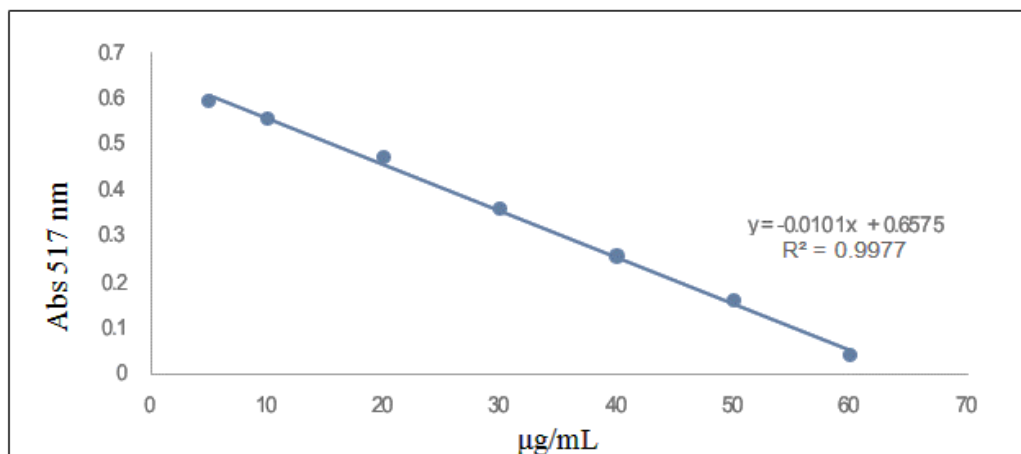


Figura 24: Curva de calibração para análise de DPPH.

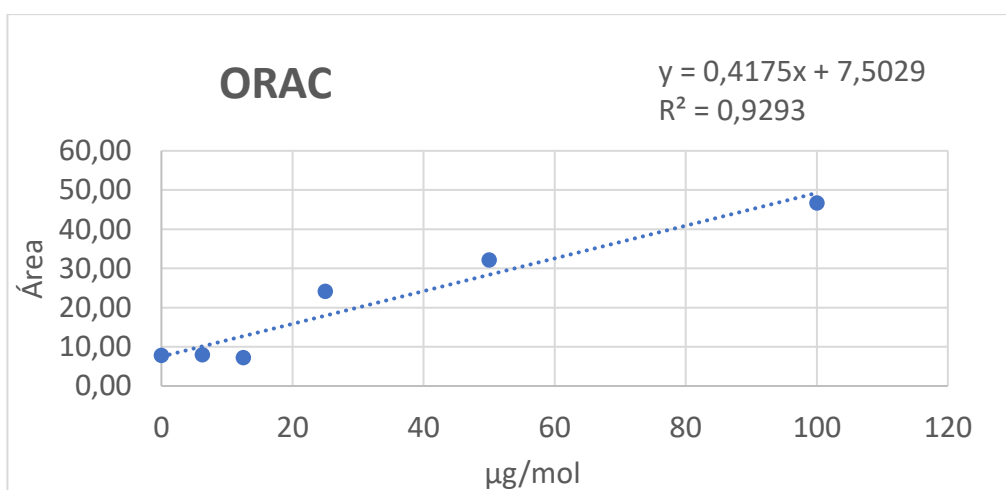


Figura 25: Curva de calibração do Trolox (ORAC). Área = Área sob a curva para diferentes concentrações de antioxidante – Área sob a curva para o controle (sem antioxidante).

ANEXO B – Ácidos graxos

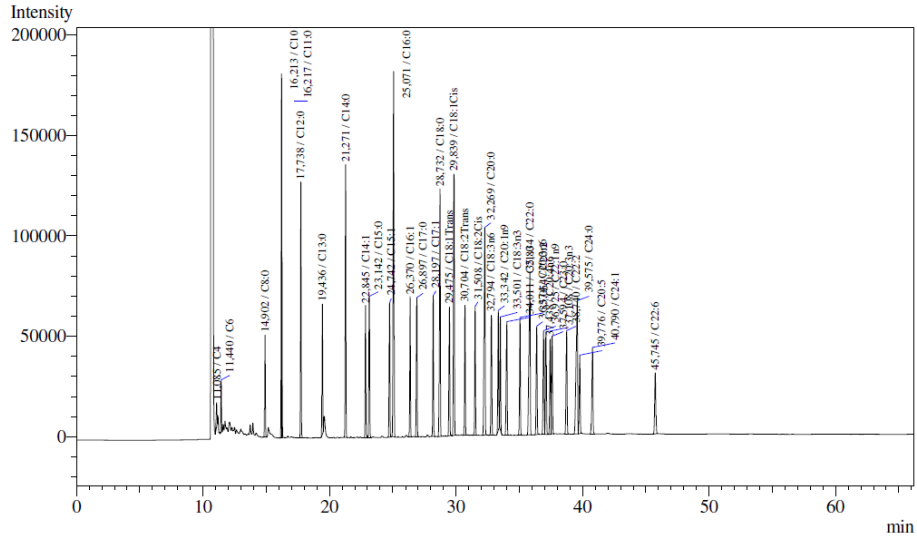


Figura 26: Perfil cromatográfico dos padrões de ésteres metílicos dos ácidos graxos.

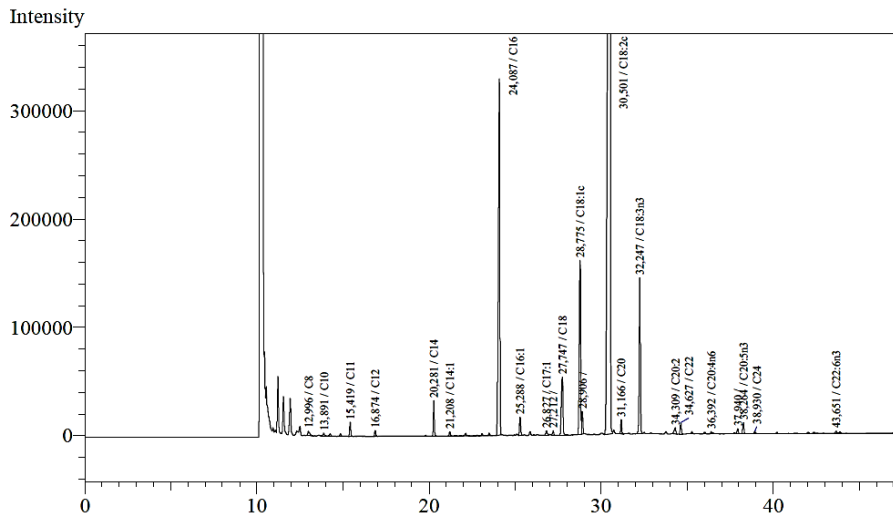


Figura 27: Perfil cromatográfico da farinha de pimenta biquinho.

ANEXO C – Colesterol e óxidos de colesterol

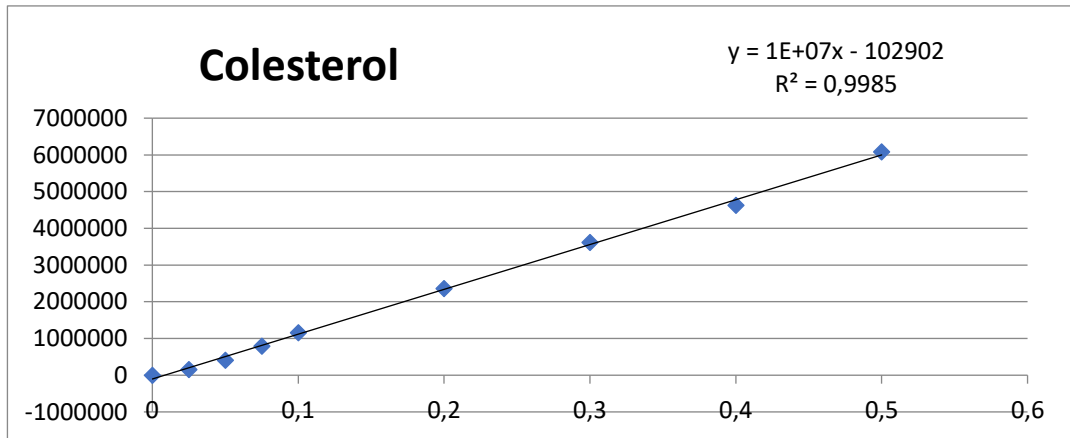


Figura 37: Padronização externa do colesterol

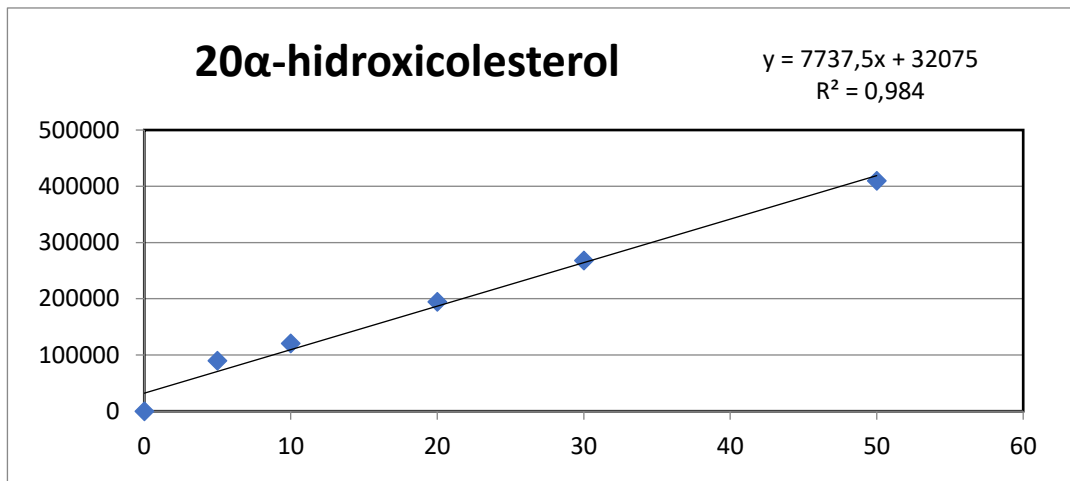


Figura 38: Padronização externa do 20 α -hidroxicolesterol.

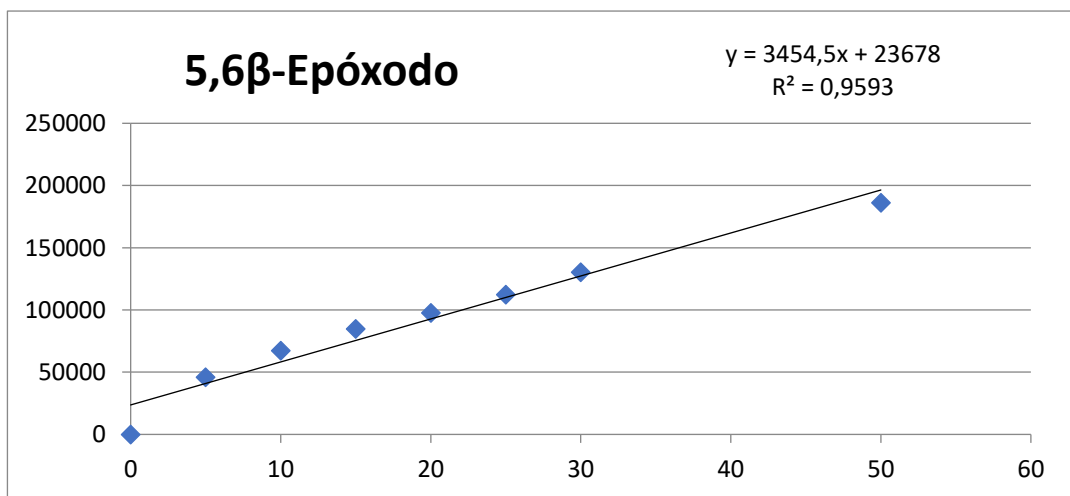


Figura 39: Padronização externa do 5,6 β - Epóxido.

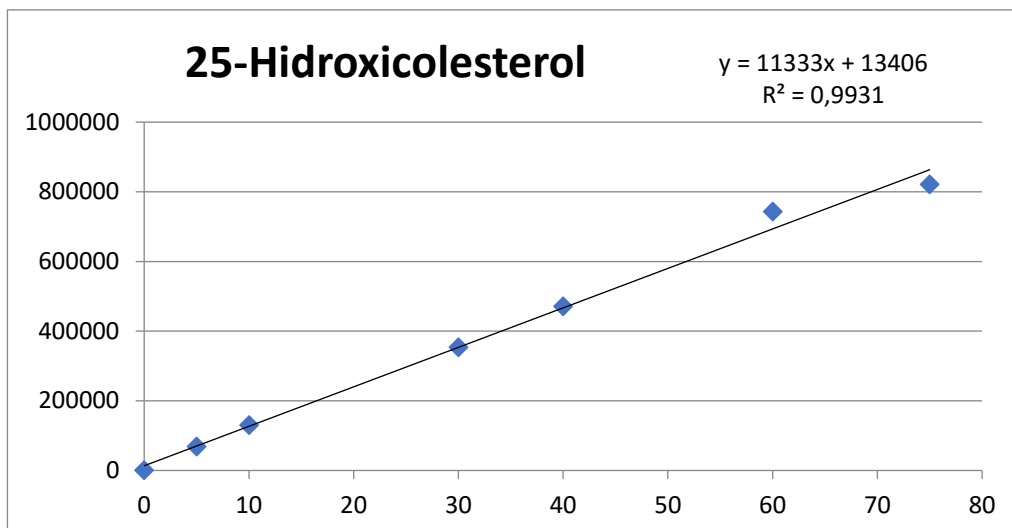


Figura 40: Padronização externa do 25-hidroxicolesterol.

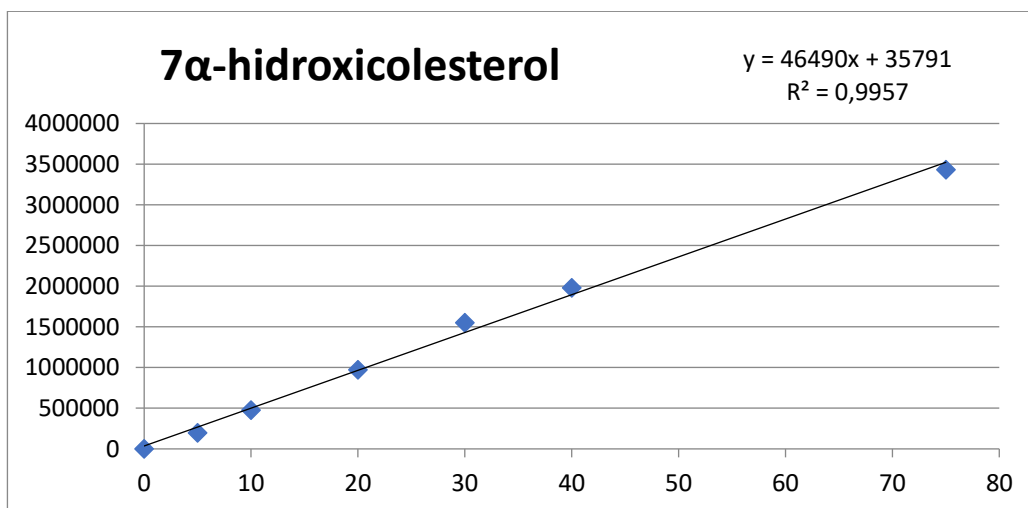


Figura 41: Padronização externa do 7 α -hidroxicolesterol.

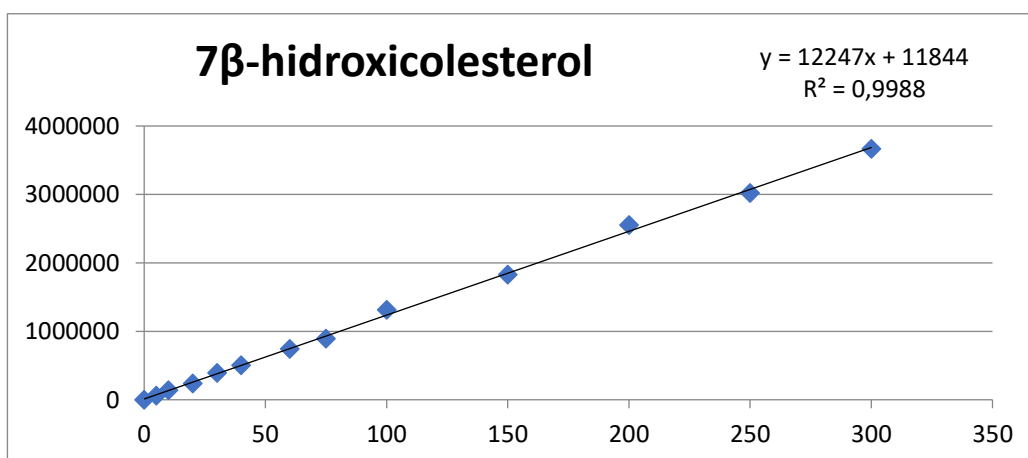


Figura 42: Padronização externa do 7 β -hidroxicolesterol.

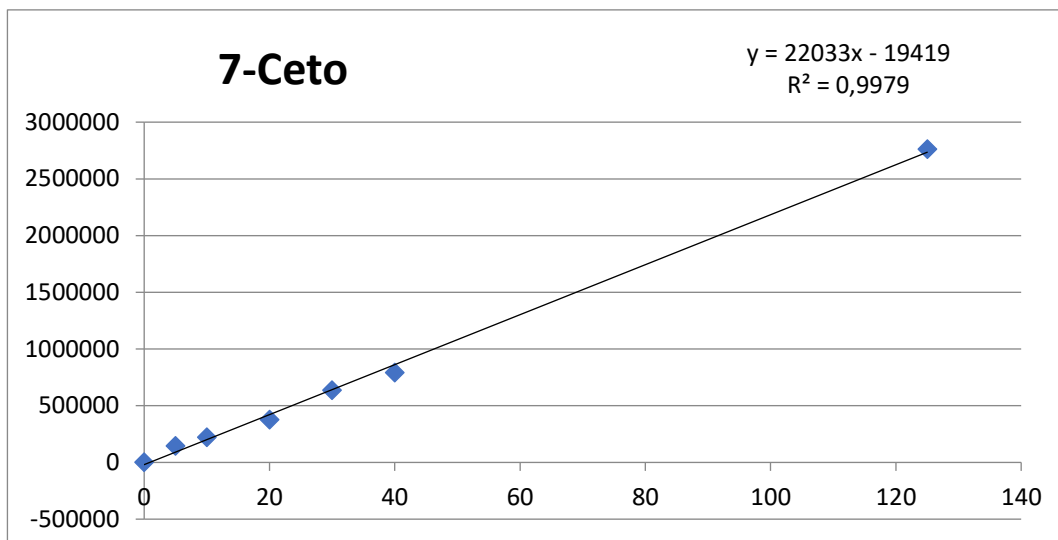


Figura 45: Padronização externa do 7-cetocolesterol.