

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS  
ALIMENTOS

Cristine Rampelotto

**ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO (*Cymbopogon flexuosus*) NA  
DIETA DE FRANGOS E PEIXES: IMPACTOS NO DESEMPENHO E  
QUALIDADE DA CARNE**

Santa Maria, RS  
2017



**Cristine Rampelotto**

**ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO (*Cymbopogon flexuosus*) NA DIETA DE  
FRANGOS E PEIXES: IMPACTOS NO DESEMPENHO E QUALIDADE DA CARNE**

Tese apresentada para o curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, área de concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Tatiana Emanuelli

Santa Maria, RS  
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Rampelotto, Cristine  
ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO (*Cymbopogon flexuosus*)  
NA DIETA DE FRANGOS E PEIXES: IMPACTOS NO DESEMPENHO E  
QUALIDADE DA CARNE / Cristine Rampelotto.- 2017.  
173 p.; 30 cm

Orientadora: Tatiana Emanuelli  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-  
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2017

1. Óleo essencial 2. Suplementação dietética 3.  
Qualidade da carne 4. Desempenho produtivo 5. Frangos de  
corte e jundiás I. Emanuelli, Tatiana II. Título.

© 2017

Todos os direitos autorais reservados a Cristine Rampelotto. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante citação da fonte.

Endereço: Avenida Roraima, n. 1000, bairro Camobi, Santa Maria, RS. CEP: 97105900

Fone: (0xx) 55 32208547; email: cris\_rampelotto@hotmail.com

**Cristine Rampelotto**

**ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO (*Cymbopogon flexuosus*) NA DIETA DE FRANGOS E PEIXES: IMPACTOS NO DESEMPENHO E QUALIDADE DA CARNE**

Tese apresentada para o curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, área de concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

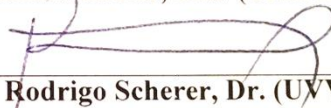
**Aprovada em de agosto de 2017:**



**Tatiana Emanuelli**  
(Presidente/Orientador)



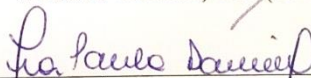
**Alexandra Pretto, Dra. (UNIPAMPA)**



**Rodrigo Scherer, Dr. (UVV)**



**Mauro Cunha, Dr. (UFSM)**



**Ana Paula Daniel, Dra. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2017



## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha família que foi meu esteio durante esta jornada e que sempre acreditou na minha capacidade de seguir em frente.





## AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos por possibilitar a formação profissional e promover o incentivo à pesquisa.

Agradeço a minha orientadora, Tatiana Emanuelli, por me permitir fazer parte da sua equipe e compartilhar comigo os seus saberes. Tu és um exemplo de profissional e fonte de inspiração para todos que tem o privilégio de trabalhar contigo.

À toda a equipe do NIDAL a qual não apenas participou da construção experimental deste trabalho, mas também foi apoio e guarida em todos os momentos desta caminhada. Obrigada colegas por promoverem o meu crescimento profissional e principalmente pelo amadurecimento pessoal proporcionado pelo convívio com vocês.

Aos professores Bernardo Baldisserotto, Berta M. Heinzmann, Leila P. da Silva e Roger Wagner pela constante colaboração.

À equipe do Laboratório Piscicultura - UFSM, pela disposição em me receber e compartilhar conhecimento, recursos e ideias. Aprendi muito com vocês.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo auxílio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

A todos os servidores e professores do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos por fazerem do departamento o que ele é hoje.

Aos membros da banca Alexandra Pretto, Rodrigo Scherer, Mauro Cunha, Ana Paula Daniel, Bernardo Baldisserotto e Paulo Campagnol por se disporem a analisar e contribuir com este trabalho.

A todos que de uma maneira ou de outra fizeram parte dessa caminhada.



“Good education is not what fills your head with facts but what stimulates curiosity. You then learn for the rest of your life.”

(Neil deGrasse Tyson)



## RESUMO

Tese de doutorado  
Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos  
Universidade Federal de Santa Maria

### **ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO (*Cymbopogon flexuosus*) NA DIETA DE FRANGOS E PEIXES: IMPACTO NO DESEMPENHO E QUALIDADE DA CARNE**

AUTORA: CRISTINE RAMPELOTTO  
ORIENTADORA: TATIANA EMANUELLI

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação dietética com óleo essencial (OE) de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) nos indicadores de produtividade e marcadores bioquímicos de frangos de corte (*Galus galus*) e de jundiás (*Rhamdia quelen*), bem como avaliar a qualidade e a estabilidade da carne destes animais durante o armazenamento sob congelamento. Frangos Cobb machos com um dia de vida foram alimentados por 20 dias com dieta experimental controle ou contendo 0,25 mL de OE/kg. Verificou-se que o OE aumentou o ganho de peso dos animais apenas na 3ª. semana de suplementação, mas elevou os níveis séricos de triglicerídeos e o peso do fígado em 35% e 10%, respectivamente, e reduziu as globulinas séricas em 16%. A carne do peito dos frangos tratados com OE não apresentou alteração na composição centesimal, mas exibiu aumento da proporção de ácido palmítico. Não foi observada alteração no perfil de compostos voláteis da carne, mas a aceitação quanto ao sabor foi aumentada pela dieta com OE. Durante o armazenamento da carne a -18°C por 12 meses verificou-se que a suplementação com OE aumentou o pH e os valores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), indicando que, apesar de melhorar a aceitação sensorial do sabor da carne, a estabilidade lipídica foi reduzida com a suplementação com OE. Nos peixes em fase de terminação (~400g) foi investigado o efeito do arraçoamento por 20 dias com dieta controle ou suplementada com OE de *C. flexuosus* microencapsulado nos níveis de 1 e 3 mL/kg de ração. Foram avaliados o desempenho produtivo, parâmetros metabólicos, a composição corporal e a qualidade dos filés. O comprimento total, o fator de condição, o ganho de peso, a taxa de crescimento específico, o índice hepatossomático, o teor de gordura visceral e a composição centesimal dos filés não foram afetados pela suplementação com OE. Os níveis plasmáticos de proteína total, globulina e triglicérides foram reduzidos pela suplementação com 1 mL/kg de OE. A suplementação com 1 mL/kg aumentou o rendimento de carcaça e a deposição de proteína na carcaça, mas reduziu o índice gonadossomático e a deposição de gordura em comparação ao grupo controle. Além disso, 1 mL/kg aumentou o consumo de ração em comparação com 3 mL/kg. Nos filés de jundiá a suplementação dietética com OE não afetou a composição centesimal, a composição de ácidos graxos ou a aceitação sensorial. No entanto, durante a estocagem a -18°C por 12 meses, os filés do tratamento com 3 mL/kg apresentaram maior instabilidade de cor e textura. Além disso, a suplementação com OE de *C. flexuosus* não foi capaz de prevenir reações oxidativas em proteínas ou lipídios dos filés em nenhum dos níveis utilizados. Essas evidências sugerem que o uso de OE de *C. flexuosus* na ração de aves não é recomendado, ao passo que a suplementação com 1 mL/kg de OE pode ser recomendada na alimentação de jundiás em fase de engorda, para aumentar o rendimento da carcaça e o teor de proteína na mesma.

**Palavras-chave:** *Rhamdia quelen*. Óleo essencial. Citral. Suplementação dietética. Qualidade da carne. Desempenho produtivo. Microencapsulação.



## ABSTRACT

Doctoral thesis  
Graduate Program on Food Science and Technology  
Federal University of Santa Maria

### ESSENTIAL OIL OF LEMONGRASS (*Cymbopogon flexuosus*) ON CHICKEN AND FISH DIET: IMPACT ON GROWTH PERFORMANCE AND MEAT QUALITY

AUTHOR: CRISTINE RAMPELOTTO

ADVISOR: TATIANA EMANUELLI

The aim of present work was to evaluate the effect of dietary supplementation with essential oil (EO) of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) on productivity indicators and biochemical markers of broilers (*Galus galus*) and silver catfish (*Rhamdia quelen*), as well as to evaluate the quality and stability of the meat of these animals during frozen storage. One-day-old male Cobb chicks were fed control diet or diet supplemented with 0.25 mL of EO/kg for 20 days. EO increased body weight only in the 3<sup>rd</sup> week of supplementation but increased serum triglycerides and liver weight by 35% and 10%, respectively, and reduced serum globulins by 16%. Breast meat from animals treated with EO had no change in the proximate composition, but had higher proportion of palmitic acid. There was no change in the meat volatile compound profile but the taste acceptance was improved by EO diet. EO supplementation increased pH and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) values during meat storage at -18°C for 12 months, indicating that lipid stability during frozen storage was reduced by EO supplementation. The effect of feeding control diet or diet supplemented with microencapsulated lemongrass EO for 1 or 3 mL/kg during 20 days was evaluated in adult silver catfish. Productive performance, metabolic parameters, body composition and fillet quality were investigated. Total length, condition factor, weight gain, specific growth rate, hepatosomatic index, visceral fat content and fillet composition were not affected by EO supplementation. Plasma levels of total protein, globulin and triglycerides were reduced by supplementation with 1 mL/kg of EO. EO supplementation at 1 mL/kg increased carcass yield and protein deposition in the carcass but reduced the gonadosomatic index and fat deposition compared to the control group. In addition, 1 mL/kg increased feed intake compared to 3 mL/kg of EO. Dietary supplementation with EO did not affect the proximate composition, fatty acid composition or sensory acceptance of silver catfish fillets. However, during 12 months of frozen storage, fillets from fish treated with 3 mL/kg of EO had greater color and texture changes. In addition, supplementation with *C. flexuosus* EO was not able to prevent protein or lipid oxidative changes in fish fillets regardless of the dose used. These evidence suggest that the use of *C. flexuosus* EO in poultry feed is not recommended, whereas feed supplementation with 1 mL/kg of microencapsulated EO is recommended for silver catfish in the fattening stage, to increase the carcass yield and protein deposition in carcass.

**Keywords:** *Rhamdia quelen*. Essential oil. Citral. Dietary supplementation. Meat quality. Productive performance. Microencapsulation.





## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Introdução

Figura 1 - Molécula de isopreno.....	25
Figura 2 - Exemplar de capim-limão ( <i>Cymbopogon flexuosus</i> ).....	26
Figura 3 - Óleo essencial de capim-limão ( <i>Cymbopogon flexuosus</i> ) .....	27
Figura 4 - Formas isoméricas do citral .....	28
Figura 5 - Exemplar de jundiá ( <i>Rhamdia quelen</i> ) .....	34

### Manuscrito I

FIGURE 1 - Carcass yield (A) and liver weight (B) of chicks fed with a standard diet (Control) or supplemented with essential oil of <i>Cymbopogon flexuosus</i> .....	69
FIGURE 2 - Blood biochemistry of chicks fed with a standard diet (Control) or supplemented with essential oil of <i>Cymbopogon flexuosus</i> .....	70

### Manuscrito II

FIGURE 1 - Changes in pH (A), texture (B), peroxide value (C) and TBARS (D) values during frozen storage of breast meat from chicks fed with a standard diet (control) or supplemented with essential oil of <i>Cymbopogon flexuosus</i> .....	95
--	----

### Manuscrito IV

FIGURE 1 - Representative chromatograms of volatile compounds of essential oil (EO) of <i>C. flexuosus</i> (A) and fillets from fish fed with diet supplemented with different levels of EO (B).....	143
FIGURE 2 - Total color difference (A), pH (B) and water holding capacity (C) during frozen storage of fillets from silver catfish fed with diet supplemented with different levels of essential oil of <i>Cymbopogon flexuosus</i> .....	145
FIGURE 3 - Protein and lipid oxidation during frozen storage of fillets from silver catfish fed with diet supplemented with different levels of essential oil of <i>Cymbopogon flexuosus</i> . SH content (A), protein carbonyl groups (B), conjugate dienes (C), peroxide value (D) and hexanal levels (E).....	147



## LISTA DE TABELAS

### Manuscrito I

TABLE 1 - Proximate composition of diets.....	66
TABLE 2 - Live body weight, cumulative feed intake and feed conversion of chicks fed with a standard diet (Control) or supplemented with essential oil of <i>Cymbopogon flexuosus</i> .....	67

### Manuscrito II

TABLE 1 - Proximate composition, cholesterol content and sensory acceptance of breast meat from chicks fed with a standard diet (control) or diet supplemented with essential oil of <i>Cymbopogon flexuosus</i> .....	91
TABLE 2 - Fatty acids composition of breast meat from chicks fed with a standard diet (control) or diet supplemented with essential oil of <i>Cymbopogon flexuosus</i> .....	92
TABLE 3 - Volatile compounds of raw breast meat from chicks fed with a standard diet (control) or diet supplemented with essential oil of <i>Cymbopogon flexuosus</i> .....	93
TABLE 4 - Color coordinates during frozen storage of breast meat from chicks fed with a standard diet (control) or supplemented with essential oil of <i>Cymbopogon flexuosus</i> .....	94

### Manuscrito III

TABLE - 1. Ingredients and proximate composition of experimental diets.....	101
TABLE - 2. Productive performance of silver catfish ( <i>Rhamdia quelen</i> ) fed different concentrations of <i>Cymbopogon flexuosus</i> EO.....	104
TABLE - 3. Body yield and somatic indices of silver catfish ( <i>Rhamdia quelen</i> ) fed different concentrations of <i>Cymbopogon flexuosus</i> EO.....	104
TABLE - 4. Proximate composition of whole fish and fish fillet of silver catfish ( <i>Rhamdia quelen</i> ) fed different concentration of <i>Cymbopogon flexuosus</i> EO.....	105
TABLE - 5 Plasmatic variables of silver catfish ( <i>Rhamdia quelen</i> ) fed different concentrations of <i>Cymbopogon flexuosus</i> EO.....	105
TABLE - 6 Metabolic parameters in liver and digestive enzymes of silver catfish ( <i>Rhamdia quelen</i> ) fed diets containing different concentrations of <i>Cymbopogon flexuosus</i> EO.....	106

### Manuscrito IV

TABLE 1 - Composition of the essential oil of <i>Cymbopogon flexuosus</i> .....	139
TABLE 2 - Ingredients of diets.....	140
TABLE 3 - Proximate composition and sensory acceptance of fillets from silver catfish fed with diet supplemented with different levels of essential oil (EO) of <i>Cymbopogon flexuosus</i> .....	141
TABLE 4 - Fatty acid composition of fillets from silver catfish fed with diet supplemented with different levels of essential oil (EO) of <i>Cymbopogon flexuosus</i> .....	142
TABLE 5 - Changes in color coordinates during frozen storage of fillets from silver catfish fed with diet supplemented with different levels of essential oil (EO) of <i>Cymbopogon flexuosus</i> .....	144
TABLE 6 - Texture changes during frozen storage of fillets from silver catfish fed with diet supplemented with different levels of essential oil of <i>Cymbopogon flexuosus</i> .....	146



## LISTA DE ABREVIATURAS

- ALT** – Alanina aminotransferase
- ANOVA** – Análise de variância
- AST** – Aspartato aminotransferase
- ATP** – Adenosine trifosfato
- BTEE** – N-Benzoyl-L-tyrosine ethyl Ester
- CG** – Cromatógrafo gasoso
- DC**- Dienos conjugados
- DNPH** - Dinitrofenilhidrazina
- EROs** – Espécies reativas de oxigênio
- MAP** – Atmosfera modificada
- MDA** – Malondialdeído
- EM** – Espectrômetro de massas
- OE** – Óleo essencial
- SPME** – Microextração em fase sólida
- TAME** – N<sub>α</sub>-p-Tosyl-L-arginine methyl Ester hydrochloride
- TBARS** – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
- TPA** – Análise de perfil de textura
- VP** – Valor de peróxidos
- ΔE** – Diferença total de cor



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	23
1.1. ÓLEO ESSENCIAL .....	24
1.2. CARNE DE AVES E PEIXES E CONSERVAÇÃO PELO CONGELAMENTO .....	29
1.3. JUNDIÁ.....	33
1.4. ÓLEOS ESSENCIAIS NA PRODUÇÃO ANIMAL.....	35
1.5. ÓLEOS ESSENCIAIS E QUALIDADE DA CARNE .....	37
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	41
2.1. OBJETIVO GERAL.....	41
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
3.1. ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. flexuosus</i> : OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E MICROENCAPSULAÇÃO .....	42
3.2. DIETAS E MANEJO DOS ANIMAIS .....	43
3.2.1. Frangos .....	43
3.2.2. Peixes.....	43
3.3. DESEMPENHO PRODUTIVO E ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	44
3.3.1. Frango.....	44
3.3.2. Peixes.....	44
3.4. ANÁLISE DA CARNE.....	46
<b>4. DESENVOLVIMENTO</b> .....	53
4.1. MANUSCRITO I: DIETARY SUPPLEMENTATION WITH LEMONGRASS ESSENTIAL OIL ON GROWTH PERFORMANCE AND BLOOD BIOCHEMISTRY OF GROWING BROILERS .....	53
4.2. MANUSCRITO II: EFFECT OF DIETARY SUPPLEMENTATION WITH LEMONGRASS ESSENTIAL OIL ON BREAST MEAT QUALITY OF GROWING BROILERS.....	71
4.3. MANUSCRITO III: SUPPLEMENTATION WITH MICROENCAPSULATED LEMONGRASS ESSENTIAL OIL IMPROVES PROTEIN DEPOSITION AND CARCASS YIELD IN SILVER CATFISH ( <i>Rhamdia quelen</i> ).....	96
4.4. MANUSCRITO IV: LEMONGRASS ( <i>Cymbopogon flexuosus</i> ) ESSENTIAL OIL SUPPLEMENTATION ON QUALITY AND STABILITY OF SILVER CATFISH FILLETS DURING FROZEN STORAGE.....	113
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	148
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	153
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	155





## 1. INTRODUÇÃO

A avicultura é um setor de destaque na economia brasileira. Além do elevado consumo interno de aves, o país também apresenta expressiva participação no mercado de exportação de carne de frango (IBGE, 2017). A aquicultura contribui com uma parcela menor da economia, porém apresenta grande potencial de expansão, devido à disponibilidade de recursos hídricos no Brasil e a crescente demanda por carne de pescado, exercida por consumidores que buscam uma alimentação mais saudável (FAO, 2013).

As carnes são de maneira geral, alimentos altamente perecíveis, porém muito nutritivos. A carne de aves é bastante apreciada pelos consumidores e apresenta alto teor de proteína, baixo teor de gordura e maior proporção de ácidos graxos poli-insaturados que as carnes vermelhas (TACO, 2011). O pescado, além de apresentar aminoácidos essenciais à dieta humana, tem proteínas de elevada qualidade e digestibilidade, é importante fonte de vitaminas do complexo B e lipossolúveis, minerais e ácidos graxos poli-insaturados n-3, que apresentam uma série de efeitos benéficos à saúde (EMANUELLI; PICCOLO, 2013).

A garantia da segurança e da qualidade dos alimentos é de extrema importância para a indústria e consumidores, bem como a produtividade e durabilidade. Busca-se, rotineiramente, desenvolver métodos e processos que permitam garantir e aprimorar estes elementos. Os fatores críticos para a qualidade de carnes são a condição inicial da matéria-prima e as condições de conservação. A contaminação microbiana e a velocidade das reações oxidativas ocorridas durante o armazenamento são decisivas para a vida de prateleira e a segurança dos produtos e estão intimamente relacionadas ao desenvolvimento de alterações organolépticas e nutricionais.

Os fatores pré-abate tais como o sistema de criação, o manejo e a nutrição são determinantes para definir as características e a qualidade da carne. A alimentação oferecida aos animais é um dos elementos que mais influencia a composição química e valor nutricional da carne, podendo assim ser decisiva para os processos de degradação que ocorrem durante o armazenamento (EMANUELLI; PICCOLO, 2013).

O uso de produtos naturais como os óleos essenciais aplicados diretamente em carnes tem sido uma estratégia para reduzir os efeitos negativos do armazenamento e retardar a deterioração dos alimentos sem a necessidade de aditivos sintéticos (ERKAN et al., 2011; FRATIANNI et al., 2010). Os óleos essenciais também vêm sendo estudados como possíveis substitutos de antibióticos e promotores de crescimento no arraçamento animal (HONG et al., 2012; ZHENG et al., 2009), o que configura estes compostos como importantes

adjuvantes na manutenção da produtividade animal, bem como na produção de alimentos de alta qualidade.

### 1.1. ÓLEO ESSENCIAL

O metabolismo das plantas existe em dois níveis funcionais: primário e secundário. O metabolismo primário abrange todos os processos essenciais para produção de energia, crescimento e desenvolvimento, enquanto o metabolismo secundário é indispensável para a sobrevivência do indivíduo em seu meio, compreendendo todas as interações de plantas com seu ambiente biótico e abiótico. A característica inerente do metabolismo secundário é a sua elevada plasticidade genética e diversidade que garante adaptações das plantas para as demandas de seu ambiente de contínua mudança (HARTMANN, 2007).

Uma grande variedade estrutural de metabólitos secundários ocorre nas plantas, como por exemplo alcaloides, ácidos orgânicos, flavonoides, taninos, terpenoides, glicosinolatos, glicosídeos cianogênicos, ligninas, lignanas, entre outros compostos. Apesar da grande variedade de metabólitos, seus precursores são restritos e, usualmente, originam-se do ciclo de Krebs. A maioria dos metabólitos secundários são sintetizados no citoplasma das células vegetais e armazenados em vacúolos, quando hidrofílicos, ou em tricomas, cutículas e dutos de resina, quando lipofílicos (WINK, 2010).

Os óleos essenciais (OEs) são líquidos oleosos, aromáticos, extraídos a partir de material vegetal, como flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutas e raízes (BURT, 2004). Os OEs são misturas complexas de substâncias voláteis, principalmente produtos do metabolismo secundário das plantas. Geralmente são formados de mono e sesquiterpenos e em menor quantidade por compostos fenólicos, tais como fenilpropanoides, embora outros grupos de compostos também possam ocorrer em quantidades relevantes (FARIA et al., 2013). Podem conter cerca de 20-60 componentes em variadas concentrações e são caracterizados por dois ou três componentes principais em concentrações relativamente elevadas (20-70%) em comparação com outros componentes presentes em quantidades vestigiais (BAKKALI et al., 2008).

Os terpenos são formados a partir de combinações de várias unidades de isopreno (Figura 1), cuja base são cinco átomos de carbono (C5). Podem ser classificados como monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15), hemiterpenos (C5), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40), sendo os dois primeiros mais comuns nos vegetais e os

monoterpenos as moléculas mais representativas, que constituem cerca de 90% da composição dos OEs (BAKKALI et al., 2008).

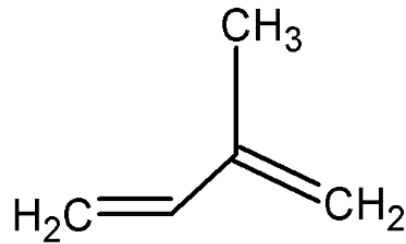


Figura 1 - Molécula de isopreno. Fonte: autoria pessoal.

Os terpenoides, em sua maioria são encontrados no reino vegetal e quando gerados pelo metabolismo primário das plantas, exercem funções na fotossíntese, respiração, fluidez da membrana e na regulação do crescimento e do desenvolvimento (KREUZWIESER; SCHNITZLER; STEINBRECHER, 1999). Quando originados do metabolismo secundário atuam como protetores contra danos causados por altas temperaturas, herbívoros ou patógenos e têm atividade na comunicação entre vegetais. Além disso, podem ter valor comercial, farmacológico e agrícola substanciais (KREUZWIESER; SCHNITZLER; STEINBRECHER, 1999; VRANOVÁ; COMAN; GRUISSEM, 2012)

O gênero *Cymbopogon* é fonte importante de OEs com numerosos compostos bioativos de relevância farmacêutica e medicinal (GANJEWALA, 2009). Este gênero pertence à família *Poaceae* (Gramineae) e é originário do Sul da Ásia e Austrália. Foi perfeitamente adaptado no Brasil, e é comumente encontrado em diversos estados brasileiros. A espécie *Cymbopogon flexuosus* (Figura 2), conhecida como capim-limão da Índia e como capim cidreira, tem florescimento intenso nas condições climáticas do Brasil e um bom rendimento de biomassa (MAY et al., 2008).

Na Ásia, especialmente na Índia, capim-limão tem sido usado há muito tempo como condimento da culinária típica e suas folhas e talos são encontrados nos mercados locais e utilizados como especiarias, para a lavagem de cabelos e como água de colônia. O seu OE (Figura 3) tem coloração entre o amarelo e castanho avermelhado e um forte aroma de limão (GANJEWALA, 2009). A partir destes usos tradicionais populares surgiu o interesse em estudar sua composição e atividade biológica.

A espécie *C. flexuosus* produz um OE com alto conteúdo de citral (KHANUJA et al., 2005), um monoterpene aldeído que ocorre naturalmente como uma mistura de duas formas isoméricas: geranial ( $\alpha$ ) e neral ( $\beta$ ) (Figura 4). Este OE apresenta efeitos farmacológicos como

diminuição de resposta nociceptiva, ação anti-inflamatória, inibição da formação de óxido nítrico e efeito quimiopreventivo em animais (GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS, 2013).



Figura 2 - Exemplar de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*). Fonte: Imagem cedida pelo botânico Ethan Freid.

O OE de *C. flexuosus* tem várias propriedades conhecidas e uma diversidade de aplicações. Estudos propõem o uso deste OE como repelente de insetos ou inseticida (CABALLERO-GALLARDO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2012), antifúngico em material vegetal (KUMAR et al., 2009) e até mesmo para uso clínico na redução da propagação de células tumorais (SHARMA et al., 2009). Este OE não tem sido empregado em produtos alimentícios ou na alimentação de animais, mas ensaios *in vitro* demonstram sua alta atividade antimicrobiana (SACCHETTI et al., 2005; SILVEIRA et al., 2012) e potencial antioxidante (CHANDRA; AH, 2014), indicando potencialidade para o uso na conservação de alimentos.

A avaliação da concentração inibitória mínima e da concentração bactericida mínima de OEs de 10 diferentes plantas, no teste do disco de difusão em ágar, demonstrou que o OE de *C. flexuosus* inibiu fortemente todas as bactérias gram-positivas testadas, apresentando maior atividade inibitória que a ampicilina para *Staphylococcus aureus*. Também inibiu fortemente *Salmonella* Typhimurium, *Yersinia enterocolitica* e *Proteus vulgaris*, e

moderadamente *Escherichia coli*. Entre os óleos testados, o de *C. flexuosus* foi o mais eficiente, especialmente contra o *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhimurium* e, juntamente com o óleo de orégano, foram os únicos a inibir o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* (SILVEIRA et al., 2012).



Figura 3 - Óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*). Fonte: Acervo pessoal da autora.

Como visto anteriormente, o capim-limão é uma planta versátil que apresenta uma ampla gama de usos demonstrando valor econômico e industrial em diversos setores como o farmacêutico e o alimentício. Além do mais, é um vegetal vigoroso que pode render entre 7.000 – 25.000 kg de matéria seca por hectare cultivado, resultando em um rendimento de OE na faixa de 30 a 140 kg/ha (JOYCE et al., 2015; ZHELJAZKOV et al., 2011), sendo o material lignocelulósico resíduo da extração de OE um produto com potencial econômico para a produção de biocombustíveis (JOYCE et al., 2003). Todas essas características concedem ao *C. flexuosus* e a seus derivados grande viabilidade econômica.

Alguns fatores físico-químicos como a presença de oxigênio, pH, exposição a luz e temperatura afetam a integridade dos OEs e podem ocasionar oxidação e perda de compostos voláteis, afetando as características sensoriais e a atividade biológica (DIMA; DIMA, 2015). Devido a isso, o emprego de estratégias para proteger os OEs da degradação que pode ocorrer

durante o processamento e armazenamento se torna indispensável para garantir a qualidade do mesmo e, neste sentido, a microencapsulação surge como uma alternativa relevante.

A microencapsulação é um procedimento que busca revestir ou aprisionar um material puro ou composto em micropartículas com o objetivo de protegê-lo de condições ambientais desfavoráveis (GIBBS et al., 1999). Para a microencapsulação de OEs tem-se empregado, em especial, revestimentos poliméricos como polissacarídeos e as técnicas que mais se destacam são a coacervação e a atomização que, apesar de resultarem em alguma perda de OE durante a fabricação das microcápsulas, garantem proteção ao OE e preservam sua atividade biológica (Asbahani et al., 2015).

Apesar dos OEs apresentarem diversas atividades benéficas, é preciso considerar que o uso inapropriado deste tipo de substância, como de muitas outras, pode causar danos à saúde. Por isso é importante conhecer os efeitos agudos e subagudos da administração de OEs. Não existem estudos sobre a toxicidade do OE de *C. flexuosus*, mas apenas para a espécie *C. citratus*, que possui composição química muito semelhante. A análise de toxicidade do OE de capim-limão (*C. citratus*) em ratos, não revelou nenhuma anormalidade no comportamento geral ou morte em animais que receberam doses diárias de 5-1500 mg de óleo/kg de peso corporal por gavagem durante 14 dias. Também não foram observadas alterações morfológicas ou histológicas no fígado ou na mucosa gástrica dos animais tratados com estas doses. Foram observadas anormalidades histológicas e comportamentais nos animais tratados com doses mais altas (2000 e 3000 mg de óleo/kg de peso corporal) e a dose letal média para ratos foi de 3250 mg de óleo/kg de peso corporal (FANDOHAN et al., 2008).

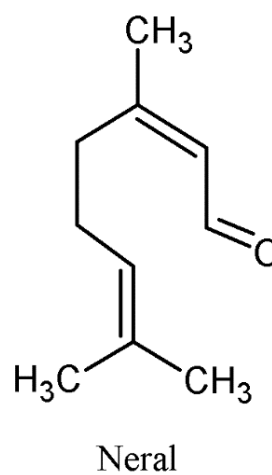
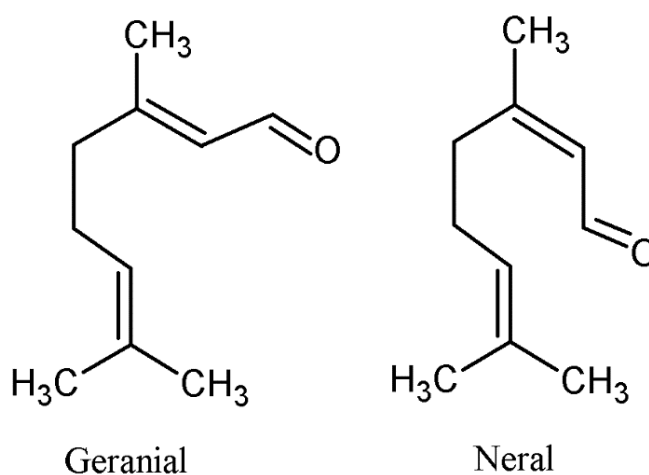


Figura 4 - Formas isoméricas do citral. Fonte: autoria pessoal.

As doses de óleo que apresentaram efeitos tóxicos em animais (2000-3000 mg/kg de peso corporal) são relativamente altas em comparação com as concentrações de OEs encontradas nos alimentos e materiais vegetais, onde estes óleos que representam em torno de 1% da composição do capim-limão fresco (SANTOS et al., 2009). Além disso, o OE de capim-limão apresentou concentração de metais pesados bem abaixo dos níveis considerados críticos para alimentação humana, mesmo quando oriundo de plantas cultivadas em solo contaminado (LAL et al., 2013).

## 1.2. CARNE DE AVES E PEIXES E CONSERVAÇÃO PELO CONGELAMENTO

O Brasil é um grande produtor e exportador de carnes, com destaque para a produção de suínos, bovinos e aves. Segundo o IBGE, 2017, só no primeiro trimestre de 2017 foram abatidos no país em torno de 1,48 bilhões de cabeças de frango, atingindo um peso acumulado de 3,38 milhões de toneladas e levando a região sul a uma posição de destaque na produção de aves.

Nas últimas décadas o mercado avícola tem apresentado um progressivo aumento na produção e no consumo em diversas regiões do mundo, tendência que deve se manter ao longo dos próximos anos, devido ao crescimento da população mundial e ao aumento na renda nos países subdesenvolvidos (BARBUT, 2012). A carne de aves é atrativa devido ao preço acessível e a diversidade de cortes e produtos (CAVANI; PETRACCI, 2009). Além disso, é vista como um alimento saudável e nutritivo por apresentar alto teor de proteína (28,5%) e baixo teor de gordura (7,8%), juntamente com um módico teor de colesterol (85 mg%) (TACO, 2011) e maior proporção de ácidos graxos poli-insaturados do que as carnes vermelhas (RULE, 2002).

Estima-se que cerca de 3,5 milhões de pessoas estejam envolvidas direta ou indiretamente na pesca e na aquicultura no Brasil. Da década de 80 até o ano de 2011 a produção de pescado no país passou de 808,6 para 1432,6 mil toneladas anuais e a partir dos anos 2000 a aquicultura passou a contribuir de forma mais representativa para a produção nacional (FAO, 2013). A aquicultura é um mercado promissor com potencial de crescimento, pois o Brasil conta com notáveis recursos hídricos em sua porção continental (FAO, 2013). Além disso, o Banco Mundial projeta que no período de 2008 a 2030 o consumo mundial de peixes oriundos da aquicultura aumentará 98%, totalizando 93,6 milhões de toneladas em 2030 (TWB, 2013). No Brasil estima-se que a produção de pescado cultivado passe de 560

mil toneladas nos anos 2013 a 2015 para 1145 mil toneladas em 2025, o que representa um crescimento de 104% (FAO, 2016).

De maneira geral, os peixes possuem proteína de alta qualidade, vitaminas e minerais essenciais, além de serem ricos em ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (PUFA), especialmente os n-3, que são importantes para manter a integridade da membrana celular e para a síntese de prostaglandinas que regulam muitos processos fisiológicos, tais como a coagulação sanguínea e a inflamação, além de reduzirem o risco de doenças crônicas como artrite, diabetes, obesidade, e doenças cardiovasculares (WALL et al., 2010). A presença de gorduras na dieta também é necessária para promover a absorção das vitaminas lipossolúveis A, D, E e K, a partir de alimentos, e na regulação do metabolismo do colesterol corporal (SILVA; MURA, 2010). Além dos benefícios nutricionais da carne de pescado, a sua produção possui potencialidade econômica. Mas, apesar destas qualidades, os pescados e produtos à base de pescados são altamente perecíveis e podem sofrer alterações que causam prejuízos financeiros e à saúde do consumidor.

O congelamento é uma forma de preservação de alimentos muito utilizada atualmente. Ele impede o crescimento microbiano e reduz a velocidade de reações bioquímicas, porém não evita que ocorram oxidações proteica e lipídica, as quais progridem com o tempo de armazenamento, limitando a vida comercial de alimentos congelados. As carnes que apresentam alto teor de ácidos graxos poli-insaturados são particularmente mais propensas à oxidação lipídica durante o armazenamento congelado (SOYER et al., 2010).

Não apenas o tipo de gordura, mas também o teor de lipídios da carne influencia os processos oxidativos. O armazenamento congelado promove significativa deterioração dos lipídios em carnes com médio (15%) e alto teor de gordura (30%), enquanto as de baixo teor (3%) sofrem pouca influência do processo de congelamento, porém podem apresentar maior conteúdo de catalisadores da oxidação como íons metálicos (UTRERA; MORCUENDE; ESTÉVEZ, 2014).

A oxidação lipídica é mediada por radicais livres e apresenta as fases de iniciação, propagação e terminação. A iniciação envolve a formação de radicais livres lipídicos, o rearranjo das duplas ligações com a formação de dienos conjugados e a reação destes radicais com o oxigênio, formando os radicais peroxila que, durante a fase de propagação, reagem com os outros lipídeos dando origem a hidroperóxidos e novos radicais livres.

Os hidroperóxidos de ácidos graxos insaturados, formados por auto-oxidação, são muito instáveis e na fase de terminação decompõem-se em uma grande variedade de compostos não radicalares que incluem tanto compostos aromáticos voláteis, como produtos



não voláteis. Dentre os produtos voláteis pode-se citar os aldeídos, cetonas, furanos, alcoóis, alcanos, alcenos e alcinos (HO; CHEN, 1994). Um dos compostos formados em grande quantidade é o malondialdeído (MDA), produto da oxidação de ácidos graxos com três ou mais insaturações, que é quantificado pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e frequentemente utilizado como um indicador de oxidação lipídica (MCCLEMENTS; DECKER, 2010).

A formação de produtos voláteis secundários a oxidação é altamente dependente do tipo de ácido graxo presente no músculo dos peixes e de seus produtos de oxidação. Peixes alimentados com dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados n-3, por exemplo, apresentam aumento na formação de 1-penten-3-ol, ao passo que um teor elevado de ácidos graxos n-6 na dieta resulta em um aumento na formação de hexanal (TIMM-HEINRICH et al., 2013).

A oxidação lipídica é influenciada por muitos fatores, tais como, a porção da carcaça analisada, o teor de lipídios, a forma de estocagem e o tempo de armazenamento. Os valores de TBARS costumam aumentar ao longo do armazenamento (OZKECECI et al., 2008), enquanto os produtos das fases de iniciação e propagação, como os dienos conjugados e peróxidos, tem seu pico no início da estocagem e tendem a diminuir ao longo de um armazenamento prolongado (VEECK et al., 2013).

Produtos primários e secundários da oxidação de lipídios podem atuar como substratos para a oxidação de proteínas, de modo que uma vez que a oxidação dos lipídios é iniciada, a oxidação de proteínas também vai ocorrer (SOYER et al., 2010). Carnes com alto conteúdo de produtos da oxidação lipídica também demonstram aumento da oxidação proteica, apresentando degradação de aminoácidos e aumento de semialdeídos (UTRERA; MORCUENDE; ESTÉVEZ, 2014).

Sendo assim, de forma simultânea à oxidação lipídica ocorre também a oxidação das proteínas, a qual é condicionada à característica dos aminoácidos presentes no músculo. A susceptibilidade de resíduos de aminoácidos a reações oxidativas é muito diferente de acordo com sua estrutura. Os aminoácidos histidina, leucina, metionina e cisteína, bem como os aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano são mais susceptíveis que outros (HÖHN; KÖNIG; GRUNE, 2013).

O tipo de modificação oxidativa também difere dependendo da estrutura dos aminoácidos. Dentre os aminoácidos sulfurados, a oxidação da metionina leva a formação de sulfóxido de metionina, enquanto a oxidação da cisteína conduz à formação de pontes dissulfeto (HÖHN; KÖNIG; GRUNE, 2013). O anel dos aminoácidos aromáticos é o

principal local de ataque do radical hidroxila, e sua oxidação leva à formação de hidroxicompostos, à cisão de anel e, no caso da tirosina, à formação de dímeros agregados (STADTMAN, 1993). Já o ataque oxidativo sobre lisina, arginina, prolina e treonina pode levar à formação de derivados carbonilados das proteínas (HÖHN; KÖNIG; GRUNE, 2013).

A oxidação de proteínas pode ser iniciada com a captação de um átomo de hidrogênio da proteína por um radical livre, gerando um radical alquila, que na presença de oxigênio é convertido a um radical peroxil e em alquilperóxido pela abstração de um átomo de hidrogênio de outra molécula susceptível. Outras reações com espécies reativas de oxigênio (EROs) como o radical hidroperoxil e metais de transição também podem conduzir à formação de radicais alcóxil e seus derivados hidroxilados (ESTÉVEZ, 2011).

Para monitorar a progressão da oxidação proteica em carnes os marcadores mais utilizados são o conteúdo de grupos tiólicos e de compostos carbonilados proteicos. Durante o armazenamento em temperaturas de congelamento, a estrutura funcional do músculo, o complexo actomiosina, vai apresentando gradativa queda no conteúdo de grupos tiólicos reduzidos ao mesmo tempo em que o montante de pontes dissulfeto aumenta (BENJAKUL, 2003). A formação de ligações cruzadas intra e intermolecular nas proteínas musculares envolve a formação de uma variedade de produtos que posteriormente conduzem à polimerização das proteínas. Na miosina as ligações cruzadas podem ocorrer principalmente por formação de pontes dissulfeto ou pela formação de ditirosina (LUND et al., 2011).

A carbonilação é uma das modificações químicas mais notáveis em proteínas oxidadas e geralmente é atribuída ao ataque direto de radicais livres a resíduos básicos de aminoácidos (HÖHN, 2013). Lisina, prolina e/ou arginina das proteínas miofibrilares podem ser oxidadas na presença de metais como o ferro e o cobre, resultando em semialdeídos como produtos finais. A formação desses semialdeídos não requer uma clivagem anterior da ligação peptídica à medida que os aminoácidos ligados às proteínas podem ser degradados em seus correspondentes semialdeídos (LUND et al., 2011).

Além das alterações oxidativas a textura e a cor da carne podem sofrer modificações oriundas do congelamento. O processo de congelamento leva à formação de cristais de gelo nos espaços intra e extracelular. No meio extracelular há formação de grandes cristais que rompem a estrutura física do músculo, quebrando miofibrilas e resultando em amaciamento por meio da perda de integridade estrutural. Já a formação de pequenos cristais de gelo intracelulares aumenta a taxa de maturação, provavelmente através da liberação de enzimas proteolíticas (VIEIRA et al., 2009).

Carnes congeladas usualmente demonstram estabilidade de cor durante o período de armazenamento congelado, porém o processo de congelamento, *per se*, causa alterações na coloração (MUELA et al., 2010). De maneira geral os processos de congelamento e descongelamento ocasionam a perda da mioglobina, pigmento responsável pela cor vermelha, devido à exsudação. Também ocorre a desnaturação da fração globina da molécula de mioglobina em algum momento durante o congelamento, armazenamento ou descongelamento e leva a um aumento da suscetibilidade do pigmento a oxidação e subsequente perda da cor desejável (LEYGONIE; BRITZ; HOFFMAN, 2012). Logo após o congelamento, pode ocorrer redução na tendência ao vermelho ( $a^*$ ) e ao amarelo ( $b^*$ ), porém com um período de armazenamento prolongado (em torno de 8 meses), tendem ao escurecimento com aumento dos valores das coordenadas  $a^*$  e  $b^*$  e redução da coordenada  $L^*$  (LEE et al., 2008).

Além das alterações de textura e cor ocasionadas pelo processo de congelamento por si só, também existe uma relação entre os processos oxidativos e as mudanças das características organolépticas da carne. Após longo período de estocagem ocorre a oxidação dos grupos tiólicos das proteínas e posterior formação de ligações cruzadas e polimerização proteica (Lund et al., 2011), que leva à formação de agregados proteicos que podem aumentar a dureza das carnes (Kim et al., 2010). Também é observado que os aldeídos e os compostos carbonílicos gerados pela oxidação lipídica e/ou proteica podem reagir através da reação de Maillard, induzindo à formação de melanoidinas, pigmentos que irão alterar a coloração da carne (Estévez et al., 2011).

### 1.3. JUNDIÁ

Jundiá é o nome popular que se dá a peixes teleósteos da espécie *Rhamdia quelen*, pertencentes à família *Heptateridae* (SILFVERGRIP, 1996). São peixes de couro, onívoros que vivem em água doce em lagos e poços de rios e apresentam coloração do marrom ao cinza com o ventre claro (Figura 5) (BALDISSEROTTO; RADÜNZ NETO, 2004).



Figura 5 - Exemplar de jundiá (*Rhamdia quelen*). Fonte: Imagem cedida por Juliana Veit. Acervo pessoal.

Esta espécie é endêmica da América do Sul e é ideal para o cultivo em qualquer região com um clima temperado ou subtropical, pois suporta invernos rigorosos e apresenta crescimento rápido no verão (BARCELLOS et al., 2001). Em termos de quantidade e valor, Brasil é o país mais produtivo da América do Sul (VALLADÃO; GALLANI; PILARSKI, 2016). Esta espécie adapta-se bem ao monocultivo em tanques e alimentação exclusiva com ração, obtendo boas produção e conversão alimentar, mas exibe uma alimentação versátil, tendo uma boa aceitação da dieta composta com fontes de diversas origens (CORRÊIA et al., 2009; LOVATTO et al., 2014).

Já há algumas décadas vem-se estudando a nutrição do jundiá e a influência da composição das dietas sobre a reprodução, desenvolvimento e crescimento deste peixe em diversas fases do seu ciclo vital (RADÜNZ NETO; VEIVERBERG; LAZZARI, 2013). Quanto à pesquisa no campo da nutrição é necessário, atualmente, avaliar diversos aspectos, considerando fatores como a biodisponibilidade e a palatabilidade da dieta, os parâmetros zootécnicos, o metabolismo geral e a qualidade e aceitabilidade do produto final pelo consumidor (RADÜNZ NETO; VEIVERBERG; LAZZARI, 2013).

A composição e a qualidade da carne de jundiá podem variar de acordo com inúmeros fatores tais como sexo, idade, porção do peixe analisada, densidade, manejo pré-abate e a alimentação, sendo a dieta um dos fatores que mais influencia sua composição química. De maneira geral os jundiás apresentam de 11 a 20% de proteína, de 2,5 a 16% de gordura e um conteúdo de cinzas de 0,9 a 4%. Os ácidos graxos mais abundantes no filé são o oleico, o linoleico e o palmítico (EMANUELLI; PICCOLO, 2013). A proteína é de alta qualidade, apresentando bom conteúdo de aminoácidos essenciais, com exceção do triptofano (MEYER; FRACALOSSO, 2005).

#### 1.4. ÓLEOS ESSENCIAIS NA PRODUÇÃO ANIMAL

Os OEs têm sido apontados como potenciais promotores de crescimento para serem fornecidos na alimentação animal. Os OEs integrais e alguns de seus componentes isolados, incluindo o citral têm, *in vitro* e *in vivo*, capacidade de inibir bactérias comuns do trato gastrintestinal de animais de produção, afetando, principalmente, o crescimento de agentes patogênicos potenciais, como alguns sorotipos de *Salmonella enterica* e o *Clostridium perfringens*, enquanto afetam moderadamente o desenvolvimento de lactobacilos e bifidobactérias, componentes benéficos da microbiota intestinal (OUWEHAND et al., 2010; YANG et al., 2010). Isso leva a crer que os OEs podem estimular o crescimento dos animais.

A adição de alguns OEs na dieta de frangos indica que estes podem trazer efeitos benéficos ao desempenho produtivo dos animais, porém os dados ainda são controversos. A mistura de OEs de orégano, sálvia e alecrim e extrato de pimenta fornecida na dieta por 42 dias tem grande potencial para ser utilizada em substituição aos promotores de crescimento de aves, pois resulta em ganho de peso e conversão alimentar equivalentes aos antibióticos utilizados para este fim, porém, em altas doses, podem levar a lesões hepáticas e renais (TRAESEL et al., 2011). O OE de menta, fornecido por 42 dias na concentração de 0,2 g/kg de dieta, apresenta efeitos sobre o crescimento de frangos de corte, gerando uma boa conversão alimentar quando comparado ao controle sem OE (KHODAMBASHI EMAMI et al., 2012)

A suplementação dietética com 0,3 e 0,6 g/kg com OE de orégano foi eficaz como promotor de crescimento para frangos de corte, sendo que ambos os níveis de suplementação aumentaram o crescimento e melhoraram características de carcaça e a saúde intestinal das aves aos 42 dias de vida, apresentando resultados semelhantes aos dos animais que receberam o antibiótico avilamicina na dieta (PENG et al., 2016). Em contrapartida, outro estudo demonstrou que a suplementação dietética com 0,3 g/kg também de OE de orégano por 42 dias não apresentou efeito sobre a maioria dos parâmetros de produtividade e saúde avaliados e ainda reduziu o ganho de peso dos frangos (KIRKPINAR; ÜNLÜ; ÖZDEMİR, 2011). Já uma combinação de OEs de orégano, de anis e de casca de frutas cítricas (0,125 g/kg), fornecido na dieta por 42 dias, melhorou a conversão alimentar e aumentou a taxa de sobrevivência das aves em aproximadamente 10%, em comparação com o grupo de controle (HONG et al., 2012).

Compostos isolados dos OEs também têm sido avaliados como promotores de crescimento em aves. Constituintes do OE de orégano, timol e o carvacrol (0,015-0,06 g/kg), podem melhorar a resposta imune e preservar a integridade intestinal dos frangos de corte com 28 dias de vida desafiados com *Clostridium perfringens*, mesmo sem apresentar efeito sobre o rendimento produtivo dos animais (DU et al., 2016). O desempenho dos frangos alimentados com os compostos terpênicos microencapsulados eugenol e eucaliptol nas concentrações de 0,5 g/kg e 1 g/kg por 20 dias não foi diferente do grupo que recebeu antibiótico (avilamicina), porém quando utilizados em combinação na concentração de 1 g/kg (50% eugenol/50% eucaliptol), reduziram o consumo alimentar e o ganho de peso (SCHERER et al., 2014). A suplementação dietética por 20 dias com 0,1 g/kg de uma combinação de carvacrol, cinamaldeído e oleoresina de pimenta aumentou o crescimento, a conversão alimentar e a deposição de proteína na carcaça de aves (PIRGOZLIEV et al., 2015). Entretanto, um estudo com aves de corte demonstrou que os OEs microencapsulados de *C. flexuosus* e *Lippia rotundifolia* na concentração de 0,12g/kg de ração, não afetaram o desempenho ou o rendimento de carcaça de frangos de corte em nenhuma das fases de crescimento avaliadas (7, 21, 33 e 42 dias) (AZEVEDO et al., 2017).

Na aquicultura os OEs têm sido amplamente estudados como anestésicos com destaque para os OEs de cravo (CUNHA et al., 2010a), *Lippia alba* (BECKER et al., 2016; CUNHA et al., 2010b; SENA et al., 2016; VEIT et al., 2016) e *Aloysia triphylla* (DANIEL et al., 2016; GRESSLER et al., 2014; PARODI et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2017). Existem no Brasil registros de patentes de anestésicos dos OEs de *L. alba* e *A. triphylla* (PI11039663 e PI0904832-4A2, respectivamente), mas produtos comerciais à base destes OEs ainda não estão disponíveis. O óleo de cravo, cujo principal constituinte é o eugenol, possui efeito anestésico bem fundamentado e seu uso tópico em odontologia é bem conhecido. Porém, na aquicultura, apenas seu correspondente sintético, o isoeugenol, é comercializado e aprovado em alguns países como Austrália, Nova Zelândia e Chile, para anestésiar peixes na despesca sem período de carência (ROSS; ROSS, 2008).

Além do uso como anestésico, desenvolveu-se também na aquicultura o interesse de estudar o efeito de OEs dietéticos nos parâmetros metabólicos, plasmáticos e de crescimento de peixes.

Verificou-se que alevinos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas durante 90 dias com 0,1%, 0,3%, e 0,5% de OE de casca de laranja doce, rico em limoneno, apresentaram aumento de peso, melhora da imunidade e resistência às infecções de *Streptococcus iniae* (ACAR et al., 2015). Já o uso de OE de casca de limão, também rico em

limoneno, nos níveis de 0,5%, 0,75% e 1% por 60 dias não apresentou efeito sobre o crescimento de alevinos de tilápias de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*) (BABA et al., 2016). No entanto, ambos os OEs aumentaram a resistência contra agentes patogênicos e níveis de adição variando de 0,3 a 1% tendem a aumentar as proteínas plasmáticas e diminuir o colesterol, os triglicérides e a glicose em tilápias (ACAR et al., 2015; BABA et al., 2016).

O OE de *Lippia alba*, quando incorporado a ração por 60 dias não afeta o crescimento ou os parâmetros sanguíneos de alevinos de jundiás, mas aumenta a resposta antioxidante de diversos tecidos incluindo o muscular (SACCOL et al., 2013), enquanto a suplementação com OE de orégano por 56 dias, além de elevar a capacidade antioxidante plasmática, também acelera o crescimento de bagres de canal (ZHENG et al., 2009).

Já a suplementação por 56 dias com os compostos carvacrol e timol, apesar de não influenciarem o ganho de peso de trutas subadultas, agem sobre enzimas plasmáticas e musculares, sendo que o carvacrol aumenta a atividade da lisozima, da catalase e os níveis de óxido nítrico no plasma, assim como a atividade da glutatona-s-transferase no músculo, enquanto timol aumenta apenas a atividade da catalase no plasma, além da atividade das enzimas glutatona-s-transferase e glutatona redutase no músculo (GIANNENAS et al., 2012).

O potencial do OE de *C. flexuosus* como promotor de crescimento foi pouco explorado. O uso das folhas de *C. citratus*, o qual apresenta composição muito semelhante ao *C. flexuosus*, parece não promover o crescimento de frangos alimentados com dieta contendo 0,8% de folhas de capim-limão (ALZAWQARI et al., 2016) além de ser prejudicial ao crescimento das aves no nível de 2% na dieta (THAYALINI, K., SHANMUGAVELU, S., SAMINATHAN, 2011).

No entanto o OE de capim-limão apresenta, *in vitro*, alta atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas isoladas de aves (AZEVEDO et al., 2016) e o seu componente majoritário, o citral, reduz lesões intestinais causadas por *Clostridium perfringes* em frangos (YANG et al., 2010). Além disso o OE de *Aloysia triphylla* do quimiotipo rico em citral aumentou o número de pregas intestinais de alevinos de jundiá, promovendo o ganho de peso e aumentando a taxa de crescimento dos animais alimentados com esta dieta por 60 dias (ZEPPEFELD et al., 2016). Isto sinaliza que os OEs ricos em citral como é o caso do OE de capim-limão podem promover a saúde intestinal de aves e peixes.

## 1.5. ÓLEOS ESSENCIAIS E QUALIDADE DA CARNE

A repercussão do uso de OEs em carnes e produtos cárneos sobre os parâmetros de qualidade dos mesmos também é tema de incontáveis estudos, sejam os OEs utilizados como suplemento dietético, anestésicos ou aplicados diretamente no alimento. Nesse sentido, a suplementação dietética com OE de *Zataria multiflora* por 42 dias (0,1-0,4 g/kg) retarda a oxidação lipídica e a deterioração microbiana dos filés de peito de frango durante o armazenamento refrigerado (JAVAN et al., 2013). Por outro lado, a adição de 0,1 mg/kg de óleo de cravo à dieta de frangos não apresentou efeitos sobre a qualidade da carne de coxa e peito dos animais e promoveu uma pequena redução do ácido linolênico na carne de coxas dos animais (HERNÁNDEZ et al., 2009).

A suplementação dietética com OE de orégano (0,10-0,25 g/kg) não teve efeito significativo no desempenho do crescimento e nos atributos organolépticos da carne de galinhas caipiras, no entanto, causou aumento da tendência ao amarelo e da perda de peso por cozimento nos animais com 63 dias de vida (SYMEON et al., 2009). OE de orégano dietético (0,05%) causou um comportamento inconstante de valores das coordenadas de cor  $a^*$  e  $b^*$  durante o armazenamento e aumentou a força de cisalhamento da carne de peito de frangos com 42 dias de vida (ALFAIG et al., 2013).

Quanto à qualidade da carne de pescado, alguns compostos presentes no OE de tomilho quando presentes na dieta (126 dias) podem retardar a oxidação lipídica e estender a vida útil da carne de dourada (*Sparus aurata*), com pouca ou nenhuma ação sobre a cor e contagens microbiológicas (ÁLVAREZ et al., 2012). A adição à dieta de 1 g/kg de timol e carvacrol por 56 dias reduziu a oxidação lipídica e a contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos em filé de truta (GIANNENAS et al., 2012). Já a suplementação com OE de tomilho por 84 dias reduziu a oxidação lipídica e o conteúdo de bases nitrogenadas voláteis além de melhorar a aceitação do odor de dourada armazenada por 21 dias em gelo (HERNÁNDEZ et al., 2015).

Apesar de diversos estudos demonstrarem a eficácia de OEs como anestésicos e sedativos, pouco se sabe sobre as implicações da sedação por OE na qualidade da carne. Estudos recentes revelam que OE de *L. alba* utilizado como sedativo durante o transporte retarda a oxidação lipídica de filés de jundiá armazenados congelados, indicando que este pode ser utilizado para prolongar a vida útil do pescado (VEECK et al., 2013). A sedação de jundiás com OE de *A. triphylla* também demonstra efeitos positivos sobre a qualidade da carne, pois retarda a perda de frescor, aumenta a vida útil do pescado armazenado em gelo



(DANIEL et al., 2014) e retarda a oxidação lipídica em filés armazenados congelados (DANIEL et al., 2016).

Já o uso do OE de *L. alba* na água (300 mg/L), como anestésico pré-abate, não preveniu a oxidação lipídica e apresentou comportamento pró-oxidante em relação a certos marcadores de oxidação em filés de jundiá congelados, mas não influenciou a aceitação sensorial dos filés (VEIT et al., 2016). O mesmo comportamento, quanto a análise sensorial foi verificado também em jundiás anestesiados com OE de *L. alba* (CUNHA et al., 2010b). No entanto, a anestesia de jundiás com eugenol demonstrou que este confere sabor e odor desagradáveis à carne, sugerindo que a presença deste composto remanescente da sedação também pode acarretar efeitos negativos à qualidade (CUNHA et al., 2010a).

Afora a aplicação como promotores naturais de crescimento e o uso como anestésicos/sedativos, propondo alternativas aos antibióticos e anestésicos sintéticos, os OEs também podem ser usados após o abate para inibir a deterioração da carne e derivados, prolongando sua vida de útil, quando adicionados diretamente ao produto, sugerindo o uso potencial como agentes conservadores.

Os tratamentos com OEs de tomilho e melissa aumentaram a capacidade antioxidante e limitaram a peroxidação lipídica e a deterioração das proteínas sarcoplasmáticas de peito de frango. Estes OEs também reduziram a microflora natural da carne, sendo a melissa mais efetiva na inibição do crescimento de *Salmonella* sp. e o tomilho na inibição de *E. coli* (FRATIANNI et al., 2010). Filés de frango embalados a vácuo com adição de OE de orégano ou alecrim apresentaram menor contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos, *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, *Enterobacteriaceae* e bactérias lácticas durante o armazenamento a 4°C por 25 dias. Em comparação com o controle, a extensão da vida útil foi de 7-8 dias (NTZIMANI; GIATRAKOU; SAVVAIDIS, 2010).

A combinação de atmosfera modificada (MAP) com OE de orégano reduziu de forma efetiva a contagem microbiana sem afetar as coordenadas de cor ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ), prolongando a vida útil de peito de frango em 3-4 dias para amostras contendo 0,1% de OE de orégano, 2-3 dias para amostras apenas em MAP e em 5-6 dias para amostras sob MAP contendo 0,1% de OE. Amostras com 1% de OE apresentaram sabor muito forte e foram excluídas do estudo de vida útil (CHOULIARA et al., 2007).

Na preservação de pescados e derivados, a combinação de OE de orégano (0,2% v/p) e embalagem a vácuo aumentou a vida útil de filés de truta arco-íris refrigerados de 5 para 11-12 dias frente a amostra controle armazenada em condições aeróbicas, melhorando o escore

sensorial e a qualidade microbiológica, enquanto a adição de 0,4% (v/p) de OE de orégano conferiu odor forte e sabor amargo aos filés, levando à rejeição sensorial (FRANGOS et al., 2010).

A adição de 1% de óleo de louro ou de tomilho prolongou a vida útil baseada na aceitação sensorial de anchovas estocadas em gelo em cerca de 3-4 dias além de retardar a oxidação lipídica e a formação bases voláteis totais e trimetilamina (ERKAN et al., 2011). Os OEs de alho e tomilho também reduziram as contagens de micro-organismos totais, psicrotróficos e de bactérias lácticas, a formação de bases voláteis totais, trimetilamina e de TBARS em trutas arco-íris defumadas armazenadas a vácuo a 2°C, prolongando a vida útil de 5 semanas (controle) para 6 e 7 semanas com a adição de OE de alho e tomilho, respectivamente (ERKAN, 2012).

O OE de capim-limão tem apresentado resultados promissores na preservação de pescado e frutos do mar. Filmes de gelatina incorporados com OE de capim-limão de espécie *C. citratus* retardou o crescimento de bactérias lácticas e psicrotróficas e a deterioração microbiana de forma geral, além de retardar a formação de TBARS e de produtos de degradação de ATP em filés de perca-gigante refrigerados (AHMAD et al., 2012). Em mexilhões verdes refrigerados, os OEs de açafraão-da-terra e capim-limão reduziram a deterioração química e microbiológica e, quando combinados, apresentaram efeito sinérgico na conservação do produto. Já, os OEs aplicados isoladamente apresentaram resultados díspares quanto à aceitação sensorial, enquanto o açafraão-da-terra alterou negativamente o odor e o sabor, o capim-limão recebeu as maiores pontuações para estas variáveis (MASNIYOM; BENJAMA; MANEESRI, 2012).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi analisar o impacto da suplementação dietética com óleo essencial (OE) de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) nos indicadores de produtividade e marcadores bioquímicos de frangos de corte (*Galus galus*) e de jundiás (*Rhamdia quelen*), bem como avaliar a qualidade e a estabilidade da carne destes animais durante o armazenamento sob congelamento.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da suplementação dietética com OE de capim-limão (*C. flexuosus*) sobre o desempenho produtivo e os marcadores bioquímicos sanguíneos de frangos em crescimento.

- Analisar os efeitos da suplementação dietética com OE de capim-limão (*C. flexuosus*) sobre a composição, as características sensoriais e a estabilidade lipídica da carne de peito de frangos durante o armazenamento congelado.

- Investigar o efeito da suplementação dietética com OE microencapsulado de *C. flexuosus* no desempenho produtivo, parâmetros metabólicos e composição corporal de jundiás.

- Avaliar o efeito da suplementação dietética com OE de *C. flexuosus* microencapsulado durante o estágio de terminação na qualidade e estabilidade de filés de jundiá durante o armazenamento congelado.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Esta tese é composta por quatro experimentos os quais consistem em avaliar a suplementação dietética com óleo essencial de capim-limão sobre o desempenho do crescimento, bioquímica sanguínea (Manuscrito I) e qualidade da carne de peito (Manuscrito II) de frangos em fase de crescimento, bem como investigar o efeito da suplementação com óleo essencial de capim-limão microencapsulado no desempenho produtivo, parâmetros bioquímicos (Manuscrito III) e qualidade de filés de jundiá (*Rhamdia quelen*) (Manuscrito IV). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais, Universidade Federal de Santa Maria (protocolo número 120/2014).

#### 3.1. ÓLEO ESSENCIAL DE *C. flexuosus*: OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E MICROENCAPSULAÇÃO

O OE de *C. flexuosus* foi doado pela Bio Natural Essenciais (Três Passos, Rio Grande do Sul, Brasil). A composição química do OE foi avaliada utilizando um cromatógrafo gasoso Agilent 6890 acoplado a um detector de espectrometria de massas (GC-MS) Agilent 5973 com uma coluna HP5-MS (5% de fenilo, 95% de metilsiloxano, 30 mx 0,25 mm ID × 0,25 µM) (GARLET et al., 2016). Os constituintes do OE foram identificados por comparação do índice de retenção e dos espectros de massa com bancos de dados. A quantificação de compostos foi determinada por cromatografia a gás com detecção de ionização em chama (GC/FID) em um cromatógrafo Agilent 7890A. A porcentagem dos constituintes foi baseada na normalização da área dos picos.

O OE de *C. flexuosus* utilizado no experimento com peixes foi microencapsulado por coacervação complexa (ALVIM; GROSSO, 2010). O OE foi emulsionado com uma solução de gelatina em homogeneizador do tipo ultra-turrax a 45°C. A emulsão foi adicionada a uma solução de goma arábica e a mistura permaneceu sob agitação mecânica a 45°C enquanto procedeu-se o ajuste do pH para 4 com ácido clorídrico. Após o ajuste do pH a temperatura foi reduzida gradualmente até 10°C e então interrompeu-se a agitação para decantar as micropartículas. Em seguida foi eliminado o sobrenadante e o precipitado foi congelado e posteriormente liofilizado. A proporção de goma arábica, gelatina e OE foi de 1:1:1. A quantidade de OE de *C. flexuosus* contida nas microcápsulas liofilizadas foi determinada por hidrodestilação utilizando um aparelho de Clevenger.

## 3.2. DIETAS E MANEJO DOS ANIMAIS

### 3.2.1. Frangos

O ensaio experimental foi conduzido em uma sala de 22 m<sup>2</sup>, com pressão negativa, climatizada, que permitiu o controle da temperatura conforme a faixa etária das aves (dias 1 - 3: 29 a 33°C; 4 - 7: 28 a 31°C; 8 - 14: 26 a 28°C; 15 - 21: 23 a 26°C). Cento e vinte frangos de corte machos Cobb com um dia de vida foram alojados em número de 10 por gaiola – cada uma com uma largura de 0,5 m, comprimento de 0,5 m e altura de 0,33 m – dispostas em quatro níveis sobrepostos, sendo que cada nível possuía duas gaiolas. Cada gaiola contou com um comedouro tipo calha, um bebedouro tipo *nipple* – com regulagem de altura –, além de uma campânula para aquecimento. Um programa de iluminação de 24 h foi aplicado durante todo o experimento.

Os animais foram divididos em dois tratamentos (60 animais por tratamento) sendo que um tratamento recebeu ração basal e o outro recebeu a ração basal acrescida de 0,25 mL de OE de *C. flexuosus* por kg de ração.

Os animais foram abatidos com 21 dias de idade por eletronarcose. A sangria e o manejo pré- e pós-abate seguiram as recomendações da Lei Federal nº 7.889/89, de 23-11-89, Lei Municipal nº 4502/01; de 28-12-01 e Decreto Executivo nº 194/02, de 26-04-2002. O resfriamento foi realizado em *Chiller* por 10-15 min à 4°C.

### 3.2.2. Peixes

Foram utilizados 126 jundiás (*Rhamdia quelen*) (42 peixes por tratamento) pesando em torno de 400 g, que foram obtidos de um produtor local. Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em 21 tanques de polipropileno com capacidade de 270 L, 6 peixes por tanque (densidade de 8,9 g/L) e aclimatados às condições de laboratório durante duas semanas. Foi utilizado um sistema de recirculação de água composto por duas unidades de filtração biológica, lâmpada germicida, um filtro de carvão ativado e um reservatório de água de 2000 L. Durante o período experimental, a qualidade da água foi mantida da seguinte forma: temperatura, 21,3 ± 0,3° C; oxigênio dissolvido, 8,5 ± 0,5 mg/L; NH<sub>4</sub>, 0,32 ± 0,03 mg/L e NO<sub>2</sub> 0,17 ± 0,03 mg/L.

Foram formuladas três dietas contendo aproximadamente 33% de proteína bruta e 8,5% de lipídeos, com base no estudo de LAZZARI et al. (2008). Diferentes concentrações de OE de *C. flexuosus* (0-controle, 1,0 ou 3,0 mL de OE por kg de dieta) microencapsulado foram adicionadas à ração. A mistura da ração foi seca em estufa de circulação forçada de ar a 45°C por 24 h e posteriormente, os pellets foram quebrados, peneirados e armazenados congelados até a sua utilização. Os peixes receberam as dietas experimentais até saciedade aparente, duas vezes por dia por 20 dias (8 e 16 h). Ao final do experimento os animais ficaram em jejum por 24 h e então foram abatidos por secção da medula, seguido por hipotermia.

O sangue dos peixes foi coletado da veia caudal de um animal por tanque usando seringas heparinizadas de 5 mL. Peso e comprimento foram registrados e então os animais foram eviscerados e filetados. Sangue, fígado e o músculo do filé foram armazenados a -20° C para análises futuras.

### 3.3. DESEMPENHO PRODUTIVO E ANÁLISES BIOQUÍMICAS

#### 3.3.1. Frango

O peso corporal vivo dos frangos foi registrado individualmente nos dias 1, 7, 14 e 21. A ingestão cumulativa de ração foi determinada semanalmente por gaiola (n = 6 por tratamento). Após o abate o peso de carcaça e o peso do fígado de cada animal foram registrados (n = 60 por tratamento). A conversão alimentar (CA) foi calculada pela seguinte equação:

$$CA \text{ (g/g)} = \frac{\text{Ingestão dietética cumulativa (g)}}{\text{Peso corporal vivo (g)}} \quad (1)$$

No final do período experimental, foram coletadas amostras de sangue de 12 animais por tratamento (dois animais por gaiola) para avaliação de proteínas séricas totais, albumina, colesterol e triglicerídeos. Todas as medições de soro foram realizadas em um analisador semi-automático (Thermoplate Analyser®, Thermoplate, China) usando kits comerciais (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa-MG, Brasil).

#### 3.3.2. Peixes

O comprimento total do peixe (cm) e o peso (g) foram determinados individualmente usando régua e balança digital e utilizados para calcular os seguintes índices:

$$\text{Fator de condição (g/cm}^3\text{)} = 100 \times \left( \frac{\text{Peso final}}{\text{Comprimento final}^3} \right) \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \text{Taxa de crescimento específico (\%)} \\ = 100 \times \left( \frac{\ln \text{ peso corporal final} - \ln \text{ peso corporal inicial}}{\text{Dias de experimento}} \right) \end{aligned} \quad (3)$$

$$\text{Ganho de peso (g)} = (\text{Peso corporal final} - \text{Peso corporal inicial}) \quad (4)$$

Sete peixes por tratamento (1 por caixa) foram eviscerados para avaliar o comprimento do trato digestivo e o peso de peixes eviscerados, trato digestivo, fígado, gordura visceral e gônadas que foram utilizados para calcular os seguintes índices:

$$\begin{aligned} \text{Rendimento de carcaça (\%)} \\ = [(\text{peso do peixe eviscerado} \div \text{peso do peixe inteiro}) \times 100] \end{aligned} \quad (5)$$

$$\begin{aligned} \text{Índice digestivossomático (\%)} \\ = [(\text{peso do trato digestivo} \div \text{peso do peixe inteiro}) \times 100] \end{aligned} \quad (6)$$

$$\begin{aligned} \text{Índice de gordura visceral (\%)} \\ = [(\text{peso da gordura visceral} \div \text{peso do peixe inteiro}) \times 100] \end{aligned} \quad (7)$$

$$\begin{aligned} \text{Índice hepatossomático (\%)} \\ = [(\text{peso do fígado} \div \text{peso do peixe inteiro}) \times 100] \end{aligned} \quad (8)$$

$$\begin{aligned} \text{Índice gonadossomático (\%)} \\ = [(\text{peso das gônadas} \div \text{peso do peixe inteiro}) \times 100] \end{aligned} \quad (9)$$

O plasma foi obtido após centrifugação do sangue (3000 x g, 10 minutos, 4°C) e foi armazenado a -20°C até a avaliação dos seguintes marcadores metabólicos usando kits

comerciais: fosfatase alcalina (LabTest, MG, Brasil), creatinina, albumina (Bioclin, MG, Brasil), proteína total, triglicerídeos, colesterol, glicose, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (Doles, GO, Brasil). As globulinas foram calculadas utilizando a seguinte equação:

$$\text{Globulinas (g/dL)} = \text{Proteína total (g/dL)} - \text{Albumina (g/dL)} \quad (10)$$

Os aminoácidos livres foram determinados seguindo a metodologia de Spies (1957).

As amostras de fígado foram desproteinizadas com ácido tricloroacético usando um homogeneizador de tipo Ultra Turrax (Marconi Equipment for Laboratory Industry Ltda®) para medir a glicose (DUBOIS et al., 1956), lactato (HARROWER; BROWN, 1972) e amônia (VERDOUW; VAN ECHELD; DEKKERS, 1978). As amostras de fígado foram extraídas com KOH e os extratos foram utilizados para avaliar o glicogênio (DUBOIS et al., 1956) e proteína total (LOWRY et al., 1951). As amostras de fígado foram homogeneizadas com tampão fosfato 20 mM, pH 7,5, centrifugadas a 1000 x g durante 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para determinar os aminoácidos livres (SPIES, 1957) e a atividade da AST e ALT usando kits comerciais de laboratório (Doles, GO, Brasil).

O intestino foi homogeneizado (1:20, p / v) em tampão Tris 0,02 M/fosfato 0,01 M/50% de glicerol, pH 7,5 usando um homogeneizador de tipo Ultra Turrax (Marconi, Brasil) e centrifugado a 1200 x g, a 4°C Durante 10 minutos e o sobrenadante foi coletado para análises de atividade enzimática. A atividade de tripsina foi determinada em 247 nm após incubação do sobrenadante com cloridrato de éster metílico de N<sub>α</sub>-p-Tosil-L-arginine (TAME) a 25°C, pH 8,1 (HUMMEL, 1959). A atividade de quimotripsina foi determinada em 256 nm após incubação de sobrenadantes com éster etílico de N-benzoil-L-tirosina (BTEE) em pH 7,8 (HUMMEL, 1959).

### 3.4. ANÁLISE DA CARNE

Após o abate dos animais foram coletados os cortes de peito dos frangos e os filés dos jundiás para a avaliação da qualidade e da estabilidade da carne durante o armazenamento sob congelamento. Logo após ao abate foi determinada a composição centesimal, composição de ácidos graxos, perfil de compostos voláteis, conteúdo de colesterol e aceitação sensorial dos peitos de frango. Os filés de jundiá foram avaliados quanto a composição centesimal, composição de ácidos graxos e aceitação sensorial. Para a avaliação da estabilidade durante o



armazenamento as carnes foram armazenadas a temperatura de aproximadamente  $-18^{\circ}\text{C}$  durante 12 meses e as análises foram realizadas a cada 90 dias. A carne de peito de frango foi avaliada quanto a cor objetiva, pH, força de cisalhamento, conteúdo de peróxidos e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Enquanto para o filé de peixe foram acompanhados pH, cor objetiva, capacidade de retenção de água, perfil de textura instrumental e conteúdo de dienos, peróxidos, hexanal, proteínas carboniladas e grupos tióis reduzidos. Também foi determinada a diferença total de cor dos filés de peixe entre o início e o final de armazenamento.

#### **3.4.1. Composição**

A umidade, cinzas e proteína bruta das amostras de peito de frango, filé de peixe e do peixe inteiro foram determinadas de acordo com a (AOAC, 2005). O teor de umidade foi obtido após a secagem em estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  até um peso constante. O teor de cinzas foi determinado a  $550^{\circ}\text{C}$ . A proteína bruta foi determinada pelo procedimento de micro Kjeldahl e o teor de gordura foi determinado gravimetricamente após extração utilizando clorofórmio e metanol (BLIGH; DYER, 1959).

#### **3.4.2. Perfil de ácidos graxos**

A fração lipídica obtida pela metodologia de BLIGH; DYER (1959) foi saponificada em solução metanólica de KOH e esterificada em solução metanólica de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (HARTMAN; LAGO, 1973). Após a metilação, os ácidos graxos foram analisados usando um cromatógrafo a gás Agilent Technologies (HP 6890) equipado com coluna capilar HP-INNOWax (polietileno glicol, 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) e um detector de ionização de chama.

#### **3.4.3. Caracterização dos compostos voláteis da carne de frango**

Os compostos voláteis da carne de frango foram isolados empregando a técnica de microextração em fase sólida (SPME), onde a fibra foi exposta no espaço confinado (*headspace*) sobre a amostra. Foi utilizada uma fibra com fase adsorvente polar Car/PDMS (carboxen/polidimetilsiloxano, Supelco, 75  $\mu\text{m}$  x 10 mm) (BRUNTON et al., 2000). Uma alíquota de 5 g de amostra devidamente homogeneizada foi transferida para um frasco com

capacidade de 20 mL, e este vedado com septo de PTFE. A extração dos compostos voláteis ocorreu à 35°C por 45 min através da exposição da fibra no *headspace* da amostra. Antes do período de extração o frasco contendo a amostra foi mantido por 15 min na mesma temperatura de extração. Foram analisadas 4 repetições de cada tratamento.

A análise foi conduzida em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (CG/EM QP-2010 *Plus*, Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). Os compostos voláteis da fibra de SPME foram desorvidos termicamente em um injetor do tipo *split/splitless* operando em modo *splitless* por 1 min (razão de divisão 30:1), a 250°C. Nestas condições a fibra foi mantida exposta no interior do injetor por 15 min para eliminar o efeito memória. Foi utilizado hélio como gás de arraste a pressão constante de 30 psi. A separação dos compostos voláteis ocorreu em uma coluna capilar de sílica fundida de fase polar, CP-WAX (Varian Chromopack, USA) de 60 m × 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de fase estacionária. O forno do cromatógrafo foi mantido a 35°C por 2 min, aquecido a 2°C/min até 80°C, depois aquecido a 4°C/min até 150°C, e então aquecido a 8°C/min até 230°C. A interface entre o CG e o MS, bem como a fonte de ionização foram mantidas a 230°C. O analisador de massas triplo quadrupolo foi operado no modo de varredura monitorando as massas de 35 a 350 u.m.a. A identificação dos compostos voláteis foi feita por comparação dos espectros de massa experimentais com os da biblioteca (NIST, 2005) e pela comparação dos índices de retenção linear dos mesmos com os da literatura.

#### **3.4.4. Análise sensorial**

A análise sensorial da carne de peito dos frangos e dos filés de peixe foi realizada utilizando escala hedônica estruturada em nove pontos, ancorada entre mínimo e máximo: 1 - desgostei muitíssimo até 9 - gostei muitíssimo (MEILGAARD; CARR; CIVILLE, 2006) para avaliação dos atributos cor, aroma, sabor e textura.

O painel de provadores foi formado por indivíduos não treinados selecionados entre docentes, funcionários e estudantes que frequentam regularmente o prédio 42 e o Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria. Todos os julgadores receberam informações a respeito dos objetivos e riscos da pesquisa, conforme os procedimentos éticos preconizados pela Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e puderam aderir livremente à pesquisa por meio de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A).

Os julgadores não foram obrigados a participar do projeto e no caso de possuírem intolerância a carne de frango ou filé de pescado, estes não participaram do estudo. Não houve prejuízos ou riscos a saúde dos participantes, pois os procedimentos de preparo seguiram as normas de boas práticas de fabricação. Não houve benefício financeiro pela participação e nenhum custo para os participantes.

Foram incluídos no estudo participantes (julgadores) não treinados de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos. Foram excluídos do estudo sujeitos que não apreciam, que apresentam intolerância a carne de frango ou pescado, ou que estavam com doenças respiratórias, tais como gripe, resfriado, rinite e outras que pudessem alterar o olfato.

Os participantes receberam orientação quanto às características sensoriais que foram avaliadas, antes de receberem as amostras para julgamento. As amostras foram compostas por um pedaço com aproximadamente 20 g de peito de frango ou de filé de peixe de cada tratamento. Estas foram codificadas, envoltas e papel manteiga e cozidas em forno de micro-ondas por 20 segundos imediatamente antes de serem fornecidas aos provadores. Cada julgador recebeu uma amostra por vez e avaliou os atributos de cor, odor e sabor, indicando os resultados da sua apreciação em uma ficha de avaliação (Anexo B). Para esta análise foi necessário apenas colocar as amostras na boca, mastigá-las, não sendo obrigatório, no entanto, degluti-las.

### 3.4.5. Cor instrumental, pH, textura e capacidade de retenção de água

A cor das amostras foi avaliada objetivamente utilizando o colorímetro Minolta CR-300 (Carne de frango) ou CM-700d (Filé de peixe) de acordo com a Comissão Internacional de Iluminação (CIE 1976  $L^*a^*b^*$ ), usando um iluminante D65, com ângulo de observação de 2°. Foram registradas as coordenadas  $L^*$  (luminosidade),  $a^*$  (direção para o vermelho ou verde) e  $b^*$  (direção para o amarelo ou azul).  $C^*$  (saturação),  $H^*$  (cor observável) e  $\Delta E$  (diferença total de cor) foram calculados segundo as equações:

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (11)$$

$$h^* = \tan^{-1} \left\{ \frac{a^*}{b^*} \right\} \quad (12)$$

$$\Delta E_{0-12} = [(L^*_{12} - L^*_0)^2 + (a^*_{12} - a^*_0)^2 + (b^*_{12} - b^*_0)^2]^{1/2} \quad (13)$$

O pH foi determinado em homogeneizado contendo 1 g de amostra em 10 mL de água destilada utilizando um potenciômetro previamente calibrado.

A textura dos peitos de frango foi analisada através da força de cisalhamento e a textura do filé foi avaliada pela análise do perfil de textura (TPA) utilizando texturômetro TA-XT plus Texture Analyzer e o software Texture Expert Exponent (Stable Microsystems Ltd. Surrey, England). Para a carne de frango, o músculo *Pectoralis major* foi cortado em parcelas de dimensões de 1 x 1 cm (A x L) que foram posicionados no texturômetro perpendicularmente ao sentido da fibra muscular. Foi utilizada a probe Warner-Bratzler Blade HDP/BSW com velocidades de pré-teste de 0,2 cm.s<sup>-1</sup>, de pós-teste e teste de 0,5 cm.s<sup>-1</sup>, altura ajustada em 8 mm e retorno de 10 cm. Os resultados foram expressos em Newton.

#### 3.4.6. Oxidação lipídica

Os marcadores de oxidação lipídica avaliados foram os níveis de dienos conjugados (DC), valor de peróxidos (VP) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e conteúdo de hexanal. DC e VP foram determinados na gordura extraída pelo método de (BLIGH; DYER, 1959). Para determinação de DC foi avaliada a densidade óptica em ciclohexano a 233 nm (RECKNAGEL; GLENDE, 1984). O VP foi determinado pelo método do tiocianato férrico (SHANTHA; DECKER, 1994). Porções de 10-20 mg da gordura extraída foram dissolvidas em 2 mL de mistura de tolueno: metanol (7:3) seguido da adição de 10 µL de tiocianato de amônio 30% e 10 µL de cloreto ferroso. As amostras foram encubadas a 50°C por 2 min e a leitura realizada em 520 nm. Os resultados foram expressos em mEq/Kg de gordura. Para a determinação do valor de TBARS, 1 g de cada amostra foi homogeneizado com 5 mL de cloreto de potássio 1,5%, e centrifugado a 3000 x g durante 10 min. O sobrenadante foi incubado a 100°C por 15 min em meio contendo ácido tricloroacético e ácido tiobarbitúrico. Após a incubação, foi utilizado n-butanol para extrair o produto de reação e a densidade ótica da fase alcoólica foi lido em 535 nm (BUEGE; AUST, 1978).

O hexanal dos filés foi isolado por SPME usando uma fibra polar (divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano, Supelco, 50/30 µm). As amostras foram trituradas e 5 g das mesmas foram acondicionadas em um frasco de 20 mL que foi selado com septo de PTFE e aquecido a 35°C durante 15 min para liberar os compostos voláteis.

Posteriormente, os compostos voláteis foram extraídos a 35°C, expondo a fibra no *headspace* durante 45 min (ZEPKA et al., 2013).

A análise foi realizada em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa (CG/EM QP-2010 Plus Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Os compostos presentes na fibra de SPME foram dessorvidos termicamente em um injetor split/splitless em modo de separação durante 1 min (relação de divisão 30:1) a 250°C. O gás de arraste foi nitrogênio a uma pressão constante de 30 psi. Os compostos foram separados utilizando uma coluna capilar CP-WAX 52 CB (Varian Chrompack, EUA, 50 m × 0,25 mm ID x 0,25 µm). A temperatura do forno foi ajustada a 35°C durante 2 min, depois aquecida a 80°C a 2°C/min, a 150°C a 4°C/min e por fim a 230°C a 8°C/min. A interface entre CG e MS, bem como a fonte de ionização foram mantidas a 230°C. O analisador de massas quadrupolo foi operado no modo de varredura monitorando as massas 35-350 u.m.a. A identificação do hexanal foi feita comparando os espectros de massa experimentais e os índices de retenção linear com a literatura.

#### **3.4.7. Oxidação proteica**

Um homogeneizado da carne foi preparado com tampão fosfato e a partir dele foi avaliada a oxidação proteica. O conteúdo de grupos carbonila proteicos foi determinado por reatividade com a 2, 4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar hidrazonas (LEVINE et al., 1990). Após precipitação da proteína com ácido tricloroacético 10%, foi realizada a reação com DNPH. A absorbância foi lida em 370 nm contra um branco contendo amostra, porém sem DNPH. O teor de tíóis totais foi determinado em 412 nm após reação com o ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (ELLMAN, 1959).

### **3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O teste de Levene foi realizado para verificar a homogeneidade das variâncias para todos os dados. Os dados de produtividade, bioquímica sanguínea, composição da carne e os dados do perfil de voláteis dos frangos foram analisados pelo teste T-Student, enquanto os dados da análise sensorial da carne de peito foram analisados pelo teste de Wilcoxon. Os dados de produtividade e parâmetros bioquímicos dos peixes e composição centesimal e ácidos graxos dos filés foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via e o

teste de Tukey foi aplicado para determinar as diferenças entre os grupos. A análise sensorial dos filés de jundiá foi avaliada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Os resultados da vida de prateleira da carne foram submetidos à ANOVA de duas vias (tratamentos x tempos) e as diferenças entre as médias foram verificadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). No caso dos dados que violaram os pressupostos da ANOVA, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de comparação múltipla não-paramétrico. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

#### **4. DESENVOLVIMENTO**

##### **4.1. MANUSCRITO I**

**DIETARY SUPPLEMENTATION WITH LEMONGRASS ESSENTIAL OIL ON  
GROWTH PERFORMANCE AND BLOOD BIOCHEMISTRY OF GROWING BROILERS**

**Manuscrito em fase de revisão para submissão à Revista Brasileira de Plantas  
Medicinais**

(Configurado conforme normas da revista)

**Dietary supplementation with lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) essential oil on growth performance and blood biochemistry of growing broilers**

**Rampelotto, C.<sup>1</sup>; Lima, R.L.<sup>2</sup>; Scherer, A.F.<sup>1</sup>; Silva, D.T.<sup>3</sup>; Heinzmann, B.M.<sup>4</sup>;**

**Baldisserotto, B.<sup>2</sup>; Mallmann, C.A.<sup>5</sup>; Dilkin, P.<sup>5</sup>; Emanuelli, T.<sup>1\*</sup>.**

<sup>1</sup>Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil <sup>2</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil <sup>3</sup>Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil <sup>4</sup>Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil <sup>5</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, CEP 97105900 \*Corresponding author e-mail: [tatiana.emanuelli@ufsm.br](mailto:tatiana.emanuelli@ufsm.br)

**ABSTRACT:** The effects of dietary supplementation with essential oil of lemongrass (EO) was evaluated on growing broilers. One-day-old male Cobb chicks were feed basal diet (control) or basal diet + 0.25mL of EO/kg diet for 20 days. Growth performance and blood markers were analyzed. EO increased body weight only in the 3<sup>rd</sup> week of supplementation but increased serum triglycerides and liver weight by 35% and 10%, respectively, and reduced serum globulins by 16%. Dietary supplementation with lemongrass EO had small effect on chick growth performance and possibly caused adverse effects in young chickens.

**Key words:** Citral, Feed efficiency, Growth promoter.

**RESUMO:** Suplementação dietética com óleo essencial de capim-limão no desempenho e bioquímica sanguínea de frangos. O efeito da suplementação dietética com óleo essencial de capim-limão (EO) em frangos em fase de



crescimento foi avaliado. Frangos Cobb machos de um dia de idade foram alimentados com dieta basal (controle) ou dieta basal + 0,25mL de EO/kg de dieta por 20 dias. Foram analisados o desempenho e marcadores sanguíneos. O EO aumentou o ganho de peso apenas na 3<sup>a</sup>. semana de suplementação, mas elevou os níveis séricos de triglicerídeos e o peso do fígado em 35% e 10%, respectivamente, e reduziu as globulinas séricas em 16%. A suplementação dietética com EO de capim-limão, teve pequeno impacto no desempenho produtivo, e possivelmente causou algum efeito indesejado para os frangos de corte em fase de crescimento.

**Palavras-chave:** Citral, Eficiência alimentar, Promotor de crescimento.

## INTRODUCTION

Poultry farming is an important commodity of the Brazilian economy due to the high internal consumption of poultry and the significant participation in the chicken meat export market (IBGE 2016). One of the important consumers of exported birds, the European community, banned the use of antibiotics in animal feed (European Union, 2003) which aroused the interest in finding alternatives for the use of antibiotics. The essential oils (EO) from a variety of plant sources demonstrate high antimicrobial capacity (Silveira et al., 2012), which makes them a good choice to replace antibiotics in animal feed.

Oregano EO has been demonstrated to be effective as growth promoter for broilers (Peng et al., 2016) and some EO constituents namely thymol and carvacrol were effective to improve immune response and preserve intestinal integrity of broilers challenged with *Clostridium perfringens* (Du et al., 2016).

The potential of *Cymbopogon flexuosus* EO as growth promoter has not been explored, although this lemongrass species has been demonstrated to eliminate biofilms (Adukwu et al., 2012) and pathogen microorganisms (Ahmad & Viljoen, 2015) *in vitro*. Taking into account that citral, the major component of *C. flexuosus* EO, has been shown to control necrotic enteritis in broiler chickens (Yang et al., 2010), *C. flexuosus* EO could be a potential natural growth promoter additive for animal feed.

The aim of the present work was to evaluate the effects of dietary supplementation with EO of lemongrass (*C. flexuosus*) on growth performance and blood biochemical markers of growing chicks.

## **MATERIALS AND METHODS**

The EO of *Cymbopogon flexuosus* (Bio Natural Essenciais, Três Passos, Rio Grande do Sul, Brazil) was characterized using an Agilent 7890A gas chromatograph coupled to a mass spectrometry detector Agilent 5975C with a HP5-MS column (5% phenyl, 95% methylsiloxane, 30 m x 0.25  $\mu$ M ID x 0.25 mm) (Garlet et al., 2016). Compounds were identified by comparison of their Kovats retention index and their mass spectra with reference database. Flame ionization detection under the same conditions described above was used for compound quantification. The EO major components were  $\alpha$ -citral (48.9%) and  $\beta$ -citral (37.5%). Other compounds were found at concentrations below than 3%.

One-day-old male Cobb chicks (average initial weight = 42.54g) was randomized into two groups of 60 animals and each group was divided into 6 pens with 10 chicks per pen. The pens (0.5x0.5x0.33 m - l<sub>x</sub>w<sub>x</sub>h), were superimposed on four level stands and each pen had a feeder through type, a drinking nipple type and

a heating hood. The temperature was controlled for each growth phase of broiler (days 1 - 3: 29 to 33°C; days 4 - 7: 28 to 31°C; days 8 - 14: 26 to 28°C; days 15 - 21: 23 to 26°C) and light schedule was continuous (24h).

Two diets composed by corn, soybean meal, and vitamin and mineral premix (NRC, 1994) were formulated: a control diet composed by basal diet containing no additives and an experimental diet, composed by basal diet plus 0.25 mL/kg of EO. Diet moisture, ash crude protein and dietary fiber were determined as described by AOAC (2005) and fat content was determined by the gravimetric method of Bligh & Dyer (1959). Both diets had similar composition (Table 1). Animals were fed control diet or experimental diet during 20 days. After diet treatment (day 21), birds were slaughtered by electronarcosis followed by bleeding. This slaughter time was chosen as chickens slaughtered at this age are used to make a typical dish in the regions of Italian immigration, mainly at south Brazil, known as “galeto al primo canto” which refers to the time when the birds begin to cackle.

Live body weight (LBW) was recorded individually on days 1, 7, 14 and 21. Cumulative feed intake (CFI) was determined weekly per cage (n=6 per treatment). After slaughter carcass weight and liver weight of each animal were recorded (n=60 per treatment). Feed conversion (FC) was calculated by the following equation:  $FC = CFI (g) / (LBW (g) - \text{initial body weight})$ .

At the end of the experimental period, blood samples were collected from 12 animals per treatment (two animals per cage) for evaluation of total serum proteins, albumin, cholesterol and triglycerides. All serum measurements were done in a semi-automatic analyzer (Thermoplate Analyser®, Thermoplate, China) using commercial kits (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa-MG, Brazil). All procedures were

approved by the Ethics Committee on Animal Use, Federal University of Santa Maria (protocol number 120/2014).

Statistical analysis was performed using the statistical package of Statistica 7.0 (Copyright Stat Soft, Inc, Tulsa, USA). The homogeneity of variances was analyzed by Levene's test. Student's T test was used to compare means between treatments. Significance level was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

The inclusion of 0.25 mL *C. flexuosus* EO/kg diet did not change feed intake, body weight gain, feed conversion (Table 2) or carcass yield (Figure 1A). However, the weight gain in the period of 14 to 21 days was higher in the group that received EO (Table 2). The present study demonstrated that dietary supplementation with EO of *C. flexuosus* (0.25mL/kg of diet) during 20 days did not improve main parameters of broiler performance. Other studies demonstrated that dietary supplementation with leaves of *C. citratus* had no effect (Alzawqari et al., 2016) or negative impact (Thayalini et al., 2011) on growth performance of broilers. However, dietary supplementation with a blend of *C. citratus* and *C. martini* EOs improved weight gain in piglets from 28 to 63-days-old (Duarte et al., 2014). Similar to *C. citratus*, the EO of *C. flexuosus* also contains high levels of citral (Bassolé et al., 2011; Rajeswara et al., 2015). In contrast, *C. martini* EO has trace levels of citral and is mostly composed of geraniol, geranylacetate and linalool (Kakaraparthi et al., 2015), which may have contributed to the positive effects of the blend of EOs on pig growth performance.

The effect of herbal products in bird metabolism is very complex and can be influenced by factors as animal growth stage, EO composition and concentration

added in animal feed. Therefore, conflicting results were obtained on the effects of EOs in chicken growth performance.

Dietary supplementation with a volatile oil blend and some isolated compounds, including carvacrol, cinnamaldehyde, and capsicum oleoresin (0.1g/kg of diet), improved by 17% the body weight of chicks (21 days-old) (Pirgozlie et al., 2015). However, Du et al. (2016) observed that supplementation with an EO rich in thymol and carvacrol (0.06-0.26g/kg of diet) did not influence broilers' growth performance up to 14-days age and had just a tendency to reduce the factor conversion ratio between 14 and 28 days of age. Furthermore, the supplementation with oregano EO, containing high level of thymol and carvacrol (0.3g/kg diet), did not increase body weight gain of broilers up to 21 days of age but increased final body weight at 42 days of age (Peng et al., 2016). These data indicate that supplementation with EOs has a more expressive effect on chicken performance when birds are more than 20 days old. In this study, the EO group had greater weight gain only in the last week of the experiment (17-21 days), indicating that the effect of EO supplementation on birds' weight can be verified only in older birds or in longer experimental periods.

The present study showed that addition of *C. flexuosus* EO to broiler feed increased liver weight (Figure 1B) and serum triglycerides (Figure 2E) and reduced total serum protein (Figure 2A) and globulin (Figure 2B) with no effect on feed consumption (Table 2), weight gain (Table 2) or carcass weight (Figure 1A), serum albumin (Figure 2B), albumin/globulin ratio (Figure 2D) and cholesterol (Figure 2F). These data indicate that EO supplementation changed the metabolism or transport of some macronutrients.

The total protein value found in this study was  $3.62 \pm 0.07$  mg/dL in control group and  $3.14 \pm 0.08$  mg/dL in EO group. Data indicate that OE can have caused

impairment in blood proteins production because the baseline values found in the literature ranged from 3.4 to 6.8 mg/dL (Arruda et al., 2016; Paraskeuas et al., 2017; Toghyani et al., 2011; Traesel et al., 2011). However, globulin values from both groups, control ( $2.44\pm 0.09$  mg/dL) and EO ( $2.05\pm 0.09$  mg/dL) were slightly higher than those found in previous studies (0.36-1.8 mg/dL) (Arruda et al., 2016; Elagib et al., 2012).

Total serum protein fraction is composed mainly by albumin and globulins. Albumin and most of the globulins are synthesized in the liver. Changes in serum protein levels may be related to liver and kidney dysfunction, immune response and mal-nutrition (Busher, 1990). Some natural growth promoters can increase serum globulins, improving immune efficiency indicators (Mostafa et al., 2016). In opposite, our study showed a decrease in plasma globulin levels when animals were fed with *C. flexuosus* EO, indicating a negative effect on chick health.

Both EO and pure citral showed toxic effects on cultured fibroblasts (Adukwu et al., 2016) and hepatocytes (Zhang et al., 2015) suggesting that they may cause adverse effects. Lemongrass EO has been shown to upregulate genes involved in heat shock response, immunotoxicity, necrosis, antioxidant response and steatosis process in cultured hepatic cells (Zhang et al., 2015). In addition, a blend containing oregano, sage and rosemary EOs impaired renal and hepatic function at levels above 150 mg/kg of diet, although live weight of broiler chicks was improved at 42 days (Traesel et al., 2011). As some EO and terpene compounds such as citral cause negative effects on different tissues, further studies are needed to establish the safe dose of these compounds for animal feed supplementtion.

The blood triglyceride value for chickens of the Cobb line verified in previous studies were 33-40 mg/dL (Paraskeuas et al., 2017; Traesel et al., 2011). In the

present study the control group presented a value of triglycerides within this range ( $36.18 \pm 1.51$ ) while the EO showed a higher value than previously verified ( $48.76 \pm 1.75$ ).

Acute administration of hepatotoxic compounds also has been shown to directly affect plasma triglyceride levels, causing, initially, a marked decrease accompanied by several liver injuries (Provost et al., 2003). In this study, plasma triglyceride levels increased with EO administration, which may indicate that chronic consumption of EO of *C. flexuosus* produces a compensatory mechanism for energy supply. In addition, EO supplementation caused an increase in liver weight, which is related with an increment in blood triglycerides in steatohepatitis model in birds (AYALA et al., 2009), indicating that dietary EO may trigger liver disease in chickens.

## **CONCLUSION**

The inclusion of EO of lemongrass (*C. flexuosus*) in chick feed (0.25mL/kg of diet) did not affect feed intake or carcass yield but increase body weight gain only in the 3<sup>rd</sup> week of supplementation. However, EO supplementation possibly presented some side effect on health of young chicks which affected liver metabolism. Therefore, dietary supplementation with lemongrass EO is not recommended for broiler chickens under the conditions of this study.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by Foundation for Research Support of Rio Grande do Sul State (FAPERGS) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (grant PRONEX), Financier of Studies and Projects (FINEP-Brazil) (grant CT-AGRO), CNPq and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel and (CAPES) (grant 552440/2011-6), CAPES (Call 13/2008 -

Pro-Equipamentos Institucional – UFSM).

Authors BMH, BB, and TE are the recipients of CNPq Research Fellowships (306449/2015-3, 301156/2012-3 and 309227/2013-5, respectively).

## REFERENCES

ADUKWU, E.C. et al. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon Flexuosus*) and grapefruit (*Citrus Paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of applied microbiology**, v.113, n.5, p.1217–1227, 2012.

ADUKWU, E. et al. Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.100, n.22, p.9619–9627, 2016.

AHMAD, A.; ALVARO V. The *in vitro* antimicrobial activity of *Cymbopogon* essential oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. **Phytomedicine**, v.22, n.6, p.657–665, 2015.

ALZAWQARI, M.H. et al. Effect of feeding dried sweet orange (*Citrus sinensis*) peel and lemon grass (*Cymbopogon Citratus*) leaves on growth performance, carcass traits, serum metabolites and antioxidant status in broiler during the finisher phase. **Environmental science and pollution research international**, v.23, n.17, p.17077–17082, 2016.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC**. 18th ed. Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists, 2005.

ARRUDA, J. et al. Live performance, carcass yield, and welfare of broilers of different genetic strains reared at different housing densities. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.18, n.1, p.141–152, 2016.



AYALA, I. et al. Hyperlipidemic chicken as a model of non-alcoholic steatohepatitis. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, n. 1, p. 10–16, 2009.

BASSOLÉ, I.H.N et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v.18, n.12, p.1070–1074, 2011.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.37, p. 911–917, 1959.

BUSHER, J.T. Serum albumin and globulin. In: WALKER H.K. et al. **Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations**. Boston: Butterworths, 1990. cap. 101, p.497–499.

DU, E. et al. Effects of thymol and carvacrol supplementation on intestinal integrity and immune responses of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.7, n.19, p.1–10, 2016.

DUARTE, M.C.T. Essential oil microparticles and uses thereof for preventing enteric diseases. International patent application WO/2014/028999; PCT/BR2013/000324, 2014.

ELAGIB et al. Effect of natural spices on plasma proteins in broiler chicks. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, v. 2, n.7, p.10–13, 2012.

European Union. European Parliament. Regulamento n.1831/2003. **Regulation on additives for use in animal feed**. Brussels, 2003.

GARLET, Q. I. et al. 2016. Effect of (+)-dehydrofukinone on GABAA receptors and stress response in fish model. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.49, n.1, p.1–9, 2016.

IBGE. 2016. Indicadores IBGE: Estatística da produção pecuária. Rio de Janeiro, 2016.

KAKARAPARTHI, P.S. et al. Changes in the essential oil content and composition of palmarosa (*Cymbopogon martinii*) harvested at different stages and short intervals in two different seasons. **Industrial Crops and Products**, v.69, p.348–354, 2015.

MOSTAFA, M.M.E. et al. Effect of different sources of growth promoter supplementation in diet on performance, carcass traits and blood constituents of broiler chicks. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.11, n.2, p.106–113, 2016.

NCR. National Research Council. **Nutrient requirement of poultry**, 9th ed. Washington: National Academic Press, 1994.

PARASKEUAS, V. et al. Growth performance, nutrient digestibility, antioxidant capacity, blood biochemical biomarkers and cytokines expression in broiler chickens fed different phytogetic levels. **Animal Nutrition**, v.3, n.2, p.114–120, 2017.

PENG, Q.Y. et al. Effects of dietary supplementation with oregano essential oil on growth performance, carcass traits and jejunal morphology in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v.214, p.148–153, 2016.

PIRGOZLIEV, V. et al. Growth performance and endogenous losses of broilers fed wheat-based diets with and without essential oils and xylanase supplementation. **Poultry Science**, v.94, n.6, p.1227–1232, 2015.

PROVOST, J.P. et al. Plasma triglycerides: an overlooked biomarker of hepatotoxicity in the rat. **Comparative Clinical Pathology**, v.12, n.2, p.95–101, 2003.

RAJESWARA R.B.R. et al. Essential oil profiles of different parts of east indian lemongrass (*Cymbopogon Flexuosus* (Nees ex steud.) Wats.). **Journal of Essential**

**Oil Research**, v.27, n.3, p.225–231, 2015.

SILVEIRA, S.M. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the south of Brazil against food spoilage and foodborne pathogens. **Ciência Rural**, v.42, n.7, p.1300–1306, 2012.

THAYALINI, K. et al. Effects of *Cymbopogon citratus* leaf and *Zingiber officinale* rhizome supplementation on growth performance, ileal morphology and lactic acid concentration in broilers. **Malaysian Journal of Animal Science**, v.14, n.1, p.43–49, 2011.

TOGHYANI, M. et al. Evaluation of cinnamon and garlic as antibiotic growth promoter substitutions on performance, immune responses, serum biochemical and haematological parameters in broiler chicks. **Livestock Science**, v. 138, n.1-3, p.167–173, 2011.

TRAESEL, C.K. et al. Serum biochemical profile and performance of broiler chickens fed diets containing essential oils and pepper. **Comparative Clinical Pathology**, v.20, p.453–460, 2011.

YANG, Y. et al. Functional assessment of encapsulated citral for controlling necrotic enteritis in broiler chickens. **Poultry Science**, v.95, n.4, p.780–789, 2010.

ZHANG, L.W. et al. Safety assessment of potential food ingredients in canine hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v.78, n.1, p.105–115, apr. 2015.

**TABLE 1.** Proximate composition of diets

Feed	Composition (%)					
	Moisture	Fat	Protein	Ash	TDF	NFE
Control	11.6±0.0	5.8±0.4	20.6±0.6	5.6±0.0	22.4±3.1	35.2±5.3
Essential oil	11.7±0.1	5.6±0.0	20.8±0.3	5.3±0.4	21.8±0.0	35.8±1.3

Results are mean followed by standard error of 3 independent repetitions. TDF = Total dietary fiber; NFE = Nitrogen free extract. Student's T test demonstrate no differences between diets.

**TABLE 2.** Live body weight, cumulative feed intake and feed conversion of chicks fed with a standard diet (Control) or supplemented with essential oil of *Cymbopogon flexuosus*.

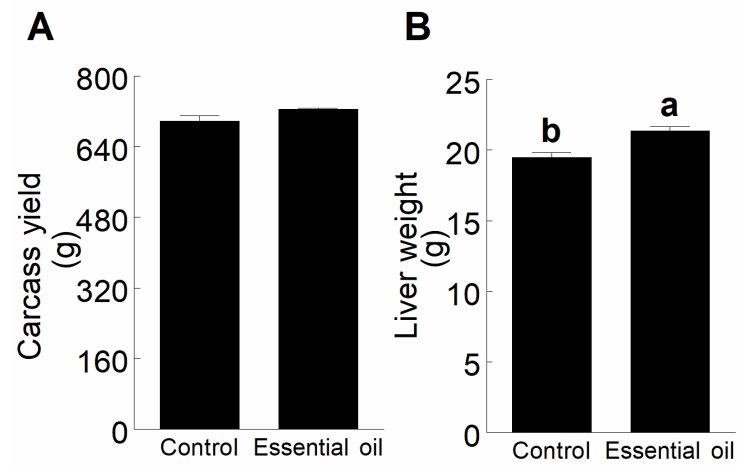
Variable	Diet	
	Control	Essential oil
Initial body weight (g)	43.05 ± 0.30	42.63 ± 0.23
1-7 days		
Live body weight (g)	162.81 ± 3.85	164.80 ± 3.31
Weight gain on period (g)	119.83 ± 3.73	122.17 ± 2.31
Cumulative feed intake (g)	155.50 ± 1.47	150.89 ± 4.98
Feed conversion (g feed/g body weight gain)	1.31 ± 0.06	1.24 ± 0.04
7-14 days		
Live body weight (g)	406.88 ± 17.14	415.97 ± 10.99
Weight gain on period (g)	244.00 ± 14.37	251.17 ± 9.06
Cumulative feed intake (g)	518.82 ± 12.95	496.68 ± 13.34
Feed conversion (g feed/g body weight gain)	1.43 ± 0.04	1.33 ± 0.04
14-21 days		
Live body weight (g)	783.61 ± 18.69	836.36 ± 22.08
Weight gain on period (g)	264.78 ± 18.02 <sup>b</sup>	339.68 ± 18.81 <sup>a</sup>
Cumulative feed intake (g)	1137.81 ± 17.85	1177.86 ± 15.61
Feed conversion (g feed/g body weight gain)	1.47 ± 0.04	1.50 ± 0.05

Results are expressed as mean ± SE (n=60 for body weight; n=6 for cumulative feed intake and feed conversion). Different lowercase letters indicate difference between treatments (Student's T test; p <0.05).

## Figure captions

**FIGURE 1.** Carcass yield (A) and liver weight (B) of chicks fed with a standard diet (Control) or supplemented with essential oil of *Cymbopogon flexuosus*. Results are mean  $\pm$  standard error of 60 independent animals per group. Different lowercase letters indicate difference between treatments (Student's T test;  $p < 0.05$ ).

**FIGURE 2.** Blood biochemistry of chicks fed with a standard diet (Control) or supplemented with essential oil of *Cymbopogon flexuosus*: total serum protein (A), albumin (B), globulin (C), albumin/globulin ratio (D), triglycerides (E) and cholesterol (F). Results are mean followed by standard error of 12 independent animals per group. Different lowercase letters indicate difference between treatments (Student's T test;  $p < 0.05$ ).

**FIGURE 1**

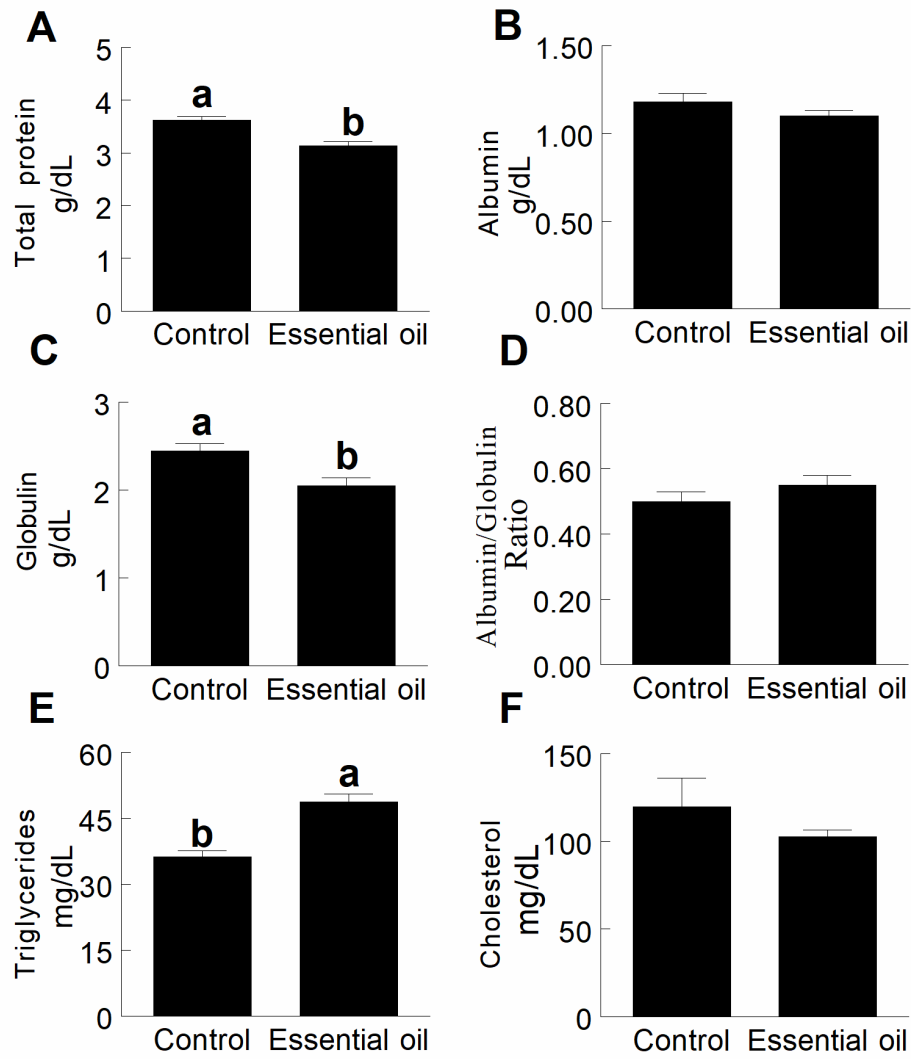


FIGURE 2



#### 4.2. MANUSCRITO II

### EFFECT OF DIETARY SUPPLEMENTATION WITH LEMONGRASS ESSENTIAL OIL ON BREAST MEAT QUALITY OF GROWING BROILERS

**Artigo aceito para publicação na revista International Food Research Journal**  
(Configurado conforme normas da revista)

1           **Effect of dietary supplementation with lemongrass essential oil on breast meat**  
2 **quality of growing broilers**

3

4           <sup>1</sup>Rampelotto, C., <sup>1</sup>Scherer, A. F., <sup>1</sup>Peres, M. M., <sup>1</sup>Conte, L., <sup>1</sup>Klein, B., <sup>1</sup>Wagner, R.,  
5 <sup>2</sup>Lima, R. L., <sup>3</sup>Silva, D. T., <sup>4</sup>Heinzmann, B. M., <sup>2</sup> Baldisserotto, B., <sup>5</sup>Mallmann, C. A., <sup>5</sup>Dilkin, P.,  
6 <sup>1\*</sup>Emanuelli, T.

7

8           <sup>1</sup>Department of Technology and Food Science, Federal University of Santa Maria,  
9 Brazil.

10           <sup>2</sup>Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria,  
11 Brazil.

12           <sup>3</sup>Department of Forest Engineering, Federal University of Santa Maria, Brazil.

13           <sup>4</sup>Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Brazil.

14           <sup>5</sup>Department of Preventive Veterinary Medicine, Federal University of Santa Maria,  
15 Brazil.

16

17           \*Corresponding author,

18           Email: [tatiana.emanuelli@ufsm.br](mailto:tatiana.emanuelli@ufsm.br)

19

20           **Abstract**

21   Essential oils (EOs) are emerging as natural antimicrobial compounds that can substitute for  
22   antibiotics as growth promoters. This work evaluated the effects of dietary supplementation  
23   with essential oil of lemongrass (EO) on the composition, sensory characteristics and lipid  
24   stability of chick breast meat during frozen storage. A basal diet composed by corn, soybean  
25   meal, and vitamin and mineral premix, containing 6% fat and 21% crude protein was  
26   formulated with adequate nutrients for chick age. Control diet (CT) consisted of this basal  
27   diet, whereas the essential oil diet (EOT) was similar to CT except for the inclusion of 0.25  
28   mL/kg of *Cymbopogon flexuosus* EO. One-day-old male Cobb chicks were feed experimental  
29   diets for 20 days. Then chicks were killed and samples from breast muscle were taken,  
30   frozen stored for 12 months and analyzed every 90 days. EO did not change breast meat  
31   proximate composition but improved meat taste. Meat pH and palmitic acid content  
32   increased after EO supplementation. EO volatile components were not detected in meat.  
33   During breast meat frozen storage there was no effect of treatments on meat color or  
34   peroxide value, but TBARS value was increased in breast meat from EO-treated chicks.  
35   Dietary supplementation with lemongrass EO did not affect meat proximate composition but  
36   improved meat taste. However, lipid stability of frozen breast meat was reduced by EO  
37   supplementation.

38           **Keywords**

39           *Cymbopogon flexuosus*, Citral, Volatile compounds, Oxidative stability, Sensory  
40   characteristics

41

## 42 Introduction

43 Apart from their therapeutic application in animal production, subtherapeutic doses of  
44 antibiotics have been extensively used in poultry feed as growth promoters. The risk of  
45 spreading microbial resistance, however, led to the banning of antibiotics as growth  
46 promoters in European Union since 2005 (European Union, 2003) and many countries have  
47 applied similar restrictions thereafter.

48 Essential oils (EOs) are oily and aromatic complex mixtures, extracted from vegetable  
49 material, which are composed by a combination of volatile substances, mainly terpenoid  
50 compounds produced by the secondary metabolism of plants (Burt, 2004; Faria, *et al.*, 2013).  
51 Some EOs have been shown to inhibit the growth of pathogenic bacteria from gut microbiota  
52 and therefore appear as a natural alternative to replace antibiotics in animal feed (Ouwehand  
53 *et al.*, 2010). EOs and EO constituents add in broilers diet have been demonstrated to be  
54 effective as growth promoter (Peng *et al.*, 2016) and were effective to improve immune  
55 response and preserve intestinal integrity. (Du *et al.*, 2016). In addition, EOs exhibited  
56 antimicrobial and antioxidant properties *in vitro* (Sacchetti *et al.*, 2005) and in processed food  
57 products including meat products (Kodal *et al.*, 2014; Rimini *et al.*, 2014; Barbosa *et al.*,  
58 2015; Nair *et al.*, 2015; Smaoui *et al.*, 2016). However, limited studies have focused on the  
59 effects of dietary EOs supplementation in meat shelf life.

60 Lemongrass comprises two citral-rich species that belong to the *Cymbopogon* genus,  
61 *C. citratus* and *C. flexuosus* (Ganjewala, 2009). The EO of both species have demonstrated  
62 antimicrobial effects *in vitro* (Bassolé *et al.*, 2011; Millezi *et al.*, 2012). In addition,  
63 lemongrass EO applied to the surface of refrigerated seafood products enhanced their shelf  
64 life by delaying microbiological deterioration and lipid oxidation (Masniyom *et al.*, 2012;  
65 Ahmad and Viljoen, 2015).

66 The potential of *C. flexuosus* EO as feed additive has not been explored, however the  
67 EO of *C. citratus* was effective to control foodborne *Salmonella enterica* in leafy greens  
68 (Moore-Neibel *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2016). Although *C. citratus* leaf meal added to a broiler

69 diet did not improve bird performance (Thayalini *et al.*, 2011; Alzawqari *et al.*, 2016),  
70 microparticles containing *C. citratus* EO were recently shown to exhibit antimicrobial activity  
71 against pathogenic intestinal bacteria and were patented for oral use to control enteric  
72 infections in animals (WO/2014/028999). Furthermore, *C. citratus* had growth promoter effect  
73 in growing pigs similar to an antibiotic (Duarte *et al.*, 2014).

74 Our hypothesis is that dietary supplementation with the EO of *C. flexuosus* would  
75 affect meat taste and lipid oxidation. Therefore, the aim of the present work was to evaluate  
76 the effects of dietary supplementation with EO of lemongrass (*C. flexuosus*) on sensory  
77 characteristics and lipid stability of breast meat during frozen storage.

78

## 79 **Materials and methods**

80

### 81 *Essential oil*

82 The EO of *Cymbopogon flexuosus* was obtained from Bio Natural Essenciais (Três  
83 Passos, Rio Grande do Sul, Brazil). EO composition was determined by GC-MS using an  
84 Agilent 7890A gas chromatograph coupled to a mass spectrometry detector Agilent 5975C  
85 with a HP5-MS column (5% phenyl, 95% methylsiloxane, 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm) as  
86 previously described (Garlet *et al.*, 2016). The EO constituents were identified by comparison  
87 of their Kovats retention index with literature data and their mass spectra with a library and  
88 the individual components quantification were performed using a flame ionization detector  
89 under the same conditions described above, in triplicate. The EO was composed of  $\alpha$ -citral  
90 (48.90%),  $\beta$ -citral (37.47%), 6-methyl-5-heptene-2-one (2.67%), *E*-isocitral (2.34%),  
91 caryophyllene (1.53%) and *Z*-isocitral (1.39%). Other compounds were found at  
92 concentrations below than 1%.

93

### 94 *Animals and treatment*

95 This study was approved by the Committee on Ethics in Animal Use of Universidade  
96 Federal de Santa Maria (Protocol n° 120/2014) and was conducted in accordance with the

97 ethical principles and rules of the National Council for the Control of Animal Experimentation  
98 (CONCEA).

99 The experiment was carried out with a total of 120 one-day-old male Cobb chicks  
100 (average initial weight = 42.54 g) randomized into 12 cages with 10 chicks per cage and  
101 parceled out in two treatments. The cages measuring 0.5 × 0.5 × 0.33 m (l × w × h), were  
102 superimposed on four level stands and were equipped with a feeder through type, a drinking  
103 nipple type and a heating hood. The experimental trial was conducted in a 22 m<sup>2</sup> room with  
104 controlled temperature for each growth phase of broiler and continuous 24-h light schedule.

105 A basal feed composed by corn, soybean meal, and vitamin and mineral premix was  
106 formulated with adequate nutrients for chick age according to NRC (1994) and contained  
107 11% moisture, 6% fat, 21% crude protein, 5% ash, 22% dietary fiber and 35% nitrogen free  
108 extract. Control diet (CT) consisted of this basal feed, whereas the essential oil diet (EOT)  
109 was similar to CT except for the inclusion of *C. flexuosus* EO at the proportion of 0.25 mL/kg  
110 of diet. Animals were fed control diet or essential oil-containing diet for 20 days. After diet  
111 treatment (day 21), chicks were fasted for 6 h and slaughtered by electronarcosis followed by  
112 bleeding. Samples from breast muscle were taken for analysis.

113 Dietary supplementation with EO was performed only in the first stage of animal  
114 growth to avoid the interference of changes in animal management such as modification of  
115 diet composition that occur at a later stage. Moreover, in the regions of Italian colonization,  
116 mainly in the Southern Brazil, chicks slaughtered at 21 days-old are used to prepare a typical  
117 dish, "galeto al primo canto" (spring chicken), which refers to the period in which the chicks  
118 start cackling.

119

#### 120 *Meat composition*

121 Proximate composition of breast meat was evaluated immediately after slaughter.  
122 Moisture content was obtained after oven-drying at 105°C until a constant weight (AOAC,  
123 2005). Ash content was determined at 550°C (AOAC, 2005). Crude protein was determined  
124 by the micro Kjeldahl method (N × 6.25) (AOAC, 2005). Fat content was determined by the

125 gravimetric method of Bligh and Dyer (1959). Cholesterol was determined as described by  
126 Mestre Prates *et al.* (2006) with some adaptations. Extraction of samples was made by direct  
127 saponification and then samples were injected (20  $\mu$ L) in a Shimadzu LC-20AT prominence  
128 HPLC system equipped with a Shimadzu degasser DGU-20A, a Shimadzu LC-20AT  
129 quaternary pump, a Shimadzu CTO-20A column compartment and a Shimadzu UV-Vis  
130 detector SPD – 20 AV. Cholesterol was separated in a reverse phase Zorbax ODS column  
131 (4.6  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m – Agilent Technologies). The mobile phase was acetonitrile, methanol  
132 and methyl tert-butyl ether at the proportion 65:25:10 (v:v:v) at 1 mL/min flow rate. The  
133 detector was set at 202 nm. Total cholesterol content was calculated using an external  
134 standard curve of peak area vs. concentration.

135

#### 136 *Fatty acid composition*

137 Fat from the samples were extracted (Bligh and Dyer, 1959), esterified (Hartman and  
138 Lago, 1973) and then fatty acid methyl esters were extracted with hexane and determined  
139 using a gas chromatograph Agilent Technologies HP 6890 coupled to a flame ionization  
140 detector (FID) with a capillary column (DB-23, Agilent Technologies). The injection and  
141 detection temperature was 250°C and nitrogen was used as carrier gas (0.9 mL/min). After  
142 the injection (1 $\mu$ L, split ratio 50:1), column temperature was kept at 160°C for 4 min.  
143 thereafter the temperature was raised to 240°C at a rate of 4°C/min and maintained for 8  
144 min. The standards of fatty acid methyl esters (FAME Mix 37, Sigma) were analyzed under  
145 the same conditions, and their retention times were used for identification of fatty acids. The  
146 content of each fatty acid was expressed as % of total fatty acids identified.

147

#### 148 *Meat volatile compounds*

149 Volatile compounds of chicken meat were isolated by Solid Phase Microextraction  
150 (SPME) using a polar phase sorbent fiber (carboxen/polydimethylsiloxane, Supelco, 75  $\mu$ m  $\times$   
151 10 mm) (Brunton *et al.*, 2000). Breast muscle without skin, bones and visible fat was ground  
152 and 5 g sample was placed into a 20-mL vial that was sealed with PTFE septum and heated

153 to 35°C for 15 min to release volatile compounds. Thereafter, volatile compounds were  
154 extracted at 35°C by exposing the fiber in the headspace of the sample for 45 min. Five  
155 replicates were examined for each treatment.

156 Analysis was conducted in a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer  
157 (GC/MS QP-2010 Plus Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). The volatile compounds were  
158 thermally desorbed from SPME fiber in a split/splitless injector operating in splitless mode for  
159 1 min (split ratio 30:1) at 250°C. Under these conditions the fiber was maintained within the  
160 injector exposed for 15 min to eliminate the memory effect. The carrier gas was He at a  
161 constant pressure of 30 psi. Separation of volatile compounds was conducted in a capillary  
162 column of fused silica polar phase, CP-WAX (Varian Chrompack, USA - 60 m × 0.25 mm ID  
163 × 0.25 µm). Oven temperature was set 35°C for 2 min, then heated to 80°C at 2°C/min, then  
164 heated to 150°C at 4°C/min and then 230°C at 8°C/min and remained at this temperature.  
165 The interface between the GC and MS, as well as ionization source was maintained at 230°C.  
166 The quadrupole mass analyzer was operated in scan mode monitoring the range mass of 35-  
167 350 *m/z*. The identification of volatile compounds was done by comparing the experimental  
168 mass spectra with the National Institute of Standards and Technology library (NIST, 2005)  
169 and by comparing their linear retention indices (LRI) with the literature.

170

#### 171 *Sensory analysis*

172 Attributes of cooked breast meat were evaluated by a panel of 30 untrained judges  
173 selected among students and staff from the University. Samples were cooked individually in  
174 a microwave oven (20 g/ 1 min), wrapped in greaseproof paper, coded and randomly offered  
175 to the judges. The panel was asked to score color, taste, flavor and texture using a nine-point  
176 hedonic scale in which one corresponds to extremely dislike and nine corresponds to  
177 extremely like (Meilgaard *et al.*, 2006). This study was approved by the Committee on  
178 Research Ethics of Universidade Federal de Santa Maria (CAAE 36317414.3.0000.5346).

179

180



181 *Meat stability during frozen storage*

182 Lipid oxidation, pH and texture of breast muscle samples were evaluated before  
183 storage (day 0) and after 3, 6, 9 and 12 months of storage at -18°C. Skin, bones and visual  
184 fat were removed from samples before analysis.

185

186 *Lipid oxidation*

187 Lipid oxidation of meat was assessed by monitoring peroxide value (PV) and  
188 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Meat fat was extracted by the Bligh and  
189 Dyer (1959) method and PV was determined using the ferric thiocyanate method according  
190 to Chapman and Mackay (1949). TBARS were determined spectrophotometrically (Buege  
191 and Aust, 1978). Meat samples were homogenized with 1.5% KCl, and the supernatant was  
192 incubated at 100°C for 15 min in a medium containing trichloroacetic acid (TCA) and  
193 thiobarbituric acid. After incubation, butyl alcohol was used to extract the reaction product  
194 that was measured at 535 nm.

195

196 *Color*

197 Breast meat color was assessed using a CR-300 (0-9 months) Chromameter (Minolta,  
198 Osaka, Japan) according to the Intl. Commission on Illumination (CIE 1976 L\* a\* b\*), using a  
199 standard illuminant D65, with 2° observation angle. Four measurements were recorded  
200 directly in the meat surface, with the illumination system being rotated 90° between each  
201 measurement. Color coordinates L\* (lightness), a\* (direction for the red or green), b\*  
202 (direction for the yellow or blue), H\* (observable color) and C\* (saturation) were recorded.

203

204 *pH*

205 Meat pH was measured on homogenates of sample and distilled water (1:10; w/v)  
206 using Bel W3B (Bel Engineering, Monza, Italy) pH-meter.

207

208

209 *Texture*

210 Texture was evaluated as the shear force using the TA-XT Plus Texture Analyzer  
211 texturometer and the Texture Expert Software Exponent (Stable Microsystems Ltd. Surrey,  
212 England). *Pectoralis major* muscle was cut into 1 × 1 cm size portions that were placed in the  
213 texturometer with the muscle fiber transversally positioned to the blade. Warner-Bratzler  
214 blade HDP/BSW probe was used and pre-test, post-test and test speed were set at 0.2 cm/s,  
215 0.5 cm/s and 0.5 cm/s, respectively.

216

217 *Statistical Analysis*

218 Levene's test was performed to check the homogeneity of variances for all data. Meat  
219 composition and volatile profile data were analyzed by Student's T test, whereas data from  
220 sensory analysis was analyzed by the Wilcoxon test.

221 Meat data during storage were analyzed by a two-way ANOVA with time and  
222 treatment being the experimental factors and Tukey's test was carried out post hoc to assess  
223 significant differences among samples. Significance level was set at  $p < 0.05$ . All data were  
224 subjected to analysis using the statistical package of Statistica 7.0 (Copyright Stat Soft, Inc,  
225 Tulsa, USA).

226

227 **Results**

228

229 *Meat composition*

230 Chick supplementation with the EO of *C. flexuosus* did not affect the proximate  
231 composition of breast meat (Table 1). Fat of breast meat was composed of ~32% of  
232 saturated fatty acids and ~68% of unsaturated fatty acids, being 33.2% monounsaturated  
233 and 34.4% polyunsaturated (Table 2). The major fatty acids found in meat from both  
234 treatments were oleic acid (C18:1n9c), linoleic acid (C18:2n6c), palmitic acid (C16:0), stearic  
235 acid (C18:0) and arachidonic acid (C20:4n6). Supplementation with *C. flexuosus* EO

236 increased the content of palmitic acid in breast meat ( $p < 0.05$ ), while other fatty acids did not  
237 change (Table 2).

238 The sensory variables color, texture and flavor did not differ between treatments  
239 whilst the taste was improved for the cooked breast of animals that received *C. flexuosus* EO  
240 ( $p < 0.05$ ) (Table 1).

241 Analysis of volatile compounds in the headspace of raw breast meat revealed the  
242 presence of 32 compounds including acids, alcohols, ketones, hydrocarbons, esters,  
243 aldehydes, ethers and sulfur compounds (Table 3). The volatile compounds profile of breast  
244 meat was not changed by dietary supplementation of *C. flexuosus* EO (Table 3) and no  
245 compounds found in the composition of *C. flexuosus* EO (methods section) were detected in  
246 breast meat (Table 3).

247

#### 248 *Meat stability during frozen storage*

249 There were significant time and treatment effects on the pH of breast meat ( $p < 0.05$ ;  
250 Figure. 1A) during frozen storage but no factorial interaction was observed ( $p > 0.05$ ). The pH  
251 values increased up to 6 months of storage ( $p < 0.05$ ) and then remained constant up to 12  
252 months. The meat of animals fed with *C. flexuosus* EO diet showed higher pH than control  
253 group ( $p < 0.05$ ; Figure. 1A insert).

254 Treatment and storage duration did not affect  $b^*$  or  $h^*$  values.  $L^*$ ,  $a^*$  and  $C^*$  values  
255 were affected by the duration of storage ( $p < 0.05$ ) but no effects of treatment or treatment  $\times$   
256 time interaction were observed for color coordinates. The  $L^*$  value of chick breast meat was  
257 reduced in the start of frozen storage (up to 3 months) and remained constant thereafter. The  
258 values of  $a^*$  and  $C^*$  increased between 0 and 3 months of storage ( $p < 0.05$ ) and remained  
259 constant thereafter (Table 4).

260 The shear force of breast meat samples remained almost constant during frozen  
261 storage except for the 12<sup>th</sup> month, when the shear force of *C. flexuosus* EO samples was  
262 reduced when compared to EO at 9 months and compared to control samples at 12 months  
263 ( $p < 0.05$ ) (Figure. 1B).

264 Lipid oxidation was assessed as the formation of primary (PV values) and secondary  
265 (TBARS value) products during frozen storage (Figure. 1C and 1D). Independent of dietary  
266 treatment the level of all lipid oxidation markers were affected by the storage time. PV was  
267 higher in the first three months of storage and then decreased from 6 to 12 months of frozen  
268 storage ( $p < 0.05$ ), but no effects of treatment or time  $\times$  treatment interaction were observed  
269 on PV (Figure. 1C). ANOVA revealed significant effect of time and treatment but no factorial  
270 interactions on TBARS (Figure. 1D). TBARS value increased up to the 6<sup>th</sup> month of frozen  
271 storage and then decreased from 9 months of storage onwards ( $p < 0.05$ ). *Cymbopogon*  
272 *flexuosus* EO supplementation yielded higher TBARS content in breast meat ( $p < 0.05$ ), but no  
273 significant time  $\times$  treatment interaction was observed (Figure. 1D insert).

274

## 275 Discussion

276 Few studies investigated citral metabolism in live organisms, however both fractions  
277 of citral (neral and geranial) and their metabolites are excreted within 24 h in rats (Diliberto *et al.*  
278 *et al.*, 1990) and insects (Tak and Isman, 2016). In this experiment, chicks were fasted for  
279 about 6 h and volatile compounds were not found in meat indicating that the kinetics of citral  
280 excretion seems to be faster in chicks than in rats. Besides, others components of EOs as  
281 thymol were found just at trace amounts in the muscle tissue of non-fasted chickens fed with  
282 different concentrations of these compounds (Haselmeyer *et al.*, 2015).

283 Fatty acid composition of breast meat from both treatments was similar to previous  
284 studies, as palmitic, oleic and linoleic acids were the major fatty acids (Boschetti *et al.*, 2015).  
285 Dietary supplementation with *C. flexuosus* EO yielded higher palmitic acid content in breast  
286 meat. Such effect may be a consequence of the stressor effect of EO as the stress has been  
287 shown to modify the proportion of fatty acids in fat tissues increasing mainly palmitic acid  
288 (Ain Baziz *et al.*, 1996).

289 Food sensory characteristics are connected to its components. Besides the content  
290 and type of lipids, proteins and carbohydrates, sensory perception is also influenced by the  
291 content and water activity and the presence of aromatic compounds (Wrolstad *et al.*, 2005).

292 Even though no significant differences were observed in the composition of macronutrients  
293 or volatile compound profile of breast meat between treatments, the taste of breast meat  
294 from EO group received better scores than control. Meat taste may have been affected by  
295 substances unevaluated in this study or by slight variations in pH, lipid oxidation products  
296 and, particularly, by the increase of palmitic acid, because dietary triacylglycerol was  
297 involved in food palatability and humans can detect different fatty acids by gustatory stimulus  
298 (Mattes, 2009).

299 During storage just few differences were verified between treatments. Most variations  
300 were attributed to the time effect. The pH of breast meat from EO treatment was significantly  
301 higher than control during frozen storage. Likewise, Ali *et al.* (2008) described that high pH in  
302 broiler meat results from low glycogen level in the muscle at slaughter because of glycogen  
303 depletion that generally occurs due to a combination of chronic stress and activity levels  
304 before slaughter, which indicate a possible toxic effect of EO.

305 Meat pH can influence color and texture characteristics (Andrés-Bello *et al.*, 2013).  
306 Meat with low pH tend to be lighter and softer, presenting higher L\* values and lower shear  
307 force. In contrast, meat with high pH exhibit lower L\* value and higher shear force (Barbut *et*  
308 *al.*, 2005). In the present study, breast meat from both groups had similar color and texture  
309 characteristics despite differences in pH values. This result may be explained as both  
310 treatments showed pH values within the normal range for chicken breast meat without the  
311 presence of defects as pale soft exudative (pH < 5.7) or dark firm dry meat (pH > 6.3)  
312 (Barbut *et al.*, 2005).

313 Breast meat color was not affected by *C. flexuosus* EO treatment but only by storage  
314 time. The shear force, however, was lower for the breast meat of EO-treated chicks than for  
315 control only in the final storage time. Other studies showed controversial effects of EOs on  
316 these characteristics. In pig meat just b\* values were influenced by supplementation with an  
317 EO blend (thyme, rosemary and oregano) (Yan *et al.*, 2010). Oregano EO caused an  
318 inconstant behavior of a\* and b\* values during storage and increased the shear force of  
319 broiler breast meat (Symeon *et al.* 2009), whereas thyme EO caused a tenderization of the

320 breast meat (Alfaig *et al.*, 2013) and clove EO had no effect on breast shear force and  
321 firmness (Hernández *et al.*, 2009).

322           Supplementation with EO of *C. flexuosus* did not affect primary lipid oxidation  
323 products (PV) during frozen storage but yielded higher levels of secondary lipid oxidation  
324 products (TBARS) in breast meat in opposite to Javan *et al.* (2013), in which TBARS was  
325 reduced in breast meat of animals supplemented with *Zataria multiflora* EO. TBARS assess  
326 the levels of malondialdehyde, which is produced as a result of unsaturated fatty acid  
327 oxidation (Jensen *et al.*, 1997). The increased TBARS level of breast meat from chicks  
328 treated with the EO of *C. flexuosus* was not secondary to changes in MUFA, PUFA or total  
329 lipid content, which were found at similar amount to the control group. Several pro-oxidative  
330 conditions induce meat lipid oxidation, which is considered an oxidative stress biomarker and  
331 is implicated in cell and tissue damage in living organisms (Halliwell and Gutteridge, 2008).  
332 Then, the higher content of TBARS in breast meat can be associated to an *in vivo* pro-  
333 oxidative effect of EO supplementation.

334

### 335           **Conclusion**

336           The inclusion of EO of lemongrass (*C. flexuosus*) in chick feed (0.25 mL/kg of diet)  
337 did not affect meat composition and meat volatile compounds but improved breast meat taste,  
338 probably by increasing palmitic acid proportion. EO supplementation showed negative impact  
339 on the lipid stability of frozen breast meat, by increasing secondary products of lipid oxidation  
340 and pH values which may be related to an *in vivo* stress effect that deserves further  
341 investigation.

342

### 343           **Acknowledgements**

344           This study was supported by PRONEX (FAPERGS/CNPq), CT-AGRO  
345 (MCT/MPA/FINEP), Casadinho/PROCAD (MCT/CNPq/MEC/Capes)  
346 and Edital Capes 13/2008 - Pro-Equipamentos Institucional - UFSM.

347 Authors BMH, RW, BB and TE are the recipients of CNPq Research Fellowships  
348 (306449/2015-3, 308830/2015-6, 301156/2012-3 and 309227/2013-5, respectively).

349

350 **References**

- 351 Ahmad, A. and Viljoen, A. 2015. The *in vitro* antimicrobial activity of *Cymbopogon essential*  
352 oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. *Phytomedicine* 22(6): 657–665.
- 353 Ain Baziz, H., Geraert, P. A., Padilha, J. C. and Guillaumin, S. 1996. Chronic heat exposure  
354 enhances fat deposition and modifies muscle and fat partition in broiler carcasses.  
355 *Poultry Science* 75: 505–513.
- 356 Alfaig, E., Angelovicova, M., Kral, M., Vietoris, V. and Zidek, R. 2013. Effect of probiotics and  
357 thyme essential oil on the texture of cooked chicken breast meat. *Acta Scientiarum*  
358 *Polonorum, Technologia Alimentaria* 12(4): 379–384.
- 359 Ali, M. S., Kang, G. H. and Joo, S. T. 2008. A review: Influences of pre-slaughter stress on  
360 poultry meat quality. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 21(6): 912–916.
- 361 Alzawqari, M. H., Al-Baddany, A. A., Al-Baadani, H. H., Alhidary, I. A., Khan, R. U., Aqil, G. M.  
362 and Abdurab, A. 2016. Effect of feeding dried sweet orange (*Citrus sinensis*) peel and  
363 lemon grass (*Cymbopogon citratus*) leaves on growth performance, carcass traits,  
364 serum metabolites and antioxidant status in broiler during the finisher phase.  
365 *Environmental Science and Pollution Research International* 23(17): 17077–17082.
- 366 Andrés-Bello, A., Barreto-Palacios, V., García-Segovia, P., Mir-Bel, J. and Martínez-Monzó,  
367 J. 2013. Effect of pH on color and texture of food products. *Food Engineering Reviews*  
368 5(3): 158–170.
- 369 AOAC. 2005. Official methods of analysis of AOAC international. 18<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, MD:  
370 Association of Official Analytical Chemists.
- 371 Barbosa, L. N., Probst, I. S., Murbach Teles Andrade, B. F., Bérnago Alves, F. C., Albano,  
372 M., Mores Rall, V. L. and Fernandes Júnior, A. 2015. Essential oils from herbs against  
373 foodborne pathogens in chicken sausage. *Journal of Oleo Science* 64(1): 117–124.

- 374 Barbut, S., Zhang, L. and Marcone, M. 2005. Effects of pale, normal, and dark chicken breast  
375 meat on microstructure, extractable proteins, and cooking of marinated fillets. *Poultry*  
376 *Science* 84(5): 797–802.
- 377 Bassolé, I. H. N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Obame, L. C., Ilboudo, A. J., Franz, C.,  
378 Novak, J., Nebié, R. C. and Dicko, M. H. 2011. Chemical composition and antimicrobial  
379 activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in  
380 combination. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and*  
381 *Phytopharmacology* 18(12): 1070–1074.
- 382 Bligh, E. G. and Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification.  
383 *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 37(5): 911–917.
- 384 Boschetti, E., Bordoni, A., Meluzzi, A., Castellini, C., Dal Bosco, A. and Sirri, F. 2015. Fatty  
385 acid composition of chicken breast meat is dependent on genotype-related variation of  
386 FADS1 and FADS2 gene expression and desaturating activity. *Animal* 10(4): 700–708.
- 387 Brunton, N., Cronin, D., Monahan, F. and Durcan, R. 2000. A comparison of solid-phase  
388 microextraction (SPME) fibres for measurement of hexanal and pentanal in cooked  
389 turkey. *Food Chemistry* 68(3): 339–345.
- 390 Buege, J. A. and Aust, S. D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*  
391 52: 302–310.
- 392 Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods:  
393 a review. *International Journal of Food Microbiology* 94(3): 223–253.
- 394 Chapman, R. A. and Mackay, K. 1949. The estimation of peroxides in fats and oils by the  
395 ferric thiocyanate method. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 26(7): 360–  
396 363.
- 397 Diliberto, J. J., Srinivas, P., Overstreet, D., Usha, G., Burka, L. T. and Birnbaum, L. S. 1990.  
398 Metabolism of citral, an alpha,beta-unsaturated aldehyde, in male F344 rats. *Drug*  
399 *Metabolism and Disposition* 18(6): 866–875.
- 400 Du, E., Wang, W., Gan, L., Li, Z., Guo, S. and Guo, Y. 2016. Effects of thymol and carvacrol  
401 supplementation on intestinal integrity and immune responses of broiler chickens



- 402 challenged with *Clostridium perfringens*. Journal of Animal Science and Biotechnology  
403 7(19): 1–10.
- 404 Duarte, M. C. T., Figueira, G. M., Foglio, M. A., Rodrigues, R. A., Coraucci Neto, D., Ruiz, A.  
405 L. T. G. and Carvalho, J. E. de. 2014. Essential oil microparticles and uses thereof for  
406 preventing enteric diseases. International patent application WO/2014/028999;  
407 PCT/BR2013/000324.
- 408 European Union (EU). September 2003. Regulation on additives for use in animal feed.  
409 Regulament n.1831/2003. Retrived on July 31, 2014 from EU Website: [http://eur-](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1490638767926&uri=CELEX:32003R1831)  
410 [lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1490638767926&uri=CELEX:32003R1831](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1490638767926&uri=CELEX:32003R1831)
- 411 Faria, J. M. S., Barbosa, P., Bennett, R. N., Mota, M. and Figueiredo, A. C. 2013. Bioactivity  
412 against *Bursaphelenchus xylophilus*: Nematotoxics from essential oils, essential oils  
413 fractions and decoction waters. Phytochemistry 94: 220–228.
- 414 Ganjewala, D. 2009. Cymbopogon essential oils: chemical compositions and bioactivities.  
415 International Journal of Essential Oil Therapeutics 3(2-3):56–65.
- 416 Garlet, Q. I., Pires, L. C., Silva, D. T., Spall, S., Gressler, L. T., Bürger, M. E., Baldisserotto,  
417 B. and Heinzmann, B. M. 2016. Effect of (+)-dehydrofukinone on GABAA receptors and  
418 stress response in fish model. Brazilian Journal of Medical and Biological Research  
419 49(1): 1–9.
- 420 Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 2008. Free radicals in biology and medicine. 4<sup>th</sup> ed.  
421 Oxford: Oxford University Press.
- 422 Hartman, L. and Lago, R. C. A. 1973. Rapid preparation of fatty acids methyl esters.  
423 Laboratory Practice 22: 475–476.
- 424 Haselmeyer, A., Zentek, J. and Chizzola, R. 2015. Effects of thyme as a feed additive in  
425 broiler chickens on thymol in gut contents, blood plasma, liver and muscle. Journal of  
426 the Science of Food and Agriculture 95(3): 504–508.
- 427 Hernández, P., Juste, V., Zomeño, C., Moreno, J. R. and Peñalver, P. 2009. Effect of dietary  
428 clove essential oil on poultry meat quality. Proceedings of the 55<sup>th</sup> International  
429 Congress of Meat Science and Technology (ICoMST). Copenhagen, Denmark.

- 430 Javan, A. J., Ghazvinian, K., Mahdavi, A., Vayeghan, A. J., Staji, H. and Khaligh, S. G. 2013.  
431 The effect of dietary *Zataria multiflora* boiss essential oil supplementation on microbial  
432 growth and lipid peroxidation of broiler breast fillets during refrigerated storage. Journal  
433 of Food Processing and Preservation 37(5): 881–888.
- 434 Jensen, C., Engberg, R., Jakobsen, K., Skibsted, L. H. and Bertelsen, G. 1997. Influence of  
435 the oxidative quality of dietary oil on broiler meat storage stability. Meat Science 47(3-4):  
436 211–222.
- 437 Kodal Coşkun, B., Çalikoğlu, E., Karagöz Emiroğlu, Z. and Candoğan, K. 2014. Antioxidant  
438 active packaging with soy edible films and oregano or thyme essential oils for oxidative  
439 stability of ground beef patties. Journal of Food Quality 37(3): 203–212.
- 440 Masniyom, P., Benjama, O. and Maneesri, J. 2012. Effect of turmeric and lemongrass  
441 essential oils and their mixture on quality changes of refrigerated green mussel (*Perna*  
442 *viridis*). International Journal of Food Science and Technology 47(5): 1079–1085.
- 443 Mattes, R. D. 2009. Is there a fatty acid taste?. Annual Review of Nutrition 29: 305–327.
- 444 Meilgaard, M. C., Carr, B. T. and Civille, G. V. 2006. Sensory evaluation techniques. 4<sup>th</sup> ed.  
445 Boca Raton: CRC Press.
- 446 Mestre Prates, J. A., Gonçalves Quaresma, M. A., Branquinho Bessa, R. J., Andrade Fontes,  
447 C. M. G. and Mateus Alfaia, C. M. P. 2006. Simultaneous HPLC quantification of total  
448 cholesterol, tocopherols and b-carotene in Barrosã-PDO veal. Food Chemistry 94(3):  
449 469–477.
- 450 Millezi, A. F., Caixeta, D. S., Rossoni, D. F., Cardoso, G. and Piccoli, R. H. (2012). *In vitro*  
451 antimicrobial properties of plant essential oils *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus*  
452 and *Laurus nobilis* against five important foodborne pathogens. Ciência e Tecnologia de  
453 Alimentos 32(1): 167–172.
- 454 Moore-Neibel, K., Gerber, C., Patel, J., Friedman, M. and Ravishankar, S. 2012.  
455 Antimicrobial activity of lemongrass oil against *Salmonella enterica* on organic leafy  
456 greens. Journal of Applied Microbiology 112(3): 485–492.
- 457 Nair, D. V. T., Kiess, A., Nannapaneni, R., Schilling, W. and Sharma, C. S. 2015. The

- 458 combined efficacy of carvacrol and modified atmosphere packaging on the survival of  
459 *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* and lactic acid bacteria on Turkey breast cutlets.  
460 Food Microbiology 49: 134–141.
- 461 NCR. National Research Council. (1994). Nutrient requirement of poultry, 9<sup>th</sup> ed. Washington:  
462 National Academic Press.
- 463 NIST. (2005). EPA/NIH Mass Spectral Library and Search/Analysis Programs. Hoboken, NJ:  
464 J. Wiley and Sons.
- 465 Ouwehand, A., Tiihonen, K., Kettunen, H., Peuranen, S., Schulze, H. and Rautonen, N. 2010.  
466 *In vitro* effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the  
467 normal microbiota. Veterinarni Medicina 55(2): 71–78.
- 468 Peng, Q. Y., Li, J. D., Li, Z., Duan, Z. Y. and Wu, Y. P. 2016. Effects of dietary  
469 supplementation with oregano essential oil on growth performance, carcass traits and  
470 jejunal morphology in broiler chickens. Animal Feed Science and Technology 214: 148–  
471 153.
- 472 Rimini, S., Petracci, M. and Smith, D. P. 2014. The use of thyme and orange essential oils  
473 blend to improve quality traits of marinated chicken meat. Poultry Science 93(8): 2096–  
474 2102.
- 475 Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M. and Bruni, R.  
476 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional  
477 antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. Food Chemistry 91(4): 621–632.
- 478 Smaoui, S., Hsouna, A. B., Lahmar, A., Ennouri, K., Mtibaa-Chakchouk, A., Sellem, I., Najah,  
479 S., Bouazis, M. and Mellouli, L. 2016. Bio-preservative effect of the essential oil of the  
480 endemic *Mentha piperita* used alone and in combination with BacTN635 in stored  
481 minced beef meat. Meat Science 117: 196–204.
- 482 Symeon, G. K., Zintilas, C., Ayoutanti, A., Bizelis, J. A. and Deligeorgis, S. G. (2009). Effect  
483 of dietary oregano essential oil supplementation for an extensive fattening period on  
484 growth performance and breast meat quality of female medium-growing broilers.  
485 Canadian Journal of Animal Science 89(3): 331–334.

- 486 Tak, J.-H. and Isman, M. B. 2016. Metabolism of citral, the major constituent of lemongrass  
487 oil, in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, and effects of enzyme inhibitors on toxicity  
488 and metabolism. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 133: 20–25.
- 489 Thayalini, K., Shanmugavelu, S. and Saminathan, M. 2011. Effects of *Cymbopogon citratus*  
490 leaf and *Zingiber officinale* rhizome supplementation on growth performance, ileal  
491 morphology and lactic acid concentration in broilers. *Malaysian Journal of Animal*  
492 *Science* 49(1): 43–49.
- 493 Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J.,  
494 Shoemaker, C. F., Smith, D. and Sporns, P. (Eds.). 2005. *Handbook of food analytical*  
495 *chemistry: pigments, colorants, flavors, texture and bioactive food components*. New  
496 Jersey: John Wiley and Sons.
- 497 Yan, L., Wang, J. P., Kim, H. J., Meng, Q. W., Ao, X., Hong, S. M. and Kim, I. H. 2010.  
498 Influence of essential oil supplementation and diets with different nutrient densities on growth  
499 performance, nutrient digestibility, blood characteristics, meat quality and fecal noxious gas  
500 content in grower-finisher pigs. *Livestock Science* 128(1-3): 115–122.

501 Table 1. Proximate composition, cholesterol content and sensory acceptance of breast meat  
 502 from chicks fed with a standard diet (control) or diet supplemented with essential oil of  
 503 *Cymbopogon flexuosus*.

Composition	Feed	
	Control	Essential oil
Moisture (%)	75.55 (0.43)	76.13 (0.32)
Fat (%)	1.75 (0.21)	1.93 (0.16)
Crude protein (%)	5.98 (0.46)	5.64 (0.21)
Ash (%)	1.07 (0.02)	1.08 (0.02)
Cholesterol (mg/100g)	92.93 (4.35)	104.42 (3.13)
<b>Sensory acceptance</b>		
Texture	7.00 (0.26)	7.37 (0.22)
Color	6.30 (0.34)	6.23 (0.31)
Flavor	6.40 (0.32)	6.27 (0.32)
Taste	6.80 <sup>b</sup> (0.23)	7.33 <sup>a</sup> (0.25)

504 Composition data are mean followed by standard error of 6 independent animals per group.  
 505 Sensory acceptance data are mean of 30 judges that evaluated samples using a hedonic  
 506 scale in which 1 corresponds to extremely dislike and 9 corresponds to extremely like.  
 507 Different letters indicate differences between treatments using the Wilcoxon test ( $p < 0.05$ ).

508 Table 2. Fatty acids composition of breast meat from chicks fed with a standard diet (control)  
 509 or diet supplemented with essential oil of *Cymbopogon flexuosus*.

Fatty acid (%)	Feed	
	Control	Essential oil
C14:0	0.26 (0.09)	0.37 (0.02)
C14:1	0.03 (0.01)	0.05 (0.00)
C15:0	0.07 (0.02)	0.08 (0.00)
C15:1	0.53 (0.037)	0.27 (0.04)
C16:0	20.74 (0.33) <sup>b</sup>	21.85(0.13) <sup>a</sup>
C16:1	2.96 (0.061)	2.62 (0.08)
C17:0	0.12 (0.04)	0.16 (0.02)
C18:0	9.99 (0.51)	10.05 (0.22)
C18:1n9t	0.12 (0.04)	0.17 (0.01)
C18:1n9c	26.63 (0.79)	27.52 (0.66)
C18:1n7	2.38 (0.07)	2.35 (0.09)
C18:2n6c	25.85 (0.52)	24.83 (0.43)
C18:3n6	0.17 (0.06)	0.25 (0.02)
C18:3n3	1.67 (0.49)	1.17 (0.03)
C21:0	0.08 (0.03)	0.13 (0.02)
C20:3n6	0.71 (0.24)	1.08 (0.04)
C20:4n6	4.46 (0.32)	4.36 (0.28)
C20:5n3	0.13 (0.04)	0.19 (0.01)
C22:4n6	1.37 (0.12)	1.29 (0.08)
C22:5n3	0.72 (0.11)	0.57 (0.03)
C24:1	0.39 (0.14)	0.41 (0.05)
SFA	31.25 (1.02)	32.64 (0.42)
MUFA	33.05 (2.03)	33.40 (0.92)
PUFA	35.06 (1.90)	33.74 (0.92)

510 Results are mean followed by standard error of 4 independent animals per group. Different  
 511 lowercase letters indicate difference between treatments (Tukey's;  $p < 0.05$ ).

512 Table 3. Volatile compounds of raw breast meat from chicks fed with a standard diet (control)  
 513 or diet supplemented with essential oil of *Cymbopogon flexuosus*.

	Compound	Feed				LRI <sub>ref</sub>
		Control		Essential oil		
		Area	LRI <sub>exp</sub>	Area	LRI <sub>exp</sub>	
Acids	Acetic acid	22.61	1467	23.51	1468	1461
	Propionic acid	3.00	1552	2.05	1553	1523
	Butanoic acid	5.16	1641	3.44	1641	1662
Alcohols	2-Methyl butiric acid	2.89	1680	-	-	1667
	2-Propanol	14.43	929	12.19	929	921
	Ethyl alcohol	14.94	939	16.75	938	929
	2-Butanol	1.18	1041	1.23	1036	1024
	1-Butanol	7.87	1171	5.11	1172	1145
	1-Penten-3-ol	11.22	1177	12.99	1181	1157
	Eucalyptol	-	-	1.79	1191	1202
	1-Pentanol	9.72	1261	12.34	1264	1255
	Cis-2-penten-1-ol	-	-	3.56	1331	1326
	1-Hexanol	3.06	1361	2.90	1362	1360
	1-Octen-3-ol	3.54	1456	3.73	1456	1465
	1-Heptanol	0.78	1463	0.69	1463	1453
	2-Ethyl-1-hexanol	11.75	1494	13.39	1493	1487
	1-Octanol	1.53	1566	1.60	1566	1578
	Menthol	1.02	1650	1.44	1650	1646
Ketones	Acetone	130.97	824	120.72	824	814
	2-Butanone	10.00	901	7.84	901	945
	2-Pentanone	0.98	988	1.39	988	960
	6-Methyl-5-hepten-2-one	2.14	1341	2.24	1339	1365
Hydrocarbons	2(3H)-Furanone, dihydro	0.02	1669	0.02	1669	1647
	Limonene	4.65	1174	1.99	1170	1178
	Octane	1.15	800	2.33	800	800
	Cyclopentane, methyl	23.31	651	48.57	651	627
	Cyclohexane	14.40	696	13.38	696	705
Miscellaneous	Ethyl Acetate	8.23	884	26.69	884	885
	Acetaldehyde	-	-	11.44	691	692
	Ethyl ether	22.35	618	26.71	618	0
	Carbon disulfide	60.57	714	79.97	714	701
	Acetoin	18.09	1300	27.54	1305	1287

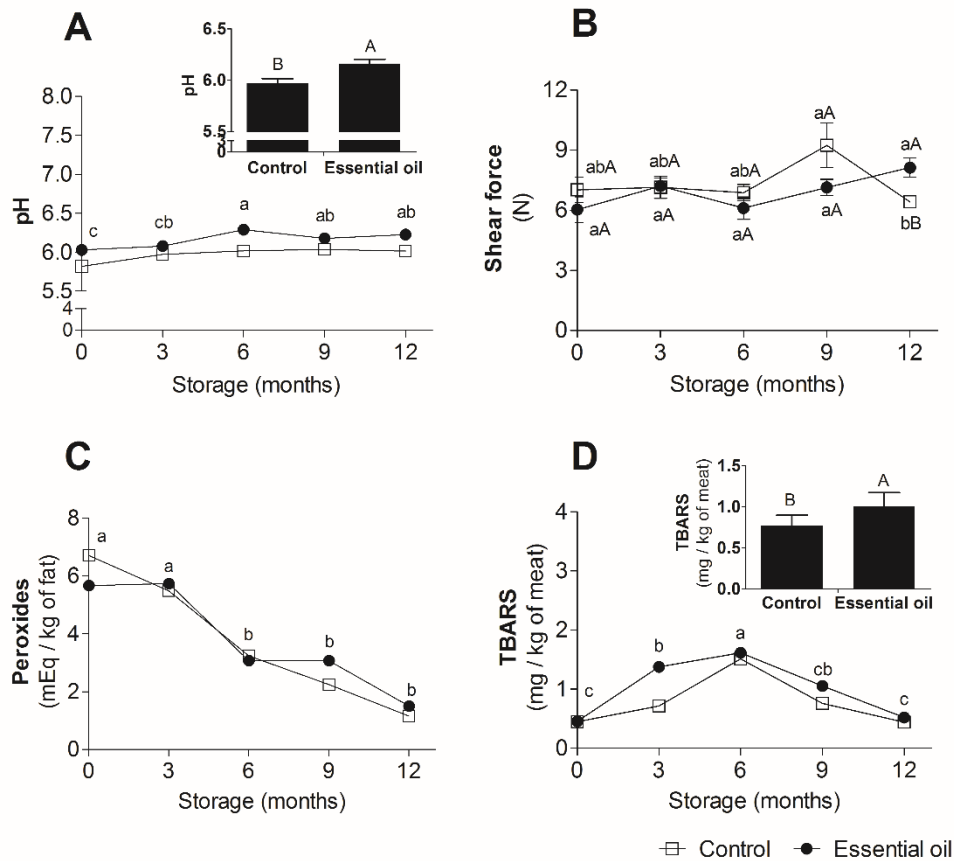
514 Results are average area  $\times 10^5$  of 6 independent animals per group. No significant  
 515 differences were observed between treatments using the T-test ( $p > 0.05$ ). LRI<sub>exp</sub> =  
 516 experimental Linear retention index; LRI<sub>ref</sub> = reference Linear retention index from literature.

517 Table 4. Color coordinates during frozen storage of breast meat from chicks fed with a  
 518 standard diet (control) or supplemented with essential oil of *Cymbopogon flexuosus*.

<b>L*</b>					
Feed	Storage (months)				Mean
	0	3	6	9	
Control	68.15 (0.60)	63.95 (0.60)	62.14 (0.41)	62.52 (1.12)	<b>64.19</b>
Essential oil	68.27 (0.68)	63.40 (0.92)	62.15 (1.21)	64.23 (1.06)	<b>64.51</b>
<b>Mean</b>	<b>68.21<sup>a</sup></b>	<b>63.68<sup>b</sup></b>	<b>62.14<sup>b</sup></b>	<b>63.38<sup>b</sup></b>	
<b>a*</b>					
Feed	Storage (months)				Mean
	0	3	6	9	
Control	10.87 (0.32)	12.19 (0.35)	12.38 (0.31)	11.52 (0.70)	<b>11.74</b>
Essential oil	11.02 (0.41)	12.38 (0.47)	12.16 (0.69)	10.74 (0.50)	<b>11.90</b>
<b>Mean</b>	<b>10.94<sup>b</sup></b>	<b>12.28<sup>a</sup></b>	<b>12.27<sup>a</sup></b>	<b>11.13<sup>ab</sup></b>	
<b>b*</b>					
Feed	Storage (months)				Mean
	0	3	6	9	
Control	10.14 (0.57)	11.64 (0.79)	11.35 (0.52)	11.51 (0.83)	<b>11.16</b>
Essential oil	9.99 (0.56)	11.00 (0.60)	11.37 (0.50)	12.05 (0.87)	<b>11.10</b>
<b>Mean</b>	<b>10.06</b>	<b>11.32</b>	<b>11.36</b>	<b>11.78</b>	
<b>C*</b>					
Feed	Storage (months)				Mean
	0	3	6	9	
Control	14.93 (0.49)	16.90 (0.58)	16.82 (0.49)	16.60 (0.61)	<b>16.31</b>
Essential oil	14.96 (0.55)	16.66 (0.18)	16.72 (0.50)	16.25 (0.58)	<b>16.15</b>
<b>Mean</b>	<b>14.94<sup>b</sup></b>	<b>16.78<sup>a</sup></b>	<b>16.77<sup>a</sup></b>	<b>16.42<sup>a</sup></b>	
<b>h*</b>					
Feed	Storage (months)				Mean
	0	3	6	9	
Control	43.02 (1.53)	43.37 (2.12)	42.42 (1.25)	45.11 (2.87)	<b>43.48</b>
Essential oil	42.12 (1.71)	41.57 (2.59)	43.20 (2.30)	48.03 (2.87)	<b>43.73</b>
<b>Mean</b>	<b>42.57</b>	<b>42.47</b>	<b>42.81</b>	<b>46.57</b>	

519 Results are mean followed by standard error of 6 independent animals per group. ANOVA  
 520 indicated only effect of storage time on L\*, a\* and C\* values. Different lowercase letters  
 521 indicate difference among the days of storage by Tukey's test (p <0.05).





522

523 Figure 1. Changes in pH (A), texture (B), peroxide value (C) and TBARS (D) values during  
 524 frozen storage of breast meat from chicks fed with a standard diet (control) or supplemented  
 525 with essential oil of *Cymbopogon flexuosus*. Results are expressed as mean  $\pm$  SE (n = 6).  
 526 Different capital letters indicate difference between treatments and different lowercase letters  
 527 indicate difference among the days of storage (Tukey's test; p < 0.05).

### 4.3. MANUSCRITO III

SUPPLEMENTATION WITH MICROENCAPSULATED LEMONGRASS ESSENTIAL OIL IMPROVES PROTEIN DEPOSITION AND CARCASS YIELD IN SILVER CATFISH  
*(Rhamdia quelen)*

**Artigo aceito para publicação no periódico Acta Scientiarum: Animal Science**  
(Configurado conforme normas da revista)

1           **Title: Supplementation with microencapsulated lemongrass essential oil improves**  
2           **protein deposition and carcass yield in silver catfish (*Rhamdia quelen*)**

3  
4                           *Running head: Cymbopogon flexuosus in fish diet*

5  
6   Cristine Rampelotto<sup>a</sup>, Joziane Soares de Lima<sup>b</sup>, Carlos Garrido Pinheiro<sup>c</sup>, Joseânia Salbego<sup>d</sup>,  
7   Leila Picolli da Silva<sup>b</sup>, Tatiana Emanuelli<sup>a\*</sup>

8  
9   <sup>a</sup>Department of Technology and Food Science, Federal University of Santa Maria, Santa  
10   Maria, RS, Brazil; <sup>b</sup>Department of Animal Science, Federal University of Santa Maria, Santa  
11   Maria, RS, Brazil; <sup>c</sup>Department of Forest Engineering, Federal University of Santa Maria, Av.  
12   Roraima 1000, Santa Maria, RS, Brazil; <sup>d</sup>Department of Physiology and Pharmacology,  
13   Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. \*Author for correspondence, E-  
14   mail:tatiana.emanuelli@ufsm.br

15  
16   **ABSTRACT**

17   The aim of this study was to investigate the effect of dietary supplementation with  
18   *Cymbopogon flexuosus* essential oil (EO) on productive performance, metabolic parameters  
19   and body and fillet composition of adult silver catfish, *Rhamdia quelen*. Total length,  
20   condition factor, weight gain, specific growth rate, hepatosomatic index, visceral fat content  
21   and fillet composition were not affected by EO supplementation. Plasma total protein,  
22   globulin and triglycerides were reduced by EO supplementation. Supplementation with 1 mL  
23   EO kg<sup>-1</sup> diet increased carcass yield and protein deposition in the carcass, while reducing  
24   gonadosomatic index and fat deposition in the carcass when compared to control group. In  
25   addition, 1 mL EO kg<sup>-1</sup> diet also improved feed intake when compared to 3 mL EO kg<sup>-1</sup> diet.  
26   Our results suggest that EO up to 1 mL kg<sup>-1</sup> diet can be used in fish feed to improve protein  
27   deposition and carcass yield of silver catfish.

28   **Keywords:** *Cymbopogon flexuosus*; citral; growth performance; gonads; body composition

29  
30

1 **Título: A suplementação com óleo essencial de capim-limão microencapsulado**  
2 **melhora a deposição de proteína e o rendimento de carcaça de jundiás (*Rhamdia quelen*)**

3  
4 ***Título resumido: Cymbopogon flexuosus* na dieta de peixes**

5  
6 **RESUMO**

7 O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da suplementação na dieta com óleo essencial  
8 de *Cymbopogon flexuosus* (EO) sobre o desempenho produtivo, os parâmetros metabólicos e  
9 a composição corporal e de filés de jundiás (*Rhamdia quelen*) adultos. O comprimento total, o  
10 fator de condição, o ganho de peso, a taxa de crescimento específico, o índice  
11 hepatossomático, o teor de gordura visceral e a composição dos filés não foram afetados pela  
12 suplementação com EO. Os níveis plasmáticos de proteína total, globulina e triglicérides  
13 foram reduzidos pela suplementação com EO. A suplementação com 1 mL de EO kg<sup>-1</sup> de  
14 dieta aumentou o rendimento de carcaça e a deposição de proteína na carcaça, mas reduziu o  
15 índice gonadossomático e a deposição de gordura em comparação ao grupo controle. Além  
16 disso, 1 mL de EO kg<sup>-1</sup> de dieta também melhorou o consumo de ração em comparação com 3  
17 mL de EO kg<sup>-1</sup> de dieta. Os resultados sugerem que se pode utilizar até 1 mL de EO kg<sup>-1</sup> de  
18 dieta na alimentação de peixes para melhorar a deposição de proteína e a produtividade de  
19 carcaça de jundiás em fase de engorda.

20 **Palavras-chave:** *Cymbopogon flexuosus*; citral; desempenho produtivo; gônadas; composição  
21 corporal

22

## 1 INTRODUCTION

2 Aquaculture plays an important role in economic and social development as it  
3 provides high biological value food for human nutrition and generates job opportunities that  
4 contribute to economic growth (Subasinghe, Soto & Jia, 2009). Catfish (Siluriformes)  
5 comprises numerous fish species, mostly freshwater fish (Ferraris, 2007), widely distributed  
6 with a key role in world aquaculture (The World Bank, 2013). Silver catfish, *Rhamdia quelen*,  
7 is endemic from southern Mexico to central Argentina (Valladão, Gallani & Oilarski, 2016).  
8 This freshwater species is well adapted to the low winter temperatures in southern Brazil  
9 (Garcia, Copatti, Wachholz, Pereira Filho & Baldisserotto, 2008), being a valuable species for  
10 aquaculture in temperate climate.

11 Plant extracts and derivatives, including essential oils (EOs), emerged as an alternative  
12 to antibiotics and chemotherapy in aquaculture since they have antimicrobial activity and  
13 stimulate fish immunity (Vaseeharan & Thaya, 2013). EOs have also been prospected for use  
14 as anaesthetic and sedative for fish, and have been shown to reduce the stress during  
15 transportation (Parodi et al., 2012; 2014; Salbego et al. in press) and increase the shelf-life of  
16 refrigerated and frozen fish (Veeck et al., 2013; Daniel et al., 2014; 2016; Veit et al. in press).

17 Strategies to improve fish growth performance may accelerate the development of the  
18 aquaculture sector and EOs have been investigated as feed additive for different fish species  
19 but results are conflicting. In Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, sweet orange peel EO, rich  
20 in limonene, improved weight gain and blood parameters (Acar, Kesbiç, Yılmaz, Gültepe &  
21 Türker, 2015), while lemon peel EO, also rich in limonene, had no effect on growth  
22 performance and had little effect on blood parameters (Baba, Acar, Öntas, Kesbiç & Yılmaz,  
23 2016). However, both EOs increased resistance against pathogens (Acar et al., 2015; Baba et  
24 al., 2016). In silver catfish, feed supplementation with EO from *Lippia alba* (linalool  
25 chemotype) leaves (0.25 - 2.0 mL EO kg<sup>-1</sup> diet) did not influence growth performance or  
26 blood parameters but increased antioxidant enzymes and reduced lipid oxidation (Saccol et al.,  
27 2013). On the other hand, diet containing citral-rich EOs as from *Aloysia triphylla* leaves (2.0  
28 mL EO kg<sup>-1</sup> diet) and *Cymbopogon flexuosus* increased the number of intestinal folds and/or  
29 promoted fish growth (Zeppenfeld et al., 2016; Baldisserotto et al., 2015).

30 *Cymbopogon flexuosus* is a highly productive and vigorous plant that has good yield  
31 of dry mass (7-25 t ha<sup>-1</sup>) and higher yield in the production of EO (100 L of EO ha<sup>-1</sup>)  
32 (Zheljazkov, Cantrell, Astatkie & Cannon, 2011) compared to other citral-rich herbs like *L.*  
33 *alba* (citral chemotype) (~26-67 L of EO ha<sup>-1</sup>) (Zambrano, Buitrago, Durán, Sanchez &

1 Bonilla, 2013) and *A. triphylla* (10 L of EO ha<sup>-1</sup>) (Al-Mefleh, Abu Salah & Abandeh, 2012).  
2 These characteristics increase the economic viability for the production of *C. flexuosus* EO.

3 Beyond chemical differences between the EOs tested in fish, loss of part of their  
4 components during feed production and storage may have contributed to some negative  
5 results on animal growth. EOs are known to undergo loss by volatilization and degradation  
6 when exposed to high temperature, light or oxidants. Therefore, microencapsulation appears  
7 as an important strategy to protect and preserve EOs and their bioactive properties (Asbahani  
8 et al., 2015).

9 The aim of this study was to investigate the effect of dietary supplementation with  
10 microencapsulated EO from *C. flexuosus* on productive performance, metabolic parameters  
11 and body composition of adult silver catfish.

12

## 13 MATERIAL AND METHODS

### 14 Essential oil

15 The EO from *C. flexuosus* was donated by Bio Natural Essenciais (Três Passos, Rio  
16 Grande do Sul, Brazil) and had 0.907 g/cm<sup>3</sup> density. To prevent degradation, EO was  
17 microencapsulated by complex coacervation (Alvim & Grosso, 2010) before incorporation  
18 into fish feed. The amount of EO contained in the microcapsules, assessed by  
19 hydrodistillation (Clevenger apparatus), was 365 mL kg<sup>-1</sup>.

20 The identification of EO composition was determined using an Agilent 6890 gas  
21 chromatograph (GC) coupled to a mass spectrometry detector (MS) Agilent 5973 with a HP5-  
22 MS column (5% phenyl, 95% methylsiloxane, 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm). The EO  
23 chemical constituents were identified by comparison of their retention indices, which were  
24 determined by a calibration curve of n-alkanes injected under the same chromatographic  
25 conditions as the samples and mass fragmentation patterns described in the literature (Garlet  
26 et al., 2016). The chemical constituents of the EO were quantified by GC coupled to flame  
27 ionization detector (FID) on an Agilent 7890A. The percentage of the constituents was based  
28 on peak area normalization. Ninety-three percent of EO composition was identified and the  
29 major constituents (>1.5%) were: geranial or α-citral (45.7%), neral or β-citral (32.1%), Z-  
30 verbenol (2.4%), citronellol (2.0%), Z-geraniol (2.0%) and caryophyllene (1.7%).

### 31 Diets

32 Three diets were formulated (Table 1): a control diet (without EO), a diet containing 1  
33 mL kg<sup>-1</sup> of *C. flexuosus* EO and a diet containing 3 mL kg<sup>-1</sup> of *C. flexuosus* EO. Diets had the  
34 same formulation except for the presence of EO. The ingredients were manually homogenized,

1 pelleted (6 mm) and then dried at 45°C in an air flow oven for 24 hours. After drying, diets  
2 were stored at -18°C.

3

4 Table 1. Ingredients and proximate composition of  
5 experimental diets.

Diet components	Essential oil level 6 (mL kg <sup>-1</sup> )		
	0	1	3
<b>Ingredients (g kg<sup>-1</sup>)</b>			
Meat and bone meal	350	350	350
Soybean meal	300	300	300
Broken corn	150	150	150
Rice bran	120	120	120
Canola oil	30	30	30
Vitamin and mineral Premix	30	30	30
Sodium chloride	10	10	10
Dicalcium phosphate	10	10	10
Essential oil microcapsules*	0	2.74	8.22
<b>Proximate composition</b>			
Moisture (g kg <sup>-1</sup> )	57.3	57.0	58.2
Protein (g kg <sup>-1</sup> )	336.9	343.4	349.3
Fat (g kg <sup>-1</sup> )	85.0	91.6	89.4
Ash (g kg <sup>-1</sup> )	215.7	224.0	219.4
NFE (g kg <sup>-1</sup> )	275.9	254.1	252.3
Energetic value (kJ kg <sup>-1</sup> )	13461	13456	13443

7 Notes: Values are expressed as mean ± SEM (n = 3 per  
8 group). NFE: Nitrogen free extract. \* Microcapsules  
9 contained 365 mL of EO kg<sup>-1</sup>.

10

## 11 Fish treatment

12 One hundred twenty-six silver catfish (*Rhamdia quelen*) from both sex (average initial  
13 body weight = 403.1 ± 8.5 g) were obtained from a local fish farm and transported to the  
14 Laboratory of Fisheries in oxygenated water. Fish were randomized into 21 tanks (270 L)  
15 with six fish per tank. Seven independent replicates (seven tanks) were conducted for each  
16 treatment. The tanks were connected to a water recirculating system with two biological  
17 filters, an activated carbon filter and a 2000-L water reservoir.

18 Animals were given the experimental diets twice a day (8:00 a.m. and 4:00 p.m.) to  
19 apparent satiation for 20 days. During the experimental period, water quality was maintained  
20 as follows: 21.3 ± 0.3°C; 8.5 ± 0.5 mg dissolved oxygen L<sup>-1</sup>; 0.32 ± 0.03 mg NH<sub>3</sub> + NH<sub>4</sub><sup>+</sup> L<sup>-1</sup>  
21 and 0.17 ± 0.03 mg NO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. At the end of the experimental period, fish were fasted for 24  
22 hours and euthanized by spinal cord section. Blood was collected from the caudal vein of each  
23 fish using heparinized 5-mL syringes. Fish were eviscerated to collect liver and intestine that

1 were weighed and stored at -20°C until analysis. All procedures were approved by the Ethics  
2 Committee on Animal Use, Federal University of Santa Maria (protocol number 120/2014).

### 3 **Productive performance**

4 Fish total length (cm) and weight (g) were determined individually using digital  
5 callipers and scales and used to calculate following indices:

$$6 \quad \text{Condition factor (g/cm}^3\text{)} = 100 \times \left( \frac{\text{Final weight}}{\text{Final length}^3} \right)$$

$$7 \quad \text{Weight gain (g)} = (\text{Final body weight} - \text{Initial body weight})$$

$$8 \quad \text{Specific growth rate (\%)} = 100 \times \left( \frac{\ln \text{ final body weight} - \ln \text{ initial body weight}}{\text{Days of experiment}} \right)$$

### 9 **Somatic indices and body yield**

10 Seven fish per treatment were eviscerated to assess the digestive tract length and the  
11 weight of eviscerated fish, digestive tract, liver, visceral fat and gonads that were used to  
12 calculate the following indices:

$$13 \quad \text{Carcass yield (\%)} = \left( \frac{\text{Eviscerated fish weight}}{\text{Whole fish weight}} \right) \times 100$$

$$14 \quad \text{Digestive somatic index (\%)} = \left( \frac{\text{Digestive tract weight}}{\text{Whole fish weight}} \right) \times 100$$

$$15 \quad \text{Visceral fat index (\%)} = \left( \frac{\text{Visceral fat weight}}{\text{Whole fish weight}} \right) \times 100$$

$$16 \quad \text{Hepatosomatic index (\%)} = \left( \frac{\text{Liver weight}}{\text{Whole fish weight}} \right) \times 100$$

$$17 \quad \text{Gonadosomatic index (\%)} = \left( \frac{\text{Gonad weight}}{\text{Whole fish weight}} \right) \times 100$$

### 18 **Proximate composition of diet, whole fish and fish fillet**

19 Moisture, ash and crude protein of experimental diets, whole fish and fillets were  
20 analyzed following the methods of AOAC (2005). Fat content was determined by gravimetric  
21 method (Bligh & Dyer, 1959). Dietary crude fiber was determined by method 978.10 of  
22 AOAC (2005) and nitrogen-free extract (NFE) was calculated as:

$$24 \quad \text{NFE} = 100 - (\% \text{ moisture} + \% \text{ protein} + \% \text{ lipid} + \% \text{ crude fiber} + \% \text{ total ash})$$

### 25 **Plasma assays**

26 Plasma was obtained after blood centrifugation (3000 x g, 10 minutes, 4°C) and was  
27 stored at -20°C before assessment of the following metabolic markers using commercial kits:  
28 alkaline phosphatase (LabTest, MG, Brazil), creatinine, albumin (Bioclin, MG, Brazil), total



1 protein, triglycerides, cholesterol, glucose, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate  
2 aminotransferase (AST) (Doles, GO, Brazil). Globulins were calculated using the following  
3 equation:

$$4 \quad \text{Globulins (g dL}^{-1}\text{)} = \text{total protein (g dL}^{-1}\text{)} - \text{albumin (g dL}^{-1}\text{)}$$

5 Free amino acids were determined following the methodology of Spies (1957).

#### 6 **Liver metabolic parameters**

7 Liver samples were deproteinized with trichloroacetic acid using an ultra Turrax-type  
8 homogenizer (Marconi Equipment for Laboratory Industry Ltda®) to measure glucose  
9 (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers & Smith, 1956), lactate (Harrower & Brown, 1972) and  
10 ammonia (Verdouw, Van Echteld & Dekkers, 1978) levels. Liver samples were extracted with  
11 KOH and the extracts were used to assess glycogen (Dubois et al., 1956) and total protein  
12 (Lowry, Rosebrough, Lewis Farr & Randall, 1951). Liver samples were homogenized with 20  
13 mM phosphate buffer, pH 7.5, centrifuged at 1000 x g for 10 minutes and the supernatant was  
14 used to determine free amino acids (Spies, 1957) and AST and ALT activity using  
15 commercial laboratory kits (Doles, GO, Brazil).

#### 16 **Digestive enzymes**

17 Intestine was homogenized (1:20, w/v) in 0.02 M Tris/0.01 M phosphate/50% glycerol,  
18 pH 7.5 buffer using an ultra Turrax-type homogenizer (Marconi, Brazil) and centrifuged at  
19 1200 x g, at 4°C for 10 minutes and the supernatant was collected for enzyme analysis.

20 Trypsin activity was determined at 247 nm after incubating supernatants with N $\alpha$ -p-  
21 tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride (TAME) at 25°C, pH 8.1 (Hummel, 1959).  
22 Chymotrypsin activity was determined at 256 nm after incubating supernatants with N-  
23 benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE) at pH 7.8 (Hummel, 1959).

#### 24 **Statistical analysis**

25 Levene's test was used to evaluate the homogeneity of variances. Data were analyzed  
26 by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test, applied to determine  
27 differences between groups. Gonadosomatic index data did not met ANOVA assumptions and  
28 were analyzed by Kruskal-Wallis test followed by multiple comparisons of mean ranks.  
29 Spearman's test was used to evaluate the correlation between gonadosomatic index and other  
30 variables. The significance level was set at  $p < 0.05$ . Analyses were run with SPSS 16.0 for  
31 Windows (Chicago, IL, USA).

32

33

## 1 RESULTS

2 At the end of the experimental period, total length, condition factor, weight gain and  
 3 specific growth rate did not differ among treatments. Fish fed 1 mL EO kg<sup>-1</sup> diet had feed  
 4 intake similar to the control group but higher than fish fed 3 mL EO kg<sup>-1</sup> diet (p<0.05).  
 5 Despite the lower feed intake by fish fed 3 mL EO kg<sup>-1</sup> diet, the estimated consumption of EO  
 6 by this group was ~3.6-fold higher compared to fish fed 1 mL EO kg<sup>-1</sup> diet (Table 2).

7  
 8 Table 2. Productive performance of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fed different concentrations of *Cymbopogon flexuosus*  
 9 EO.

Variable	Essential oil level (mL kg <sup>-1</sup> )		
	0	1	3
Total diet consumption (g kg <sup>-1</sup> body weight per day)	8.8±0.5 <sup>ab</sup>	10.17±0.5 <sup>a</sup>	7.8±0.7 <sup>b</sup>
EO consumption (µL kg <sup>-1</sup> body weight per day)*	0	7.9	28.3
Total length (cm)	35.1±1.1	34.9±1.2	34.4±1.1
Condition factor (g per cm <sup>3</sup> )	1.04±0.07	1.06±0.07	1.03±0.07
Weight gain (g)	47.6±10.8	47.1±12.8	40.5±17.2
Specific growth rate (% per day)	0.49±0.12	0.68±0.17	0.46±0.16

10 Notes: Values are expressed as mean ± SEM (n = 7). Values that have no common superscript letter within the same row are  
 11 different by Tukey's test (p<0.05). \*Calculated based on the amount of EO in diet and the apparent consumption of diet.

12  
 13 EO supplementation did not affect hepatosomatic index or visceral fat mass but  
 14 reduced the digestive somatic (1 and 3 mL EO kg<sup>-1</sup> diet) and gonadosomatic indices (1 mL  
 15 EO kg<sup>-1</sup> diet) and increased carcass yield (1 mL EO kg<sup>-1</sup> diet) (p<0.05; Table 3) compared to  
 16 control diet.

17  
 18 Table 3. Body yield and somatic indices of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fed different concentrations of *Cymbopogon*  
 19 *flexuosus* EO.

Variable (%)	Essential oil level (mL kg <sup>-1</sup> )		
	0	1	3
Carcass yield	80.4±3.4 <sup>b</sup>	84.7±1.7 <sup>a</sup>	83.5±1.6 <sup>ab</sup>
Digestivesomatic index	3.1±0.1 <sup>a</sup>	2.5±0.1 <sup>b</sup>	2.5±0.1 <sup>b</sup>
Hepatosomatic index	1.62±0.14	1.50±0.24	1.29±0.07
Visceral fat index	1.05±0.27	1.27±0.24	0.84±0.18
Gonadosomatic index*	5.4 (3.4-9.3) <sup>a</sup>	1.8 (0.9-2.7) <sup>b</sup>	3.1 (2.4-5.9) <sup>ab</sup>

20 Notes: Values are expressed as mean ± SEM, except for the \*gonadosomatic index, which was expressed as median followed  
 21 by interquartile range (n = 7 per group). Values that have no common superscript letter within the same row are different by  
 22 Tukey's test (p<0.05).

23  
 24 Body composition was also affected by EO supplementation, but it did not affect fillet  
 25 composition (Table 4). EO supplementation reduced fat content and increased moisture of  
 26 whole fish (p<0.05). Protein content of whole fish was increased only by supplementation  
 27 with 1 mL EO kg<sup>-1</sup> diet.

28

1 Table 4. Proximate composition of whole fish and fish  
2 fillet of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fed different  
3 concentration of *Cymbopogon flexuosus* EO.

Composition (%)	Essential oil level (mL kg <sup>-1</sup> )		
	0	1	3
<b>Whole fish</b>			
Moisture	66.3±0.8 <sup>b</sup>	70.1±0.5 <sup>a</sup>	71.22±0.3 <sup>a</sup>
Fat	14.1±0.3 <sup>a</sup>	11.0±0.2 <sup>b</sup>	10.6±0.2 <sup>b</sup>
Protein	14.9±0.2 <sup>b</sup>	16.4±0.3 <sup>a</sup>	14.8±0.6 <sup>b</sup>
Ash	2.9±0.3	3.4±0.4	3.8±0.3
<b>Fillet</b>			
Moisture	76.7±0.5	75.9±0.8	77.8±0.4
Fat	3.7±0.4	4.5±0.6	2.9±0.4
Protein	18.1±0.5	18.8±0.6	19.0±0.2
Ash	1.1±0.1	1.1±0.0	1.2±0.1

4 Notes: Values are expressed as mean ± SEM (n = 7 per  
5 group). Values that have no common superscript letter  
6 within the same row are different by Tukey's test (p<0.05).

7  
8 Plasma total protein was reduced by EO supplementation compared to control group,  
9 whereas globulin and triglycerides levels were reduced only in fish fed 1 mL EO kg<sup>-1</sup> diet  
10 (p<0.05). Other plasmatic variables, namely albumin, creatinine, alkaline phosphatase, free  
11 amino acids, cholesterol, glucose, AST and ALT were not affected by EO supplementation  
12 (Table 5).

13  
14 Table 5. Plasmatic variables of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fed different concentrations of *Cymbopogon flexuosus* EO.

Variable	Essential oil level (mL kg <sup>-1</sup> )		
	0	1	3
Total protein (g dL <sup>-1</sup> )	4.4±0.1 <sup>a</sup>	3.6±0.2 <sup>b</sup>	3.7±0.3 <sup>b</sup>
Albumin (g dL <sup>-1</sup> )	1.4±0.1	1.4±0.2	1.3±0.1
Globulin (g dL <sup>-1</sup> )	3.0±0.1 <sup>a</sup>	2.1±0.2 <sup>b</sup>	2.3±0.3 <sup>ab</sup>
Creatinine (mg dL <sup>-1</sup> )	0.18±0.04	0.26±0.04	0.27±0.08
Alkaline phosphatase (U L <sup>-1</sup> )	47.6±4.6	45.5±5.6	51.1±6.4
Free amino acids (nmol dL <sup>-1</sup> )	11.8±0.7	9.6±0.8	10.4±0.9
Triglycerides (mg dL <sup>-1</sup> )	243.0±36.1 <sup>a</sup>	114.5±25.5 <sup>b</sup>	173.9±24.3 <sup>ab</sup>
Cholesterol (mg dL <sup>-1</sup> )	98.3±7.1	106.5±8.1	102.1±4.8
Glucose (mg dL <sup>-1</sup> )	23.8±1.8	24.9±3.4	22.3±3.0
ALT (U L <sup>-1</sup> )	23.9±6.9	23.3±4.5	26.5±8.5
AST (U L <sup>-1</sup> )	21.3±5.1	20.9±3.4	23.3±6.4

15 Notes: Values are expressed as mean ± SEM (n = 7). Values that have no common superscript letter within the same row are  
16 different by Tukey's test (p<0.05). ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase.

17  
18 In liver, fish fed 3 mL EO kg<sup>-1</sup> diet had higher content of free amino acids than control  
19 group (p<0.05). However, EO treatment did not affect total protein content, the activity of  
20 transaminases, glucose, glycogen, ammonia or lactate levels in liver neither the activity of  
21 digestive enzymes (Table 6).

22

1 Table 6. Metabolic parameters in liver and digestive enzymes of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fed diets containing different  
 2 concentrations of *Cymbopogon flexuosus* EO.

Variable	Essential oil level (mL kg <sup>-1</sup> )		
	0	1	3
Protein (mg g <sup>-1</sup> )	68.5±4.4	69.6±6.6	63.0±6.0
Free amino acids (mmol g <sup>-1</sup> )	128.5±7.3 <sup>b</sup>	138.3±11.8 <sup>ab</sup>	161.4±6.7 <sup>a</sup>
Ammonia (mmol g <sup>-1</sup> )	6.6±1.1	6.4±0.6	7.14±0.4
Glucose (µmol g <sup>-1</sup> )	302.5±29.3	293.2±15.3	343.7±19.0
Glycogen (µmol g <sup>-1</sup> )	174.0±51.8	118.7±25.7	140.8±44.5
Lactate (µmol g <sup>-1</sup> )	4.3±0.3	4.8±0.3	4.7±0.3
ALT (UI g <sup>-1</sup> )	35.2±8.4	30.7±1.9	31.11±3.8
AST (UI g <sup>-1</sup> )	1166.1±105.1	1189.70±73.6	1104.01±99.4
Digestive enzymes			
Trypsin (µmol of TAME min <sup>-1</sup> mg of protein <sup>-1</sup> )	4.8±1.0	5.0±1.5	5.1±0.9
Chymotrypsin (µmol of BTEE min <sup>-1</sup> mg of protein <sup>-1</sup> )	3987.0±294.66	4396.8±439.4	4425.3±297.3

3 Notes: Values are expressed as mean ± SEM (n = 7 per group). Values that have no common superscript letter within the  
 4 same row are different by Tukey's test (p<0.05). ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase.

5

## 6 DISCUSSION

7 Dietary *C. flexuosus* EO supplementation favored muscle deposition instead of  
 8 gonadal tissue development as the lowest dose of EO increased carcass yield and protein  
 9 content of carcass and reduced gonadosomatic index and fat content in the carcass. The  
 10 gonadosomatic index suffers little influence from dietary components like lipids (Coldebella  
 11 et al., 2013) or energy content (Tessaro et al., 2014). In silver catfish, the gonadosomatic  
 12 index is strongly influenced by seasonality and, in both sexes, the gonadosomatic peak  
 13 coincides with testosterone peak (Barcellos et al., 2002). We propose that the decrease in  
 14 gonadosomatic index induced by the lowest dose of EO is likely associated to changes in the  
 15 distribution of testosterone or other sexual hormone caused by the decrease in blood globulin  
 16 levels, which are known to be responsible for regulating bioavailability and concentration of  
 17 steroid hormones in blood (Hammond, 2016). In fact, we detected a significant positive  
 18 association between blood globulin levels and the gonadosomatic index (R=0.448; p<0.05).  
 19 EO had no effect on the activity of intestinal trypsin and chymotrypsin suggesting that  
 20 changes in protein content of carcass were not due to an improvement in protein digestibility.  
 21 Thus, the decrease in gonadosomatic index is probably responsible for lower fat and higher  
 22 protein content of carcass and also for the higher carcass yield. These data demonstrate that  
 23 supplementation of EO in the finisher diet for farmed catfish can increase the proportion of  
 24 tissues of commercial interest, improving the commercial value of fish.

25 Despite the improvement in carcass yield and carcass composition, EO  
 26 supplementation did not change fish growth performance compared to the control group but 1

1 mL EO kg<sup>-1</sup> diet (equivalent to 0.9 g EO kg<sup>-1</sup> diet) increased diet intake compared to the highest EO dose (equivalent to 2.7 g EO kg<sup>-1</sup> diet). Corroborating with these results, Jensen et al. (2015) verified that pure citral (0.3 g kg<sup>-1</sup> diet) had no effect on growth of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed for 30 days. Similarly, dietary supplementation with ginger (*Zingiber officinale*) EO (~40% of citral) at concentrations of 5 g kg<sup>-1</sup> and 10 g kg<sup>-1</sup> diet did not affect the weight gain of Nile tilapia fed for 55 days but 15 g kg<sup>-1</sup> EO decreased weight gain (Brum et al., 2017). These data suggest that high doses of citral-rich EO may impair growth efficiency. Although in the present study both doses of *C. flexuosus* EO did not impair growth performance compared to the control, we did observe lower feed intake in fish fed 3 mL EO kg<sup>-1</sup> when compared to 1 mL EO kg<sup>-1</sup>.

Feeding behavior in some teleosts is influenced by the amino acids profile of feed and the olfactory system is dominant in initiating feeding behavior (Bazáes, Olivares & Schmachtenberg, 2013). EOs are characterized by a strong odor, which may have masked the odor of amino acids and contributed to impair the consumption of the diet containing the highest EO level.

The digestive somatic index was reduced by EO supplementation, contrary to the effect of *L. alba* (Saccol et al., 2013) and *A. triphylla* EOs (Zeppenfeld et al., 2016), which did not affect visceral weight of silver catfish. Despite this decrease, *C. flexuosus* EO did not impair fish weight gain or specific growth rate.

Dietary supplementation with EOs has shown controversial results on fish plasma markers. Diets containing lemon peel and sweet orange peel EO at doses ranging from 3 to 80 g kg<sup>-1</sup> of feed tend to increase plasma proteins and decrease cholesterol, triglycerides and glucose in Nile tilapia (Acar et al., 2015, Baba et al., 2016). However, diets containing *L. alba* EO (0.25 – 2 mL kg<sup>-1</sup>) did not affect plasma variables of silver catfish (Saccol et al., 2013). In the present study, EO supplementation at the lowest dose reduced plasmatic levels of total protein, globulin and triglycerides, whereas the highest dose reduced only total protein levels. The decrease in total protein level in plasma appears to be caused by a decrease in globulin fraction, which includes carrier proteins, enzymes, complement, and immunoglobulins. Most globulins are produced in liver but no impairment in liver function (plasma ALT and AST activity) or kidney function (creatinine levels) was verified. Blood globulin fraction also contains low amount of sex hormone-binding globulin (SHBG), and corticosteroid-binding globulin (CBG), which are proteins responsible for steroid hormones regulation on blood (Hammond, 2016). For a better understanding of EO effect on blood proteins, it is necessary to analyze each fraction in detail.

1           The only change observed in liver metabolites was the increase in free amino acids in  
2 fish that received the highest dietary level of *C. flexuosus* EO. The type of dietary protein  
3 promotes changes in free amino acids and liver enzymes and other enzymes involved in  
4 protein metabolism are also altered (Cai et al., 2015). In the present study, the increase in liver  
5 free amino acids did not seem to be related to changes in dietary protein as all diets had the  
6 same protein level and the activity of digestive proteinase enzymes and hepatic transaminases  
7 were not affected by EO supplementation, indicating that there was no change in protein  
8 digestibility. Some phytoadditives have been shown to improve protein deposition and to  
9 promote protein synthesis increasing liver free amino acids and free amino acids uptake by  
10 muscle in fish (Gabor, Şara & Barbu, 2010). Similar mechanism may be responsible for the  
11 beneficial effects of *C. flexuosus* EO on protein deposition and carcass yield.

12

## 13 **CONCLUSIONS**

14           Dietary supplementation of silver catfish with *C. flexuosus* EO for 20 days showed no  
15 toxic effects for the animals. In addition, EO supplementation at 1 mL kg<sup>-1</sup> diet improved  
16 carcass yield and protein deposition, and therefore can be indicated for diets for the finisher  
17 phase.

18

## 19 **ACKNOWLEDGEMENTS**

20           The authors are grateful to Bio Natural Essenciais (Três Passos, Rio Grande do Sul,  
21 Brazil) for the donation of essential oil and to Nexira (Rouen Cedex, France) for the donation  
22 of material for microencapsulation. This study was supported by the Brazilian Funding  
23 Authority for Research and Projects (FINEP) under grant [CT-AGRO] and Brazilian National  
24 Council for Scientific and Technological Development (CNPq) under grants [552440/2011-6;  
25 301156/2012-3; 307757/2015-3; 306449/2015-3; 309227/2013-5 and INCT-Adapta]. Authors  
26 thank to L. Conte and C.R. Menezes for helping in the preparation of microencapsulated  
27 essential oil, B.B. Loureiro for preparing the water recirculating system, D. Pianesso, T.J.  
28 Adorian, P. Mombach, I.S. Machado, A.F. Scherer, and C.S. Speroni for helping in fish  
29 handling, A.E. Bianchini for helping in blood protein analysis, and B.B. Heinzmann and B.  
30 Baldisserotto for critical reading of the manuscript.

31

## 32 **REFERENCES**

33 Acar, Ü., Kesbiç, O.S., Yılmaz, S., Gültepe, N. & Türker, A. (2015). Evaluation of the effects

- 1 of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia  
2 (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*.  
3 *Aquaculture*, 437, 282–286.
- 4 Al-Mefleh, N.K., Abu, Salah, K.K. & Abandeh, M.M. (2012). Influence of water quality and  
5 harvest times on biomass yield and essential oil of lemon verbena (*Aloysia triphylla*) under a  
6 drip irrigation system. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 18(2), 166-177.
- 7 Alvim, I.D. & Grosso, C.R.F. (2010). Microparticles obtained by complex coacervation:  
8 influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material.  
9 *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(4), 1069-1076.
- 10 AOAC. (2010). *Official methods of analysis*. 18th ed, 3th rev, Gaithersburg MD: Association  
11 of Official Analytical Chemists.
- 12 Asbahani, A.E., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E.H.A., Casabianca, H., ... Elaissari, A.  
13 (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal Pharmaceutics*,  
14 483(1-2), 220-243.
- 15 Baba, E., Acar, Ü., Öntas, C., Kesbiç, OS. & Yılmaz S. (2016). Evaluation of Citrus limon  
16 peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia  
17 *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture*, 465, 13–18.
- 18 Baldisserotto, B., Heinzmann, B.M., Lazzari, R., Lima, R., Silva, D. & Irgang, D. (2015).  
19 Composição veterinária, processo de estimulação de crescimento de peixes, e uso de óleo  
20 essencial. BR Patent 10 2015 020931-2.
- 21 Barcellos, L.J.G, Wassermann, G.F., Scott, A.P., Woehl, V.M., Quevedo, R.M., Ittzes, I., ...  
22 Lulhier, F. (2002). Plasma steroid concentrations in relation to the reproductive cycle of  
23 cultured male *Rhamdia quelen*. *Journal of Fish Biology*, 61(3), 751-763.
- 24 Bazáes, A., Olivares, J. & Schmachtenberg, O. (2013). Properties, projections, and tuning of  
25 teleost olfactory receptor neurons. *Journal of Chemical Ecology*, 39(4): 451–464.
- 26 Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification.  
27 *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 37, 911-917.
- 28 Brum, A., Pereira, S.A., Owatari, M.S., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Mouriño, J.L.P. &  
29 Martins, M.L. (2017). Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia  
30 (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*, 468,  
31 235-243.
- 32 Cai, Z., Li, W., Mai, K., Xu, W., Zhang, Y. & Ai, Q. (2015). Effects of dietary size-  
33 fractionated fish hydrolysates on growth, activities of digestive enzymes and  
34 aminotransferases and expression of some protein metabolism related genes in large yellow

- 1 croaker (*Larimichthys crocea*) larvae. *Aquaculture*, 440: 40–47.
- 2 Coldebella, I.J., Emanuelli, T., Veiverberg, C.A., Pretto, A., Rossato, S., Ferreira, D., ...  
3 Radünz Neto, J. (2013). Effect of different dietary lipid levels on the reproduction of *Rhamdia*  
4 *quelen* (Quoy and Gaimard, 1824). *Aquaculture Nutrition*, 19(5), 751-764.
- 5 Daniel, A.P., Veeck, A.P.L., Klein, B., Ferreira, L.F., da Cunha, M.A., Parodi, T.V., ...  
6 Emanuelli, T. (2014). Using the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton to sedate  
7 silver catfish (*Rhamdia quelen*) during transport improved the chemical and sensory qualities  
8 of the fish during storage in ice. *Journal of Food Science*, 79(6), S1205-1211.
- 9 Daniel, A.P., Ferreira, L.F., Klein, B., Ruviano, A.R., Quatrin, A., Parodi, T.V., ... Emanuelli,  
10 T. (2016). Oxidative stability during frozen storage of fillets from silver catfish (*Rhamdia*  
11 *quelen*) sedated with the essential oil of *Aloysia triphylla* during transport. *Ciência Rural*, 46,  
12 560-566.
- 13 Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. & Smith, S. (1956). Colorimetric method for  
14 determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
- 15 Ferraris, C.J. (2007). Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes),  
16 and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*, 1418, 1-628.
- 17 Gabor, E., Şara, A. & Barbu, A. (2010). The effects of some phytoadditives on growth, health  
18 and meat quality on different species of fish. *Animal Science*, 43(1), 61–65.
- 19 Garcia, L.D.O., Copatti, C.E., Wachholz, F., Pereira Filho, W. & Baldisserotto, B. (2008).  
20 Freshwater temperature in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil, and its implication  
21 for fish culture. *Neotropical Ichthyology*, 6(2), 275-281.
- 22 Garlet, Q.I., Pires, L.C., Silva, D.T., Spall, S., Gressler, L.T., Bürger, M.E., ... Heinzmann,  
23 B.M. (2016). Effect of (+)-dehydrofukinone on GABAA receptors and stress response in fish  
24 model. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 49(1), 1–9.
- 25 Hammond, G.L. (2016). Plasma steroid-binding proteins: Primary gatekeepers of steroid  
26 hormone action. *Journal of Endocrinology*, 230(1), R13–25.
- 27 Harrower, J. & Brown, C. (1972). Blood lactic acid. A micro method adapted to field  
28 collection of microliters samples. *Journal of Applied Physiology*, 32(5), 709-711.
- 29 Hummel, B. (1959). A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin,  
30 and thrombin. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(12), 1393-1399.
- 31 Jensen, L.B., Provan, F., Larssen, E., Bron, J.E. & Obach, A. (2015). Reducing sea lice  
32 (*Lepeophtheirus salmonis*) infestation of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) through  
33 functional feeds. *Aquaculture Nutrition*, 21, 983-993.
- 34 Lowry, O., Rosebrough, N., Lewis, Farr, A. & Randall, R. (1951). Protein measurement with



- 1 the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- 2 Parodi, T.V., Cunha, M.A., Heldwein, C.G., Souza, D.M., Martins, A.C., Garcia, L.O., ...
- 3 Baldisserotto, B. (2012). The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia*
- 4 *alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea,
- 5 Penaeidae), *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C - Pharmacology Toxicology &*
- 6 *Endocrinology*, 155, 462-468.
- 7 Parodi, T.V., Cunha, M.A., Becker, A.G., Zeppenfeld, C.C., Martins, D.I., Koakoski, G., ...
- 8 Baldisserotto, B. (2014). Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and
- 9 effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish,
- 10 *Rhamdia quelen*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(2), 323-334.
- 11 Saccol, E.M.H., Uczay, J., Pês, T.S., Finamor, I.A., Ourique, G.M., Riffel, A.P.K., ...
- 12 Pavanato, M.A. (2013). Addition of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown essential oil to the diet of
- 13 the silver catfish: An analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant
- 14 response. *Aquaculture*, 416-417, 244-524.
- 15 Salbego, J., Toni C., Becker, A.G., Zeppenfeld, C.C., Menezes, C.C., Loro, V.L., ...
- 16 Baldisserotto, B. (in press). Biochemical parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) after
- 17 transport with eugenol or essential oil of *Lippia alba* added to the water. *Brazilian Journal of*
- 18 *Biology*.
- 19 Spies, J.R. (1957). Colorimetric procedures for amino acids. *Methods in Enzymology*, 3, 467-
- 20 477.
- 21 Subasinghe, R., Soto, D. & Jia J. (2009). Global aquaculture and its role in sustainable
- 22 development. *Reviews in Aquaculture*, 1, 2-9.
- 23 Tessaro, L., Toledo, C.P.R., Neumann, G., Krause, R.A., Meurer, F., Natali, M.R.M. &
- 24 Bombardelli, R.A. (2014). Animal performance and reproductive aspects of female *Rhamdia*
- 25 *quelen* fed on different levels of digestible energy. *Aquaculture Research*, 45(9), 1425-1433.
- 26 The World Bank (2013). Fish to 2030: Prospects for fisheries and aquaculture. Agriculture
- 27 and environmental services discussion paper. World Bank report n. 83177-GLB, Washington.
- 28 Valladão, G.M.R., Gallani S.U. & Pilarski, F. (2016). South American fish for continental
- 29 aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 0: 1-19.
- 30 Vaseeharan, B. & Thaya, R. (2013). Medicinal plant derivatives as immunostimulants: an
- 31 alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. *Aquaculture International*
- 32 22(3), 1079-1091.
- 33 Veeck, A.P.L., Klein, B., Ferreira, L.F., Becker, A.G., Heldwein, C.G., Heinzmann, B.M., ...
- 34 Emanuelli, T. (2013). Lipid stability during the frozen storage of fillets from silver catfish

- 1 exposed *in vivo* to the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. *Journal of the Science of*  
2 *Food and Agriculture*, 93, 955–960.
- 3 Veit, J.C., Piccolo, J., Scherer, A.F., Machado, I.S., Peres, M.M., Schwerz, J.P., ... Emanuelli,  
4 T. (in press). Stability of frozen fillets from silver catfish anesthetized with essential oil of  
5 *Lippia alba* prior to electrical stunning or hypothermia. *Journal of Food Processing and*  
6 *Preservation*.
- 7 Verdouw, H., Van Echteld, C. & Dekkers, E. (1978). Ammonia determination based on  
8 indophenol formation with sodium salicylate. *Water Research*, 12(6), 399-402.
- 9 Zambrano, E.L., Buitrago, L.A., Durán, L.A., Sanchez, M.S. & Bonilla, C.R. (2013). Effect of  
10 nitrogen fertilization on essential oil yield and composition in different species and accessions  
11 of *Lippia*. *Acta Agronómica*, 62(6), 131–137.
- 12 Zeppenfeld C.C., Hernández D.R., Santinón J.J., Heinzmann B.M., da Cunha M.A., Schmidt,  
13 D. & Baldisserotto, B. (2016). Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes  
14 growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Aquaculture Nutrition*, 22(4), 933-940.
- 15 Zheljzkov, V.D., Cantrell, C.L., Astatkie, T. & Cannon J.B. (2011). Lemongrass productivity,  
16 oil content, and composition as a function of nitrogen, sulfur, and harvest time. *Agronomy*  
17 *Journal*, 103(3), 805-812

#### 4.4. MANUSCRITO IV

LEMONGRASS (*Cymbopogon flexuosus*) MICROENCAPSULATED ESSENTIAL OIL  
SUPPLEMENTATION ON QUALITY AND STABILITY OF SILVER CATFISH FILLETS  
DURING FROZEN STORAGE

**Manuscrito em fase de revisão para submissão ao periódico Journal of Food Science**  
(Configurado conforme normas da revista)

1 **Microencapsulated lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) essential oil supplementation on**  
2 **quality and stability of silver catfish fillets during frozen storage**

3

4 Cristine Rampelotto<sup>1</sup>, Caroline S. Speroni<sup>1</sup>, Lisiane Conte<sup>1</sup>, Dirleise Pianesso<sup>2</sup>, Isadora S.  
5 Machado<sup>1</sup>, Renata Fritzsche<sup>1</sup>, Natália M. Minuzzi<sup>1</sup>, Taida J. Adorian<sup>2</sup>, Patrícia Mombach<sup>2</sup>,  
6 Bruna Klein<sup>1</sup>, Roger Wagner<sup>1</sup>, Bernardo Baldisserotto<sup>3</sup>, Leila P. da Silva<sup>2</sup>, Berta M.  
7 Heinzmann<sup>4</sup>, Cristiano R. de Menezes<sup>1</sup>, Tatiana Emanuelli<sup>1\*</sup>.

8

9 1. Department of Technology and Food Science, Federal University of Santa Maria,  
10 Santa Maria, RS, Brazil.

11 2. Department of Animal Science, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS,  
12 Brazil.

13 3. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria,  
14 Santa Maria, RS, Brazil.

15 4. Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria,  
16 RS, Brazil.

17 \*Corresponding author: Tatiana Emanuelli

18 Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria,  
19 Avenida Roraima 1000, 97 105-900, Santa Maria, Brazil; Email: tatiana.emanuelli@ufsm.br;  
20 Tel. +55 55 3220 8596.

21

22 **7,024 Words**

23 **Lemongrass essential oil in catfish diet...**

24 **Food chemistry**

25

26 **ABSTRACT:** The effect of fish dietary supplementation with microencapsulated lemongrass  
27 essential oil (EO) was evaluated at doses that are known to increase yield and protein  
28 deposition in the carcass. The aim was to evaluate the physico-chemical properties and  
29 sensory acceptance of fish fillets and their stability during frozen storage. Silver catfish  
30 (*Rhamdia quelen*) were fed diets containing 0, 1 or 3 mL/kg of EO for 20 days, fish were  
31 slaughtered and fillets were stored at -20°C for 12 months. Dietary supplementation with EO  
32 did not affect proximate composition, fatty acid composition or sensory acceptance of fish  
33 fillets. EO constituents (especially citral) were not detected in fish fillets. Fillets from fish  
34 supplemented at 3 mL EO/kg diet had the greatest color changes during frozen storage and  
35 had higher hardness and chewiness by the end of storage. EO supplementation did not protect  
36 against lipid or protein oxidation of fillets during storage. EO supplementation at 1 mL/kg  
37 appear to more suitable to keep physico-chemical changes similar to control during frozen  
38 storage.

39 **Keywords:** *Rhamdia quelen*, citral, lipid oxidation, protein oxidation, texture, color.

40

41 **Practical application:** There is growing interest for using essential oils in fish feed as they  
42 can improve fish health, growth and productive yield but there is little information concerning  
43 to their effect on fish flesh quality and whether oil residues can be found in flesh. The present  
44 study reports how the supplementation with microencapsulated lemongrass essential oil  
45 influences the composition, sensory acceptance and stability during the storage of silver  
46 catfish fillets, besides investigating oil residues in fish flesh.

47

## 48 **Introduction**

49 There is growing interest in using plant essential oils (EOs) in aquaculture, as anesthetics for  
50 fish handling (Cunha and others, 2010a), fish transportation (Becker and others, 2016; Daniel  
51 and others, 2016, 2014; Veeck and others, 2013) or as preslaughter anesthetics (Veit and  
52 others, 2016). In addition, numerous studies propose the use of EOs as additives in fish diet  
53 to improve fish productive performance and promote fish health (Sutuli and others, 2017).  
54 Dietary supplementation with EO has been shown to promote fish growth (Acar and others,  
55 2015; Zeppenfeld and others, 2016), improve fish resistance against pathogenic  
56 microorganisms (Baba and others, 2016) and parasites (Jensen and others, 2015) as well as  
57 their antioxidant status (Diler and others, 2017; Saccol and others, 2013; Zheng and others,  
58 2009). The use of EOs in pre-slaughter procedures, however, raises concern as to the presence  
59 of EO residues in fish flesh.

60 Lemongrass belongs to the *Cymbopogon* genus that includes some grass species with special  
61 interest for EO production (Shah and others, 2011). *Cymbopogon flexuosus* and *Cymbopogon*  
62 *citratus* are widely used in folk medicine due to their citral-rich EO (Avoseh and others,  
63 2015). Both species have been shown to improve animal productive performance, *C. citratus*  
64 EO has been patented as a growth promoter in pigs (Duarte and others, 2014), whereas *C.*  
65 *flexuosus* EO has been patented as a growth stimulant for fish (Baldisserotto and others, 2015).  
66 Moreover, we have recently demonstrated that supplementation of silver catfish (*Rhamdia*  
67 *quelen*) with microencapsulated *C. flexuosus* EO (1 mL EO/kg diet) increases protein  
68 deposition in the carcass and reduces gonadosomatic index improving carcass yield  
69 (Rampelotto and others, in press).

70 However, studies evaluating the impact of dietary EO on flesh quality are still scarce. Thyme  
71 EO and its components have been the most studied ones and had their dietary effects  
72 characterized on physico-chemical, microbiological and sensory characteristics of fish flesh,

73 demonstrating potential to reduce lipid oxidation and to extend the shelf-life in refrigerated  
74 fish (Álvarez and others, 2012; Giannenas and others, 2012; Hernández and others, 2015).  
75 However, there is some controversial data on this topic. Seabream (*Sparus aurata*) fed with  
76 carvacrol-rich thyme EO had lower lipid oxidation at 14 days of refrigerated storage (Álvarez  
77 and others, 2012; Hernández and others, 2015) whereas the same dose of thymol-rich thyme  
78 EO had no effect (Álvarez and others, 2012). Conversely, in rainbow trout (*Oncorhynchus*  
79 *mykiss*) dietary supplementation with carvacrol had no effect on lipid oxidation, whereas  
80 thymol reduced lipid oxidation after 5 days of storage at 4°C (Giannenas and others, 2012).  
81 Although lemongrass EO directly applied to processed seafood products has been shown to  
82 delay microbiological deterioration and lipid oxidation (Ahmad and Viljoen, 2015; Masniyom  
83 and others, 2012), the effect of dietary supplementation with microencapsulated lemongrass  
84 EO on the quality of fish flesh has not been explored yet.

85 Silver catfish (*Rhamdia quelen*) is a freshwater fish endemic from Central to South America  
86 that plays an important role for aquaculture in subtropical areas in Argentina, Uruguay and  
87 Brazil (Valladão and others, 2016). It is well adapted to a wide range of temperatures including  
88 the low winter water temperatures (Garcia and others, 2008).

89 The objective of this study was to evaluate the effect of dietary supplementation with *C.*  
90 *flexuosus* EO during the termination stage on quality and stability of catfish fillets during  
91 frozen storage and to determine whether residues of EO constituents can be found in fish  
92 fillets.

93

## 94 **Material and Methods**

95

96 Essential oil

97 The EO of *C. flexuosus* used in this study was supplied by Bio Natural Essenciais (Três  
98 Passos, Rio Grande do Sul, Brazil). To prevent degradation of EO it was microencapsulated  
99 by complex coacervation using arabic gum and gelatin (1:1, w/w) as wall material (Alvim and  
100 Grosso, 2010) followed by lyophilization. The amount of EO contained in the microcapsules  
101 (about 365 mL/kg) was assessed by hydrodistillation using a Clevenger apparatus.

102 The chemical composition of essential oil (Table 1) was assessed using an Agilent 6890 gas  
103 chromatograph (GC) coupled to a mass spectrometry detector (MS) Agilent 5973 with a HP5-  
104 MS column (5% phenyl, 95% methylsiloxane, 30 m x 0.25 mm ID × 0.25 µm) (Garlet and  
105 others, 2016). The EO constituents were identified by comparison of the retention index and  
106 mass spectra with databases. EO constituents were quantified by gas chromatography with  
107 flame ionization detection (FID) on an Agilent 7890A GC (Figure 1A) and expressed as  
108 percentage based on peak area normalization.

109

#### 110 Diets

111 A basal (control) diet containing 34% of protein, 9% of fat and 1345 kJ/100 g was formulated  
112 (Table 2) and supplemented with 1 or 3 mL/kg of *C. flexuosus* EO. The ingredients were  
113 manually homogenized, pelletized (6 mm) and then dried at 45°C in an air flow oven for 24 h.  
114 After drying, diets were stored at -18°C.

115

#### 116 Fish treatment

117 Silver catfish (*Rhamdia quelen*) from both sexes (initial weight approximately 400 g; initial  
118 length approximately 35 cm) were obtained from a local fish-farming (Santa Maria-RS,  
119 Brazil) and transported to the Laboratory of Fisheries from Federal University of Santa Maria  
120 in oxygenated water tanks. Fish were weighed and randomized into 21 tanks (270 L) with six  
121 fish per tank. Tanks were connected to a water recirculating system with two biological filters,



122 an activated carbon filter and a 2000-L water reservoir equipped with heating system. During  
123 the experimental period water was maintained as follows:  $21.3\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ,  $8.5\pm 0.5$  mg of dissolved  
124 oxygen/L;  $0.32\pm 0.03$  mg of  $\text{NH}_3$ /L and  $0.17 \pm 0.03$  mg/L of  $\text{NO}_2$ .

125 Animals were fed the experimental diets twice a day (8:00 a.m. and 4:00 p.m.) to apparent  
126 satiation for 20 days. Apparent consumption of diet per tank was daily registered and used to  
127 calculate the amount of EO consumed/kg of fish/day. At the end of the experimental period,  
128 fish were fasted for 24 h and euthanized by spinal cord section. Fish were eviscerated, the  
129 skin was removed with pliers and fillet was removed with a cut perpendicular to the spine  
130 from the gills to the caudal fin. The fillets without bones and without skin were frozen at -  
131  $18^{\circ}\text{C}$ . All procedures were approved by the Ethical Committee on Animal Use from Federal  
132 University of Santa Maria (protocol number 120/2014).

133

#### 134 Proximate composition

135 Proximate composition was evaluated in fish fillets using four repetitions per treatment.  
136 Moisture content was obtained after oven-drying at  $105^{\circ}\text{C}$  until a constant weight (AOAC,  
137 2005). Ash content was determined at  $550^{\circ}\text{C}$  (AOAC, 2005). Crude protein was determined  
138 by the micro Kjeldahl method ( $\text{N} \times 6.25$ ) (AOAC, 2005). Fat content was gravimetrically  
139 determined (Bligh and Dyer, 1959).

140

#### 141 Fatty acid composition

142 Fat was extracted from fish fillets (Bligh and Dyer, 1959), esterified (Hartman and Lago,  
143 1973) and then, fatty acid methyl esters were extracted with hexane and determined using an  
144 Agilent Technologies HP 6890 GC/FID with a capillary column (DB-23, 60 m x 0.25 mm ID  
145  $\times 0.25$   $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies). The injection and detection temperature was  $250^{\circ}\text{C}$  and  
146 nitrogen was used as carrier gas (0.3 mL/min). After the injection (1  $\mu\text{L}$ , split ratio 50:1),

147 column temperature was kept at 160°C for 4 min. Thereafter the temperature was raised to  
148 240°C at a rate of 4°C/min and maintained for 8 min. Fatty acid methyl esters standards  
149 (FAME Mix 37, Sigma) were analyzed under the same conditions, and their retention times  
150 were used for identification of fatty acids. The content of each fatty acid was expressed as  
151 percentage of total fatty acids identified.

152

### 153 Sensory evaluation of cooked fish fillets

154 The acceptability attributes of cooked fillets were evaluated by a panel of 41 untrained judges  
155 recruited in the Center of Rural Sciences at the Federal University of Santa Maria. Sensory  
156 evaluation was conducted in individual booths under cool white fluorescent light. Samples  
157 were cooked individually in a microwave oven (20 g/1 min), without salt, wrapped in  
158 greaseproof paper, coded and randomly offered to the judges in white plastic plates. Room  
159 temperature water and crackers were offered to the judges to clean the palate between samples.  
160 Panelists judged color, odor, taste and texture of samples using a nine-point hedonic scale (1 -  
161 greatly dislike; 9 - greatly like) (Meilgaard and others, 2006). The protocol for this study was  
162 approved by the Research Ethics Committee of Federal University of Santa Maria (CAAE  
163 36317414.3.0000.5346).

164

### 165 Fillet quality during frozen storage

166 Immediately after filleting, fillets were packed in polystyrene trays, covered with polyvinyl  
167 chloride film and stored at -18°C for 12 months. Instrumental color, instrumental texture, pH,  
168 lipid oxidation and protein oxidation were evaluated every three months in fillets from 4  
169 independent fish per treatment at each time point, totalizing 60 fillets

170

171 **Instrumental color.** Fillet color was assessed in the visceral side of fillets using a Minolta®  
 172 CM-700d (Konica Minolta Sensing Americas Inc., Ramsey, New Jersey, USA), with a  
 173 standard illuminant D65 and 2° observation angle. Reflectance measurement mode was used  
 174 and specular component was included (SCI). The measurement was of 3 mm (SAV mask).  
 175 Four fillets per treatment were evaluated at each storage point. Four color measurements were  
 176 performed directly on each sample in distinct points along the fillet. The average of the four  
 177 measurements represented the value of each repetition. The CIELAB coordinates L\*, a\* and  
 178 b\* were obtained and used to calculate chroma (C\*), hue angle (h\*) and the numerical total  
 179 color difference ( $\Delta E$ ) between fish fillets at 0 and 12 months as follows:

$$180 \quad C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

$$181 \quad h^* = \tan^{-1} \left\{ \frac{a^*}{b^*} \right\}$$

$$182 \quad \Delta E_{0-12} = [(L^*_{12} - L^*_0)^2 + (a^*_{12} - a^*_0)^2 + (b^*_{12} - b^*_0)^2]^{1/2}$$

183 **pH and water holding capacity.** Flesh pH was measured on homogenates of sample and  
 184 distilled water (1:10; w/v) using Bel W3B (Bel Engineering, Monza, Italy) pH-meter. The  
 185 water holding capacity (WHC) was determined by centrifuging 2.5 g of grounded samples at  
 186  $3500 \times g$  for 15 min in 50 mL tubes. After centrifugation the supernatant was discarded and  
 187 samples were weighed again. WHC was expressed as the percentage of water retained in  
 188 sample using the sample moisture as a reference.

189 **Instrumental texture.** Instrumental texture was determined in a TA-Xt.plus Texture  
 190 Analyzer equipped with a Texture Expert Exponent Software (Stable Microsystems, Surrey,  
 191 England) and a 36-mm cylindrical probe. Fish fillets were fractionated into 10 x 10 mm  
 192 portions. Texture measurement was performed by compressing samples to 60% of their  
 193 original height in two consecutive compression trials at a constant rate of 1 mm/s with 15 s  
 194 interval between trials. Pretest, post-test and head speed were set at 1 mm/s, 5.0 mm/s and 5.0

195 mm/s, respectively. Data of compressions were used to calculate hardness, springiness,  
196 cohesiveness and chewiness of samples (Bourne, 1978).

197 **Volatile compounds in fish fillets.** Volatile compounds of fish fillets were isolated by solid  
198 phase microextraction (SPME) using a fiber polar phase sorbent  
199 (divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane, Supelco, 50/30  $\mu\text{m}$ ). Fillets were ground and  
200 a 5-g sample was placed into a 20-mL vial that was sealed with PTFE septum and heated to  
201 35°C during 15 min to release volatile compounds. Thereafter, volatile compounds were  
202 extracted at 35°C by exposing the fiber in the headspace of the sample during 45 min. Three  
203 fillets for each treatment were examined in each point of analysis (Zepka and others, 2013).

204 Analysis was conducted in a GC/MS QP-2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).  
205 SPME fiber volatile compounds were thermally desorbed in a split/splitless injector operating  
206 in splitless mode for 1 min (split ratio 30:1) at 250°C. The carrier gas was nitrogen at a  
207 constant pressure of 30 psi. Compounds were separated by using a capillary column of fused  
208 silica polar phase, CP-WAX 52 CB (Varian Chrompack, USA; 50 m  $\times$  0.25 mm ID  $\times$  0.25  
209  $\mu\text{m}$ ). Oven temperature was set 35°C for 2 min, then heated to 80°C at 2°C/min, then heated  
210 to 150°C at 4°C/min and then 230°C at 8°C/min. The interface between the GC and MS, as  
211 well as the ionization source were maintained at 230°C. The quadrupole mass analyzer was  
212 operated in scan mode monitoring the masses 35-350 u.m.a. The identification of  $\alpha$ -citral  
213 (geranial) and  $\beta$ -citral (neral) were done by comparing the experimental mass spectra and  
214 linear retention indices with authentic standard.

215 **Lipid oxidation.** The lipid oxidation of fillets was assessed by monitoring the levels of  
216 conjugated dienes (CD), peroxide value (PV) and formation of hexanal. CD and PV were  
217 evaluated in the fat extracted with chloroform and methanol according to Bligh and Dyer  
218 (1959). Fat was diluted in cyclohexane and its optical density at 233 nm was used to evaluate  
219 CD value (Recknagel and Glende, 1984). PV was determined using the ferric thiocyanate

220 method at 500 nm (Chapman and Mackay, 1949), which is based on the ability of peroxides  
221 to oxidize ferrous ions to ferric ions.

222 Hexanal was isolated from fish fillets and analyzed as described for the analysis of volatile  
223 compounds in fish fillets except that the identification of hexanal was done by comparing the  
224 experimental mass spectra and linear retention indices with the literature.

225 **Protein oxidation.** Protein oxidation of fillets was assessed by determining total reduced  
226 sulfhydryl groups (SH) and protein carbonyl (PC) content. Fillets were homogenized with  
227 phosphate buffered saline (1:4, w/v) for both determinations. SH content was determined at  
228 412 nm after reaction with 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (Ellman, 1959). Cysteine was  
229 used to construct the standard curve. PC content was determined at 370 nm using 2,4-  
230 dinitrophenylhydrazine (Levine and others, 1990) and normalized to the protein content. Total  
231 protein was determined at 625 nm after reaction with Folin Ciocalteu and using bovine serum  
232 albumin as standard (Lowry and others, 1951).

233

#### 234 Statistical Analysis

235 Levene's test was performed to check the homogeneity of variances for all data. Consumption,  
236 flesh composition, fatty acids profile and total color difference data were analyzed by one-  
237 way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. Data from sensory analysis was  
238 analyzed by the non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA.

239 The data obtained from fillets during storage was analyzed by a two-way ANOVA (diet  
240 treatment x storage time) followed by Tukey's test. Significance level was set at  $p < 0.05$ .

241 Pearson's test was used to evaluate the correlation between variables assessed during storage.

242 All data were analyzed using the package Statistica 9.0 (Copyright Stat Soft, Inc, Tulsa, USA).

243

244

## 245 **Results**

### 246 Fillet composition and sensory analysis

247 Fish diet supplementation at 1 and 3 mL of *C. flexuosus* EO/kg diet yielded an average daily  
248 intake of 8 and 28  $\mu\text{L}$  of *C. flexuosus* EO/kg body weight respectively. No significant  
249 difference in fillet proximate composition (Table 3) was observed among treatments. Fish  
250 fillets had an average composition of 76.9% moisture, 18.5% protein, 3.5% fat and 1.2% ash.  
251 Dietary supplementation with EO did not modify the fatty acid composition of fillets (Table  
252 4). The most abundant fatty acids in the fillets were oleic acid (C 18:1n9), palmitic acid  
253 (C16:0) and linoleic acid (C18:2n6) (>10%). Monounsaturated (MUFA), polyunsaturated  
254 (PUFA) and saturated (SFA) fatty acids amounted to 45, 23 and 32% of total identified fatty  
255 acids of fillets.

256 The sensory acceptance (Table 3) of fish fillets was similar for all treatments. Fillet texture  
257 was rated at 8 points in the hedonic scale (Really like), whereas color, odor and taste were  
258 rated at 7 points (Moderately like). Accordingly, no traces of geranial or neral, which are the  
259 major constituents of *C. flexuosus* EO were detected in fish fillets (Figure 1B).

260

### 261 Fillet stability during frozen storage

262 ANOVA demonstrated an interaction between time and treatment for L\*, b\* and C\* color  
263 coordinates ( $p < 0.05$ ), whereas a\* and h\* values were not affected by diet or storage time  
264 (Table 5). In the start of storage, fillets from fish that received 3 mL EO/kg diet exhibited  
265 lower L\* values than the other treatments. During storage, fillets from control and 1 mL  
266 EO/kg diet showed constant L\* values, while those from fish that received 3 mL EO/kg diet  
267 had a linear increase in luminosity along the storage ( $p < 0.05$ ).

268 Coordinates b\* and C\* increased up to the 3<sup>rd</sup> month of storage in fillets from fish that  
269 received 1 and 3 mL EO/kg diet. Control fillets showed significant increase of b\* and C\*

270 values only in the 6<sup>th</sup> month of storage. Dietary supplementation with 3 mL EO/kg diet  
271 yielded the greatest color change of fillets during storage ( $\Delta E_{0-12 \text{ months}}$ : 10.4) compared to  
272 control and 1 mL EO/kg diet (Figure 2A).

273 There was no significant effect of diet on the pH of fillets (Figure 2B) that were only affected  
274 by the storage time. The initial pH value of fillets was 6.36 and this value was reduced in the  
275 3<sup>rd</sup> month of storage and thereafter increased reaching its maximum value at the 9<sup>th</sup> month of  
276 storage (6.68). The WHC of fillets was also affected by the storage time ( $p < 0.05$ ) but diet had  
277 no effect (Figure 2C). The initial WHC was 96% and it was reduced to 93% in the 6<sup>th</sup> month  
278 of storage and maintained this value until the end of storage.

279 Texture was evaluated by hardness, springiness, cohesiveness and chewiness (Table 6).  
280 Cohesiveness and springiness were affected by the storage time independent of dietary  
281 treatment. Cohesiveness showed a small increase during the storage period, whilst the  
282 springiness showed a small reduction (10% of initial time) in the end of storage. ANOVA  
283 revealed factorial diet treatment x time interaction for hardness and chewiness, which were  
284 reduced up to the 6<sup>th</sup> month and then increased until the end of storage. The increase in  
285 hardness and chewiness was more accentuated for fillets from fish that received 3 mL EO/kg  
286 diet, yielding higher hardness (at 9 and 12 months) and chewiness values (at 12 months) at the  
287 end of storage compared to the two other treatments.

288 Protein oxidation was assessed by the decrease of SH groups (Figure 3A) and formation of PC  
289 (Figure 3B). ANOVA revealed just effect of time on SH values, which decreased in all  
290 samples at the 12<sup>th</sup> month of storage (27% of initial time) ( $p < 0.05$ ). There was a significant  
291 diet treatment x storage time interaction on PC content ( $p < 0.05$ ). PC content showed a bell-  
292 shaped behavior during storage but fillets from fish fed 3 mL EO/kg diet had delayed peak  
293 values (at 9 months of storage) compared to fillets from control and 1 mL EO/diet (at 6  
294 months), showing higher PC content than the other groups at 9 months of storage ( $p < 0.05$ ).

295 Lipid oxidation was evaluated by the formation of CD (Figure 3C), PV (Figure 3D) and  
296 hexanal (Figure 3E). ANOVA revealed only effect of time on PV and a significant diet  
297 treatment x storage time interaction on CD and hexanal content. PV had a slight reduction  
298 during storage for all treatments. CD had a bell-shaped behavior with peak values at the 9<sup>th</sup>  
299 month for all groups, but at the end of storage fillets from fish supplemented with EO had  
300 lower values of CD when compared to control ( $p<0.05$ ). Hexanal content, which was very  
301 low at the start of storage, was increased for all groups along the storage ( $p<0.05$ ). Although  
302 at 3 months of storage the content of hexanal was lower in fillets from fish that received EO  
303 than in control ( $p<0.05$ ), fillets from fish that received 1 mL EO/kg diet had faster increase in  
304 hexanal content thereafter, yielding higher hexanal content than the other groups at 9 months  
305 of storage ( $p<0.05$ ; Figure 3-E).

306

## 307 **Discussion**

308 Fillet composition was not affected by EO supplementation. Proximate composition of silver  
309 catfish fillets was similar to that found in other studies (Veit and others, 2016; Weber and  
310 others, 2008). Oleic acid, palmitic acid and linoleic acid were the most abundant fatty acids in  
311 silver catfish fillets as previously reported (Weber and others, 2008).

312 The sensory acceptance of fish fillets, assessed by texture, color, odor and taste attributes, was  
313 not affected by dietary supplementation with EO. The EO used in this study is mostly  
314 composed by citral in its two isomeric forms, geranial (45.7%) and neral (32.1%). Citral has  
315 high odorific power, being able to be detected by human olfactory system at concentrations  
316 below 15 ppm (Plotto and others, 2004). Therefore, low amounts of citral deposited in fish  
317 fillets could have a negative impact on fillet flavor as previously reported after fish anesthesia  
318 with clove oil (Cunha and others, 2010). However, analysis of the volatile profile of fish  
319 fillets revealed no traces of  $\alpha$  and  $\beta$ -citral (Figure 1B). Accordingly, sensory analysis of fish



320 fillets revealed no differences in the acceptance among treatments. EO components like citral  
321 have been shown to be rapidly excreted from mammals (Diliberto and others, 1990) and  
322 insects (Tak and Isman, 2016) but this is the first study in fish. Fish volatile profile and  
323 sensory acceptance data indicate that dietary supplementation of adult fish with EO does not  
324 yield the accumulation of EO components in catfish muscle at sufficient amounts to be  
325 detected. Studies have already shown that dietary supplementation with thyme EO during 84  
326 (Hernández and others, 2015) and 105 days (Álvarez and others, 2012) improved sensory  
327 acceptance of refrigerated seabream. Anesthesia with *Lippia alba* EO did not affect the  
328 perception of taste and odor in fillets of silver catfish (Cunha and others, 2010b), whereas  
329 clove EO used as sedative in silver catfish impaired the acceptance of fillets taste (Cunha and  
330 others, 2010), suggesting the high intensity of residual volatile compounds of clove OE may  
331 negatively affect sensory acceptance of fish fillets. Meat sensory perception was not affected  
332 by dietary supplementation with a blend of thyme, rosemary, oreganum EO in pigs (Yan and  
333 others, 2010) and oregano EO in chicken (Symeon and others, 2009).

334 Silver catfish flesh has low color saturation tending to a grayish color at the start of storage  
335 but had a marked increase in  $b^*$  and  $C^*$  values along the storage, which indicates that fillets  
336 were getting yellowish and had increased color saturation over time (Pathare and others,  
337 2013). This increase of fillet yellowness during prolonged frozen storage has been reported in  
338 other studies (Veeck and others, 2013; Veit and others, 2016). Although lipid oxidation has  
339 been pointed as the cause of color changes in fish muscle (Thanonkaew and others, 2006), in  
340 the present study markers of primary lipid oxidation, CD and PV, appear to be unrelated to  
341 color changes, whereas hexanal was positively correlated with  $L^*$  ( $R = 0.423$ ;  $p < 0.01$ ),  $b^*$  ( $R$   
342  $= 0.420$ ;  $p < 0.01$ ) and  $C^*$  ( $R = 0.441$ ;  $p < 0.01$ ). The increase in yellowing during storage can  
343 also be related to the protein oxidation because products of protein oxidation, as carbonyl  
344 compounds, in complex food systems, interact with numerous food components and can

345 undergo Maillard reaction (Estévez 2011) which produces colorless, yellow and reddish to  
346 brown compounds that promote a progressive color change (Rizzi 1997).

347 The numerical total color difference ( $\Delta E_{0-12 \text{ months}}$ ) indicates the intensity of color change in  
348 fillets between the start and the end of storage. Samples of control and 1 mL EO/kg groups  
349 had evident color change along the storage ( $\Delta E$  3-6) but this change was twice greater for  
350 fillets from fish fed 3 mL EO/kg diet compared to the other fillets and the change of color of  
351 this group is classified as very clearly perceptible ( $\Delta E$  6-12) (Prändl and others, 1994). These  
352 data suggest that supplementation with EO at the highest level could negatively impact color  
353 of fillets by the end of storage, although sensory acceptance of fillets has not been evaluated  
354 along the storage.

355 Hardness and chewiness of fish fillets decreased up to the 6<sup>th</sup> month of storage and then  
356 increased until the end of storage. Such behavior has already been described for fillets of Nile  
357 tilapia (Subbaiah and others, 2015). The activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated ATPases has been shown  
358 to be reduced in fish flesh along the first months of frozen storage indicating progressive  
359 degradation of myofibrillar proteins (Ganesh and others, 2006), which could explain the flesh  
360 softening. Protease activity has been suggested to underlie the degradation of myofibrillar  
361 proteins (Subbaiah and others, 2015). However, protein oxidation leads to the occurrence of  
362 intra and intermolecular cross-linking of meat proteins followed by protein polymerization,  
363 which have been implicated in the increase of meat hardness (Kim and others, 2010). The  
364 oxidation of protein thiol groups is the mainly responsible for cross-links through the  
365 formation of disulphide bonds (Lund and others. 2011). In the present study, the content of  
366 SH reached the lowest level by 12 months of storage, indicating ideal conditions for protein  
367 cross-linking. In addition, the thiol content demonstrated an inverse correlation with hardness  
368 ( $R = -0.531$ ;  $p < 0.01$ ). Thus, protein oxidation is likely implicated in the increase of fillets  
369 hardness, which reached the peak value at 12 months of storage. Moreover, fillets from fish

370 that received 3 mL EO/kg diet had higher protein oxidation and were firmer than control at 9-  
371 12 months of storage, which indicates greater changes in the protein structure of such fillets,  
372 even though the WHC did not differ among treatments. The parallel behaviour of increased  
373 firmness and protein oxidation, reinforces the hypothesis that the first change was underlined  
374 by oxidative changes that lead to protein aggregation/polymerization.

375 pH value is closely linked to physical characteristics of meat such as color and texture  
376 (Andrés-Bello and others, 2013), however the greater color instability and final hardness of  
377 fillets from fish fed 3 mL EO/kg diet were not associated to differences in the flesh pH. The  
378 highest PC content of fillets from fish fed 3 mL EO/kg diet in the 9<sup>th</sup> month of storage reveals  
379 more substantial protein oxidation compared to the other samples. Frozen storage causes  
380 disruption of muscle tissue due to ice formation and increase in salt concentration of unfrozen  
381 phase. Such events contribute to protein denaturation and exposure of hydrophobic protein  
382 residues in frozen fish. In addition, the oxidation of SH groups leads to protein polymerization  
383 through disulfhyde bond formation. Thiol oxidation along with other mechanisms of protein  
384 denaturation has been associated with physicochemical changes in fish meat (Benjakul and  
385 others, 2003). Besides that, protein carbonyls can affect protein functionality causing, among  
386 other consequences, tenderness decrease and color change in meat (Estévez, 2011).

387 Both *C. flexuosus* EO and citral, present *in vitro* antioxidant activity and this activity varies  
388 depending on EO concentration (Chandra and Ah, 2014). In the present study  
389 supplementation with EO did not protect against lipid (CD, PV and hexanal) or protein  
390 oxidation (SH and PC) of silver catfish fillets, except in the 3<sup>rd</sup> month, when EO treatments  
391 had lower hexanal content than control. However, in the 9<sup>th</sup> month of storage fillets from fish  
392 supplemented with EO had higher content of hexanal (1 mL EO/kg diet) and PC (3 mL EO/kg  
393 diet) than control. Hexanal is a volatile compound originating from the oxidative degradation  
394 of linoleic acid (Shahidi and Pegg 1994) and can be used as an indicator of fish quality (Secci

395 and Parisi 2016). PC originates from direct metal-catalyzed oxidation of the side-chains of  
396 some amino acid residues (proline, arginine, lysine or threonine) or by amino acid reaction  
397 with reactive aldehydes derived from fatty acid oxidation (Maisonneuve and others, 2009). In  
398 fact, the present study reveals a significant positive interaction (0.384;  $p < 0.01$ ) between the  
399 contents of hexanal and PC. Thus, it is possible to infer that different doses of EO act by  
400 distinct paths in the frozen fillet during storage. While the lowest dose of *C. flexuosus* EO  
401 appears to cause a slight increase in lipid oxidation, the highest one slightly increased protein  
402 oxidation after long frozen storage. The impact of such increase on fish shelf life and the  
403 mechanisms that underlie such effects deserve further investigation.

404 Lemongrass EO has been recently shown to up-regulate the expression of heat shock proteins  
405 in canine hepatocyte cell culture (Zhang and others, 2015). Heat shock proteins are known to  
406 be upregulated in fish muscle as a response to protein denaturation (Kayhan and Duman,  
407 2010), oxidative stress and depletion of endogenous antioxidants (Sahin and others, 2014).  
408 However, our lipid and protein oxidation data immediately after slaughtering (time zero) do  
409 not support the hypothesis that *C. flexuosus* EO caused *in vivo* oxidative stress.

410

## 411 **Conclusion**

412 Dietary supplementation with *C. flexuosus* EO does not affect the composition or sensory  
413 acceptability of catfish fillets and does not leave citral residues in the fillets. However, fillets  
414 from fish fed 3 mL EO/kg diet had greater color changes during frozen storage and higher  
415 firmness by the end of storage than control fillets, which appear to be caused by greater  
416 protein oxidation.

417

418

419

**420 Acknowledgements:**

421 The authors are grateful to Bio Natural Essenciais (Três Passos, Rio Grande do Sul, Brazil)  
422 and to Nexira (Rouen Cedex, France) for the donation of material for microencapsulation. The  
423 authors thank to Carlos Rubini Jr. for technical assistance in the fatty acid analysis. This  
424 study was supported by the Brazilian Funding Authority for Research and Projects (FINEP)  
425 under grant [CT-AGRO] and Brazilian National Council for Scientific and Technological  
426 Development (CNPq) under grants [552440/2011-6; 301156/2012-3; 307757/2015-3;  
427 306449/2015-3; 309227/2013-5 and INCT-Adapta].

428

**429 Author Contributions**

430 C. Rampelotto conducted the experiments, collected data, analyzed and interpreted the  
431 results and wrote the manuscript. T. Emanuelli, B. Baldisserotto and L.P. da Silva guided the  
432 experimental design, provided funds and structure for experiment and helped in the the  
433 interpretation of data and revising the manuscript. C.S. Speroni, L. Conte, D. Pianesso I.S.  
434 Machado, R. Fritzsche, N.M Minuzzi, T.J. Adorian, P. Mombach, B. Klein and R. Wagner  
435 collected test data and collaborated with the experimental management of fish. B.M.  
436 Heinzmann, C.R. de Menezes characterized the essential oil and microcapsules. All of the  
437 authors contributed to the interpretation and discussion of the results related to their part of  
438 the study and approved the final version of the paper.

439

**440 References**

441 Acar Ü, Kesbiç OS, Yılmaz S, Gültepe N, Türker A. 2015. Evaluation of the effects of  
442 essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia  
443 (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*.  
444 Aquaculture 437: 282–286.

445 Ahmad A, Viljoen A. 2015. The in vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon*  
446 *essential* oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. *Phytomedicine* 22: 657–665.

447 Álvarez, A, García B., Jordán MJ, Martínez-Conesa C, Hernández MD. 2012. The  
448 effect of diets supplemented with thyme essential oils and rosemary extract on the  
449 deterioration of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during storage on ice. *Food Chem.*  
450 132: 1395–1405.

451 Alvim ID, Grosso CRF. 2010. Microparticles obtained by complex coacervation:  
452 influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material.  
453 *Ciência e Technol. Aliment.* 30: 1069–1076.

454 Andrés-Bello A, Barreto-Palacios V, García-Segovia P, Mir-Bel J, Martínez-Monzó J.  
455 2013. Effect of pH on color and texture of food products. *Food Eng. Rev.* 5: 158–170.

456 AOAC, 2005. Official methods of analysis. 18th ed. Gaithersburg: Association of  
457 Official Analytical Chemists.

458 Avoseh O, Oyedeji O, Rungqu P, Nkeh-Chungag B, Oyedeji A. 2015. *Cymbopogon*  
459 *species*; ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance. *Molecules*  
460 20: 7438–7453.

461 Baba E, Acar Ü, Öntas C, Kesbiç OS, Yılmaz S. 2016. Evaluation of *Citrus limon*  
462 *peels* essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia  
463 *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture* 465: 13–18.

464 Baldisserotto B, Heinzmann B, Lazzari R, Lima R, Silva D, Irgang D, inventors. 2015.  
465 *Composição veterinária, processo de estimulação de crescimento de peixes, e uso de óleo*  
466 *essencial*. BR Patent 10 2015 020931 2.

467 Becker AG, Parodi T V, Zeppenfeld CC, Salbego J, Cunha MA, Heldwein CG, Loro  
468 VL, Heinzmann BM, Baldisserotto B. 2016. Pre-sedation and transport of *Rhamdia quelen* in

469 water containing essential oil of *Lippia alba*: metabolic and physiological responses. Fish  
470 Physiol. Biochem. 42: 73–81.

471 Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification.  
472 Can. J. Physiol. Pharmacol. 37: 911–917.

473 Bourne M., 1978. Texture profile analysis. Food Technol. 32: 62–66.

474 Chandra H, Ah AF. 2014. Lipoxygenase inhibitory, antioxidant, and antimicrobial  
475 activities of selected essential oils. Asian J. Pharm. Clin. Res. 7: 79–83.

476 Chapman RA, Mackay K. 1949. The estimation of peroxides in fats and oils by the  
477 ferric thiocyanate method. J. Am. Oil Chem. Soc. 26: 360–363.

478 Cunha MA, Zeppenfeld CC, Garcia LO, Loro VL, Fonseca MB, Emanuelli T, Veeck  
479 APL, Copatti CE, Baldisserotto B. 2010. Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of  
480 induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. Ciência Rural 40: 2107–2114.

481 Cunha MA, Barros, FMC, Garcia LO, Veeck APL, Heinzmann BM, Loro VL,  
482 Emanuelli T, Baldisserotto B. 2010a. Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver  
483 catfish, *Rhamdia quelen*. Aquaculture 306: 403–406.

484 Daniel AP, Ferreira LF, Klein B, Ruviaro AR, Quatrin A, Parodi TV, Zeppenfeld CC,  
485 Heinzmann BM, Baldisserotto B, Emanuelli T. 2016. Oxidative stability during frozen storage  
486 of fillets from silver catfish (*Rhamdia quelen*) sedated with the essential oil of *Aloysia*  
487 *triphylla* during transport. Ciência Rural 46: 560–566.

488 Daniel AP, Veeck APL, Klein B, Ferreira LF, Cunha MA, Parodi TV, Zeppenfeld CC,  
489 Schmidt D, Caron BO, Heinzmann BM, Baldisserotto B, Emanuelli T. 2014. Using the  
490 essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton to sedate silver catfish (*Rhamdia quelen*)  
491 during transport improved the chemical and sensory qualities of the fish during storage in ice.  
492 J. Food Sci. 79: S1205-1211.

493 Diler O, Gormez O, Diler I, Metin S. 2017. Effect of oregano (*Origanum onites* L.)  
494 essential oil on growth, lysozyme and antioxidant activity and resistance against *Lactococcus*  
495 *garvieae* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac. Nutr.* 23: 844-851.

496 Diliberto JJ, Srinivas P, Overstreet D, Usha G, Burka LT, Birnbaum LS. 1990.  
497 Metabolism of citral, an alpha, beta-unsaturated aldehyde, in male F344 rats. *Drug Metab.*  
498 *Dispos.* 18: 866–875.

499 Duarte MCT, Figueira GM, Foglio MA, Rodrigues RA, Coraucci Neto D, Ruiz ALTG,  
500 Carvalho JE, inventors. 2014. Essential oil microparticles and uses thereof for preventing  
501 enteric diseases. International patent application WO/2014/028999; PCT/BR2013/000324.  
502 WO/2014/028999.

503 Ellman GL. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70–77.

504 Estévez M. 2011. Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Sci.* 89: 259–279.

505 Ganesh A, Dileep AO, Shamasundar BA, Singh U. 2006. Gel-forming ability of  
506 common carp fish (*Cyprinus carpio*) meat: Effect of freezing and frozen storage. *J. Food*  
507 *Biochem.* 30: 342–361.

508 Garcia LDO, Copatti CE, Wachholz F, Pereira Filho W, Baldisserotto B. 2008.  
509 Freshwater temperature in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil, and its implication  
510 for fish culture. *Neotrop. Ichthyol.* 6: 275–281.

511 Garlet QI, Pires LC, Silva DT, Spall S, Gressler LT, Bürger ME, Baldisserotto B,  
512 Heinzmann BM. 2016. Effect of (+)-dehydrofukinone on GABAA receptors and stress  
513 response in fish model. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 49: 1–9.

514 Giannenas I, Triantafyllou E, Stavrakakis S, Margaroni M, Mavridis S, Steiner T,  
515 Karagouni E. 2012. Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol  
516 containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of  
517 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 350–353: 26–32.



- 518 Hartman L, Lago RCA. 1973. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. Lab.  
519 Pract. 22: 475–476.
- 520 Hernández A, García BG, Caballero MJ, Hernández MD. 2015. The inclusion of  
521 thyme essential oil in the feed of gilthead seabream (*Sparus aurata*) promotes changes in the  
522 frequency of lymphocyte aggregates in gut-associated lymphoid tissue. Aquac. Res. 47:  
523 3341–3345.
- 524 Hernández, A., García BG, Jordán MJ, Hernández MD. 2015. Study of the dose of  
525 thyme essential oil in feed to prolong the shelf life of gilthead seabream (*Sparus aurata*).  
526 Aquac. Nutr. 21: 740–749.
- 527 Jensen LB, Provan F, Larssen E, Bron JE, Obach A. 2015. Reducing sea lice  
528 (*Lepeophtheirus salmonis*) infestation of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) through  
529 functional feeds. Aquac. Nutr. 21: 983–993.
- 530 Kayhan FE, Duman BS. 2010. Heat shock protein genes in fish. Turkish J. Fish. Aquat.  
531 Sci. 10: 287–293.
- 532 Kim YH, Huff-Lonergan E, Sebranek JG, Lonergan SM. 2010. High-oxygen modified  
533 atmosphere packaging system induces lipid and myoglobin oxidation and protein  
534 polymerization. Meat Sci. 85: 759–767.
- 535 Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S,  
536 Stadtman ER. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins.  
537 Methods Enzymol. 186: 464–478.
- 538 Lowry O, Rosebrough N, Lewis Farr A, Randall R. 1951. Protein measurement with  
539 the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265–275.
- 540 Maisonneuve E, Ducret A, Khoueiry P, Lignon S, Longhi S, Talla E, Dukan S. 2009.  
541 Rules governing selective protein carbonylation. PLoS One 4: 1–13.

542 Masniyom P, Benjama O, Maneesri J. 2012. Effect of turmeric and lemongrass  
543 essential oils and their mixture on quality changes of refrigerated green mussel (*Perna viridis*).  
544 Int. J. Food Sci. Technol. 47: 1079–1085.

545 Meilgaard MC, Carr BT, Civille GV. 2006. Sensory evaluation techniques. 4th ed.  
546 Boca Raton: CRC Press. 464 p.

547 Pathare PB, Opara UL, Al-Said FAJ. 2013. Colour measurement and analysis in fresh  
548 and processed foods: a review. Food bioprocess Technol. 6: 36–60.

549 Prändl O, Fischer A, Schimidhofer T, Sinell H. 1994. Tecnologia e higiene de la carne.  
550 Zaragoza: Acribia. 854 p.

551 Rampelotto C, Lima JS, Pinheiro CG, Salbego J, Silva LP, Emanuelli T. n.d.  
552 Supplementation with microencapsulated lemongrass essential oil improves protein  
553 deposition and carcass yield of silver catfish (*Rhamdia quelen*). Acta Sci. Anim. Sci.

554 Recknagel RO, Glende EA. 1984. Spectrophotometric detection of lipid conjugated  
555 dienes. Methods Enzymol. 105: 331–337.

556 Saccol EMH, Uczay J, Pês TS, Finamor IA, Ourique GM, Riffel APK, Schmidt D,  
557 Caron BO, Heinzmann BM, Llesuy SF, Lazzari R, Baldisserotto B, Pavanato MA. 2013.  
558 Addition of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown essential oil to the diet of the silver catfish: An  
559 analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. Aquaculture  
560 416–417: 244–254.

561 Sahin K, Orhan C, Yazlak H, Tuzcu M, Sahin N. 2014. Lycopene improves activation  
562 of antioxidant system and Nrf2/HO-1 pathway of muscle in rainbow trout (*Oncorhynchus*  
563 *mykiss*) with different stocking densities. Aquaculture 430: 133–138.

564 Shah G, Shri R, Panchal V, Sharma N, Singh B, Mann AS. 2011. Scientific basis for  
565 the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). J. Adv. Pharm. Technol.  
566 Res. 2: 3–8.

- 567 Subbaiah K, Majumdar RK, Choudhury J, Priyadarshini BM, Dhar B, Roy D, Saha A,  
568 Maurya P. 2015. Protein degradation and instrumental textural changes in fresh Nile tilapia  
569 (*Oreochromis niloticus*) during frozen storage. J. Food Process. Preserv. 39: 2206–2214.
- 570 Sutili FJ, Gatlin DM, Heinzmann BM, Baldisserotto B. 2017. Plant essential oils as  
571 fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. Rev. Aquac.
- 572 Symeon GK, Zintilas C, Ayoutanti A, Bizelis JA, Deligeorgis SG. 2009. Effect of  
573 dietary oregano essential oil supplementation for an extensive fattening period on growth  
574 performance and breast meat quality of female medium-growing broilers. Can. J. Anim. Sci.  
575 89: 331–334.
- 576 Tak JH, Isman MB. 2016. Metabolism of citral, the major constituent of lemongrass  
577 oil, in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, and effects of enzyme inhibitors on toxicity and  
578 metabolism. Pestic. Biochem. Physiol. 133: 20–25.
- 579 Thanonkaew A, Benjakul S, Visessanguan W, Decker EA. 2006. The effect of metal  
580 ions on lipid oxidation, colour and physicochemical properties of cuttlefish (*Sepia pharaonis*)  
581 subjected to multiple freeze-thaw cycles. Food Chem. 95: 591–599.
- 582 Valladão GMR, Gallani SU, Pilarski F. 2016. South American fish for continental  
583 aquaculture. Rev. Aquac.
- 584 Veeck APL, Boligon AA, Athayde ML, Emanuelli T. 2013. Mate extract on lipid and  
585 color changes of dourado fillets during frozen storage. Ciência Rural 43: 1317–1322.
- 586 Veeck APL, Klein B, Ferreira LF, Becker AG, Heldwein CG, Heinzmann BM,  
587 Baldisserotto B, Emanuelli T. 2013. Lipid stability during the frozen storage of fillets from  
588 silver catfish exposed in vivo to the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. J. Sci.  
589 Food Agric. 93: 955–60.
- 590 Veit JC, Piccolo J, Scherer AF, Machado IS, Peres MM, Schwerz JP, Baldisserotto B,  
591 Heinzmann BM, Emanuelli T. 2016. Stability of frozen fillets from silver catfish anesthetized

592 with essential oil of *Lippia alba* prior to electrical stunning or hypothermia. J. Food Process.  
593 Preserv.

594 Weber J, Bochi VC, Ribeiro CP, Victório AM, Emanuelli T. 2008. Effect of different  
595 cooking methods on the oxidation, proximate and fatty acid composition of silver catfish  
596 (*Rhamdia quelen*) fillets. Food Chem. 106: 140–146.

597 Yan L, Wang JP, Kim HJ, Meng QW, Ao X, Hong SM, Kim IH. 2010. Influence of  
598 essential oil supplementation and diets with different nutrient densities on growth  
599 performance, nutrient digestibility, blood characteristics, meat quality and fecal noxious gas  
600 content in grower-finisher pigs. Livest. Sci. 128: 115–122.

601 Zepka LQ, Wagner R, Jacob-Lopes E, Mitterer M, Santos AB, Torri AF, Donadel JZ.  
602 2013. Study of the volatile compounds useful for the characterization of frozen anchoita  
603 (*Engraulis anchoita*) by SPME-GC-MS. In: Ferreira V, Lopez R. Flavour Science:  
604 Proceedings from XIII Weurman Flavour Research Symposium. San Diego: Academic Press.  
605 P. 169-72.

606 Zeppenfeld CC, Hernández DR, Santinón JJ, Heinzmann BM, Cunha MA, Schmidt D,  
607 Baldisserotto B. 2016. Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes growth of  
608 silver catfish (*Rhamdia quelen*). Aquac. Nutr. 22: 933–940.

609 Zhang LW, Koci J, Jeffery B, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. 2015. Safety  
610 assessment of potential food ingredients in canine hepatocytes. Food Chem. Toxicol. 78: 105–  
611 115

612 Zheng ZL, Tan JYW, Liu HY, Zhou XH, Xiang X, Wang KY. 2009. Evaluation of  
613 oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and  
614 resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*).  
615 Aquaculture 292: 214–218.

616

617 Table 1: Composition of the essential oil of *Cymbopogon flexuosus*.

<b>Compound</b>	<b>Experimental RI*</b>	<b>Literature RI<sup>a,b</sup></b>	<b>Percent composition</b>
Camphene	946	946	0.65
6-Methyl-5-heptene-2-one	988	984	0.61
Limonene	1028	1030	0.36
Citronellal	1153	1153	1.39
Z-Verbenol	1183	1188	2.35
Citronellol	1229	1228	1.97
Neral	1242	1242	32.11
Z-Geraniol	1255	1259	1.97
Geraniol	1272	1270	45.68
Neryl acetate	1384	1381	0.87
Caryophyllene	1423	1418	1.68
$\gamma$ -Cadinene	1517	1517	1.47
$\delta$ -Cadinene	1526	1528	0.25
Elemol	1552	1549	0.81
Caryophyllene oxide	1587	1582	1.01
<b>Identified compounds</b>			<b>93.2</b>

618 \*RI=Retention index; <sup>a</sup>Adams, 2009; <sup>b</sup>NIST, 2010.

619

620 Table 2: Ingredients of diets.

Ingredients (g/kg)	Diets		
	Control	1 mL EO/kg diet	3 mL EO/kg diet
Meat and bone meal	350	350	350
Soybean meal	300	300	300
Broken corn	150	150	150
Rice bran	120	120	120
Canola oil	30	30	30
Vitamin and mineral premix	30	30	30
Sodium chloride	10	10	10
Dicalcium phosphate	10	10	10
Microcapsules of EO*	0	2.74	8.22

621 \*Containing 365 mL of *C. flexuosus* EO/kg of microcapsules.

622

623 Table 3: Proximate composition and sensory acceptance of fillets from silver catfish fed with  
 624 diet supplemented with different levels of essential oil (EO) of *Cymbopogon flexuosus*.

<i>Proximate composition (%)</i>	<i>Treatment</i>		
	<i>Control</i>	<i>1 mL EO/kg diet</i>	<i>3 mL EO/kg diet</i>
Moisture	77.2±0.7	76.0±1.3	77.5±0.6
Protein	18.1±0.8	18.0±0.5	19.4±0.2
Fat	3.4±0.7	3.8±0.8	3.2±0.5
Ash	1.12±0.07	1.19±0.03	1.21±0.05
<i>Sensory acceptance</i>			
Texture	8 (7-8)	8 (7-8)	8 (7-8)
Color	7 (6-8)	7 (6-8)	7 (6-8)
Odor	7 (5-8)	7 (6-8)	7 (6-8)
Taste	7 (6-8)	7 (7-8)	7 (6-8)

625 Proximate composition data are expressed as mean ± SE (n = 4). Sensory acceptance was  
 626 evaluated using a hedonic scale (1 – greatly dislike and 9 – greatly like) and presented as the  
 627 median (interquartile interval) of sensory scores from 41 judges.

628

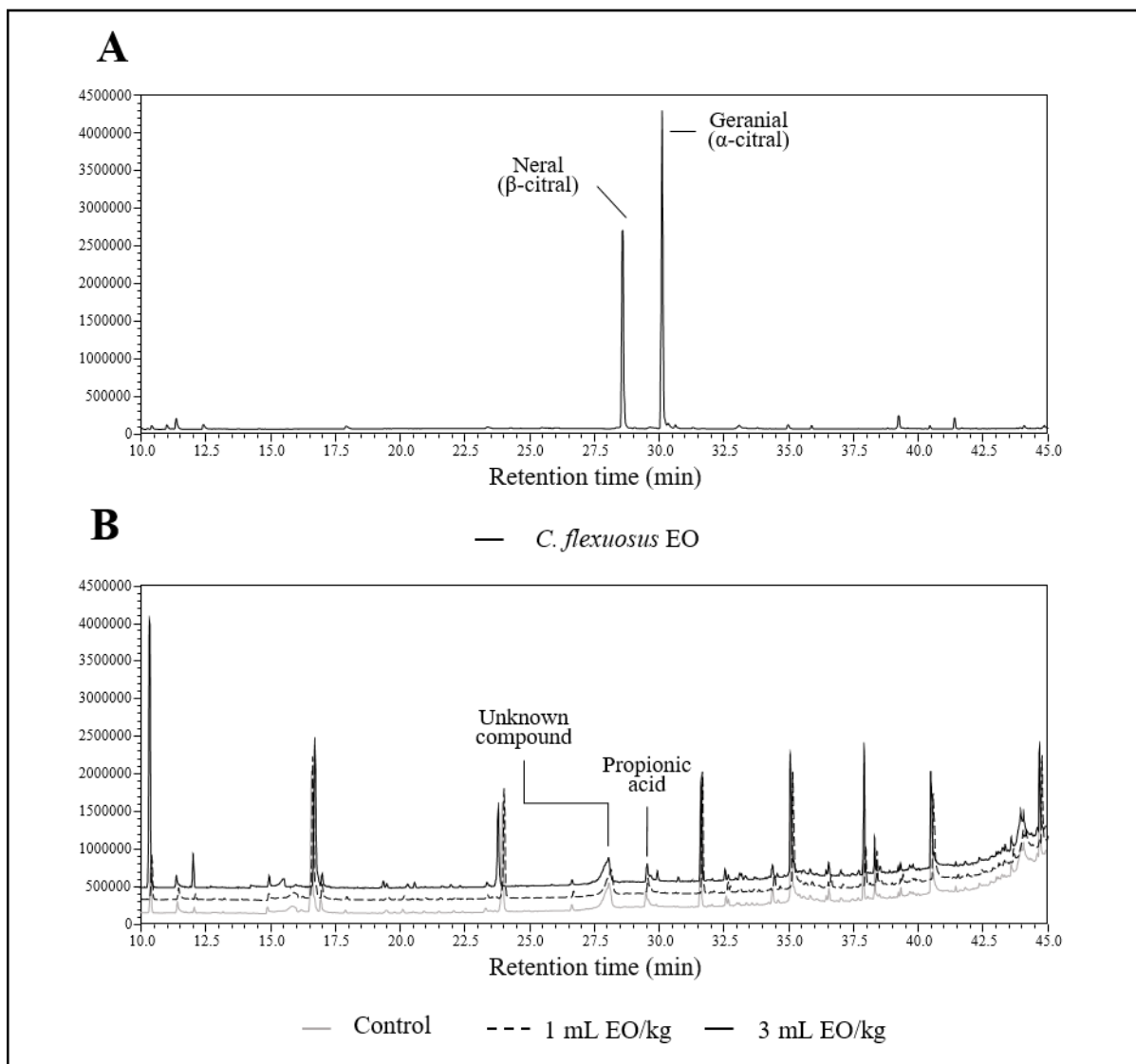
629 Table 4: Fatty acid composition of fillets from silver catfish fed with diet supplemented with  
 630 different levels of essential oil (EO) of *Cymbopogon flexuosus*.

Fatty acid	Treatment		
	Control	1 mL EO/kg diet	3 mL EO/kg diet
C14:0	1.24±0.18	0.68±0.27	0.65±0.24
C14:1n5	0.06±0.04	0.05±0.01	0.21±0.14
C15:0	0.11±0.04	0.08±0.02	0.04±0.03
C16:0	23.75±0.56	21.71±0.61	22.32±0.15
C16:1n7	4.58±1.54	5.41±0.60	5.52±0.69
C17:0	0.20±0.07	0.33±0.04	0.28±0.05
C17:1n5	0.17±0.04	0.18±0.03	0.16±0.03
C18:0	7.38±0.33	7.19±0.34	7.71±0.46
C18:1n7	2.71±0.16	2.88±0.11	2.79±0.12
C18:1n9	35.46±0.64	36.51±0.40	34.82±1.26
C18:2n6	15.50±1.10	15.11±1.23	15.40±0.32
C18:3n3	1.00±0.19	1.38±0.09	1.15±0.19
C18:3n6	0.87±0.19	1.07±0.12	0.83±0.06
C20:0	0.20±0.07	0.31±0.08	0.19±0.05
C20:1n9	1.03±0.08	1.16±0.03	0.84±0.09
C20:2n6	0.28±0.02	0.35±0.09	0.33±0.03
C21:0	0.12±0.04	0.33±0.07	0.29±0.05
C20:3n3	0.49±0.31	0.03±0.02	0.03±0.03
C20:3n6	1.64±0.28	1.45±0.16	1.91±0.40
C20:4n6	0.98±0.10	1.30±0.20	1.51±0.36
C20:5n3	0.10±0.01	0.13±0.05	0.15±0.01
C22:5n3	0.29±0.05	0.51±0.09	0.55±0.013
C22:5n6	0.19±0.04	0.26±0.08	0.23±0.06
C22:6n3	1.40±0.27	1.33±0.18	1.90±0.59
C24:0	0.17±0.05	0.24±0.05	0.18±0.03
MUFA	44.01±2.18	46.19±0.58	44.34±1.70
PUFA	22.82±1.63	22.93±1.36	23.99±1.13
SFA	33.17±0.76	30.88±0.89	31.66±0.60
n-3	4.99±0.75	4.84±0.50	5.69±0.95
n-6	19.47±1.31	19.55±1.16	20.20±0.58
n-9	36.50±0.57	37.66±0.43	35.66±1.33
n-3/n-6	0.25±0.03	0.25±0.03	0.28±0.04

631 Results are expressed as mean ± SE (n = 4).

632





633

634 Figure 1: Representative chromatograms of volatile compounds of essential oil (EO) of *C.*635 *flexuosus* (A) and fillets from fish fed with diet supplemented with different levels of EO (B).

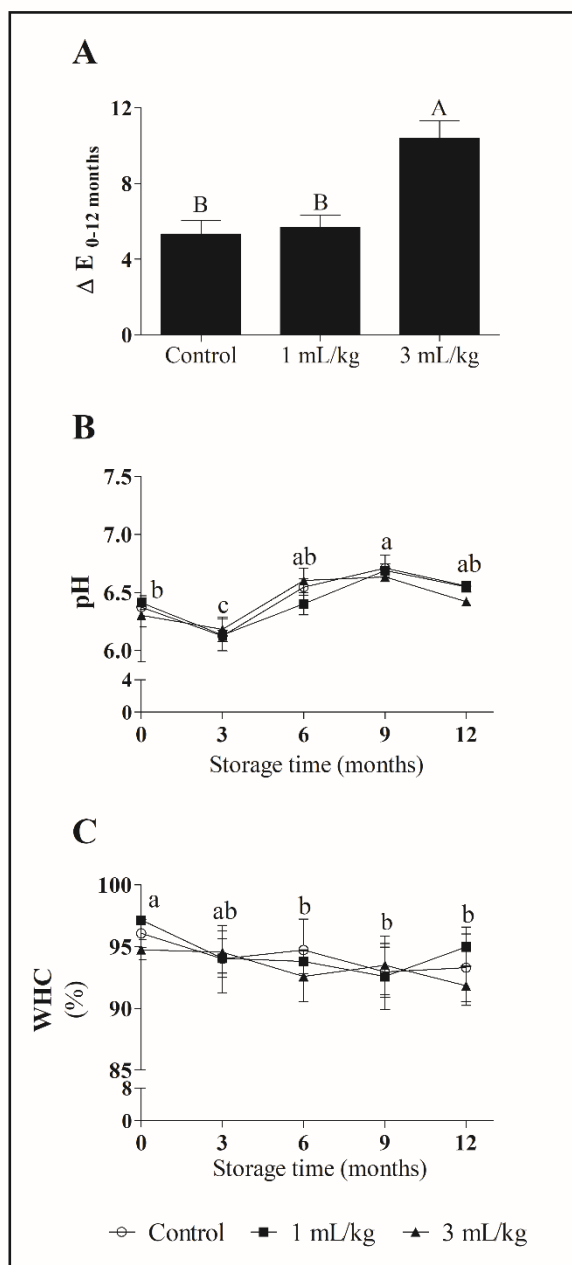
636

637 Table 5: Changes in color coordinates during frozen storage of fillets from silver catfish fed  
 638 with diet supplemented with different levels of essential oil (EO) of *Cymbopogon flexuosus*.

Feed	Storage (months)					Mean
	0	3	6	9	12	
L*						
Control	50.6±0.7 <sup>Aab</sup>	49.8±1.3 <sup>Ab</sup>	52.6±1.1 <sup>Aab</sup>	55.2±1.4 <sup>Aa</sup>	52.4±0.5 <sup>Bab</sup>	52.1
1 mL EO/kg diet	53.0±1.0 <sup>Aa</sup>	53.5±1.4 <sup>Aa</sup>	55.5±1.0 <sup>Aa</sup>	53.5±1.0 <sup>Aa</sup>	53.1±0.7 <sup>Ba</sup>	53.7
3 mL EO/kg diet	48.6±0.9 <sup>Bc</sup>	51.9±1.2 <sup>AcB</sup>	55.6±0.6 <sup>Aab</sup>	55.4±0.7 <sup>Aa</sup>	57.0±0.5 <sup>Aa</sup>	53.7
Mean	50.7	51.7	54.5	54.7	54.2	
a*						
Control	-1.13±0.30	-2.01±0.07	-1.32±0.20	-1.45±0.24	-1.26±0.47	-1.43
1 mL EO/kg diet	-1.56±0.42	-1.80±0.20	-1.75±0.32	-1.40±0.22	-1.39±0.35	-1.58
3 mL EO/kg diet	-0.62±0.51	-0.69±0.62	-1.43±0.42	-2.06±0.25	-1.54±0.28	-1.27
Mean	-1.10	-1.50	-1.50	-1.64	-1.40	
b*						
Control	1.85±0.43 <sup>b</sup>	4.32±0.71 <sup>ab</sup>	6.41±0.36 <sup>a</sup>	6.47±0.75 <sup>a</sup>	6.19±0.90 <sup>a</sup>	5.05
1 mL EO/kg diet	1.53±0.59 <sup>b</sup>	5.23±0.37 <sup>a</sup>	6.65±0.80 <sup>a</sup>	6.52±0.77 <sup>a</sup>	6.15±0.73 <sup>a</sup>	5.22
3 mL EO/kg diet	2.57±0.60 <sup>c</sup>	6.61±0.96 <sup>ab</sup>	4.11±1.20 <sup>bc</sup>	4.57±0.44 <sup>abc</sup>	7.95±0.45 <sup>a</sup>	5.16
Mean	1.98	5.39	5.72	5.85	6.76	
C*						
Control	2.30±0.29 <sup>b</sup>	4.73±0.58 <sup>ab</sup>	6.56±0.32 <sup>a</sup>	6.66±0.70 <sup>a</sup>	6.42±0.79 <sup>a</sup>	5.33
1 mL EO/kg diet	2.51±0.11 <sup>b</sup>	5.53±0.40 <sup>a</sup>	6.87±0.70 <sup>a</sup>	6.70±0.72 <sup>a</sup>	6.36±0.65 <sup>a</sup>	5.59
3 mL EO/kg diet	2.83±0.49 <sup>c</sup>	6.86±1.06 <sup>ab</sup>	4.62±0.90 <sup>bc</sup>	5.06±0.35 <sup>abc</sup>	8.12±0.40 <sup>a</sup>	5.50
Mean	2.55	5.71	6.02	6.14	6.97	
h*						
Control	180.78± 1.29	180.37±0.37	171.22±7.57	180.33±0.25	184.11±4.98	179.36
1 mL EO/kg diet	183.65±6.01	181.45±1.12	179.07±0.87	179.86±1.55	180.28±2.09	180.86
3 mL EO/kg diet	179.56±0.66	178.13±0.94	180.10±1.10	180.08±0.74	182.86±1.39	180.15
Mean	181.33	179.98	176.80	180.09	182.42	

639 Results are expressed as mean ± SE (n = 4). Different lowercase letters indicate difference  
 640 among the time points and different capital letters indicate difference among treatments  
 641 within the same time point (Tukey's test; p <0.05).

642



643

644 Figure 2: Total color difference (A), pH (B) and water holding capacity (C) during frozen  
 645 storage of fillets from silver catfish fed with diet supplemented with different levels of  
 646 essential oil of *Cymbopogon flexuosus*. Results are expressed as mean  $\pm$  SE (n = 4). Different  
 647 lowercase letters indicate difference among time points and different capital letters indicate  
 648 difference among treatments (Tukey's test; p < 0.05).

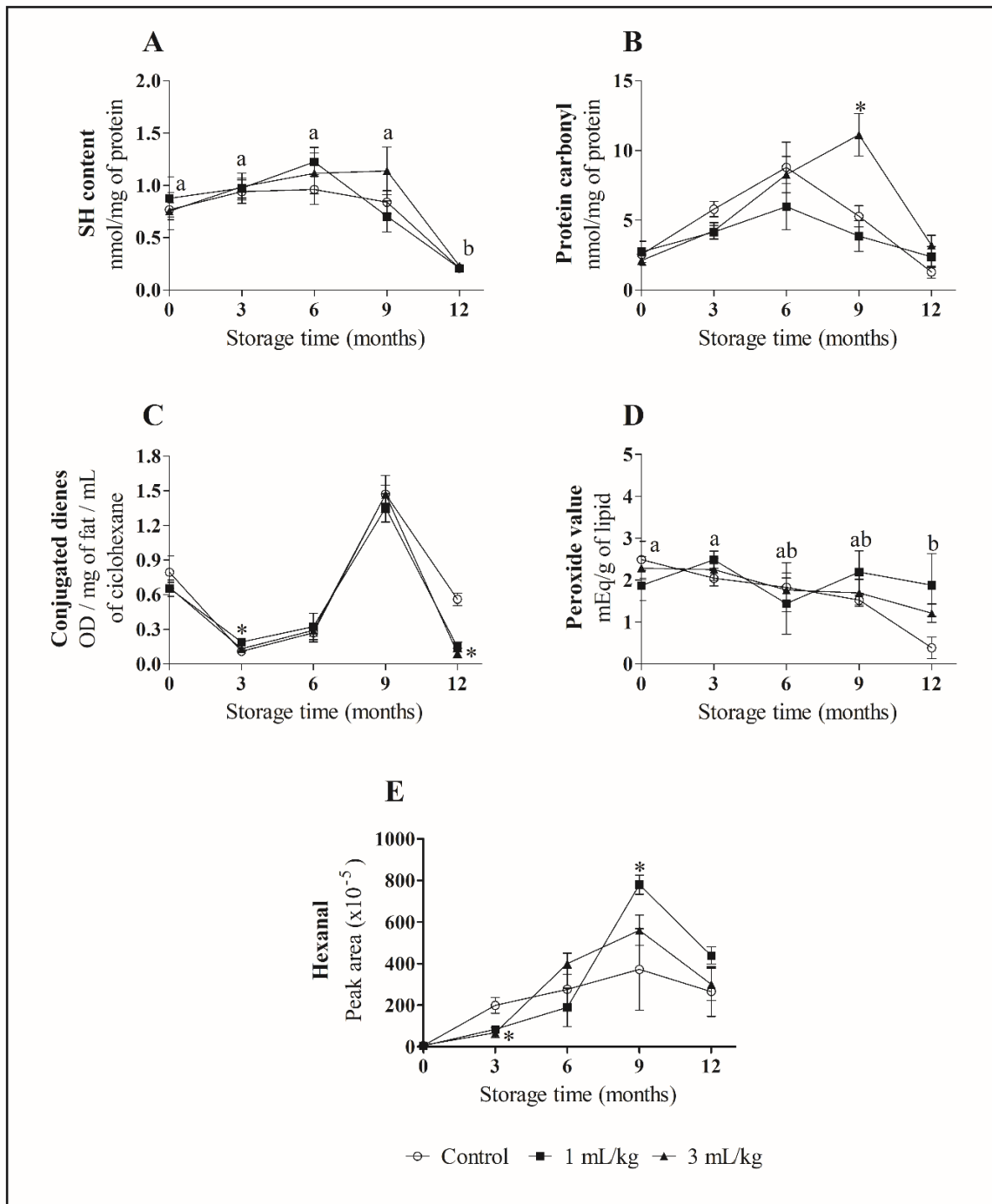
649

650 Table 6: Texture changes during frozen storage of fillets from silver catfish fed with diet  
 651 supplemented with different levels of essential oil of *Cymbopogon flexuosus*.

Feed	Storage (Months)					Mean
	0	3	6	9	12	
	Hardness (N)					
Control	30.1±3.8 <sup>Aa</sup>	21.6±3.5 <sup>Aab</sup>	12.8±1.4 <sup>Ab</sup>	16.8±0.7 <sup>Bb</sup>	30.2±3.1 <sup>ABa</sup>	22.3
1 mL EO/kg diet	23.5±2.3 <sup>Ab</sup>	17.3±0.7 <sup>Ab</sup>	12.2±0.9 <sup>Ac</sup>	20.1±1.7 <sup>ABab</sup>	26.2±2.3 <sup>Ba</sup>	19.9
3 mL EO/kg diet	18.5±1.1 <sup>Aab</sup>	19.3±2.6 <sup>Aab</sup>	11.5±0.9 <sup>Ac</sup>	22.4±0.7 <sup>Ab</sup>	40.8±3.1 <sup>Aa</sup>	22.5
Mean	24.0	19.4	12.2	19.8	32.4	
	Springiness (cm)					
Control	0.36±0.02	0.36±0.01	0.34±0.02	0.36±0.00	0.29±0.01	0.34
1 mL EO/kg diet	0.34±0.01	0.37±0.01	0.33±0.01	0.37±0.02	0.31±0.01	0.34
3mL EO/kg diet	0.34±0.00	0.34±0.01	0.33±0.01	0.40±0.01	0.33±0.01	0.35
Mean	0.35 <sup>ab</sup>	0.36 <sup>ab</sup>	0.33 <sup>bc</sup>	0.38 <sup>a</sup>	0.31 <sup>c</sup>	
	Cohesiveness (dimensionless)					
Control	0.25±0.01	0.28±0.01	0.30±0.04	0.29±0.01	0.28±0.03	0.28
1 mL EO/kg diet	0.27±0.02	0.28±0.02	0.31±0.03	0.36±0.04	0.30±0.02	0.30
3mL EO/kg diet	0.25±0.01	0.30±0.01	0.26±0.02	0.35±0.03	0.31±0.02	0.29
Mean	0.26 <sup>b</sup>	0.29 <sup>aab</sup>	0.29 <sup>ab</sup>	0.33 <sup>a</sup>	0.30 <sup>ab</sup>	
	Chewiness (N • cm)					
Control	2.99±0.63 <sup>Aa</sup>	2.23±0.45 <sup>Aab</sup>	1.26±0.07 <sup>Ab</sup>	1.80±0.16 <sup>Aab</sup>	2.61±0.34 <sup>Bab</sup>	2.18
1 mL EO/kg diet	2.15±0.35 <sup>Aa</sup>	1.81±0.26 <sup>Aa</sup>	1.30±0.21 <sup>Aa</sup>	2.46±0.64 <sup>Aa</sup>	2.30±0.39 <sup>Ba</sup>	2.00
3mL EO/kg diet	1.58±0.09 <sup>Abc</sup>	1.83±0.21 <sup>Abc</sup>	0.96±0.06 <sup>Ac</sup>	3.09±0.28 <sup>Aab</sup>	4.52±0.62 <sup>Aa</sup>	2.40
Mean	2.24	1.96	1.17	2.45	3.14	

652 Results are expressed as mean ± SE (n = 4). Different lowercase letters indicate difference  
 653 among time points and different capital letters indicate difference among treatments in the  
 654 same month by Tukey's test (p <0.05).

655



656

657 Figure 3: Protein and lipid oxidation during frozen storage of fillets from silver catfish fed  
 658 with diet supplemented with different levels of essential oil of *Cymbopogon flexuosus*. SH  
 659 content (A), protein carbonyl groups (B), conjugate dienes (C), peroxide value (D) and  
 660 hexanal levels (E) Results are expressed as mean  $\pm$  SE (n = 4). Different lowercase letters  
 661 indicate difference among time points and \* indicate difference from control group (Tukey's  
 662 test; p < 0.05).

## 5. DISCUSSÃO

Os óleos essenciais (OEs) têm sido utilizados há séculos pelo homem para diversas finalidades. Devido ao seu aroma tradicional e propriedades antibactericida e antioxidante, eles têm sido propostos como alternativas aos aditivos sintéticos (DIMA; DIMA, 2015). Em alimentos o uso de OEs para redução da carga microbiana, inibição de produção de micotoxinas e também para retardar a oxidação é frequentemente reportado em estudos científicos (PRAKASH et al., 2015). Além disso, são utilizados na medicina popular e propostos para vários usos farmacológicos como bactericida, antifúngico, anticâncer, anti-inflamatório, entre outros (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Por apresentarem tantas propriedades e atividades biológicas, também surgiu o interesse em utilizar os OEs na alimentação animal. Inúmeros estudos demonstram as potencialidades dos OEs como promotores de crescimento, imunostimulantes, antibactericidas e antiparasitários em peixes (REVERTER et al., 2014; SUTILI et al., 2017) e aves (BRENES; ROURA, 2010).

Os OEs que apresentam o citral como componente majoritário têm considerável capacidade antioxidante *in vitro* devido à habilidade de neutralizar radicais livres e prevenir a oxidação de ácidos graxos insaturados. Além disso, demonstram elevado potencial antimicrobiano (SACCHETTI et al., 2005), o qual é atribuído as suas duas frações,  $\alpha$  e  $\beta$  (ONAWUNMI; YISAK; OGUNLANA, 1984). Devido a estas características eles são propostos como potenciais promotores de crescimento de animais de produção.

No entanto, existe grande diversidade biológica tanto entre os animais de produção, que podem apresentar diferentes respostas frente aos diversos EOs disponíveis, sendo necessário avaliar as particularidades de cada um. Portanto, os estudos que compõe esta tese buscaram analisar os efeitos da administração dietética do óleo essencial de *C. flexuosus* tanto nos parâmetros de produtividade e em marcadores bioquímicos sanguíneos, quanto nas características de qualidade da carne de duas espécies distintas, frangos e peixes.

A inclusão de 0,25 mL de OE de *C. flexuosus*/kg de dieta de frangos não alterou a ingestão alimentar ou o peso da carcaça das aves, mas promoveu pequeno aumento no ganho de peso dos animais durante a 3<sup>a</sup>. semana de suplementação (Manuscrito I). Alguns estudos com suplementação dietética com OE demonstram que a suplementação com folhas de *C. citratus* não teve efeito (ALZAWQARI et al., 2016) ou impacto negativo (THAYALINI, K., SHANMUGAVELU, S., SAMINATHAN, 2011) sobre o desempenho de crescimento de frangos de corte. No entanto, a suplementação dietética com uma mistura de *C. citratus* e EO

de *C. martini* aumentou o ganho de peso de leitões de 28 a 63 dias de idade (DUARTE et al., 2016). Mas, corroborando com os resultados apresentados no Manuscrito I, um estudo com aves de corte demonstrou que os OEs microencapsulados de *C. flexuosus* e *Lippia rotundifolia*, na concentração de 0,12 g/kg de ração, não melhoram o desempenho produtivo ou o rendimento de carcaça de frangos de corte (AZEVEDO et al., 2017).

Quanto aos jundiás alimentados por 20 dias com ração contendo 1 ou 3 mL/kg de OE (Manuscrito III), também não houve melhora no desempenho produtivo, mas a dose de 1 mL/kg aumentou o rendimento da carcaça e reduziu os índices digestivo e gonadossomático. Apesar da suplementação dietética com alguns OEs como *Citrus sinensis* (ACAR et al., 2015) e *Aloysia triphylla* (ZEPPEFELD et al., 2016) ter promovido o crescimento de peixes, a utilização de citral puro na dieta de salmões (JENSEN et al., 2015) e a suplementação de tilápias com OE de gengibre (~ 40% de citral) (BRUM et al., 2017), não afetaram os parâmetros de produtividade dos peixes. Isto pode indicar que a utilização de citral em dietas de peixes não tem efeito promotor de crescimento em situações sem desafios.

No entanto, devido à modificação de alguns índices somáticos, com destaque para o gonadossomático, é possível inferir que os compostos do OE de *C. flexuosus* apresentam alguma atividade sobre a regulação hormonal dos animais, já que a principal causa de variação do índice gonadossomático é a produção de testosterona (BARCELLOS et al., 2002).

A alimentação de frangos por 20 dias com ração adicionada de 0,25 mL/kg de OE de *C. flexuosus* aumentou o peso do fígado e triglicerídeos séricos, enquanto reduziu as proteínas totais e albumina séricas (Manuscrito I). Assim como os frangos, os peixes alimentados com OE apresentaram redução das proteínas plasmáticas totais, porém a fração albumina não foi afetada e ocorreu uma redução dos triglicerídeos, em oposição ao observado nos frangos.

A redução de proteínas sanguíneas pode estar relacionada com lesões renais e hepáticas, subnutrição ou resposta imunológica (BUSHER, 1990). A redução de triglicerídeos pode ocorrer devido à administração aguda de compostos hepatotóxicos, que pode ser acompanhada por lesões no fígado (PROVOST; HANTON; LE NET, 2003). Porém, no estudo com peixes (Manuscrito III) não foi observada alteração nas enzimas alanina aminotransferase (ALT) ou aspartato aminotransferase (AST) no sangue, que são marcadores clássicos de dano hepático.

Observou-se que a dose utilizada na ração dos frangos (0,25 mL/kg) não influenciou o consumo alimentar (Manuscrito I), porém o nível de adição de 3 mL/kg, utilizada na ração dos peixes reduziu o consumo alimentar quando comparado ao grupo 1 mL/kg (Manuscrito III). O citral, composto encontrado em maior concentração no OE de *C. flexuosus*, tem

elevado poder odorífero, e pode ser detectado pelo olfato humano em concentrações abaixo de 15 ppm (PLOTTO et al., 2004). Como a concentração na ração chegou a ~200 vezes o limite de detecção olfativa, é possível que, mesmo o OE estando microencapsulado, o nível de 3 mL/kg de ração afete negativamente o odor e também a palatabilidade do alimento o tornando menos atrativo aos animais. Não foram encontrados estudos sobre o limite de detecção olfativa do citral para animais de produção.

A composição corporal dos peixes foi afetada pelos tratamentos com OE de *C. flexuosus*, porém a composição do filé não (Manuscrito III e IV). Resultado semelhante foi observado na carne de peito de frango (Manuscrito II), a qual não apresentou alteração no conteúdo de gordura, lipídeos ou proteínas com o tratamento com OE de *C. flexuosus*. Estes resultados indicam que o OE de *C. flexuosus* dietético tem pouca influência sobre a constituição muscular dos animais visto que, além de não haver diferença entre tratamentos, os teores de umidade, proteína, gordura e cinzas observados nos estudos são semelhantes aos encontrados na literatura para peito de frango (JANG et al., 2008; SOUZA; FARIA; BRESSAN, 2011) e filé de jundiá (VEIT et al., [s.d.]; WEBER et al., 2008).

A aceitação sensorial de textura, cor e odor dos dois tipos de carne também não foi afetada, porém o sabor da carne de frango foi beneficiado pelo consumo dietético de OE de *C. flexuosus*. No entanto, não foram encontrados compostos voláteis oriundos do OE de *C. flexuosus* na carne de frango (Manuscrito II) ou de peixe (Manuscrito IV). No organismo de mamíferos (DILIBERTO et al., 1990) e insetos (TAK; ISMAN, 2016) o citral é rapidamente metabolizado a ácidos carboxílicos, o que fundamenta a ausência dos terpenos neral e geranial no perfil de compostos voláteis da carne.

A alteração da composição de ácidos graxos provocada pelo consumo de OE de *C. flexuosus* só foi observada na carne de peito do frango (Manuscrito II), a qual apresentou conteúdo ligeiramente superior de ácido palmítico (C 16:0) comparado ao controle. Este resultado pode justificar a melhor aceitação do sabor da carne de peito dos frangos alimentados com ração contendo 0,25 mL/kg de OE de *C. flexuosus*. Mesmo assim, o perfil de ácidos graxos se apresentou de acordo com o encontrado na literatura para aves (BOSCHETTI et al., 2015).

No armazenamento congelado observou-se que, durante todo o período o pH dos peitos dos frangos alimentados com OE de *C. flexuosus* foi mais alto do que os do controle, porém se mantendo dentro de uma faixa normal de pH (BARBUT; ZHANG; MARCONE, 2005). Já os filés de peixe não apresentaram diferença de pH entre tratamentos.



Os marcadores iniciais de oxidação lipídica avaliados na carne de frango (peróxidos) e de pescado (peróxidos e dienos conjugados) apresentaram pouca ou nenhuma influência da administração dietética de OE de *C. flexuosus*. Porém os marcadores secundários da oxidação foram mais fortemente influenciados pela suplementação com este OE. Independentemente do tempo de armazenamento, os peitos dos frangos que receberam OE de *C. flexuosus* na dieta apresentaram maior conteúdo de TBARS, enquanto os filés dos peixes tratados com 1 mL/kg apresentaram conteúdo de hexanal superior aos demais no nono mês de armazenamento.

Além da oxidação lipídica, nos filés de jundiá, a oxidação proteica foi avaliada por meio da determinação do conteúdo de grupos tiólicos e da carbonilação proteica. A adição de OE de *C. flexuosus* na ração afetou o conteúdo de grupos tiólicos, porém, ao final do armazenamento, foi observada uma queda acentuada dos mesmos. No entanto, a formação de grupos carbonila proteicos foi maior nos filés dos peixes tratados com 3 mL/kg no nono mês de armazenamento, ponto no qual este tratamento apresentou um pico de formação destes compostos.

Apesar do OE de *C. flexuosus* apresentar atividade antioxidante *in vitro* (CHANDRA; AH, 2014), os resultados obtidos a partir dos estudos de qualidade da carne tanto dos frangos quanto dos peixes demonstraram que a suplementação dietética com este OE não é capaz de prevenir ou retardar a oxidação lipídica e proteica na carne. De maneira oposta, o tratamento favoreceu a formação de alguns marcadores de oxidação, sugerindo que sua atividade *in vivo*, nas doses avaliadas, é pró-oxidante.

Estudos prévios demonstram que a suplementação com OEs pode minimizar a oxidação lipídica em carnes de frango (BOTSOGLOU et al., 2002; JAVAN et al., 2013) e peixe (ÁLVAREZ et al., 2012; GIANNENAS et al., 2012; HERNÁNDEZ et al., 2015). Porém estes estudos também indicam que o efeito antioxidante é dependente da composição dos OEs e da espécie animal suplementada com eles (ÁLVAREZ et al., 2012; GIANNENAS et al., 2012).

A cor objetiva dos peitos de frango (Manuscrito II) não foi afetada pelo tratamento com OE de *C. flexuosus*, nem pelo tempo de armazenamento. No entanto, os filés de peixe apresentaram um aumento da tendência ao amarelo ( $b^*$ ) ao longo do período de estocagem, independentemente do tratamento, (Manuscrito IV). Tal comportamento foi verificado também em estudos prévios com a mesma espécie de peixe (VEECK et al., 2013; VEIT et al., [s.d.]). No manuscrito IV foi verificado que até o pico de formação de grupos carbonila em proteínas ocorreu entre seis e nove meses, e reações que se seguem a carbonilação proteica podem contribuir com o amarelamento da carne uma vez que os produtos de oxidação das

proteínas podem reagir, via reação de Maillard, produzindo pigmentos do amarelo ao marrom (ESTÉVEZ, 2011). Reforçando esse pressuposto, verificou-se que os filés de peixe do tratamento com 3 mL/kg de OE que apresentaram maior instabilidade de cor ( $\Delta E$ ) durante o armazenamento por 12 meses também apresentaram o maior conteúdo de proteínas carboniladas aos nove meses de armazenamento.

Outros experimentos com OEs dietéticos demonstram efeito variável sobre os parâmetros de cor. Em carne suína, apenas os valores de  $b^*$  foram influenciados pela suplementação com uma mistura de OE de tomilho, alecrim e orégano (YAN et al., 2010), enquanto em carne de frango o OE de orégano provocou um comportamento inconstante nos valores de  $a^*$  e  $b^*$  durante o armazenamento (SYMEON et al., 2009). Em filés de pescada armazenados refrigerados o OE de tomilho não afetou a cor (ÁLVAREZ et al., 2012) ou causou apenas algumas alterações pontuais nas coordenadas  $L^*$ ,  $b^*$  e  $C^*$  aos 7 dias de armazenamento (HERNÁNDEZ et al., 2015).

A textura dos peitos de frango foi avaliada por meio da força de cisalhamento, a qual permaneceu quase constante durante o armazenamento congelado, exceto no 12º mês quando a carne controle apresentou uma queda desta variável, exibindo valores menores do que a carne dos frangos tratados com OE de *C. flexuosus*. O efeito da suplementação com OEs na textura é bastante variável em carne de frango. O OE de orégano aumentou a força de cisalhamento da carne de peito de frango (SYMEON et al., 2009), enquanto que o OE de tomilho causou amaciamento da carne de peito (ALFAIG et al., 2013) e o OE de cravo não teve efeito sobre a força de cisalhamento e firmeza de peitos de frango (HERNÁNDEZ et al., 2009).

Nos filés de peixe foi realizada análise do perfil de textura, por meio da qual verificou-se que a coesividade e a elasticidade foram afetadas somente pelo tempo de armazenamento sem efeito da suplementação. Porém a dureza e a mastigabilidade se mostraram maiores nos filés dos peixes suplementados com 3 mL/kg no final do armazenamento.

A partir do nono mês de armazenamento foi observado um enrijecimento dos filés, em especial do tratamento com 3 mL/kg, que apresentou a maior dureza e mastigabilidade no ponto final do armazenamento. Como consequência da oxidação proteica ocorrem ligações cruzadas intra e intermoleculares entre as proteínas da carne seguida de polimerização proteica, ocasionadas, principalmente, pela formação de pontes dissulfeto (LUND et al., 2011) que são responsáveis por aumentar a dureza da carne (KIM et al., 2010). Tendo em vista que o tratamento com maior oxidação proteica também apresentou uma carne mais firme

no final do armazenamento, reforça-se a hipótese de que a alteração de textura está sendo potencializada pelas alterações oxidativas na estrutura das proteínas.

A partir dos dados adquiridos nos quatro experimentos que compõe esta tese observa-se que o comportamento das aves e dos peixes em resposta a suplementação com OE de *C. flexuosus* é diferenciado. Enquanto a dose de 0,25 mL/kg de OE de *C. flexuosus* promoveu pequeno efeito no crescimento dos animais e, aparentemente, causou algum efeito prejudicial à saúde dos frangos, nos peixes o nível de adição de 1 mL/kg, aumentou a deposição de proteína na carcaça, aumentando seu rendimento.

Apesar do OE de *C. flexuosus* apresentar atividade antioxidante *in vitro*, não foi observado este mesmo efeito na carne dos animais. O tratamento com 0,25 mL/kg promoveu um aumento do TBARS na carne de peito de frango, enquanto que 1 mL/kg aumentou a formação de hexanal e 3 mL/kg favoreceu a carbonilação proteica nos filés de peixe. Além disso, os filés dos animais suplementados com 3 mL/kg de OE apresentaram maior instabilidade de cor e textura durante o armazenamento congelado.

Essas evidências sugerem que o uso de OE de *C. flexuosus* na ração de aves não é recomendado. Ao passo que a suplementação com 1 mL/kg de OE pode ser recomendada na alimentação de jundiás em fase de engorda, para aumentar o rendimento da carcaça e o teor de proteína na mesma.

## 6. CONCLUSÃO

A alimentação de frangos de corte com dieta contendo 0,25 mL/kg de OE de capim-limão (*C. flexuosus*) durante a fase de crescimento não é recomendável, pois tem pequeno impacto no desempenho produtivo, além de reduzir proteínas sanguíneas totais e globulinas e aumentar triglicérides nos animais.

A suplementação dietética com OE de capim-limão (*C. flexuosus*) não afeta a composição da carne de peito de frango ou a composição de voláteis da mesma, mas aumenta a aceitabilidade do sabor, possivelmente por aumentar a proporção de ácido palmítico. No entanto, a suplementação apresenta um impacto negativo sobre a estabilidade da carne congelada, pois aumenta produtos secundários da oxidação lipídica e o pH.

A suplementação de jundiás em fase de engorda com dieta contendo 1 mL/kg de OE de *C. flexuosus* microencapsulado aumenta a deposição de proteína e a produtividade de carcaça, sendo esta dose indicada para a suplementação dos peixes na fase de terminação.

A suplementação dietética com OE de *C. flexuosus* durante o estágio de terminação de jundiás não afetou a composição ou a aceitabilidade sensorial dos filés e não protegeu a carne das reações oxidativas durante o armazenamento congelado. Os filés dos peixes suplementados com 3 mL/kg de OE apresentaram grande instabilidade de cor durante o armazenamento e maior firmeza no final do período de estocagem, o que parece estar relacionado a maior extensão da oxidação proteica nestes filés.

## REFERÊNCIAS

- ACAR, Ü. et al. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. **Aquaculture**, v. 437, p. 282–286, 2015.
- AHMAD, A.; VILJOEN, A. The in vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon essential* oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. **Phytomedicine**, v. 22, n. 6, p. 657–665, 2015.
- AHMAD, M. et al. Quality changes of sea bass slices wrapped with gelatin film incorporated with lemongrass essential oil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, n. 3, p. 171–178, 2012.
- AIN BAZIZ, H. et al. Chronic heat exposure enhances fat deposition and modifies muscle and fat partition in broiler carcasses. **Poultry science**, v. 75, p. 505–513, 1996.
- ALFAIG, E. et al. Effect of probiotics and thyme essential oil on the texture of cooked chicken breast meat. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 12, n. 4, p. 379–384, 2013.
- ALI, M. S.; KANG, G. H.; JOO, S. T. A review: Influences of pre-slaughter stress on poultry meat quality. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 21, n. 6, p. 912–916, 2008.
- ÁLVAREZ, A. et al. The effect of diets supplemented with thyme essential oils and rosemary extract on the deterioration of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during storage on ice. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1395–1405, jun. 2012.
- ALVIM, I. D.; GROSSO, C. R. F. Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 1069–1076, 2010.
- ALZAWQARI, M. H. et al. Effect of feeding dried sweet orange (*Citrus sinensis*) peel and lemon grass (*Cymbopogon citratus*) leaves on growth performance, carcass traits, serum metabolites and antioxidant status in broiler during the finisher phase. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 23, n. 17, p. 17077–17082, 2016.
- ANDRÉS-BELLO, A. et al. Effect of pH on color and texture of food products. **Food Engineering Reviews**, v. 5, n. 3, p. 158–170, 2013.
- AOAC. **Official Methods of Analysis**. 18. ed. Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists, 2005.
- ASBAHANI, A. E. et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 220–243, 2015.
- AZEVEDO, I. L. et al. Eficiência *in vitro* do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus* steud. wats.) frente a bactérias entéricas de origem avícola. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 10, n. 1, p. 25–31, 2016.

AZEVEDO, I. L. et al. Use of *Lippia rotundifolia* and *Cymbopogon flexuosus* essential oils, individually or in combination, in broiler diets. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 1, p. 13–19, 2017.

BABA, E. et al. Evaluation of *Citrus limon* peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. **Aquaculture**, v. 465, p. 13–18, 2016.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–75, fev. 2008.

BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. **Criação de Jundiá**. Santa Maria: UFSM, 2004. 232 p.

BARBOSA, L. N. et al. Essential oils from herbs against foodborne pathogens in chicken sausage. **Journal of Oleo Science**, v. 64, n. 1, p. 117–124, 2015.

BARBUT, S. Convenience breaded poultry meat products – New developments. **Trends in Food Science & Technology**, v. 26, n. 1, p. 14–20, 2012.

BARBUT, S.; ZHANG, L.; MARCONE, M. Effects of pale, normal, and dark chicken breast meat on microstructure, extractable proteins, and cooking of marinated fillets. **Poultry science**, v. 84, n. 5, p. 797–802, 2005.

BARCELLOS, L. J. G. et al. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. **Aquaculture Research**, v. 32, n. 2, p. 121–123, 2001.

BASSOLÉ, I. H. N. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 18, n. 12, p. 1070–1074, 2011.

BECKER, A. G. et al. Pre-sedation and transport of *Rhamdia quelen* in water containing essential oil of *Lippia alba*: metabolic and physiological responses. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 73–81, 2016.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 37, p. 911–917, 1959.

BOSCHETTI, E. et al. Fatty acid composition of chicken breast meat is dependent on genotype-related variation of FADS1 and FADS2 gene expression and desaturating activity. **Animal**, v. 10, n. 4, p. 700–708, 2015.

BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, n. 1–2, p. 1–14, 2010.

- BRUNTON, N. et al. A comparison of solid-phase microextraction (SPME) fibres for measurement of hexanal and pentanal in cooked turkey. **Food Chemistry**, v. 68, n. 3, p. 339–345, 2000.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302–310, 1978.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004.
- CABALLERO-GALLARDO, K.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. E. Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia organoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. **Journal of Stored Products Research**, v. 50, p. 62–65, 2012.
- CAVANI, C.; PETRACCI, M. Advances in research on poultry and rabbit meat quality. **Italian Journal of Animal Science**, v. 8, p. 741–750, 2009.
- CHANDRA, H.; AH, A. F. Lipoxygenase inhibitory, antioxidant, and antimicrobial activities of selected essential oils. **Asian journal of pharmaceutical and clinical research**, v. 7, n. 4, p. 79–83, 2014.
- CHAPMAN, R. A.; MACKAY, K. The estimation of peroxides in fats and oils by the ferric thiocyanate method. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 26, n. 7, p. 360–363, 1949.
- CHOULIARA, E. et al. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 ° C. **Food Microbiology**, v. 24, p. 607–617, 2007.
- CORRÊIA, V. et al. Crescimento de jundiá e carpa húngara criados em sistema de recirculação de água. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p. 1533–1539, 2009.
- CUNHA, M. A. et al. Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction , cortisol response and sensory analysis of fillet. **Ciência Rural**, v. 40, n. 10, p. 2107–2114, 2010a.
- CUNHA, M. A. DA et al. Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 306, n. 1–4, p. 403–406, 2010b.
- DANIEL, A. P. et al. Using the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton to sedate silver catfish (*Rhamdia quelen*) during transport improved the chemical and sensory qualities of the fish during storage in ice. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 6, p. S1205-11, jun. 2014.
- DANIEL, A. P. et al. Oxidative stability during frozen storage of fillets from silver catfish (*Rhamdia quelen*) sedated with the essential oil of *Aloysia triphylla* during transport. **Ciência Rural**, v. 46, n. 3, p. 560–566, 2016.
- DILIBERTO, J. J. et al. Metabolism of citral, an alpha,beta-unsaturated aldehyde, in male F344 rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 18, n. 6, p. 866–875, 1990.

DIMA, C.; DIMA, S. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 29–35, 2015.

DU, E. et al. Effects of thymol and carvacrol supplementation on intestinal integrity and immune responses of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 7, n. 19, p. 1–10, 2016.

DUARTE, M. C. T. et al. **Essential oil microparticles and uses thereof for preventing enteric diseases**. International patent application WO/2014/028999; PCT/BR2013/000324, 26 ago 2012, 29 ago 2013, 7 jan 2016.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p. 70–77, 1959.

EMANUELLI, T.; PICCOLO, J. Qualidade da carne de jundiá. In: BARCELLOS, L. J. G.; FAGUNDES, M.; FERREIRA, D. (Eds.). **Workshop sobre jundiá: história e perspectivas**. Passo Fundo: UPF Editora, 2013. 43-73 p.

ERKAN, N. et al. The use of thyme and laurel essential oil treatments to extend the shelf life of bluefish (*Pomatomus saltatrix*) during storage in ice. **Journal of Consumer Protection and Safety**, v. 6, n. 1, p. 39–48, 2011.

ERKAN, N. The effect of thyme and garlic oil on the preservation of vacuum-packaged hot smoked rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 4, p. 1246–1254, 2012.

ESTÉVEZ, M. Protein carbonyls in meat systems: A review. **Meat Science**, v. 89, n. 3, p. 259–279, 2011.

EUROPEAN UNION. European Parliament. **Regulation on additives for use in animal feed.**, 2003.

FANDOCHAN, P. et al. Toxicity and gastric tolerance of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Ocimum basilicum* in Wistar rats. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2493–2497, 2008.

FAO. **Fishery and Aquaculture Country Profiles. Brazil (2010)**. Country Profile Fact Sheets. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Jun 2010. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/facp/BRA/en>. Acesso em: 27 abr. 2015.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture (SOFIA)**. Contributing to food security and nutrition for all. Roma. 2016. 200 p.

FARIA, J. M. S. et al. Bioactivity against *Bursaphelenchus xylophilus*: Nematotoxics from essential oils, essential oils fractions and decoction waters. **Phytochemistry**, v. 94, p. 220–228, 2013.



FRANGOS, L. et al. Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets. **Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 115–21, 2010.

FRATIANNI, F. et al. Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 8, p. M528–M535, 2010.

GANJEWALA, D. Cymbopogon essential oils: chemical compositions and bioactivities. **International Journal of Essential Oil Therapeutics**, v. 3, n. 2–3, p. 56–65, 2009.

GARLET, Q. I. et al. Effect of (+)-dehydrofukinone on GABAA receptors and stress response in fish model. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 1, p. 1–9, 2016.

GIANNENAS, I. et al. Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 350–353, p. 26–32, 2012.

GIBBS, B. F. et al. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, n. 3, p. 213–224, 1999.

GRESSLER, L. T. et al. Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. **Aquaculture Research**, v. 45, p. 1061–1072, 18 out. 2014.

GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS, L. J. Monoterpenes with analgesic activity-a systematic review. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 1, p. 1–15, 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 2008. 851p.

HARROWER, J.; BROWN, C. Blood lactic acid. A micro method adapted to field collection of microliters samples. **Journal of Applied Physiology**, v. 32, n. 5, p. 709–711, 1972.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. **Laboratory Practice**, v. 22, p. 475–476, 1973.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22–24, p. 2831–46, 2007.

HASELMEYER, A.; ZENTEK, J.; CHIZZOLA, R. Effects of thyme as a feed additive in broiler chickens on thymol in gut contents, blood plasma, liver and muscle. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 3, p. 504–508, 2015.

HERNÁNDEZ, A. et al. Study of the dose of thyme essential oil in feed to prolong the shelf life of gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Aquaculture Nutrition**, v. 21, n. 5, p. 740–749, 2015.

HERNÁNDEZ, P. et al. **Effect of dietary clove essential oil on poultry meat quality**. In: 55th INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY (ICoMST). **Anais...**Copenhagen, Denmark: 2009

HO, C.; CHEN, Q. Lipids in food flavors. **ACS Symposium Series**, 1994. 2-14 p.

HÖHN, A.; KÖNIG, J.; GRUNE, T. Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. **Journal of Proteomics**, v. 92, p. 132–159, 2013.

HONG, J.-C. et al. Effects of supplemental essential oil on growth performance, lipid metabolites and immunity, intestinal characteristics, microbiota and carcass traits in broilers. **Livestock Science**, v. 144, n. 3, p. 253–262, 2012.

HUMMEL, B. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 12, p. 1393–1399, 1959.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE: Estatística da produção pecuária**. Rio de Janeiro, 2017.

JAVAN, A. J. et al. The effect of dietary *Zataria multiflora* boiss. essential oil supplementation on microbial growth and lipid peroxidation of broiler breast fillets during refrigerated storage. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 37, n. 5, p. 881–888, 2013.

JENSEN, C. et al. Influence of the oxidative quality of dietary oil on broiler meat storage stability. **Meat science**, v. 47, n. 3–4, p. 211–222, 1997.

JOYCE, B. L. et al. Ethanol and high-value terpene co-production from lignocellulosic biomass of *Cymbopogon flexuosus* and *Cymbopogon martinii*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–17, 2015.

JOYCE, E. et al. The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured *Bacillus* species. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 10, n. 6, p. 315–318, 2003.

KHANUJA, S. P. S. et al. Essential oil constituents and RAPD markers to establish species relationship in *Cymbopogon Spreng.* (Poaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 2, p. 171–186, 2005.

KHODAMBASHI EMAMI, N. et al. The effect of peppermint essential oil and fructooligosaccharides, as alternatives to virginiamycin, on growth performance, digestibility, gut morphology and immune response of male broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 175, n. 1–2, p. 57–64, 2012.

KIRKPINAR, F.; ÜNLÜ, H. B.; ÖZDEMİR, G. Effects of oregano and garlic essential oils on performance, carcass, organ and blood characteristics and intestinal microflora of broilers. **Livestock Science**, v. 137, n. 1–3, p. 219–225, 2011.

KODAL COŞKUN, B. et al. Antioxidant active packaging with soy edible films and oregano or thyme essential oils for oxidative stability of ground beef patties. **Journal of Food Quality**, v. 37, n. 3, p. 203–212, 2014.

KREUZWIESER, J.; SCHNITZLER, J.-P.; STEINBRECHER, R. Biosynthesis of Organic Compounds Emitted by Plants. **Plant Biology**, v. 1, n. 2, p. 149–159, 1999.

KUMAR, A. et al. Biodeterioration of some herbal raw materials by storage fungi and aflatoxin and assessment of *Cymbopogon flexuosus* essential oil and its components as antifungal. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 6, p. 712–716, 2009.

LAL, K. et al. Productivity, essential oil yield, and heavy metal accumulation in lemon grass (*Cymbopogon flexuosus*) under varied wastewater–groundwater irrigation regimes. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 270–278, 2013.

LAZZARI, R. et al. Desempenho e composição dos filés de jundiás (*Rhamdia quelen*) submetidos a diferentes dietas na fase de recria. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 477–484, 2008.

LEE, Y. S. et al. Changes in broiler breast fillet tenderness, water-holding capacity, and color attributes during long-term frozen storage. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 4, p. E162–E168, 2008.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464–478, 1990.

LEYGONIE, C.; BRITZ, T. J.; HOFFMAN, L. C. Impact of freezing and thawing on the quality of meat: review. **Meat Science**, v. 91, n. 2, p. 93–8, 2012.

LOVATTO, N. D. M. et al. Efeitos de dietas contendo concentrados proteicos vegetais no desempenho e atividade de enzimas digestivas de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 2, p. 1071–1081, 2014.

LOWRY, O. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LUND, M. N. et al. Protein oxidation in muscle foods: A review. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 55, n. 1, p. 83–95, 2011.

MASNIYOM, P.; BENJAMA, O.; MANEESRI, J. Effect of turmeric and lemongrass essential oils and their mixture on quality changes of refrigerated green mussel (*Perna viridis*). **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 5, p. 1079–1085, 2012.

MATTES, R. D. Is there a fatty acid taste?. **Annual Review of Nutrition**, v. 29, p. 305–327, 2009.

MAY, A. et al. Influência do intervalo entre cortes sobre a produção de biomassa de duas espécies de capim limão. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 379–382, 2008.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Lipídeos. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. (Eds.). **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Aetmed, 2010. 131-178.

MEILGAARD, M. C.; CARR, B. T.; CIVILLE, G. V. **Sensory evaluation techniques**. 4. ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. 464 p.

MEYER, G.; FRACALOSSO, D. Estimation of jundiá (*Rhamdia quelen*) dietary amino acid requirements based on muscle amino acid composition. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 4, p. 401–405, 2005.

MILLEZI, A. F. et al. *In vitro* antimicrobial properties of plant essential oils *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* and *Laurus nobilis* against five important foodborne pathogens. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 1, p. 167–172, 2012.

MOORE-NEIBEL, K. et al. Antimicrobial activity of lemongrass oil against *Salmonella enterica* on organic leafy greens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 3, p. 485–492, 2012.

MUELA, E. et al. Effect of freezing method and frozen storage duration on instrumental quality of lamb throughout display. **Meat Science**, v. 84, n. 4, p. 662–669, 2010.

NAIR, D. V. T. et al. The combined efficacy of carvacrol and modified atmosphere packaging on the survival of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* and lactic acid bacteria on Turkey breast cutlets. **Food Microbiology**, v. 49, p. 134–141, 2015.

NIST. **EPA/NIH Mass Spectral Library and Search/Analysis Programs**. Hoboken, Wiley and Sons, 2005.

NTZIMANI, A. G.; GIATRAKOU, V. I.; SAVVAIDIS, I. N. Combined natural antimicrobial treatments (EDTA, lysozyme, rosemary and oregano oil) on semi cooked coated chicken meat stored in vacuum packages at 4 °C: Microbiological and sensory evaluation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 187–196, 2010.

OUWEHAND, A. et al. *In vitro* effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. **Veterinarni Medicina**, v. 55, n. 2, p. 71–78, 2010.

OZKECECI, R. B. et al. The effect of carcass part and packaging method on the storage stability of mechanically deboned chicken meat. **Journal of Muscle Foods**, v. 19, n. 3, p. 288–301, 2008.

PARODI, T. V et al. Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 323–334, 2014.

PENG, Q. Y. et al. Effects of dietary supplementation with oregano essential oil on growth performance, carcass traits and jejunal morphology in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 214, p. 148–153, 2016.

- RADÜNZ NETO, J.; VEIVERBERG, C. A.; LAZZARI, R. Nutrição do jundiá. In: BARCELLOS, L. J. G.; FAGUNDES, M.; FERREIRA, D. (Eds.). **Workshop sobre jundiá: história e perspectivas**. Passo Fundo: UPF Editora, 2013. 239-252 p.
- RECKNAGEL, R. O.; GLENDE, E. A. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 331–337, 1984.
- RIMINI, S.; PETRACCI, M.; SMITH, D. P. The use of thyme and orange essential oils blend to improve quality traits of marinated chicken meat. **Poultry science**, v. 93, n. 8, p. 2096–2102, 2014.
- ROSS, L.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for fish**. 3. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2008.
- RULE, D. Comparison of muscle fatty acid profiles and cholesterol concentrations of bison, beef cattle, elk, and chicken. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 5, p. 1202–1211, 2002.
- SACCHETTI, G. et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, n. 4, p. 621–632, 2005.
- SACCOL, E. M. H. et al. Addition of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown essential oil to the diet of the silver catfish: An analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. **Aquaculture**, v. 416–417, p. 244–254, 2013.
- SANTOS, A. et al. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 436–441, 2009.
- SCHERER, R. et al. Microencapsulated eucalyptol and eugenol as growth promoters in broilers. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 5, n. 1, p. 26, 2014.
- SENA, A. C. et al. Essential oil from *Lippia alba* has anaesthetic activity and is effective in reducing handling and transport stress in tambacu (*Piaractus mesopotamicus*×*Colossoma macropomum*). **Aquaculture**, v. 465, p. 374–379, 2016.
- SHANTHA, N.; DECKER, E. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. **Journal of AOAC International**, v. 77, n. 2, p. 421–4, 1994.
- SHARMA, P. R. et al. Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 179, n. 2–3, p. 160–8, 2009.
- SILFVERGRIP, A.M.C. A sistemática revisão do neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae). Stockholm, Sweden, 1996. 156p. (PhD Thesis) - Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, 1996.
- SILVA, S. M. C. S. DA; MURA, J. D. P. **Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2010.

- SILVEIRA, S. M. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and foodborne pathogens. **Ciência Rural**, v. 42, n. 7, p. 1300–1306, 2012.
- SMAOUI, S. et al. Bio-preservative effect of the essential oil of the endemic *Mentha piperita* used alone and in combination with BacTN635 in stored minced beef meat. **Meat Science**, v. 117, p. 196–204, 2016.
- SOYER, A. et al. Effects of freezing temperature and duration of frozen storage on lipid and protein oxidation in chicken meat. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 1025–1030, 2010.
- SPIES, J. R. Colorimetric procedures for amino acids. **Methods in Enzymology**, v. 3, p. 467–477, 1957.
- STADTMAN, E. R. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed. **Annual Review of Biochemistry**, v. 62, p. 797–821, 1993.
- SYMEON, G. K. et al. Effect of dietary oregano essential oil supplementation for an extensive fattening period on growth performance and breast meat quality of female medium-growing broilers. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 89, n. 3, p. 331–334, 2009.
- TACO. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 4. ed. Campinas: NEPA-Unicamp, 2011.
- TAK, J.-H.; ISMAN, M. B. Metabolism of citral, the major constituent of lemongrass oil, in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, and effects of enzyme inhibitors on toxicity and metabolism. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 133, p. 20–25, 2016.
- TEIXEIRA, R. R. et al. Essential oil of *Aloysia triphylla* in Nile tilapia: anaesthesia, stress parameters and sensory evaluation of fillets. **Aquaculture Research**, v. 48, p. 3383–3392, 2017.
- THAYALINI, K., SHANMUGAVELU, S., SAMINATHAN, M. Effects of *Cymbopogon citratus* leaf and *Zingiber officinale* rhizome supplementation on growth performance, ileal morphology and lactic acid concentration in broilers. **Malaysian Journal of Animal Science**, v. 49, n. 1, p. 43–49, 2011.
- TIMM-HEINRICH, M. et al. Oxidative changes during ice storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed different ratios of marine and vegetable feed ingredients. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3–4, p. 1220–1230, 2013.
- TRAESEL, C. K. et al. Serum biochemical profile and performance of broiler chickens fed diets containing essential oils and pepper. **Comparative Clinical Pathology**, v. 20, p. 453–460, 2011.
- TWB. The World Bank. **Fish to 2030: Prospects for fisheries and aquaculture**. Agriculture and environmental services discussion paper. Washington, 2013. Disponível em: <http://documents.worldbank.org/curated/en/2013/12/18882045/fish-2030-prospects-fisheries-aquaculture>. Acesso em: 5 mai, 2016.

UTRERA, M.; MORCUENDE, D.; ESTÉVEZ, M. Fat content has a significant impact on protein oxidation occurred during frozen storage of beef patties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 62–68, 2014.

VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, 2016.

VEECK, A. P. L. et al. Lipid stability during the frozen storage of fillets from silver catfish exposed in vivo to the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 4, p. 955–60, 2013.

VEIT, J. C. et al. Stability of frozen fillets from silver catfish anesthetized with essential oil of *Lippia alba* prior to electrical stunning or hypothermia. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2016.

VERDOUW, H.; VAN ECHELD, C.; DEKKERS, E. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. **Water Research**, v. 12, n. 6, p. 399–402, 1978.

VIEIRA, C. et al. Effect of frozen storage conditions (temperature and length of storage) on microbiological and sensory quality of rustic crossbred beef at different states of ageing. **Meat Science**, v. 83, n. 3, p. 398–404, 2009.

VRANOVÁ, E.; COMAN, D.; GRUISSEM, W. Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. **Molecular Plant**, v. 5, n. 2, p. 318–333, 2012.

WALL, R. et al. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. **Nutrition reviews**, v. 68, n. 5, p. 280–289, 2010.

WINK, M. **Biochemistry of plant secondary metabolism**. 2. ed. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2010.

WROLSTAD, R. E. et al. (EDS.). **Handbook of food analytical chemistry: pigments, colorants, flavors, texture and bioactive food components**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2005.

YAN, L. et al. Influence of essential oil supplementation and diets with different nutrient densities on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, meat quality and fecal noxious gas content in grower-finisher pigs. **Livestock Science**, v. 128, n. 1–3, p. 115–122, 2010.

YANG, Y. et al. Functional assessment of encapsulated citral for controlling necrotic enteritis in broiler chickens. v. 95, n. 4, p. 780–789, 2010.

ZEPKA, L. Q. et al. Study of the volatile compounds useful for the characterization of frozen anchoita (*Engraulis anchoita*) by SPME-GC-MS. In: **Flavour Science: Proceedings from XIII Weurman Flavour Research Symposium**. [s.l.] Academic Press, 2013. p. 742.

ZEPPENFELD, C. C. et al. Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Aquaculture Nutrition**, v. 22, n. 4, p. 933–940, 2016.

ZHELJAZKOV, V. D. et al. Lemongrass productivity, oil content, and composition as a function of nitrogen, sulfur, and harvest time. **Agronomy Journal**, v. 103, n. 3, p. 805–812, 2011.

ZHENG, Z. L. et al. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v. 292, n. 3–4, p. 214–218, 2009.



## **ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Título do projeto: “**ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO (*Cymbopogon flexuosus*) NA DIETA DE FRANGOS E PEIXES: IMPACTO SOBRE A QUALIDADE DA CARNE**”

Pesquisador responsável: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tatiana Emanuelli

Instituição/Departamento: Universidade Federal de Santa Maria/Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos – CCR

Telefone para contato (inclusive a cobrar): (55) 3220-8547

Pesquisadores participantes: Cristine Rampelotto

Telefone: (55) 81134908

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa que tem como objetivo avaliar se a adição de óleo essencial de capim-limão na ração de frangos e peixes modifica as características da carne ou aumenta sua vida comercial. Você precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma.

### ***Procedimentos a serem realizados***

Se aceitar participar desta pesquisa você passará por um treinamento a fim de torná-lo capaz de identificar e diferenciar as alterações ocorridas no pescado refrigerado, que será realizado sete dias antes da análise sensorial. Durante o treinamento serão apresentadas a você amostras de pescados com tempos crescentes desde o abate, identificadas com a data de abate, para que você conheça os diferentes estágios de deterioração do pescado e consiga identificar as modificações que ocorrem no pescado após o abate e que serão avaliadas na análise sensorial.

Sete dias após o treinamento você participará da primeira análise sensorial do pescado inteiro, que deverá ser repetida 2, 6, 9, 16, 25, 33, 37 e 41 dias após esta primeira análise. No momento das análises serão apresentadas a você amostras de pescado inteiro a quais não precisarão ser mastigadas nem deglutidas, mas apenas visualizadas e avaliadas em relação as suas características externas. Você receberá luvas de látex descartáveis e pinças para avaliar a aparência geral, firmeza do músculo, odor, presença de muco e cor das brânquias, características do olho e orifício anal do pescado.

Em outra ocasião você receberá também amostras de filé de pescado e de peito de frango cozidas, que deverão ser avaliadas em relação aos parâmetros de cor, aroma, sabor e textura, e para tanto, deverão ser analisadas visualmente e mastigadas, mas não necessariamente deglutidas. O resultado da sua avaliação deverá ser marcado em uma ficha de resposta.

### ***Riscos possíveis e benefícios esperados***

Fica claro que você não é obrigado a participar do projeto. No caso de recusa você não terá nenhum tipo de prejuízo. A qualquer momento da pesquisa você é livre para retirar-se da mesma.

Os alimentos oferecidos nas análises em que é necessário mastigar a carne são seguros e de boa qualidade. No entanto, nos testes de avaliação do peixe inteiro, em que é feita avaliação apenas visual e de odor, pode ocorrer desconforto quanto à aparência ou odor do pescado, especialmente quando os peixes estiverem em estágio avançado de deterioração. Neste, caso lhe será oferecida uma máscara para minimizar o odor desagradável.

Se você possuir alergia a carne de frango, peixes ou frutos do mar não é recomendado que participe deste estudo. Caso ocorra alguma reação adversa será conduzido imediatamente a um hospital ou unidade de pronto atendimento do município.

Não haverá benefício financeiro pela sua participação e nenhum custo para você. Você não terá benefícios diretos, entretanto, ajudará a avaliar se o uso de produtos naturais (óleos essenciais de plantas) na ração de animais modifica o sabor ou o gosto da carne de peito de frango e de filés de jundiá.

**Garantia de acesso**

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

**Confidencialidade e utilização dos dados obtidos**

Os dados obtidos com esta pesquisa serão publicados em revistas científicas reconhecidas. Os seus dados serão analisados em conjunto com os de outros participantes, assim, não aparecerão informações que possam lhe identificar, sendo mantido o sigilo de sua identidade. O material coletado e os seus dados serão utilizados somente para esta pesquisa e ficarão guardados com o pesquisador por cinco anos, após o qual serão destruídos.

Consentimento da participação da pessoa como julgador em teste de análise sensorial.

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do estudo de análise sensorial de frango e pescado como julgador. Fui suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO (*Cymbopogon flexuosus*) NA DIETA DE FRANGOS E PEIXES: IMPACTO SOBRE A QUALIDADE DA CARNE**”. Eu discuti com a MSc. Cristine Rampelotto sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Local e data \_\_\_\_\_

Nome e Assinatura do sujeito ou responsável: \_\_\_\_\_

Este estudo obteve aprovação junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria, com protocolo nº XXXXXX.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito de pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

Santa Maria \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ de 201\_\_.

\_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável

---

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato: Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM - Cidade Universitária - Bairro Camobi, Av. Roraima, nº1000 - CEP: 97.105.900 Santa Maria – RS. Telefone: (55) 3220-9362 – Fax: (55)3220-8009 Email: comiteeticapesquisa@smail.ufsm.br. Web: www.ufsm.br/cep

## ANEXO B – FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL COM ESCALA HEDÔNICA DE NOVE PONTOS

Amostra: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: ( )M ( )F Data: \_\_\_\_\_

Você está recebendo uma amostra codificada de carne cozida, avalie cada atributo seguindo a escala presente na primeira coluna da tabela.

Escala	Atributo			
	Cor	Aroma	Sabor	Textura
Gostei muitíssimo				
Gostei muito				
Gostei moderadamente				
Gostei pouco				
Não gostei nem desgostei				
Desgostei pouco				
Desgostei moderadamente				
Desgostei muito				
Desgostei muitíssimo				

Observações: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**ANEXO C – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM**

**CARTA DE APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

**Título do Projeto:** "Óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosos*) na dieta de frangos e peixes: impacto sobre a qualidade da carne."

**Número do Parecer:** 120/2014

**Pesquisador Responsável:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tatiana Emanuelli

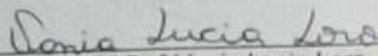
Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

**OBS:** Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.

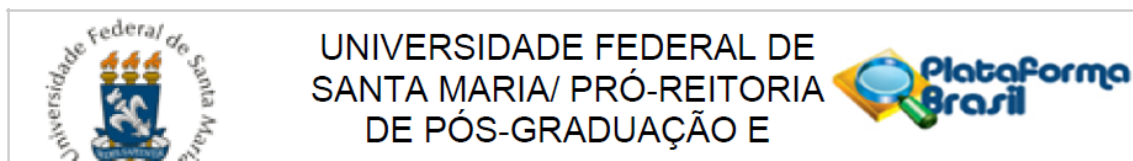
Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

**DATA DE APROVAÇÃO:** 05/01/2015.

Santa Maria, 05 de janeiro de 2015.

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vania Lucia Loro  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais- UFSM

## ANEXO D – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – UFSM



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO E

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO (*Cymbopogon flexuosus*) NA DIETA DE FRANGOS E PEIXES: IMPACTO SOBRE A QUALIDADE DA CARNE

**Pesquisador:** Tatiana Emanuelli

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 36317414.3.0000.5346

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 832.889

**Data da Relatoria:** 14/10/2014

#### Apresentação do Projeto:

O estudo consiste na avaliação sensorial de amostras pescado e de filés de jundiá por julgadores 30 não treinados e 20 treinados. Os peixes (jundiás) e os frangos serão previamente alimentados com ração contendo óleo essencial de *C. flexuosus* durante 20 dias.

A intenção do projeto é verificar se a adição de óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* na ração de frangos e peixes prolongará a vida comercial da carne destes animais armazenada congelada, por retardar as reações de oxidação lipídica, além de retardar a deterioração microbiológica do pescado armazenado sob refrigeração por retardar a deterioração microbiológica.

#### Objetivo da Pesquisa:

**Geral:** Avaliar a implicação da suplementação com óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* na ração de frangos e peixes sobre características físicoquímicas, microbiológicas e sensoriais da carne.

**Específicos:** Caracterizar o óleo essencial de *C. flexuosus* quanto a sua composição e capacidades antioxidante e antimicrobiana in vitro e em modelo de alimento;

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

**Bairro:** Camobi

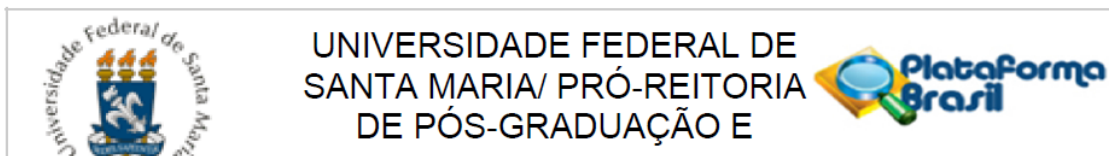
**CEP:** 97.105-970

**UF:** RS

**Município:** SANTA MARIA

**Telefone:** (55)3220-9362

**E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 832.889

Investigar o efeito da suplementação com óleo essencial de *C. flexuosus* na dieta de frangos de abate sobre a composição, oxidação lipídica, oxidação proteica, características físicas e sensoriais e vida útil de peitos armazenados congelados;

Avaliar o efeito da suplementação com óleo essencial de *C. flexuosus* na dieta de jundiás (*Rhamdia quelen*) sobre a composição, oxidação lipídica, oxidação proteica, características físicas e sensoriais e vida útil de filés armazenados congelados;

Avaliar o efeito da suplementação com óleo essencial de *C. flexuosus* na dieta de jundiás sobre a qualidade da carne, indicadores de frescor e a vida útil do pescado armazenado inteiro em gelo.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

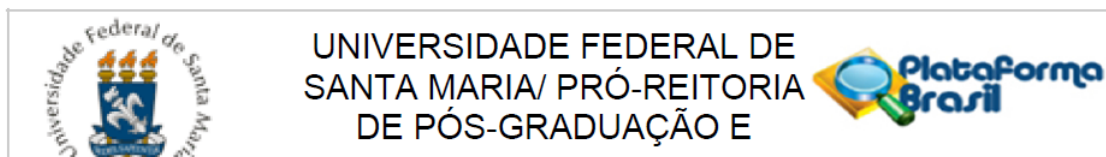
**Riscos:** Na análise da sensorial da carne de peito de frango e de filés de pescado não são esperados prejuízos ou riscos a saúde dos participantes, pois a carne será fresca, utilizada imediatamente após o abate, e os procedimentos de preparo seguirão as normas de boas práticas de fabricação. Sujeitos que possuam alergia a carne de frango, peixes ou frutos do mar serão excluídos do estudo. No entanto, caso ocorra alguma reação adversa após a realização da análise, o participante será conduzido imediatamente a um hospital ou unidade de pronto atendimento do município. Na análise sensorial da vida útil comercial do pescado inteiro refrigerado não haverá contato da amostra com a boca do provador. Pode ocorrer apenas desconforto individual quanto à aparência ou odor do pescado em estágio avançado de deterioração, e nesta condição, os julgadores receberão máscaras para minimizar o odor desagradável.

**Benefícios:** Não haverá benefício financeiro pela participação e nenhum custo para os participantes. O participante não terá benefícios diretos, entretanto, ajudará a avaliar se o uso de produtos naturais (óleos essenciais de plantas) na ração de animais modifica o sabor ou o gosto da carne de peito de frango e de filés de jundiá.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

.

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar  
**Bairro:** Camobi **CEP:** 97.105-970  
**UF:** RS **Município:** SANTA MARIA  
**Telefone:** (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 832.889

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos de apresentação obrigatório foram apresentados adequadamente.

**Recomendações:**

A resolução do CNS em vigor é 466/12 e não mais a 196/96.

Acesse ao novo site do CEP - <http://coral.ufsm.br/cep> - e, na aba "Orientações gerais", encontre modelos para apresentação de documentos.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SANTA MARIA, 15 de Outubro de 2014

---

**Assinado por:**  
**CLAUDEMIR DE QUADROS**  
(Coordenador)