

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

**DISSERTAÇÃO**

**UTILIZAÇÃO DO SUCO DO LIMÃO TAHITI (*Citrus latifolia*) COMO  
ANTIOXIDANTE NATURAL DURANTE O PREPARO TÉRMICO DE  
SARDINHAS (*Sardina pilchardus*) POR DIFERENTES MÉTODOS DE  
COCCÃO**

**ISABELLA OLIVEIRA ALVES MOREIRA DE CARVALHO**

**2020**



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

**UTILIZAÇÃO DO SUCO DO LIMÃO TAHITI (*Citrus latifolia*) COMO**  
**ANTIOXIDANTE NATURAL DURANTE O PREPARO TÉRMICO DE**  
**SARDINHAS (*Sardina pilchardus*) POR DIFERENTES MÉTODOS DE**  
**COCCÃO**

**ISABELLA OLIVEIRA ALVES MOREIRA DE CARVALHO**

*Sob orientação da professora Doutora*

**Tatiana Saldanha**

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

Seropédica, RJ

Agosto de 2020

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

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

C331u Carvalho, Isabella Oliveira Alves Moreira de, 1996-  
Utilização do suco do limão Tahiti (Citrus latifolia)  
como antioxidante natural durante o preparo térmico de  
sardinhas (Sardina pilchardus) por  
diferentes métodos de cocção / Isabella Oliveira Alves  
Moreira de Carvalho. - Rio de Janeiro, 2020.  
81 f.

Orientadora: Tatiana Saldanha.  
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro, Curso de Pós- Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, 2020.

1. Ácidos graxos. 2. Produtos de oxidação do  
colesterol. 3. Antioxidantes naturais. I. Saldanha, Tatiana  
, 1971-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Curso de Pós- Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos III. Título.



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



ATA Nº 2147/2020 - PPGCTA (12.28.01.00.00.00.41)

Nº do Protocolo: 23083.042894/2020-90

Seropédica-RJ, 02 de setembro de 2020.

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

**ISABELLA OLIVEIRA ALVES MOREIRA DE CARVALHO**

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 02/09/2020

---

TATIANA SALDANHA (Dr<sup>a</sup>) UFRRJ  
(orientadora)

---

GENI RODRIGUES SAMPAIO (Dr<sup>a</sup>) USP

---

MICHELI DA SILVA FERREIRA (Dr<sup>a</sup>) UFF

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

*(Assinado digitalmente em 02/09/2020 15:55)*

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

*(Assinado digitalmente em 02/09/2020 15:40)*

GENI RODRIGUES SAMPAIO  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 155.509.348-50

*(Assinado digitalmente em 04/09/2020 07:34)*

MICHELI DA SILVA FERREIRA  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 052.766.347-69

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **2147**, ano: **2020**, tipo: **ATA**, data de emissão: **02/09/2020** e o código de verificação: **cb39c5b99a**

## **AGRADECIMENTOS**

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

## RESUMO

MOREIRA DE CARVALHO, Isabella Oliveira Alves. **Utilização do suco do limão Tahiti (*Citrus latifolia*) como antioxidante natural durante o preparo térmico de sardinhas (*Sardina pilchardus*) por diferentes métodos de cocção.** 87p. 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, 2020.

A crescente preocupação dos consumidores em adquirir hábitos alimentares saudáveis tem aumentado a busca por alimentos funcionais. As sardinhas apresentam altos teores de ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3. Entretanto, contêm concentrações apreciáveis de colesterol, composto altamente susceptível à oxidação lipídica. A formação de óxidos de colesterol e a degradação de ácidos graxos poli-insaturados durante o processamento térmico (termo-oxidação) têm um papel de destaque entre os fatores responsáveis pela perda de qualidade e das características nutricionais do pescado. Além disso, o consumo de lipídios oxidados tem sido alvo de pesquisas na área de saúde pública, devido à correlação entre a ingestão desses e a indução de efeitos pró-inflamatórios, além de outras doenças crônicas degenerativas. Assim, torna-se necessária a pesquisa de fontes alternativas de componentes antioxidantes naturais que possam evitar ou minimizar a oxidação de pescado marinho durante o preparo térmico. O suco do limão Tahiti (*Citrus latifolia*) é amplamente utilizado no preparo culinário de peixes. No Brasil, o limão Tahiti é uma fruta de grande relevância comercial e amplamente disponível em mercados varejistas. Além disso, estudos têm demonstrado que o suco do limão Tahiti possui potencial antioxidante devido à presença de compostos bioativos. Este estudo avaliou a aplicação de 3 níveis de adição de suco do limão Tahiti (5%, 10% e 15%), seguida de processamento térmico em filés de sardinhas (*Sardina pilchardus*) submetidos aos métodos de cocção por air fryer, grelha e fritura por imersão em óleo de soja. Foram avaliados os impactos sobre os ácidos graxos insaturados e à oxidação do colesterol. O extrato do suco foi caracterizado por sua capacidade antioxidante, além dos compostos bioativos por UHPLC-MS. O processamento térmico causou a degradação de ácidos graxos insaturados e aumentou o nível de óxidos de colesterol. No entanto, na maioria dos tratamentos, a oxidação lipídica foi mais pronunciada nas amostras com suco. O suco de limão induziu a oxidação do colesterol, principalmente em sardinhas preparadas em Air Fryer, onde o conteúdo total de óxidos de colesterol aumentou de  $699,75 \pm 3,90$  (controle) para  $1333,51 \pm 5,20$   $\mu\text{g} / \text{g}$  (suco de limão a 10%). Assim, os dados gerais sugerem que potenciais compostos antioxidantes podem ter sido degradados durante o aquecimento e o ambiente ácido pode ter induzido reações de oxidação.

**Palavras-chave:** ácidos graxos, produtos de oxidação do colesterol, antioxidantes naturais.

## ABSTRACT

MOREIRA DE CARVALHO, Isabella Oliveira Alves. **Use of Tahiti lemon juice (*Citrus latifolia*) as natural antioxidant during the thermal preparation of sardines (*Sardina pilchardus*) by different cooking methods.** 87p. Dissertation (Master in Food Science and Technology). Institute of Technology, Food Technology Department, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

In recent years, consumers are more concerned about their eating habits, boosting the search for functional foods. Marine fish are considered functional foods, due to the presence of high levels of n-3 polyunsaturated fatty acids. However, sardines contain appreciable concentrations of cholesterol which is highly susceptible to lipid oxidation. The formation of cholesterol oxides and the degradation of polyunsaturated fatty acids during thermal processing (thermo-oxidation) play an important role among the factors responsible for the loss of quality and nutritional characteristics of fish. In addition, the consumption of oxidized lipids has been the subject of research in the public health area, due to the correlation between their intake and the induction of pro-inflammatory effects and other chronic degenerative diseases. Thus, natural antioxidant components that can prevent or minimize the oxidation of marine fish during the thermal preparation are interesting alternatives. Tahiti lemon (*Citrus latifolia*) juice is extensively used in the culinary preparation of fish. In Brazil, lemon Tahiti is a fruit of great commercial relevance and widely available in retail markets. Besides that, studies have shown that lemon juice has antioxidant potential due to the presence of bioactive compounds. This study evaluated the impact of adding Tahiti lemon juice (5%, 10% and 15%) to sardine (*Sardina pilchardus*) fillets submitted to air frying, grilling, and deep-fat frying, regarding the unsaturated fatty acids and the cholesterol oxidation. Firstly, the juice extract was characterized by its antioxidant capacity and bioactive constituents. Thermal processing caused the degradation of unsaturated fatty acids and increased the cholesterol oxides level. However, in most treatments, lipid oxidation was more pronounced in samples with juice. Lemon juice induced cholesterol oxidation, mainly in air-fried sardines where the total content of cholesterol oxides increased from  $699.75 \pm 3.90$  (control) to  $1333.51 \pm 5.20$   $\mu\text{g/g}$  (10% lemon juice). Thus, the overall data suggests that potential antioxidant compounds may have been degraded during heating and the acid environment may have induced oxidative reactions.

**Keywords:** Fatty acids, cholesterol oxidation products, natural antioxidants.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA .....	4
1 SARDINHAS.....	5
2 LIPÍDIOS EM PESCADO.....	9
3 COLESTEROL E ÓXIDOS DE COLESTEROL.....	15
4 PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DO COLESTEROL E EFEITOS À SAÚDE .....	19
5 PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DO COLESTEROL EM PESCADO.....	21
6 ANTIOXIDANTES E PROCESSAMENTO TÉRMICO EM PESCADO.....	24
7 LIMÃO TAHITI ( <i>Citrus latifolia</i> ) .....	27
8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	31
CAPÍTULO II – ARTIGO ENVIADO A REVISTA “FOOD CHEMISTRY” .....	47
ABSTRACT.....	48
1 INTRODUCTION .....	49
2 MATERIALS AND METHODS .....	50
2.1. Chemicals, standards, and reagents.....	50
2.2. Tahiti lemon ( <i>Citrus latifolia</i> ).....	50
2.2.1. pH and total soluble solids content of lemon juice.....	51
2.2.2. Extract preparation .....	51
2.2.3. Total phenolic compounds.....	51
2.2.4. <i>In vitro</i> antioxidant capacity.....	51
2.2.5. Identification of bioactive compounds by UHPLC-ESI-MS .....	52
2.3. Sardines and samples preparation.....	53
2.3.1. Cooking methods .....	53
2.4. Analyses of the sardine samples .....	54
2.4.1. pH, moisture and total lipids.....	54
2.4.2. Fatty acid composition .....	54
2.4.3. Determination of cholesterol and cholesterol oxides.....	54



2.5 Statistical analysis.....	55
3 RESULTS AND DISCUSSION .....	55
3.1. Lemon juice analyses.....	55
3.1.1. pH and total soluble solids .....	55
3.1.2. Total content of phenolics and antioxidant capacity .....	55
3.1.3. Identification of bioactive compounds of lemon juice extract by UHPLC-ESI-MS .....	57
3.2. Sardines analyses .....	60
3.2.1. pH, moisture, and total lipid .....	60
3.2.2. Fatty acids .....	61
3.2.3. Cholesterol and cholesterol oxides .....	67
3.3. PCA analysis.....	73
4 CONCLUSION .....	75
5 REFERENCES .....	76
6 SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	80

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A sardinha europeia (*Sardina pilchardus*) pertence ao grupo de espécies marinhas mais capturadas no mundo (FAO, 2018). Além do baixo custo de mercado, contém um excelente valor nutricional, principalmente, devido aos teores de ácidos graxos poli-insaturados da série ômega-3, destacando a presença dos ácidos eicosapentanoico (EPA, C20:5) e docosaexaenóico (DHA, C22:6) (FAO, 2016). Os ácidos graxos da série ômega-3 ( $\omega$ -3) foram relacionados em diversas pesquisas a benefícios à saúde, como por exemplo, ao aprimoramento de funções cognitivas (ZHENG et al., 2013; SHAHIDI e AMBIGAIPALAN, 2018).

O preparo culinário das sardinhas pode ser executado de diferentes maneiras e com a aplicação de diferentes técnicas como: grelha, fritura por imersão em óleo ou através da aplicação de novas tecnologias, cujo emprego possibilita o preparo dos alimentos de uma forma rápida e sem a adição de óleos (como fritadeiras elétricas chamadas comercialmente de "Air fryer"). Porém, a aplicação do calor durante o preparo culinário da sardinha favorece reações químicas e físicas que alteram o valor nutricional desse alimento. Os ácidos graxos poli-insaturados e o colesterol são componentes quimicamente instáveis e presentes em quantidades significativas na sardinha verdadeira (SALDANHA, BENASSI e BRAGAGNOLO, 2008). Devido à instabilidade de suas estruturas químicas, os lipídios insaturados, quando aquecidos, sofrem reações de degradação e de oxidação, gerando produtos de oxidação lipídica, como os óxidos de colesterol (FERREIRA et al., 2017).

A ingestão dos óxidos de colesterol de origem exógena, provenientes dos alimentos, tem sido associada a efeitos prejudiciais à saúde como o desenvolvimento de eventos cardiovasculares, indução de efeitos pró-inflamatórios e doenças neurodegenerativas (LUCETTI et al., 2015; DORIA et al., 2016; KULIG et al., 2016; BARRIUSO, ANSORENA e ASTIASARÁN, 2017; OLIVIER et al., 2017; SATO et al., 2017). Desse modo, o controle da formação dos óxidos de colesterol, através do uso de antioxidantes, se faz necessário para que a ingestão destes compostos possa ser minimizada.

O interesse pela busca por novas fontes de antioxidantes naturais para a redução do uso dos sintéticos tem demonstrado que diversos produtos de origem vegetal apresentam um potencial significativo, além de efeitos benéficos à saúde (DE OLIVEIRA et al., 2018).

Tradicionalmente, o suco do limão Tahiti (*Citrus latifolia*) é utilizado para o preparo culinário de pescado. O potencial antioxidante do suco pode ser esclarecido a partir de sua composição química e dos compostos bioativos presentes. Assim, a utilização do suco de limão Tahiti como antioxidante natural pode minimizar a formação de óxidos de colesterol durante o preparo térmico das sardinhas em diferentes métodos de cocção.

O efeito do cozimento sobre a composição lipídica em peixes já foi esclarecido por inúmeros pesquisadores. Entretanto, não existem estudos sobre as possíveis alterações ocorridas na composição lipídica de sardinhas termicamente preparadas em diferentes técnicas de cocção (grelha elétrica, “Air fryer” e fritura por imersão em óleo) com a associação do suco de limão Tahiti empregado como antioxidante natural, justificando assim a realização do presente estudo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito da aplicação de três níveis de adição (5, 10 e 15%) do suco de limão Tahiti (*Citrus latifolia*), frente à oxidação lipídica em sardinhas preparadas em três métodos de cocção (grill elétrico, air fryer e fritura por imersão em óleo de soja).

### 2.2 Objetivos Específicos

- Determinar as características do suco do limão Tahiti através das análises de sólidos solúveis em graus Brix e pH;
- Determinar a capacidade antioxidante *in vitro* do suco do limão Tahiti a partir das análises de fenólicos totais, ORAC e sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e perfil dos compostos bioativos por UPLC-ESI-MS.
- Determinar a umidade e lipídios totais das sardinhas frescas, além da composição lipídica por análises de ácidos graxos, colesterol e produtos de oxidação do colesterol;
- Avaliar a alteração do pH das sardinhas frescas e nas amostras termicamente preparadas após a adição das concentrações de 5%; 10% e 15% de suco de limão Tahiti.
- Avaliar a degradação lipídica após o emprego de diferentes técnicas de cocção, a partir das análises: ácidos graxos, colesterol e óxidos de colesterol nas amostras controle (sem adição de suco de limão Tahiti) e nas amostras adicionadas com concentrações de 5%; 10% e 15% de suco de limão Tahiti.

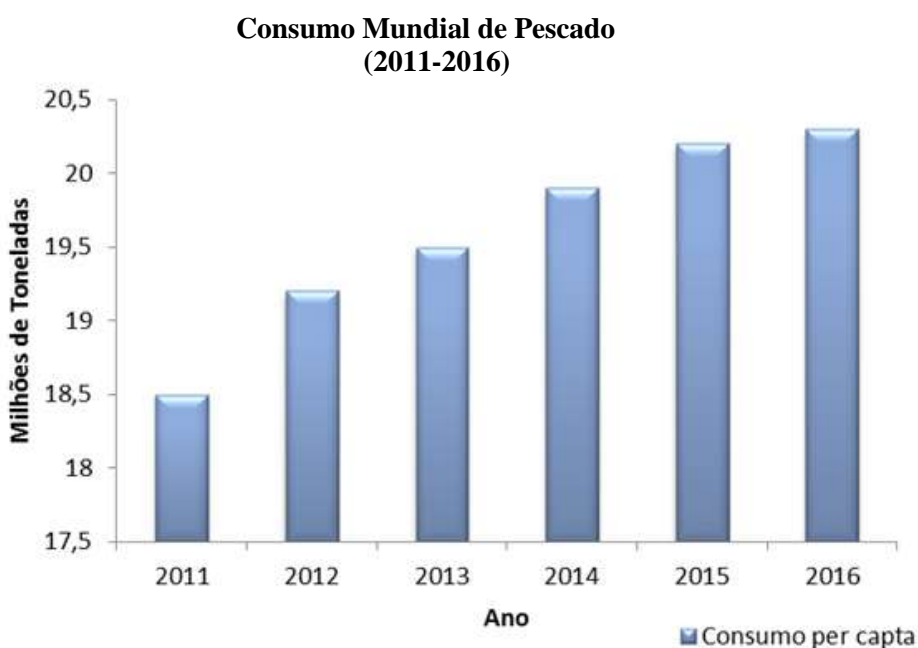
# **CAPÍTULO I**

## **REVISÃO DE LITERATURA**

## 1 SARDINHAS

A indústria da pesca possui grande relevância mundial, gerando empregos, renda e fornecendo alimentos que são fonte de proteínas de alta qualidade. Nas últimas décadas, tem sido observado o aumento do consumo mundial per capita de pescado, de 9,0 kg em 1961 a 20,2 kg em 2015, apresentando uma taxa de crescimento de cerca de 1,5% ao ano (Figura 1).

Em 2012, do total da produção de pescado oriunda do extrativismo, 87,2% eram de origem marinha e 12,8% de água doce (FAO, 2014). Em 2015, o pescado representou 17% de toda proteína animal consumida no mundo e a pesca marinha produziu 81,2 milhões de toneladas de pescado. Em 2016, a produção da pesca de captura foi de 90,9 milhões de toneladas e a pesca representou 87,2% (marinha) e 12,8% (continental) do total mundial (FAO, 2018).



**Figura 1:** Consumo Mundial de pescado: adaptação (FAO,2018).

O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA) define pescado como: peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, quelônios e mamíferos de água doce ou salgada destinados à alimentação humana (BRASIL, 2017, BRASIL, 2020). Segundo a FAO (2018), diferentes gêneros de sardinhas fazem parte do

grupo das 25 espécies mais capturadas de pescado, com grande importância econômica no mundo.

A sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) impulsiona a pesca e o setor de processamento de pescado no Brasil, principalmente nas regiões Sudeste e Sul, e se destaca devido ao baixo custo de mercado e ao excelente valor nutricional (IBAMA, 2013). No início dos anos 2000 houve uma grande redução no volume de captura, o que comprometeu a viabilidade comercial e preservação desse recurso pesqueiro (CERGOLE e DIAS-NETO, 2011, MARTINS et al., 2016). Assim, devido à crise de depleção do estoque marinho, foi estabelecido o período de defeso dessa espécie (entre 1/ Outubro a 28/ Fevereiro) (BRASIL, 2020). Desse modo, outras espécies do gênero *Sardinella*, como a sardinha europeia, também são utilizadas no setor de processamento no país (BRASIL, 2010). A sardinha europeia (*Sardina pilchardus*) (Walbaum, 1792), representada na Figura 2, é uma espécie de peixe pelágico de hábitos costeiros, pertencente à família Clupeidae. É uma das principais espécies de peixes pelágicos encontrados no ecossistema no nordeste do Oceano Atlântico, mar negro e mar Mediterrâneo (Figura 3) (SCOLES et al., 1998).



**Figura 2:** Sardinha Europeia (*Sardina pilchardus*)

A sardinha europeia, também conhecida como sardinha do Atlântico, apresenta como característica corpo cilíndrico alongado, azul ou verde prateado no dorso, prateado no ventre arredondado e manchas escuras arredondadas ao longo dos flancos superiores. Considerada como um pescado de pequeno porte, pode chegar 27,5 cm de comprimento, marcando a fase adulta a partir de 14 cm. De característica migratória, costuma nadar em cardumes organizados (OLST e HUNTER, 1970).

Encontradas em águas profundas (10-100 m), migram durante o dia e se alimentam à noite, exclusivamente de plâncton (microalgas e crustáceos). A pesca é de captura e principalmente realizada por redes de cerco, contudo, ocasionalmente é realizada por arrasto de fundo. Entre setembro-outubro acumula gordura para utilizar

como energia, necessária para a reprodução durante os meses seguintes, que ocorre preferencialmente em temperaturas de 14-15°C.



**Figura 3:** Mapa da distribuição da sardinha europeia

A Sardinha europeia é a segunda espécie mais capturada em Portugal, com grande importância econômica pelo seu valor nos desembarques e a sua utilização na indústria de conservas da Europa e de outros países (BANDARRA et al., 2018). O excelente valor nutricional atribuído às sardinhas deve-se à presença de proteínas de alto valor biológico e digestibilidade, vitaminas, minerais e por sua composição lipídica, com altos teores de ácidos graxos poli-insaturados da série ômega-3, especialmente os ácidos eicosapentanóico (EPA, C20:5) e docosaexaenóico (DHA, C22:6) (FAO, 2016). O consumo de ácidos graxos poli-insaturados foi relacionado a efeitos benéficos à saúde como atuação no combate ao estresse oxidativo hepático, doenças autoimunes, aprimoramento de funções cognitivas, melhora dos efeitos da depressão, além de promover melhora no perfil metabólico de indivíduos obesos (ZHENG et al., 2013; ZHANG; TSAO, 2016; ALBRACHT-SCHULTE et al., 2018; CALDER, 2018).

A composição química das sardinhas pode sofrer alterações por diversos fatores e por isso, o perfil dos ácidos graxos que são comumente encontrados, como o ácido mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1  $\omega$ 9), linoleico (C18:2  $\omega$ 6) e o araquidônico (C20:4  $\omega$ 6), pode sofrer variações de acordo com diversos fatores como: época do ano, condições ambientais, local de captura, sexo, alimentação, idade e estado fisiológico do animal, de acordo com as fases de maturação e desova (NUNES et al., 2008; SOM; RADHAKRISHNAN, 2013; BANDARRA et al., 2018).



Zlatanov e Laskaridis (2007), ao estudarem a variação sazonal do teor de ácidos graxos da sardinha europeia, observaram que a soma de ácidos graxos  $\omega$ -3 variou entre 30,49 a 40,86 g/100g de óleo de sardinha. Zotos et al. (2013) determinaram a soma dos ácidos eicosapentanoico (EPA) e docosaexaenoico (DHA) de 33,03% do teor total de lipídios da sardinha europeia. Além disso, a soma de ácidos graxos  $\omega$ -3 representou 36,51% do teor total de lipídios e as somas de ácidos graxos poli-insaturados e monoinsaturados representaram 40,44% e 21,42%, respectivamente.

Em conjunto com o conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados, as sardinhas também apresentam elevados teores de colesterol (CARDENIA et al., 2013; DANTAS et al., 2015). Segundo Zotos e Vouzanidou (2013) o teor de colesterol na sardinha variou de 67,31 a 43,39 mg/100g de colesterol em diferentes meses do ano. O conteúdo total de colesterol para *S. pilchardus* segundo Zotos et al. (2016) foi de 206,7 mg/100 g em base seca. Maiores teores foram encontrados para filés de sardinha (*S. brasiliensis*) por Ferreira et al. (2017) e por Saldanha e Bragagnolo (2010), que variaram entre 136,4 a 237,2 mg/100g e entre 327 mg/100g a 342 mg/100g em base seca, respectivamente.

A presença dos lipídios insaturados torna a sardinha europeia suscetível à oxidação lipídica, principalmente durante o tratamento térmico, alterando sua qualidade nutricional devido à degradação dos ácidos graxos essenciais e por consequente formação de produtos de oxidação potencialmente tóxicos (DORIA et al., 2016; KULIG et al., 2016).

## 2 LIPÍDIOS EM PESCADO

Devido a sua composição nutricional, o pescado marinho tem sido objeto de pesquisa ao longo dos anos. Os fatores que influenciam o perfil nutricional de espécies marinhas, a presença de proteínas de alto valor biológico e a composição lipídica, continuam gerando interesse da comunidade científica (GRIGORAKIS, 2017; XU et al., 2018; RIVERO-RAMIREZ et al., 2020).

Contudo, alterações da composição do pescado marinho podem ocorrer por diversos fatores inter e intra-espécie, tais como idade, sexo, alimentação, origem, estação do ano, condições de vida e fase fisiológica do animal (SALDANHA, BENASSI e BRAGAGNOLO, 2008). Além disso, o período de reprodução e de desova pode interferir ainda mais nos teores de lipídios desses animais. Antes da desova, ocorre o acúmulo de energia através de reservas lipídicas nos tecidos musculares e que, durante a desova, são esgotadas (USYDUS; SZLIFDER-RICHERT; ADAMCZYK, 2012).

O termo "lipídios" se refere a um grupo de compostos químicos que têm em comum a insolubilidade em água e a solubilidade em solventes orgânicos. Porém, muitas substâncias se encaixam nessa definição, e por isso, os lipídios possuem diferentes classificações. Essas moléculas podem ser classificadas por propriedades físicas em temperatura ambiente, por polaridade, essencialidade ou por propriedades estruturais.

Os ácidos graxos, presentes no pescado marinho, raramente são encontrados em sua forma livre nos alimentos, mas geralmente esterificados com moléculas de glicerol (SILVA; TASSI; PASCOAL, 2016). Estes podem ser classificados como saturados (com ausência de ligações duplas) ou insaturados (com a presença de uma ou mais ligações em sua cadeia carbônica). Quanto maior a cadeia de ácidos graxos saturados, maior será a sua insolubilidade. Os ácidos graxos insaturados possuem duas configurações possíveis, *cis* e *trans*, e na natureza são preferencialmente encontrados na posição *cis* (SILVA; TASSI; PASCOAL, 2016). Os ácidos graxos poli-insaturados são classificados de acordo com a posição das suas ligações duplas, quando se numera a cadeia carbônica a partir do grupo metílico (-CH<sub>3</sub>). Os ácidos graxos essenciais são os pertencentes às famílias ômega-6 e ômega-3, destacando os ácidos linoléico (C18:2) e araquidônico (C20:4) e os ácidos  $\alpha$ -linolénico (C18:3), eicosapentaenóico (EPA, C20:5) e docosahexaenóico (DHA, C22:6) respectivamente (SILVA; TASSI; PASCOAL, 2016).

De acordo com o meio e com a presença de catalizadores, os lipídios podem sofrer reações de oxidação por ação enzimática, foto-oxidação ou auto-oxidação (SUÁREZ-JIMÉNEZ et al., 2016). A oxidação dos lipídios em pescado ocorre principalmente por ação do oxigênio e é iniciada por fatores como o calor, íon metálicos ou radicais livres. Espécies químicas instáveis e de alta reatividade, contendo elétrons não pareados, reagem com os ácidos graxos insaturados através de reações em cadeia. Reações de auto-oxidação possuem maior velocidade quando ocorrem em ácidos graxos insaturados ou poli-insaturados, porque as insaturações conferem menor energia de dissociação de hidrogênio dos átomos de carbono adjacentes, favorecendo a cadeia de reações de oxidação e a formação de radicais livres (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Os radicais formados continuam reagindo com o oxigênio, apresentando baixa energia de ativação pela presença de elétrons não pareados, resultando em radicais peróxidos. Por sua vez, os peróxidos promovem a formação de novos radicais livres em outras cadeias de ácidos graxos, formando novos peróxidos e hidroperóxidos (MEDINA-MEZA; BARNABA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2014; BARNABA et al., 2016). Com a redução de ácidos graxos no sistema, os radicais peróxidos e hidroperóxidos reagem entre si e dessas reações são formados compostos estáveis (NICKI et al., 2005). Álcoois, aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos podem ser gerados com a decomposição desses compostos (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

Os ácidos linoléico e  $\alpha$ -linolénico são necessários para a fluidez das membranas e são obtidos através de alimentos fonte, pois não podem ser sintetizados pelo organismo humano (SAHENA et al., 2009). Os ácidos graxos de cadeia longa EPA (C20:5) e DHA (C22:6), podem ser sintetizados a partir dos ácidos linoléico e  $\alpha$ -linolénico presentes na dieta (GORJÃO et al., 2009; PATTERSON et al., 2012). Entretanto, produção de EPA e DHA é muito limitada em seres humanos, desta forma, para atender a demanda fisiológica e a ingestão adequada, devem ser obtidos exclusivamente através da dieta (CALDER, 2017; HANSEN, VIK e SERHAN, 2019, DIAS e ALVES, 2019).

Os ácidos linoléico e  $\alpha$ -linolénico podem ser encontrados em óleos vegetais, em alguns óleos de algas, mas principalmente, em peixes de água fria (atum, salmão, sardinha, bacalhau), considerados alimentos fonte de EPA e DHA (CALDER, 2014). O consumo regular de alimentos fonte de lipídios insaturados e ácidos graxos essenciais tem sido associado a eventos fisiológicos, já que estes são indispensáveis para a síntese de mediadores da inflamação como prostaglandinas, eicosanoides, leucotrienos e tromboxanos (FAO, 2010; BHANGLE e KOLASINSKI, 2011; LI et al., 2014).

Efeitos benéficos do consumo regular desses ácidos graxos têm sido registrados por pesquisadores ao longo dos anos, como combate ao estresse oxidativo durante a resistência à insulina, inflamações, doenças pulmonares, câncer, efeitos imunomoduladores, prevenção do desenvolvimento de aterosclerose, hipertrigliceremia, hipertensão e menor risco de desenvolvimento de síndrome metabólica (GRANOT et al., 2011, LEE et al. 2013; RAATZ et al., 2013; ZHENG et al., 2013; LOZOVY; SIMÃO; MORIMOTO, 2015; PITTAWAY; CHUANG; AHUJA, 2015; ABBOTT et al., 2016; JANG; PARK, 2020; VALLE FLORE et al. 2020). Dentre os ácidos graxos essenciais, o ômega-3 é considerado como adjuvante no tratamento da hipertrigliceridemia e, segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2017), a ingestão de ômega-3 (EPA e DHA) entre 2 a 4g ao dia, pode reduzir a concentração dos triacilgliceróis totais no sangue em até 25 a 30% (FALUDI et al., 2017). Logo, esses efeitos possuem correlação direta com a redução da mortalidade por doenças cardíacas, redução do número de infartos e do desenvolvimento de complicações cardíacas (LOZOVY; SIMÃO; MORIMOTO, 2015; PITTAWAY et al, 2015).

Segundo Innes e Calder (2020), estudos de coorte prospectivos de longo prazo demonstraram a associação do maior consumo de peixes gordos e ácidos graxos ômega-3 marinhos (EPA + DHA) com menor risco de desenvolver doenças cardiovasculares por efeito cardioprotetor secundário, considerando as evidências do efeito modulador do EPA e do DHA na inflamação, agregação plaquetária, pressão arterial, perfil lipídico no sangue e função endotelial, considerados fatores de risco para doenças cardiovasculares.

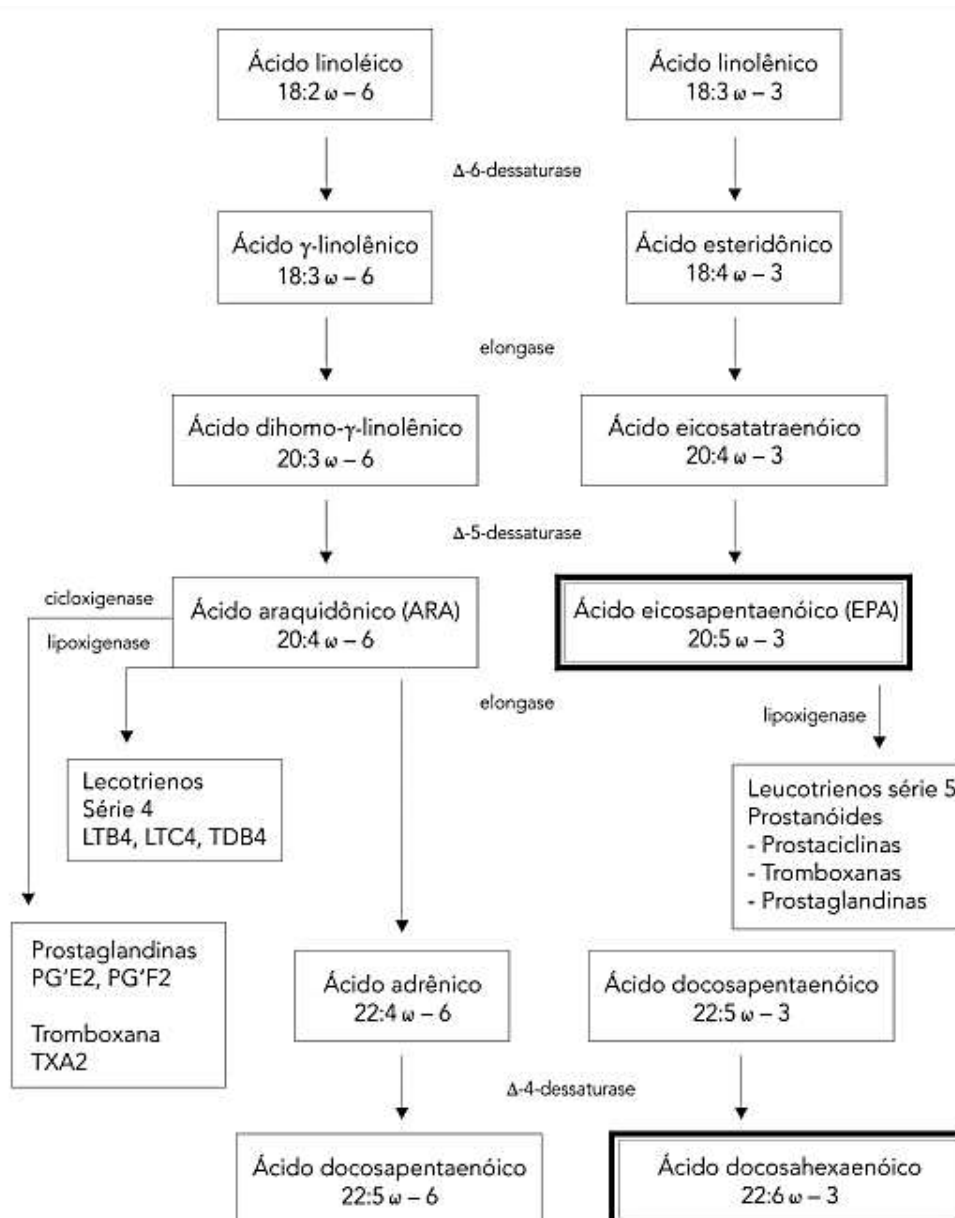
Um estudo prospectivo de 25 anos corroborou os achados de outros pesquisadores (LAURETANI et al., 2008; GOPINATH et al., 2011) ao observar a relação inversa do consumo de PUFA na dieta com a incidência de doença renal crônica (PARK et al., 2020). A relação inversa foi associada por modulação de resposta celular, como da inflamação, apoptose, migração, proliferação e diferenciação celular. Além disso, em revisão sistemática, a suplementação de PUFA ômega-3 demonstrou eficácia na redução da mortalidade em pacientes em hemodiálise (SAGLIMBENE et al. 2020).

O consumo dos ácidos graxos  $\omega$ -3, EPA e DHA, também apresentou importância na saúde de gestantes e crianças, visto que o aporte desses nutrientes, como o ácido docosahexaenóico, é fundamental para o desenvolvimento adequado do sistema visual e nervoso do feto (HURTADO et al., 2015). Outros pesquisadores observaram desfechos positivos de gravidez com o consumo de DHA sobre a incidência de nascimentos prematuros (MIDDLETON et al., 2019).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a ingestão de lipídios da dieta entre 20-35% do total de energia para indivíduos adultos se enquadra às recomendações para a ingestão adequada dos ácidos graxos essenciais (WHO, 2008). Dietas hipolipídicas ( $\leq 20\%$ ) tendem à ingestão inadequada de ácidos graxos essenciais, o que pode afetar o perfil lipídico nesses indivíduos, reduzindo os teores de HDL-colesterol.

Grupos populacionais como gestantes, lactantes e crianças devem ser orientados para o aumento da ingestão de alimentos fontes de ácidos graxos essenciais. Nesses grupos, ocorre uma demanda maior desses ácidos graxos pelos tecidos em desenvolvimento e por suas funções estruturais fundamentais para o desenvolvimento visual e neurológico (GOW; HIBBELN, 2014; NOGUEIRA-DE-ALMEIDA et al., 2014). A ingestão adequada dos ácidos EPA e DHA contribui no desenvolvimento mental, na melhora da capacidade de aprendizagem e redução de doenças psiquiátricas em adultos (SAHENA et al., 2009; CALDER, 2014).

A conversão dos ácidos graxos das famílias  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 em mediadores inflamatórios dependem das mesmas enzimas, e assim, ocorre competição enzimática pelas reações de dessaturação e alongamento de cadeia entre os mecanismos precursores de mediadores inflamatórios, conforme apresentado na figura 4 (SIMOPOULOS, 2020). Contudo, os eicosanoides derivados de ácidos graxos  $\omega$ -6 apresentam propriedades metabólicas pró-inflamatórias, opostas aos derivados de ácidos graxos  $\omega$ -3, que apresentam propriedades anti-inflamatorias (HANSEN, VIK e SERHAN, 2019; SIMOPOULOS, 2020).



**Figura 4:** Metabolismo dos ácidos graxos de cadeia longa (Adaptado de KUS, 2009).

A ingestão de ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 e a proporção destes na alimentação humana ainda são de interesse na comunidade científica, que por sua vez tem apontado para a recomendação da redução do consumo de ácidos graxos ômega-6, que é amplamente consumido no padrão da dieta ocidental e para o aumento do consumo de ácidos graxos ômega-3, particularmente de EPA e DHA (DEFILIPPIS; SPERLING, 2006; CANDELA; LÓPEZ; KOHEN, 2011; STROBEL; JAHREIS; KUHN, 2012). Os valores apresentados na tabela 1 demonstram diferentes recomendações da razão entre os

ácidos graxos  $\omega 6:\omega 3$ . Em sua maioria, os valores seguem a recomendação da FAO/OMS (1995) entre 5:1 e 10:1, apresentando a tendência para a recomendação de 4:1 e 5:1.

**Tabela 1:** Valores recomendados para a razão  $\omega 6:\omega 3$  na dieta (adaptado de MARTIN et al., 2006).

<b>País ou instituição</b>	<b>Razão <math>\omega 6:\omega 3</math> recomendada</b>	<b>Referências</b>
<b>WHO/FAO</b>	5:1 - 10:1	WHO
<b>Suécia</b>	3:1-9:1	NCM
<b>Japão</b>	2:1 - 4:1	Kris-Etherton et al.
<b>França</b>	5:1	Chardigny et al.
<b>Canadá</b>	4:1- 10:1	SCR
<b>EUA</b>	2:1 – 3:1	Simopoulos
<b>EUA</b>	4:1	Schaefer

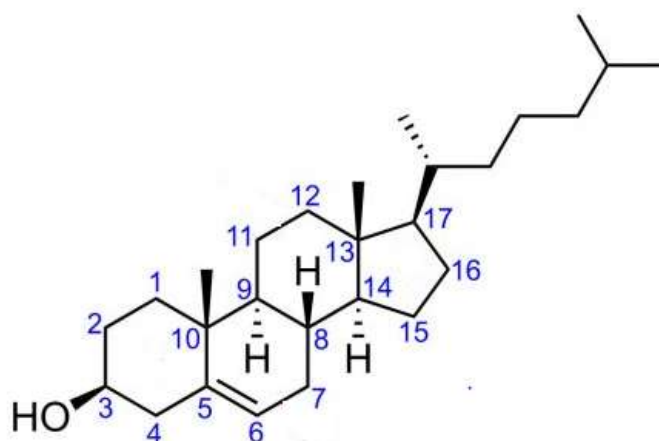
WHO= World Health Organization; FAO=Food and Agriculture Organization; SRC=Scientific Review Committee; NCM=Nordic Council of Ministers

Em diferentes países, devido ao padrão alimentar ocidental, existe um maior consumo de óleos vegetais e de alimentos ultraprocessados e assim, estima-se que a ingestão média da razão  $\omega 6:\omega 3$  pode variar entre 10:1 a 50:1 (SIMOPOULOS, 2004; MARTIN et al., 2006; DYDJOW-BENDEK, ZAGOŹDŹON, 2020). Estudos clínicos destacaram a importância da redução da razão  $\omega 6:\omega 3$  evidenciando a redução de inflamação quando a razão foi de 3 a 4:1 e a diminuição da taxa de mortalidade de pacientes com doença cardiovascular quando a razão foi de 4:1 (DE LORGERIL et al., 1994; JAMES e CLELAND, 1997; BROUGHTON et al., 1997, DIAS e ALVES, 2019).

Desse modo, o maior consumo de alimentos fonte PUFAs  $\omega$ -3 na dieta, como os peixes marinhos, resulta em uma diminuição da síntese de mediadores pró-inflamatórios derivados do ácido graxo linoleico (18:2  $\omega$  -6) e araquidônico (20:4  $\omega$  -6), o que favorece o aumento da formação dos eicosanóides derivados do EPA (20:5  $\omega$  -3) (FAO, 2010; LI et al., 2014). Logo, segundo os estudos apresentados, o equilíbrio dos ácidos graxos ômega-6 e ômega-3 na dieta e o consumo adequado de alimentos fonte de EPA e DHA são de grande relevância para a saúde.

### 3 COLESTEROL E ÓXIDOS DE COLESTEROL

Pertencente à família dos esteróis, o colesterol ( $C_{27}H_{46}O$ ) (Figura 5) é um composto presente nas células de origem animal e que está envolvido no transporte e metabolismo dos lipídios no organismo por participar das estruturas de lipoproteínas (HARPER; JACOBSON, 1999). Além dessa função biológica, o colesterol também atua no controle da permeabilidade e fluidez das membranas celulares e participa da síntese de ácidos biliares, de vitamina D e hormônios esteroides. A molécula de colesterol é alicíclica, composta por um núcleo ciclo-pentano-peridrofenantreno hidroxilado no carbono 3, com ligação dupla no carbono 5 e uma cadeia alifática ramificada com 8 carbonos no carbono 17 (NELSON e COX, 2010). Quimicamente, o colesterol pode ser encontrado em sua forma livre, combinado com ácidos graxos de cadeia longa ou na forma de ésteres de colesterol (MORZYCKI, 2014).



**Figura 5:** Estrutura química da molécula de colesterol

O colesterol está presente em apreciáveis concentrações em pescado (OSADA et al., 1993; SALDANHA et al., 2006; FERREIRA et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2020) e tem reconhecida instabilidade, que é influenciada por sua própria estrutura química, além da temperatura, pH, oxigênio, luz, presença de íons metálicos, dentre outros fatores. Estes agentes são promotores de transformações, tais como degradação e oxidação (BECKWITH, 1959; BASCOUL et al., 1986; SMITH, 1987). Desta forma, o preparo térmico e as condições de armazenamento determinam alterações na composição química



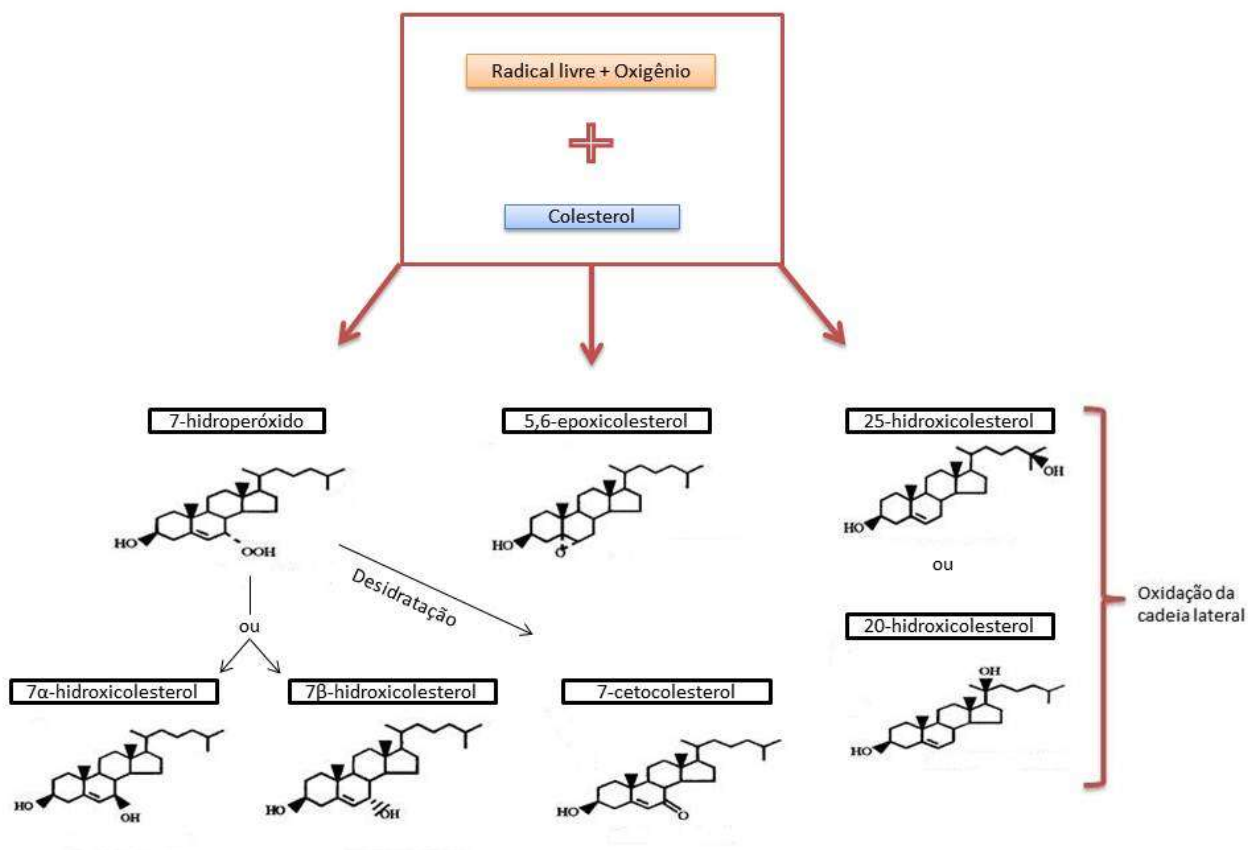
dos óleos de pescado, originando produtos de oxidação lipídica, denominados óxidos de colesterol.

Assim como ocorre com os lipídios insaturados, o processo de oxidação do colesterol também pode ser dividido em fases, denominadas de fases de iniciação, propagação e terminação. Durante o avanço da oxidação, reações em cadeia de alta complexidade ocorrem através da formação de radicais livres com oxigênio triplete e singlete (SMITH, 1987). Além dos radicais livres de oxigênio, outras espécies reativas podem oxidar o colesterol, como radicais hidroxilas ( $\text{OH}\bullet$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), alcóxilas ( $\text{RO}\bullet$ ), peróxilas ( $\text{ROO}\bullet$ ), e ozônio ( $\text{O}_3$ ) (SMITH, 1987).

Os produtos formados a partir da oxidação do colesterol (Figura 6), são principalmente originados da oxidação do carbono C-7, que, devido a insaturação da molécula entre os carbonos 5 e 6, é o carbono quimicamente mais disponível para a formação de radicais livres. Durante esse processo, os  $7\alpha$ - e  $7\beta$ -hidroperóxidos são formados simultaneamente, e por ser termodinamicamente mais estável, o  $7\beta$ -hidroperóxido é predominante. A partir da redução desses compostos, são formados álcoois correspondentes ( $7\alpha$ - e  $7\beta$ -hidroxicolesterol) e a 7-cetocolesterol (SMITH, 1987; CHIEN; WANG; CHEN, 1998.).

Os produtos de oxidação do colesterol (POCs)  $20\alpha$ -hidroxicolesterol e  $25$ -hidroxicolesterol são originados da oxidação dos carbonos C20 e C25 da cadeia lateral do colesterol (SMITH, 1987). Outros produtos de oxidação podem ser originados através da oxidação da cadeia lateral do colesterol como os  $20\beta$ -,  $24\alpha$ - e  $24\beta$ -,  $26\alpha$ - e  $26\beta$ -hidroperóxidos, formados principalmente quando o colesterol é fortemente oxidado pelo oxigênio (SMITH, 1987). Os  $5\alpha,6\alpha$ - e  $5\beta,6\beta$ -epoxicolesterolis, que são formados por mecanismos de reações mais complexos por reação a diferentes espécies de oxigênio ativas (GUMULKA; PYREK; SMITH, 1982; GUARDIOLA et al., 1996).

Os POCs foram encontrados em diversos alimentos de origem animal nas últimas décadas, como em pescado e em produtos de pescado, carnes e produtos de carne, leite e derivados e em ovos (MALDONADO-PEREIRA et al., 2018). A estabilidade desses compostos pode variar em diferentes graus conforme alterações de pH no meio em que estão expostos (MAERKER; BUNICK, 1987; KIM; NAWAR, 1993). Os POCs possuem semelhança molecular com a do colesterol, apresentando grupos funcionais adicionais (álcool, cetona e epóxi) sobre a cadeia lateral ou núcleo esteróide (MAERKER, 1987; SMITH, 1996).



**Figura 6:** Mecanismo de auto-oxidação do colesterol (Adaptado de SMITH, 1987).

O tempo e a temperatura de exposição de alimentos ricos em colesterol influenciam diretamente na degradação de colesterol e formação de POCs. Em temperaturas abaixo do ponto de fusão do colesterol (140°C), a molécula pode interagir e sofrer reações com outros compostos presentes na matriz alimentar, como ácidos graxos, vitaminas, pigmentos ou minerais (GUARDIOLA et al., 1995). Em temperaturas acima do ponto de fusão, ocorre alteração do estado físico do colesterol e por isso, a molécula se torna mais susceptível a interações, e conseqüentemente, facilitando processos de oxidação mais intensos. Com o tempo de exposição prolongado ou em temperaturas muito elevadas, além da degradação do colesterol, também pode ocorrer a degradação dos POCs em compostos ainda desconhecidos ou não identificados (PARK e ADDIS, 1986, KIM e NAWAR, 1993; HUR et al., 2007).

Barriuso et al. (2012) avaliaram a termo-oxidação do colesterol e observaram que o processo de termo-oxidação ocorre em temperaturas acima de 150 °C, que promove a fusão da molécula e conseqüente exposição a possíveis agentes oxidantes. O tratamento térmico do colesterol a 180°C por 1 hora levou a perda de 77% da concentração inicial

de colesterol. Foi constatado que quanto maior o tempo de aquecimento, maior será a razão de degradação do colesterol, com consequente formação dos produtos de degradação (7-cetocolesterol, 7 $\alpha$ - e 7 $\beta$ -hidroxicolesterol, 5,6 $\alpha$ -e 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol). Outros autores também demonstram que a exposição da molécula de colesterol a altas temperaturas favorece o processo de oxidação e a formação de POCs (LEAL-CASTAÑEDA, et al., 2017; DEREWIAKA e MOLINSK, 2015). Derewiaka (2019) ao aquecer o colesterol livre (padrão) a 150°C por 1h observou a drástica redução do teor de colesterol (64,1%) comparado a amostras não aquecidas. Perdas maiores do teor de colesterol (90,5%) foram observadas com o aquecimento a 180 °C por 1 h. Os POCs mais abundantes foram: 5, 6 $\alpha$ -epoxicolesterol e 7-cetocolesterol.

O comportamento do colesterol durante o aquecimento (130°C) na presença de triacilgliceróis foi avaliado por Kim e Nawar (1991). Em conjunto com triacilgliceróis o colesterol foi mais oxidado do que quando aquecido sozinho. Os autores concluíram que os ácidos graxos são oxidados primeiro. Dessa oxidação, são liberados radicais livres e peróxidos, contribuindo para as reações de oxidação do colesterol, inclusive em temperaturas abaixo do seu ponto de fusão, devido ao meio mais fluido originado da degradação dos ácidos graxos.

Ansorena et al. (2013) também observaram a interação de ácidos graxos na oxidação do colesterol a 180°C em sistema modelo e avaliaram a influência do grau de instauração dos triacilgliceróis durante esse processo. Os autores demonstraram que a degradação do colesterol foi acelerada na presença dos triacilgliceróis, alcançando a concentração máxima em 20 minutos de aquecimento. Contudo, reações de oxidação do colesterol foram mais lentas na presença de triacilgliceróis mais insaturados, alcançando o pico máximo de POCs em 120 minutos de aquecimento. Os óxidos predominantes foram o 7-cetocolesterol,  $\alpha$ -epoxicolesterol e  $\beta$ -epoxicolesterol.

Ainda não existem determinações ou regulamentações oficiais para condições de armazenamento e processamento que considerem a formação de POCs em alimentos (MALDONADO-PEREIRA et al., 2018). Além disso, as condições de exposição ao aquecimento e de temperatura que favorecem a formação de POCs em diferentes alimentos ainda estão sendo elucidadas. Monitorar e avaliar a formação desses compostos impulsiona novos caminhos para minimizar a ingestão dos POCs, como a utilização de novas fontes antioxidantes naturais durante o processamento de alimentos.

#### 4 PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DO COLESTEROL E EFEITOS À SAÚDE

O processamento de alimentos com altos teores de colesterol pode gerar o acúmulo de compostos oriundos de mecanismos de oxidação. O consumo regular desses compostos pode ser prejudicial à saúde humana. Existem evidências de que os POCs exerçam um papel regulador biológico, entretanto, seu papel fisiológico ainda é controverso, com efeitos prejudiciais atribuídos a esses compostos (GUARDIOLA et al., 1996; BROWN; JESSUP, 1999; LYONS et al., 1999; LEONARDUZZI; SOTTERO; POLI, 2002; VICENTE et al., 2012; POIROT; SILVENTE-POIROT, 2013; GEORGIU; CONSTANTINOU; KAPNISSI-CHRISTODOULOU, 2014; KHATIB; VAYA, 2014; HUR; NAM; MIN, 2014).

Os POCs podem ser produzidos por vias enzimáticas endogenamente e estão relacionados com a síntese de hormônios esteroides e ácidos biliares, sendo intermediários no transporte de esteróis dos tecidos periféricos ao fígado, além de servirem como biomarcadores da oxidação das lipoproteínas celulares (MIYOSHI et al., 2014; KULIG et al., 2016). Contudo, diferentes estudos apresentaram efeitos biológicos prejudiciais atribuídos à ingestão exógena dos POCs oriundos de fontes alimentares.

Efeitos biológicos foram comprovadamente relacionados à ingestão de óxidos de colesterol provenientes dos alimentos como inflamações, artrite reumatóide, citotoxicidade, aterogênese, carcinogênese e alterações das propriedades das membranas celulares afetando a sua fluidez, permeabilidade e estabilidade (DORIA et al., 2016; KULIG et al., 2016; BARRIUSO et al., 2017; SATO et al., 2017; MALDONADO-PEREIRA et al., 2018).

Devido à estrutura molecular similar à do colesterol, os POCs alteram a estrutura da membrana celular influenciando na sua estabilidade, permeabilidade e fluidez (NETO e CORDEIRO, 2016; MALDONADO-PEREIRA et al. 2018).

O 7-cetocolesterol foi correlacionado com a indução de apoptose celular em células neuronais, endoteliais e em células mesenquimais (JANG e LEE, 2011; KHATIB e VAYA, 2014; LEVY et al., 2014). Outros POCs induzem o estresse oxidativo, contribuindo para o desenvolvimento de diversas patologias envolvidas com danos no DNA, como o 5,6 $\alpha$ -epoxicolesterol e o 5,6 $\beta$ -epoxicolesterol, que demonstraram propriedades inflamatórias e pró-oxidativas (NELSON, CHANG e MCDONNELL, 2014; THANAN et al., 2014; MARWARHA et al., 2017; MALDONADO-PEREIRA et al. 2018).

Os POCs também estão associados a doenças degenerativas como Parkinson e Alzheimer, ao desenvolvimento de cânceres de cólon, mama, próstata e pele, como também à oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, que podem desencadear a progressão de placa aterosclerótica (Figura 7) (HUR et. al., 2014; DANTAS et. al., 2015, KULIG et. al., 2016; MARWARHA et al., 2017).

O processo de aterogênese e progressão de placas ateroscleróticas induzidas por POCs se inicia por modificação da função de barreira do endotélio vascular, que aumenta a permeabilidade vascular e induz a migração de macrófagos devido à penetração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e das plaquetas no endotélio. A proliferação de macrófagos no tecido vascular induz a oxidação da LDL, o que resulta na formação de células espumosas, que armazenam o colesterol e seus ésteres, formando as chamadas placas de ateromas (GUARDIOLA et al., 1996).

As LDLs oxidadas no endotélio dos vasos sanguíneos acumuladas levam a progressão do quadro, liberação de citocinas por macrófagos que contribuem para a vulnerabilidade e instabilidade das placas (POLI et al., 2009; KHATIB; VAYA, 2014).

Embora já se comprove os efeitos deletérios da ingestão dos POCs, ainda são necessários outros estudos para determinar o papel metabólico destes compostos, além da sua quantificação nos alimentos, o que permitiria recomendações oficiais de entidades da área de saúde.

## 5 PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DO COLESTEROL EM PESCADO

O preparo térmico de pescado agrega características organolépticas a esses alimentos e as técnicas utilizadas para o preparo e conservação podem levar à degradação do colesterol (DANTAS et al., 2015). Sabe-se que a presença de calor é um fator iniciador para a ocorrência da auto-oxidação dos lipídios, por isso, pesquisas tem investigado produtos de oxidação do colesterol (POCs) pela alta degradação do colesterol e de ácidos graxos durante o preparo térmico de pescado.

Diversos óxidos de colesterol já foram determinados em alimentos e desses, 12 foram encontrados em pescado (SALDANHA et. al., 2006; SALDANHA; BRAGAGNOLO, 2007; SALDANHA; BRAGAGNOLO, 2008; SALDANHA; BRAGAGNOLO, 2010; DANTAS et. al., 2015; FERREIRA et. al., 2017).

Ohshima e Koizumi (1993) observaram a formação de óxidos de produtos de oxidação do colesterol em diferentes produtos de pescado salgados, cozidos, defumados e secos no Japão. Maiores teores de produtos de oxidação do colesterol foram encontrados nas amostras de anchova cozida e seca (188.0 µg/g POCs em base seca) quando comparadas a amostras de camarão cozido e seco (8.3 µg/g POCs em base seca). A formação dos óxidos 7β-hidroxicolesterol e o 7-cetocolesterol foi predominante nessas amostras em relação aos outros produtos de oxidação.

O efeito do processamento de secagem ao sol e a formação de POCs foi avaliado por Chen e Yen (1994) que estudaram a formação de óxidos de colesterol em pescados secos ao sol (1 ou 2 dias em Taiwan) armazenados em temperatura ambiente por 3 meses das espécies *Spratelloides gracilis*, *Decapterus maruodsi* e *Spratelloides gracilis*. Os autores concluíram que as condições de processamento e armazenamento foram determinantes para a formação de POCs, como a presença de oxigênio e exposição à luz fluorescente por longo período de tempo. Os óxidos 7α-hidroxicolesterol, 7-hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol e 5,6α-epoxicolesterol foram identificados nas amostras.

Diferentes espécies de pescado e a formação de produtos de oxidação do colesterol após o preparo em grelha foram estudadas por Shozen et al. (1995). Amostras de lulas cozidas e secas, bacalhau do Norte e do Pacífico salgados, arenque do Pacífico seco, badejo japonês seco e “carapau” fermentado foram utilizadas. Após o processamento térmico ocorreu diminuição das concentrações de colesterol e simultâneo aumento da concentração de produtos de oxidação do colesterol. Foram identificados os óxidos: 5,6α-

epóxido, 5,6 $\beta$ - epóxido, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol. Em outro estudo, Ohshima et al. (1996) investigaram a formação de POCs em anchova cozida e seca após o processamento térmico em grelha (220 °C). Os produtos de oxidação identificados nas anchovas secas foram: 5,6  $\alpha$ -epóxido (22,3  $\mu\text{g/g}$ ), 5,6 $\beta$ -epóxido (61,9  $\mu\text{g/g}$ ), 7 $\beta$ -hidroxicolesterol (64,4  $\mu\text{g/g}$ ), 7-cetocolesterol (49,6  $\mu\text{g/g}$ ), e 25-hidroxicolesterol (11,8  $\mu\text{g/g}$ ), os resultados foram apresentados em base seca. Além disso, os autores observaram aumento dos teores de POCs totais após o aquecimento por 6 minutos.

Produtos de oxidação também foram encontrados em filés de salmão (*Salmo salar*) cozidos no vapor e em filés fritos em três tipos de óleo (óleo de oliva, óleo de milho e óleo vegetal “parcialmente hidrogenado”) (AL-SAGHIR et al., 2004). As concentrações de óxidos aumentaram significativamente após os processos de cozimento de 0,9  $\mu\text{g/g}$  na amostra crua para valores entre 4.0 a 9.0  $\mu\text{g/g}$  de óleo extraído das amostras após o processamento. O 7-cetocolesterol foi o óxido que apresentou maior concentração nas amostras, seguido do 7 $\beta$ -hidroxicolesterol. Os pesquisadores também atribuíram uma relação direta entre a exposição ao calor e a formação de óxidos de colesterol.

A presença de óxidos de colesterol após aquecimento de pescado também foi avaliada por Echarte et al. (2005), que avaliaram a presença de óxidos de colesterol em camarões (*Penaeus vannamei*) grelhados. Os óxidos 7-cetocolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol, 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol,  $\alpha$ -epoxicolesterol,  $\beta$ -epoxicolesterol e 25-hidroxicolesterol foram identificados e após o processamento térmico, maiores teores de POCs foram quantificados nas amostras comercializadas resfriadas em comparação com as amostras comercializadas congeladas (13,06  $\mu\text{g/g}$  e 55,43  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente).

A formação de produtos de oxidação do colesterol em amostras de bacalhau seco e salgado (*Gadus morhua*) foi estudada por Saldanha et al. (2006), que identificaram os óxidos: 5,6 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 5,6 $\beta$ -hidroxicolesterol, 19-hidroxicolesterol, 20 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 22(R)- hidroxicolesterol, 24 (S)-hidroxicolesterol, 22(S)-hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol, 25(R)-hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol, 7 $\beta$ hidroxicolesterol e 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol. Em outro estudo, Saldanha et. al. (2008), ao estudarem os efeitos do preparo térmico na grelha de sardinhas (*Sardinella brasilienses*) in natura e após armazenagem sob congelamento durante 120 dias, identificaram 6 produtos de oxidação do colesterol (19-hidroxicolesterol, 24(S)-hidroxicolesterol, 22(S)-hidroxicolesterol, 25- hidroxicolesterol, 25(R) hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol). As amostras foram analisadas a cada 30 dias e a formação de POCs ocorreu

concomitantemente à diminuição do teor de colesterol nas amostras (177,9 µg/g POCs nas amostras grelhadas). Nesse estudo foi observado um aumento de 53% do total de óxidos após preparo das sardinhas na grelha.

Saldanha e Bragagnolo (2010) estudaram a formação de POCs em pescada e sardinha grelhadas. Foi observado a formação de óxidos originados da cadeia lateral do colesterol e dentre os óxidos encontrados após o tratamento térmico, foram determinados o 22S hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol, 25R -hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol.

A formação de óxidos de colesterol em camarão pitu frito em óleo de soja foi estudada por Simon et al. (2012) Após a fritura, não foi observado alteração na formação e concentração de produtos de colesterol. Tal resultado foi associado ao baixo teor de colesterol nas amostras estudadas.

Freitas et al. (2015) observaram a formação de 7-cetocolesterol em filés de duas espécies de peixes (*Merluccius hubbsi* e *Cynoscion leiarchus*) submetidos a diferentes métodos de cozimento (assados em forno elétrico ou de microondas, grelhados, assados em forno de convecção, assados a vapor; fervidos, grelhados e fritos). O 7-cetocolesterol foi identificado em todas as amostras em concentrações diferentes dependendo do método de cozimento e maiores concentrações foram observadas após exposição às temperaturas mais altas e por maior período de tempo.

A formação de óxidos de colesterol e o efeito da aplicação do calor também foi estudado por Leal-Castañeda et al. (2017). Os autores avaliaram os efeitos do aquecimento em forno convencional, a 180 °C durante 20 minutos em um sistema modelo contendo colesterol e óleo de peixe (2,5 mg de colesterol/g de óleo) e foi observado um aumento significativo no conteúdo total de óxidos de colesterol após o tratamento térmico, apresentando principalmente óxidos 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol.

Ferreira et. al. (2017) realizaram análises em sardinhas preparadas em panela do tipo “Air fryer” ajustada para 180°C e os resultados mostraram uma diminuição significativa nos teores de ácidos graxos poli-insaturados e altos níveis de formação de óxidos de colesterol. Após o processamento térmico foram encontrados 10 produtos de oxidação do colesterol e um aumento 78,3% do total de POCs em comparação com as amostras controle.

As condições de preparo do pescado, como o tempo e a temperatura empregados, são fatores que interferem diretamente na formação de produtos de oxidação do colesterol. Dessa forma, através dos estudos apresentados, pode-se inferir que a aplicação



do tratamento térmico em altas temperaturas em matrizes alimentares que contenham o colesterol, como em pescado, favorece a formação dos óxidos de colesterol.

## 6 ANTIOXIDANTES E PROCESSAMENTO TÉRMICO EM PESCADO

A maioria dos alimentos de origem animal é submetida a processos que expõem as moléculas de colesterol à oxidação lipídica, aumentando o consumo de produtos de oxidação do colesterol pelos consumidores. Assim, o uso de antioxidantes nesses alimentos pode inibir a formação desses compostos, evitando danos à saúde associados à ingestão dos mesmos (OLIVEIRA, et. al., 2018).

Os compostos que podem retardar ou inibir as reações oxidativas, atuando na etapa de iniciação ou de propagação da oxidação lipídica, são denominados como antioxidantes (SHAHIDI; ZHONG, 2010; KUMAR et al., 2015). Os antioxidantes são utilizados em diversos alimentos, e sua origem pode ser natural ou sintética. A utilização dos antioxidantes sintéticos como butilidroxianisol (BHA), butilidroxitolueno (BHT), galato de propila (GP) e *terc*-butilidroquinona (TBHQ), foi associada a efeitos prejudiciais à saúde dos consumidores por sua toxicidade e por seus efeitos cancerígenos (ESKANDANI; HAMISHEHKAR; DOLATABADI, 2014; DE; CHATTERJEE, 2015; MATUMOTO-PINTRO et. al., 2017).

Os antioxidantes naturais são o grupo de substâncias bioativas, como compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides, taninos e terpenos, que podem ser encontrados nos alimentos *in natura* de origem vegetal (BARBIERI et. al., 2017). Ao contrário dos antioxidantes sintéticos, os de origem natural têm sido associados ao seu valor nutricional e suas propriedades terapêuticas (CALEJA et. al., 2016; BARNABA; MEDINA-MEZA, 2019).

Os antioxidantes naturais são amplamente distribuídos em frutas e vegetais, além de incorporarem sabor e aroma aos alimentos. Esses compostos são caracterizados por pigmentos ou por produtos do metabolismo secundário das plantas, formados a partir de reações de defesa contra agressões ambientais (OROIAN; ESCRICHE, 2015). Além disso, alguns minerais (Se, Zn) e vitaminas (vitamina A, vitamina C e vitamina E) também são considerados como antioxidantes naturais (DE OLIVEIRA, et. al., 2018).

Os compostos fenólicos, comumente encontrados em alimentos de origem vegetal, são substâncias que possuem um anel aromático com uma ou mais hidroxilas e

que também podem apresentar outros grupos substituintes em sua estrutura, como ésteres e glicosídeos (BREWER, 2011; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2018). Esses compostos possuem alta capacidade de absorção de radicais, facilidade de doação do átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) de sua estrutura aromática e a habilidade da estrutura molecular de suportar um elétron não emparelhado, sem perder sua estabilidade (MCCLEMENTS; DECKER, 2010). Os principais constituintes fenólicos são ácidos fenólicos (ácidos gálico, cafeico e rosmarínico), diterpenos fenólicos (carnosol e ácido carnósico), flavonóides (quercetina, catequina, apigenina, kaempferol, naringenina e hesperetina) e óleos voláteis (eugenol, carvacrol, timol e mentol) (BREWER, 2011).

Estudos têm demonstrado os efeitos de antioxidantes naturais como protetores nos processos de oxidação lipídica, aumentando a durabilidade dos alimentos sem efeitos adversos à saúde (KUMAR et al., 2015; RAEISI, et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2020; MIRA-SÁNCHEZ ET AL. 2020). Em alimentos contendo lipídios insaturados e colesterol, como no pescado, os antioxidantes naturais retardam a oxidação lipídica por duas vias principais: protegendo os lipídios dos iniciadores das reações em cadeia ou inibindo a oxidação na fase de propagação (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

A formação de produtos de oxidação do colesterol foi avaliada em carapau congelado (*Trachurus trachurus*) por Lebovics (2009). As amostras de peixe foram submetidas a uma solução aquosa contendo uma mistura de extratos vegetais de hissopo (*Hysoppus officinalis*), prunela (*Prunella vulgaris*), erva-cidreira (*Melissa officinalis*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e armazenados por 12 meses em temperatura de -20 °C. Foi observado a formação de 7-cetocolesterol, 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol durante o armazenamento, assim como o aumento da concentração desses produtos de oxidação. Contudo, os autores demonstraram uma inibição parcial da formação de óxidos de colesterol, pois as amostras que foram tratadas anteriormente com a solução de extratos vegetais apresentaram formação reduzida de 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol e 7 $\beta$ -hidroxicolesterol.

O efeito protetor do extrato aquoso da erva-cidreira (*Melissa officinalis*) também foi estudado por Barriuso et al. (2015). Os autores avaliaram a ação antioxidante durante a degradação do colesterol em sistemas modelo. O extrato foi adicionado em soluções padrão de colesterol (2 mg de extrato / 100 mg de colesterol). Após o aquecimento a 180 °C durante diferentes tempos (0, 10, 20, 30, 60, 120 e 180 min) as amostras controle mantiveram apenas 23% do colesterol e as amostras com o extrato natural 69%, demonstrando a ação protetora desse extrato natural durante a degradação do colesterol.

Figueiredo et al. (2015) demonstraram a inibição da oxidação do colesterol por sementes de urucum e pelo seu principal carotenoide (bixina) em arenque (*Clupea harengus*) ~~e~~ *harengus*) e em cavala (*Scomber scombrus*) processadas por alta pressão e durante o armazenamento a 5 °C por 14 dias. O efeito protetor dos compostos do urucum foi associado ao mecanismo antioxidante por doação de átomos de hidrogênio, comum em fenóis vegetais, quebrando a cadeia de oxidação. O efeito protetor da bixina, por ser um carotenóide, foi relacionado a capacidade de incorporação ao colesterol nas membranas celulares e sua ação antioxidante através da transferência de elétrons para radicais livres.

O efeito antioxidante da adição de sementes de erva-doce (*Foeniculum vulgare*), pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) e canela (*Cinnamomum verum*) em tilápia armazenada sob refrigeração por 5 semanas foi estudado por De e Chatterjee (2015). Após o armazenamento, as amostras que foram tratadas com especiarias apresentaram maior teor de colesterol do que as amostras controle, evidenciando a ação antioxidante dessas especiarias durante a oxidação do colesterol. A duração do efeito antioxidante variou entre os ingredientes estudados e apenas a canela apresentou efeito antioxidante ao término das 5 semanas. As sementes de erva-doce e pimenta-do-reino não apresentaram eficácia significativa após 25 dias.

Xu et al. (2016) avaliaram o efeito de diferentes antioxidantes em amostras de colesterol aquecidas a 160 °C por 1 hora. Entre os antioxidantes, nove compostos fenólicos foram avaliados (hesperetina, hesperidina, rutina, quercetina, naringenina, naringina, cafeína, ácido clorogênico e ácido ferúlico). Todos os compostos fenólicos foram eficazes para minimizar a formação de produtos de oxidação do colesterol. Os compostos rutina, quercetina, ácido clorogênico e ácido caféico apresentaram maior eficácia na proteção durante a degradação do colesterol.

A capacidade antioxidante do fruto mana-cubiu (*Solanum sessiliflorum*) foi estudada por Barriuso et al. (2016) em solução padrão de colesterol aquecida. Após aquecimento (180 °C por 7 min), a amostra de colesterol com o extrato vegetal apresentou o teor de óxidos de colesterol de 25 µg/ mg de colesterol, teor muito menor do que na amostra sem o extrato de mana-cubiu, que apresentou 227 µg/ mg de colesterol.

Tarvainen et al. (2016), investigaram o efeito de três diferentes extratos na proteção da oxidação do colesterol em salmão do Atlântico filetado durante o preparo térmico. O salmão foi aquecido na temperatura de 180 °C durante 20 minutos. Os extratos utilizados foram: extrato de folhas de alecrim, extrato de folhas de orégano e uma mistura

de extratos de sete ervas aromáticas (açafraão, orégano, lúpulo, cravo, salva, ajowan e alcaçuz). Após o processamento térmico foi quantificado o total de 14 µg/g de POCs nas amostras controle e valores inferiores foram quantificados em todas as amostras contendo os extratos naturais (<1 µg/g), confirmando o potencial dos antioxidantes naturais na inibição da formação de óxidos de colesterol.

Os efeitos de ervas frescas (salsa, cebolinha e cheiro-verde brasileiro) como antioxidantes naturais foram estudados por Ferreira et al. (2017) em amostras de sardinhas termicamente preparadas em fritadeira “Air Fryer”. Os autores concluíram que o processamento térmico diminuiu significativamente o teor de ácidos graxos essenciais e aumentou os níveis de óxidos de colesterol de 61,2% (sardinha crua) a 283 µg/g na amostra controle. Porém, o uso das ervas como antioxidantes naturais nas concentrações de 2% e 4% se mostrou eficaz para a redução dos níveis de óxidos de colesterol na maioria das amostras e o melhor efeito protetor da oxidação lipídica foi observado na adição de 4% de cheiro verde.

De Oliveira et al. (2020) avaliaram o efeito protetor de frutos de aroeira moída (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na oxidação do colesterol durante o aquecimento de óleo de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) a 150 e 180 °C em sistema modelo. Os autores demonstraram a eficácia dos frutos de aroeira contra oxidação lipídica, que apresentou efeito antioxidante protetor semelhante ao antioxidante sintético BHT.

Assim, os antioxidantes naturais têm sido estudados devido ao potencial de aplicação dos extratos vegetais como uma alternativa mais saudável ao uso dos antioxidantes sintéticos, agregando ainda características sensoriais geralmente apreciadas nos alimentos.

## **7 LIMÃO TAHITI (*Citrus latifolia*)**

Pertencente à família Rutaceae e do gênero *Citrus*, os frutos da espécie *Citrus latifolia*, são chamados popularmente de limão Tahiti, lima da pérsia ou lima ácida. Os frutos são geralmente de tamanho médio, apresentando uma casca lisa e fina, polpa esverdeada ou amarelo-esverdeada, tenra e succulenta quando maduros (aproximadamente 120 dias após a florada) e com raras sementes (COELHO et al., 1998). É um fruto de origem tropical, sendo popularmente conhecido por volta de 1875, na Califórnia (BARROS, 1986). Acredita-se que seu surgimento tenha ocorrido por meio de sementes de frutas cítricas importadas do Taiti. Como representado na Figura 8, na parte interna do fruto encontra-se a columela e o endocarpo (composto por vesículas de suco) e em direção

à parte externa, formando a casca, encontra-se o mesocarpo (albedo) e o epicarpo (glândulas de óleo e flavedo) (COELHO et al., 1998).



**Figura 7:** Morfologia do limão tahiti (*C. latifolia*)

O suco é ácido (pH entre 2 e 2,8), possui sabor cítrico e representa cerca de 50% do peso do fruto (DE MORAES BARROS; DE CASTRO FERREIRA; GENOVESE, 2012; DA SILVA et al., 2013). Na culinária o limão é utilizado como ingrediente de preparações tanto doces como salgadas, sendo muito apreciado quando utilizado como protagonista em tortas, sorvetes, sucos ou então harmonizando pratos como peixes, carnes e saladas, sendo muito apreciado como condimento (ZIENA, 2000). Devido às características de temperatura para a taxa de crescimento ideal da limeira ácida “Tahiti” (entre 25 a 31°C), as floradas são frequentes e contínuas, o que, por sua vez, acarretam em diversas colheitas durante o ano (LIM, 2012). Entre os meses de setembro e outubro ocorrem às florações mais abundantes com picos de produção concentrados entre janeiro e junho. A colheita deve ser realizada de 120 a 160 dias após a florada (Figura 9), quando o fruto estiver bem desenvolvido, porém ainda verde (CRUZ et al., 2008). No Brasil, a espécie foi introduzida em 1824 e até hoje, devido às condições climáticas e de plantio, se destaca como um dos frutos de maior importância econômica no país (COELHO et al., 1998).



**Figura 8:** Flores da limeira ácida “Tahiti”

O Brasil é um dos principais produtores de frutas cítricas na América Latina e as mais produzidas são as laranjas, tangerinas e os limões (FAO, 2017). Segundo dados da Pesquisa de Orçamento Familiar (IBGE, 2010), a aquisição de frutas cítricas representou 25% do total de frutos adquiridos por domicílios no país. O Brasil é considerado como o segundo maior produtor de limões no hemisfério sul e o limão Tahiti (*C. latifolia*) é uma variedade muito produzida, sendo a região Sudeste a principal produtora nacional, responsável por 79% do total de limão produzido no país (IBGE, 2016; FAO, 2017).

A capacidade antioxidante do suco do limão Tahiti é influenciada por sua composição química e seu conteúdo total de compostos bioativos, visto que pesquisas sugerem que a capacidade antioxidante de frutas cítricas, durante a peroxidação lipídica, está positivamente associada com seu conteúdo total de compostos fenólicos e ao seu conteúdo de ácido ascórbico (FRANKE et al., 2004, RANGEL et al., 2011; DE MORAES BARROS; DE CASTRO FERREIRA; GENOVESE, 2012; REKHA et al., 2012).

Os flavonoides (especialmente flavanonas, flavanonóis e flavonas) têm demonstrado melhor bioatividade quando comparados à outros metabólitos secundários (KRIS-ETHERTON et al., 2002; GIL-IZQUIERDO et al., 2004; BENAVENTE-GARCÍA e CASTILLO, 2008; RAASMAJA et.al., 2013; CASQUETE et al, 2015; LV et al., 2015).

Considerando que os flavonóides são sintetizados naturalmente pelos organismos vegetais em resposta a lesões físicas, infecções, estresse ou luz UV, sua composição pode variar dependendo das mudanças ambientais (AHANGER et al., 2020). A via biossintética geral dos fenóis se inicia com a conversão de fenilalanina ou tirosina em ácido p-cumárico. Através de reações subsequentes, este ácido pode ser transformado em flavonóides ou outros ácidos fenólicos (MARTENS; MITHOFER, 2005). Os flavonóides

são os compostos fenólicos mais abundantes em citros, sendo as flavanonas, a subclasse de flavonóides mais abundante nesses frutos (BENAVENTE-GARCÍA; CASTILLO, 2008; RAMOS-CHAN et al., 2017).

Os compostos bioativos encontrados no suco do limão Tahiti têm sido associados a um amplo espectro de efeitos promotores a saúde como: antioxidante, anti-inflamatório, antitumoral, bem como efeitos cardioprotetores, neuroprotetores e hepatoprotetores (GONZÁLEZ-MOLINA et al., 2010; CHENG et al., 2020; ZHAO et al. 2020).

De Moraes Barros, de Castro Ferreira e Genovese (2012) ao estudarem a capacidade antioxidante e conteúdo mineral da polpa e casca de frutas cítricas do Brasil, encontraram para o suco do limão Tahiti 41,4 mg/100 mL de ácido ascórbico e a capacidade redutora a partir de análises de fenólicos totais variou de 109,16 a 118,94 mg catequina equivalente / 100 g de peso seco. Já Rangel et. al. (2011) ao estudarem o valor nutricional do suco, quantificaram o conteúdo de ácido ascórbico na concentração de 22.86 mg/100 mL de suco.

Ledesma-Escobar et al. (2017) identificaram o total de 72 metabolitos secundários no suco do limão Tahiti. A concentração máxima de ácidos fenólicos foi observada no início dos estágios de maturação do fruto e a concentração máxima de flavanonas e flavonas foram observadas nos estágios finais de maturação. A máxima concentração dos flavonóis ocorreu entre os dois estágios de maturação. Nesse estudo, houve uma relação inversa entre a concentração de flavonoides e fenilalanina (o precursor na via biosintética dos flavonoides).

Pesquisas já descreveram as flavanonas como a subclasse mais abundante em frutas cítricas e sua predominância foi revisada por González-Molina et al. (2010) e confirmada por outros pesquisadores como Girons-Vilaplana; Moreno; Garca-Viguera, (2014), Ledesma-Escobar et al. (2018), Cheng et al. (2020).

Ledesma-Escobar et. al. (2017) apontaram a hesperidina, seguida de neoeriocitrina e naringenina, como os flavanonas mais abundantes no suco do limão Tahiti, e Da Silva et al. (2013) encontraram a concentração de 73,2 µg/mg de hesperidina no suco do limão Tahiti. Os mesmos autores (LEDESMA-ESCOBAR et al., 2018) em um estudo de análise direcionada das mudanças de concentração de compostos fenólicos durante o crescimento do limão Tahiti, confirmaram a predominância das flavanonas e que, dependendo do estágio de crescimento, as flavanonas representam entre 69,5 e 80,5% do total do conteúdo dos compostos fenólicos quantificados. Dentre os polifenóis quantificados foram determinadas as concentrações de hesperidina ( $2005 \pm 254$

$\mu\text{g g}^{-1}$ ), narirutina ( $1207 \pm 315 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e eriocitrina ( $1171 \pm 392 \mu\text{g g}^{-1}$ ). As flavonas foram a segunda subclasse mais abundante dos compostos fenólicos analisados, constituindo entre 7,8 e 17,7% do conteúdo de compostos fenólicos totais.

Contini et al. (2014) demonstraram como a ação de um antioxidante contendo extrato cítrico foi efetivo na redução da oxidação lipídica em carne de peru cozida durante o armazenamento e na manutenção de características sensoriais, prolongando a vida de prateleira do produto. A redução na oxidação lipídica pôde ser observada com o aumento da maciez da carne armazenada na embalagem ativa. O ácido cítrico foi o principal promotor da atividade antioxidante entre os componentes do extrato, que era composto por uma mistura que continha, entre outros componentes, as flavanonas, ácido cítrico, naringenina e neohesperidina. Os compostos utilizados já foram identificados no suco do limão Tahiti, o que indica o seu potencial como antioxidante natural em outras matrizes alimentares.

Desta forma, o emprego dos compostos antioxidantes em alimentos está associado ao seu mecanismo de ação, já que os mesmos podem atuar nas fases de iniciação ou de propagação da oxidação lipídica. A utilização de antioxidantes naturais permite manter ou melhorar a qualidade dos alimentos e suas características sensoriais durante o processamento e armazenamento dos mesmos. O desenvolvimento de técnicas para utilização de antioxidantes naturais em detrimento dos sintéticos é uma demanda dos consumidores e da legislação, sendo cada vez maiores as restrições ao uso de substâncias artificiais.

## 8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABBOTT, Kylie A. et al. Do  $\omega$ -3 PUFAs affect insulin resistance in a sex-specific manner? A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 104, n. 5, p. 1470-1484, 2016.

AHANGER, Mohammad Abass et al. Combined Kinetin and Spermidine Treatments Ameliorate Growth and Photosynthetic Inhibition in *Vigna angularis* by Up-Regulating Antioxidant and Nitrogen Metabolism under Cadmium Stress. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, p. 147, 2020.

ALBRACHT-SCHULTE, Kembra et al. Omega-3 fatty acids in obesity and metabolic syndrome: a mechanistic update. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 58, p. 1-16, 2018.



AL-SAGHIR, Sabri et al. Effects of different cooking procedures on lipid quality and cholesterol oxidation of farmed salmon fish (*Salmo salar*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 16, p. 5290-5296, 2004.

ANSORENA, Diana et al. Thermo-oxidation of cholesterol: effect of the unsaturation degree of the lipid matrix. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2757-2764, 2013.

AYORA-TALAVERA, Teresa Del Rosario et al. Evaluation of pectin extraction conditions and polyphenol profile from citrus x lantifolia waste: Potential application as functional ingredients. **Agriculture**, v. 7, n. 3, p. 28, 2017.

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

BARBIERI, Ramona et al. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. **Microbiological Research**, v. 196, p. 44-68, 2017.

BARNABA, Carlo et al. Cholesterol photo-oxidation: A chemical reaction network for kinetic modeling. **Steroids**, v. 116, p. 52-59, 2016.

BARNABA, Carlo; MEDINA-MEZA, Ilce G. Flavonoids Ability to Disrupt Inflammation Mediated by Lipid and Cholesterol Oxidation. In: **The Role of Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases**. Springer, Cham, 2019. p. 243-253.

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

BARRIUSO, Blanca et al. Role of *Melissa officinalis* in cholesterol oxidation: Antioxidant effect in model systems and application in beef patties. **Food Research International**, v. 69, p. 133-140, 2015.

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

BARRIUSO, Blanca et al. Sterols heating: Degradation and formation of their ring-structure polar oxidation products. **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 706-712, 2012.

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

BARROS, Cleide Bassani de; YABIKU, H. Y.; PINTO, AJD. **Óleos essenciais cítricos especificações**. Campinas, 1986.

BASCOUL, J. DOMERGUE, N., OLLE, M. De Paulet, A. C. Autoxidation of cholesterol in tallows heated under deep frying conditions: Evaluation of oxysterols by GLC and TLC-FID. **Lipids**, 21(6), 383-387, 1986.

BECKWITH, A. L. J. The oxidation of crystalline cholesterol. **Proceedings of the Chemical Society of London**, n. 7, p. 194-195, 1958.

BENAVENTE-GARCIA, O. Castillo, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56(15), 6185-6205, 2008.

BHANGLE, Samir; KOLASINSKI, Sharon L. Fish oil in rheumatic diseases. **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v. 37, n. 1, p. 77-84, 2011.

BRASIL (2010). Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Conservas de Sardinhas. Brasília: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 406, de 10 de agosto de 2010.

BRASIL, Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, 2011. Disponível: <[http://www.mpa.gov.br/files/docs/Boletim\\_MPA\\_2011\\_pub.pdf](http://www.mpa.gov.br/files/docs/Boletim_MPA_2011_pub.pdf)> Acesso em: 23/07/2018.

BRASIL. Instrução Normativa n. 18 de 10 de junho de 2020. Altera os arts. 4º e 5º da Instrução Normativa IBAMA nº 15, de 21 de maio de 2009, e estabelece regras de monitoramento para avaliação do novo período de defeso. Diário Oficial da União, Nº 111, sexta-feira, 12 de junho de 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA**. Brasília: MAPA, 2017. p. 39-43. Aprovado pelo Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017.

**BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA. Brasília: MAPA, 2020. Aprovado pelo Decreto nº 10.468, de 18 de agosto de 2020.**

BREWER, M. S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 221-247, 2011.

BROWN, Andrew J.; JESSUP, Wendy. Oxysterols and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 142, n. 1, p. 1-28, 1999.

CALDER, Philip C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, n. 5, p. 1105-1115, 2017.

CALDER, Philip C. Very long chain omega-3 (n-3) fatty acids and human health. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, n. 10, p. 1280-1300, 2014.

CALDER, Philip C. Very long-chain n-3 fatty acids and human health: fact, fiction and the future. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 77, n. 1, p. 52-72, 2018.

CALEJA, Cristina et al. Fortification of yogurts with different antioxidant preservatives: A comparative study between natural and synthetic additives. **Food Chemistry**, v. 210, p. 262-268, 2016.

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

CASQUETE, Rocío et al. Evaluation of the effect of high pressure on total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of citrus peels. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 31, p. 37-44, 2015.

CERGOLE, Maria Cristina; DIAS-NETO, José. Plano de gestão para o uso sustentável da sardinha-verdadeira *Sardinella brasiliensis* no Brasil. **Brasília: Ibama**, 2011.

CHARDIGNY, Jean Michel; BRETILLON, Lionel; SÉBÉDIO, Jean-Louis. New insights in health effects of trans  $\alpha$ -linolenic acid isomers in humans. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 103, n. 7, p. 478-482, 2001.

CHEN, J.-S.; YEN, G.-C. Cholesterol oxidation products in small sun-dried fish. **Food Chemistry**, v. 50, p. 167-170, 1994.

CHENG, Liping et al. Citrus fruits are rich in flavonoids for immunoregulation and potential targeting ACE2. 2020.

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

COELHO, Y. et al. A cultura do limão-taiti. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 1998.

CONTINI, Claudia et al. Effect of an active packaging with citrus extract on lipid oxidation and sensory quality of cooked turkey meat. **Meat Science**, v. 96, n. 3, p. 1171-1176, 2014.

CRUZ, Maria do Céu Monteiro da et al. Influência do paclobutrazol e da temperatura ambiente sobre o florescimento e frutificação da limeira ácida 'Tahiti'. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 4, p. 1148-1153, 2008.

DA SILVA, Camila Morais Gonçalves et al. Enhancement of the antioxidant activity of orange and lime juices by flavonoid enzymatic de-glycosylation. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 308-314, 2013.

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

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

DE LEONARDIS, Antonella; MACCIOLA, Vincenzo. A study on the lipid fraction of Adriatic sardine filets (*Sardina pilchardus*). **Food/Nahrung**, v. 48, n. 3, p. 209-212, 2004.

DE MORAES BARROS, Helena Rudge; DE CASTRO FERREIRA, Tânia Aparecida Pinto; GENOVESE, Maria Inés. Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 1892-1898, 2012.

DE OLIVEIRA, Vanessa Sales et al. Effect of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) fruit against polyunsaturated fatty acids and cholesterol thermo-oxidation in model systems containing sardine oil (*Sardinella brasiliensis*). **Food Research International**, v. 132, p. 109091, 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, n. 6, p. 1465-1483, 2018.

DE, Banani; CHATTERJEE, Suchanda. Impact of assorted spices on lipid quality alteration of refrigerated fish muscle. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 1, 2015.

DEFILIPPIS, Andrew P.; SPERLING, Laurence S. Understanding omega-3's. **American Heart Journal**, v. 151, n. 3, p. 564-570, 2006.

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

DEREWIAKA, Dorota. Formation of Cholesterol Oxidation Products, Cholesterol Dimers and Cholestadienes After Thermal Processing of Cholesterol Standards and Butter. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 121, n. 9, p. 1800373, 2019.

DIAS, Débora Borges; ALVES, Thaisy Cristina Honorato Santos. Avaliação do perfil lipídico de fórmulas enterais utilizadas em um hospital filantrópico de Salvador-BA. **Revista da Associação Brasileira de Nutrição-RASBRAN**, v. 10, n. 1, p. 22-30, 2019.

DORIA, Margaux et al. Contribution of cholesterol and oxysterols to the pathophysiology of Parkinson's disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 101, p. 393-400, 2016.

ECHARTE, M.; CONCHILLO, A.; ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I. Óxidos de colesterol en langostinos frescos y congelados, crudos y a la plancha. **Nutricion Hospitalaria**, v. 20, p. 293-296, 2005.

ESKANDANI, Morteza; HAMISHEHKAR, Hamed; DOLATABADI, Jafar Ezzati Nazhad. Cytotoxicity and DNA damage properties of tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. **Food Chemistry**, v. 153, p. 315-320, 2014.

FALUDI, André Arpad et al. Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose-2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 2, p. 1-76, 2017.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2014a). **The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges**. Roma: FAO.

FAO, Food. Agriculture Organization of the United Nations, The State of World. **Fisheries and Aquaculture**. FAO: Rome, 2016.

FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. **Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible**. Roma. 2018.Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

FAO. Food and Agricultural Organization of the United Nations. **Fats and fatty acids in human nutrition**. Rome, 2010.

FAO.. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. **Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible**. Roma. 2018. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

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

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

FRANKE, Silvia Isabel Rech et al. Study of antioxidant and mutagenic activity of different orange juices. **Food Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 45-55, 2004.

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

FRESH, FAO Citrus Fruit. Processed Statistical Bulletin 2016. **Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy**, p. 66, 2017.

GEORGIU, Christiana A.; CONSTANTINOU, Michalis S.; KAPNISSI-CHRISTODOULOU, Constantina P. Sample preparation: a critical step in the analysis of cholesterol oxidation products. **Food chemistry**, v. 145, p. 918-926, 2014.

GIL-IZQUIERDO, Angel et al. Effect of the rootstock and interstock grafted in lemon tree (*Citrus limon* (L.) Burm.) on the flavonoid content of lemon juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 2, p. 324-331, 2004.

GIRONÉS-VILAPLANA, Amadeo; MORENO, Diego A.; GARCÍA-VIGUERA, Cristina. Phytochemistry and biological activity of Spanish Citrus fruits. **Food & Function**, v. 5, n. 4, p. 764-772, 2014.

GÓMEZ CANDELA, C.; BERMEJO LÓPEZ, L. M.; LORIA KOHEN, V. Importancia del equilibrio del índice omega-6/omega-3 en el mantenimiento de un buen estado de salud: Recomendaciones nutricionales. **Nutrición Hospitalaria**, v. 26, n. 2, p. 323-329, 2011.

GONZÁLEZ-MOLINA, E. et al. Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 2, p. 327-345, 2010.

GOPINATH, Bamini et al. Consumption of long-chain n-3 PUFA,  $\alpha$ -linolenic acid and fish is associated with the prevalence of chronic kidney disease. **British Journal of Nutrition**, v. 105, n. 9, p. 1361-1368, 2011.

GORJÃO, Renata et al. Comparative effects of DHA and EPA on cell function. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 122, n. 1, p. 56-64, 2009.

GOW, Rachel V.; HIBBELN, Joseph R. Omega-3 fatty acid and nutrient deficits in adverse neurodevelopment and childhood behaviors. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics**, v. 23, n. 3, p. 555-590, 2014.

GRANOT, Esther et al. DHA supplementation during pregnancy and lactation affects infants' cellular but not humoral immune response. **Mediators of Inflammation**, v. 2011, 2011.

GRIGORAKIS, Kriton. Fillet proximate composition, lipid quality, yields, and organoleptic quality of Mediterranean-farmed marine fish: A review with emphasis on new species. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 14, p. 2956-2969, 2017.

GUARDIOLA, F. et al. Biological effects of oxysterols: current status. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, n. 2, p. 193-211, 1996.

GUARDIOLA, F. et al. Formación de derivados oxidados del colesterol en alimentos. **Grasas y Aceites**, v.46, n.3, p.202-212, 1995.

GUMULKA, Jerzy; PYREK, Jan St; SMITH, Leland L. Interception of discrete oxygen species in aqueous media by cholesterol: formation of cholesterol epoxides and secoosterols. **Lipids**, v. 17, n. 3, p. 197-203, 1982.

GW, AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. Rockville, MD: **AOAC International**, ISBN: 978-0-935584-87-5. 2016.

HANSEN, Trond Vidar; VIK, Anders; SERHAN, Charles N. The protectin family of specialized pro-resolving mediators: Potent immunoresolvents enabling innovative approaches to target obesity and diabetes. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1582, 2019.

HARPER, Charles R.; JACOBSON, Terry A. New perspectives on the management of low levels of high-density lipoprotein cholesterol. **Archives of Internal Medicine**, v. 159, n. 10, p. 1049-1057, 1999.

HSU, Kai-Yu; CHEN, Bing Huei. A comparative study on the formation of heterocyclic amines and cholesterol oxidation products in fried chicken fiber processed under different traditional conditions. **LWT**, p. 109300, 2020.

HUR, Sun Jin et al. Effects of dietary cholesterol and its oxidation products on pathological lesions and cholesterol and lipid oxidation in the rabbit liver. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

HUR, Sun-Jin; PARK, G. B.; JOO, S. T. Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products. **Food Control**, v. 18, n. 8, p. 939-947, 2007.

HURTADO, Jose A. et al. Effects of maternal  $\Omega$ -3 supplementation on fatty acids and on visual and cognitive development. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 61, n. 4, p. 472-480, 2015.

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

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal, 2016. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam> Acesso: 25/07/2018.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares 2008–2009: Despesas, rendimentos e condições de vida. 2010. Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

IKEGAMI, Tadashi et al. Increased serum oxysterol concentrations in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 446, n. 3, p. 736-740, 2014.

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

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

JANG, Haeun; PARK, Kyong. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids and metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis. **Clinical Nutrition**, v. 39, n. 3, p. 765-773, 2020.

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

KHATIB, Soliman; VAYA, Jacob. Oxysterols and symptomatic versus asymptomatic human atherosclerotic plaque. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 446, n. 3, p. 709-713, 2014.

KIM, S. K.; NAWAR, W. W. Oxidative interactions of cholesterol with triacylglycerols. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 68, n. 12, p. 931-934, 1991.

KIM, S. K.; NAWAR, W. W. Parameters influencing cholesterol oxidation. **Lipids**, v. 28, n. 10, p. 917-922, 1993.

KRIS-ETHERTON, Penny M. et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n. 9, p. 71-88, 2002.

KRIS-ETHERTON, Penny M. et al. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 1, p. 179S-188S, 2000.

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

KUMAR, Yogesh et al. Recent trends in the use of natural antioxidants for meat and meat products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 6, p. 796-812, 2015.

KUS, Mahyara Markievicz Mancio; AUED-PIMENTEL, Sabria; MANCINI-FILHO, Jorge. Comparação de métodos analíticos para determinação de lipídios e ácidos graxos polinsaturados por cromatografia gasosa em fórmula infantil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 68, n. 1, p. 12-20, 2009.

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

LAURETANI, Fulvio et al. Plasma polyunsaturated fatty acids and the decline of renal function. **Clinical Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 475-481, 2008.

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

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

LEBOVICS, Vera et al. Partial inhibition of cholesterol oxides formation in frozen fish pre-treated with a plant extract. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, n. 2, p. 342-348, 2009.

LEDESMA-ESCOBAR, C. A. et al. Changes in the composition of the polar fraction of Persian lime (*Citrus latifolia*) during fruit growth by LC-QTOF MS/MS analysis. **Food Chemistry**, v. 234, p. 262-268, 2017.

LEDESMA-ESCOBAR, Carlos A. et al. Targeted analysis of the concentration changes of phenolic compounds in persian lime (*Citrus latifolia*) during fruit growth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 8, p. 1813-1820, 2018.



LEE, Ho-Sun et al. Modulation of DNA methylation states and infant immune system by dietary supplementation with  $\omega$ -3 PUFA during pregnancy in an intervention study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 98, n. 2, p. 480-487, 2013.

LEONARDUZZI, Gabriella; SOTTERO, Barbara; POLI, Giuseppe. Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 12, p. 700-710, 2002.

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

LI, Kelei et al. Effect of marine-derived n-3 polyunsaturated fatty acids on C-reactive protein, interleukin 6 and tumor necrosis factor  $\alpha$ : a meta-analysis. **PloS One**, v. 9, n. 2, p. e88103, 2014.

LIM, T. K. Citrus latifolia. In: **Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants**. Springer, Dordrecht, 2012. p. 662-666.

LOZOVOY, Marcell Alysson Batisti et al. Fish oil N-3 fatty acids increase adiponectin and decrease leptin levels in patients with systemic lupus erythematosus. **Marine Drugs**, v. 13, n. 2, p. 1071-1083, 2015.

LUCHETTI, Francesca et al. 7-Ketocholesterol and 5, 6-secosterol induce human endothelial cell dysfunction by differential mechanisms. **Steroids**, v. 99, p. 204-211, 2015.

LV, Xinmiao et al. Citrus fruits as a treasure trove of active natural metabolites that potentially provide benefits for human health. **Chemistry Central Journal**, v. 9, n. 1, p. 68, 2015.

LYONS, Malcolm A. et al. Rapid hepatic metabolism of 7-ketocholesterol in vivo: implications for dietary oxysterols. **Journal of Lipid Research**, v. 40, n. 10, p. 1846-1857, 1999.

MAERKER, G. Cholesterol autoxidation-current status. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 64, n. 3, p. 388-392, 1987.

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

MARTENS, Stefan; MITHÖFER, Axel. Flavones and flavone synthases. **Phytochemistry**, v. 66, n. 20, p. 2399-2407, 2005.

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

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

MARWARHA, Gurdeep et al. 27-hydroxycholesterol: A novel player in molecular carcinogenesis of breast and prostate cancer. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 207, p. 108-126, 2017.

MATUMOTO-PINTRO, Paula Toshimi et al. Effects of storage time and temperature on lipid oxidation of egg powders enriched with natural antioxidants. **Food Chemistry**, v. 228, p. 463-468, 2017.

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

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

MIDDLETON, Philippa et al. Omega-3 Fatty Acid Addition During Pregnancy. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 74, n. 4, p. 189-191, 2019.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 48, n. 2, p. 91-91, 1971.

MIRA-SÁNCHEZ, María D.; CASTILLO-SÁNCHEZ, Julián; MORILLAS-RUIZ, Juana María. Comparative study of rosemary extracts and several synthetic and natural food antioxidants. Relevance of carnosic acid/carnosol ratio. **Food Chemistry**, v. 309, p. 125688, 2020.

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

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

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 2015.

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

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

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

NOGUEIRA-DE-ALMEIDA, C.A.; FILHO, D. R.; MELLO, E.D.; BERTOLUCCI, P. H. F.; FALCÃO, M.C. I Consenso da Associação Brasileira de Nutrologia sobre recomendações de DHA durante gestação, lactação e infância. *Anais de Congresso*

(XVIII Congresso Brasileiro de Nutrologia). **International Journal of Nutrology**, p. 1-13, 2014.

NORDISK RÅD. **Nordic Nutrition Recommendations 2004: Integrating Nutrition and Psysical Activity**. Nordic Council of Ministers, 2005.

NUNES, M. L. et al. Produtos da pesca: valor nutricional e importância para a saúde e bem-estar dos consumidores. **Publicações avulsas do IPIMAR**, v. 18, p. 1-77, 2008.

OHSHIMA, Toshiaki et al. Effects of grilling on formation of cholesterol oxides in seafood products rich in polyunsaturated fatty acids. **LWT-Food Science and Technology**, v. 29, n. 1-2, p. 94-99, 1996.

OHSHIMA, Toshiaki; LI, Nan; KOIZUMI, Chiaki. Oxidative decomposition of cholesterol in fish products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 70, n. 6, p. 595-600, 1993.

OLIVIER, Elodie et al. 25-Hydroxycholesterol induces both P2X7-dependent pyroptosis and caspase-dependent apoptosis in human skin model: New insights into degenerative pathways. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 207, p. 171-178, 2017.

OLST, Jon C. van; HUNTER, John R. Some aspects of the organization of fish schools. **Journal of the Fisheries Board of Canada**, v. 27, n. 7, p. 1225-1238, 1970.

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

OSADA, Kyoichi et al. Oxidation of cholesterol by heating. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 8, p. 1198-1202, 1993.

PARK, Inwhae et al. Intakes of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and non-fried fish in relation to incidence of chronic kidney disease in young adults: a 25-year follow-up. **European Journal of Nutrition**, v. 59, n. 1, p. 399-407, 2020.

PARK, S. Won; ADDIS, P. B. Further investigation of oxidized cholesterol derivatives in heated fats. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 5, p. 1380-1381, 1986.

PATTERSON, Elaine et al. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2012, 2012.

PITTAWAY, Jane K. et al. Omega-3 dietary fatty acid status of healthy older adults in Tasmania, Australia: An observational study. **The Journal of Nutrition, Health & Aging**, v. 19, n. 5, p. 505-510, 2015.

POIROT, Marc; SILVENTE-POIROT, Sandrine. Cholesterol-5, 6-epoxides: chemistry, biochemistry, metabolic fate and cancer. **Biochimie**, v. 95, n. 3, p. 622-631, 2013.

POLI, Giuseppe et al. Cholesterol oxidation products in the vascular remodeling due to atherosclerosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, n. 3, p. 180-189, 2009.

RAASMAJA, Atso et al. A water-alcohol extract of Citrus grandis whole fruits has beneficial metabolic effects in the obese Zucker rats fed with high fat/high cholesterol diet. **Food chemistry**, v. 138, n. 2-3, p. 1392-1399, 2013.

RAATZ, Susan K. et al. Issues of fish consumption for cardiovascular disease risk reduction. **Nutrients**, v. 5, n. 4, p. 1081-1097, 2013.

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

RANGEL, Carolina Netto et al. Nutritional value of organic acid lime juice (*Citrus latifolia* T.), cv. Tahiti. **Food Science and Technology**, v. 31, n. 4, p. 918-922, 2011.

REKHA, C. et al. Ascorbic acid, total phenol content and antioxidant activity of fresh juices of four ripe and unripe citrus fruits. **Chemical Science Transactions**, v. 1, n. 2, p. 303-310, 2012.

RIVERO-RAMIREZ, Fernando et al. Effects of dietary arachidonic acid in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) distal intestine lipid classes and gut health. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 681-697, 2020.

SAGLIMBENE, Valeria M. et al. Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acid intake in patients with chronic kidney disease: Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Clinical Nutrition**, v. 39, n. 2, p. 358-368, 2020.

SAHENA, F. et al. PUFAs in fish: extraction, fractionation, importance in health. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, n. 2, p. 59-74, 2009.

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

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

SALDANHA, Tatiana; 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. Effects of grilling on cholesterol oxide formation and fatty acids alterations in fish. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 2, p. 385-390, 2010.

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.

SATO, Yuta et al. 7-ketocholesterol induces apoptosis of MC3T3-E1 cells associated with reactive oxygen species generation, endoplasmic reticulum stress and caspase-3/7 dependent pathway. **Molecular Genetics and Metabolism Reports**, v. 10, p. 56-60, 2017.

SCHAEFER, Ernst J. Lipoproteins, nutrition, and heart disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 75, n. 2, p. 191-212, 2002.

SCOLES, D. S.; COLLETTE, Bruce B.; GRAVES, John E. Global phylogeography of mackerels of the genus *Scomber*. **Fishery Bulletin**, 1998.

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

SHAHIDI, Fereidoon; ZHONG, Ying. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 9, p. 930-940, 2010.

SHOZEN, K.; OHSHIMA, C.; USHIO, H. Formation of Cholesterol Oxides in Marine Fish Products Induced by Grilling. **Fisheries Science**, v. 61, n. 5, p. 817–821, 1995.

SILVA, C., TASSI, E., & PASCOAL, G. (2016). *Ciência dos Alimentos: princípios de bromatologia*. Editora: Rubio, 248p. Rio de Janeiro.

SIMON, S. J. G. B. et al. Interaction between soybean oil and the lipid fraction of fried pitu prawn. **LWT-Food Science and Technology**, v. 48, n. 1, p. 120-126, 2012.

SIMOPOULOS, Artemis P. Omega-6 and omega-3 fatty acids: Endocannabinoids, genetics and obesity. **OCL**, v. 27, p. 7, 2020.

SIMOPOULOS, Artemis P. Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. **Food Reviews International**, v. 20, n. 1, p. 77-90, 2004.

SMITH, Leland L. Review of progress in sterol oxidations: 1987–1995. **Lipids**, v. 31, n. 5, p. 453-487, 1996.

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

SOM, Chitra RS; RADHAKRISHNAN, C. K. Seasonal variation in the fatty acid composition of *Sardinella longiceps* and *Sardinella fimbriata*: **Implications for Nutrition and Pharmaceutical Industry**. 2013.

STROBEL, Claudia; JAHREIS, Gerhard; KUHNT, Katrin. Survey of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in fish and fish products. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 144, 2012.

SUÁREZ-JIMÉNEZ, Guadalupe Miroslava et al. Role of endogenous and exogenous tocopherols in the lipid stability of marine oil systems: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 1968, 2016.

TARVAINEN, Marko et al. CO<sub>2</sub> 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.

THANAN, R.; OIKAWA, S.; HIRAKU, Y.; OHNISHI, S.; MA, N.; PINLAOR, S.; USYDUS, Zygmunt; SZLIFDER-RICHERT, Joanna; ADAMCZYK, Maria. Variations in proximate composition and fatty acid profiles of Baltic sprat (*Sprattus sprattus balticus*). **Food Chemistry**, v. 130, n. 1, p. 97-103, 2012.

VALLE FLORES, José Antonio et al. Oral supplementation with omega-3 fatty acids and inflammation markers in patients with chronic kidney disease in hemodialysis. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, n. ja, 2020.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Interim summary of conclusions and dietary recommendations on total fat & fatty acids. **From the joint FAO/WHO expert consultation on fats and fatty acids in human nutrition**, p. 10-14, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Joint Consultation: fats and oils in human nutrition. **Nutr Rev**, v. 53, n. 7, p. 202-5, 1995.

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

XU, Houguo et al. Lipid contents in farmed fish are influenced by dietary DHA/EPA ratio: a study with the marine flatfish, tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). **Aquaculture**, v. 485, p. 183-190, 2018.

YONGVANIT, P.; KAWANISHI, S.; MURATA, M. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. **International Journal of Molecular Science**, v.16, p. 193-217, 2014.

ZHANG, Hua; TSAO, Rong. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 33-42, 2016.

ZHAO, Chengying et al. Biosynthesis of citrus flavonoids and their health effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 4, p. 566-583, 2020.

ZHENG, Ju-Sheng et al. Intake of fish and marine n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of breast cancer: meta-analysis of data from 21 independent prospective cohort studies. **Bmj**, v. 346, p. f3706, 2013.

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

ZIENA, H. M. S. Quality attributes of Bearss Seedless lime (*Citrus latifolia* Tan) juice during storage. **Food Chemistry**, v. 71, n. 2, p. 167-172, 2000.

ZLATANOS, Spiros; LASKARIDIS, Kostas. Seasonal variation in the fatty acid composition of three Mediterranean fish—sardine (*Sardina pilchardus*), anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and picarel (*Spicara smaris*). **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 725-728, 2007.

ZOTOS, Anastasios; GOTSIS, Dimitris; TSOLAKIS, Marta. The Effect of Prior Frozen Storage ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) on the Quality of Oven-Baked Sardines (*Sardina pilchardus*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 25, n. 2, p. 240-250, 2016.

ZOTOS, Anastasios; KOTARAS, Akylas; MIKRAS, Emmanouil. Effect of baking of sardine (*Sardina pilchardus*) and frying of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in olive and sunflower oil on their quality. **Food Science and Technology International**, v. 19, n. 1, p. 11-23, 2013.

ZOTOS, Anastasios; VOUZANIDOU, M. Seasonal changes in composition, fatty acid, cholesterol and mineral content of six highly commercial fish species of Greece. **Food Science and Technology International**, v. 18, n. 2, p. 139-149, 2012.

## **CAPÍTULO II**

**ARTIGO ENVIADO A REVISTA**

**“Food Chemistry”**

**EVALUATION OF TAHITI LEMON JUICE (*CITRUS LATIFOLIA*)  
AS A NATURAL ANTIOXIDANT ON THE CHOLESTEROL  
OXIDATION IN SARDINES (*SARDINA PILCHARDUS*)  
PREPARED USING CONVENTIONAL COOKING METHODS**



## ABSTRACT

Lemon juice is used to enhance the flavor of dishes prepared with fish, which is more prone to oxidation than other muscle food. This study evaluated the impact of adding Tahiti lemon juice to sardine fillets (*Sardina pilchardus*) submitted to air fryer, grill and deep-fat fryer, regarding the oxidation of unsaturated fatty acids and cholesterol. The juice extract was characterized by its antioxidant capacity and bioactive constituents by UHPLC-MS. Cooking caused the degradation of unsaturated fatty acids and increased the cholesterol oxides level. However, for most treatments, lipid oxidation was more pronounced in samples with juice. Lemon juice induced cholesterol oxidation, mainly in air-fried sardines where the total content of cholesterol oxides increased from  $699.75 \pm 3.9$  (control) to  $1333.51 \pm 5.2$   $\mu\text{g/g}$  (10% lemon juice). Thus, the overall data suggest that potential antioxidant compounds may have degraded during heating and the acid environment may have induced oxidative reactions.

**Keywords:** Tahiti lemon (*Citrus latifolia*), bioactive compounds, UHPLC-MS, thermo-oxidation, cholesterol oxides, fatty acids degradation.

## 1 INTRODUCTION

Fish and fish products are extremely prone to oxidation, since their lipid fraction presents high content of unsaturated compounds such as fatty acids and cholesterol (Saldanha, Benassi, & Bragagnolo, 2008; Ferreira et al., 2017). Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) of the *n*-3 series, mainly eicosapentaenoic (EPA, C20:5) and docosahexaenoic acid (DHA, C22:6), exert structural and regulatory physiological functions in the human body, being crucial to the neurological development and protecting against cardiovascular diseases (Calder, 2018). Cholesterol is also recognized as a key component of several biological processes (Sottero, Leonarduzzi, Testa, Gargiulo, Poli, & Biasi, 2019).

Although these unsaturated compounds play an important role in human health, they may undergo oxidative reactions when exposed to favorable factors such as oxygen, light and high temperature (Barriuso, Ansorena, & Astiasarán, 2017). Oxidative changes caused by heating compromise not only relevant fatty acids, but also result in the formation of mono- or polyoxygenated compounds, known as cholesterol oxidation products (COPs) or cholesterol oxides (Barriuso et al., 2017; Ferreira et al., 2017; de Oliveira et al., 2020).

Many cooking methods, commonly applied to prepare fish culinary dishes, have shown a strong impact on the dietary intake of COPs (Saldanha et al., 2008; Ferreira et al., 2017), which are associated with the development of inflammatory processes, cell death, atherosclerosis, carcinogenesis, and neurodegenerative diseases (Sottero et al., 2019; Anderson, Campo, Fulton, Corwin, Jerome, & O'Connor, 2020).

Consumption of COPs is a subject of remarkable importance in the food safety area. Therefore, in order to prevent or minimize lipid oxidation in food, antioxidants are widely used by the industry. Nonetheless, due to the growing consumer concern about the safety of synthetic additives, natural sources of antioxidants have been investigated as alternatives to limit oxidative reactions (de Oliveira et al., 2018).

Tahiti lemon (*Citrus latifolia*) has been reported due to its antioxidant potential that is related to the presence of bioactive compounds such as vitamin C, flavones and flavanones (Ledesma-Escobar, Priego-Capote, & Luque de Castro, 2015; Domínguez & Ordoñez, 2018). Its juice is extensively used in culinary procedures involving fish.

Regarding the bioactive constituents and antioxidant potential of lemon juice, it may be added to food matrices not only due to its sensory effects but also to act as a

natural antioxidant. However, there are no available studies on the effects of lemon juice addition on the lipid fraction of fish such as sardines (*Sardina pilchardus*), which are largely commercialized and consumed in Brazil.

In this context, the present study aimed to evaluate the cholesterol and PUFAs oxidation in sardines prepared using conventional cooking techniques (grill, deep-fat fryer, air fryer), as well as the impact of lemon juice addition on oxidative processes. The pH, soluble solids content, phenolic content, and antioxidant capacity of the lemon juice were analyzed. Additionally, the identification of some bioactive compounds of the lemon juice extract was performed by UHPLC-ESI-MS.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Chemicals, standards, and reagents

Tween-40, monobasic sodium phosphate and chloroform were obtained from Synth (São Paulo, Brazil), and AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride), Fluorescein was from Merck (Darmstadt, Germany). Linoleic acid,  $\beta$ -carotene, Folin-Ciocalteu reagent, Trolox, and gallic acid were acquired from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). All other chemicals were purchased from Vetec (Sigma, São Paulo, Brazil). All cholesterol oxide standards were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., U.S.A.), except 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol and cholesterol (Steraloids, Wilton, N.H., U.S.A.). Undecanoic methyl ester was from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., U.S.A.) and the standard fatty acid mixtures were from Supelco TM 37 (FAME Mix 18919, Bellefonte, Pa., U.S.A.). HPLC grade solvents were acquired as follows: formic acid (Synth, São Paulo, Brazil), methanol (Merck, Darmstadt, Germany), *n*-hexane and 2-propanol (Vetec, Sigma, São Paulo, Brazil).

### 2.2. Tahiti lemon (*Citrus latifolia*)

Five kilograms of Tahiti lemon (*Citrus latifolia*) were obtained from a local supply center (CEASA) located in Rio de Janeiro, Brazil, in February 2019. The lemons were selected considering their appearance (green color, smooth and uniform peel, absence of injuries) and washed in running water. The juice was obtained using a domestic fruit

juicer (Mondial Premium, Model E-02). Then, 3 L (60% yield) of juice was filtered through a 24 TY mesh sieve and stored in polypropylene packages (15 mL) at -18 °C, in the absence of light. The juice was stored for a maximum of one week. Then, it was used to determine pH, total soluble solids content, bioactive compounds, and antioxidant capacity, as well as to prepare the sardine samples.

### **2.2.1. pH and total soluble solids content of lemon juice**

The pH was determined using a pH meter (PHS-3E, IONLAB, ISRAEL) and the total soluble solids (TSS) with a refractometer (GT427, LORBEN, SINGAPORE) according to AOAC (2016).

### **2.2.2. Extract preparation**

The juice was centrifuged (NI 1813, Nova Instruments, Brazil) at 34,200 rpm for 20 min at 4 °C. Then, the supernatant was filtered through paper, transferred to a 50 mL volumetric flask.

### **2.2.3. Total phenolic compounds**

The total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method as described by de Oliveira et al. (2020). The Folin–Ciocalteu reagent (1mL) was mixed with the extract (1 mL) and distilled water (10 mL). After 3 minutes, a 10% sodium carbonate solution (1.5 mL) was added to the mixture and this solution was left to rest for 2 hours at room temperature in the dark. The absorbance was measured at 725 nm and the results were expressed as mg gallic acid equivalent (mg GAE)/mL of juice.

### **2.2.4. *In vitro* antioxidant capacity**

#### **2.2.4.1. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay**

The extract (50 µL, in 0.09 µM phosphate buffer) was incubated with the fluorescein solution (150 µL) at 37 °C. After 15 minutes, AAPH radical (50 µL) was added and fluorescence detection (ex. 485 nm/em. 535 nm) was measured every minute

for 1 hour (Ou, Hampsch-Woodill, & Prior, 2001). A curve of relative fluorescence intensity was used and ORAC values were expressed as Trolox equivalents ( $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$  of juice).

#### 2.2.4.2. $\beta$ -Carotene/linoleic acid assay

$\beta$ -carotene (20 mg) was dissolved in 1 mL of chloroform. Then,  $\beta$ -carotene methanolic solution (28  $\mu\text{L}$ ; 20 mg/mL) was homogenized with linoleic acid (28  $\mu\text{L}$ ) and Tween40 (200 mg). The chloroform was evaporated and distilled water saturated with oxygen was added. Readings were performed every 15 min at 50 °C and 470 nm (Miller, 1971). The percentage of oxidation inhibition (%I) was determined as described in the following equations (1, 2, and 3), where  $A_c$  and  $A_s$  are the absorbance of the control and samples, respectively:

$$A_c = \text{Initial absorbance} - \text{final absorbance} \quad (1)$$

$$A_s = \text{Initial absorbance} - \text{final absorbance} \quad (2)$$

$$\%I = (A_c - A_s / A_c) \times 100 \quad (3)$$

#### 2.2.5. Identification of bioactive compounds by UHPLC-ESI-MS

Aliquots (1 mL) of lemon juice were mixed 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  $\mu\text{m}$ ) and the bioactive compounds of lemon juice extract were determined by chromatographic analyses performed with an UHPLC Acquity chromatographer coupled to a triple-quadrupole mass spectrometer (Micromass, Waters, Manchester, England), with electrospray ionization (ESI) in the positive and negative ion modes. The conditions were established as reported by de Oliveira et al. (2020), with data acquisition between  $m/z$  100 and 900. MS/MS of selected peaks were acquired via collision-induced dissociation (CID) with collision energy of 30 V. For chromatographic separation, a C18 BEH Waters Acquity (2.1 mm x 50 mm x 1.7  $\mu\text{m}$ ) column at 30 °C was used. Regarding the mobile phases, phase A (0.1% formic acid) and B (methanol) were applied at a flow rate of 0.2 mL/min with a linear gradient starting at 5% B and increasing to up 100% methanol in 7.5 min, before holding until 9 min, and returning to the initial conditions, followed by column re-equilibration until 10 min.

## **2.3. Sardines and samples preparation**

Ten kilograms of fresh sardines (*Sardina pilchardus*) (SIF/DISPOA Registration No.0003 / 5042, lot 007) were donated by Nova Piracema (Niterói, Rio de Janeiro, Brazil), in March 2019. The sardines were transported in a refrigerated truck to UFRRJ (Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil).

The sardines were thawed and washed. Tail, fin, and head were removed, resulting in two fillets per sardine. Then, the fish samples were weighed and separated into 13 lots. A sample was analyzed the same day the sardines were obtained, corresponding to raw sardines. The other samples were packed in polyethylene films and stored at -18 °C until samples preparation at the next day.

For each cooking method, 4 batches of 5 sardine fillets were separated. The samples were prepared as follows: sardines without the addition of lemon juice (control) and sardines with the addition of lemon juice at concentrations of 5%, 10%, and 15%. The percentage of lemon juice was calculated according to the weight of each fillet. The lemon juice was added to the sardines, which were then turned over every 20 seconds for 3 min to guarantee the complete immersion and contact of the whole fillet with the juice. Then, the sardines were thermally prepared.

### **2.3.1. Cooking methods**

The cooking methods were applied immediately after sample preparation. The samples were cooked following the equipment instructions. For the Air fryer (George Foreman AF 2000, U.S.A), the samples were heated at 220 °C for 20 min without oil. For the grill (George Foreman GR20, U.S.A), the samples were heated at 175 °C for 5 min without oil. For the deep-fat fryer (Britânia, Brazil), the samples were heated at 180 °C for 7 min and soybean oil was used. The internal temperature ( $72\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ) was monitored using a digital thermometer (Incoterm 6132, Brazil). The cooked samples were ground and homogenized in a domestic processor, then aliquots were taken for analyses.

## **2.4. Analyses of the sardine samples**

### **2.4.1. pH, moisture and total lipids**

The pH, moisture, and total lipids were determined according to the AOAC procedures (AOAC, 2016).

### **2.4.2. Fatty acid composition**

The lipid fraction of samples was trans-esterified and converted into methyl esters (Zhu, Svendsen, Jaepelt, Moughan, & Rutherford, 2011). The chromatographic analyses were conducted using a gas chromatographer (Shimadzu GC 2010, Tokyo, Japan) with a flame ionization detector and a fused silica CP-SIL 88 capillary column (100 m x 0.25 mm i.d., 0.20 µm film thickness) (Chrompack, Middelburg, The Netherlands), operating in the split mode (1:50). The chromatographic conditions were established as described by de Oliveira et al. (2020).

### **2.4.3. Determination of cholesterol and cholesterol oxides**

Cholesterol and cholesterol oxides were obtained by direct saponification (Saldanha, Sawaya, Eberlin, & Bragagnolo, 2006). Chromatographic analyses were performed using a Waters device (Milford, MA, EUA), equipped with PDA/RID detectors, a tertiary solvent delivery system (Waters 600), and a software (Empower 2). The column was a CN Hyperchrome 250 mm x 4.3mm x 5.0 µm (Phenomenex, Colorado, USA) and the chromatographic conditions were established according to Ferreira et al. (2017).

The cholesterol oxides were confirmed using a UHPLC-MS-PDA (Shimadzu LCMS-2020, Tokyo, Japan), equipped with an autoinjector, Hypersil Cyano column (250 mm x 4.6 mm) (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), and Photodiode Array Detector (PDA). The chromatographic conditions were determined as reported by de Oliveira et al. (2020).

## **2.5 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 ( $p < 0.05$ ). Pearson's correlation test was used to evaluate the relation among variables (Teles et al., 2019). Finally, Principal Component Analysis (PCA) was carried out to evaluate variable-variable and variable-sample relationships and Hierarchical Clustering of Principal Components (HCPC) to group similar samples. PCA was conducted after data standardization to avoid the influence of variables with different magnitudes. All statistical analyses were performed using software R language.

## **3 RESULTS AND DISCUSSION**

### **3.1. Lemon juice analyses**

#### **3.1.1. pH and total soluble solids**

Lemon juice presented a pH value of  $2.18 \pm 0.02$  (Table 1), which is similar to that found by de Moraes Barros, Castro Ferreira, and Genovese (2012) that reported 2.32. Regarding the total soluble solids content,  $11.37 \pm 0.50$  °Brix was determined (Table 1). Previous studies described lower results such as 9.8 °Brix (de Moraes Barros et al., 2012) and 9.0 °Brix (Kieling & Prudencio, 2019). These differences may be due to the maturation stage of fruit that greatly influences their soluble solid content and pH value (McAtee, Karim, Schaffer, & David, 2013).

#### **3.1.2. Total content of phenolics and antioxidant capacity**

The total level of phenolics and antioxidant capacity determined by ORAC and  $\beta$ -carotene/linoleic acid assays of the lemon juice extract are shown in Table 1. The amount of total phenolics was  $23.33 \pm 0.18$  mg GAE/mL extract. Similar levels were reported by Ramos, Sánchez, Pérez, and Villafaña (2012), who found 25.85 and 27.07 mg GAE/mL for methanolic and ethanolic extracts of lemon juice, respectively. On the contrary, a



much lower value was determined by Duzzioni, Franco, Duzzioni, and De Sylos (2010), with a total phenolic content of 4.55 mg GAE/mL.

The lemon juice extract exhibited an ORAC value of  $309.30 \pm 3.97$   $\mu\text{mol TE}/100$  mL of juice. Seeram et al., (2008) analyzed different commercial ready-to-drink and the ORAC values ( $\mu\text{mol TE}/100$  mL of juice) showed were: Concord grape juice (2590); blueberry juice (2060); orange juice (740.0); iced green tea (170.0); iced black tea (50.0), and apple juice (120.0).

**Table 1:** pH value and total soluble solids of lemon juice. Total phenolics content and antioxidant capacity determined by ORAC and  $\beta$ -carotene/linoleic acid assays of lemon juice extract.

Method	Value
<b>pH</b>	$2.18 \pm 0.02$
<b>Total soluble solids</b> °Brix	$11.37 \pm 0.50$
<b>Total phenolics</b> mg GAE/mL of juice	$23.33 \pm 0.18$
<b>ORAC</b> $\mu\text{mol TE}/100$ mL of juice	$309.30 \pm 3.97$
<b><math>\beta</math>-carotene/linoleic acid</b> % oxidative inhibition	$6.90 \pm 1.21$

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

$\beta$ -carotene/linoleic acid assay showed a percentage of oxidative inhibition of  $6.90 \pm 1.21\%$ . Haraoui, Allem, Chaouche, and Belouazni (2019) evaluated ten varieties of *Citrus* juice fruits and reported percentages varying from 44.44 (*Citrus Clementine*) to 80.55% (*Citrus aurantium*).

Most studies concerning the antioxidant capacity of *Citrus latifolia* species are carried out on its peel and pulp. Although the methods applied herein are widely used in natural extracts, there is a lack of literature describing results obtained by ORAC and  $\beta$ -carotene/linoleic acid assays in Tahiti lemons. Numerous authors evaluated different *Citrus* species, as well as performed analyses under different conditions, making it difficult to compare the results found in the current study. Moreover, variable results may be due to the influence of the extraction procedure (solvent, time of extraction, temperature) and other aspects such as the plant origin, degree of maturation, environment conditions, and harvest time (Mcharek & Hanchi, 2017)

### 3.1.3. Identification of bioactive compounds of lemon juice extract by UHPLC-ESI-MS

The MS/MS spectra in the negative and positive ion modes of the compounds identified in lemon juice extract can be seen in Figure 1. Eleven compounds representing varied classes such as organic acids, phenolic acids, flavanols, flavones, and flavanones were found. Most of them were determined in the negative ion mode; however, two compounds were observed in the positive ion mode (Table 2).

Five flavones were identified in lemon juice extract. Three of them were detected in the negative ion mode, apigenin-6-8-di-C-glucoside ( $m/z$  593), luteolin-glucoside-rhamnoside ( $m/z$  595), and diosmetin-7-O-glucoside ( $m/z$  461), while diosmetin-glucoside-rhamnoside ( $m/z$  609) and apigenin-7-O-neohesperidoside ( $m/z$  579) were found in the positive ion mode. Previous studies also reported the presence of these components in citrus fruits (Mencherini et al., 2012; Ledesma-Escobar et al., 2015; Spínola, Pinto, & Castilho, 2015).

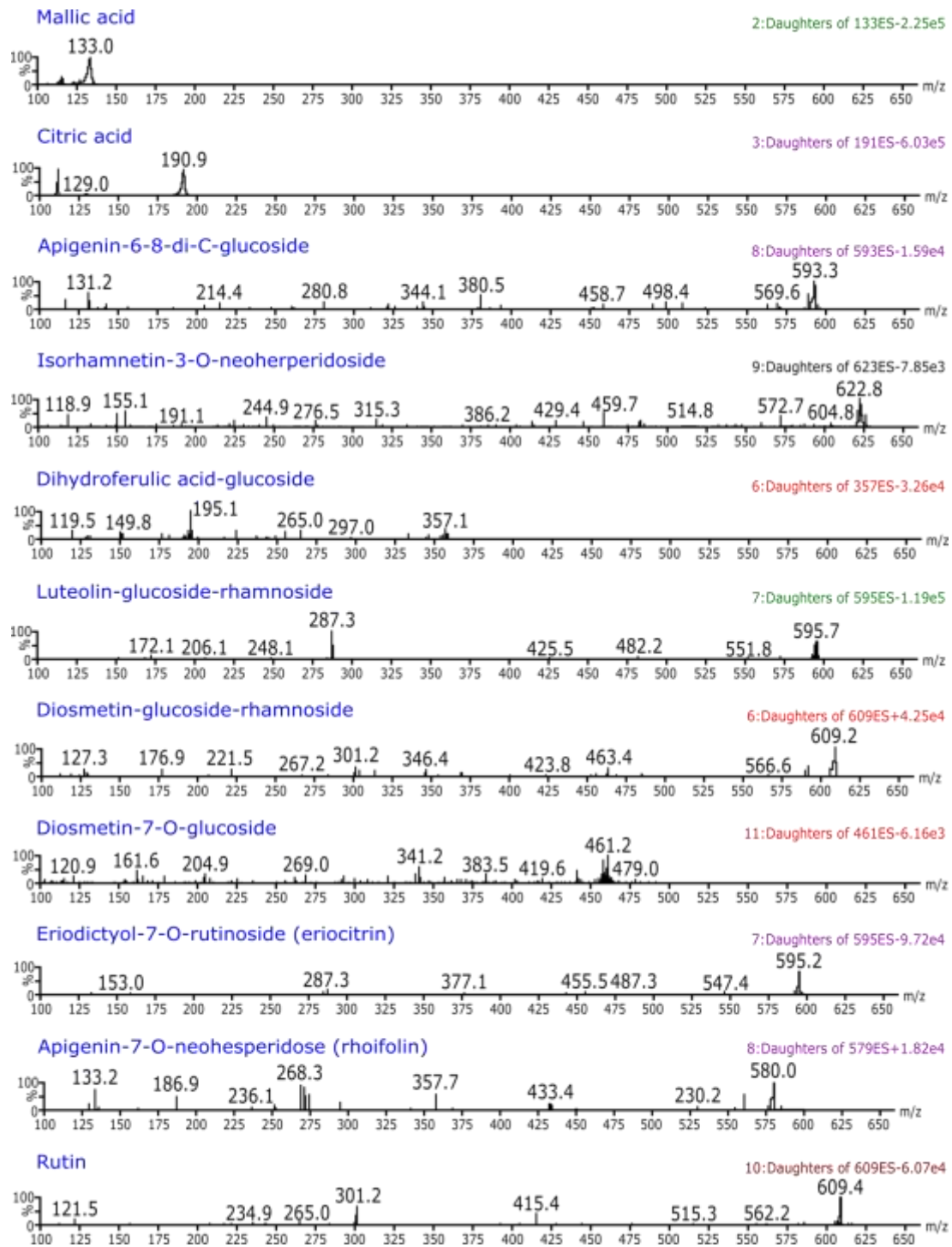
The flavanols, rutin ( $m/z$  609) and isorhamnetin-3-O-neohesperidoside ( $m/z$  623) were found in the negative ion mode, which is in agreement with Ledesma-Escobar et al. (2015) that also determined these compounds in Tahiti lemon. The flavanone Eriodictyol 7-O-rutinoside (eriocitrin) was identified at  $m/z$  595 in the negative ion mode (Spínola et al., 2015).

Malic and citric acids were detected in the negative ion mode at  $m/z$  133 and 191, respectively (Spínola et al., 2015). In addition, the phenolic acid dihydroferulic acid-glucoside ( $m/z$  357) was also determined, as described by Ledesma-Escobar et al. (2015).

Most of the identified compounds belong to the flavonoid group. Higher amounts of glycosylated flavonoids have been described in citrus fruits, being associated with many health benefits, such as protection against cardiovascular diseases and cancers (Testai & Calderone, 2017; Sharma et al., 2018). Moreover, flavonoids are extensively studied showing potential antioxidant properties (Nile, Keum, Nile, Jalde, & Patel, 2018).

Considering the presence of such bioactive compounds in lemon juice extract and consequent antioxidant potential, which was also assessed in the present study, lemon juice could be more than a flavor enhancer in fish-based dishes. Therefore, since there is an increasing interest in new sources of natural food additives, it is of great importance to investigate the effect of lemon juice addition on oxidative reactions in fish.

**Figure 1: MS/MS spectra in the negative and positive ion mode of selected compounds identified in lemon juice extract.**



**Table 2:** Proposed identification of bioactive compounds of lemon juice extract by UHPLC-ESI-MS.

ESI ion mode	RT (min)	Main ion ( <i>m/z</i> )	Fragment ions ( <i>m/z</i> )	Proposed identification	References
-	0.850	133	133	Malic acid	V. Spínola et al. (2015)
-	1.080	191	190.9	Citric acid	V. Spínola et al. (2015)
-	3.351	593	353.4	Apigenin-6-8-di- <i>C</i> -glucoside	V. Spínola et al. (2015)
-	3.485	623	622.8; 315.3	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -neohesperidoside	Ledesma-Escobar et al. (2015)
-	3.727	357	195.1	Dihydroferulic acid-glucoside	Ledesma-Escobar et al. (2015)
-	3.912	595	287.3	Luteolin-glucoside-rhamnoside	Ledesma-Escobar et al. (2015)
+	4.060	609	463.4; 301.2	Diosmetin-glucoside-rhamnoside	Ledesma-Escobar et al. (2015)
-	4.123	461	341.2	Diosmetin-7- <i>O</i> -glucoside	Ledesma-Escobar et al. (2015)
-	4.164	595	287.3	Eriodictyol 7- <i>O</i> -rutinoside (eriocitrin)	V. Spínola et al. (2015)
+	4.527	579	433.4	Apigenin-7- <i>O</i> -neohesperidose (rhoifolin)	Mencherini et al. (2012)
-	4.534	609	301.2	Rutin	Ledesma-Escobar et al. (2015)

\*RT= RETENTION TIME.

## 3.2. Sardines analyses

### 3.2.1. pH, moisture, and total lipid

The pH of raw sardines decreased as follows: control ( $6.23 \pm 0.12$ ) > 5% lemon juice ( $5.61 \pm 0.02$ ) > 10% lemon juice ( $5.40 \pm 0.02$ ) > 15% lemon juice ( $5.39 \pm 0.01$ ) (Supplementary material Table 1), which is explained by the low pH value of lemon juice described in item 3.1.1.

After cooking, the pH of the control sardines varied from  $6.26 \pm 0.01$  to  $6.41 \pm 0.02$ . In samples with the lemon juice, the pH values ranged from  $5.87 \pm 0.06$  to  $6.04 \pm 0.03$ . However, in most samples, no significant differences were determined among samples treated with different levels of addition, as well as among the cooking methods ( $p > 0.05$ ).

The moisture level of raw sardines was  $71.07 \pm 0.10$  g/100 g (Supplementary material Table 2), which was close to the one determined by Zotos, Gotsis, and Tsolakis (2016) (74.00 g/100 g). Cooking caused a reduction in the moisture level. Contents of  $48.55 \pm 0.89$  g/100 g (deep-fat fryer),  $50.91 \pm 1.22$  g/100 g (air fryer), and  $53.31 \pm 0.51$  g/100 g (grill) were determined in control samples. Air-fried samples presented a loss of approximately 29% of water in this study, while a decrease of 20% in the moisture level was assessed by Ferreira et al. (2017) in sardine fillets after air frying. These differences may be due to the different equipment and operating conditions used.

A similar trend was noticed in sardines treated with lemon juice, where values varied from  $41.00 \pm 0.05$  to  $46.90 \pm 0.56$  g/100 g, from  $55.18 \pm 0.36$  to  $56.39 \pm 0.64$  g/100 g, and from  $46.09 \pm 0.39$  to  $50.33 \pm 0.19$  g/100 g in air-fried, grilled, and deep-fried sardines, respectively.

The total lipid amount of raw sardines was  $27.11 \pm 0.15$  g/100 g (dry basis) (Supplementary material Table 2). Bandarra, Marçalo, Cordeiro, and Pousão-Ferreira (2018) compared the lipid fraction of wild and captive sardines and assessed levels ranging from 14 to 24.8 g/100 g. Variable values of lipid and moisture levels in raw samples may be expected, since the fish composition may be influenced by feeding and environmental conditions, age, catching season, fishing location, among other factors (Saldanha et al., 2008; Bandarra et al., 2018).

Thermally processed control sardines presented contents of  $15.91 \pm 0.94$ ,  $23.24 \pm 1.32$ , and  $28.95 \pm 1.51$  g/100 g (dry basis) for air-fried, grilled, and deep-fried sardines,

respectively. Air frying caused a greater reduction in lipid levels (41.32%) in comparison with grilling (14.28%). Percentages in the same range were previously determined in air-fried sardines, where losses ranged from 15.6% to 49% (Ferreira et al., 2017). Deep-fat frying caused an increase in the lipid level; however, no significant difference was observed between these samples and the raw ones ( $p>0.05$ ).

In samples treated with the lemon juice, the lipid contents varied from  $18.16 \pm 0.46$  to  $20.68 \pm 0.53$  g/100 g after grilling and from  $29.82 \pm 0.42$  to  $36.26 \pm 0.33$  g/100 g after deep-fat frying, where most samples were not significantly affected by the lemon addition ( $p>0.05$ ). The air-fried sardines had the lowest values, ranging from  $16.37 \pm 0.88$  to  $34.38 \pm 1.87$  g/100 g, showing the protective effect of the juice against lipid losses.

Contents obtained by both analyses did not present significant statistical differences among juice concentrations for most samples ( $p>0.05$ ). This indicates that the cooking method applied was more relevant than the added lemon juice concentration when considering its influence on the levels of moisture and total lipids.

### 3.2.2. Fatty acids

The main fatty acids determined in raw sardines were palmitic (C16:0,  $29.68 \pm 0.45$  g/100 g oil), eicosapentaenoic EPA (C20:5  $n_3$ ,  $17.67 \pm 0.7$  g/100 g oil), oleic (C18:1  $n_9c$ ,  $15.74 \pm 0.3$  g/100 g oil), and myristic (C14:0,  $11.69 \pm 0.9$  oil) (Table 3). The sum fatty acid levels of raw sardines increased in the following order: polyunsaturated (PUFA) ( $20.53 \pm 0.6$  g/100 g oil) < monounsaturated (MUFA) ( $28.30 \pm 0.4$  g/100 g oil) < saturated (SFA) ( $47.96 \pm 1.4$  g/100 g oil).

Heating modified the fatty acids concentration in control sardines. After air frying, the SFAs, MUFAs, and PUFAs contents decreased and reached concentrations of  $44.7 \pm 0.57$ ,  $26.11 \pm 0.0$ , and  $17.06 \pm 0.8$  g/100 g, respectively.

In grilled sardines, cooking increased SFAs ( $52.24 \pm 0.1$  g/100 g), while PUFAs decreased in approximately 63% ( $7.48 \pm 0.5$  g/100 g). No significant differences were observed when comparing the MUFAs contents of raw and grilled sardines ( $p>0.05$ ). Deep-fat frying significantly reduced the levels of SFAs ( $19.63 \pm 0.3$  g/100 g oil) and MUFAs ( $25.23 \pm 0.1$  g/100 g oil), and increased the amount of PUFAs ( $46.04 \pm 0.7$  g/100 g). The levels of PUFAs in the fried samples were influenced by the absorption of soybean oil, mainly  $n_6$ -fatty acids such as linoleic acid (C18:2  $n_6$ ).

Changes in the fatty acid contents of sardines after grilling were previously reported in a study developed by Saldanha et al. (2008), where losses varied from 18% to 24% in PUFAs contents and minor losses were determined for SFAs and MUFAs. Heating also affected SFAs and MUFAs after air frying by increasing their levels; however, air frying resulted in PUFAs degradation (approximately 70.2%) (Ferreira et al, 2017).

Cooking causes a disruption of cell membranes, promoting the exposure of fatty acids to pro-oxidants factors such as heat and oxygen that induce the loss of important fatty acids, mainly unsaturated fatty acids that are more susceptible to oxidation (Saldanha et al., 2008). Moreover, 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). However, reductions in fatty acid concentrations may not only be associated to oxidative processes, since the temperatures applied affect the fish musculature leading to the release of lipids.

In the present study, grilling presented a greater reduction of PUFAs levels when compared with air frying. The strongest effect on the amount of PUFAs was found after deep-fat frying, where PUFAs contents increased substantially. This may be due to the interaction and exchange between fish fatty acids and fatty acids of the frying oil (Nieva-Echevarría, Goicoechea, Manzanos, & Guillén, 2016).

Cooking also altered the EPA and DHA contents showing the following degradation percentages: air fryer (24.4%), grill (69.2%), and deep-fat fryer (79.1%). These results demonstrate that high temperatures may affect the nutritional value of fish, leading to the degradation of relevant fatty acids that are related to several benefits to human health (Calder, 2018).

**Table 3:** Fatty acid composition (g/100 g oil) of raw and cooked sardines (control and with lemon juice at 5%, 10%, and 15%).

	Air fryer				
	Raw	Control	5%	10%	15%
<b>C4:0</b>	0.05 ± 0.0b	0.04 ± 0.0b	0.16 ± 0.0a	0.01 ± 0.0c	-
<b>C6:0</b>	0.03 ± 0.0a	0.13 ± 0.0b	0.03 ± 0.0a	0.03 ± 0.0a	0.03 ± 0.0a
<b>C8:0</b>	0.05 ± 0.0c	0.35 ± 0.0a	0.14 ± 0.0b	-	-
<b>C10:0</b>	0.10 ± 0.0a	0.03 ± 0.0b	0.10 ± 0.0a	0.03 ± 0.0b	0.01 ± 0.0c
<b>C12:0</b>	0.23 ± 0.0a	0.17 ± 0.0b	0.15 ± 0.0b	0.14 ± 0.0b	0.26 ± 0.0a
<b>C14:0</b>	11.69 ± 0.9bc	10.77 ± 0.0bc	12.99 ± 0.2a	13.12 ± 0.4a	9.89 ± 0.1c
<b>C14:1</b>	0.40 ± 0.0b	0.09 ± 0.0c	0.47 ± 0.0a	0.50 ± 0.0a	0.40 ± 0.0b
<b>C16:0</b>	29.68 ± 0.4c	27.24 ± 0.4d	32.90 ± 0.8b	34.57 ± 0.9a	30.61 ± 0.4c
<b>C16:1</b>	8.94 ± 0.9c	10.29 ± 0.0ab	11.17 ± 0.2a	10.60 ± 0.2ab	9.70 ± 0.0bc
<b>C17:0</b>	0.29 ± 0.0a	0.14 ± 0.0c	0.30 ± 0.0a	0.36 ± 0.0b	0.24 ± 0.0d
<b>C17:1</b>	1.24 ± 0.0a	1.16 ± 0.0a	1.06 ± 0.0b	0.73 ± 0.0d	0.93 ± 0.0c
<b>C18:0</b>	5.45 ± 0.5c	5.50 ± 0.0c	6.20 ± 0.0b	7.55 ± 0.1a	6.05 ± 0.1bc
<b>C18:1n9t</b>	1.43 ± 0.1a	0.07 ± 0.0b	0.82 ± 0.0c	0.46 ± 0.0d	0.93 ± 0.0c
<b>C18:1 n9c</b>	15.74 ± 0.3a	14.04 ± 0.1b	16.47 ± 0.2ac	16.96 ± 0.2c	18.23 ± 0.1d
<b>C18:2 n6c</b>	0.70 ± 0.0a	2.09 ± 0.0b	0.62 ± 0.0a	0.53 ± 0.0c	1.30 ± 0.0d
<b>C20:0</b>	0.39 ± 0.0b	0.41 ± 0.0b	0.44 ± 0.01b	0.63 ± 0.0a	-
<b>C18:3 n6</b>	0.16 ± 0.0a	0.17 ± 0.0a	-	-	0.36 ± 0.0b
<b>C20:1 n9</b>	-	-	-	-	-
<b>C18:3 n3</b>	-	-	-	-	-
<b>C20:2 n6</b>	-	-	-	-	-
<b>C20:3 n6</b>	-	-	-	-	-
<b>C22:1 n9</b>	-	-	-	-	-
<b>C20:3 n3</b>	0.41 ± 0.0a	0.08 ± 0.0b	0.26 ± 0.0c	0.44 ± 0.0a	0.36 ± 0.0d
<b>C20:4 n6</b>	1.37 ± 0.1a	1.17 ± 0.0a	0.55 ± 0.0b	0.22 ± 0.0c	0.47 ± 0.0b
<b>C20:5 n3</b>	17.67 ± 0.7a	13.07 ± 0.8b	5.68 ± 0.2c	1.69 ± 0.2d	6.13 ± 0.5c
<b>C24:1 n9</b>	0.55 ± 0.0c	0.46 ± 0.0d	0.67 ± 0.0b	0.81 ± 0.0a	0.54 ± 0.0cd
<b>C22:6 n3</b>	0.23 ± 0.0b	0.47 ± 0.0a	0.22 ± 0.0b	0.13 ± 0.0c	0.11 ± 0.0c
<b>ΣSFA</b>	<b>47.96 ± 1.4c</b>	<b>44.78 ± 0.5d</b>	<b>53.43 ± 1.1b</b>	<b>56.45 ± 1.4a</b>	<b>47.08 ± 0.7cd</b>
<b>ΣMUFA</b>	<b>28.30 ± 0.4b</b>	<b>26.11 ± 0.0c</b>	<b>30.67 ± 0.0a</b>	<b>30.06 ± 0.3a</b>	<b>30.73 ± 0.2a</b>
<b>ΣPUFA</b>	<b>20.53 ± 0.6c</b>	<b>17.06 ± 0.8a</b>	<b>7.33 ± 0.2b</b>	<b>3.01 ± 0.2d</b>	<b>8.73 ± 0.6b</b>
<b>Σω3</b>	<b>18.31 ± 0.7a</b>	<b>13.63 ± 0.8b</b>	<b>6.15 ± 0.2c</b>	<b>2.26 ± 0.2d</b>	<b>6.60 ± 0.5c</b>
<b>Σω6</b>	<b>2.23 ± 0.1a</b>	<b>3.43 ± 0.0b</b>	<b>1.17 ± 0.0c</b>	<b>0.75 ± 0.0d</b>	<b>2.13 ± 0.1a</b>
<b>ω3/ ω6</b>	<b>8.25 ± 0.7a</b>	<b>3.97 ± 0.1c</b>	<b>5.25 ± 0.2b</b>	<b>3.01 ± 0.3d</b>	<b>3.09 ± 0.1d</b>
<b>ΣTrans</b>	<b>1.43 ± 0.1a</b>	<b>0.07 ± 0.0b</b>	<b>0.82 ± 0.0c</b>	<b>0.46 ± 0.0d</b>	<b>0.93 ± 0.0c</b>
<b>EPA + DHA</b>	<b>17.90 ± 0.7a</b>	<b>13.54 ± 0.8b</b>	<b>5.90 ± 0.2c</b>	<b>1.82 ± 0.2d</b>	<b>6.24 ± 0.5c</b>
<b>ΣUFAs</b>	<b>48.83 ± 0.7a</b>	<b>43.17 ± 0.8b</b>	<b>38.00 ± 0.2c</b>	<b>33.07 ± 0.2d</b>	<b>39.46 ± 0.8c</b>
			<b>Grill</b>		



	<b>Raw</b>	<b>Control</b>	<b>5%</b>	<b>10%</b>	<b>15%</b>
<b>C4:0</b>	0.05 ± 0.0a	0.05 ± 0.0a	0.02 ± 0.0b	-	-
<b>C6:0</b>	0.03 ± 0.0a	0.07 ± 0.0c	0.09 ± 0.0c	0.08 ± 0.0c	0.11 ± 0.0b
<b>C8:0</b>	0.05 ± 0.0a	0.05 ± 0.0a	0.04 ± 0.0a	0.05 ± 0.0a	0.06 ± 0.0a
<b>C10:0</b>	0.10 ± 0.0a	0.02 ± 0.0b	0.02 ± 0.0b	0.03 ± 0.0b	0.03 ± 0.0b
<b>C12:0</b>	0.23 ± 0.0a	0.29 ± 0.0b	0.20 ± 0.0a	0.16 ± 0.0c	0.17 ± 0.0c
<b>C14:0</b>	11.69 ± 0.9b	14.12 ± 0.2a	13.92 ± 0.7a	11.62 ± 0.7b	11.13 ± 0.0b
<b>C14:1</b>	0.40 ± 0.0a	0.42 ± 0.0a	0.41 ± 0.0a	0.41 ± 0.0a	0.43 ± 0.0a
<b>C16:0</b>	29.68 ± 0.4b	31.44 ± 0.1a	31.42 ± 1.0a	28.62 ± 0.3b	28.19 ± 0.4b
<b>C16:1</b>	8.94 ± 0.9c	11.16 ± 0.1a	10.38 ± 0.5ab	9.68 ± 0.3bc	9.77 ± 0.0bc
<b>C17:0</b>	0.29 ± 0.0b	0.07 ± 0.0c	0.27 ± 0.0b	0.49 ± 0.0a	0.53 ± 0.0a
<b>C17:1</b>	1.24 ± 0.0a	0.43 ± 0.0c	0.45 ± 0.0c	0.46 ± 0.0e	1.06 ± 0.0b
<b>C18:0</b>	5.45 ± 0.5a	6.08 ± 0.1b	5.74 ± 0.5c	5.77 ± 0.1c	5.63 ± 0.1d
<b>C18:1n9t</b>	1.43 ± 0.1a	0.74 ± 0.0b	0.70 ± 0.0b	1.08 ± 0.0d	0.82 ± 0.0c
<b>C18:1 n9c</b>	15.74 ± 0.3a	15.02 ± 0.2ab	14.19 ± 0.4b	13.13 ± 0.3c	12.40 ± 0.4c
<b>C18:2 n6c</b>	0.70 ± 0.0a	1.30 ± 0.0b	1.41 ± 0.0b	2.02 ± 0.0c	1.75 ± 0.0d
<b>C20:0</b>	0.39 ± 0.0bc	0.03 ± 0.0a	0.30 ± 0.0d	0.45 ± 0.0b	0.35 ± 0.0cd
<b>C18:3 n6</b>	0.16 ± 0.0b	0.19 ± 0.0b	0.54 ± 0.0a	0.51 ± 0.0a	0.56 ± 0.0a
<b>C20:1 n9</b>	-	-	-	-	-
<b>C18:3 n3</b>	-	-	-	-	-
<b>C20:2 n6</b>	-	-	-	-	-
<b>C20:3 n6</b>	-	-	-	-	-
<b>C22:1 n9</b>	-	-	-	-	-
<b>C20:3 n3</b>	0.41 ± 0.0a	-	-	-	-
<b>C20:4 n6</b>	1.37 ± 0.1b	0.49 ± 0.0c	1.17 ± 0.2b	1.23 ± 0.1b	2.24 ± 0.0a
<b>C20:5 n3</b>	17.67 ± 0.7a	5.31 ± 0.5b	5.78 ± 0.6b	10.65 ± 0.0c	10.88 ± 0.4c
<b>C24:1 n9</b>	0.55 ± 0.0b	0.42 ± 0.0c	0.75 ± 0.0a	0.53 ± 0.0b	0.68 ± 0.0a
<b>C22:6 n3</b>	0.23 ± 0.0a	0.19 ± 0.0a	0.20 ± 0.0a	0.41 ± 0.0b	0.39 ± 0.0b
<b>∑SFA</b>	<b>47.96 ± 1.4a</b>	<b>52.24 ± 0.1b</b>	<b>52.02 ± 1.3b</b>	<b>47.27 ± 0.3a</b>	<b>46.20 ± 0.6a</b>
<b>∑MUFA</b>	<b>28.30 ± 0.4b</b>	<b>28.19 ± 0.1b</b>	<b>26.89 ± 0.1a</b>	<b>25.29 ± 0.1c</b>	<b>25.16 ± 0.5c</b>
<b>∑PUFA</b>	<b>20.53 ± 0.6c</b>	<b>7.48 ± 0.5a</b>	<b>9.10 ± 0.8a</b>	<b>14.82 ± 0.2b</b>	<b>15.83 ± 0.5b</b>
<b>∑ω3</b>	<b>18.31 ± 0.7a</b>	<b>5.50 ± 0.5b</b>	<b>5.98 ± 0.6b</b>	<b>11.06 ± 0.0c</b>	<b>11.27 ± 0.5c</b>
<b>∑ω6</b>	<b>2.23 ± 0.1a</b>	<b>1.97 ± 0.0a</b>	<b>3.12 ± 0.2b</b>	<b>3.76 ± 0.1c</b>	<b>4.56 ± 0.1d</b>
<b>ω3/ ω6</b>	<b>8.25 ± 0.7a</b>	<b>2.79 ± 0.2b</b>	<b>1.92 ± 0.0c</b>	<b>2.94 ± 0.1b</b>	<b>2.47 ± 0.0d</b>
<b>∑Trans</b>	<b>1.43 ± 0.1a</b>	<b>0.74 ± 0.0b</b>	<b>0.70 ± 0.0b</b>	<b>1.08 ± 0.0c</b>	<b>0.82 ± 0.0b</b>
<b>EPA+DHA</b>	<b>17.90 ± 0.7a</b>	<b>5.51 ± 0.5b</b>	<b>5.97 ± 0.6b</b>	<b>11.06 ± 0.0c</b>	<b>11.26 ± 0.5c</b>
<b>∑UFAs</b>	<b>48.83 ± 0.7c</b>	<b>35.67 ± 0.3b</b>	<b>35.99 ± 0.8b</b>	<b>40.11 ± 0.3c</b>	<b>40.99 ± 0.7c</b>

	<b>Deep-fat fryer</b>				
	<b>Raw</b>	<b>Control</b>	<b>5%</b>	<b>10%</b>	<b>15%</b>
<b>C4:0</b>	0.05 ± 0.0a	0.02 ± 0.0b	0.01 ± 0.0b	-	-
<b>C6:0</b>	0.03 ± 0.0b	-	0.01 ± 0.0a	0.01 ± 0.0a	0.04 ± 0.0b
<b>C8:0</b>	0.05 ± 0.0a	0.04 ± 0.0b	0.01 ± 0.0c	0.02 ± 0.0c	0.11 ± 0.0d
<b>C10:0</b>	0.10 ± 0.0a	0.02 ± 0.0b	0.02 ± 0.0b	-	0.02 ± 0.0b

<b>C12:0</b>	0.23 ± 0.0e	0.52 ± 0.0b	0.39 ± 0.0c	0.61 ± 0.0a	0.27 ± 0.0d
<b>C14:0</b>	11.69 ± 0.9a	1.85 ± 0.1b	3.48 ± 0.4c	3.35 ± 0.0c	3.22 ± 0.0c
<b>C14:1</b>	0.40 ± 0.0a	0.08 ± 0.0b	0.12 ± 0.0b	0.13 ± 0.0b	0.37 ± 0.0a
<b>C16:0</b>	29.68 ± 0.4a	13.77 ± 0.3b	15.43 ± 0.3c	15.78 ± 0.1c	15.46 ± 0.0c
<b>C16:1</b>	8.94 ± 0.9a	1.52 ± 0.1b	2.77 ± 0.3c	2.84 ± 0.0c	2.66 ± 0.2c
<b>C17:0</b>	0.29 ± 0.0b	0.11 ± 0.0a	0.12 ± 0.0a	0.12 ± 0.0a	0.26 ± 0.0b
<b>C17:1</b>	1.24 ± 0.0a	0.20 ± 0.0b	0.32 ± 0.0c	0.36 ± 0.0c	0.93 ± 0.0d
<b>C18:0</b>	5.45 ± 0.5b	3.30 ± 0.0a	3.49 ± 0.1a	3.67 ± 0.0a	5.92 ± 0.2b
<b>C18:1n9t</b>	1.43 ± 0.1a	0.27 ± 0.0b	0.42 ± 0.0c	0.43 ± 0.0c	0.73 ± 0.0d
<b>C18:1 n9c</b>	15.74 ± 0.3a	18.27 ± 0.1b	17.41 ± 0.6b	17.97 ± 0.1b	18.20 ± 0.3b
<b>C18:2 n6c</b>	0.70 ± 0.0c	41.38 ± 0.6b	34.10 ± 1.2a	33.53 ± 0.3a	34.84 ± 0.8a
<b>C20:0</b>	0.39 ± 0.0a	-	-	-	0.34 ± 0.0a
<b>C18:3 n6</b>	0.16 ± 0.0a	0.28 ± 0.0b	0.28 ± 0.0b	0.32 ± 0.0b	0.27 ± 0.0b
<b>C20:1 n9</b>	-	4.83 ± 0.1a	4.42 ± 0.1ab	4.39 ± 0.0b	3.33 ± 0.2c
<b>C18:3 n3</b>	-	-	-	-	-
<b>C20:2 n6</b>	-	0.05 ± 0.0a	0.07 ± 0.0a	-	0.17 ± 0.0b
<b>C20:3 n6</b>	-	0.26 ± 0.0a	0.23 ± 0.0a	0.26 ± 0.0a	0.15 ± 0.0b
<b>C22:1 n9</b>	-	-	-	-	-
<b>C20:3 n3</b>	0.41 ± 0.0a	-	0.55 ± 0.0b	0.15 ± 0.0c	0.43 ± 0.0a
<b>C20:4 n6</b>	1.37 ± 0.1a	0.32 ± 0.0b	0.36 ± 0.0b	0.51 ± 0.0c	0.36 ± 0.0b
<b>C20:5 n3</b>	17.67 ± 0.7a	3.67 ± 0.0b	6.56 ± 0.4c	6.38 ± 0.2c	5.84 ± 0.5c
<b>C24:1 n9</b>	0.55 ± 0.0b	0.13 ± 0.0a	0.16 ± 0.0a	0.20 ± 0.0a	0.54 ± 0.0b
<b>C22:6 n3</b>	0.23 ± 0.0a	0.07 ± 0.0b	0.14 ± 0.0c	0.09 ± 0.0d	0.12 ± 0.0cd
<b>∑SFA</b>	<b>47.96 ± 1.4c</b>	<b>19.63 ± 0.3d</b>	<b>22.96 ± 0.5a</b>	<b>23.56 ± 0.2ba</b>	<b>25.65 ± 0.2b</b>
<b>∑MUFA</b>	<b>28.30 ± 0.4b</b>	<b>25.23 ± 0.1a</b>	<b>25.63 ± 0.7ad</b>	<b>26.32 ± 0.2cd</b>	<b>26.77 ± 0.3c</b>
<b>∑PUFA</b>	<b>20.53 ± 0.6c</b>	<b>46.04 ± 0.7a</b>	<b>42.31 ± 0.9b</b>	<b>41.23 ± 0.6b</b>	<b>42.18 ± 0.4b</b>
<b>∑ω3</b>	<b>18.31 ± 0.7a</b>	<b>3.74 ± 0.0b</b>	<b>7.26 ± 0.3c</b>	<b>6.62 ± 0.2c</b>	<b>6.39 ± 0.5c</b>
<b>∑ω6</b>	<b>2.23 ± 0.1c</b>	<b>42.29 ± 0.7a</b>	<b>35.04 ± 1.2b</b>	<b>34.61 ± 0.3b</b>	<b>35.78 ± 0.9b</b>
<b>ω3/ ω6</b>	<b>8.25 ± 0.7a</b>	<b>0.09 ± 0.0b</b>	<b>0.21 ± 0.0c</b>	<b>0.19 ± 0.0c</b>	<b>0.18 ± 0.0c</b>
<b>∑Trans</b>	<b>1.43 ± 0.1a</b>	<b>0.27 ± 0.0b</b>	<b>0.42 ± 0.0c</b>	<b>0.43 ± 0.0c</b>	<b>0.73 ± 0.0d</b>
<b>EPA+DHA</b>	<b>17.90 ± 0.7a</b>	<b>3.74 ± 0.0b</b>	<b>6.71 ± 0.4c</b>	<b>6.47 ± 0.2c</b>	<b>5.96 ± 0.5c</b>
<b>∑UFAs</b>	<b>48.83 ± 0.7c</b>	<b>71.41 ± 0.8a</b>	<b>67.94 ± 0.2b</b>	<b>67.55 ± 0.7b</b>	<b>68.95 ± 0.6b</b>

Results presented as mean ± standard deviation, n=3. Different letters in the same row indicate significant difference by Tukey test (p<0.05). 5%, 10%, and 15% correspond to the treatments with addition of lemon juice at 5%, 10%, and 15 %, respectively.

The addition of lemon juice significantly decreased PUFAs content after air frying, showing reductions around 64, 85, and 57% in samples treated with 5, 10, and 15 % of lemon juice, respectively. On the contrary, higher levels of SFA (from  $47.08 \pm 0.7$  to  $56.45 \pm 1.4$  g/100 g oil) and MUFA ( $30.06 \pm 0.3$  to  $30.73 \pm 0.2$  g/100 g oil) were observed in comparison with the control samples.

After deep frying, an increase was observed in MUFAs levels in most sardines treated with lemon juice ( $p > 0.05$ ). Regarding the SFA levels, an increase was found with values ranging from  $22.96 \pm 0.5$  to  $25.65 \pm 0.2$  g/100 g oil. However, sardines treated with the juice presented lower contents of PUFAs than control samples. These results concerning the PUFAs levels and their degradation suggest a correlation with the acidic conditions of samples, since changes in pH affect lipid oxidation (Mozuraityte, Kristinova, Rustad, & Storrø, 2016). Mozuraityte et al. (2016) reported that lipid oxidation is most remarkable at pH about 3.3, followed by pH 5.3 and 7.0. Thus, as discussed above in item 3.2.1, the addition of lemon juice reduced the pH of sardines, creating a pro-oxidant environment.

In addition, pH is an important parameter that modulates protein conformation and interactions. The lower pH value observed in samples treated with lemon juice may lead to the liberation of water to the fish surface due to the reduction of protein-protein interaction (Liu et al., 2010). Thus, the increased contact of water molecules and the myofibrillar proteins may result in the protein solubilization, causing a greater exposure of lipids to pro-oxidant factors.

However, grilled samples presented a distinct trend. The addition of 10 and 15% lemon juice protected PUFAs against oxidation ( $p < 0.05$ ). Grilled samples with lemon juice presented the following contents of PUFAs:  $9.10 \pm 0.8$  g/100 g (5% lemon juice),  $14.82 \pm 0.2$  g/100 g (10% lemon juice), and  $15.83 \pm 0.5$  g/100 g (15% lemon juice). The levels of SFAs and MUFAs were affected in most samples treated with juice, showing lower values ( $p < 0.05$ ).

The protective effect of lemon juice in grilled sardines could be due to the presence of bioactive compounds and the antioxidant capacity determined in its extract. This protection was not observed in air frying and deep-fat frying probably due to the thermal degradation of such antioxidant constituents. Slighter time/temperature binomial ( $175^\circ\text{C}$  for 5 min) was applied during grilling, which probably allowed these compounds to remain active (Ioannou, Chekir, & Ghoul, 2019).

PUFAs are commonly the main fatty acids studied when considering lipid oxidation due to their high susceptibility to the oxidative process. Thus, the results assessed demonstrated that, in general, the addition of juice induced PUFAs degradation. A protective effect was only observed in grilled samples treated with 10 and 15% of juice. Moreover, the use of varied juice concentrations did not lead to significant changes in fatty acids amounts in most sardine samples ( $p > 0.05$ ).

### 3.2.3. Cholesterol and cholesterol oxides

Table 4 shows the cholesterol and cholesterol oxide contents of raw and cooked sardines (control, 5%, 10%, and 15% lemon juice). The raw sardines presented a cholesterol content of  $322.77 \pm 3.0$  mg/100 g (dry basis), which is higher than the one determined by Zotos et al. (2016) (206.7 mg/100 g) in *Sardina pilchardus* and Ferreira et al. (2017) (237.2 mg/100 g) in *Sardinella brasiliensis*.

Heating caused a reduction of cholesterol levels. Contents of  $134.78 \pm 3.9$  mg/100 g (58.24% of degradation),  $114.23 \pm 1.3$  mg/100 g (64.10% of degradation), and  $181.58 \pm 1.9$  mg/100 g (43.74% of degradation) were found in air-fried, grilled, and deep-fried sardines, respectively.

Previous studies have also shown the thermal degradation of the cholesterol molecule, reducing cholesterol levels of food matrices (Saldanha & Bragagnolo, 2010; Ferreira et al., 2017; de Oliveira et al., 2020). Saldanha and Bragagnolo (2010) determined a loss of approximately 22% in sardines after grilling (175 °C for 4 minutes). A loss of 34.9% was noticed in air-fried sardines (Ferreira et al., 2017). de Oliveira et al. (2020) reported reductions around 44 and 66% in sardine oil heated in an oven for 7 minutes at 150 and 180 °C, respectively.

In samples treated with lemon juice, the cholesterol levels ranged from  $141.81 \pm 1.1$  to  $166.38 \pm 1.7$  mg/100 g (air fryer), from  $103.37 \pm 3.8$  to  $134.68 \pm 2.9$  mg/100 g (grill), and from  $143.14 \pm 2.1$  to  $145.32 \pm 2.7$  mg/100 g (deep-fat fryer). The addition of lemon juice minimized the cholesterol degradation in most samples submitted to air frying and grilling. However, deep-fried samples treated with the juice showed lower amounts of cholesterol than the control samples, demonstrating that the juice did not present a protective effect on cholesterol molecule.

**Table 4:** Cholesterol (mg/100 g, dry basis) and cholesterol oxides ( $\mu\text{g/g}$ , dry basis) contents of raw and cooked sardines (control and with lemon juice at 5%, 10%, and 15%).

	Air fryer				
	Raw	Control	5%	10%	15%
<b>20<math>\alpha</math>-OH</b>	-	-	-	38.97 $\pm$ 1.5b	78.80 $\pm$ 2.5a
<b>5,6<math>\alpha</math>-EP</b>	9.82 $\pm$ 0.1e	508.86 $\pm$ 1.1d	545.42 $\pm$ 2.3c	909.42 $\pm$ 2.4a	763.61 $\pm$ 3.0b
<b>5,6<math>\beta</math>-EP</b>	-	179.24 $\pm$ 3.0d	227.74 $\pm$ 1.8c	332.01 $\pm$ 3.0a	432.19 $\pm$ 1.2b
<b>22R-OH</b>	-	-	3.19 $\pm$ 0.2a	-	3.13 $\pm$ 0.1a
<b>22S-OH</b>	-	-	3.20 $\pm$ 0.2a	-	3.22 $\pm$ 0.1a
<b>25R-OH</b>	-	-	2.78 $\pm$ 0.06a	6.15 $\pm$ 0.51b	4.21 $\pm$ 0.23c
<b>7-Keto</b>	1.34 $\pm$ 0.0d	2.14 $\pm$ 0.0d	18.39 $\pm$ 0.1a	7.38 $\pm$ 0.0b	10.58 $\pm$ 0.8c
<b>7<math>\alpha</math>-OH</b>	-	2.20 $\pm$ 0.0d	9.63 $\pm$ 0.2a	5.87 $\pm$ 0.3c	7.73 $\pm$ 0.3b
<b>7<math>\beta</math>-OH</b>	0.31 $\pm$ 0.0d	7.31 $\pm$ 0.4e	40.59 $\pm$ 1.2a	33.69 $\pm$ 1.7b	15.94 $\pm$ 1.6c
<b>Total COPs</b>	<b>11.47 <math>\pm</math> 0.1c</b>	<b>699.75 <math>\pm</math> 3.9d</b>	<b>850.94 <math>\pm</math> 5.2b</b>	<b>1333.51 <math>\pm</math> 5.2a</b>	<b>1319.41 <math>\pm</math> 8.5a</b>
<b>Cholesterol</b>	<b>322.77 <math>\pm</math> 3.0a</b>	<b>134.78 <math>\pm</math> 3.9c</b>	<b>141.81 <math>\pm</math> 1.1cd</b>	<b>148.29 <math>\pm</math> 0.5d</b>	<b>166.38 <math>\pm</math> 1.7b</b>
	Grill				
	Raw	Control	5%	10%	15%
<b>20<math>\alpha</math>-OH</b>	-	14.10 $\pm$ 1.0b	9.78 $\pm$ 0.5a	31.78 $\pm$ 2.0c	7.52 $\pm$ 0.4a
<b>5,6<math>\alpha</math>-EP</b>	9.82 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	174.13 $\pm$ 2.2b	217.82 $\pm$ 2.0c	231.51 $\pm$ 1.0d	161.64 $\pm$ 0.7e
<b>5,6<math>\beta</math>-EP</b>	-	344.40 $\pm$ 3.5a	302.83 $\pm$ 3.1b	145.60 $\pm$ 3.5c	368.45 $\pm$ 3.0d
<b>22R-OH</b>	-	0.76 $\pm$ 0.0c	0.88 $\pm$ 0.0c	4.54 $\pm$ 0.4b	7.25 $\pm$ 0.4a
<b>22S-OH</b>	-	0.60 $\pm$ 0.0d	0.09 $\pm$ 0.0b	3.84 $\pm$ 0.2a	2.18 $\pm$ 0.1c
<b>25R-OH</b>	-	-	-	1.22 $\pm$ 0.03a	0.71 $\pm$ 0.06a
<b>7-Keto</b>	1.34 $\pm$ 0.0a	13.13 $\pm$ 0.4b	9.90 $\pm$ 0.2c	10.51 $\pm$ 0.5c	10.56 $\pm$ 0.4c
<b>7<math>\alpha</math>-OH</b>	-	5.00 $\pm$ 0.1a	4.39 $\pm$ 0.2a	6.46 $\pm$ 0.2b	5.77 $\pm$ 0.1c
<b>7<math>\beta</math>-OH</b>	0.31 $\pm$ 0.0a	18.04 $\pm$ 1.0b	12.90 $\pm$ 0.8c	28.12 $\pm$ 0.4d	33.93 $\pm$ 2.0e
<b>Total COPs</b>	<b>11.47 <math>\pm</math> 0.1d</b>	<b>570.15 <math>\pm</math> 5.0a</b>	<b>558.58 <math>\pm</math> 0.9a</b>	<b>463.58 <math>\pm</math> 5.3b</b>	<b>598.02 <math>\pm</math> 5.8c</b>
<b>Cholesterol</b>	<b>322.77 <math>\pm</math> 3.0a</b>	<b>114.23 <math>\pm</math> 1.3b</b>	<b>134.68 <math>\pm</math> 2.9c</b>	<b>103.37 <math>\pm</math> 3.8d</b>	<b>128.82 <math>\pm</math> 3.3c</b>

	Deep-fat fryer				
	Raw	Control	5%	10%	15%
<b>20<math>\alpha</math>-OH</b>	-	-	-	-	-
<b>5,6<math>\alpha</math>-EP</b>	9.82 $\pm$ 0.1a	439.64 $\pm$ 0.1b	188.41 $\pm$ 2.8c	370.58 $\pm$ 2.0d	114.57 $\pm$ 2.8e
<b>5,6<math>\beta</math>-EP</b>	-	31.14 $\pm$ 1.3a	569.04 $\pm$ 2.3b	59.01 $\pm$ 0.2c	271.68 $\pm$ 2.4d
<b>22R-OH</b>	-	-	-	-	-
<b>22S-OH</b>	-	-	-	-	-
<b>25R-OH</b>	-	-	-	-	-
<b>7-Keto</b>	1.34 $\pm$ 0.0e	0.94 $\pm$ 0.0d	4.88 $\pm$ 0.1b	17.88 $\pm$ 0.2a	8.28 $\pm$ 0.0c
<b>7<math>\alpha</math>-OH</b>	-	0.14 $\pm$ 0.0a	2.28 $\pm$ 0.0b	4.45 $\pm$ 0.4c	1.26 $\pm$ 0.1d
<b>7<math>\beta</math>-OH</b>	0.31 $\pm$ 0.0a	0.48 $\pm$ 0.0a	4.40 $\pm$ 0.1b	7.35 $\pm$ 0.0c	4.19 $\pm$ 0.3b
<b>Total COPs</b>	<b>11.47 <math>\pm</math> 0.1a</b>	<b>472.34 <math>\pm</math> 1.2b</b>	<b>769.01 <math>\pm</math> 5.1c</b>	<b>459.27 <math>\pm</math> 1.8b</b>	<b>399.98 <math>\pm</math> 5.6d</b>
<b>Cholesterol</b>	<b>322.77 <math>\pm</math> 3.0a</b>	<b>181.58 <math>\pm</math> 1.9b</b>	<b>145.32 <math>\pm</math> 2.7c</b>	<b>143.18 <math>\pm</math> 3.2c</b>	<b>143.14 <math>\pm</math> 2.1c</b>

Results presented as mean  $\pm$  standard deviation, n=3. Different letters in the same row indicate significant difference by Tukey test ( $p < 0.05$ ). 5%, 10%, and 15% correspond to the treatments with addition of lemon juice at 5%, 10%, and 15 %, respectively.

The cholesterol content of air-fried sardines increased in the following order: 5% lemon juice ( $141.81 \pm 1.1$  mg/100 g) < 10% lemon juice ( $148.29 \pm 0.5$  mg/100 g) < 15% lemon juice ( $166.38 \pm 1.7$  mg/100 g). These values showed that higher the concentration of juice, lower the cholesterol degradation. However, no significant differences were noticed among samples treated with 5 and 10% of juice ( $p > 0.05$ ).

In grilled sardines, the addition of 5% and 15% of juice contributed to maintain the cholesterol levels; however, these results were not statistically different ( $p > 0.05$ ). On the contrary, a degradation percentage around 9% was found in samples treated with 10% lemon juice, where the amount of cholesterol determined was  $103.37 \pm 3.8$  mg/100 g (<  $114.23 \pm 1.3$  mg/100 g, control samples).

The addition of lemon juice did not show a protective effect against cholesterol degradation in deep-fried sardines, since the contents determined were lower than in control samples ( $181.68 \pm 1.9$  mg/100 g). The levels of cholesterol were  $145.32 \pm 2.7$

mg/100 g (5%),  $143.18 \pm 3.2$  mg/100 g (10%), and  $143.14 \pm 2.1$  mg/100 g (15%). No significant differences were found among these samples ( $p > 0.05$ ).

The degradation of cholesterol during heating may occur not only by oxidative reactions but also through other routes that lead to the formation of hydrocarbons, aldehydes, ketones, and alcohols (Smith, 1987). Therefore, COPs are not the only products of this degradative process.

Regarding the cholesterol oxides, the presence of 5,6 $\alpha$ - epoxycholesterol ( $9.82 \pm 0.1$   $\mu\text{g/g}$ ), 7-ketocholesterol ( $1.34 \pm 0.0$   $\mu\text{g/g}$ ), and 7 $\beta$ - hydroxycholesterol ( $0.31 \pm 0.0$   $\mu\text{g/g}$ ) was determined in raw sardines (Table 4). In fact, these compounds are commonly found in raw fish samples and are originated from enzymatic processes of the fish metabolism (Osada, Kodama, Cui, Yamada, and Sugano, 1993).

However, nine cholesterol oxides were identified after cooking: 20 $\alpha$ -hydroxycholesterol (20 $\alpha$ -OH), 5,6 $\alpha$ -epoxycholesterol (5,6 $\alpha$ -EP), 5,6 $\beta$ -epoxycholesterol (5,6 $\beta$ -EP), 22R-hydroxycholesterol (22R-OH), 22S-hydroxycholesterol (22S-OH), 25R-hydroxycholesterol (25R-OH), 7-ketocholesterol (7-keto), 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol (7 $\alpha$ -OH), and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol (7 $\beta$ -OH).

Among the COPs cited above, 22R-OH, 22S-OH, 25R-OH, and 20 $\alpha$ -OH were not detected in air-fried and deep-fried control samples. The total COPs levels of control samples after each cooking method increased as follows: deep-fat fryer ( $472.34 \pm 1.2$   $\mu\text{g/g}$ ) < grill ( $570.15 \pm 5.0$   $\mu\text{g/g}$ ) < air fryer ( $699.75 \pm 3.9$   $\mu\text{g/g}$ ).

Heating induced the cholesterol oxides formation and higher levels of COPs were observed when higher temperatures were applied (air fryer, grill). In addition, it is important to consider the longer exposure of sardines to heat and oxygen and the different mechanism of heat transfer. The minor COPs content assessed in deep-fried samples may be due to their dissolution in the frying oil.

The main COP found in air-fried and deep-fried samples was 5,6 $\alpha$ -EP ( $508.86 \pm 1.1$  and  $439.64 \pm 0.1$   $\mu\text{g/g}$ , respectively), followed by 5,6 $\beta$ -EP ( $179.24 \pm 3.0$  and  $31.14 \pm 1.3$   $\mu\text{g/g}$ , respectively). Grilled control samples presented 5,6 $\beta$ -EP as the most prominent COP ( $344.40 \pm 3.5$   $\mu\text{g/g}$ ), followed by 5,6 $\alpha$ -EP ( $174.13 \pm 2.2$   $\mu\text{g/g}$ ) and 7 $\beta$ -OH ( $18.04 \pm 1.0$   $\mu\text{g/g}$ ).

The addition of juice led to different consequences in the formation of COPs. The total amount of COPs in air-fried samples ranged from  $850.94 \pm 5.2$  to  $1333.51 \pm 5.2$   $\mu\text{g/g}$ . These values were higher than those found in control samples, pointing out the pro-oxidant effect of the juice when considering the cholesterol oxidation. The negative effect

of the juice addition on COPs formation decreased in the following order: 10% lemon juice > 15% lemon juice > 5% lemon juice. However, results assessed in samples treated with 10% and 15% lemon juice were not statistically different ( $p>0.05$ ).

For grilled sardines, the COPs levels varied from  $463.58 \pm 5.3$  to  $598.02 \pm 5.8$   $\mu\text{g/g}$ . The lemon juice induced the COPs formation when added at 15 %, where total COPs content increased from  $570.15 \pm 5.0$  (control) to  $598.02 \pm 5.8$   $\mu\text{g/g}$ . Addition of 5% juice did not affect the total COPs level ( $558.58 \pm 0.9$   $\mu\text{g/g}$ ) ( $p>0.05$ ), while the treatment with 10% juice limited the formation of COPs ( $463.58 \pm 5.3$   $\mu\text{g/g}$ ).

In deep-fried sardines treated with lemon juice, the total COPs contents ranged from  $399.98 \pm 5.6$  to  $769.01 \pm 5.1$   $\mu\text{g/g}$ , showing that the addition of 5% juice induced COPs formation. On the contrary, the addition of 15% juice protected cholesterol from oxidation and the treatment with 10% of juice did not present significant effects on total COPs levels ( $p>0.05$ ).

The great variation observed in COPs levels may be explained by the influence of factors such as the temperature applied, pH changes in the fish muscle, time of exposure to heat, direct contact with oxygen and light, presence of antioxidants and pro-oxidants, among others. Therefore, cholesterol oxidation may occur by distinct pathways, leading to the formation of different oxides in different concentrations (Smith, 1987; Barriuso et al., 2017).

As presented in Table 4, high contents of epoxides were determined after heating in all samples. Formation of epoxide occurs by the epoxidation route and 5,6 $\alpha$ -EP and 5,6 $\beta$ -EP are identified as products of cholesterol oxidation by air. Therefore, the exposure of samples to atmospheric oxygen and heat during the cooking promoted the formation of relevant contents of 5,6 $\alpha$ -EP and 5,6 $\beta$ -EP. Cholesterol oxides derived from the oxidation of C-7 (7-keto, 7 $\beta$ -OH, and 7 $\alpha$ -OH) are commonly reported in thermo-oxidation process and were also determined in this study, although in minor amounts. Besides, the formation of cholesterol oxides originated from the side-chain oxidation, mainly 20 $\alpha$ -OH, was also remarkable (Smith, 1987).

The literature has reported the antioxidant potential of lemon juice and its bioactive compounds, which is in agreement with the findings determined herein (items 3.1.2 and 3.1.3). However, regarding the cholesterol oxidation, the addition of juice induced the COPs formation in air-fried sardines (5, 10, and 15%), grilled sardines (15%), and deep-fried sardines (5%). A protective effect against cholesterol oxidation was



noticed just in grilled samples treated with 10% lemon juice and in deep-fried sardines treated with 15% lemon juice ( $p < 0.05$ ).

Most of the bioactive compounds identified in the juice belong to the flavonoid class. The stability of flavonoids may be affected by heating, resulting in the degradation of these compounds. Nevertheless, the flavonoid degradation varies according to the heating temperature applied and the flavonoid structure (Ioannou, Chekir, & Ghoul, 2019).

Ioannou et al. (2019) demonstrated that the higher the time and the temperature, the greater the degradation rates of flavonoids. Therefore, since a higher temperature and time were applied during air frying, following the manufacturer's instruction, a greater degradation of these bioactive compounds can be expected.

On the contrary, previous studies have related that even after flavonoid degradation by heating, their products may still showing free radical scavenging activity (Murakami, Yamaguchi, Takamura, & Atoba, 2004; Ioannou et al., 2019), explaining the antioxidant effect of lemon during grilling (10% lemon juice) and deep-fat frying (15% lemon juice).

In addition, the stability and activity of flavonoids before and after heating also depends on the pH. As described by Mozuraityte et al. (2016), changes in pH may impact the droplet surface charge and the activity of pro-oxidants and antioxidants. Therefore, the reduction of pH values due to juice addition may also be considered. Besides the effect of pH on flavonoids, the pro-oxidant potential of acid mediums is well established, promoting COPs formation.

The results obtained for the fatty acids are also associated with the pro-oxidant effect of the acid medium and possible thermo-degradation of bioactive compounds present in the lemon juice. For most treatments, the juice treatment compromised the level of important fatty acids. In addition, it also increased the formation of COPs, mainly in air-fried samples.

Taking into account these considerations, strategies to limit oxidation in fish are of great importance, mainly the ones that suggest the use of natural antioxidants. Although lemon juice has been widely applied in culinary procedures and recognized as a rich source of bioactive compounds with antioxidant capacity, this is the first study that aimed to evaluate its effect on lipid oxidation in cooked fish and the results obtained do not indicate the use of lemon as a natural antioxidant.

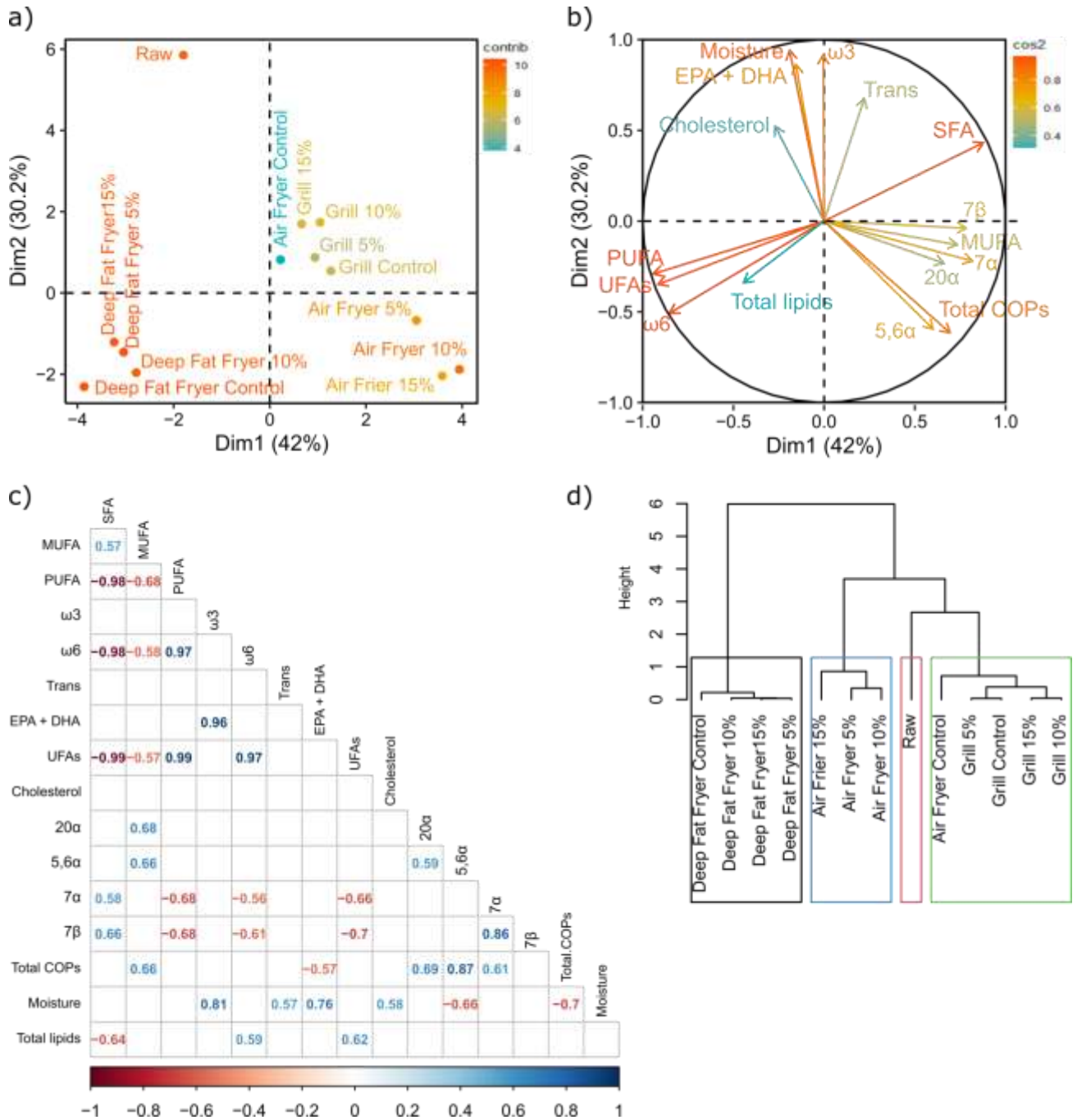
### 3.3. PCA analysis

PCA (Figure 2a and 2b) is a reduce dimensionality technic that allows the easy visualization of complex tables in a single two or two dimensionality maps. The first two PCs explain approximately 71% of the data variability (Dim 1: 39.6%, Dim 2: 31.8%), which is considered adequate to explain the variance of experimental data. All samples submitted to deep-fat frying (Figure 2a) were closely placed and were characterized by higher amounts of PUFAs, UFAs (PUFA + MUFA), and fatty acids from the n6-serie (Figure 2b and Table 3). Air-fried samples with addition of lemon juice (Figure 2a) presented the highest values of total COPs (Figure 2b and Tables 4). On the other hand, raw sample presented the highest values for moisture, fatty acids from the n3-serie, and the sum of EPA and DHA (EPA+DHA).

Regarding correlations,  $\Sigma n6$  vs PUFA ( $r = 0.96$ ) and EPA+DHA vs  $\Sigma n3$  ( $r = 1.00$ ) had a very positive strong correlation. PUFA had a strong negative correlation with SFA ( $r = -0.98$ ) and a moderate negative correlation with MUFA ( $r = -0.60$ ) (Figure 2c).

Figure 2d shows four groups of samples that were formed according to their similarities by applying HCPC. All samples submitted to deep-fat frying formed the first group and the second group is composed of air-fried samples treated with 10 and 15% juice. The third group presents just the raw samples, while the last group is formed by the grilled samples (control, 5, 10, and 15%) and the other air-fried samples (control and 5% lemon juice). These results demonstrate that the different cooking methods promoted distinct effects on the lipid composition of sardines, since the groups are mainly divided according to the cooking procedure. Just in air-fried samples, the different treatments were not all grouped together. Moreover, one group is composed only by the raw samples, showing the great influence of heating.

**Figure 2:** Multivariate analyses. Principal component analyses for treatments (a) and variables (b). Correlogram, where negative or positive correlation are represented by red or blue numbers, respectively (c). Hierarchical clustering from principal components (d).



## 4 CONCLUSION

This study demonstrated that air-frying, grilling, and deep-fat frying significantly affected the amount of polyunsaturated fatty acids and led to the formation of cholesterol oxides in sardine fillets. Considering the PUFAs degradation, the most pronounced effect was observed in grilled samples, where the PUFAs contents significantly decreased. The highest total COPs level was formed in air-fried sardines. Despite the antioxidant potential determined in the lemon juice extract and the bioactive compounds identified, the addition of lemon juice induced the oxidative reactions in most samples. The results suggest that the high temperatures applied during cooking led to the degradation of potent antioxidants such as flavonoids. Besides, the juice addition seems to favor lipid oxidation, probably due to the pro-oxidative effect generated by the pH reduction. Therefore, the results obtained do not suggest the use of lemon as a natural antioxidant and further studies should be conducted to better understand the mechanisms that may explain the effects of lemon addition on lipid oxidation in fish.

## 5 REFERENCES

1. Anderson, A., Campo, A., Fulton, E., Corwin, A., Jerome III, W. G., & O'Connor, M. S. (2020). 7-Ketocholesterol in disease and aging. *Redox Biology*, 29, 101380.
2. AOAC, G. (2016). Official methods of analysis of AOAC International. Rockville, MD: AOAC International, ISBN: 978-0-935584-87-5.
3. Bandarra, N. M., Marçalo, A., Cordeiro, A. R., & Pousão-Ferreira, P. (2018). Sardine (*Sardina pilchardus*) lipid composition: Does it change after one year in captivity?. *Food Chemistry*, 244, 408-413.
4. Barriuso, B., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2017). Oxysterols formation: a review of a multifactorial process. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 169, 39-45.
5. Calder, P. C. (2018). Very long-chain n-3 fatty acids and human health: fact, fiction and the future. *Proceedings of the Nutrition Society*, 77(1), 52-72.
6. de Moraes Barros, H. R., de Castro Ferreira, T. A. P., & Genovese, M. I. (2012). Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. *Food Chemistry*, 134(4), 1892-1898.
7. de Oliveira, V. S., Cháves, D. W. H., Gamallo, O. D., Sawaya, A. C. H. F., Sampaio, G. R., Castro, R. N., ... & Saldanha, T. (2020). 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.
8. de Oliveira, V. S., Ferreira, F. S., Cople, M. C. R., Labre, T. D. S., Augusta, I. M., Gamallo, O. D., & Saldanha, T. (2018). Use of Natural Antioxidants in the Inhibition of Cholesterol Oxidation: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(6), 1465-1483.
9. Duzzioni, A. G., Franco, A. G., Duzzioni, M., & De Sylos, C. M. (2010). Determinação da atividade antioxidante e de constituintes bioativos em frutas cítricas. *Brazilian Journal of Food & Nutrition/Alimentos e Nutrição*, 21(4).
10. Ferreira, F. S., Sampaio, G. R., Keller, L. M., Sawaya, A. C., Chávez, D. W., Torres, E. A., & Saldanha, T. (2017). 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.
11. Haraoui, N., Allem, R., Chaouche, T. M., & Belouazni, A. (2019). *In-vitro* antioxidant and antimicrobial activities of some varieties citrus grown in Algeria. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 1-12.

12. Ioannou, I., Chekir, L., & Ghoul, M. (2019). Effect of the Processing Temperature on the Degradation of Food Flavonoids: Kinetic and Calorimetric Studies on Model Solutions. *Journal of Food Engineering and Technology*, 8(2), 91-102.
13. Kieling, D. D., & Prudencio, S. H. (2019). Blends of lemongrass derivatives and lime for the preparation of mixed beverages: antioxidant, physicochemical, and sensory properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(3), 1302-1310
14. Ledesma-Escobar, C. A., Priego-Capote, F., & Luque de Castro, M. D. (2015). Characterization of lemon (*Citrus limon*) polar extract by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in high resolution mode. *Journal of Mass Spectrometry*, 50(11), 1196-1205.
15. Liu, R., Zhao, S. M., Liu, Y. M., Yang, H., Xiong, S. B., Xie, B. J., & Qin, L. H. (2010). Effect of pH on the gel properties and secondary structure of fish myosin. *Food Chemistry*, 121(1), 196-202.
16. McAtee, P., Karim, S., Schaffer, R. J., & David, K. (2013). A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation, and ripening. *Frontiers in Plant Science*, 4, 79.
17. Mcharek, N., & Hanchi, B. (2017). Maturation effects on phenolic constituents, antioxidant activities and LC-MS/MS profiles of lemon (*Citrus limon*) peels. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 90, 1-9.
18. Mencherini, T., Campone, L., Piccinelli, A. L., García Mesa, M., Sánchez, D. M., Aquino, R. P., & Rastrelli, L. (2012). HPLC-PDA-MS and NMR characterization of a hydroalcoholic extract of *Citrus aurantium* L. var. amara peel with antiedematogenic activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), 1686-1693
19. Miller, H. E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48(2), 91-91.
20. Mozuraityte, R., Kristinova, V., Rustad, T., & Storrø, I. (2016). The role of iron in peroxidation of PUFA: Effect of pH and chelators. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(4), 658-668.
21. Murakami, M., Yamaguchi, T., Takamura, H., & Atoba, T. M. (2004). Effects of thermal treatment on radical-scavenging activity of single and mixed polyphenolic compounds. *Journal of Food Science*, 69(1), FCT7-FCT10.
22. Nieva-Echevarría, B., Goicoechea, E., Manzanos, M. J., & Guillén, M. D. (2016). The influence of frying technique, cooking oil and fish species on the changes occurring in fish

- lipids and oil during shallow-frying, studied by <sup>1</sup>H NMR. *Food Research International*, *84*, 150-159.
23. Nile, S. H., Keum, Y. S., Nile, A. S., Jalde, S. S., & Patel, R. V. (2018). Antioxidant, anti-inflammatory, and enzyme inhibitory activity of natural plant flavonoids and their synthesized derivatives. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, *32*(1), e22002.
  24. Osada, K., Kodama, T., Yamada, K., & Sugano, M. (1993). Oxidation of cholesterol by heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *41*(8), 1198-1202.
  25. Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). 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.
  26. Ramos, K. O., Sánchez, Y. H., Pérez, N. V., & Villafaña, O. P. (2012). Actividad antioxidante in vitro y toxicidad de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp. (Rutaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, *17*(4), 368-379.
  27. Saldanha, T., & Bragagnolo, N. (2010). Effects of grilling on cholesterol oxide formation and fatty acids alterations in fish. *Food Science and Technology*, *30*(2), 385-390.
  28. Saldanha, T., Benassi, M. T., & Bragagnolo, N. (2008). 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*(7), 1301-1309.
  29. Saldanha, T., Sawaya, A. C. H. F., Eberlin, M. N., & Bragagnolo, N. (2006). 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.
  30. Seeram, N. P., Aviram, M., Zhang, Y., Henning, S. M., Feng, L., Dreher, M., & Heber, D. (2008). Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(4), 1415-1422.
  31. Sharma, A., Kaur, M., Katnoria, J. K., & Nagpal, A. K. (2018). Polyphenols in food: Cancer prevention and apoptosis induction. *Current Medicinal Chemistry*, *25*(36), 4740-4757.
  32. Smith, L. L. (1987). Cholesterol autoxidation 1981–1986. *Chemistry and Physics of Lipids*, *44*(2-4), 87-125.
  33. Sottero, B., Leonarduzzi, G., Testa, G., Gargiulo, S., Poli, G., & Biasi, F. (2019). Lipid oxidation derived aldehydes and oxysterols between health and disease. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *121*(1), 1700047.
  34. Spínola, V., Pinto, J., & Castilho, P. C. (2015). Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD–ESI-MS<sup>n</sup> and screening for their antioxidant activity. *Food Chemistry*, *173*, 14-30.

35. Teles, A. S., Chávez, D. W., Oliveira, R. A., Bon, E. P., Terzi, S. C., Souza, E. F., ... & Tonon, R. V. (2019). Use of grape pomace for the production of hydrolytic enzymes by solid-state fermentation and recovery of its bioactive compounds. *Food Research International*, *120*, 441-448.
36. Testai, L., & Calderone, V. (2017). Nutraceutical value of citrus flavanones and their implications in cardiovascular disease. *Nutrients*, *9*(5), 502.
37. 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.
38. Zotos, A., Gotsis, D., & Tsolakis, M. (2016). The Effect of Prior Frozen Storage ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) on the Quality of Oven-Baked Sardines (*Sardina pilchardus*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, *25*(2), 240-250.



## 6 SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Table 1:** pH values of raw and cooked sardines (control and with lemon juice at 5%, 10%, and 15%).

Treatments	Raw	Air Fryer	Grill	Deep-fat fryer
<b>Control</b>	6.23 <sup>b</sup> (0.12)	6.38 <sup>a</sup> (0.04)	6.41 <sup>a</sup> (0.02)	6.26 <sup>b</sup> (0.01)
<b>5% lemon juice</b>	5.61 <sup>f</sup> (0.02)	6.04 <sup>cd</sup> (0.03)	6.03 <sup>c</sup> (0.06)	6.00 <sup>cd</sup> (0.01)
<b>10% lemon juice</b>	5.40 <sup>g</sup> (0.02)	5.94 <sup>cde</sup> (0.01)	5.93 <sup>cde</sup> (0.01)	5.91 <sup>de</sup> (0.02)
<b>15% lemon juice</b>	5.39 <sup>g</sup> (0.01)	5.87 <sup>e</sup> (0.06)	5.92 <sup>cde</sup> (0.01)	5.93 <sup>cde</sup> (0.01)

Results presented as mean  $\pm$  standard deviation, n=3. Different letters in the same row indicate significant difference by Tukey test (p<0.05).

**Table 2:** Moisture (g/100 g) and total lipids contents (g/100 g, dry basis) of raw and cooked sardines (control and with lemon juice at 5%, 10%, and 15%).

	Air fryer					Grill				Deep-fat fryer			
	Raw	Control	5%	10%	15%	Control	5%	10%	15%	Control	5%	10%	15%
<b>Moisture (g/100 g)</b>	71.07 <sup>a</sup> (0.10)	50.91 <sup>d</sup> (1.22)	46.41 <sup>g</sup> (1.63)	46.90 <sup>fg</sup> (0.56)	41.00 <sup>h</sup> (0.05)	53.31 <sup>c</sup> (0.51)	55.26 <sup>bc</sup> (0.10)	56.39 <sup>b</sup> (0.64)	55.18 <sup>bc</sup> (0.36)	48.55 <sup>ef</sup> (0.89)	50.33 <sup>de</sup> (0.19)	46.09 <sup>g</sup> (0.39)	46.89 <sup>g</sup> (0.39)
<b>Total lipid (g/100 g)</b>	27.11 <sup>c</sup> (0.15)	15.91 <sup>g</sup> (0.94)	26.62 <sup>c</sup> (0.29)	16.37 <sup>g</sup> (0.88)	34.38 <sup>a</sup> (1.87)	23.24 <sup>de</sup> (1.32)	18.16 <sup>fg</sup> (0.46)	23.4 <sup>d</sup> (0.40)	20.68 <sup>ef</sup> (0.53)	28.95 <sup>bc</sup> (1.51)	29.82 <sup>b</sup> (0.42)	36.26 <sup>a</sup> (0.33)	30.91 <sup>b</sup> (0.75)

Results presented as mean ± standard deviation, n=3. Different letters in the same row indicate significant difference by Tukey test (p<0.05). 5%, 10%, and 15% correspond to the treatments with addition of lemon juice at 5%, 10%, and 15 %, respectively.