

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

**ÓLEO ESSENCIAL E INFUSÃO DE *Aloysia  
triphylla*: EFEITOS NA ESTABILIDADE DA CARNE  
DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)**

**TESE DE DOUTORADO**

**Ana Paula Daniel**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

**ÓLEO ESSENCIAL E INFUSÃO DE *Aloysia triphylla*:  
EFEITOS NA ESTABILIDADE DA CARNE DE JUNDIÁ  
(*Rhamdia quelen*)**

**Ana Paula Daniel**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de concentração Ciência e  
Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,  
RS) como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**Orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatiana Emanuelli**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2014**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**ÓLEO ESSENCIAL E INFUSÃO DE *Aloysia triphylla*: EFEITOS NA  
ESTABILIDADE DA CARNE DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)**

elaborado por  
**Ana Paula Daniel**

como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Tatiana Emanuelli, Dr<sup>a</sup>**  
(Presidente/Orientadora)

**Paula Rossini Augusti, Dr<sup>a</sup>** (UFRGS)

**Luciano de Oliveira Garcia, Dr.** (FURG)

**Vivian Caetano Bochi, Dr<sup>a</sup>** (UFSM)

**Ernesto Hashime Kubota, Dr.** (UFSM)

Santa Maria, 22 de agosto de 2014.

## AGRADECIMENTOS

À minha família “amores da minha vida” que estiveram sempre comigo, agradeço todo o carinho, aconchego e atenção, especialmente ao meu marido Leonardo e ao meu filho Antônio que chegou a nossas vidas com muito amor e carinho e participou intensivamente de alguns experimentos e momentos importantes do doutorado.

Aos meus pais, Elói e Marli pelos quais tenho muito carinho, admiração e amor eterno! Agradeço todo o carinho e amor que eles têm proporcionado ao longo de minha vida!

A minha irmã Raquel e meu irmão Jonatan que participam da minha história de vida e estão sempre presentes com seu conselho e carinho, e os quais amo muito. Também agradeço o carinho das minhas cunhadas Cissa e Miche e meus cunhados Evandro e Fernando e sobrinhos Miguel, Felipe, Pedro e Bruno.

Agradeço o carinho que sempre tive da “vovó do céu” minha sogra Nelsi “*in memoriam*” que sempre esteve ao nosso lado e também ao meu sogro Lauro.

Minha eterna gratidão para a admirável orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Tatiana Emanuelli, o meu exemplo profissional e pessoal. Obrigada pelos ensinamentos, pela compreensão, pela amizade, pelas dicas maternas, enfim por tudo que me ensinou sobre a docência, relação professor e aluno, e pela grandiosa área de Ciência e Tecnologia dos Alimentos. O meu, muito obrigada!!!

As amigas Ana, Jaqueline, Bruna, Lauren, Amanda, Andréia, Juliana, Sabrina, Luana, Cristine e amigo Miguel pelos momentos de descontração, palavras de carinho, amizade, parceria e principalmente pela ajuda fundamental na execução deste projeto. Podem contar sempre comigo!!! A todos os colegas que passaram e ou estão trabalhando no NIDAL agradeço as palavras de carinho e pela convivência tão agradável durante esses anos.

Aos meus colegas e alunos do Colégio Politécnico pelo carinho e atenção, em especial a Prof<sup>ª</sup> Ísis Portolan dos Santos, que sempre esteve ao meu lado.

Aos professores do DCTA e do PPGCTA pelos ensinamentos e amizade, e aos colegas do doutorado pelo convívio e amizade durante as aulas. Ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia e Ciência dos Alimentos da UFSM, por possibilitar a realização deste trabalho, em especial a servidora Lia Pisani Cidade.

Ao Prof. Bernardo Baldisserotto, a Prof<sup>a</sup> Berta Maria Heinzmann e o Prof. Carlos Augusto Mallmann, Prof. Mauro Alves da Cunha, e colegas Carla Cristina Zeppenfeld, Maurício Schneider Oliveira, , Thaylise Vey Parodi e técnica Liana Guidolin Milani, pelas contribuições na realização dos trabalhos e artigos.

Aos membros da banca, Prof<sup>a</sup> Paula Rossini Augusti, Prof. Luciano de Oliveira Garcia, Prof<sup>a</sup> Vivian Caetano Boachi, Prof. Ernesto Hashime Kubota, Prof<sup>a</sup> Rosa Cristina Preste e Prof. João Radünz Neto por terem aceitado o convite, pela análise e contribuições deste trabalho.

Ao Carlos Rubini Junior pelo seu trabalho na injeção das amostras no cromatógrafo gasoso e pela amizade durante os trabalhos no Nidal.

A todos aqueles, que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente a Deus pela constante presença, amor e por guiar nosso destino, nesta linda trajetória que é a VIDA! Muito obrigada!!!!

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos  
Universidade Federal de Santa Maria

### **ÓLEO ESSENCIAL E INFUSÃO DE *Aloysia triphylla*: EFEITOS NA ESTABILIDADE DA CARNE DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)**

AUTORA: ANA PAULA DANIEL

ORIENTADORA: TATIANA EMANUELLI

Data e Local de Defesa: Santa Maria, 22 de agosto de 2014.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do óleo essencial de *Aloysia triphylla* (OAT) e da infusão de *A. triphylla* (IAT) na estabilidade da carne de jundiá (*Rhamdia quelen*) com ênfase nas alterações microbiológicas, químicas e sensoriais do pescado. O  $\alpha$ -citral (29,4%) e o  $\beta$ -citral (20,8%) foram os compostos majoritários do OAT, seguidos do limoneno (11,9%). Na IAT foram identificados como compostos majoritários a isoquercetrina > ácido rosmarínico > luteolina. No 1º experimento avaliou-se a atividade antimicrobiana do OAT contra cepas isoladas de alimentos, a estabilidade microbiológica de filés refrigerados após imersão em solução de OAT, bem como as alterações microbiológicas durante a armazenagem sob refrigeração de jundiás inteiros previamente sedados com OAT durante o transporte *in vivo*. Os ensaios *in vitro* revelaram que o OAT apresenta ação inibidora forte contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, e moderada contra *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Choleraesuis* e *Salmonella Enteritidis*, mas não inibe *Pseudomonas aeruginosa*. Os filés imersos em OAT 30 ou 40  $\mu\text{L/L}$  apresentaram menores contagens de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos que o controle ( $p < 0,05$ ) ao longo do armazenamento. Os peixes sedados com 40  $\mu\text{L/L}$  de OAT durante o transporte tiveram contagens de psicrotróficos menores que o controle após 7 e 28 dias ( $p < 0,05$ ), enquanto as contagens de mesófilos foram semelhantes ao controle durante o armazenamento. No 2º experimento foi investigado se o uso do OAT na água (0, 30 ou 40  $\mu\text{L/L}$ ) como sedativo durante o transporte de jundiás pode retardar as modificações químicas e sensoriais do pescado inteiro refrigerado. A exposição do jundiá a 40  $\mu\text{L/L}$  de OAT durante o transporte retardou o início do *rigor mortis*, bem como a degradação de inosina 5'-monofosfato em inosina comparado ao controle ( $p < 0,05$ ), prolongando o frescor do pescado. Os peixes expostos a 30 ou 40  $\mu\text{L/L}$  de OAT receberam menor escore sensorial de demérito que o controle ( $p < 0,05$ ) após 10 dias de armazenamento, enquanto os expostos a 40  $\mu\text{L/L}$  de OAT apresentaram maior vida útil (35 dias em gelo) que o controle ( $p < 0,05$ ). No 3º experimento foi avaliado se o uso do OAT na água como sedativo durante o transporte de jundiás influencia a estabilidade lipídica dos filés do pescado durante o congelamento. A exposição 30 e 40  $\mu\text{L/L}$  de OAT resultou em maior teor inicial de produtos primários da oxidação lipídica (dienos conjugados, DC) nos filés, enquanto os filés dos peixes expostos a 40  $\mu\text{L/L}$  de OAT apresentaram menor teor de produtos secundários da oxidação lipídica (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, TBARS) que os peixes controle após 6, 9 e 17 meses de congelamento ( $p < 0,05$ ). No 4º experimento avaliou-se a atividade antioxidante da IAT *in vitro* e a estabilidade lipídica e cor instrumental de filés congelados após a imersão em água destilada (controle) ou IAT (1, 2,5 ou 5%). O efeito antioxidante da IAT (1-5%) foi constatado pelos menores valores DC após 7 meses de congelamento, bem como valor de TBARS inferior ao controle após 4, 7 e 10 meses de congelamento nos filés tratados. Independente do tempo de armazenagem, o tratamento com IAT 5% reduziu a luminosidade, aumentou a tendência ao amarelo e o croma comparado aos filés controle, enquanto o tratamento com IAT 2,5% aumentou apenas a tendência ao amarelo. No entanto, a variação total de cor dos filés tratados com IAT 2,5 e 5% ao longo do congelamento foi menor que nos filés controle ( $p < 0,05$ ). Os resultados indicam que o OAT possui atividade antimicrobiana contra patógenos e micro-organismos indicadores de qualidade dos alimentos. Além disso, a utilização do OAT como um sedativo na água de transporte de jundiás prolongou o frescor e aumentou a vida útil do pescado inteiro refrigerado, além de retardar a oxidação lipídica dos filés durante o armazenamento congelado. A imersão de filés de jundiás na IAT retardou a oxidação lipídica e as mudanças na coloração durante o armazenamento congelado, podendo estender a vida útil dos filés. Estes resultados indicam o grande potencial da *A. triphylla* na área de processamento pescados, tanto no tratamento pré-abate (sedativo) como pós-abate (aditivo alimentar natural).

**Palavras-chave:** *Aloysia triphylla*. Terpenóides. Polifenóis. Antimicrobiano. Antioxidante. Pescado.

## ABSTRACT

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

### ESSENTIAL OIL AND INFUSION OF *Aloysia triphylla*: EFFECTS ON STABILITY OF SILVER CATFISH FLESH (*Rhamdia quelen*)

AUTHOR: ANA PAULA DANIEL

ADVISER: TATIANA EMANUELLI

Place and date of defense: Santa Maria, August 22, 2014.

This study has aimed to evaluate the effects of treatments with essential oil (OAT) and infusion of *Aloysia triphylla* (IAT) on microbiological, chemical and sensory stability of silver catfish (*Rhamdia quelen*).  $\alpha$ -citral (29.4%) and  $\beta$ -citral (20.8%) were the main components of OAT, followed by limonene (11.9%). Major compounds identified in the IAT were isoquercetrin > rosmarinic acid > luteolin. Experiments were divided in four parts in which the first has been aimed at evaluating the antimicrobial activity of OAT against foodborne bacteria strains, the microbiological stability of silver catfish fillets refrigerated after dipping in OAT solution and the microbiological changes during the ice storage of whole silver catfish previously sedated with OAT during the transport *in vivo*. *In vitro* assays revealed that the OAT has strong inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*, and moderate inhibitory activity against *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Choleraesuis and *Salmonella* Enteritidis, but does not inhibit *Pseudomonas aeruginosa*. Fillets immersed in 30 or 40  $\mu$ L/L of OAT had lower mesophilic and psychrotrophic counts than control ( $p < 0.05$ ) during storage. Entire refrigerated fish that were previously sedated with 40  $\mu$ L/L of OAT showed lower counts for psychrotrophic at the 7<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup> days of storage than control ( $p < 0.05$ ), whereas the mesophilic counts were similar to the control during storage. The 2<sup>nd</sup> experiment has aimed to determine whether the use of OAT in the water (0, 30 or 40  $\mu$ L/L) to sedate silver catfish during transport would delay the chemical and the sensory *post mortem* changes of refrigerated whole fish. Freshness of entire silver catfish was extended by sedation with 40  $\mu$ L/L of OAT as indicated by the delay in the onset of *rigor mortis* and in the degradation of inosine 5'-monophosphate into inosine compared to the control ( $p < 0.05$ ). Fish exposed to 30 or 40  $\mu$ L/L OAT received lower demerit scores than the control ( $p < 0.05$ ) in sensory evaluation after 10 days of storage, whereas fish treated with 40  $\mu$ L/L of OAT had higher shelf life (35 days in ice) than the control ( $p < 0.05$ ). In the 3<sup>rd</sup> experiment, we assessed whether the use of OAT in the water to sedate silver catfish during transport would influence the lipid stability of fish fillets during frozen storage (17 months). The fillets from fish exposed to 30 and 40  $\mu$ L/L of OAT had higher initial content of primary products of lipid oxidation (conjugated dienes, CD) than control fillets, whereas the fillets from fish exposed to 40  $\mu$ L/L of OAT had lower content of secondary products of lipid oxidation (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) after 6, 9 and 17 months of frozen storage than control fillets ( $p < 0.05$ ). The 4<sup>th</sup> experiment was aimed at evaluating the *in vitro* antioxidant activity of IAT and the lipid stability and instrumental color of frozen fillets after immersion in distilled water (control) or IAT (1, 2.5 or 5%). The antioxidant effect of IAT (1-5%) was demonstrated as the treated fillets had lower CD values after 7 months of storage, as well as lower TBARS value than control after 4, 7 and 10 months of storage. Regardless of the storage time, the treatment with 5% IAT reduced brightness, increased the yellowness and chroma compared to control fillets, whereas the treatment with 2.5% IAT only increased the yellowness. However, the total color change during the storage of fillets treated with 2.5 and 5% IAT was lower than in control fillets ( $p < 0.05$ ). These results indicate that OAT has antimicrobial activity against foodborne bacteria. Furthermore, the use of OAT as a sedative in the transport of silver catfish extended the freshness and increased shelf life of the refrigerated whole fish, and also delayed lipid oxidation of the fillets during frozen storage. Dipping silver catfish fillets in IAT delayed lipid oxidation and color changes during frozen storage, which can extend the shelf life of fillets. These results indicate the great potential of *A. triphylla* in the fish processing sector as a pre-slaughter treatment (sedative) or in the post-slaughter period (natural food additive).

**Keywords:** *Aloysia triphylla*. Terpenoids. Polyphenols. Antimicrobial. Antioxidant. Fish.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

- Figura 1 – Exemplar de jundiá (*Rhamdia quelen*) e seu filé (DANIEL, A. P.).....15  
Figura 2 – Exemplar de *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton (DANIEL, A.P., identificada por LONGHI, S.J. UFSM).....26

### ARTIGO 1

- Figura 1 - Mudanças nas contagens de bactérias mesófilos (A) e psicrótróficos (B) de filés de jundiá tratados com o óleo essencial de *A. triphylla* (AT) durante o armazenamento sob refrigeração.....60  
Figura 2 - Efeito da exposição *in vivo* a diferentes concentrações de óleo essencial de *A. triphylla* (AT) nas contagens de bactérias mesófilas (A) e psicrótróficos (B) no músculo de jundiá armazenados em gelo.....61

### ARTIGO 2

- Figura 1 - Avaliação de *rigor mortis*, durante o armazenamento de gelo de jundiá que foram expostas *in vivo* a diferentes concentrações do óleo essencial de *A. triphylla* (L'Her.) Britton (AT).....66  
Figura 2 - Efeito de exposição *in vivo* de diferentes concentrações de óleo essencial de *A. triphylla* (L'Her.) Britton (AT) sobre a degradação de nucleótideos em músculos de jundiá armazenado em gelo.....67  
Figura 3 - Mudanças na qualidade sensorial durante o armazenamento refrigerado de jundiá que foram expostas *in vivo* ao óleo essencial de *A. triphylla* (L'Her.) Britton (AT).....68

### ARTIGO 3

- Figura 1 - Efeito da exposição *in vivo* ao óleo essencial de *Aloysia triphylla* (AT) sobre o valor de pH de filés de jundiá durante o armazenamento congelado.....85  
Figura 2 - Efeito da exposição *in vivo* ao óleo essencial de *Aloysia triphylla* (AT) sobre os valores de dienos conjugados (DC) (A) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (B) nos filés de jundiá durante armazenamento congelado.....86

### ARTIGO 4

- Figura 1 - Efeito do tratamento com infusão de *A. triphylla* sobre o valor de pH de filés de jundiá durante armazenamento congelado.....94  
Figura 2 - Efeito do tratamento com infusão de *A. triphylla* (IAT) sobre os valores de dienos conjugados (DC) (A) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (B) de filés de jundiá durante armazenamento congelado.....96



## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

- Tabela 1 - Atividade antimicrobiana contra micro-organismos alimentares avaliadas como a zona de inibição (mm) no teste de disco difusão em ágar.....57
- Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da AT contra micro-organismos alimentares selecionados.....58

### ARTIGO 2

- Tabela 1 – Esquema de avaliação sensorial da Unidade de Pesquisa Alimentar da Tasmânia (TFRU) modificado para jundiá.....66
- Tabela 2 - Valores dos parâmetros de qualidade da água antes e depois do transporte (6 h) de jundiá (*Rhamdia quelen*) em sacos plásticos com o óleo essencial de *A. triphylla* (L'Her.) Britton adicionado à água.....66

### ARTIGO 4

- Tabela 1 - Parâmetros de monitoramento da varredura de reação múltipla para os compostos fenólicos.....92
- Tabela 2 - Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante das infusões de *A. triphylla* (IAT).....94
- Tabela 3 - Efeito do tratamento com infusão de *A. triphylla* (IAT) sobre as coordenadas de cor de filés de jundiá durante o armazenamento congelado.....97

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADP** – Adenosina 5'-difosfato  
**AGL** – Ácido graxo livre  
**AMP** – Adenosina 5'-monofosfato  
**ANOVA** – Análise de variância  
**AT** – Óleo essencial de *Aloysia triphylla*  
**ATP** – Adenosina trifosfato  
**BHA** – Butil hidroxianisol  
**BHT** – Butil hidroxitolueno  
**DC** – Dienos conjugados  
**DHA** – Ácido docosahexaenóico  
**DNA** – Ácido desoxirribonucléico  
**DPPH** – 1,1-difenil-2-picrilhidrazil  
**EPA** – Ácido eicosapentaenóico  
**FAME** – Metil éster de ácido graxo  
**GP** – Galato de propila  
**HxR** – Inosina  
**IMP** – Inosina 5'-monofosfato  
**MDA** – Malondialdeído  
**MIC** – Concentração inibitória mínima  
**MUFA** – Ácidos graxos monoinsaturados  
**NCCLS** – Comissão Nacional para Padrões Clínicos de Laboratório  
**PUFA** – Ácidos graxos poliinsaturados  
**EROs** – Espécies reativas de oxigênio  
**SFA** – Ácidos graxos saturados  
**TBARS** – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
**TBHQ** – Terc-butil-hidroquinona  
**TFRU** – Unidade de Pesquisa Alimentar da Tasmânia  
**TMA** – Trimetilamina  
**TMAO** – Óxido de trimetilamina

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>1.1 Jundiá</b> .....	13
<b>1.2 Manejo de peixe e o estresse</b> .....	16
<b>1.3 Anestésicos naturais</b> .....	18
<b>1.4 Qualidade da carne do pescado</b> .....	19
<b>1.5 <i>Aloysia triphylla</i></b> .....	25
<b>1.6 Conservantes e antioxidantes de alimentos</b> .....	29
<b>OBJETIVOS</b> .....	31
<b>DESENVOLVIMENTO</b> .....	32
<b>ARTIGO 1</b> - Antimicrobial activity of the essential oil of <i>Aloysia triphylla</i> (L'Her.) Britton: effect against foodborne bacteria <i>in vitro</i> and on the microbiological quality of fish fillets and whole fish.....	32
<b>Abstract</b> .....	36
<b>Introdução</b> .....	38
<b>Material e métodos</b> .....	40
<b>Resultados e discussão</b> .....	45
<b>Referências</b> .....	52
<b>3. ARTIGO 2</b> - Using the essential oil of <i>Aloysia triphylla</i> (l'Her.) Britton to sedate silver catfish ( <i>Rhamdia quelen</i> ) during transport improved the chemical and sensory qualities of the fish during storage in ice.....	62
<b>Abstract</b> .....	63
<b>Introdução</b> .....	63
<b>Material e métodos</b> .....	64
<b>Resultados e discussão</b> .....	65
<b>Conclusão</b> .....	68
<b>Referências</b> .....	69
<b>ARTIGO 3</b> - Estabilidade lipídica de filés congelados de jundiás ( <i>Rhamdia quelen</i> ) sedados com o óleo essencial de <i>Aloysia triphylla</i> (L'Her.) Britton durante o transporte.....	70
<b>Resumo</b> .....	71
<b>Abstract</b> .....	72
<b>Introdução</b> .....	72
<b>Material e métodos</b> .....	74
<b>Resultados e discussão</b> .....	76

<b>Conclusão</b> .....	79
<b>Referências</b> .....	79
<b>ARTIGO 4 - Efeito da infusão de <i>Aloysia triphylla</i> na estabilidade de filés de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) congelados</b> .....	87
<b>Resumo</b> .....	88
<b>Abstract</b> .....	89
<b>Introdução</b> .....	89
<b>Material e métodos</b> .....	90
<b>Resultados e discussão</b> .....	92
<b>Conclusão</b> .....	98
<b>Referências</b> .....	98
<b>DISCUSSÃO</b> .....	101
<b>CONCLUSÃO</b> .....	106
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	107

## INTRODUÇÃO

Após o abate, o pescado torna-se altamente perecível, o que leva a alterações associadas com a perda de qualidade, tais como hidrólise, oxidação lipídica e protéica, formação de aminas (voláteis e biogênicas) e alterações microbiológicas, resultando em modificações na cor, sabor e textura (HULTMANN et al., 2012).

O curso e a velocidade destas alterações é crítico para determinar a qualidade e a vida útil dos pescados e seus derivados, sendo necessário o desenvolvimento de estratégias para minimizar ou retardar essas mudanças (BOSWORTH et al., 2007). Desta forma, a busca por substâncias químicas naturais que apresentem baixa toxicidade e, com potencial de aplicação na aquicultura e indústria de alimentos, estimula o estudo de compostos bioativos presentes em óleos essenciais e/ou em infusões de plantas, como a *Aloysia triphylla*. Esta planta é caracterizada pela sua ação sedativa e calmante, e popularmente conhecida por cidró ou erva-luisa (PASCUAL, 2001; VALENTÃO, et al. 2002; PARODI et al., 2012).

Considerando as evidências prévias da ação sedativa, antioxidante e antimicrobiana dessa planta (CARNAT et al., 1999; VALENTÃO, et al. 2002; BURT, 2004; ZAMARANO-PONCE et al., 2006; PARODI et al., 2013) o seu uso como anestésico no pré-abate, poderia melhorar a estabilidade química e microbiológica da carne pós-abate. Da mesma forma, as infusões desta planta, ricas em compostos fenólicos (CARNAT et al., 1999) poderiam ser eficazes como aditivos antioxidantes para uso em alimentos processados, uma vez que o mercado consumidor encontra-se interessado em compostos naturais que possam substituir os aditivos químicos sintéticos.

### 1.1 Jundiá

O jundiá é um peixe de água doce que habita rios com fundo arenoso, lagos e poços fundos dos rios, preferindo os ambientes de águas mais calmas, próxima às margens e vegetação, sendo conhecido popularmente no Brasil como: jundiá, jundiá-tinga, jandiá, jandiá-tinga, mandi e sapipoca (GOMES et al., 2000). O seu nome científico é *Rhamdia quelen* e pertence à seguinte divisão taxonômica: Classe: *Osteichthyes*, Série: *Teleostei*, Ordem: *Siluriformes*, Família: *Heptapteridae*, Gênero: *Rhamdia*, Espécie: *R. quelen* (SILFVERGRIP, 1996 apud GOMES et al., 2000). Este peixe encontra-se geograficamente

distribuído desde o centro da Argentina até o sul do México (GOMES et al., 2000). O cultivo do jundiá está aumentando no sul do Brasil, sendo uma das espécies mais promissoras da cadeia produtiva da piscicultura desta região (BARCELLOS; FAGUNDES; FERREIRA, 2013). Este fato deve-se ao jundiá ser uma espécie nativa, adaptada ao ambiente da região sul do Brasil, que se reproduz com facilidade, aceita bem o alimento exógeno ou artificial e apresenta rápido crescimento (BALDISSEROTTO; RADÜNZ NETO, 2004). Além disso, é uma espécie euritérmica que tolera as baixas temperaturas da região sul. Ele também apresenta carne saborosa, um filé sem espinhos de ótima qualidade e com rendimento na filetagem sem pele de 30 a 42% (KUBOTA; EMANUELLI, 2004). A criação do jundiá pode ser por cultivo semi-intensivo e de acordo com as suas características pode ser cultivado através do policultivo com carpas e tilápias, ou monocultivo intensivo em tanques-redes e tanques escavados (BALDISSEROTTO; RADÜNZ NETO, 2004).

O jundiá (*R. quelen*) é um peixe de couro, cuja coloração é influenciada pela luminosidade do ambiente, variando de marron-avermelhado claro a cinza, com a parte ventral do corpo mais clara (BALDISSEROTTO; RADÜNZ NETO, 2004). Este peixe é omnívoro, com preferência por peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais, e detritos orgânicos, sendo que o seu ganho de peso diário é em torno de 1,3 g/dia, podendo atingir 50 cm de comprimento e 3 kg de peso corporal (GOMES et al., 2000; BARCELLOS et al., 2012).

A composição química dos pescados pode variar de acordo com fatores como espécie, idade, sexo, estação do ano, fatores ambientais, alimentação, porção do peixe analisada, entre outros (EMANUELLI; PICOLLO, 2013). Desta forma, a composição do filé de jundiá depende da sua dieta e geralmente pode variar entre 15,5 a 20,8 g% de proteína e entre 2,5 a 8 g% gordura (LAZZARI et al., 2006; WEBER et al., 2008; BARCELLOS et al., 2012, VEECK et al., 2013; EMANUELLI; PICOLLO, 2013). Os filés cru de jundiá apresenta uma rica composição de ácidos graxos, com destaque para os ácidos oleico (C18:1n-9, aproximadamente 30% do total de ácidos graxos), linoleico (C18:2n-6, aproximadamente 19%) e palmítico (C16:0, aproximadamente 25%), enquanto que as concentrações dos ácidos graxos n-3 de cadeia longa, DPA e DHA foram de 1,2 e 3,9%, respectivamente (WEBER et al., 2008; EMANUELLI; PICOLLO, 2013).



**Figura 1:** Peixe inteiro (A) e filé (B) de Jundiá (*Rhamdia quelen*)

Fonte: Arquivo pessoal da autora

A produção do jundiá (*Rhamdia quelen*) vem crescendo a cada ano em torno de 354,7 toneladas em 2011 (BRASIL, 2013), impulsionada pelas vantagens zootécnicas da espécie, e pelos resultados das pesquisas, experimentos e ações de extensão realizadas por diversas entidades públicas e privadas como a UFSM, UPF, UFSC, UFPR, IPESCA, CAUNESP, USP e ESALQ (AMARAL JUNIOR et al., 2011). O levantamento estatístico divulgado pelo Ministério da Pesca e Aquicultura em 2011 revela que a produção de pescado atingiu 628,7 mil toneladas, o que representa um crescimento de 31,1% em relação ao ano de 2010, além de um aumento de consumo *per capita* no Brasil de 9,75 quilos em 2010, para 11,17 quilos em 2013 (ROCHA et al., 2013). Este crescimento no consumo de pescados no Brasil, provavelmente está relacionado com as políticas e campanhas publicitárias do governo federal que buscam promover o produto e o setor, além do desenvolvimento da culinária e gastronomia, explorando os benefícios à saúde humana e as características próprias dos pescados (SEBRAE, 2014).

Os pescados são fonte importante de proteínas e contêm alta proporção de ácidos graxos poli-insaturados n-3, que possuem papel fisiológico importante contribuindo na prevenção algumas doenças degenerativas como esclerose múltipla e doença de Alzheimer (ZAMARIA, 2004; FOTUHI; MOHASSEL; YAFFE, 2009). A carne de pescado é um alimento saudável e ao mesmo tempo funcional, tornando-se cada vez mais importante a sua presença na dieta, uma vez que é a principal fonte de ácidos graxos n-3 de cadeia longa da dieta humana (FOGAÇA et al., 2009; ZAMARIA, 2004). A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o consumo anual de pelo menos 12 quilos de pescado por habitante/ano (FAO, 2012) número acima da média dos brasileiros que é cerca de 11,17

quilos por habitante/ano (BRASIL, 2013). Assim, as estratégias de marketing para o aumento do consumo de pescados exigem articulação entre o setor produtivo, comerciantes e instituições de pesquisa, devido ao envolvimento de diferentes segmentos da área como os setores de insumos, produção, beneficiamento, logística e comercialização, abrangendo assim todos os elos da cadeia produtiva (SEBRAE, 2014). A cadeia produtiva do pescado é muito dinâmica e complexa, uma vez que depende de características intrínsecas do pescado (facilmente perecível), da distância dos centros consumidores, descontrolo entre oferta e demanda, questões legais e pouco hábito de consumo de pescados pela população brasileira (SEBRAE, 2014). Desta forma, destaca-se a necessidade de pesquisas e o desenvolvimento de estratégias para minimizar ou retardar os processos de deterioração de pescados, a fim de ampliar e promover uma cadeia produtiva de pescados de água doce, como o jundiá, com qualidade e segurança alimentar para os consumidores.

## **1.2 Manejo de peixe e o estresse**

Na aquicultura comercial, algumas práticas realizadas com frequência durante o cultivo de peixes, como a biometria, análises patológicas, implantes hormonais, manuseio e transporte, expõe os peixes a fatores estressantes que podem afetar seu desempenho (BARTON, 2000; PARODI et al., 2012). Estas práticas, geralmente, causam danos físicos aos peixes, além de aumentar sua atividade muscular antes do abate, o que pode antecipar o início do *rigor mortis* e conseqüentemente, afetar a textura e qualidade da carne (NAKAYAMA et al., 1992).

Os principais pontos críticos na produção de peixes como a alimentação, o manejo, a qualidade da água, densidade de estocagem, o transporte e o abate tem uma grande importância na produtividade de pescados e podem interferir na saúde e no grau de bem-estar desses animais (PEDRAZZANI et al., 2007). Procedimentos pré-abate que minimizem a dor, medo, excitação ou estresse dos peixes garantem o bem-estar animal (BAGNI et al., 2007). As medidas utilizadas para a avaliação do bem-estar dos peixes não podem ser isoladas, sendo necessárias associações entre as medidas fisiológicas de estresse, como a liberação de cortisol em resposta a atividade ou excitação, com as medidas comportamentais de estresse em determinadas situações, possibilitando uma melhor compreensão do bem-estar (ASLEY, 2007).



Os peixes apresentam as vias neuroendócrinas do estresse muito semelhantes a outros vertebrados, e dependem do sistema adrenérgico e do eixo hipotalamo-pituitária-interrenal (WEBER, 2011). Quando expostos a fatores estressantes, ocorre liberação de hormônios na corrente sanguínea, como as catecolaminas e o cortisol (ROSS; ROSS, 2008). A liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) resulta em respostas imediatas como a chamada reação de luta ou fuga, já a liberação dos hormônios esteróides (cortisol) provoca menos efeitos imediatos, porém tem efeitos com duração mais prolongada (ROSS; ROSS, 2008). A resposta ao estresse avaliada durante o manejo de captura e transferência dos animais de um tanque para outro, em ambos os sexos, apresentou pico de formação de cortisol após uma hora da exposição ao estresse (BARCELLOS et al., 2001). Barcellos et al. (2011) demonstraram que quando os peixes são expostos ao estresse, os níveis basais de cortisol aumentam 1h após o manuseio, liberando algum fator químico na água, pois quando outros peixes são expostos a esta água onde estava o peixe estressado, seus níveis de cortisol também aumentam, porém mais tarde (2h após).

Outra resposta fisiológica ao estresse é o estresse oxidativo que resulta no desequilíbrio entre a formação de espécies reativas (ERs) e a remoção destas espécies pelos sistemas de defesa antioxidantes, as quais podem causar danos em lipídios, proteínas e no ácido desoxirribonucléico (DNA) (LUSHCHAK, 2011). As reações oxidativas ocorrem normalmente durante o metabolismo aeróbico e a quantidade de ERs produzida é controlada pela ação de antioxidantes. Porém, durante o estresse, o aumento na produção de ERs ou uma redução nas defesas antioxidantes promove a perturbação do estado redox, modificando o metabolismo celular e sua regulação, o que danifica os componentes celulares (LUSHCHAK, 2011).

O estresse oxidativo pode ser avaliado pela modificação dos lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, assim como a determinação de antioxidantes de baixo e alto peso molecular como (ácido ascórbico, ácido úrico, tocoferol, glutathione, enzimas antioxidantes, proteínas/enzimas específicas), bem como a capacidade antioxidante total (remoção de radicais livres) (LUSHCHAK, 2011). Durante uma situação de estresse oxidativo, pode ocorrer aumento da oxidação lipídica nos tecidos do peixe (quantificada pelo aumento do índice de TBARS), entretanto o efeito deletério dos ERs pode ser equilibrado pela produção das defesas antioxidantes (AHMAD et al., 2000), como CAT (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A carne de pescados expostos ao estresse antes do abate apresenta qualidade inferior e maior susceptibilidade a processos de deterioração como a oxidação lipídica e proteica durante o armazenamento, quando comparada à carne de pescados não estressados antes do abate (POLI et al., 2005, BAGNI et al., 2007). Estudos realizados por Ribas et al. (2007) verificaram o efeito de três métodos de anestesia no estresse *ante mortem* e na qualidade da carne de linguado do Senegal (*Solea senegalensis*), sendo que os peixes anestesiados com 1 mL/L de óleo de cravo revelaram melhor índice de *rigor mortis*, bem como condições de frescor superiores aos peixes abatidos por asfixia e hipotermia.

### 1.3 Anestésicos naturais

Os anestésicos apresentam um papel importante na piscicultura para reduzir o estresse e a mortalidade dos peixes durante as práticas de manejo (FAÇANHA; GOMES, 2005; PARODI et al. 2012). Porém, os anestésicos mais utilizados para este fim, são de difícil obtenção e apresentam alto custo, como a tricaina metanosulfato (MS-222), a quinaldina, o 2-fenoxietanol, a benzocaína e o isoeugenol (Z AHL et al., 2012). Alguns destes compostos podem apresentar toxicidade, desta forma, compostos anestésicos menos tóxicos têm sido testados como o AQUI-S<sup>®</sup> (composto ativo isoeugenol) (MEINERTZ et al, 2006), mentol (FAÇANHA; GOMES, 2005) e os óleos essenciais de *Lippia alba* (BECKER et al., 2012; CUNHA et al., 2010a, 2011), *Ocimum gratissimum* (SILVA et al., 2012) e *A. triphylla* (PARODI et al., 2012, 2013; ZEPPENFELD et al., 2014). Geralmente, a eficácia do anestésico para reduzir a resposta ao estresse, indicada pelos níveis de cortisol ou estresse oxidativo, depende da ação de cada tipo de anestésico. Neste caso, o óleo de cravo e 2-fenoxietanol não bloquearam a resposta do cortisol ao estresse para o pargo (*Sparus aurata*) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (TORT et al., 2002). Entretanto, para jundiás submetidos ao estresse de manejo, o eugenol (óleo de cravo) reduziu o cortisol plasmático (CUNHA et al., 2010b), assim como o metomidato inibiu a resposta ao estresse em salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (OLSEN et al., 1995).

No Brasil ainda não existem leis que regulamentem o uso de anestésicos para peixes, e o anestésico mais utilizado é a benzocaína (FAÇANHA; GOMES, 2005). Anestésicos contendo isoeugenol como ingrediente ativo (AQUI-S<sup>®</sup> 20E) podem ser usados para sedar os peixes na Nova Zelândia, Austrália, Chile e Coréia (ASHLEY, 2007). No entanto, o único anestésico aprovado pela Food and Drug Administration para uso na aquicultura

(Metanossulfonato de Tricaína, MS-222) não pode ser aplicado em período inferior a 21 dias antes do abate se o peixe for destinado para o consumo humano nos EUA e inferior a 5 dias no Canadá (MEINERTZ et al., 2014).

Sendo assim, tem aumentado o interesse em anestésicos alternativos, como os de fontes naturais. Anestésicos a base de isoeugenol (óleo de cravo e AQUI-S<sup>®</sup> 20E) parecem promissores para o salmão do Atlântico, pois reduziram o estresse dos peixes em baixas doses, além de serem facilmente obtidos, seguros para o ambiente e usuários e possuírem baixo custo (IVERSEN et al., 2003). Inoue et al. (2003) demonstraram que o óleo de cravo é eficiente para anestésiar juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*), já o mentol foi eficiente na anestesia do tambaqui (*Colossoma macropomum*) (FAÇANHA; GOMES, 2005). Recentemente, o óleo essencial de *A. triphylla* foi patenteado como sedativo e anestésico para animais aquáticos (PI0904839-1A2). Concentrações deste óleo essencial (*A. triphylla*) acima de 30 µL/L foram eficientes para a indução da anestesia e melhoraram o sistema antioxidante contra ERs durante transporte de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*) por 6 h (PARODI et al., 2012). A adição de 40 µL/L de óleo essencial de *A. triphylla* na água de transporte (por 6 h) de jundiás reduziu o estresse do transporte (ZEPPENFELD et al., 2014).

A utilização do óleo essencial de *A. triphylla* como sedativo durante o transporte de jundiás protegeu contra o estresse do transporte, reduzindo os níveis de TBARS no fígado e músculo dos peixes, e aumentando a atividade da CAT nas brânquias e fígado de jundiás tratados com 40µL/L (ZEPPENFELD et al., 2014). Este aumento nas defesas antioxidantes também foi demonstrado pelo óleo essencial de *A. triphylla* quando usado como anestésico *in vivo* em jundiás, sendo que a exposição *in vivo* ao óleo essencial de *A. triphylla* imediatamente antes do abate reduziu o estresse dos jundiás pela supressão da liberação de cortisol e aumentou a atividade das enzimas de defesa antioxidante CAT e glutathione-S-transferase (GST) (GRESSLER et al., 2012). Além disso, a exposição de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*) ao óleo essencial de *A. triphylla* (20 µL/L) aumentou a capacidade antioxidante total (150%), CAT (70%) e GST (615%) após 6 h, sendo que concentrações acima de 30 µL/L foram eficientes para a indução da anestesia e melhoraram o sistema antioxidante contra espécies reativas de oxigênio (EROs) durante transporte por um período de 6 h (PARODI et al., 2012).

#### **1.4 Qualidade da carne do pescado**

O pescado, após o abate, sofre uma seqüência de mudanças que iniciam com o desenvolvimento do *rigor mortis*, seguido de sua resolução, perda de frescor resultante de reações autolíticas, e por fim pela deterioração microbiológica (PACHECO-AGUILAR et al., 2000). Estas alterações incluem a degradação do ATP (adenosina-5'-trifosfato), alterações de pH, degradação de proteínas, e a produção de bases voláteis (BVT) de baixo peso molecular principalmente por micro-organismos deteriorantes (OCAÑO-HIGUERA et al., 2009; HULTMANN et al., 2012). Os pescados são altamente perecíveis devido a sua composição biológica (ZAMBUCHINI et al., 2008) com a elevada atividade de água nos tecidos, pH próximo à neutralidade, elevado teor de nutrientes facilmente utilizáveis por micro-organismos, bem como ao alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados suscetíveis a oxidação (HOSSEINI et al., 2010; SAMPELS, 2013). Assim, em pescados ocorrem facilmente alterações microbiológicas, bioquímicas e sensoriais, as quais estão associadas com a perda de qualidade e menor tempo de vida útil (CRUZ-ROMERO et al., 2008; OCAÑO-HIGUERA et al., 2011). Desta forma, o desenvolvimento de estratégias para reduzir o estresse pré-abate poderia melhorar a qualidade dos produtos de pescados, já que a velocidade das alterações que ocorrem com os pescados são fundamentais na determinação da qualidade e vida útil (BOSWORTH et al., 2007).

Diferentes métodos de avaliação podem ser utilizados para verificar a qualidade do pescado armazenado sob refrigeração, como a determinação do *rigor mortis*, quantificação de nucleotídeos resultantes da degradação do ATP, contagem de micro-organismos, avaliação do pH, determinação de compostos voláteis, assim como testes sensoriais (SCHERER et al., 2005; 2006; OCAÑO-HIGUERA et al., 2009; 2011).

Uma das características que se deseja para pescados *post mortem* é que a instalação do *rigor mortis* ocorra o mais tarde possível e que a sua resolução seja de forma prolongada, a fim de manter por mais tempo as características de frescor. Durante o *rigor mortis* as reservas energéticas musculares são reduzidas pela degradação anaeróbica do glicogênio e consumo do ATP, o que resulta na produção de ácido lático no músculo e consequente redução do pH (BAGNI et al., 2007). A queda do pH favorece a autólise muscular dos pescados e o índice de rigor do músculo começa a declinar pela atividade de proteases endógenas, sendo esta fase chamada de pós-*rigor mortis* ou resolução do rigor (SCHERER et al., 2004). O estresse pré-abate aumenta a degradação de glicogênio a fim de fornecer energia para a atividade muscular, e com isso, antecipa o início do *rigor*

*mortis*, resultando em um estado de rigor mais agudo (BAGNI et al., 2007; BOSWORTH et al., 2007).

A etapa inicial de deterioração dos pescados inicia-se a partir da resolução do *rigor mortis* (POLI et al., 2005) concomitante ao processo de degradação de ATP (IWAMOTO et al., 1987). Assim, o processo de degradação de ATP ocorre em cascata, iniciando quando as fontes de ATP (glicólise anaeróbica e creatina fosfato) são esgotadas, o nível de ATP intramuscular começa a diminuir, seguindo uma seqüência de degradação do ATP → adenosina 5'-difosfato (ADP) → adenosina 5'-monofosfato (AMP) → inosina 5'-monofosfato (IMP) → HxR (inosina) → Hx (hipoxantina) → xantina → ácido úrico (VENUGOPAL, 2002; HOWGATE, 2006). Quando o nível de ATP diminui para cerca de 1  $\mu\text{mol/g}$ , o músculo entra em um estado de pleno *rigor* (WANG et al., 1998). Os níveis de ATP e seus produtos de degradação, ADP, AMP, IMP, HXR, e Hx, podem ser quantificados como indicadores adicionais do *rigor mortis* (WANG et al., 1998) e do frescor do pescado (OCANÕ-HIGUERA et al., 2011). A redução dos níveis de IMP está relacionada com a redução do aroma e frescor do pescado (HOWGATE, 2006) e a sua transformação em HXR ao longo do armazenamento, é relativamente rápida através da ação das enzimas endógenas. Já a degradação da HXR em ácido úrico é resultante da ação de enzimas produzidas por micro-organismos deteriorantes, elevando-se no final da vida útil do pescado (VENUGOPAL, 2002).

As bases voláteis totais (BVT) são compostos nitrogenados, como a amônia e a trimetilamina, as quais são produzidas pela ação das enzimas bacterianas através da conversão do óxido de trimetilamina (OTMA) em trimetilamina (TMA) e também da decomposição de aminoácidos, proteínas e uréia, formando amônia, sulfeto de hidrogênio e outros compostos indesejáveis característicos da deterioração microbiana (AUBOURG, 2001). A legislação brasileira preconiza o limite de 30 mg% de BVT, como indicador de qualidade do pescado refrigerado (BRASIL, 1974). Entretanto, os pescados de água doce, como o jundiá, apresentam quantidades mínimas de OTMA em comparação aos pescados de água salgada, e com isso os níveis de BVT geralmente são muito baixos não sendo apropriados como indicadores da qualidade (SCHERER et al., 2006). Os valores de pH da carne de pescados refrigerados aumenta no final do armazenamento devido a proteólise resultante do crescimento microbiano (OCAÑO-HIGUERA et al., 2009). O limite máximo aceitável para os valores de pH para consumo de pescados é de 6,8 segundo a legislação brasileira (BRASIL, 1974).

Ao longo da vida útil dos pescados, concomitante com as etapas de alterações químicas como as reações autolíticas ocorre o desenvolvimento microbiano, o qual é responsável degradação final de pescados (PACHECO-AGUILAR et al., 2000). Assim, a deterioração do pescado fresco e seus produtos armazenados em condições aeróbias sob refrigeração, é promovida por micro-organismos gram-negativos psicrotóxicos não fermentadores, como a *Pseudomonas* spp. e a *Shewanella putrefaciens*. Já na temperatura ambiente (25°C), a microflora dos pescados é dominada por micro-organismos mesófilos, e se os peixes são capturados em águas poluídas apresentam microflora de mesófilos *Enterobacteriaceae* (GRAM; HUSS, 1996). Para o estudo da vida útil de pescados e derivados, geralmente são realizadas as contagens totais de micro-organismos mesófilos e psicrotóxicos. O Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para alimentos (RDC nº 12 de 2001 da ANVISA) estabelece para pescado “*in natura*”, resfriado ou congelado não consumido cru, o limite de  $10^3$  UFC/g para *Estafilococcus* coagulase positiva e ausência de *Salmonella* sp em 25g (ANVISA, 2001). Cakli et al., (2007) verificaram que as contagens totais de micro-organismos mesófilos e psicrotóxicos aumentaram significativamente em dourado (*Sparus aurata*) e robalo (*Dicentrarchus labrax*) durante o armazenamento refrigerado, além disso, a avaliação sensorial do frescor utilizando a tabela adaptada da Unidade de Pesquisa em Alimentos da Tasmânia (TFRU) apresentou correlação com as contagem microbiológicas, com limite de vida útil no 18º dia.

A análise sensorial de pescados é outro índice importante que complementa as avaliações químicas e microbiológicas, a fim de avaliar o frescor dos pescados armazenados refrigerados (AUBOURG, 2001). A análise sensorial caracteriza-se por medir, analisar e interpretar as características organolépticas dos alimentos, através da utilização dos órgãos dos sentidos da visão, olfato, paladar, tato e audição (LAWLESS; HEYNMANN, 1998). Geralmente, as características sensoriais dos pescados inteiros refrigerados como a ocular, brânquias, textura e odores são avaliados por métodos sensoriais, porém estas variáveis apresentam particularidades referentes às características de cada espécie de pescado. Desta forma, muitos estudos utilizam como ferramenta a tabela da Unidade de Pesquisa em Alimentos da Tasmânia (TFRU), como uma boa alternativa para a avaliação sensorial de pescados ao longo da sua vida útil (BRANCH; VAIL, 1985). No entanto, é necessário adaptar e verificar a validade dos parâmetros para cada espécie de pescado. A avaliação sensorial do frescor de carpa capim

(*Ctenopharyngodon idella*) inteira armazenada em gelo utilizando a tabela da TFRU adaptada apresentou um aumento linear no escore de demérito durante o armazenamento, sendo que os painelistas consideraram os peixes impróprios para o consumo no 16º dia (SCHERER et al., 2005).

A vida útil dos pescados congelados é limitada por reações de hidrólise e especialmente de oxidação lipídica, que resultam em alterações indesejáveis na cor, sabor, odor e valor nutritivo (SAMPELS, 2013). Os pescados inteiros ou filés são ricos em proteínas e quando armazenados congelados, são também suscetíveis à oxidação protéica, que muitas vezes está associada à oxidação lipídica e resulta em alteração na cor nos produtos (VILJANEN et al. 2004). A oxidação das proteínas resulta em alterações conformacionais que podem modificar a incidência da luz refletida, e com isso aumentar os valores de L\* (MORKORE, 2006). Além disso, a oxidação lipídica pode aumentar os compostos secundários da oxidação (TBARS) elevando a intensidade da cor amarela, além de ocorrer interações de grupos aldeído-amina, os quais produzem cor (THANONKAEW et al., 2006). Apesar da carne de peixe apresentar pequenas quantidades de hemoglobina e mioglobina, a oxidação destes pigmentos durante o armazenamento congelado pode atenuar a intensidade da cor vermelha dos filés (HAMRE et al., 2003).

Os pescados são mais susceptíveis as reações oxidativas que outras carnes brancas como a carne de frangos ou suínos, pois possuem alto conteúdo de ácidos graxos insaturados (SAMPELS, 2013; SÁNCHEZ-ALONSO et. al., 2007), como ácido oléico (18:1) e ácido linoléico (18:2), e os ácidos graxos poli-insaturados da família n-3 como o ácido linolênico (18:3n-3), o ácido eicosapentaenóico, EPA (20:5n-3) e o ácido docosahexaenóico, DHA (22:6n-3) (MEDINA et. al., 2007).

A reação de oxidação lipídica apresenta alterações indesejáveis, principalmente quanto ao valor nutricional dos produtos pela degradação de ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis A, D, E e K, além de produzir sabores e odores desagradáveis, mudanças de cor, através do escurecimento de gorduras e óleos, além do clareamento de pigmentos (ARAB-TEHRANY et al., 2012). Os fatores intrínsecos, como a estrutura química dos lipídios e seu grau de insaturação, assim com os fatores extrínsecos, como presença de oxigênio, luz, antioxidantes, temperatura, superfície de contato e atividade de água, possibilitam as reações de oxidação (SAMPELS, 2013). A peroxidação lipídica ocorre em três estágios principais denominados iniciação (auto-oxidação), propagação, e a terminação (SAMPELS, 2013). Na auto-oxidação um átomo de hidrogênio é removido de

um grupo metileno adjacente a uma dupla ligação (-CH = CH - CH<sub>2</sub> - CH = CH -) do ácido graxo insaturado, deixando um elétron desemparelhado o chamado radical livre (-CH = CH - C•H - CH = CH -), o qual pode migrar e a partir de um rearranjo da dupla ligação resultando na formação de dienos conjugados (- C•H - CH = CH - CH = CH -). O estágio da propagação sucede o estágio da iniciação quando os radicais livres formados reagem com o oxigênio molecular para formar o radical peroxil (- CH - COO•-), estes radicais são altamente reativos e capazes de remover átomos de hidrogênio de outros ácidos graxos insaturados formando os hidroperóxidos (ROOH) e novos radicais livres (SAMPELS, 2013). Os dienos conjugados e os hidroperóxidos formados nesta etapa são considerados produtos primários da oxidação lipídica. O teor de dienos conjugados pode ser determinado em pescados através de absorção em 233 nm (RECKNAGEL; GLENDE, 1984), enquanto que a determinação de peróxidos baseia-se na oxidação do ferro (Fe<sup>2+</sup>) a íon férrico (Fe<sup>3+</sup>) por ação dos peróxidos, o qual é dosado por colorimetria sob a forma de tiocianato férrico (CHAPMAN; MACKAY, 1949). Os radicais livres gerados reagem novamente com o oxigênio e a cascata de reação inicia em outras cadeias de lipídios (YOUNG; McENENY, 2001). A duração do estágio de propagação é dependente de muitos fatores incluindo a relação dos lipídios com as proteínas, a composição de ácidos graxos, assim como a presença e concentração de antioxidantes (HALLIWELL; CHIRICO, 1993). O processo de terminação da oxidação acaba por formar na maioria das vezes álcoois, cetonas ou aldeídos de cadeia curta provenientes da clivagem dos peróxidos formados na etapa de propagação (YOUNG; MCENENY, 2001). Vários desses compostos são voláteis e, portanto, contribuem com o odor característico associado à oxidação de lipídios (DAMODARAN et al., 2008), bem como ocorre a formação de produtos secundários da oxidação lipídica, que podem ser avaliados nos alimentos através da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que reflete especialmente a concentração de malondialdeído (MDA), um dos principais aldeídos formados nesta etapa da reação (LUSHCHAK, 2011).

A preservação das características originais dos alimentos, pelo maior tempo possível é um dos grandes desafios da indústria de alimentos. Neste contexto, diferentes métodos são utilizados para prevenir ou retardar essas reações como o armazenamento em baixas temperaturas, o uso de embalagens adequadas, manipulação dos alimentos em condições ideais e a utilização de aditivos alimentares como os conservantes para retardar a deterioração microbológica e os antioxidantes para retardar as reações oxidativas.



### 1.5 *Aloysia triphylla*

Originária da Argentina e do Chile, *A. triphylla* foi descoberta no século XVIII pelos botânicos espanhóis e dedicada à Princesa das Astúrias, Maria Luisa de Parma, sendo por este motivo conhecida por *Aloysia* e a palavra *triphylla* é caracterizada pela definição de *tri*= três e *phylla*= folhas (PARODI, 2010; FLORA DIGITAL, 2010). O gênero *Aloysia* engloba cerca de quarenta espécies (OLIVEIRA, 2005), sendo comum nas montanhas ou florestas e distribuída na América subtropical e temperada, desde o Sul dos Estados Unidos até o Norte da Patagônia e centro do Chile. Para alguns autores temos a classificação de algumas espécies do gênero *Aloysia*, sendo consideradas do gênero *Lippia*, o que faz a espécie ora ser descrita como *A. triphylla*, ora como *Lippia triphylla*, fato este explicado pela agregação de alguns gêneros, tais como *Aloysia*, a partir do gênero *Lippia* (MOLDENKE, 1971 apud PASCUAL, 2001).

*A. triphylla* (L'Her.) Britton recebe esta denominação por ser mais difundida e enquadrar-se na Classificação de Moldenke (PASCUAL, 2001), tendo por descritor L'Her. Britton (FLORA DIGITAL, 2010). A planta *A. triphylla* pertence à família das Verbenáceas; divisão: Magnoliophytina (Angiosperma); subdivisão: Spermatophyta; classe: Magnoliopsida (dicotiledôneas); subclasse: Lamiidae; ordem: Lamiales; família: Verbenaceae e por fim; gênero: *Aloysia*. São sinônimos dessa espécie: *Aloysia citriodora* Palau; *Aloysia citriodora* Ortega; *Aloysia sleumeri*; *Lippia citriodora* H. B. K.; *Lippia citriodora* (Lam.) Kunth; *Lippia triphylla* (L' Her.) Kuntze; *Verbena citriodora*; *Verbena triphylla* (VALENTÃO, et al. 1999; PASCUAL, 2001; SANTOS-GOMES, 2005). Neste contexto, a busca por pesquisas e trabalhos relatando a planta *A. triphylla* (L'Herit) Britton precisa ser muito criteriosa.

Outro ponto importante na identificação da *A. triphylla* está relacionado com a variabilidade de seus nomes populares, sendo geralmente denominada no Brasil de: cidró, cidrão, erva-luisa, bela-alóisia, doce-lima ou limonete. A sobreposição dos nomes e identificações das plantas popularmente remete-se ao fato de que algumas espécies como *Melissa officinalis*, *Lippia alba*, *Cymbopogon citratus* (capim cidreira), bem como *A. triphylla* exalam um odor de limão (relação com a cidra, um tipo de limão-galego) (FLORAL DIGITAL, 2010). Atualmente, essas características aromatizantes estão relacionadas aos constituintes do óleo essencial da planta e o isolamento e identificação

dos constituintes químicos responsáveis por este efeito pode promover alternativas para aplicação, em diferentes áreas tecnológicas.



**Figura 2:** Exemplar de *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton com a presença de floração (Identificada por LONGHI, S.J., UFSM)

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

A infusão (1%) de *A. triphylla* apresenta como principais constituintes compostos fenólicos, com destaque aos polifenóis (675 mg/L) como o verbascosídeo (400 mg/L) e o flavonóide luteolina 7-diglicuronídeo (100 mg/L) (CARNAT et al., 1999). Os componentes principais do óleo essencial de *A. triphylla* são  $\alpha$ -citral,  $\beta$ -citral e limoneno (CARNAT et al, 1999; PARODI, 2012). Alguns extratos e óleos essenciais de plantas mostraram-se eficientes no controle do crescimento de uma ampla variedade de microorganismos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias, assim como se demonstraram potenciais antioxidantes (BURT, 2004). Usos práticos de infusões, extratos e/ou óleos essenciais de plantas com atividades antimicrobianas e antioxidantes são sugeridos para humanos e animais, e também para indústria de alimentos (BURT, 2004; ZAMARANO-PONCE et.al., 2006). O liofilizado do extrato alcoólico com 10% de oligossacarídeos da *A. triphylla* encontra-se patentado para aplicação em alimentos, com fins nutracêuticos, devido a sua ação antioxidante em sistemas biológicos afetados por doenças inflamatórias, com destaque na elaboração de produtos lácteos como iogurte, bebidas lácteas e queijo frescal (PA20060280820, BALAN; PAPER, 2006).

O método mais utilizado para a obtenção do óleo essencial de folhas frescas é a hidrodestilação utilizando aparelho de destilação tipo Clevenger (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Deve-se destacar que a composição dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos, porém os fatores ambientais podem causar variações

significativas em seus componentes (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). A época e horário da colheita, a fonte geográfica, o modo de secagem do material vegetal e fatores ambientais, como umidade, água, solo e herbivoria também podem influenciar a composição e o teor do óleo (SANTOS et al., 2004; GOBBO-NETO; LOPES, 2007) e com isso aumentar ou diminuir seus efeitos biológicos (SANTOS et al., 2004; BURT, 2004).

O óleo essencial da *A. triphylla* destaca-se pelo seu efeito anestésico, tranqüilizante e sedativo, possuindo como principais componentes o citral, neral, geranial, limoneno, 1,8-cineol, geraniol e beta-cariofileno (CARNAT et al., 1999; PÉREZ et al., 1998; PARODI et al., 2012). Estas características são importantes, devido ao crescente interesse dos consumidores por alimentos naturais ou orgânicos, que são livres de aditivos químicos sintéticos, estimula a busca por alternativas naturais para alcançar a conservação de alimentos (CAROVIC-STANKO et al., 2010). Os óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais apresentam atividades antibacteriana, antifúngica e antioxidante (BARATTA et al., 1998), e, portanto, poderiam ser alternativas para o uso de aditivos sintéticos.

A maioria dos estudos revelam que os óleos essenciais são um pouco mais ativos contra bactérias gram-positivas, que incluem cepas de micro-organismos patogênicos e deteriorantes de alimentos (BURT, 2004). O método de difusão em disco é um ensaio *in vitro* facilmente aplicado para avaliar a atividade antimicrobiana, apresentando resultados reprodutíveis (KIM et al., 1995). No entanto, a atividade antimicrobiana pode ser afetada por fatores intrínsecos do alimento, tais como pH e disponibilidade do substrato, além de fatores extrínsecos aos alimentos (KIM et al., 1995). Portanto, ensaios *in situ* em alimentos são necessários para confirmar a eficácia antimicrobiana. Geralmente, são necessárias maiores concentrações de óleos essenciais para atingir no alimento, o mesmo efeito antibacteriano obtido nos ensaios *in vitro* (BURT, 2004). O óleo essencial de *A. triphylla* demonstrou atividade antimicrobiana contra cepas gram-negativas isoladas de infecções urinárias clínicas e cepas de referência de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecalis* (ROJAS et al., 2010), além de *Salmonella Choleraesuis* (SARTORATTO et al., 2004) e contra diferentes sorotipos de *Escherichia coli* (DUARTE et al., 2007). *Staphylococcus aureus* foi o micro-organismo mais sensível, enquanto *Pseudomonas aeruginosa* foi o mais resistente ao óleo essencial de *A. triphylla* (ROJAS et al., 2010; SARTORATTO et al., 2004; DEMO et al., 2005). O citral, um dos componentes majoritários do óleo essencial de *A. triphylla*, apresenta atividade antibacteriana contra patógenos de origem alimentar, como *E. coli*, *E. coli* 0157:H7 e *Salmonella* Typhimurium

(KIM et al 1995), enquanto que o limoneno, também encontrado neste óleo, apresenta atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas de origem alimentar (SINGH Et al. 2010;. TAJKARIMI et al 2010).

Além da atividade antimicrobiana, o óleo essencial de *A. triphylla* apresentou atividade antidiarréica em ensaio de diarréia induzida por óleo de rícino ou sulfato de magnésio em camundongos (PÉREZ et al., 1998). A ação sedativa/anestésica do óleo essencial de *A. triphylla* em peixes já foram descritos no item 1.3 (Anestésicos naturais), demonstrando que o mesmo é eficiente para a indução da anestesia, reduz o estresse de transporte e melhora o sistema antioxidante durante o transporte de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*) (PARODI et al., 2012) e de jundiás (GRESSLER et al., 2012; ZEPPEFELD et al., 2014). Com base nestes resultados, o óleo essencial de *A. triphylla* foi patenteado recentemente como sedativo e anestésico para animais aquáticos (PI0904839-1A2). Ensaio *in vitro* para avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial de *A. triphylla* revelaram que o óleo apresenta capacidade moderada para remover o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) em comparação ao antioxidante sintético BHA (butil hidroxianisol), já utilizado comercialmente (HOSSAM et al., 2011).

Outros estudos, *in vitro* e em sistemas biológicos têm indicado o potencial antioxidante e antimicrobiano de infusões e extratos de *A. triphylla* (VALENTÃO et al., 2002; ZAMARANO-PONCE et al., 2006; PEREIRA; MEIRELES, 2007; FUNES et al., 2009; PARODI et al., 2013) e tem sido tradicionalmente utilizados na medicina popular para o tratamento de insônia e ansiedade, devido a sua ação analgésica e sedativa (CARNAT et al., 1999). As folhas desta erva aromática podem ser usadas como tempero de alimentos, e para conferir sabor de limão para pratos a base de pescados e aves, vegetais marinados, saladas e outros (FUNES et al., 2009). O extrato de *A. triphylla* com 25% de verbascosídeo foi eficiente para evitar a peroxidação lipídica em um ensaio em meio lipofílico *in vitro* (FUNES et al., 2009). A infusão de *A. triphylla* liofilizada revelou potente atividade antioxidante na remoção de radicais superóxido, radicais hidroxila e ácido hipocloroso, sendo o efeito protetor relacionado aos principais compostos fenólicos identificados no estudo, o verbascosídeo e derivados de luteolina (VALENTÃO et al., 2002).

A infusão de *A. triphylla* é amplamente usada como chá na medicina popular, e nenhum efeito de toxicidade oral ou efeito adverso foi observado em ratos quando foram tratados com extrato de *A. triphylla* contendo 25% de verbascosídeo na dose de 2000

mg/kg (FUNES et al., 2009). O citral e o limoneno, principais componentes presentes no óleo essencial de *A. triphylla*, foram reconhecidos como seguros para o uso como aditivos alimentares por órgãos reguladores nos Estados Unidos da América e na União Européia (TAJKARIMI et al., 2010).

### **1.7 Conservantes e antioxidantes de alimentos**

De acordo com a legislação brasileira, o aditivo alimentar é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem o propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a as etapas de produção e vida útil de um alimento (BRASIL, PORTARIA no. 540, SVS/MS, de 27 de outubro de 1997). Neste caso, a função do aditivo alimentar pode ser de conservante, o qual impede ou retarda a alteração dos alimentos provocada por micro-organismos ou enzimas, bem como a função de antioxidante que é a substância que retarda o aparecimento de alteração oxidativa no alimento (BRASIL, PORTARIA no. 540, SVS/MS, de 27 de outubro de 1997).

A legislação brasileira proíbe o uso de conservantes e antioxidantes em peixes inteiros e filés de pescado (BRASIL, Resolução CNS/MS n.º 04, de 24 de novembro de 1988). Na indústria de pescados, durante o processo de glazeamento, o pescado ou filé que será congelado, recebe um banho de água resfriada hiperclorada (5ppm) com gelo em escamas, por imersão durante dois segundos (em tanque inox) para formar uma pequena camada de gelo em sua superfície, que serve como proteção contra desidratação e/ou rancificação do produto (OETTERER, 2002). Assim, uma alternativa para ampliar a vida útil e conservação dos pescados e seus produtos poderia ser inclusão de aditivos antioxidantes naturais, como o óleo essencial ou infusão da *A. triphylla*, nesta etapa do processamento de pescados.

Os compostos fenólicos sintéticos, tais como BHA, butil hidroxitolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e ésteres do ácido gálico como o galato de propila (GP) estão entre os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos (DOLATABADI; KASHANIAN, 2010). Sánchez et al. (2002) revelou em seu estudo com conservante sintético TBHQ à 0,02% que o mesmo foi eficaz para retardar a oxidação de óleo semi-refinado de sardinha e anchova por 30 dias a 40°C e por 75 dias em temperatura ambiente. Já o estudo de Silva et al. (2008) verificou o efeito antimicrobiano e antioxidante

dos aditivos alimentares NaCl, ácido ascórbico, lactato de sódio e extrato de alecrim, os quais promoveram reduções significativas na contagem total de bactérias, sendo que o extrato de alecrim protegeu da oxidação lipídica do peixe *Ictalurus furcatus* defumado, armazenado em temperatura ambiente durante 6 semanas.

Atualmente, os consumidores têm revelado maior conhecimento sobre os efeitos de aditivos químicos na saúde humana. A segurança toxicológica dos principais antioxidantes sintéticos usados atualmente em alimentos (BHT, BHA, terc-butil-hidroquinona e ésteres do ácido gálico) tem sido questionada, pois existem evidências de que eles se ligam ao DNA e alguns apresentam efeito carcinogênico em animais (DOLATABADI & KASHANIAN, 2010). Por este motivo, tem crescido a busca por aditivos antioxidantes naturais para uso em alimentos (VALERGA et al., 2012; PICCOLO et al., 2014), destacando-se a utilização de extrato de erva mate (*Ilex paraguariensis*) que promoveu inibição da oxidação lipídica e algumas alterações de cor durante o congelamento de filés de dourado (*Salminus brasiliensis*) (VEECK et al., 2013b). O efeito de polifenóis presentes na infusão e no extrato de alecrim foi avaliado em *Carassius auratus* armazenado a 4°C por um período de 20 dias, e resultou na ampliação da vida útil dos pescados em torno de 6-8 dias, além de retardar o aumento nos valores de pH, bases voláteis totais, valor de K e TBARS (LI et al., 2012).

Naturalmente presentes nos vegetais, os polifenóis apresentam atividade antioxidante (MELLO; GUERRA, 2002; AL-ZOREKY, 2009), os quais representam uma importante alternativa para a indústria de alimentos, sendo que alguns compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante similar aos antioxidantes sintéticos BHT e BHA (FUKUMOZO et al., 2000). Assim, a busca por novas fontes de antioxidantes naturais, como o óleo essencial ou a infusão de *A. triphylla* representa uma alternativa para a indústria de alimentos. Considerando a grande suscetibilidade do pescado a deterioração tanto por reações oxidativas quanto microbiológicas, estes se constituem em excelentes modelos para o estudo mais profundo das propriedades antioxidantes e antimicrobianas da *A. triphylla*.

## OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos antimicrobiano e antioxidante do óleo essencial de *A. triphylla* (OAT) na carne de jundiá (*R. quelen*), o seu potencial para retardar modificações químicas e sensoriais do pescado refrigerado, bem como o potencial antioxidante da infusão de *A. triphylla* (IAT) em filés de jundiá. Assim, os objetivos específicos foram:

- Avaliar a atividade antimicrobiana do OAT *in vitro* contra cepas isoladas de alimentos, a estabilidade microbiológica de filés de pescado refrigerados após imersão em solução de OAT, bem como as alterações microbiológicas durante a armazenagem sob refrigeração em gelo de jundiás inteiros sedados com OAT *in vivo* durante o transporte;
- Investigar se o uso do OAT para sedar jundiás durante o transporte pode retardar as modificações químicas e sensoriais do pescado refrigerado;
- Investigar se o uso do OAT na água como sedativo para o transporte de peixes influencia a estabilidade lipídica de filés de jundiá durante o armazenamento congelado;
- Avaliar o efeito da imersão dos filés em IAT sobre a sua estabilidade oxidativa durante o congelamento, com ênfase na oxidação lipídica e modificações de coloração.

## **DESENVOLVIMENTO**

### **Artigo 1**

**Antimicrobial activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Her.)**

**Britton: effect against foodborne bacteria *in vitro* and on the  
microbiological quality of fish fillets and whole fish**

**Artigo em fase final de revisão pelos autores para ser submetido à revista**

**International Journal of Food Microbiology**

**(configurado conforme as normas da revista)**



**Antimicrobial activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton: effect against foodborne bacteria *in vitro* and on the microbiological quality of fish fillets and whole fish**

Ana Paula Daniel<sup>a,b,c</sup>, Ana Paula de Lima Veeck<sup>b,d</sup>, Bruna Klein<sup>b,c</sup>, Lauren F. Ferreira<sup>b</sup>, Amanda Roggia Ruviano<sup>b,c</sup>, Liana Guidolin Milani<sup>c</sup>, Samantha Spall<sup>e</sup>, Carla Cristina Zeppenfeld<sup>f</sup>, Mauro Alves da Cunha<sup>f</sup>, Thaylise Vey Parodi<sup>f</sup>, Berta Maria Heinzmann<sup>e</sup>, Bernardo Baldisserotto<sup>f</sup>, Tatiana Emanuelli<sup>b,c\*</sup>

<sup>a</sup> Colégio Politécnico, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup> Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais (NIDAL), Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>c</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>d</sup> Instituto Federal de Santa Catarina/IFSC, 88506-400, Lages, SC, Brazil.

<sup>e</sup> Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

---

\* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8547; fax: +55 55 3220 8353. E-mail address:

[tatiemanuelli@gmail.com](mailto:tatiemanuelli@gmail.com) (Tatiana Emanuelli).

<sup>f</sup> Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

## Highlights

- The essential oil of *Aloysia triphylla* (AT) has antimicrobial activity.
- AT inhibited *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *E. aerogenes*, and *Salmonella* strains.
- Aqueous AT solution delayed microbiological growth in refrigerated fish fillets.
- Aqueous AT solution used as a sedative for fish transport *in vivo*.
- AT use *in vivo* slightly delayed microbiological growth in refrigerated whole fish.

**Abstract**

This study investigated the antimicrobial activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* (AT) against foodborne bacteria *in vitro*, its effect on the microbiological quality of silver catfish fillets after dipping in AT solution, and the microbiological changes during the ice storage of whole silver catfish, which had been sedated with AT during transport. The minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration assays revealed that AT was strongly inhibitory against *Staphylococcus aureus*, and that it was also effective against *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Choleraesuis, and *Salmonella* Enteritidis, but it did not inhibit *Pseudomonas aeruginosa*. Fish fillets dipped in the 30 or 40  $\mu\text{L/L}$  (27 or 36 mg/L) AT solutions had lower average mesophilic and psychrotrophic counts than controls during storage. Fish sedated with 40  $\mu\text{L/L}$  AT during transport had lower psychrotrophic counts (at the 7<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup> days) compared to the control, whereas the mesophilic counts were similar to control during the refrigerated storage. The results indicate that AT has antimicrobial activity against various foodborne pathogen strains and food-quality indicator microorganisms. In addition, a solution of AT delayed microbiological growth in refrigerated fish fillets. However, when the fish were exposed to the AT solutions before slaughtering, the antimicrobial effect was less evident, being limited to a small decrease in the psychrotrophic bacteria counts at specific time-points.

**Keywords:** psychrotrophic bacteria; mesophilic bacteria; antimicrobial; anesthetic; transport; shelf-life.

**Abbreviations:**

ANOVA: analysis of variance

AT: essential oil of *Aloysia triphylla*

CFU: colony forming units

EU: European Union

GC: gas chromatography

FID: flame ionization detector

MBC: minimum bactericidal concentration

MIC: minimum inhibitory concentration

MS: mass spectrometry

RI: retention index

UFMS: Federal University of Santa Maria

USA: United States of America

## 1. Introduction

The growing interest of consumers for natural or "green" food that is free of synthetic chemical additives has encouraged the search for natural alternatives to achieve food preservation (Carovic-Stanko et al., 2010). Essential oils from aromatic and medicinal plants exhibit antibacterial, antifungal, and antioxidant activities (Baratta et al., 1998), and therefore, could be alternatives to the use of synthetic additives.

Most studies have shown that essential oils are slightly more active against Gram-positive than Gram-negative food spoilage organisms and foodborne pathogens (Burt, 2004). The agar disc diffusion method is an easy *in vitro* assay for screening antimicrobial activity, which gives repeatable results (Kim et al., 1995). However, the antimicrobial activity may be affected by the food pH and substrate availability, in addition to extrinsic food factors. Therefore, *in situ* tests in foods are required to confirm the antimicrobial effectiveness. Greater essential oil concentrations are usually required to achieve the same antibacterial effect in the food as that obtained in the *in vitro* assays (Burt, 2004).

*Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton (Verbenaceae) is a herbal species that grows naturally in South America and is cultivated in North Africa and southern Europe (Valentão et al., 2002). Its leaves are used as a spice to give a lemony flavor to fish and poultry dishes, vegetable marinades, and other foods (Funes et al., 2009). Moreover, the essential oil of *A. triphylla* has antimicrobial activity against Gram-negative clinical isolates from urinary infections (Rojas et al., 2010) and reference strains of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterococcus faecalis* (Rojas et al., 2010), as well as *Salmonella Choleraesuis* (Sartoratto et al., 2004), and against different *Escherichia coli* serotypes (Duarte et

al., 2007). *Staphylococcus aureus* was the most sensitive microorganism, whereas *Pseudomonas aeruginosa* was the most resistant to the essential oil of *A. triphylla* (Demo et al., 2005; Rojas et al., 2010; Sartoratto et al., 2004). The major components of the essential oil of *A. triphylla* are  $\alpha$ -citral,  $\beta$ -citral, and limonene (Carnat et al., 1999; Parodi et al., 2012). Citral has antibacterial activity against foodborne pathogens, namely *E. coli*, *E. coli* 0157:H7, and *Salmonella* Typhimurium (Kim et al., 1995), whereas limonene has antibacterial activity against foodborne Gram-positive and Gram-negative bacteria (Singh et al., 2010; Tajkarimi et al., 2010).

Interestingly, the essential oil of *A. triphylla* (AT) was recently demonstrated to be an effective sedative and anesthetic for aquatic animals (Parodi et al., 2014; Zeppenfeld et al., 2014). Anesthetics are used in commercial aquaculture to reduce injuries during capture, handling, and transport (Barcellos et al., 2006; Parodi et al., 2012), but there is a lack of anesthetics that are safe for fish intended for human consumption (Coyle et al., 2004). Plant essential oils seem to be a safe alternative (Daniel et al., 2014; Veeck et al., 2013). AT could possibly fulfill the requirements for this use, because its major components, *i.e.*, citral and limonene, have been recognized as safe for use as food additives by the regulatory agencies in the USA and EU (Tajkarimi et al., 2010).

This study investigated the antimicrobial activity of AT against foodborne bacteria *in vitro*, its effect on the microbiological quality of silver catfish fillets after dipping in AT solution, and the microbiological changes during the ice storage of whole silver catfish that had been sedated with AT during transport. Silver catfish, *Rhamdia quelen*, was chosen because it is a freshwater fish species that occurs from southern Mexico to central Argentina. This species is important in the

aquaculture industry of southern Brazil (Barcellos et al., 2006) because it has adapted to temperate and subtropical climate regions (Barcellos et al., 2001).

## 2. Materials and Methods

This study was approved by the Ethics on Animal Use Commission (protocol 092/2011) and by the Ethics Committee (CAAE 0295.0.243.000-11) of Federal University of Santa Maria.

### 2.1. Essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton

*A. triphylla* was cultivated in Frederico Westphalen City (27°22"S; 53°25"W), Rio Grande do Sul State, Brazil. A voucher specimen (SMDB No. 11169) was identified by botanist Dr. Gilberto Dolejal Zanetti (Department of Industrial Pharmacy, UFSM) and was deposited in the herbarium of the Department of Biology, UFSM. The AT was obtained from fresh leaves by hydrodistillation for 3 h using a Clevenger apparatus, according to the European Pharmacopoeia (2007). The AT was stored at -20°C in amber glass bottles.

The composition of the AT was assessed by gas chromatographic (GC) analysis in a hyphenated Agilent 7890A system equipped with flame ionization detector (FID) and mass spectrometry (MS) detector (series 5975C), and a fused silica capillary column (HP5MS) measuring 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm. To identify the oil constituents AT sample (1 µL) was injected in the split mode (1:100, v/v), and the carrier gas was He (1 mL/min). The injector temperature was 250°C, the column oven temperature was initially maintained at 40°C for 4 min, and then heated up to 320°C at 4°C/min, and the interface temperature was 250°C. The GC-MS analysis was performed with electron-ionization (70 eV). Compounds



detected for AT were identified by comparison of peak Kovats retention index and mass spectra fragmentation patterns with reported data from Adams (2001) and NIST digital mass spectra library (NIST, 1998), respectively. Kovats index was determined using a homologous series of n-alkanes (C<sub>8</sub>-C<sub>32</sub>) injected under the same chromatographic conditions as the samples. Quantitative data was obtained from the electronically integrated FID peaks areas. Chromatographic conditions used for GC-FID analysis were the same described for the GC-MS, except for sample injection mode and injection and detection temperatures which were performed at splitless mode and at 300°C.

## 2.2. *In vitro* assay

### 2.2.1. *Determination of antimicrobial activity in vitro*

The AT was tested against eight bacterial strains: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis ATCC 10708, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, and *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. The disc diffusion test was performed according to the procedures described by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003). Fresh cultures of the test organisms were suspended in sterile saline (0.85% NaCl) and standardized for 0.5 on the MacFarland scale ( $1 \times 10^8$  CFU/mL). The suspensions were seeded on the surface of Mueller-Hinton agar in a Petri dish and 6-mm-diameter paper filters impregnated with 10  $\mu$ L of distilled water (negative control), AT (whole oil), or chloramphenicol (30  $\mu$ g, positive control) were plated on the

agar. After 24 h incubation at 36°C, the diameter of the inhibition zone was measured (including the disc diameter; 6 mm). The inhibitory zone was classified according to Carovic-Stanko et al. (2010): > 15 mm diameter is strongly inhibitory, 10–15 mm diameter is moderately inhibitory, and < 10 mm diameter is not inhibitory. Three independent replicates were performed for each microorganism.

### *2.2.2. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)*

The MIC of AT was determined for the bacterial strains that were inhibited in the disc diffusion test. An AT solution of 640 µL/mL was prepared in methanol (Solution I) and then diluted in Mueller-Hinton broth to yield a concentration of 6.34 µL/mL (Solution II). Based on the document M31-A3 CLSI (2008), a serial dilution of solution II was made with Mueller-Hinton broth in microdilution-plate wells to give final concentrations of 3.17, 1.585, 0.793, 0.396, 0.198, 0.099, 0.049, and 0.025 µL/mL (equivalent to 2.85, 1.42, 0.71, 0.36, 0.18, 0.09, 0.044, and 0.022 mg/mL, respectively, because the AT density is 0.90 mg/µL).

Fresh cultures of the test organisms were suspended in sterile saline (0.85% NaCl) and standardized for 0.5 on the MacFarland scale ( $1 \times 10^8$  CFU/mL). This suspension was inoculated at  $1 \times 10^5$  CFU/mL (10 µL) in the AT-containing microplate wells and incubated at 35°C for 24 h under aerobic conditions. Mueller-Hinton broth without bacterial inoculum was used as the negative control, whereas the positive control was made with Mueller-Hinton broth and bacterial inoculum, but no AT. The MIC was the lowest concentration of AT that completely inhibited bacterial growth (Santurio et al., 2011).

The minimal bactericidal concentration (MBC) was determined from the microdilution plates used in the MIC assay, according to Santurio et al. (2011). Aliquots (10  $\mu$ L) of each well that showed no visible growths were seeded on the surface of Muller-Hinton agar. The bacterial growth was assessed after incubation at 35°C for 24 h, and MBC was determined as the lowest concentration of AT that had no bacterial growth. Three independent replicates were performed to determine the MIC and MBC for each microorganism.

### *2.3. Antimicrobial activity in silver catfish*

#### *2.3.1. Antimicrobial activity in fish fillets*

Six fresh silver catfish (*R. quelen*; 361.2  $\pm$  93.2 g) were obtained in a local fish market. Fish were washed with tap water and filleted using common household practices. Fillets (85.1  $\pm$  15.5 g) were dipped for 15 min in one of the following solutions (500 mL): distilled water (control), 30  $\mu$ L/L AT, or 40  $\mu$ L/L AT. Three independent fillet samples received each one of the treatments and were separately stored at 2  $\pm$  3°C in sterile plastic bags (Baglight, Interscience, Paris, France) to yield three replicates per treatment. After 1, 3, 7, and 10 days, samples (10 g) were aseptically withdrawn from each replicate to perform the microbiological analyses.

#### *2.3.2. Antimicrobial activity after in vivo exposure to the AT*

Fifty-four silver catfish (*R. quelen*; 233.2  $\pm$  45.1 g, 31.0  $\pm$  1.4 cm) were obtained from a fish farm in the southern region of Brazil. The fish were placed in plastic bags at a load density of 260 g/L water and were transported for 6 h on a paved road. Three different treatments were applied to the water used during

transport: control (water), 30  $\mu\text{L/L}$  AT, and 40  $\mu\text{L/L}$  AT (equivalent to 0, 27, and 36 mg/L because the density of AT is approximately 0.90 mg/ $\mu\text{L}$ ). Each plastic bag contained six fish and was considered as one replicate. Three independent replicates were conducted for each treatment. The AT was diluted in ethanol (1:10, v/v) and added to the water for transport. The concentrations of AT, transport time, and loading density were chosen based on previous studies from our group (Golombieski et al., 2003; Parodi et al., 2012; 2014; Daniel et al., 2014).

Immediately after transport, the fish were slaughtered by hypothermia caused by dipping them into an ice-water slurry to mimic the procedures used in the commercial fish food industry. After slaughtering, whole fish were packed in ice flakes (1 kg/kg of fish) and stored in polystyrene boxes (100 kg capacity) at  $2^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (for up to 28 days). A separate box was used for each treatment and replicate. The water was drained from the box, and the ice was replaced daily throughout the entire storage period. Microbiological analyses were performed after 1, 3, 7, 10, 17, and 28 days of storage to assess the quality of the whole fish stored in ice. At each time point, three fish were taken from each treatment ( $n = 3$  per treatment) for the analyses.

### *2.3.3. Microbiological analyses*

Samples (10 g of fillet or 25 g of flesh from whole fish) were aseptically obtained and blended in 0.1% peptone for 2 min in a Stomacher (Bag Mixer®400, Interscience, France). Appropriate serial dilutions were plated onto plate-count agar (Difco, Detroit, MI). The total mesophilic count was determined using the pour-plate method after incubation at  $35\text{--}37^{\circ}\text{C}$  for 48 h (Downes and Ito, 2001).

The psychrotrophic count was determined using the spread-plate method after incubation at 7–10°C for 10 days (Downes and Ito, 2001).

#### 2.4. Statistical analysis

Data from the *in vitro* antimicrobial activity assay (diameter of the inhibition zone) were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), whereas the other results were analyzed using two-way factorial ANOVA (3 treatments x 4 time points for the microbiological data from fish fillets and 3 treatments x 6 time points for the microbiological data from the *in vivo* assay). The differences between the averages were *post hoc* evaluated using Duncan's test. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Composition of AT

Mono- and sesquiterpenoids were the dominant compounds found in AT. Among the 14 compounds identified, the most abundant were (g/100 g of oil):  $\alpha$ -citral (32.1%),  $\beta$ -citral (24.4%), limonene (13.4%), caryophyllene (4.9%), geranyl acetate (3.1%), *E*-geraniol (2.7%), and caryophyllene oxide (2.2%). This composition is similar to previous studies that also found  $\alpha$ -citral as the major constituent of AT followed by  $\beta$ -citral and limonene (Parodi et al., 2012).

#### 3.2. *In vitro* antimicrobial assay

The agar disc diffusion method has been used for preliminary screening of the antimicrobial activity of natural compounds. According to the measurement scale proposed by Carovic-Stanko et al. (2010), the AT (whole oil) was strongly

inhibitory against the Gram-positive bacteria *S. aureus* and *E. faecalis* (Table 1). AT was moderately inhibitory against *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. Typhimurium*, and *S. Enteritidis*, but had no inhibitory effect against *S. Choleraesuis* or *P. aeruginosa*, which are all Gram-negative bacteria (Table 1).

The AT (whole oil) was more effective than chloramphenicol at inhibiting the growth of *S. aureus*, which was the most sensitive microorganism to this essential oil. In agreement with a previous study that assessed the AT effect against *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *Klebsiella sp.*, and *Proteus mirabilis* (Demo et al., 2005), in the present study, the AT (whole oil) strongly inhibited all Gram-positive bacteria and moderately inhibited most Gram-negative bacteria. We show for the first time that AT has moderate inhibitory activity against important foodborne pathogens, namely *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, and *Enterobacter aerogenes*. This effect was confirmed by the MIC and MBC values (2.85 mg/mL; Table 2). In the agar disc diffusion test, AT was also previously shown to have inhibitory activity against pathogens isolated from genitourinary infections, namely *S. aureus* (30 mm), *E. coli* (9 to 12.75 mm), *E. faecalis* (14 to 25 mm), and *Klebsiella ozaenae* (8 to 9.75 mm), but had no activity against *P. aeruginosa* (Rojas et al., 2010). In addition, AT was previously shown to have moderate to strong inhibitory effect against 13 different *E. coli* serotypes in the MIC assay (Duarte et al., 2007), and showed up to three active fractions against *S. aureus*, *E. faecium*, *S. Choleraesuis*, *B. subtilis*, *Rhodococcus equi*, and *Micrococcus luteus* in the bioautographic assay (Sartoratto et al., 2004).

The antimicrobial activity of essential oils is affected by the lipophilicity, stereochemistry, and structure of the oil components, among other factors (Veluri et al., 2004). The mechanisms responsible for this activity include structural and

functional damage to the bacterial cell membrane due to attack of the phospholipid bilayer, disruption of enzyme systems, and DNA damage, among others (Tajkarimi et al., 2010). Citral and limonene are major components of the AT (section 3.1; Carnat et al., 1999; Parodi et al., 2012) and were likely responsible for the antimicrobial activity of this essential oil. Citral inhibited the growth of four foodborne pathogens, namely *E. coli* 0157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *L. monocytogenes*, and *Vibrio vulnificus* (Kim et al., 1995). Moreover, the inhibitory zone of AT against *Salmonella* Typhimurium (Table 1) was similar to that observed for a solution of purified citral diluted at 20% (Kim et al., 1995). Limonene also shows antimicrobial activity against foodborne pathogens and resistant strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria (Burt, 2004). Despite the agreement between the antimicrobial activity of AT and that of its major components, some minor components may also have a role in the AT activity as demonstrated for other essential oils that had greater antibacterial activity than their major isolated components (Gill et al., 2002).

The MIC and MBC of AT was determined for seven bacterial strains that were inhibited in the disc diffusion test. AT had stronger bacteriostatic potency against *S. aureus* than against the other bacteria (MIC values; Table 2). AT had similar bactericidal potency against *S. aureus*, *E. aerogenes*, *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis*, and *S. Enteritidis*, but lower bactericidal potency against *E. faecalis* and *E. coli* (MBC values; Table 2).

Although the agar disc diffusion test is largely used for the screening of potential antibacterial compounds, the size of the inhibitory zone cannot accurately reflect the relative antimicrobial effectiveness of the test compounds in liquid culture (Kim et al., 1995). Therefore, MIC and MBC assays are required to

compare the potency of compounds against different bacterial species. This fact was observed for the antibacterial activity of AT against *E. faecalis*, which presented strong inhibitory activity in the agar disc diffusion assay (Table 1), but lower bactericidal potency (MBC > 2.85; Table 2).

Previous studies on the antibacterial effects of AT revealed MIC values ranging from 0.4 to 1.0 mg/mL against 13 different *E. coli* serotypes (Duarte et al., 2007), whereas the MIC values against *S. aureus* and *S. Choleraesuis* were 0.8 and 0.6 mg/mL, respectively (Sartoratto et al., 2004). These values are somewhat higher than those found in the present study (Table 2). The discrepancy can be explained by differences in the chemical composition of the AT, which are determined by environmental conditions during plant growth, or to the different methodologies used to determine the antibacterial activity (Burt, 2004; Rojas et al. 2010).

### 3.3. Antimicrobial activity in silver catfish

The first assay investigated the microbiological quality of silver catfish fillets after being dipped in AT solution. ANOVA revealed a significant effect of AT treatment and refrigerated storage time ( $p < 0.05$ ) on the psychrotrophic and mesophilic counts of silver catfish fillets, but no interaction between these variables (Fig. 1). Fish fillets used in this experiment had a fair initial microbiological quality (Fig. 1), most likely because they were purchased in the market instead of being slaughtered immediately before the experiment. The freshness of silver catfish fillets decreased during the storage, as indicated by the significant increase in the mesophilic and psychrotrophic bacteria counts after 3 days of storage ( $p < 0.05$ ; Fig. 1). After 7 days of storage, the fillets reached the



microbiological limit for human consumption ( $10^7$  CFU/g; ICMSF, 1986). The average mesophilic counts of fillets dipped in the 30 and 40  $\mu\text{L/L}$  AT solutions ( $6.58 \pm 0.30$  and  $6.45 \pm 0.33$  log CFU/g, respectively) during storage were lower than the control ( $6.79 \pm 0.33$  log CFU/g) ( $p < 0.05$ ). Similarly, the average psychrotrophic counts of fillets dipped in the 30 and 40  $\mu\text{L/L}$  AT solutions ( $6.30 \pm 0.40$  and  $6.28 \pm 0.38$  log CFU/g, respectively) were also lower than the control ( $6.60 \pm 0.37$  log CFU/g) during storage ( $p < 0.05$ ). These results provide evidence for the antimicrobial activity of AT solutions used to treat fish fillets.

The spoilage of refrigerated fresh fish and fish products under aerobic conditions is triggered by Gram-negative psychrotrophic non-fermenting microflora. At room temperature ( $25^\circ\text{C}$ ), the fish microflora is dominated by mesophilic microorganisms and, if the fish are caught in polluted waters, by mesophilic *Enterobacteriaceae* (Gram and Huss, 1996). Because the fish fillets used in the present study had a fair initial quality, the AT-triggered decrease in the mesophilic counts may be related to the bactericidal potential of AT against *Enterobacteriaceae* that was demonstrated in the *in vitro* study (Table 2).

Essential oils can be added to foods in different ways (Goni et al., 2009). Because AT was recently demonstrated to be an effective sedative and anesthetic for aquatic animals (Parodi et al., 2014; Zeppenfeld et al., 2014), a second experiment was conducted to evaluate the microbiological changes during ice storage of whole silver catfish that had been sedated with AT during transport. The initial microbiological quality of fish used in this study was good, as indicated by the low initial bacterial counts (Fig 2). Fish freshness reduced during the storage time as indicated by the growth of mesophilic and psychrotrophic bacteria, which increased after 10 and 17 days onwards, respectively ( $p < 0.05$ ; Fig 2).

ANOVA revealed a significant effect of the storage time ( $p < 0.05$ ), but no effect of AT treatment or interaction between these factors on the mesophilic bacteria counts (Fig. 2A). In contrast, there was a significant interaction between storage time and AT treatment on the psychrotrophic bacteria counts ( $p < 0.05$ ; Fig. 1B). Fish sedated with 40  $\mu\text{L/L}$  AT during transport had lower psychrotrophic counts at the 7<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup> days of refrigerated storage compared to the control ( $p < 0.05$ ; Fig 1B). The spoilage of fish stored in ice under aerobic conditions is usually triggered by Gram-negative psychrotrophic bacteria, such as *Pseudomonas sp.* and *S. putrefaciens* (Gram and Huss, 1996). Thus, the lower psychrotrophic bacterial growth in fish exposed to the AT before slaughtering suggests an inhibitory effect of AT against these Gram-negative bacteria. However, *P. aeruginosa* was not inhibited by AT *in vitro* (Table 1). The mesophilic and psychrotrophic counts did not exceed the maximum limit recommended for products with intermediate acceptable quality up to the 28<sup>th</sup> day of storage ( $10^7$  CFU/g; ICMSF, 1986), which indicates that the shelf-life of silver catfish stored in ice was higher than 28 days (Huss, 1995).

AT is a potential antimicrobial agent against foodborne pathogenic strains and food-quality indicators, such as *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis*, *E. aerogenes*, *S. aureus*, and *E. faecalis*. This antimicrobial effect was confirmed in fish fillets dipped in AT solutions, which showed lower psychrotrophic and mesophilic counts during the refrigerated storage. However, when the fish were exposed to the AT before slaughtering, the antimicrobial effect was less evident, being limited to a small decrease in the psychrotrophic bacteria counts at specific time-points.

## **Acknowledgments**

Authors Emanuelli and Baldisserotto are recipients of CNPq research fellowships. Authors Veeck, Klein, Ferreira, and Ruviaro are recipients of CNPq scholarships. This study was supported by PRONEX (FAPERGS/CNPq), CT-AGRO (MCT/MPA/FINEP), and Casadinho/PROCAD (MCT/CNPq/MEC/Capes). Authors Heinzmann and Baldisserotto obtained a patent for “Anesthetic compositions for aquatic animals and the method of anesthesia of aquatic animals including the same” in Brazil (PI0904832-4A2), which includes the use of the essential oil of *A. triphylla*.

## References

- Adams, R.P., 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois.
- Baratta, T.M., Dorman, D.H.J., Deans, S.G., 1998. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 13, 235–244.
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., 2006. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. *Aquaculture* 253, 317–321.
- Barcellos, L.J.G., Woehl, V.M., Wassermann, G.F., Krieger, M.H., Quevedo, R.M., Lulhier, F., 2001. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard), a South American Catfish. *Aquaculture Research* 32, 123–125.
- Burt, S., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223–253.
- Carnat, A., Carnat, A.P., Fraisse, D., Lamaison, J.L., 1999. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. *Fitoterapia* 70, 44–49.
- Carovic-Stanko, K., Orlic, S., Politeo, O., Strikic, F., Kolak, I., Milos, M., Satovic, Z., 2010. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. *Food Chemistry* 119, 196–201.
- Coyle, S.D., Durborow, R.M., Tidwell, J.H., 2004. *Anesthetics in Aquaculture*. Publication 3900. Southern Regional Aquaculture Center, Stoneville.

- Daniel, A.P., Veeck, A.P., Klein, B., Ferreira, L.F., Cunha, M.A., Parodi, T.V., Zeppenfeld, C.C., Schmidt, D., Caron, B.O., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., Emanuelli, T., 2014. 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* 79, S1205–S1211.
- Demo, M., Oliva, M.D., Lopez, M.L., Zunino, M.P., Zygodlo, J.A., 2005. Antimicrobial activity of essential oils obtained from aromatic plants of Argentina. *Pharmaceutical Biology* 43, 129–134.
- Downes, F.P., Ito, K., 2001. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, fourth ed. American Public Health Association, Washington DC.
- Duarte, M., Leme, E.E., Delarmelina, C., Soares, A.A., Figueira, G.M., Sartoratto, A., 2007. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology* 111, 197–201.
- European Pharmacopoeia, 2007. European Directorate for the Quality of Medicines, sixth ed. Council of Europe, Strassbourg.
- Funes, L., Fernández-Arroyo, S., Laporta, O., Pons, A., Roche, E., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Micol, V., 2009. Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract. *Food Chemistry* 117, 589–598.
- Gill, A.O., Delaquis, P., Russo, P., Holley, R.A., 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology* 73, 83–92.

- Golombieski, J.I., Silva, L.V.F., Baldisserotto, B., Silva, J.H.S., 2003. Transport of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings at different times, load densities, and temperatures. *Aquaculture* 216, 95–102.
- Goni, P., Lopez, P., Sanchez, C., Gomez-Lus, R., Becerril, R., Nerin, C., 2009. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116, 982–989.
- Gram, L., Huss, H.H., 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33, 121–137.
- Huss, H.H., 1995. *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. FAO Fisheries Technical Paper 348. Food and Agriculture of the United Nations, Rome, Italy.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1986. *Microorganisms in Foods. 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications*, second ed., Blackwell Scientific Publications, London.
- Kim, J., Marshall, M.R., Wei, C.I., 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 2839–2845.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), 2003. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*. Eighth ed., NCCLS document M2-A8, Wayne, 58 p.
- NIST (National Institute of Standards and Technology), 1998. *NIST Scientific and Technical Databases. The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIM Mass Spectral Library Version 1.7*.

- Parodi, T.V., Cunha, M.A., Becker, A.G., Zeppenfeld, C.C., Martins, D.I., Koakoski, G., Barcellos, L.G., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., 2014. 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* 40, 323–334.
- Parodi, T.V., Cunha, M.A., Heldwein, C.G., Souza, D.M., Martins, A.C., Garcia, L.O., Wasielesky Junior, W., Monserrat, J.M., Schmidt, D., Caron, B.O., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., 2012. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae), *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C - Pharmacology Toxicology & Endocrinology*, 155, 462–468.
- Rojas, L.B., Velasco, J., Díaz, T., Gil, R.O., Carmona, J., Usubillaga, 2010. A. Chemical composition and antibacterial effects of the essential oil of *Aloysia triphylla* against genito-urinary pathogens. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 9, 56–62.
- Santurio, D.F., Costa, M.M, Maboni, G., Cavalheiro, C.P., Sá, M.F., Dal Pozzo, M., Alves, S.H., Fries, L.L.M., 2011. Antimicrobial activity of spice essential oil against *Escherichia coli* strains isolated from poultry and cattle. *Ciência Rural*, 41, 1051–1056.
- Sartoratto, A., Machado, A., Delarmelina, C., Figueira, G., Duarte, M., Rehder, L., 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 275–280.
- Singh, P., Shukla, R., Prakash, B., Kumar, A., Singh, S., Mishra, P.K., Dubey, N.K., 2010. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant

activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1734–1740.

Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O., 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21, 1199–1218.

Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Bastos, M.L., 2002. Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25, 1324–1327.

Veeck, A.P.L., Klein, B., Ferreira, L.F., Becker, A.G., Heldwein, C.G., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., Emanuelli, T., 2013. 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*, 93, 955–960.

Veluri, R., Weir, T.L., Bais, H.P., Stermitz, F.R., Vivanco, J.M., 2004. Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1077–1082.

Zeppenfeld, C.C., Toni, C., Becker, A.G., Miron, D.S., Parodi, T.V., Heinzmann, B.M., Barcellos, L.J.G., Koakoski, G., Rosa J.G.S., Loro, V.L., Cunha, M.A., Baldisserotto, B., 2014. Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. *Aquaculture* 418–419, 101–107.



**Table 1:** Antimicrobial activity against foodborne microorganisms assessed as the inhibitory zone (mm) in the agar disc diffusion test.

<b>Bacterial species</b>	<b>Gram type</b>	<b>AT</b> (10 µL of the whole oil)	<b>Chloramphenicol</b> (30 µg)
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	36.6 ± 1.5 <sup>a*</sup>	30.5 ± 1.2 <sup>b</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	23.1 ± 0.7 <sup>b*</sup>	32.0 ± 1.1 <sup>a</sup>
<i>Escherichia coli</i>	-	10.6 ± 0.4 <sup>b+</sup>	29.5 ± 0.2 <sup>a</sup>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	11.5 ± 0.5 <sup>b+</sup>	29.5 ± 0.2 <sup>a</sup>
<i>Salmonella</i> Typhimurium	-	10.1 ± 0.4 <sup>b+</sup>	27.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
<i>Salmonella</i> Choleraesuis	-	9.3 ± 0.2 <sup>b#</sup>	27.5 ± 0.2 <sup>a</sup>
<i>Salmonella</i> Enteritidis	-	11.0 ± 0.7 <sup>b+</sup>	29.5 ± 0.2 <sup>a</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	No inhibition	No inhibition

Means followed by different lower case superscript letters within the same line are different ( $p < 0.05$ ). The scale of measurement was the following: \* > 15 mm diameter is strongly inhibitory, + 10–15 mm diameter is moderately inhibitory, and # < 10 mm diameter is not inhibitory. AT: essential oil of *A. triphylla*

**Table 2:** Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of AT against selected foodborne microorganisms.

Bacterial species	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.42	2.85
<i>Enterococcus faecalis</i>	2.85	> 2.85
<i>Escherichia coli</i>	2.85	> 2.85
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2.85	2.85
<i>Salmonella</i> Typhimurium	2.85	2.85
<i>Salmonella</i> Choleraesuis	2.85	2.85
<i>Salmonella</i> Enteritidis	2.85	2.85

AT: essential oil of *A. triphylla*.

## Figure captions

**Fig. 1:** Changes in mesophilic (A) and psychrotrophic (B) bacteria counts of silver catfish fillets treated with the essential oil of *A. triphylla* (AT) during refrigerated storage. Results are expressed as mean  $\pm$  SE (n = 3). Significant differences are described in the text.

**Fig. 2:** Effect of *in vivo* exposure to different concentrations of the essential oil of *A. triphylla* (AT) on the mesophilic (A) and psychrotrophic (B) bacteria counts of silver catfish muscle stored in ice. Results are expressed as mean  $\pm$  SE (n = 3). \* Significantly different from control at the same time point ( $p < 0.05$ ).

Fig. 1

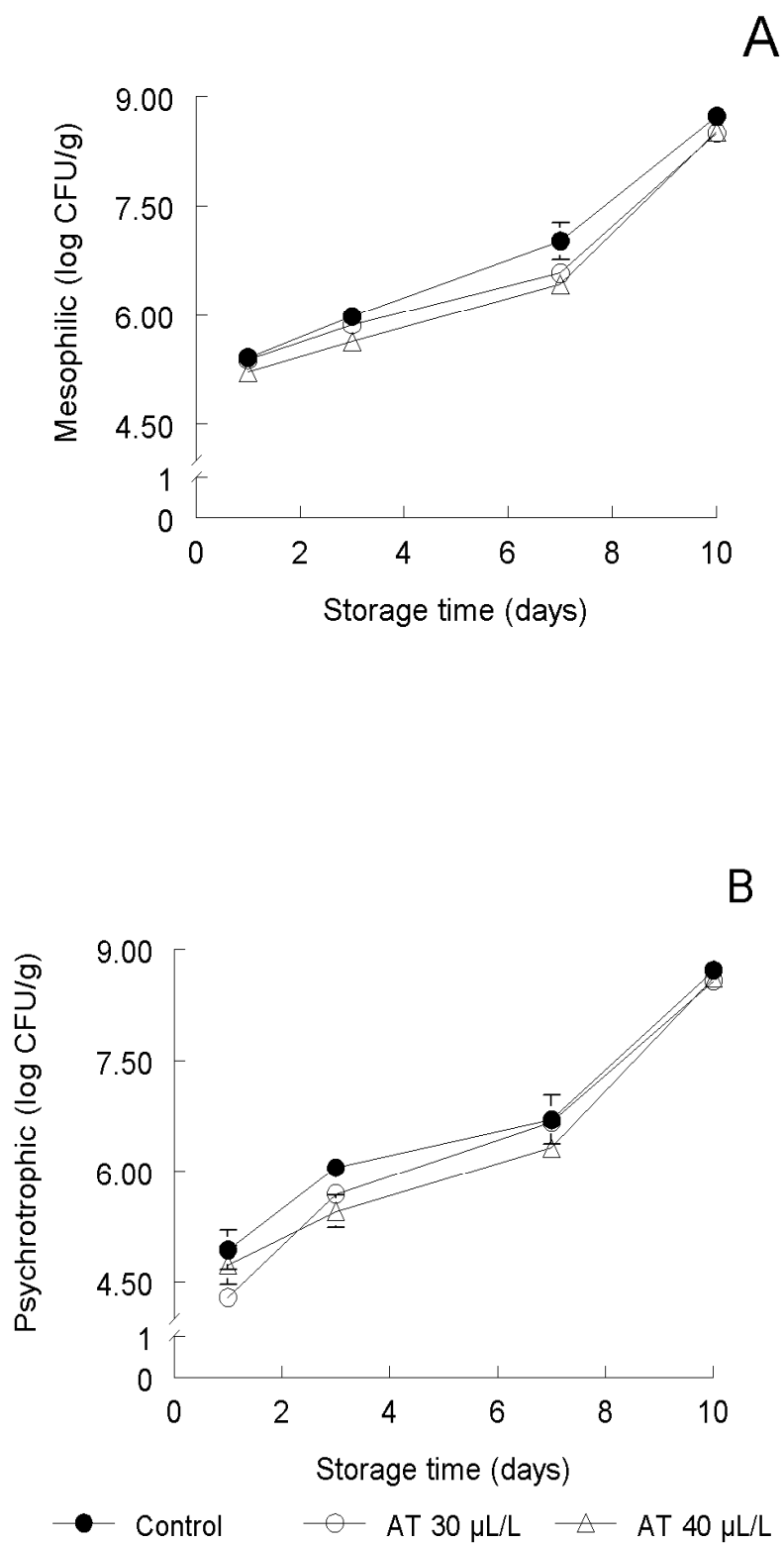
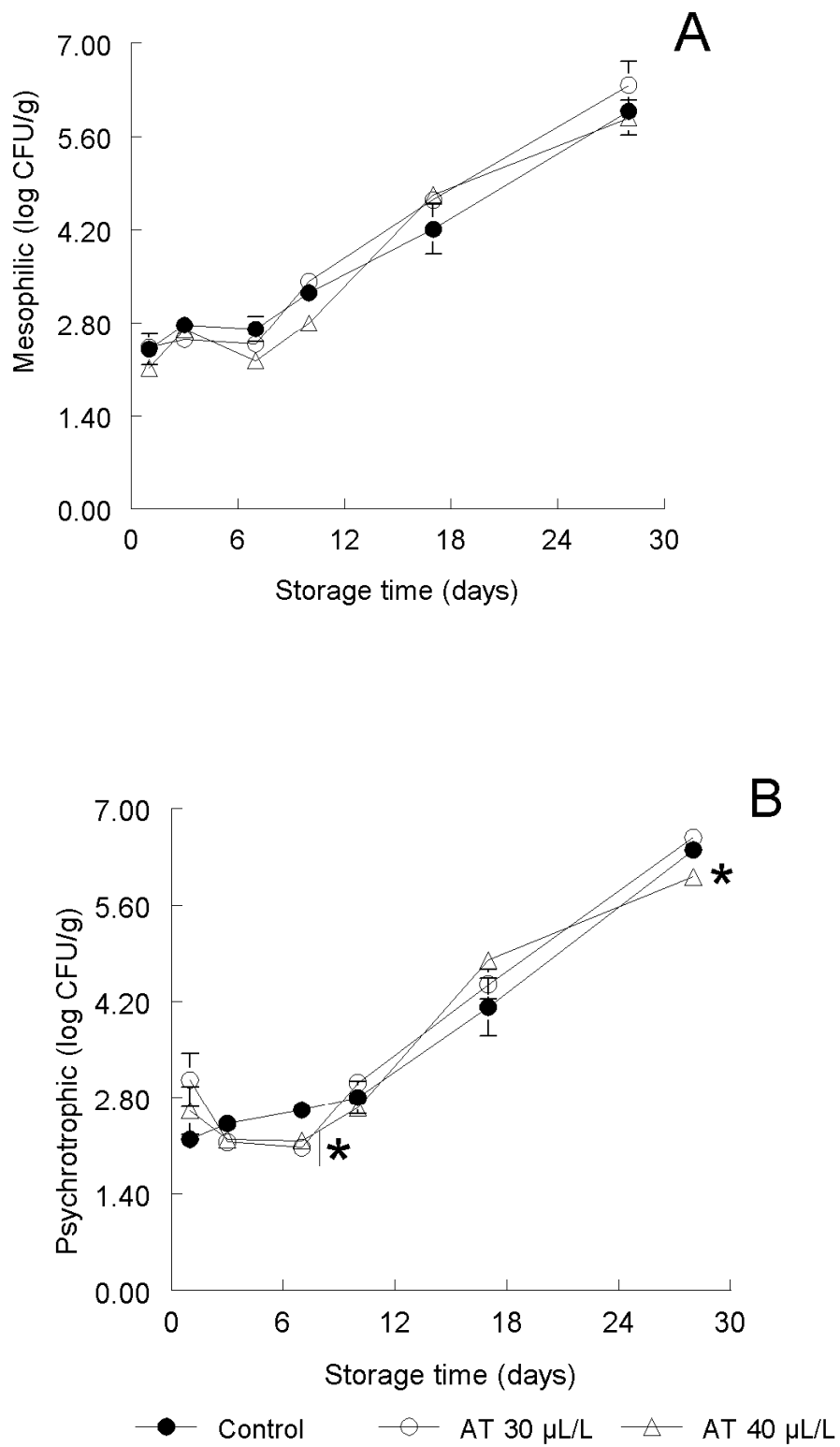


Fig. 2



**Artigo 2**

**Using the essential oil of *Aloysia triphylla* (P'Her.) Britton to sedate silver catfish (*Rhamdia quelen*) during transport improved the chemical and sensory qualities of the fish during storage in ice**

Artigo publicado no **Journal of Food Science**, Vol. 79, Nr. 6, p. S1205-S1211, 2014.

DOI:10.1111/1750-3841.12463

Journal of Food Science – Section: Sensory and Food Quality

# 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

Ana Paula Daniel, Ana Paula L. Veeck, Bruna Klein, Lauren F. Ferreira, Mauro A. da Cunha, Thaylise V. Parodi, Carla C. Zeppenfeld, Denise Schmidt, Bráulio O. Caron, Berta M. Heinzmann, Bernardo Baldisserotto, and Tatiana Emanuelli

**Abstract:** Exposure of silver catfish to 40  $\mu\text{L/L}$  of the essential oil of *Aloysia triphylla* (AT) during *in vivo* transport delayed the onset and resolution of *rigor mortis* as well as the degradation of IMP into HxR compared to the control. The fish that were treated with 30 or 40  $\mu\text{L/L}$  of AT received lower sensory demerit scores after 10 d of storage in ice compared to the control, and the fish that were treated with 40  $\mu\text{L/L}$  of AT had a longer sensory shelf life than did the control. These results indicated that using AT as a sedative in the water in which the silver catfish were transported extended their freshness and increased their shelf life during refrigerated storage.

**Keywords:** *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton, essential oil, fish, quality, sensory

**Practical Application:** Interest in natural anesthetics, such as *Aloysia triphylla*, has increased in the field of commercial aquaculture because they reduce the number of fish lesions acquired during capture, handling, and transportation. Fish sedated with the essential oil of *A. triphylla* at 40  $\mu\text{L/L}$  during transport before slaughter exhibited a delay in the loss of freshness and an increased shelf life in ice. In addition to improving animal welfare before slaughter, the essential oil appears to be a promising product for improving fish conservation in the food industry.

## Introduction

*Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton (Verbenaceae) is an herbal species that grows naturally in South America and is cultivated in North Africa and Southern Europe (Valentão and others 2002). It has been traditionally used in an infusion in folk medicine as a treatment for insomnia and anxiety and as an analgesic and sedative (Carnat and others 1999). The leaves are used as a spice to give a lemony flavor to fish and poultry dishes, vegetable marinades, salad dressings, and other foods (Funes and others 2009). Recently, the essential oil of *A. triphylla* (AT) was patented as a sedative and anesthetic for aquatic animals (PI0904839-1 A2). The anesthetic effects of AT have been attributed to its major components, including  $\alpha$ -citral,  $\beta$ -citral, and limonene (Carnat and others 1999; Parodi and others 2012).

Anesthetics are utilized in commercial aquaculture to reduce the development of lesions in fish during capture, handling, and transport (Wendelaar Bonga 1997; Barcellos and others 2006; Parodi and others 2012). However, some anesthetics fail to suppress the hormonal phase of stress, which is composed of hypothalamic–pituitary–interrenal axis stimulation and culminates in the release of catecholamines and corticosteroids (Coyle and others 2004). There is a lack of anesthetics that are safe for fish intended for human consumption. The only anesthetic approved for this use by the Food and Drug Administration (tricaine methanesulfonate, MS-222) requires a 21-d withdrawal period prior to human consumption (Coyle and others 2004). Another disadvantage of MS-222 is that it can induce corticosteroid release in fish, depending on the dosage used (Gressler and others 2014). Therefore, interest in natural anesthetics, such as AT, has increased.

In addition to the risk of physical damage to the fish, the increased muscular activity associated with stress can affect the quality of the flesh because it hastens the onset of *rigor mortis* and accelerates the degradative processes that occur during storage (Nakayama and others 1992; Poli and others 2005).

After slaughter, fish undergo sequential changes that begin with the onset and resolution of *rigor mortis* and are followed by the loss of freshness, which is dominated by autolytic reactions followed by microbiological deterioration (Pacheco-Aguilar and others 2000). These changes include the degradation of ATP (adenosine 5'-triphosphate) and proteins, pH changes, and the production of low-molecular-weight volatile bases (total volatile basic nitrogen [TVB-N]) (Ocaño-Higuera and others 2009; Hultmann and others 2012). The course and the rate of these changes are critical

MS 20131571 Submitted 10/30/2013, Accepted 3/7/2014. Authors Daniel are with Colégio Politécnico, Univ. Federal de Santa Maria, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Authors Veeck are with Inst. Federal de Santa Catarina/IFSC, CEP, 88506-400, Lages, SC, Brazil. Authors Daniel, Veeck, Klein, Ferreira and Emanuelli are with Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais (NIDAL), Dept. de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Univ. Federal de Santa Maria/Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Authors Cunha, Parodi, Zeppenfeld and Baldisserotto are with Dept. de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Univ. Federal de Santa Maria/Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Authors Schmidt and Caron are with Dept. de Agronomia, Centro de Educação Superior Norte do Rio Grande do Sul, Univ. Federal de Santa Maria, CEP, 98400-000, Frederico Westphalen, RS, Brazil. Authors Heinzmann are with Dept. de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Univ. Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil. Direct inquiries to author Emanuelli (E-mail: tatiemanuelli@gmail.com).

in determining the quality and shelf life of fish; therefore, the development of strategies that minimize preslaughter stress could also improve the quality of fish products (Bosworth and others 2007).

This study investigated whether the use of AT to sedate silver catfish during transport would delay chemical and sensory *post mortem* changes and extend the shelf life of the fish. Silver catfish, *Rhamdia quelen*, is a freshwater fish species endemic from southern Mexico to central Argentina that has become increasingly important in the aquaculture of Southern Brazil (Barcellos and others 2006) because it has adapted to temperate and subtropical climates (Barcellos and others 2001).

### Materials and Methods

This study was approved by the Ethics on Animal Use Commission (protocol 092/2011) and by the Ethics Committee (CAAE 0295.0.243.000-11) of the Federal Univ. of Santa Maria.

### Experimental procedures

Ninety-nine silver catfish (*R. quelen*;  $233.2 \pm 45.1$  g,  $31.0 \pm 1.4$  cm) were obtained from a fish farm in the Southern region of Brazil. The fish were placed in plastic bags at a load density of 260 g/L water and were transported for 6 h on a paved road. Three different treatments were applied to the water used during transport: control (water), 30  $\mu$ L/L AT, and 40  $\mu$ L/L AT (equivalent to 0, 27, and 36 mg/L, respectively; the density of the essential oil is approximately 0.90). Each plastic bag contained 11 fish and was considered as 1 replicate. Three independent replicates were conducted for each treatment. The AT was diluted in ethanol (1:10 v/v) and added to the water for transport. The transport time, loading density, and concentrations of AT were chosen based on previous studies from our group (Golombieski and others 2003; Parodi and others 2012; Parodi and others 2014).

The amount of dissolved carbon dioxide, the pH, the temperature, and the levels of total and unionized ammonia in the water were determined before and after transport following the methods of Becker and others (2012).

Immediately after transport, the fish were slaughtered by hypothermia by dipping them into an ice-water slurry (2.4 kg ice, 3.6 L water, 1 kg fish) for 20 min to mimic the procedures used in the commercial fish food industry. After slaughtering, whole fish were packed in ice flakes (1 kg/kg of fish) and stored in polystyrene boxes (100 kg capacity) at  $2 \pm 1$  °C for up to 35 d. A separate box was used for each treatment and replicate. The water was drained and the ice was replaced daily throughout the entire storage period. To assess the shelf life of whole fish stored in ice, nucleotide, TVB-N, and sensory analyses were performed at 1, 3, 7, 10, 17, 28, and 35 d of storage. At each time point, 3 fish were taken from each treatment group ( $n = 3$  per treatment) for analysis.

Three fish from each treatment group were used to evaluate the index of *rigor mortis*, which was determined in whole fish that were stored at  $2 \pm 1$  °C during the 1st 144 h after slaughter.

### Essential oil of *A. triphylla* (L'Her.) Britton

The plant *A. triphylla* (L'Her.) Britton was cultivated in Frederico Westphalen City ( $27^{\circ}22'S$ ;  $53^{\circ}25'W$ ), Rio Grande do Sul State, Brazil. A voucher specimen (SMDDB No. 11169) was identified by botanist Dr. Gilberto Dolejal Zanetti (Dept. of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, UFSM) and was deposited in the herbarium of the Dept. of Biology, UFSM. The AT was obtained from fresh leaves by hydrodistillation for 3 h using

a Clevenger apparatus according to the European Pharmacopoeia (2007). The AT was stored at  $-20^{\circ}C$  in amber glass bottles.

The composition of the AT was assessed by gas chromatographic analysis using a Varian gas chromatograph (Model CP-3800) equipped with a flame ionizer and a Saturno mass detector using a VF-5 MS fused silica capillary column (Varian) measuring  $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$ . The sample (1  $\mu$ L) was injected in the split mode (1:20) for the gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) or in the splitless mode for the GC-FID (flame ionization detection). The injector temperature was  $250^{\circ}C$ , the carrier gas was He (1 mL/min), the column oven temperature was initially maintained at  $50^{\circ}C$  for 4 min and then heated to  $280^{\circ}C$  at  $4^{\circ}C/\text{min}$ , and the detector temperature was  $310^{\circ}C$ . The GC-MS analysis was performed with electron-ionization (70 eV). The constituents of the AT were identified based on the retention index (RI), which was determined using a calibration curve of a homologous series of *n*-alkanes ( $C_8$ – $C_{32}$ ) that had been injected under the same chromatographic conditions as the samples and using fragmentation models of the mass spectra. Both data sets were compared with those in the literature (Adams 2007) and in the equipment manufacturer's library (NIST 1998). Quantitative data were obtained from the areas of the electronically integrated FID peaks.

### Fish analysis

**Rigor mortis index.** The extent of *rigor mortis* was assessed based on the curvature of the tail when the fish was placed on a flat table so that the body caudal to the posterior edge of the dorsal fin hung over the edge (Bito and others 1983). The *rigor* index ( $I_R$ ) was determined using the following formula:  $I_R = [(L_o - L_t) / L_o] * 100$ , where  $L$  represents the vertical distance between the base of the caudal fin and the table surface measured immediately after death ( $L_o$ ) and during storage ( $L_t$ ). The fish were stored at  $2 \pm 1$  °C between *rigor* measurements. Prerigor was defined as the state at which the  $I_R$  was less than 10%, inrigor was the state at which  $I_R$  ranged between 80% and 100%, and postrigor was the state at which  $I_R$  fell below 10%.

**Nucleotide analysis.** ATP and its breakdown products were extracted according to the method of Ryder (1985). A sample of muscle from the anterior dorsal region of the fish (5 g) was homogenized with 25 mL of 0.6 M perchloric acid at  $0^{\circ}C$  for 1 min in an IKA Ultra Turrax (T18 basic, IKA Works Inc., Wilmington, Del., U.S.A.) homogenizer. The homogenate was centrifuged at  $2000 \times g$  for 10 min, and 10 mL of the supernatant was adjusted to pH 6.5 to 6.8 using 1 M potassium hydroxide. Potassium perchlorate was removed by centrifugation, and the supernatant was stored at  $-20^{\circ}C$  for subsequent analysis. A Shimadzu Prominence liquid chromatograph equipped with a model LC-20AT pump, a model DGU-20A5 online degasser, and a model SPD-M20A diode array detector (set at 254 nm) operated by LC Solution version 1.25 software was used for all of the analyses. Separation was achieved using a C18 reversed-phase Shim-pack CLC ODS (M) column ( $250 \times 4.6$  mm,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ) with a guard column (Shim-pack GODS,  $10 \times 4$  mm) (Shimadzu, Tokyo, Japan) using 0.04 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 0.06 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH = 7.0) as mobile phase A and acetonitrile as mobile phase B. The buffer solutions were filtered through a 0.45- $\mu\text{m}$  Millipore filter before use. The mobile phase was eluted at a flow rate of 0.8 mL/min following the gradient proposed by Vallé and others (1998). A standard curve was prepared for each compound that was evaluated [ATP, adenosine 5'-diphosphate (ADP), adenosine 5'-monophosphate (AMP), inosine 5'-monophosphate



(IMP), hypoxanthine (Hx), and inosine (HxR), ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, U.S.A.] in the range of 0.01 to 0.4 mg/mL. The samples were filtered through a 0.22- $\mu$ m Millipore filter before injection to remove potassium perchlorate precipitates that had formed during storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ . All the reagents used were of high-performance liquid chromatography (HPLC) grade.

**TVB-N analysis.** The TVB-N content of the flesh was determined by distilling samples that were alkalinized with  $\text{MgO}$ , as described by Furuichi and others (1997), except that before distillation, the protein fraction was separated by homogenizing the fish muscle in 5% trichloroacetic acid at a ratio of 1:2 (w/v).

**Sensory analysis.** The sensory analysis of the whole fish was conducted using the Tasmanian Food Research Unit (TFRU) freshness assessment scheme, a system developed at the CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization) Div. of Food Research (Branch and Vail 1985), with minor modifications for silver catfish (Table 1). On each day of analysis, 2 fish from each treatment group were assessed by an expert panel ( $n = 13$  to 19). Each panelist was given up to 4 simple descriptors that were scored using demerit points from 0 to 3, with 0 representing the highest quality, and any higher score indicating a poorer quality. The panelists were also asked to state whether the fish were acceptable or unacceptable for consumption, and this judgment was used to determine the shelf life of the fish.

#### Statistical analysis

The values for the water parameters were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA), and the other results were analyzed using a two-way factorial ANOVA (3 treatments  $\times$  14 time points for *rigor mortis* and 3 treatments  $\times$  7 time points for the other results). The differences between the averages were *post hoc* evaluated using Tukey's HSD (honest significant difference) test. Differences were considered to be significant when  $P < 0.05$ .

## Results and Discussion

### Composition of the AT

Forty-one compounds were identified in the AT, mainly monoterpenoids and sesquiterpenoids. The AT contained (as g/100 g of oil) 29.4  $\alpha$ -citral, 20.8  $\beta$ -citral, 11.9 limonene, 5.6 caryophyllene, 3.3 cubenol, 3.0 geranyl acetate, and 2.3 caryophyllene oxide, whereas the other compounds were found at concentrations below 2 g/100 g. This composition is similar to those reported in previous studies, which also found  $\alpha$ -citral to be the major constituent of AT, followed by  $\beta$ -citral and limonene (Parodi and others 2012). Notably, citral and limonene have been recognized by the regulatory agencies in the United States and EU as safe for use as food additives (Tajkarimi and others 2010).

### Water parameters

Transporting the fish for 6 h increased the levels of carbon dioxide and the total and unionized ammonia nitrogen in the water ( $P < 0.05$ ) but did not change the pH or temperature (Table 2). The presence of AT did not change the pH, temperature, carbon dioxide level, or unionized ammonia level after transport compared to the control values ( $P > 0.05$ , Table 2). The total ammonia nitrogen levels after transport were lower in the water containing AT than in the control water ( $P < 0.05$ ), which may indicate a less stressful condition during the transport of the fish, as previously demonstrated using sedative compounds (Becker and others 2012; Vecek and others 2013). In fact, fish sedated with

AT during transport had lower plasma cortisol levels, ammonia excretion, and ionoregulatory changes than the controls, which indicates mitigation of the transport stress (Zeppenfeld and others 2014).

### Physicochemical analysis

**Rigor mortis.** An ANOVA revealed a significant effect of the treatment  $\times$  time interaction on the *rigor mortis* index values ( $P < 0.05$ ). The fish that were treated with 40  $\mu\text{L/L}$  AT had a delayed onset of *rigor mortis* (lower rigor index values than the control at 6 and 8 h after slaughter ( $P < 0.05$ ; Figure 1) and a faster initial resolution of *rigor mortis*, as indicated by their lower rigor index value compared with the control at 48 h after slaughter ( $P < 0.05$ ; Figure 1). Thereafter, the resolution of *rigor mortis* proceeded slowly in the fish that were treated with 40  $\mu\text{L/L}$  AT, so that at 144 h, these fish had a higher rigor index value than the control. These results indicated that only the fish treated with 40  $\mu\text{L/L}$  AT had not completely resolved *rigor mortis* at 144 h after slaughtering (rigor index  $> 10\%$ ).

Pre-slaughter stress increases the degradation of glycogen to supply energy for muscular activity, hastens the onset of *rigor mortis*, and leads to a more intense rigor state compared with that of less stressed fish (Bagni and others 2007; Bosworth and others 2007). The delayed onset and resolution of *rigor mortis* in the AT-treated fish may be associated with the decrease in transport stress caused by this essential oil. In fact, it was recently demonstrated that using the essential oil of AT as an anesthetic for silver catfish prevented the release of cortisol, a stress hormone (Gressler and others 2014).

Fish deterioration begins only after the resolution of *rigor mortis* (Poli and others 2005). The delayed onset and resolution of *rigor mortis* found in the fish that were treated with 40  $\mu\text{L/L}$  of AT indicated that their freshness was preserved for a longer time than that of the control fish.

**Nucleotide-degradation products.** After slaughter, the energy for muscle cell functions is supplied by ATP, which is generated by the anaerobic oxidation of glucose (from the glycogen reserve) and by creatine phosphate (Iwamoto and others 1987). When these ATP sources are depleted, the ATP level begins to decrease, following a sequence of degradation from  $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} \rightarrow \text{AMP} \rightarrow \text{IMP} \rightarrow \text{HxR} \rightarrow \text{Hx} \rightarrow \text{xanthine}$  (Howgate 2006). When the ATP level decreases to approximately 1  $\mu\text{mol/g}$ , the muscle enters a full-rigor state (Wang and others 1998). The levels of ATP and its breakdown products, ADP, AMP, IMP, HxR, and Hx, can be determined as additional indicators of *rigor mortis* (Wang and others 1998) and of fish freshness (Ocaño-Higuera and others 2011).

ATP was not detected in any of the fish muscle samples, and low levels of ADP and AMP were found, which were significantly reduced during storage (Figure 2;  $P < 0.05$ ). These findings indicate that 1 d after slaughter, when the 1st samples were collected for nucleotide evaluation, the majority of the ATP had been degraded into IMP, which was the predominant nucleotide at this time (Figure 2). No significant effects of the treatment or of the time  $\times$  treatment interaction on the ATP, ADP, or AMP levels were detected, and the ANOVA revealed a significant effect of the treatment  $\times$  time interaction on the levels of IMP and HxR ( $P < 0.05$ ; Figure 2), whereas the Hx levels were affected only by the time of storage ( $P < 0.05$ ). The IMP level decreased from the 3rd day of storage in all of the treatment groups ( $P < 0.05$ ). The fish that were treated with 40  $\mu\text{L/L}$  AT had a higher level of IMP ( $9.2 \pm 0.2 \mu\text{mol/g}$ ) than did the control ( $6.5 \pm 1.8 \mu\text{mol/g}$ ) at 1 d of storage ( $P > 0.05$ ; Figure 2). The Hx levels increased from the

Quality of fish exposed to *A. triphylla*...

Table 1—Tasmanian Food Research Unit (TFRU) sensory assessment scheme, modified for silver catfish.

Parameters assessed	Demerit points <sup>a</sup>			
	0	1	2	3
General				
Firmness	Firm	Slightly firm	Soft	Very soft
Stiffness	Prerigor	Rigor	Postrigor	—
Odor	Fresh	Strong but not spoiled	Spoiled	—
Eyes				
Clarity	Clear	Slightly cloudy	Cloudy	Very cloudy
Iris	Visible	Slightly visible	Not visible	—
Gills				
Color	Dark red	Red	Slightly brown	Dark brown or grey
Mucus	Absent	Slight	Moderate	Excessive
Odor	Fresh	Strong	Spoiled	Very spoiled
Belly				
Firmness	Firm and elastic	Firm and not elastic	Soft	Very soft
Color	Bright white	Grayish	Brownish-yellow	—
Vent				
Condition	Normal	Dilated	Excessive	—

<sup>a</sup>Total demerit points (0 to 28).

Table 2—Values for the water parameters before and after the transport (6 h) of silver catfish (*Rhamdia quelen*) in plastic bags with the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton added to the water.

Water parameter	Before transport	After transport (treatment)		
		Control	30 $\mu\text{L/L}$ AT	40 $\mu\text{L/L}$ AT
Carbon dioxide (mg/L)	4.9 $\pm$ 0.3	14.8 $\pm$ 2.8*	17.3 $\pm$ 2.2*	18.0 $\pm$ 2.5*
pH	7.3 $\pm$ 0.1	6.7 $\pm$ 0.1	6.6 $\pm$ 0.1	6.6 $\pm$ 0.1
Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	17.6 $\pm$ 0.6	18.6 $\pm$ 1.0	18.5 $\pm$ 1.0	19.0 $\pm$ 0.8
Total ammonia Nitrogen (mg N/L)	0.8 $\pm$ 0.6	10.3 $\pm$ 0.6 <sup>ab</sup>	6.0 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>	6.1 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>
Unionized ammonia (mg N/L)	0.0052 $\pm$ 0.004	0.018 $\pm$ 0.007*	0.013 $\pm$ 0.004*	0.014 $\pm$ 0.003*

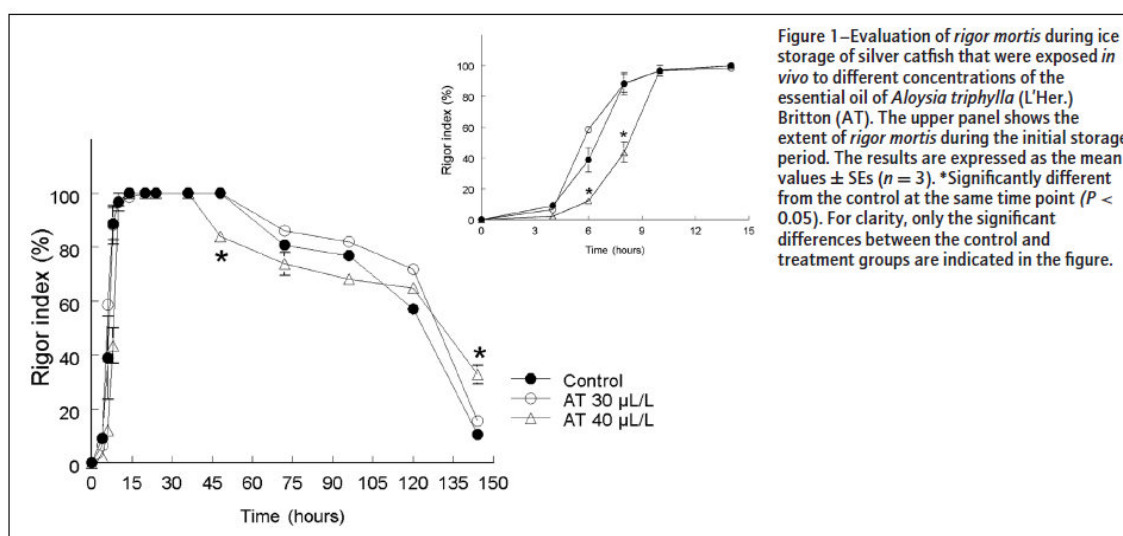
The data are expressed as the mean values  $\pm$  SEs. The asterisks indicate significant differences compared to the values before transport ( $P < 0.05$ ). Different lowercase letters in the rows indicate significant differences between the treatment groups after transport ( $P < 0.05$ ).

7th day of storage compared to the initial values ( $P < 0.05$ ), but these changes were not affected by the treatment. The HxR levels increased from the 3rd to the 17th day of storage when compared to the initial values ( $P < 0.05$ ) and then were lower on days 28 and 35 of storage compared to the level at day 17 ( $P < 0.05$ ). The fish that were treated with 40  $\mu\text{L/L}$  of AT had a lower HxR (0.64  $\pm$  0.14  $\mu\text{mol/g}$ ) level than the control (1.31  $\pm$  0.14  $\mu\text{mol/g}$ ) at 3 d of storage ( $P < 0.05$ ). These results indicate that the degradation

of IMP into HxR in the fish that were treated with 40  $\mu\text{L/L}$  AT was delayed, which suggests that AT had a beneficial effect on the fish, as the loss of IMP has been related to the loss of fresh fish flavor (Howgate 2006).

## TVB-N

The TVB-N content is used as an indicator of the extent of deterioration of refrigerated fish because it is composed of the contents



Quality of fish exposed to *A. triphylla*...

of ammonia, trimethylamine, and other nitrogenous compounds that are formed primarily by the action of microorganisms. The TVB-N content of the fish showed minimal changes during storage (2.8 to 5.6 mg N%), and these changes were not affected by treatment with AT (data not shown;  $P > 0.05$ ). The TVB-N value appears to be inappropriate for the evaluation of silver cat-

fish spoilage because it remained well below 30 mg N%, which is the maximum acceptable limit for human consumption in various countries, including Brazil (Lakshmanan and others 1996; Tome and others 2000). Although TVB-N has been widely used to assess the deterioration of marine fish, its use in assessing the deterioration of freshwater fish has been questioned (Scherer and others 2006) because these fish generally contain negligible amounts of trimethylamine oxide and urea, which are the substrates for TVB-N formation.

## Sensory analysis

A modified TFRU scheme (Table 1) was used to evaluate the deterioration of the silver catfish during storage on ice. Some parameters, such as those concerning the gills (color, mucus, and odor), eyes (clarity and the presence of an iris), and belly (firmness and color) were found to be good indicators of the freshness and spoilage of silver catfish because they incurred the greatest changes in demerit points during storage (data not shown). According to the sensory evaluation, the freshness of a silver catfish was indicated by dark-red gills with a fresh appearance and a fresh fish odor, clear eyes with a visible iris, and a firm bright-white belly, whereas poor quality was indicated by brown-colored gills with a spoiled smell containing a moderate amount of mucus, cloudy to very cloudy eyes with no visible iris, and a soft and grayish to brownish-yellow belly (data not shown).

There was a significant effect of the time  $\times$  treatment interaction on the overall TFRU sensory scores (Figure 3A). The demerit sensory scores of all the fish increased linearly during storage, but the fish that were treated with 30 or 40  $\mu\text{L/L}$  of AT received significantly lower sensory scores than did the control fish after 10 d of storage, indicating that they had a greater degree of freshness ( $P < 0.05$ ; Figure 3A). These lower sensory scores are most likely associated with a delay in biochemical deterioration (*rigor mortis* evolution and nucleotide degradation). These results indicate that AT delayed the loss of freshness during the early storage period, which would result in an advantageous quality during the early phase of shelf life.

The panelists indicated that the control fish were unacceptable for consumption at day 35 of storage, whereas the fish that were treated with 30  $\mu\text{L/L}$  AT were unacceptable at day 28, and the fish that were treated with 40  $\mu\text{L/L}$  AT were acceptable at 35 d of storage ( $P < 0.05$ ; data not shown). The shelf life of the control silver catfish ranged from 28 to 35 d of storage in ice, which is slightly higher than that previously reported for other catfish (15 to 27 d; Huss 1995). Treatment with 40  $\mu\text{L/L}$  AT increased the shelf life of fish stored in ice to more than 35 d. The sensory scores of the control fish and the fish that were treated with 30  $\mu\text{L/L}$  AT were 21.2 and 19.7, at the limits of acceptability (Figure 3A). The fish that were treated with 40  $\mu\text{L/L}$  AT, which were still acceptable at the end of the storage period, attained a sensory score of 19.3 (Figure 3A). Although no difference was observed among the treatment groups in the overall TFRU sensory scores at the end of the storage period (Figure 3A), some parameters, such as the gill color and the belly firmness, were significantly affected by the AT treatment (Figure 3B and C) and most likely contributed to the different shelf lives of the treatment groups. Compared with the control fish, the fish treated with 30  $\mu\text{L/L}$  AT had higher demerit points for gill color at day 28 of storage (Figure 3B), which most likely contributed to its rejection at this time point. In contrast, the fish that were treated with 40  $\mu\text{L/L}$  AT had lower demerit points for gill color and belly firmness at day 35 of storage compared to the control

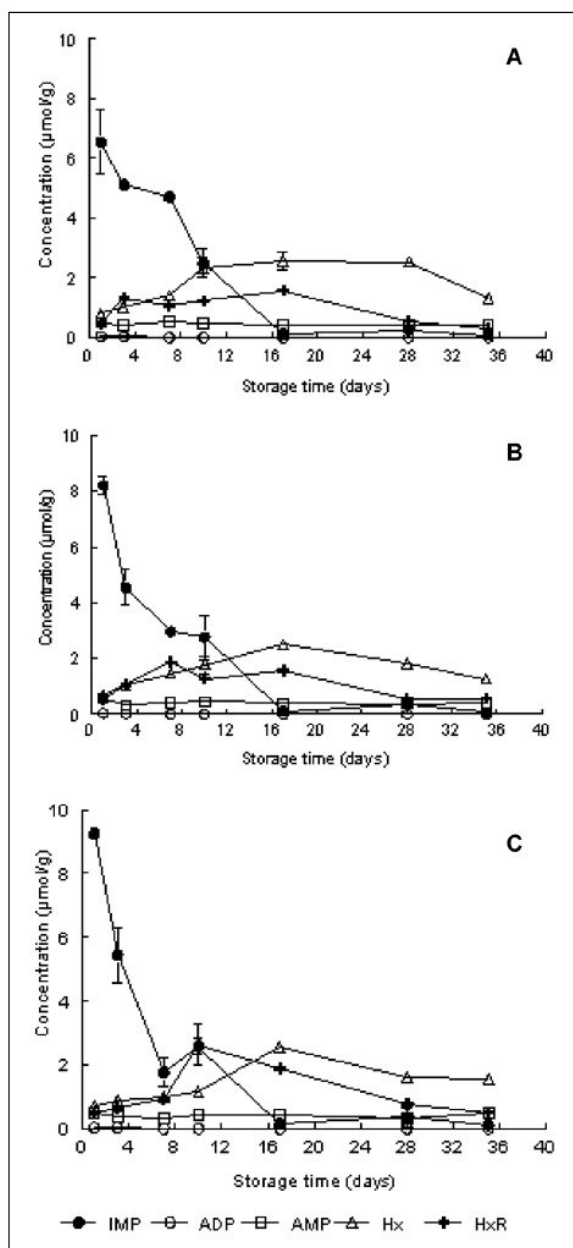
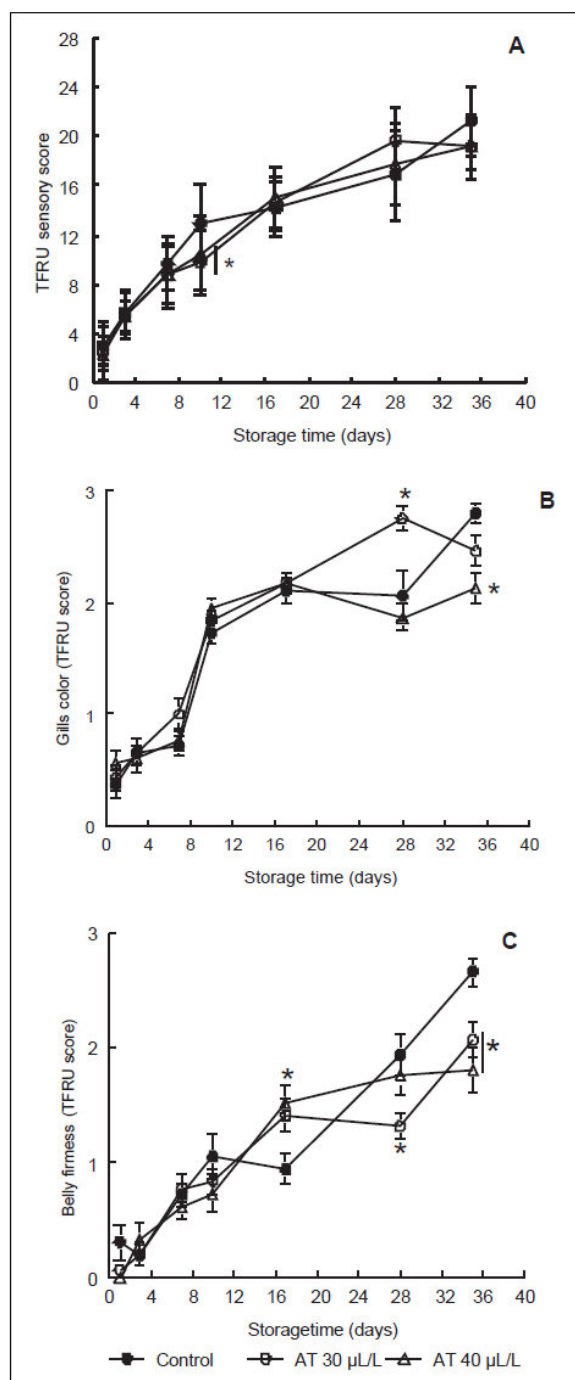


Figure 2—Effect of *in vivo* exposure to different concentrations of the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton (AT) on the degradation of nucleotides in the muscles of silver catfish stored in ice. (A) Control (distilled water), (B) 30  $\mu\text{L/L}$  AT, and (C) 40  $\mu\text{L/L}$  AT. The results are expressed as the mean values  $\pm$  SEs ( $n = 3$ ). (ATP) adenosine 5'-triphosphate, (IMP) inosine 5'-monophosphate, (ADP) adenosine 5'-diphosphate, (AMP) adenosine 5'-monophosphate, (Hx) hypoxanthine, and (HxR) inosine.



**Figure 3**—Changes in sensory qualities during the refrigerated storage of silver catfish that were exposed *in vivo* to the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton (AT): overall TFRU sensory scores (A), gill color (B), and belly firmness (C). The scores are the demerit points obtained using the TFRU scheme; higher scores indicate poorer quality. The results are expressed as the mean values  $\pm$  SEs ( $n = 13$  to  $19$ ). \*Significantly different from the control at the same time point ( $P < 0.05$ ). For clarity, only the significant differences between the control and the treatment groups are indicated in the figure.

(Figure 3B and C), which most likely contributed to them having the longest shelf life.

Cakli and others (2007) showed that the results of a sensory analysis of whole gutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using a modified TFRU freshness assessment scheme similar to the one used in the present study were well correlated with the results of microbiological analysis during storage in ice. Microbiological growth was not assessed in this study, but the higher sensory demerit points given at the end of the storage period reflected the progress of bacterial spoilage. Thus, the increased shelf life of the fish that were treated with  $40 \mu\text{L/L}$  AT could be related to its antibacterial activity. In fact, AT exhibited antibacterial activity *in vitro* against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, and *Aeromonas* sp. (Rojas and others 2010; Parodi and others 2013).

## Conclusions

Results indicate that fish that were sedated with the essential oil of AT at  $40 \mu\text{L/L}$  during transport before slaughter exhibited a delay in the loss of freshness and an increased shelf life during storage in ice. In addition to improving animal welfare before slaughter, AT appears to be a promising product for improving fish conservation in the food industry.

## Acknowledgments

Authors Emanuelli and Baldisserotto are recipients of CNPq research fellowships. Authors Veeck, Klein, and Ferreira are recipients of CNPq scholarships. This study was supported by PRONEX (FAPERGS/CNPq), CT-AGRO (MCT/MPA/FINEP), and Casadinho/PROCAD (MCT/CNPq/MEC/Capes). Authors Cunha, Parodi, Heinzmann, and Baldisserotto obtained a patent for "Anesthetic compositions for aquatic animals and the method of anesthesia of aquatic animals including the same" in Brazil (PI0904832-4A2), which includes the use of the essential oil of AT.

## Author Contributions

Emanuelli and Daniel designed the study and drafted the manuscript. Parodi, Schmidt, Caron, and Heinzmann produced the plant, prepared the essential oil, and analyzed its composition. Cunha, Parodi, Zeppenfeld, and Baldisserotto treated the fish and collected the test data before the fish slaughter. Daniel, Veeck, Klein, and Ferreira collected the test data on the shelf life of the fish. All of the authors contributed to the interpretation and discussion of the results related to their part of the study and approved the final version of the paper.

## References

- Adams RP. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadupole mass spectrometry. 4th ed. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corp.
- Bagni M, Civitareale C, Priori A, Ballerini A, Finoia M, Brambilla G, Marino G. 2007. Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 263:52–60.
- Barcellos LJG, Woehl VM, Wassermann GF, Krieger MH, Quevedo RM, Lulhier F. 2001. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard), a South American Catfish. *Aquac Res* 32:123–5.
- Barcellos LJG, Kreutz LC, Quevedo RM. 2006. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. *Aquaculture* 253:317–21.
- Becker AG, Parodi TV, Heldwein CG, Zeppenfeld CC, Heinzmann BM, Baldisserotto B. 2012. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. *Fish Physiol Biochem* 38:789–96.
- Bito M, Yamada K, Mikumo Y, Amano K. 1983. Studies on rigor mortis of fish. *Bull Tokai Reg Fish Res Lab* 109:89–96.
- Bosworth BG, Small BC, Gregory D, Kim J, Black S, Jerrett A. 2007. Effects of rested-harvest using the anesthetic AQUI-S (TM) on channel catfish, *Ictalurus punctatus*, physiology and fillet quality. *Aquaculture* 262:302–18.

Quality of fish exposed to *A. triphylla*...

- Branch AC, Vail AMA. 1985. Bringing fish inspection into computer age. *Food Technol Aust* 37:352-5.
- Cakli S, Kilinc B, Cadun A, Dincer T, Tolasa S. 2007. Quality differences of whole ungutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. *Food Control* 18:391-7.
- Carnat A, Carnat AP, Fraisse D, Lamaison JL. 1999. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. *Fitoterapia* 70:44-9.
- Coyle SD, Durborow RM, Tidwell JH. 2004. *Anesthetics in aquaculture*. Publication, No. 3900, Stoneville, MS: Southern Regional Aquaculture Center.
- European Pharmacopoeia. 2007. European Directorate for the Quality of Medicines, Council of Europe, Strasbourg, 6th ed.
- Funes L, Fernández-Arroyo S, Laporta O, Pons A, Roche E, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Micol V. 2009. Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract. *Food Chem* 117:589-98.
- Furuichi Y, Taniguchi J, Murabayashi J. 1997. A rapid and convenient method for the determination of amide nitrogen in food proteins. *Nip Nogeik Kaishi* 71:395-401.
- Golombieski JJ, Silva LVF, Baldissierotto B, da Silva JHS. 2003. Transport of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings at different times, load densities, and temperatures. *Aquaculture* 216:95-102.
- Gressler LT, Riffel APK, Parodi TV, Saccol EMH, Koakoski G, Costa ST, Pavanato MA, Heinzmann BM, Caron B, Schmidt D, Llesuy SF, Barcellos LJG, Baldissierotto B. 2014. Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. *Aquac Res* 45:1061-72.
- Howgate PA. 2006. Review of the kinetics of degradation of inosine monophosphate in some species of fish during chilled storage. *Int J Food Sci Technol* 41:341-53.
- Hultmann L, Phu TM, Tobiasen T, Aas-Hanse O, Rustad T. 2012. Effects of pre-slaughter stress on proteolytic enzyme activities and muscle quality of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Food Chem* 134:1399-408.
- Huss HH. 1995. *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. FAO Fisheries Technical Paper 348. Rome, Italy: Food and Agriculture of the United Nations.
- Iwamoto M, Yamanaka H, Watabe S, Hashimoto K. 1987. Effects of storage temperature on rigor mortis and ATP degradation in place (*Paralichthys olivaceus*) muscle. *J Food Sci* 52:1514-7.
- Lakshmanan PT, Antony PD, Gopakumar K. 1996. Nucleotide degradation and quality changes in mullet (*Liza concula*) and pearlspot (*Etroplus suratensis*) in ice and at ambient temperatures. *Food Control* 7:277-83.
- Nakayama T, Liu DJ, Ooi, A. 1992. Tension changes of stressed and unstressed carp muscle isometric rigor contraction and resolution. *Nip Sui Gak* 58:1517-22.
- Natl Inst. of Standards and Technology. 1998. NIST Scientific and Technical Databases. The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIM Mass Spectral Library Version 1.7.
- Ocaño-Higuera VM, Marquez-Ríos E, Canizales-Dávila M, Castillo-Yáñez FJ, Pacheco-Aguilar R, Lugo-Sánchez ME, García-Orozco KD, Graciano-Verdugo AZ. 2009. Postmortem changes in cazon fish muscle stored on ice. *Food Chem* 116:933-8.
- Ocaño-Higuera VM, Maeda-Martínez AN, Marquez-Ríos E, Canizales-Rodríguez DF, Castillo-Yáñez FJ, Ruiz-Bustos E, Graciano-Verdugo AZ, Plascencia-Jatomea M. 2011. Freshness assessment of ray fish stored in ice by biochemical, chemical and physical methods. *Food Chem* 125:49-54.
- Pacheco-Aguilar R, Lugo-Sánchez ME, Robles-Burgueño MR. 2000. Postmortem biochemical and functional characteristic of monterey sardine muscle stored at 0°C. *J Food Sci* 65: 40-7.
- Parodi TV, Cunha MA, Heldwein CG, Souza DM, Martins AC, Garcia LO, Wasielesky Junior W, Monserrat JM, Schmidt D, Caron BO, Heinzmann BM, Baldissierotto B. 2012. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). *Comp Biochem Physiol C* 155:462-8.
- Parodi TV, Vargas APC, Krewer C, Flores EMM, Baldissierotto B, Heinzmann BM, Oliveira JV, Popiolski MS, Minozzo M. 2013. Chemical composition and antibacterial activity of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton extracts obtained by pressurized CO<sub>2</sub> extraction. *Braz Arch Biol Technol* 56:283-92.
- Parodi TV, Cunha MA, Becker AG, Zeppenfeld CC, Martins DI, Koakoski G, Barcellos LG, Heinzmann BM, Baldissierotto B. 2014. 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 Physiol Biochem*. 40:323-34.
- Poli BM, Parisi G, Scappini F, Zampacavallo G. 2005. Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquacult Intl* 13:29-49.
- Rojas LB, Velasco J, Díaz T, Gil RO, Carmona J, Usabillaga A. 2010. Chemical composition and antibacterial effects of the essential oil of *Aloysia triphylla* against genito-urinary pathogens. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 9:56-62.
- Ryder JM. 1985. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish products by high performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 33:678-80.
- Scherer R, Augusti PR, Bochi VC, Steffens C, Fries LLM, Daniel AP, Kubota EH, Radünz-Neto J, Emanuelli T. 2006. Chemical and microbiological quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) slaughtered by different methods. *Food Chem* 99:136-42.
- Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21:1199-218.
- Tome E, Iglesias M, Kodaira M, Gonzalez A. 2000. Effects of storage temperature on the onset of rigor mortis and stability of cultured tilapia (*Oreochromis*) spp. *Rev Cient-Fac Cien* 10: 339-45.
- Valentão P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, Bastos ML. 2002. Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biol Pharm Bull* 25:1324-7.
- Vallé M, Malle P, Bouquelet S. 1998. Evaluation of fish decomposition by liquid chromatographic assay of ATP degradation products. *J AOAC Int* 81:571-5.
- Veck APL, Klein B, Ferreira LF, Becker AG, Heldwein CG, Heinzmann BM, Baldissierotto B, Emanuelli T. 2013. Lipid stability during the frozen storage of fillets from silver catfish exposed *in vivo* to the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *J Sci Food Agric* 93:955-60.
- Wang D, Tang J, Correia LR, Gill TA. 1998. Postmortem changes of cultivated Atlantic salmon and their effects on salt uptake. *J Food Sci* 63:634-7.
- Wendelaar Bonga SE. 1997. The stress response in fish. *Physiol Rev* 77:591-625.
- Zeppenfeld CC, Toni C, Becker AG, Miron DS, Parodi TV, Heinzmann BM, Barcellos LJG, Koakoski G, Rosa JGS, Loro VL, Cunha MA, Baldissierotto B. 2014. Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. *Aquaculture* 418-419:101-7.

**Artigo 3**

**Estabilidade de filés congelados de jundiás (*Rhamdia quelen*) sedados com o óleo essencial de *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton durante o transporte**

**Artigo em fase final de revisão pelos autores para ser submetido à revista**

**Ciência Rural**

(configurado conforme as normas da revista)

**Estabilidade de filés congelados de jundiás (*Rhamdia quelen*) sedados com o óleo essencial de *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton durante o transporte**

**Stability during frozen storage of fillets from silver catfish (*Rhamdia quelen*) sedated with the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton during transport**

**Ana Paula Daniel<sup>I,II</sup>, Lauren Fresinghelli Ferreira<sup>II</sup>, Bruna Klein<sup>II</sup>, Amanda Roggia Ruviaro<sup>II</sup>, Andréia Quatrin<sup>II</sup>, Thaylise Vey Parodi<sup>III</sup>, Carla Cristina Zeppenfeld<sup>III</sup>, Berta Maria Heinzmann<sup>IV</sup>, Bernardo Baldisserotto<sup>III</sup>, Tatiana Emanuelli<sup>II\*</sup>**

**RESUMO**

O objetivo do trabalho foi avaliar o uso do óleo essencial de *Aloysia triphylla* (AT) na água de transporte de peixes, *in vivo* como sedativo, e se este óleo poderia aumentar a estabilidade de filés de jundiá (*Rhamdia quelen*) durante o armazenamento congelado. Avaliou-se a composição química do AT e dos filés dos peixes expostos ao AT (0, 30 ou 40  $\mu\text{L.L}^{-1}$ ), bem como o pH e indicadores de oxidação lipídica (dienos conjugados, DC; substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, TBARS) dos filés ao longo do armazenamento ( $-18\pm 2^\circ\text{C}/17$  meses). O  $\alpha$ -citral e o  $\beta$ -citral foram os compostos majoritários do AT. O tratamento com AT não modificou a composição centesimal dos filés de jundiá. O tratamento com 40  $\mu\text{L.L}^{-1}$  de AT resultou em menor pH que o controle ( $p < 0,05$ ) durante o congelamento. Foi observado maior teor inicial de DC nos filés dos tratamentos 30 e 40  $\mu\text{L.L}^{-1}$  de AT e menor valor de TBARS nos filés do tratamento 40  $\mu\text{L.L}^{-1}$  de AT após 6, 9 e 17 meses de congelamento, em comparação com os filés controle ( $p < 0,05$ ). Os resultados indicam que o uso do AT como sedativo na água de transporte de jundiás, além de promover o bem estar animal, retarda a oxidação lipídica dos filés durante o armazenamento congelado, o que pode ampliar sua vida útil.

**Palavras chaves:** oxidação, transporte, peixe, TBARS, anestésico natural.

## **ABSTRACT**

This study was aimed at evaluating whether the use of the essential oil of *Aloysia triphylla* (AT) used for fish transport would, *in vivo* as a sedative, and this oil increase the stability of fillets from silver catfish (*R. quelen*) during frozen storage. The chemical composition of AT and of the fillets from fish exposed to the AT (0, 30 ou 40  $\mu\text{L.L}^{-1}$ ) were evaluated as well as the pH values and markers of lipid oxidation (conjugated dienes, CD; thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) in the fillets during of frozen storage ( $-18\pm 2^\circ\text{C}/17$  months).  $\alpha$ -Citral and  $\beta$ -citral were the major compounds found in the AT. AT treatment did not change the proximate composition of fish fillets. Fillets from fish treated with 40  $\mu\text{L.L}^{-1}$  of AT had lower pH values than the control ( $p < 0.05$ ) during the storage. The fillets from fish treated with 30 and 40  $\mu\text{L.L}^{-1}$  of AT had higher initial levels of DC and fillets from fish treated with 40  $\mu\text{L.L}^{-1}$  of AT had lower levels of TBARS after 6, 9 and 17 months of storage ( $p < 0.05$ ) than the control fillets. Besides promoting animal welfare, the use of AT as a sedative for the transport of silver catfish, delays lipid oxidation of frozen fillets, which may extend its shelf life.

**Keywords:** oxidation, transport, fish, TBARS, natural anesthetic.

## **INTRODUÇÃO**

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie de peixe de água doce endêmica do sul do México ao centro da Argentina. Sua importância na aquicultura tem aumentado, principalmente no sul do Brasil (BARCELLOS et al., 2006), além de ter boa aceitação no mercado consumidor (BARCELLOS et al., 2013). Na aquicultura comercial os peixes são submetidos ao estresse durante a captura, manuseio e transporte (PARODI et al., 2012). Além do risco de danos físicos ao peixe, o aumento da atividade muscular pode afetar a qualidade da carne, uma vez que antecipa o início do *rigor mortis* e acelera os processos de



degradação como a oxidação lipídica e protéica durante o armazenamento (ASHELY, 2007), sendo crítico para determinar a qualidade e a vida útil do pescado (BOSWORTH et al., 2007).

Uma estratégia para reduzir o estresse pré-abate é o uso de anestésicos (PARODI et al., 2012, ZEPPENFELD et al., 2014). Anestésicos contendo eugenol como ingrediente ativo (AQUI-S<sup>®</sup> 20E) podem ser usados para sedar os peixes na Nova Zelândia, Austrália, Chile e Coréia (ASHLEY, 2007). No entanto, o único anestésico aprovado pela Food and Drug Administration para uso na aquicultura (Metanossulfanato de Tricaína, MS-222) não pode ser aplicado em período inferior a 21 dias antes do abate se o peixe for destinado para o consumo humano nos EUA e de 5 dias no Canadá (MEINERTZ et al., 2014). Assim, tem aumentado o interesse por anestésicos naturais e, recentemente, o óleo essencial de *Aloysia triphylla* (AT) foi patenteado como sedativo e anestésico para animais aquáticos (PI0904839-1A2).

A *A. triphylla* (L' Herit) Britton (Verbenaceae) é uma espécie de erva que cresce naturalmente na América do Sul e é cultivada no Norte da África e sul da Europa (VALENTÃO et al., 2002). Ela tem sido usada na medicina popular como infusão para o tratamento de insônia e ansiedade, e como analgésico e sedativo (CARNAT et al., 1999). Suas folhas são usadas para conferir sabor de limão em pratos a base de pescado e aves, vegetais marinados, saladas e outros (FUNES et al., 2009). Os efeitos anestésicos do AT têm sido atribuídos a seus principais componentes  $\alpha$ -citral,  $\beta$ -citral e limoneno (CARNAT et al., 1999; PARODI et al., 2012). A capacidade antioxidante do AT foi demonstrada *in vitro* em ensaio de remoção do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) no qual o AT apresentou atividade moderada em comparação ao antioxidante sintético butil hidroxianisol utilizado comercialmente (HOSSAM et al., 2011).

Entre os produtos de origem animal, o pescado é o mais susceptível a deterioração devido a elevada atividade de água dos tecidos, ao pH próximo à neutralidade, ao elevado teor de nutrientes facilmente utilizáveis por micro-organismos, bem como ao alto conteúdo de ácidos graxos insaturados (HOSSEINI et al., 2010). A vida útil dos pescados congelados é limitada por reações de hidrólise e especialmente de oxidação lipídica, que resultam em alterações indesejáveis na cor, sabor, odor e valor nutritivo (SAMPELS, 2013).

Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o uso do óleo essencial de *Aloysia triphylla* (AT) na água de transporte de peixes, *in vivo* como sedativo, e se este óleo poderia aumentar a estabilidade de filés de jundiá (*R. quelen*) durante o armazenamento congelado.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Óleo essencial de *A. triphylla* (L' Her.) Britton

A *A. triphylla* (L' Her.) Britton foi cultivada na cidade de Frederico Westphalen (27°22"S; 53°25"W), Rio Grande do Sul, Brasil. A espécie foi identificada pelo botânico Dr. Gilberto Dolejal Zanetti (Departamento de Farmácia Industrial, UFSM) e depositada no herbário do Departamento de Biologia da UFSM (SMDB No. 11169). O AT foi obtido a partir de folhas frescas por hidrodestilação durante 3h usando o aparelho de Clevenger (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010) e armazenado em frascos de vidro âmbar (-20°C).

A composição do AT foi avaliada em cromatógrafo gasoso (CG) Varian (Modelo CP - 3800) equipado com detector de ionização em chama (FID) e de espectrômetro de massas (EM) Saturn com uma coluna capilar de sílica fundida, VF-5 EM (Varian) de 30m x 0,25mm x 0,25µm. A amostra (1µL) foi injetada no modo split (1:20) para CG-EM e no modo splitless para CG-FID, nas condições: temperatura do injetor 250°C, gás de arraste He (1mL.min<sup>-1</sup>), temperatura do forno 50°C durante 4 min e em seguida aquecida até

280°C a 4°C.min<sup>-1</sup>, temperatura do detector 310°C. A análise de CG-EM foi realizada com ionização por impacto de elétrons (70eV). Os componentes do AT foram identificados através da comparação entre o pico do índice de retenção de Kovats e os padrões de fragmentação de espectro de massa com dados reportados a partir de Adams (2001) e NIST biblioteca digital de espectros de massa (NIST, 1998), respectivamente. Índice Kovats foi determinado usando uma série homóloga de *n*-alcanos (C8-C32) injectados sob as condições cromatográficas idênticas às amostras. A quantificação foi obtida pela área dos picos na análise de CG-FID.

### **Procedimento experimental**

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados 45 jundiás (247,2± 45,1g; 32,8±1,4cm) obtidos em uma piscicultura comercial. Os peixes foram colocados em sacos plásticos a densidade de 260 g.L<sup>-1</sup> de água (5 peixes/saco) e transportados por 6h em rodovia asfaltada. Na água utilizada para o transporte foram aplicados três diferentes tratamentos: controle (água), 30 ou 40 µL.L<sup>-1</sup> de AT (equivalente a 0, 27 ou 36 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente, devido a densidade do óleo essencial ser de 0,90), cada um com três repetições. A AT foi diluído em etanol (1:10 v/v) e adicionado na água de transporte. O tempo de transporte, a densidade de carga e as concentrações do AT foram escolhidos com base em estudos anteriores (PARODI et al., 2012; PARODI et al., 2013; GOLOMBIESKI et al., 2003). As quantidades de gás carbônico dissolvido, pH, temperatura, amônia total e não ionizada na água antes e após o transporte foram descritas em um trabalho recente (DANIEL et al., 2014) e estavam de acordo com as exigências para o jundiá.

Após o transporte, os peixes foram abatidos por hipotermia, lavados com água potável e filetados utilizando práticas domésticas. Um filé de cada tratamento e repetição foi utilizado imediatamente após o abate para avaliar a composição química e os indicadores da oxidação lipídica, enquanto que os demais filés foram armazenados a -

18±2°C, em bandejas de poliestireno individuais cobertos com filme policloreto de vinila. Para avaliar a estabilidade lipídica dos filés foram avaliados os valores de dienos conjugados (DC) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) a cada 3 meses durante 17 meses de congelamento.

### **Análises dos filés**

A composição centesimal dos filés foi realizada imediatamente após o abate seguindo a metodologia da AOAC (1996), exceto a gordura, que foi avaliada segundo BLIGH & DYER (1959). A determinação de pH realizou-se na proporção de 1g para 10mL de água destilada (PASTORIZA & SAMPEDRO, 1994).

Os valores de DC foram determinados na gordura extraída pelo método de BLIGH e DYER (1959), sendo os lipídios extraídos dissolvidos em 3 mL de ciclohexano seguido de leitura em 233nm (RECKNAGEL & GLENDE, 1984). Os valores de TBARS foram determinados homogeneizando-se a amostra de filé em Ultra Turrax (IKA T18 Básico) com KCl 1,5% na proporção de 1:5 (m/v), seguida de centrifugação a 3000 x g por 10min. O sobrenadante foi incubado a 100°C durante 15 min em presença de ácido tricloroacético e ácido tiobarbitúrico. Por fim, o produto da reação foi extraído com n-butanol e quantificado em 535 nm (BUEGE & AUST, 1978).

### **Análise estatística**

Os dados foram analisados utilizando o programa Statistica 9.1 e expressos como média±erro padrão. A composição dos filés foi submetida a análise de variância de uma via (ANOVA) e os demais resultados a ANOVA em arranjo fatorial (3 tratamentos x 6 tempos). As diferenças entre as médias foram verificadas pelo teste de Tukey e consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foram identificados 41 compostos no AT, sendo a maioria mono e sesquiterpenos. Os compostos encontrados em maiores concentrações no AT foram ( $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de óleo)  $\alpha$ -citrinal 29,4;  $\beta$ -citrinal 20,8; limoneno 11,9; cariofileno 5,6; cubenol 3,3; acetato de geranil 3,0 e óxido de cariofileno 2,3; enquanto que os outros compostos foram encontrados em concentrações inferiores a  $2\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ . Os resultados são semelhantes aos demais estudos que encontraram citral como principal constituinte do AT (HOSSAM et al., 2011; PARODI et al., 2012). O  $\alpha$ -citrinal geralmente é o constituinte majoritário do AT, seguido por  $\beta$ -citrinal e limonene (PARODI et al., 2012). É importante destacar que agências regulatórias dos Estados Unidos e da Europa consideram o citral e o limoneno como aditivos alimentares seguros para o consumo humano (TAJKARIMI et al., 2010).

O tratamento com AT durante o transporte não modificou a composição centesimal dos filés de jundiá, sendo que a composição média para todos os tratamentos ( $n=9$ ) ( $3,0\pm 0,6\%$  de gordura,  $13,4\pm 1,0\%$  de proteína,  $1,1\pm 0,0\%$  de cinzas e  $80,3\pm 1,4\%$  de umidade) foi semelhante à relatada por VEECK et al. (2012) para esta espécie.

A legislação brasileira (BRASIL, 1974) estabelece 6,8 como o limite máximo aceitável de pH para os pescados. Ao longo da armazenagem os filés de jundiás congelados revelaram valores de pH abaixo deste limite (Figura 1). No entanto, observou-se efeito significativo do tempo de armazenamento e do tratamento sobre os valores de pH dos filés, sem interação entre estas variáveis. O pH aumentou após 12 meses de congelamento comparado ao valor inicial ( $p<0,05$ ), em todos os tratamentos. Os filés dos peixes tratados com  $40\ \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  de AT apresentaram valores de pH inferiores ( $p<0,05$ ) aos valores do controle ao longo de todo armazenamento (Figura1). Os valores menores de pH iniciais e ao longo do tempo para os filés de jundiás tratados com AT pode ser resultado da redução do estresse do peixe, reduzindo a utilização de glicogênio durante o transporte. Após o abate, o glicogênio muscular é degradado liberando glicose para produção de

energia pela via glicolítica anaeróbica, resultando em acúmulo de ácido láctico e redução do pH (BAGNI et al., 2007). Assim, propõe-se que a maior reserva de glicogênio muscular no momento do abate resultou em maior acúmulo de ácido láctico e redução do pH no peixes tratados com AT. Esta proposta está de acordo com os dados de ZEPPENFELD et al. (2014), que relataram maior teor de lactato no músculo de jundiás sedados com AT durante o transporte em comparação ao controle.

A estabilidade lipídica dos filés de jundiá congelados foi avaliada pelos valores de DC e de TBARS (Figura 2). A ANOVA revelou uma interação entre o tempo e o tratamento sobre os valores de dienos conjugados (produtos primários da oxidação lipídica) e de TBARS (produtos secundários da oxidação lipídica) dos filés de jundiá congelados ( $p < 0,05$ ). Os filés dos jundiás tratados com AT ( $30$  e  $40 \mu\text{L.L}^{-1}$ ) apresentaram valores de DC superiores ao do controle no tempo zero (Figura 2A). Por outro lado, os filés de jundiás tratados com  $40 \mu\text{L.L}^{-1}$  de AT durante o transporte apresentaram menores valores de TBARS que o controle em 6, 9 e 17 meses de congelamento ( $p < 0,05$ ; Figura 2B). Em conjunto, os resultados de DC e TBARS indicam a exposição a  $40 \mu\text{L.L}^{-1}$  de AT durante o transporte apresentou um efeito antioxidante nos filés de jundiás congelados, pois retardou a degradação dos produtos primários da oxidação lipídica (DC) em produtos secundários (TBARS). Este retardo na velocidade da oxidação lipídica, e em especial os menores valores de TBARS podem ser importantes para estender a vida útil dos filés de jundiás congelados, pois os aldeídos resultantes da oxidação lipídica (avaliados pelo valor de TBARS) são responsáveis pelo odor de ranço característico e consequente rejeição dos alimentos oxidados (DAMODARAN et al., 2008). Valores de MDA até no máximo  $1-2 \text{ mg kg}^{-1}$  são considerados como o limite de aceitabilidade (GILL, 1990), sendo que os filés de jundiás controle e os tratados com  $30 \mu\text{L L}^{-1}$  de AT atingiram esse limite no sexto mês

de congelamento, enquanto que os filés de jundiás tratados com  $40 \mu\text{L L}^{-1}$  AT não atingiram esse limite mesmo após 17 meses de congelamento.

O retardo na oxidação lipídica dos filés de jundiás expostos ao AT durante o transporte pode estar relacionado à capacidade antioxidante e de prevenção da lipoperoxidação demonstrada pelo AT quando usado como anestésico *in vivo* em jundiás (GRESSLER et al., 2012). A exposição *in vivo* ao AT imediatamente antes do abate demonstrou uma redução no estresse dos jundiás pela supressão da liberação de cortisol e, além disso, aumentou a atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutathione S-transferase (GRESSLER et al., 2012). Além disso, o efeito antioxidante do AT também pode estar relacionado à remoção de radicais livres por compostos antioxidantes presentes no óleo, já que foi demonstrado, *in vitro*, que o mesmo apresenta uma capacidade moderada de remoção do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) em comparação com o butil hidroxianisol, um antioxidante sintético utilizado comercialmente (HOSSAM, et al., 2011).

## CONCLUSÃO

O óleo essencial de *A. triphylla* ( $40 \mu\text{L.L}^{-1}$ ) utilizado na água de transporte dos peixes reduz o estresse como indicado pela redução do pH muscular após o abate, além de retardar a oxidação lipídica dos filés de jundiá armazenados congelados, especialmente a degradação de produtos primários da oxidação lipídica (DC) em produtos secundários (TBARS). Assim, o uso do AT como sedativo na água de transporte de jundiás, além de proporcionar o bem-estar dos peixes, pode contribuir para ampliar a vida útil dos filés de jundiá congelados.

## Comitê de Ética e Biossegurança

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Protocolo 092/2011) da Universidade Federal de Santa Maria.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. 4th ed. Illinois: Allured Publishing Corp., 2007.
- AOAC. **Official Methods of analysis of the association of official analysis Chemists**. 16th ed. Arlington, Virginia: Association of Official Analytical Chemists, v.16, 1996, 1137p.
- ASHELY, P.J. Fish welfare: Current issues in aquaculture. **Applied Animal Behaviour Science**, v.104, p.199–235, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168159106002954#>>. Acesso em: 27 jun.2014. doi: 10.1016/j.applanim.2006.09.001.
- BAGNI, M. et al. Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v. 263, p. 52-60, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848606006387>>. Acesso em: 20 jun.2014. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.07.049.
- BARCELLOS, L.J.G. et al. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, *Quoy and Gaimard*) fingerlings. **Aquaculture**, v.253, p.317–321, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848605003741>>. Acesso em: 10 jun. 2014. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.05.035
- BARCELLOS, L.J.G. et al. **Workshop sobre jundiá: história e perspectiva**. Passo fundo: UPF, 2013, 266p.
- BOSWORTH, B.G. et al. Effects of rested-harvest using the anesthetic AQUI-S (TM) on channel catfish, *Ictalurus punctatus*, physiology and fillet quality. **Aquaculture**, v. 262, p.302–318, 2007. Disponível em:



<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848606008337>>. Acesso em: 10 mai. 2014. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.10.035.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. RIISPOA -Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 1974.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction 247 and purification. **Canadian Journal of Biochemistry Physiology**, v.37, n.8, p.911–917, 1959. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/o59-99?journalCode=cjbp#.Ugjnt5KceSo>>. Acesso em: 03 jun. 2011. doi: 10.1139/o59-099.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.52, p.302–310, 1978. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687978520326>>. Acesso em: 11 jun. 2011. doi: 10.1016/S0076-6879(78)52032-6.

CARNAT, A. et al. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. **Fitoterapia**, v. 70, n.1, p. 44-49, 1999. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X98000161>>. Acesso em: 10 jun. 2014. doi:10.1016/S0367-326X(98)00016-1.

DAMODARAN, S. et al. **Fennema's Food Chemistry**. 4th ed., Boca Raton: CRC Press, 2008,1144 p.

DANIEL, A. P. et al. Using the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton to sedate silver catfish (*Rhamdia quelen*) during transport improves the chemical and sensory qualities of the fish during storage in ice. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 6, p. 1205-1211, 2014. Disponível em: doi:10.1111/1750-3841.12463.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, v.1, 5ª ed., **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília: Anvisa, 2010. 546p. Disponível em:

<[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/pdf/volume1.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1.pdf)>. Acesso em: 1 mai. 2011.

FUNES, L. et al. Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract. **Food Chemistry**, v.117, p.589–598, 2009. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609005123>>. Acesso em: 15 jun. 2014. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.04.059.

GILL, T.A. Objective analysis of seafood quality. **Food Reviews International**, v.6, p.681–714, 1990.

GOLOMBIESKI, J.I. et al. Transport of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings at different times, load densities, and temperatures. **Aquaculture**, v. 216, p. 95-102, 2003.

Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848602002569>>.

Acesso em: 3 mai. 2013. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00256-9.

GRESSLER, L.T. et al. Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. **Aquaculture Research**, v.45, p.1061-1072, 2012.

Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/are.12043/abstract> > . Acesso em: 15 mai. 2014. doi: 10.1111/are.12043.

HOSSAM S. et al. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of *Aloysia triphylla*. **EJEAFChe**, v.10, n.8, p.2689-2699, 2011.

HOSSEINI, S.V. et al. Influence of the *in vivo* addition of alpha-tocopheryl acetate with three lipid sources on the lipid oxidation and fatty acid composition of Beluga sturgeon, *Huso huso*, during frozen storage. **Food Chemistry**, v.118, p. 341-348, 2010. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609006104>>. Acesso em: 15 mai. 2014. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.04.131.

MEINERTZ, J.R., et al. Depletion of eugenol residues from the skin-on fillet tissue of rainbow trout exposed to 14C-labeled eugenol. **Aquaculture**, v. 430, p.74–78, 2014.

Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848614001537>>

**Acesso** em: 27 de jun. 2014. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.03.050.

NIST (National Institute of Standards and Technology) NIST Scientific and Technical Databases. **The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIM Mass Spectral Library**, Version 1.7, 1998.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. Vol.1 Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 33-49.

PARODI, T.V. et al. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei*

(Crustacea, Penaeidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C:**

**Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v.155, p. 462–468, 2012. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22198554>>. Acesso em: 15 mai. 2014.

doi:10.1016/j.cbpc.2011.12.003.

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 Biochemistry**, v. 40, n.2, p. 323-334, 2013a. Acesso

em: 20 jun. 2014. doi: 10.1007/s10695-013-9845-z.

PASTORIZA, L.; SAMPEDRO, G. Influence of ice storage on Ray (*Raja clavata*) wing muscle. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.64, p. 9–18, 1994. Disponível

em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.2740640103/abstract>>. Acesso em:

30 mai. 2012. doi:10.1002/jsfa.2740640103.

RECKNAGEL, R.O.; GLENDE, E.A.J. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. **Methods in Enzymology**, v.105, p.331–337, 1984. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687984050436>>. Acesso em: 12 jun.

2012. doi: 10.1016/S0076-6879(84)05043-6.

SAMPLES, S. Oxidation and Antioxidants in Fish and Meat from Farm to Fork. Chapter 6.

**Food Industry**, INTECH, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/53169>.

TAJKARIMI, M.M. et al. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, p.1199-1218, 2010. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713510000459>>. Acesso em: 10 jun. 2014. doi:10.1016/j.foodcont.2010.02.003.

VALENTÃO, P. et al. Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid.

**Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p.1324-1327, 2002. Disponível em:

<[http://bpb.pharm.or.jp/bpb/200210/b10\\_1324.pdf](http://bpb.pharm.or.jp/bpb/200210/b10_1324.pdf)>. Acesso em: 15 mai. 2014.

doi:10.1248/bpb.25.1324.

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.) N.E. Brown. **Journal of the**

**Science of Food and Agriculture**, v. 93, p.955-960, 2013. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22926822>>. Acesso em: 20 mai. 2014.

doi:10.1002/jsfa.5833.

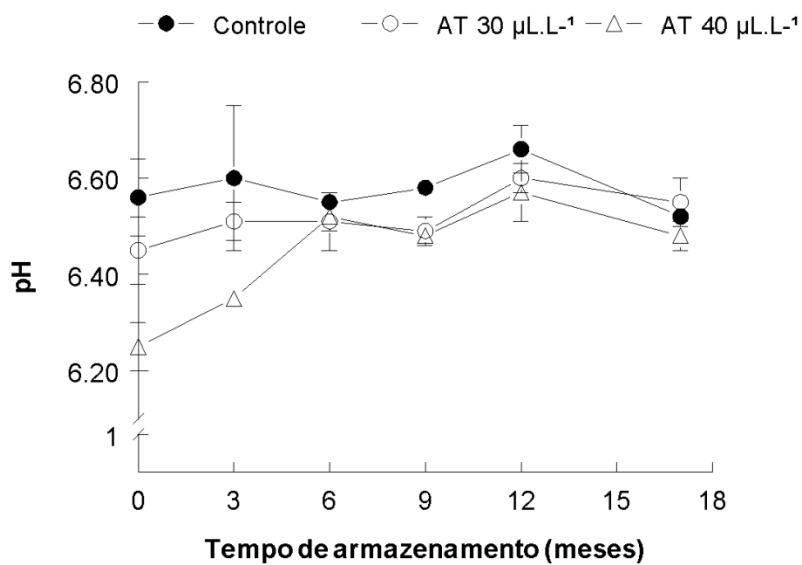
ZEPPENFELD, C.C. et al. Physiological and biochemical responses of silver catfish,

*Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit)

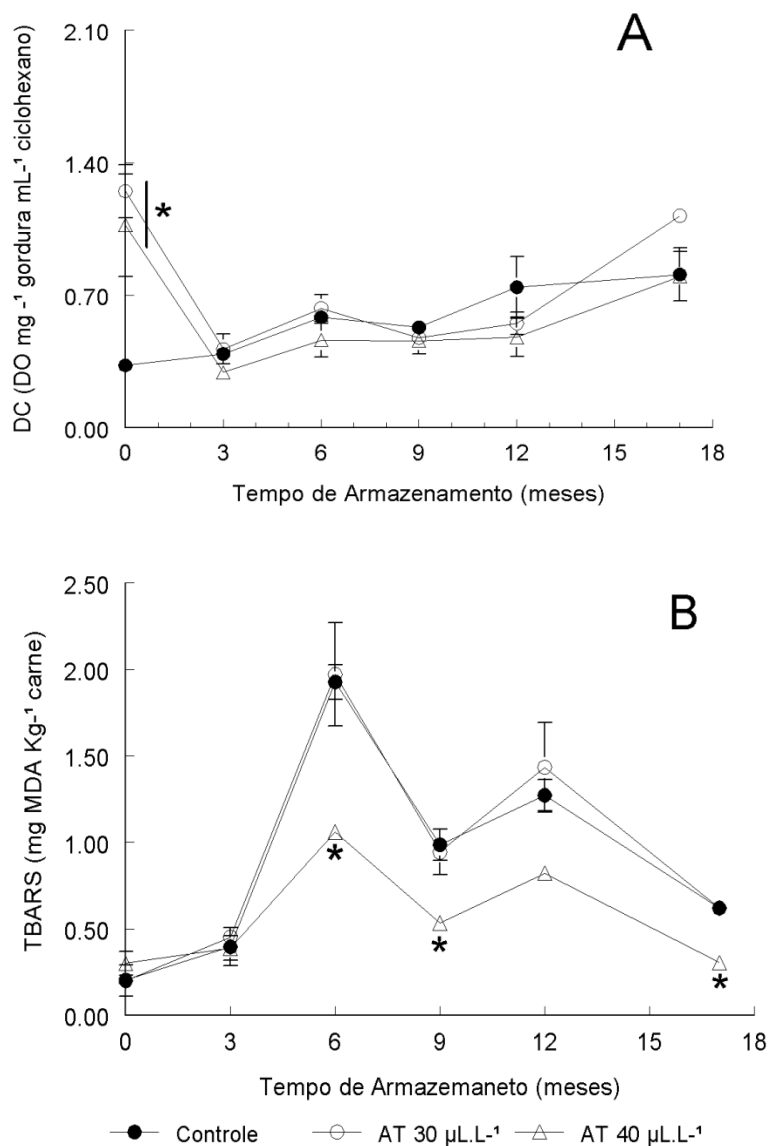
Britton. **Aquaculture**, v. 418-419, p.101-107, 2014. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004484861300522X>>. Acesso em: 30

mai. 2014. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.10.013.



**Figura 1:** Efeito da exposição *in vivo* ao óleo essencial de *Aloysia triphylla* (AT) sobre o valor de pH de filés de jundiá durante o armazenamento congelado. Os valores são média  $\pm$  erro padrão (n=3). A ANOVA revelou efeito significativo do tempo de armazenamento congelado e dos tratamentos, sem interação entre as variáveis.



**Figura 2:** Efeito da exposição *in vivo* ao óleo essencial de *Aloysia triphylla* (AT) sobre os valores de dienos conjugados (DC) (A) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (B) de filés de jundiá durante armazenamento congelado. Os valores são média±erro padrão (n=3). DO: densidade ótica. A ANOVA revelou uma interação significativa tempo X tratamento nos valores de DC e TBARS. \*Significativamente diferente do controle no mesmo tempo de armazenamento congelado (p<0,05).

**Artigo 4**

**EFEITO DA INFUSÃO DE *Aloysia triphylla* NA ESTABILIDADE DE  
FILÉS DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) CONGELADOS**

**Artigo em fase final de revisão pelos autores para ser submetido à revista**

**Boletim do Centro de Processamento de Alimentos (CEPPA, UFPR)**

(configurado conforme as normas da revista)

## EFEITO DA INFUSÃO DE *Aloysia triphylla* NA ESTABILIDADE DE FILÉS DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) CONGELADOS

Ana Paula Daniel\*, Lauren Fresinghelli Ferreira\*\*, Bruna Klein\*\*\*, Amanda Roggia Ruviano\*\*\*, Jaqueline Piccolo\*\*\*, Luana Haselein Maurer\*\*\*, Maurício Schneider Oliveira\*\*\*\*, Carlos Augusto Mallmann\*\*\*\*\*, Berta Maria Heinzmann\*\*\*\*\*, Tatiana Emanuelli\*\*\*\*\*<sup>1</sup>

### Resumo

A *Aloysia triphylla* (Verbenaceae) é uma planta nativa da América do Sul, conhecida popularmente por erva-cidreira ou cidró. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da infusão de *Aloysia triphylla* (IAT) sobre a estabilidade oxidativa de filés de Jundiá congelados. Os filés frescos de *Rhamdia quelen* foram imersos por 10 min em água destilada (controle) ou IAT (1, 2,5 ou 5%), drenados e em seguida armazenados (-18±2°C) para avaliação do pH, oxidação lipídica [dienes conjugados (DC) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)] e cor instrumental (CIELab) ao longo de 21 meses. O teor de fenólicos totais das soluções de IAT utilizadas variou de 238,7 a 832,3 mg equivalentes de ácido clorogênico/100mL, tendo sido identificados como compostos majoritários a isoquercetrina>ácido rosmarínico>luteolina. Os filés tratados com IAT apresentaram valores de pH inferiores aos filés controle após 10 meses de congelamento. O efeito antioxidante da IAT (1-5%) foi constatado pelos menores teores de DC após 7 meses de congelamento, bem como valor de TBARS inferior ao controle nos tempos 4, 7 e 10 meses de congelamento. Independente do tempo de armazenagem, o tratamento com IAT 5% reduziu a luminosidade, aumentou a tendência ao amarelo e o croma comparado aos filés controle, enquanto o tratamento com IAT 2,5% aumentou apenas a tendência ao amarelo. Porém, a variação total de cor ( $\Delta E^*ab$ ) dos filés tratados com IAT (2,5 e 5%) ao longo do congelamento foi menor que nos filés controle. Assim, a imersão de filés de jundiás na IAT retardou a oxidação lipídica e as mudanças na coloração durante o armazenamento congelado, podendo estender a vida útil dos filés.

---

\*Doutoranda em Ciências e Tecnologia dos Alimentos. Professora do Colégio Politécnico da UFSM, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. (e-mail: [anapauladaniel@gmail.com](mailto:anapauladaniel@gmail.com)).

\*\*Acadêmica do curso de Farmácia/UFSM. Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais (NIDAL). Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. (e-mail: [laurenzinhaff@hotmail.com](mailto:laurenzinhaff@hotmail.com)).

\*\*\*Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos/UFSM Acadêmica do curso de Tecnologia dos Alimentos/UFSM. Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais (NIDAL). Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. (e-mail: [brunaklein06@yahoo.com.br](mailto:brunaklein06@yahoo.com.br); [amandarruviano@gmail.com](mailto:amandarruviano@gmail.com); [jaquepiccolo@yahoo.com.br](mailto:jaquepiccolo@yahoo.com.br); [luanahmaurer@gmail.com](mailto:luanahmaurer@gmail.com)).

\*\*\*\*Doutorando em Medicina Veterinária/UFSM. Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. (e-mail: [mauricioso@lamic.ufsm.br](mailto:mauricioso@lamic.ufsm.br)).

\*\*\*\*\*Doutor em Medicina Veterinária. Professor titular da UFSM. Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. (e-mail: [mallmann@lamic.ufsm.br](mailto:mallmann@lamic.ufsm.br)).

\*\*\*\*\*Doutora em Ciências Naturais e Exatas. Professor associado da UFSM. Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. (e-mail: [hberta@ccs.ufsm.br](mailto:hberta@ccs.ufsm.br)).

\*\*\*\*\*Doutora em Ciências Biológicas. Professor associado da UFSM. Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. Autor para correspondência. (e-mail: [tatiemanuelli@gmail.com](mailto:tatiemanuelli@gmail.com)).



**Palavras chaves:** antioxidante, polifenóis, dienos conjugados, oxidação lipídica, cor instrumental.

## **EFFECT OF *Aloysia triphylla* INFUSION ON STABILITY OF SILVER CATFISH (*Rhamdia quelen*) FILLETS DURING FROZEN STORAGE**

### **ABSTRAT**

*Aloysia triphylla* (Verbenaceae) is a plant native from the South America, popularly known as lemon balm or cidrô. The objective of this study was to evaluate the effect of *Aloysia triphylla* infusion (ATI) on the oxidative stability of silver catfish fillets during frozen storage. Fresh fillets from *Rhamdia quelen* were dipped for 10 min in distilled water (control) or ATI (1, 2.5 or 5%), drained and then stored at  $-18\pm 2^{\circ}\text{C}$  for the assessment of pH, lipid oxidation [conjugated dienes (DC) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)] and instrumental color (CIELab) during 21 months. The total phenolic content of the ATI solutions ranged from 238.7 to 832.3 mg of chlorogenic acid equivalents/100 mL. The major compounds identified were isoquercetrin > rosmarinic acid > luteolin. Fillets treated with ATI had lower pH values than control after 10 months of storage. The antioxidant effect of ATI (1-5%) was supported by the lowest DC levels after 7 months of storage, and by the TBARS value lower than control at 4, 7 and 10 months of storage. Regardless of the storage time, the treatment with ATI 5% reduced the brightness, increased the yellowness and the chroma compared to control fillets, while treatment with 2.5% ATI only increased the yellowness. However, the total color change ( $\Delta E^*ab$ ) for fillets treated with ATI (2.5 and 5%) along the storage was lower than for control fillets. Thus, dipping silver catfish fillets in ATI delayed lipid oxidation and color changes during frozen storage and can extend fillets shelf life.

**Key words:** antioxidant, polyphenols, conjugated dienes, lipid oxidation, instrumental color.

### **INTRODUÇÃO**

Atualmente, os consumidores têm revelado maior conhecimento sobre os efeitos de aditivos químicos na saúde humana. A segurança toxicológica dos principais antioxidantes sintéticos usados atualmente em alimentos (butil hidroxianisol, butil hidroxitolueno, terc-butil-hidroquinona e ésteres do ácido gálico) tem sido questionada, pois existem evidências de que eles se ligam ao DNA e alguns apresentam efeito carcinogênico em animais (DOLATABADI & KASHANIAN, 2010). Por este motivo, tem crescido a busca por aditivos antioxidantes naturais para uso em alimentos (VALERGA et al., 2012; VEECK et al., 2013a; PICCOLO et al., 2014). Naturalmente presentes nos vegetais, os polifenóis apresentam atividade antioxidante (MELLO & GUERRA, 2002; AL-ZOREKY, 2009), representando uma importante alternativa para a indústria de alimentos. Alguns flavonóides e ácidos fenólicos apresentaram atividade

antioxidante similar aos antioxidantes sintéticos butil hidroxitolueno e butil hidroxianisol (FUKUMOZO et al., 2000).

A *Aloysia triphylla* (L' Herit) Britton (Verbenaceae) é uma erva aromática que cresce naturalmente na América do Sul e é cultivada no Norte da África e sul da Europa (VALENTÃO et al., 2002). As folhas desta erva podem ser usadas como tempero, para conferir sabor de limão em alimentos a base de pescados e aves, vegetais marinados, saladas e outros (FUNES et al., 2009). Os seus extratos ou infusões tem sido tradicionalmente utilizados na medicina popular para o tratamento de insônia e ansiedade, e como analgésico e sedativo (CARNAT et al., 1999). Os principais constituintes encontrados na *A. triphylla* são compostos fenólicos, com destaque para os polifenóis (675 mg/L) como o verbascosídeo (400 mg/L) e a luteolina 7-diglicuronídeo (100 mg/L), bem como o óleo essencial rico em citral (CARNAT et al., 1999).

O uso do óleo essencial de *A. triphylla* na água de transporte de peixes apresenta ação sedativa, além de retardar o *rigor mortis* e as alterações químicas (degradação de nucleotídeos) e sensoriais do pescado refrigerado (DANIEL et al., 2014). Além disso, o óleo essencial da *Lippia alba* na água de transporte de peixes, além da ação sedativa *in vivo*, também retardou a oxidação lipídica dos filés durante o posterior congelamento (VEECK et al. 2013b). Estudos *in vitro* e em sistemas biológicos têm indicado o potencial antioxidante de infusões e extratos de *A. triphylla* (VALENTAO et al., 2002; ZAMARANO-PONCE et al., 2006; PEREIRA & MEIRELES, 2007; FUNES et al., 2009). Além disso, o extrato alcoólico da *A. triphylla* com 10% de oligossacarídeos foi patenteado na sua forma liofilizada para aplicação em alimentos, com função nutracêutica, com destaque na elaboração de produtos lácteos como iogurte, bebidas lácteas e queijo frescal (BALAN & PAPER, 2006). Este efeito nutracêutico proposto foi atribuído a sua ação antioxidante, que seria benéfica nos casos de doenças inflamatórias. Entretanto, ainda não foi avaliado o potencial de infusões/extratos de *A. triphylla* para prevenir reações de oxidação em alimentos.

Devido ao grande conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados, os pescados são sensíveis a reações de hidrólise e especialmente de oxidação lipídica durante o armazenamento congelado, que resultam em alterações indesejáveis na cor, sabor, odor e textura (SAMPELS, 2013). O curso e a velocidade destas alterações é crítico para determinar a qualidade e a vida útil dos pescados e seus derivados, que assim, constituem-se em excelentes modelos para avaliar o potencial de aditivos antioxidantes em alimentos.

O jundiá foi escolhido, pois é uma espécie endêmica do sul do México ao centro da Argentina, que apresenta boa adaptação ao clima da região Sul do Brasil, onde sua importância econômica na aquicultura vem crescendo alavancada também pela boa aceitação no mercado consumidor (BARCELOS et al., 2006; CARNEIRO et al., 2002). Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da infusão de *A. triphylla* (IAT) sobre a estabilidade de filés de jundiá (*Rhamdia quelen*), avaliando a oxidação lipídica e a cor instrumental dos filés durante o armazenamento congelado.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Infusão de *A. triphylla* (IAT)**

Espécimes de plantas nativas foram coletadas na cidade de Iraí, Rio Grande do Sul, Brasil (27°11'19"S, 53°15'6"O), no mês de outubro de 2010 e identificadas como *A. triphylla* (L'Her.) Britton pelo Dr. Solon Jonas Longhi (Dept. de Ciências Florestais, UFSM). Para a obtenção das infusões foram utilizados folhas e galhos *in natura*, que após armazenagem a 25°C por 24 h foram quebrados e utilizados para preparo da infusão de acordo com Zamorano-Ponce et al.,(2006). O material vegetal (5 g) foi macerado durante 15 min em água destilada fervente (100 mL), em recipiente tampado e em seguida foi filtrado. A partir desta infusão a 5% realizaram-se as diluições para obter infusões nas concentrações de 2,5% e 1%.

O conteúdo de fenólicos totais foi determinado em 725 nm após reação com Folin-Ciocalteu, utilizando ácido clorogênico para construção da curva padrão (SWAIN & HILLIS, 1959). A atividade antioxidante das infusões foi determinada em 515 nm através da capacidade de remoção do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) (BRAND-WILLIAMS et al., 1995) e também através do potencial antioxidante de redução do ferro (FRAP) em meio ácido, onde o antioxidante reduz o  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  e este último é quantificado pela formação de um complexo com 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), que é medido em 593 nm (BENZIE & STRAIN, 1996). O trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E, foi utilizado como referência para construção da curva padrão e os resultados dos ensaios de DPPH e FRAP foram expressos em equivalentes de trolox.

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos da IAT foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo Agilent (série 1200) acoplado a um espectrômetro de massas triplo quádruplo (EM/EM) (Applied Biosystems API 5000). As amostras foram diluídas (1:100) e injetadas (20  $\mu$ L) em uma coluna  $C_{18}$  (4.6 mm x 150 mm, diâmetro de partículas 5  $\mu$ m) com um fluxo de 0,5 mL/min à 45°C. As fases móveis utilizadas foram solução de ácido acético a 1% (A) e metanol (B), conforme o gradiente: 100% (A) por 1 min, alterando para 50% de (B) em 3 min e 80% de (B) até 7 min; condição mantida constante por 2 min, seguido de 100% (B) até 12 min, condição mantida constante por 2 min. O sistema retornou as condições iniciais após 6 min de reequilíbrio. Os padrões (listados na Tabela 1) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e as soluções estoque foram diluídas em solução preparada a partir das fases móveis A e B na proporção de 1:1 (v/v). As soluções de trabalho dos padrões variaram de 10-250  $\mu$ g/mL. Os parâmetros do sistema (EM/EM) dependentes da fonte, foram otimizados em modo negativo (ESI-) por meio de análise de injeção em fluxo sendo pressão de cortina 10 psi, pressão do gás de nebulização 60 psi, pressão do gás secante 30 psi, voltagem do *electrospray* -3700 V, pressão do gás de colisão 8 psi. A temperatura da fonte foi otimizada em 650°C. A partir dos espectros de fragmentação obtidos no MS/MS, foram selecionados os dois fragmentos que apresentaram maiores intensidade e estabilidade, para quantificação e identificação dos compostos, através do modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). Os parâmetros composto-dependente são mostrados na Tabela 1, sendo 0,125  $\mu$ g/mL o limite de quantificação para todos os compostos.

**Tabela 1:** Parâmetros de monitoramento da varredura de reação múltipla para os compostos fenólicos

Composto	Precursor (M-H) <sup>-</sup>	Fragmentos	PD	EC	PCX
Ácido Clorogênico	353,0	191 / 85	-65	-24 / -58	-17 / -15
Ácido Caféico	179,0	89 / 107	-70	-44 / -32	-11 / -10
Ácido Rosmarínico	609,0	300 / 271	-175	-48 / -80	-23 / -27
Luteolina-5-glicosídeo	447,0	285 / 133	-130	-40 / -82	-19 / -11
Merecitina	317,0	151 / 109	-100	-30 / -52	-19 / -47
Apigenina	269,0	117 / 151	-80	-48 / -34	-9 / -15
Luteolina	285,1	151 / 107	-120	-36 / -44	-15 / -13
Quercetina	301,0	151 / 179	-95	-30 / -28	-9 / -11
Rutina	609,0	300 / 271	-175	-48 / -80	-23 / -27
Isoquercitrina	463,0	300 / 271	-135	-38 / -56	-21 / -19
Taxifolina	303,0	285 / 125	-85	-20 / -26	-17 / -7
Canferol	285,0	151 / 107	-120	-36 / -44	-15 / -13
Verbascosídeo	623,0	161 / 133	-170	-52 / -96	-15 / -23
Ácido Cumárico	163,0	93 / 117	-30	-46 / -44	-10 / -15
Ácido Ferrúlico	193,0	133 / 178	-60	-22 / -20	-13 / -15

PD = Potencial de desagregação iônica, aplicada na entrada do EM.; EC = energia de colisão; PCX = Potencial aplicado a cela de colisão.

### Obtenção e tratamento dos filés

Os peixes (*R. quelen*) foram adquiridos já abatidos, no comércio local (peixaria) com peso médio de 130,7±41,5g. Após a filetagem e limpeza utilizando-se técnicas domésticas, os filés (peso médio 39,2 g) foram imersos na IAT (1; 2,5 ou 5%) ou em água destilada (controle) por 10 min, sendo posteriormente drenados por 1 min. Foram tratados 3 lotes independentes (3 repetições) de filés para cada um dos 4 tratamentos. Um filé de cada lote e de cada tratamento foi utilizado imediatamente para as avaliações do tempo zero e o restante das amostras foi embalada em bandejas de poliestireno cobertas com filme plástico e armazenadas à -18±2°C para avaliar a sua estabilidade ao longo de 21 meses. Após 4, 7, 10, 18 e 21 meses de congelamento foram retiradas amostras de filés das 3 repetições de todos os tratamentos para avaliação do pH, oxidação lipídica e cor instrumental.

### Análises dos filés

Em todos os tempos de armazenagem foram determinados o pH, indicadores de oxidação lipídica e as coordenadas de cor dos filés (colorímetro Minolta CR-300, Osaka, Japão).

A determinação de pH foi realizada com eletrodo combinado de pH, após homogeneização do filé com água destilada (1g/10 mL) (PASTORIZA & SAMPEDRO, 1994). Para avaliar a estabilidade lipídica foram quantificados dienos conjugados (DC), que são compostos primários da oxidação lipídica, e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que representam

compostos secundários da oxidação lipídica, especialmente o malondialdeído. Os DC foram determinados na gordura extraída pelo método de Bligh & Dyer (1959), sendo os lipídios extraídos dissolvidos em 3 mL de ciclohexano, seguido de leitura em 233 nm (RECKNAGEL & GLENDE, 1984). Para determinação do valor de TBARS, 1 g de tecido muscular previamente triturado no processador de alimentos, foi homogeneizado em Ultra Turrax (IKA T18 Básico) com KCl 1,15% e centrifugado. O sobrenadante foi incubado a 100°C durante 15 min em presença de TCA 30% e TBA 0,67%. Por fim utilizou-se álcool n-butílico para extrair o produto de reação, que foi determinado em 535 nm (BUEGE & AUST, 1978).

Para análise da cor (sistema CIELab, 1976) foi utilizado um colorímetro CR-300 (Minolta Ltd., Osaka, Japão). Os filés de jundiás foram colocados em uma superfície lisa e de fundo branco e três medições foram registradas diretamente sobre as amostras, girando o canhão de leitura em 90° entre as medições, sendo o iluminante D65 e ângulo de observação de 2°. Os valores de L\* indicam a luminosidade das amostras, e os valores de a\* e b\* correspondem as coordenadas de cromaticidade, onde +a\* representa a direção para o vermelho, -a\* para o verde, +b\* para o amarelo e -b\* para o azul. Os valores de cromat expressam a saturação da cor e o ângulo de cor (H) é a cor observada, expresso em graus: 0° (vermelho), 90° (amarelo), 180° (verde) e 270° (azul). O diferença total de cor entre o tempo final e o tempo inicial de armazenamento ( $\Delta E^*_{ab}$ ) foi calculado pela fórmula 1, e representa o grau de diferença entre a cor de cada amostra nestes dois tempos de armazenagem. Este método calcula a distância entre os valores das coordenadas de medição (L\* a\* b\*) dentro do espaço de cor tridimensional.

$$\text{Fórmula 1: } \Delta E^*_{ab} = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

### **Análise estatística**

Os dados foram analisados utilizando o programa Statistica® 9.1 e os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em arranjo fatorial (4 tratamentos x 6 tempos de armazenagem) com 3 repetições por grupo. As diferenças entre as médias foram verificadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A IAT utilizada no tratamento dos filés de jundiá apresentou um aumento no conteúdo de fenólicos totais com o aumento da concentração, sendo o mesmo observado para a capacidade de remoção do radical DPPH e para o poder de redução do Fe<sup>3+</sup> no ensaio FRAP (Tabela 2). Os valores de DPPH e FRAP apresentaram relação direta com o teor de compostos fenólicos totais das infusões ( $r=0,85$  para ambos,  $p < 0,05$ ), indicando que estes compostos são responsáveis pela atividade antioxidante *in vitro*. Estes resultados, juntamente com estudos anteriores que revelaram maior atividade antioxidante do extrato de *A. triphylla* em um ensaio *in vitro* de remoção do radical ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6 sulfônico) (ABTS) em meio lipofílico comparado a um meio aquoso (FUNES et al., 2009), sugerem que a IAT poderia reduzir a oxidação lipídica de filés de jundiá.

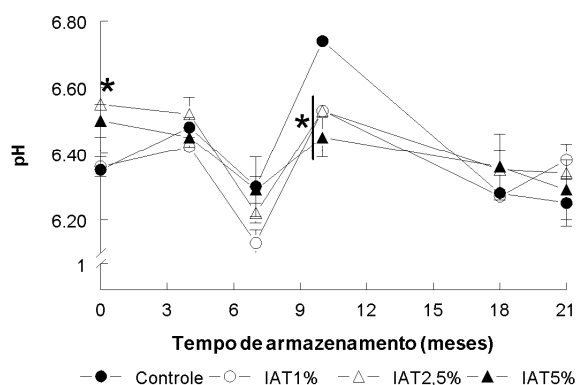
**Tabela 2:** Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante das infusões de *A. triphylla* (IAT).

Infusão	Fenólicos totais (mg ác. clorogênico/100mL)	DPPH (mmol trolox/L)	FRAP (mmol trolox/L)
IAT 1%	238,7 ± 9,8 <sup>c</sup>	1,31 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,88 ± 0,0 <sup>c</sup>
IAT 2,5%	650,5 ± 6,0 <sup>b</sup>	1,76 ± 0,0 <sup>b</sup>	1,50 ± 0,1 <sup>b</sup>
IAT 5%	831,9 ± 0,9 <sup>a</sup>	3,54 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,04 ± 0,1 <sup>a</sup>

Os resultados são média ± erro padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna indicam médias significativamente diferentes (p<0,05). DPPH: 1,1 difenil-2-picril-hidrazila.

O composto majoritário encontrado na IAT5% foi o ácido cumárico (1416,0 µg/mL), seguido pelo verbascosídeo (42,8 µg/mL), a isoquercitrina (23,4 µg/mL), o ácido rosmarínico (15,70 µg/mL) e a luteolina (6,49 µg/mL). Outros autores encontraram o verbascosídeo como principal composto da IAT, seguido de derivados da luteolina, como a luteolina-7-diglicuronídeo (CARNAT et al., 1999, VALENTÃO et al., 2002). A IAT liofilizada apresentou potente atividade antioxidante na remoção de radicais superóxido, hidroxil e de ácido hipocloroso, sendo este efeito atribuído ao verbascosídeo e aos derivados da luteolina (VALENTÃO et al., 2002).

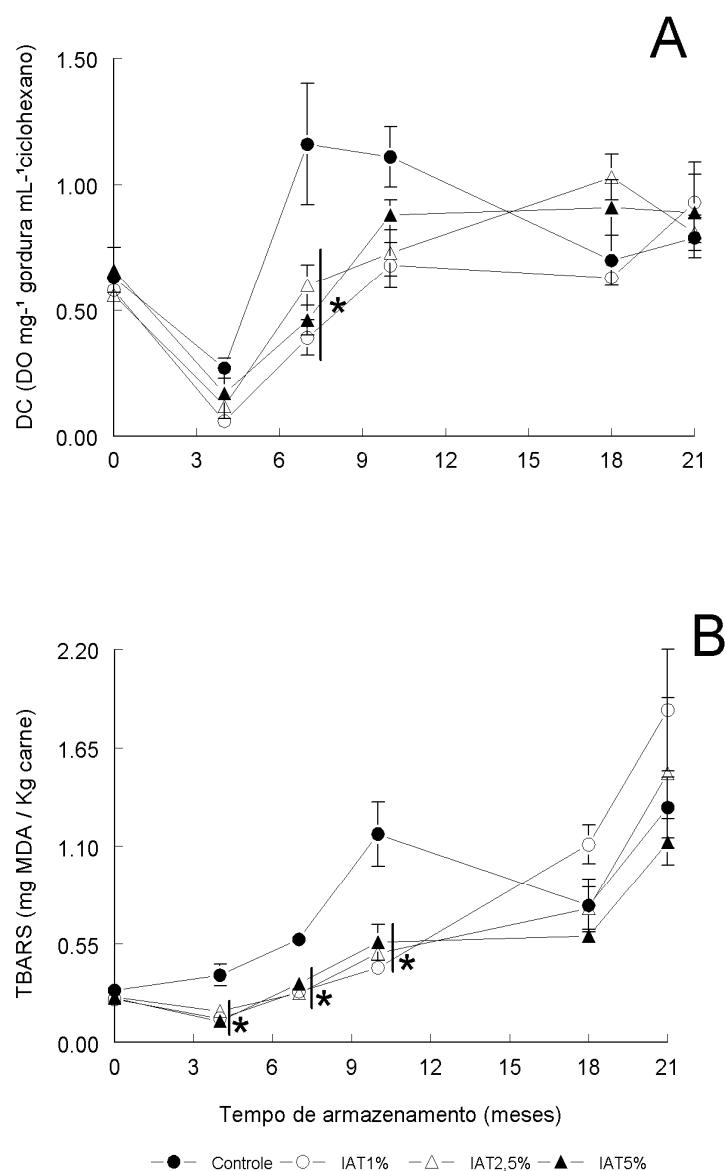
Para acompanhar a vida útil dos filés de jundiás tratados com IAT foram determinados os valores de pH, indicadores de oxidação lipídica e a cor instrumental durante o armazenamento congelado. Os valores de pH mantiveram-se abaixo de 6,8, limite máximo para aceitabilidade segundo a legislação brasileira (BRASIL, 1974) e a ANOVA revelou interação significativa entre o tempo de armazenamento x tratamento. Os valores de pH para os filés tratados com IAT 2,5% foram superiores ao controle no mês zero (p<0,05; Figura 1). Em 10 meses de armazenamento todos os filés tratados com IAT apresentaram valores de pH inferiores ao controle (p<0,05; Figura 1).



**Figura 1:** Efeito do tratamento com infusão de *A. triphylla* sobre o valor de pH de filés de jundiá durante armazenamento congelado. Os valores são média ± erro padrão (n=3). A ANOVA revelou uma interação significativa tempo x tratamento no valor de pH. \*Significativamente diferente do controle no mesmo tempo de armazenamento congelado (p<0,05).

A estabilidade lipídica de filés de jundiás tratados com IAT foi verificada através dos valores de DC (produtos primários da oxidação lipídica) e de TBARS (produtos secundários da oxidação lipídica), para os quais a ANOVA revelou efeito da interação tempo x tratamento ( $p < 0,05$ ; Figura 2). Os valores de DC dos filés de jundiá tratados com IAT apresentaram comportamento semelhante ao controle até o 4<sup>o</sup> mês de armazenamento (Figura 2A). Entretanto, em 7 meses de congelamento todos os tratamentos com IAT encontraram-se significativamente inferiores ao controle (Figura 2A;  $p < 0,05$ ), indicando que os filés de jundiá tratados com IAT ainda não iniciaram o processo de oxidação, enquanto que o controle já apresentou aumento nos teores de produtos primários da oxidação lipídica. Estes resultados, provavelmente estão relacionados à capacidade antioxidante demonstrada *in vitro* pela IAT nos ensaios de DPPH e FRAP, bem como aos efeitos relatados por Valentão et al.(2002) para IAT liofilizada na remoção de ácido hipocloroso, radical superóxido e especialmente do hidroxila, que é considerado um iniciador da oxidação lipídica.

O potencial antioxidante da IAT foi confirmado, através dos menores valores de TBARS durante o armazenamento de filés de jundiá congelados tratados com IAT (1%, 2,5% ou 5%) em comparação ao controle, em 4, 7 e 10 meses de congelamento ( $p < 0,05$ ; Figura 2B). A transformação de compostos primários de oxidação (DC) em produtos secundários caracteriza a evolução do processo de peroxidação lipídica que ocorre em três estágios principais: iniciação, propagação e terminação (LÓPEZ-DE-DICASTILLO et al., 2012). Neste contexto, pode-se verificar que a IAT retardou a iniciação e a propagação da reação. Além disso, o retardo no aumento do valor de TBARS indica que a IAT pode estender a vida útil dos filés, pois o malondialdeído (MDA), principal composto quantificado neste ensaio, é um dos responsáveis pelo odor característico da oxidação de lipídios e rejeição dos produtos (DAMODARAN et al., 2008). O limite de aceitabilidade para os valores de TBARS encontra-se entre 1-2 mg de MDA.kg<sup>-1</sup> (GILL, 1990), sendo que os filés de jundiá tratados com IAT 5% não atingiram este limite até o 21<sup>o</sup> mês de armazenamento, enquanto o controle atingiu este limite a partir do 10<sup>o</sup> mês de congelamento.



**Figura 2:** Efeito do tratamento com infusão de *A. triphylla* (IAT) sobre os valores de dienos conjugados (DC) (A) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (B) de filés de jundiá durante armazenamento congelado. Os valores são média  $\pm$  erro padrão (n=3). A ANOVA revelou uma interação significativa tempo x tratamento no valor de DC e TBARS. \*Significativamente diferente do controle no mesmo tempo de armazenamento congelado ( $p < 0,05$ ). DO: densidade ótica; MDA: malondialdeído.

Em relação às coordenadas de cor, a ANOVA revelou que o tempo de armazenamento teve efeito sobre a tendência ao vermelho (valores de  $a^*$ ), ângulo de cor (H) e a saturação da cor (croma) ( $p < 0,05$ ), enquanto que o tratamento com IAT teve efeito sobre a luminosidade (valores  $L^*$ ), tendência ao amarelo (valores de  $b^*$ ) e saturação da cor (croma) ( $p < 0,05$ ).

O tempo de armazenamento não influenciou a luminosidade (valores  $L^*$ ), enquanto que os filés de jundiá tratados com IAT 5% apresentaram menor luminosidade que o controle (valores de  $L$ ;  $p < 0,05$ ; Tabela 3). As demais



concentrações de IAT testadas não afetaram os valores de  $L^*$  (Tabela 3). A tendência ao amarelo (valor de  $b^*$ ) foi semelhante ao longo do armazenamento ( $12,0 \pm 0,5$  no tempo zero vs  $11,0 \pm 0,3$  no mês 21). O tratamento dos filés com IAT (2,5% e 5%) aumentou a tendência ao amarelo (valor de  $b^*$ ) em comparação ao controle ( $p < 0,05$ ; Tabela 3), fato que pode estar relacionado à presença de pigmentos carotenóides extraídos da planta. Já os valores de croma, que expressam a saturação da cor foram influenciados pelo tempo de armazenamento e tratamento ( $p < 0,05$ ), sendo que os valores de croma após 21 meses de armazenagem foram inferiores ao tempo zero e 7º mês ( $11,3 \pm 0,5$  vs.  $13,8 \pm 0,5$  e  $14,5 \pm 0,5$  respectivamente;  $p < 0,05$ ), enquanto que em relação ao efeito do tratamento, os filés tratados com IAT 5% apresentaram valores superiores de croma com relação ao controle ( $p < 0,05$ ; Tabela 3). A tendência ao vermelho (valor de  $a^*$ ) e o ângulo de cor ( $H^*$ ) foram influenciados apenas pelo tempo de armazenamento, sendo que os valores de  $a^*$  reduziram ao longo do tempo ( $7,3 \pm 0,6$  no tempo zero vs.  $2,5 \pm 0,3$  no mês 21,  $p < 0,05$ ), enquanto que o ângulo de cor aumentou ao longo do tempo ( $57,0 \pm 2,3$  no tempo zero vs.  $77,2 \pm 1,8$  no mês 21,  $p < 0,05$ ). Esta mudança ao longo do tempo pode estar relacionada à oxidação de pigmentos (hemoglobina e/ou mioglobina) presentes no tecido muscular dos pescados, a qual pode atenuar a intensidade da coloração vermelha dos filés (HAMRE et al., 2003). O valor de  $\Delta E^*ab$ , que avalia a diferença total de cor entre dois pontos (tempo inicial e final de armazenamento) foi menor para os filés tratados com IAT 2,5% e 5% (Tabela 3;  $p < 0,05$ ) em comparação ao controle, o que reflete a proteção do IAT contra as modificações oxidativas da cor ao longo do armazenamento.

**Tabela 3:** Efeito do tratamento com infusão de *A. triphylla* (IAT) sobre as coordenadas de cor de filés de jundiá durante o armazenamento congelado

Tratamentos	$L^*$	$a^*$	$b^*$	Croma	Ângulo de cor ( $H^*$ )	$\Delta E^*ab$
Controle	$54,6 \pm 0,7$	$4,8 \pm 0,7$	$10,7 \pm 0,3$	$12,1 \pm 0,4$	$65,6 \pm 2,8$	$10,1 \pm 0,3$
1% IAT	$54,1 \pm 0,6$	$5,1 \pm 0,3$	$11,3 \pm 0,3$	$12,4 \pm 0,3$	$64,9 \pm 1,5$	$6,1 \pm 1,3$
2,5% IAT	$52,4 \pm 0,7$	$5,2 \pm 0,5$	$12,2 \pm 0,4^*$	$13,1 \pm 0,4$	$66,8 \pm 2,0$	$3,1 \pm 0,9^*$
5% IAT	$51,9 \pm 0,6^*$	$4,7 \pm 0,4$	$12,9 \pm 0,3^*$	$13,9 \pm 0,4^*$	$69,8 \pm 1,6$	$4,6 \pm 1,4^*$

Os valores são média  $\pm$  erro padrão de todos os tempos de armazenagem ( $n=18$ ), exceto para o  $\Delta E^*ab$  cujos valores são média  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ ) para a diferença de cor entre o tempo final e o tempo inicial. \*Diferente do controle da mesma coluna ( $p < 0,05$ ).

Estudos relatam que a oxidação protéica muitas vezes pode estar associada à oxidação lipídica (VILJANEN et al. 2004), sendo que a oxidação lipídica provoca a descoloração de filés de pescado (RUFF et al., 2003). As alterações conformacionais na proteína podem modificar a incidência da luz refletida, e com isso aumentar os valores de  $L^*$  (MORKORE, 2006). Assim, o menor valor  $L^*$  dos filés tratados com IAT 5% e menores valores de  $\Delta E^*ab$  sugerem que, além de retardar a oxidação lipídica dos filés (Figura 2), a IAT possivelmente protegeu os filés de jundiás da oxidação de proteínas durante o armazenamento congelado.

O aumento da intensidade da cor amarela é muitas vezes associada à oxidação lipídica, porém este comportamento difere muito entre as espécies de pescado (HAMRE et al., 2003). No entanto, no presente estudo, não foi observado aumento da tendência ao amarelo (valor de  $b^*$ ) dos filés ao longo tempo, associado ao aumento de oxidação lipídica. A maior intensidade de amarelo dos filés tratados com IAT está relacionada provavelmente à presença de pigmentos carotenóides extraídos das folhas, pois já foi observada no mês zero ( $13,5 \pm 0,9$  no IAT 5% vs.  $10,6 \pm 0,7$  no controle,  $p < 0,05$ ).

Existem diversas formas para prevenir ou retardar as reações de oxidação lipídica e alterações de coloração, sendo uma das alternativas a utilização de aditivos alimentares, como os antioxidantes naturais. O uso de infusões de plantas para estender a vida útil de filés de pescado congelados pode ser considerado como condimento e, portanto, ser adicionado na solução de glaceamento utilizada como barreira protetora dos filés de pescado durante o processo de congelamento. Neste sentido, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a IAT retardou a oxidação lipídica dos filés durante o congelamento. Além disso, a IAT é amplamente usada como chá na medicina popular, e nenhum efeito de toxicidade oral ou efeito adverso foi observado em humanos ou em ensaio em ratos quando foram tratados com extrato de *A. triphylla* contendo 25% de verbascosídeo na dose de 2000 mg/kg (FUNES et al., 2009), indicando sua segurança para consumo humano.

## CONCLUSÃO

A infusão de *A. triphylla* utilizada na imersão de filés de jundiás retardou a oxidação lipídica, além de reduzir as mudanças na coloração dos filés de pescado congelados, indicando que ela aumenta a vida útil dos filés. Assim, a IAT (2,5 e 5%) apresenta-se como alternativa de antioxidante natural que poderia ser empregada no processo de glaceamento de pescados.

## REFERENCIAS

- AI-ZOREKY, N.S. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, v. 134, p. 244–248, 2009.
- BALAN, K. (Regensburg, DE); PAPER, D. (Maxhutte-Haidhof, DE), 2006, Patent Application 20060280820 “**Use of an extract of Aloysia/Verbena/Lippia triphylla/citriodora for the treatment of chronic and/or inflammatory diseases**” - United States, Dec, 14, 2006. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/y2006/0280820.html>>. Acesso em: 22 jun. 2010.
- BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. *Aquaculture*, v.253, p. 317–321, 2006.
- BENZIE, F. F. I.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a Measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. p. 70–76, 1996.
- 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.

- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v.28, p.25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. RIISPOA - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 1974.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-309, 1978.
- CARNAT, A. ; CARNAT, A.P. ; FRAISSE, D. ; LAMAISON, J.L. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. **Fitoterapia**, v. 70, n.1, p. 44-49, 1999.
- CARNEIRO, P.C.F.; BENDHACK, F.; MIKOS, J.D. et al. Jundiá: um grande peixe para a região sul. **Panorama da Aqüicultura**, v.12, n.69, p.41-46, 2002.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Fennema's Food Chemistry**. (4<sup>th</sup> ed.). CRC Press, Boca Raton, 2008.1144 p.
- DANIEL, A. P.; VEECK, A. P. L.; KLEIN, B.; FERREIRA, L. F.; CUNHA, M. A.; PARODI, T. V.; ZEPPENFELD, C. C.; SCHMIDT, D.; CARON, B. O.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B.; EMANUELLI, T. Using the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton to sedate silver catfish (*Rhamdia quelen*) during transport improves the chemical and sensory qualities of the fish during storage in ice. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 6, p. 1205-1211, 2014.
- DOLATABADI, J.E.N.; KASHANIAN, S. A review on DNA interaction with synthetic phenolic food additives. **Food Research International**, v. 43, p. 1223–1230, 2010.
- FUKUMOZO L.R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.3597–3604, 2000.
- FUNES, L.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; LAPORTA, O.; PONS, A.; ROCHE, E.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; MICOL, V. Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract. **Food Chemistry**, v.117, p. 589–598, 2009.
- GILL, T.A. Objective analysis of seafood quality. **Food Reviews International**, v.6, p.681–714, 1990.
- HAMRE, K. LIE, O.; SANDNES, K. Development of lipid oxidation and flesh colour in frozen stored fillets of Norwegian spring-spawning herring (*Clupea harengus* L.). Effects of treatment with ascorbic acid. **Food Chemistry**, v.82, p.447-453, 2003.
- LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C.; GÓMEZ-ESTACA, J.; CATALÁ, R.; GAVARA, R.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. **Food Chemistry**, v. 131, p.1376–1384, 2012.
- MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 36, p. 1-11, 2002.
- MORKORE, T. Relevance of dietary oil source for contraction and quality of pre-rigor filleted Atlantic cod, *Gadus morhua*. **Aquaculture**, v.256, p.56-65, 2006.
- PASTORIZA, L.; SAMPEDRO, G. Influence of ice storage on Ray (*Raja clavata*) wing muscle. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.64, p. 9–18, 1994.

- PEREIRA, C.G.; MEIRELES, M. A. A. Evaluation of global yield, composition, antioxidant activity and cost of manufacturing of extracts from lemon verbena (*Aloysia triphylla* [L'Hérit.] Britton) and mango (*Mangifera indica* L.) leaves. **Journal of Food Process Engineering**, v. 30, 150–173, 2007.
- PICCOLO, J.; DANIEL, A. P.; KLEIN, B.; FERREIRA, L. F.; RUVIARO, A. R.; EMANUELLI, T.; KUBOTA, E. H. Oxidative stability of refrigerated fish patês containing loquat seed extract. **Ciência Rural**, Santa Maria, Online, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-847cr20140066>. Acesso em: 06 de julho de 2014
- RECKNAGEL, R.O.; GLENDE JR, E.A. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. **Methods in Enzymology**, v.105, p.331-337, 1984.
- RUFF, N.; FITZGERALD, R.D.; CROSS, T.F.; HAMRE, K.; KERRY, J.P. The effect of dietary vitamin E and C level on market-size turbot (*Scophthalmus maximus*) fillet quality. **Aquaculture Nutrition**, v.9, p.91–103, 2003.
- SAMPLES, S. Oxidation and Antioxidants in Fish and Meat from Farm to Fork. Chapter 6. **Food Industry**, INTECH, 2013.
- SWAIN, T.; HILLIS, W.E. The fenolic constituents of *Prunus domestica*. **Journal Science Food Agriculture**, London, v.10, p.135-144, 1959.
- VALENTÃO, P.; FERNANDES, E.; CARVALHO, F.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M.; BASTOS, M.L. Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. **Biol Pharm Bull**, v. 25, p.1324-1327, 2002.
- VALERGA, J.; RETA, M.; LANARI, M.C. Polyphenol input to the antioxidant activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts. **LWT - Food Science and Technology**, v.45, p.28-35, 2012.
- VEECK, A.P.L.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; EMANUELLI, T. Mate extract on lipid and color changes of dourado fillets during frozen storage. **Ciência Rural**, v.43, n.7, p. 1317-1322, 2013a.
- VEECK, A.P.L.; KLEIN, B.; FERREIRA, L.F.; BECKER, A.G.; HELDWEIN, C.G.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B.; EMANUELLI, T. Lipid stability during the frozen storage of fillets from silver catfish exposed *in vivo* to the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p.955-960, 2013b.
- VILJANEN, K.; KIVIKARI, R.; HEINONEN, M. Protein-lipid interactions during liposome oxidation with added anthocyanin and other phenolic compounds. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p-1104-1111, 2004.
- ZAMORANO-PONCE, E. et al. Anti-genotoxic effect of *Aloysia triphylla* infusion against acrylamide-induced DNA damage as shown by the comet assay technique. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. Mutation Research 603, p.145-150, 2006.

## AGRADECIMENTOS

T. Emanuelli é bolsista de produtividade em pesquisa do CNPq. A.P.L. Veeck, B. Klein, L.F. Ferreira e A.R. Ruviaro foram bolsistas do CNPq. Este estudo foi financiado por auxílios PRONEX (FAPERGS/CNPq), CT-AGRO (MCT/MPA/FINEP) e Casadinho/PROCAD (MCT/CNPq/MEC/Capes).

## DISCUSSÃO

A *A. triphylla* é uma planta medicinal que apresenta características aromáticas, sedativas e calmantes já consolidadas (PASCUAL, 2001). A sua utilização na forma de infusões, extratos e/ou óleos essenciais ressalta as suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes sugeridas para humanos e animais (BURT, 2004; ZAMARANO-PONCE et.al., 2006), bem como o seu potencial de aplicação na indústria de alimentos. Atualmente, existem duas patentes (aplicação e inovação) relacionadas à *A. triphylla*, a primeira de aplicação tecnológica de um extrato alcoólico (10% de oligossacarídeos) liofilizado com foco nas propriedades nutraceuticas devido à ação antioxidante em sistemas biológicos afetados por doenças inflamatórias, com destaque na elaboração de produtos lácteos como iogurte, bebidas lácteas e queijo frescal (PA20060280820, BALAN & PAPER, 2006); e a segunda de inovação tecnológica relacionada ao óleo essencial de *A. triphylla* indicado como sedativo e anestésico para animais aquáticos (PI0904839-1A2).

Neste contexto, o presente estudo buscou identificar o potencial de uso da *A. triphylla* na área de processamento de pescados, através da avaliação do efeito antimicrobiano do óleo essencial de *A. triphylla* (OAT) (Artigo 1), e se usado como anestésico *in vivo* em jundiá influencia nas características sensoriais, na qualidade e estabilidade do pescado inteiro refrigerado (Artigo 2) ou dos filés congelados (Artigo 3). Também foi estudado o potencial de uso e efeito antioxidante da infusão de *A. triphylla* (IAT) na estabilidade de filés de jundiás congelados (Artigo 4). Além disso, o peixe em estudo, o jundiá, apresenta-se como uma espécie promissora para a cadeia produtiva da piscicultura na região sul do Brasil (AMARAL JUNIOR et al., 2011, BARCELLOS et al., 2013).

O Artigo 1 avaliou a atividade antimicrobiana do OAT e o seu efeito na estabilidade microbiológica durante a armazenagem refrigerada de filés imersos em solução de OAT e de jundiás inteiros previamente tratados com o OAT durante o transporte *in vivo*. A atividade antimicrobiana do OAT revelou forte ação inibidora para *Staphylococcus aureus*, e *Enterococcus faecalis*, moderada inibição para *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Choleraesuis e *Salmonella* Enteritidis, sem inibição de *Pseudomonas aeruginosa*. Outros autores também demonstraram que o *S. aureus* é o micro-organismo mais sensível ao óleo essencial de *A. triphylla*, enquanto *P. aeruginosa* é a mais resistente (ROJAS et al., 2010; SARTORATTO

et al., 2004; DEMO et al., 2005). A avaliação da atividade antimicrobiana no alimento revelou que os filés de pescado mergulhados no óleo essencial de *A. triphylla* 30 ou 40  $\mu\text{L/L}$  apresentaram contagens médias de mesófilos e psicrotróficos mais baixos que o controle ( $p < 0,05$ ) ao longo do armazenamento. Os peixes sedados com 40  $\mu\text{L/L}$  de OAT durante o transporte tiveram contagens de micro-organismos psicrotróficos menores (aos 7 e 28 dias) em relação ao controle ( $p < 0,05$ ), enquanto que as contagens de micro-organismos mesófilos foram semelhantes ao controle durante o armazenamento refrigerado.

O óleo essencial de *A. triphylla* (OAT) apresenta como compostos majoritários monoterpenos e sesquiterpenos. No OAT utilizado no Artigo 1 foram identificados 13 compostos, enquanto no OAT utilizado nos Artigos 2 e 3 foram identificados 41 compostos. Os compostos em destaque foram  $\alpha$ -citrinal (32,1),  $\beta$ -citrinal (24,4), limoneno (13,4), cariofileno (4,9), acetato de geranilo (3,1), e e-geraniol (2,7), para o OAT utilizado no Artigo 1; e  $\alpha$ -citrinal (29,4),  $\beta$ -citrinal (20,8), limoneno (11,9), cariofileno (5,6), cubenol (3,3), acetato de geranilo (3,0) e óxido de cariofileno (2,3) para o OAT utilizado nos Artigos 2 e 3 em 100 g/g de óleo. Esta diferença na composição química do OAT (Artigos, 1 vs 2 e 3) provavelmente está relacionada com as variações na composição que ocorrem entre plantas da mesma espécie, pela época de colheita, pela parte da planta utilizada e também pela metodologia de extração (STASHENKO et al., 2004, CASTRO et al., 2002). Neste contexto, destaca-se também que os óleos essenciais são produtos naturais derivados do metabolismo secundário das plantas, sendo constituídos por uma mistura complexa de compostos voláteis como mono e sesquiterpenos, compostos benzênicos, fenilpropanóides, etc, apresentando assim, uma enorme variação em sua composição entre as plantas (BASER; BUCHBAUER, 2009). Assim como no presente estudo, outros trabalhos também encontram como principais componentes do OAT  $\alpha$ -citrinal,  $\beta$ -citrinal e limoneno (CARNAT et al., 1999; HOSSAM et al., 2011; PARODI et al., 2012).

Desta forma, os efeitos antimicrobianos revelados pelo OAT no Artigo 1 podem ser relacionados aos seus principais constituintes (citrinal e limoneno), corroborando com outros estudos no qual o citrinal apresentou atividade antibacteriana contra patógenos de origem alimentar, como *E. coli*, *E. coli 0157:H7* e *Salmonella* Typhimurium (KIM et al., 1995), enquanto que o limoneno apresenta atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas de origem alimentar (SINGH et al., 2010; TAJKARIMI et al., 2010). Além, disso o citrinal e o limoneno foram reconhecidos como seguros para o uso

como aditivos alimentares por parte dos órgãos reguladores nos Estrados Unidos da América e na União Européia (TAJKARIMI et al., 2010), o que justifica a sua utilização em alimentos (Artigos 1, 2 e 3).

O Artigo 2 avaliou a qualidade físico-química e sensorial de jundiás expostos *in vivo* ao OAT durante o transporte, e revelou que a exposição a 40 µL/L OAT retardou o início do *rigor mortis*, bem como a degradação de IMP em HXR em comparação com o controle ( $p < 0,05$ ), estendendo as características de pescado fresco. Os peixes, que foram tratadas com 30 ou 40 µL/L de OAT receberam menores escores de demérito sensorial, após 10 dias de armazenamento em gelo em relação ao controle ( $p < 0,05$ ), sendo que a maior vida útil (35 dias) foi observada para os peixes tratados com 40 µL/L de AT. A deterioração dos pescados inicia apenas após a resolução do *rigor mortis* (POLI et al., 2005), assim quanto mais tarde ocorrer a instalação e resolução do *rigor mortis*, mais tempo serão mantidas as características de frescor do pescado (SCHERER et al., 2004). Neste caso, o efeito benéfico do OAT quanto o frescor revela o seu potencial de aplicação na cadeia produtiva de pescados, pois poderia aumentar o tempo de oferta do pescado durante a comercialização, além de promover o bem estar dos peixes durante o transporte que é atualmente, um dos grandes desafios da aquicultura. Neste contexto, o estudo desenvolvido por Ribas et al. (2007) comparando diferentes métodos de abate de linguado do Senegal (*Solea senegalensis*) revela que a utilização de óleo de cravo (1 mL/L) como anestésico teve efeito benéfico reduzindo o estresse *ante mortem* e resultando em condições de frescor superiores para a qualidade da carne em comparação aos métodos tradicionais de abate por asfixia e hipotermia. Assim como observado para o óleo de cravo, os resultados do presente estudo revelam que o OAT também apresenta resultados promissores quando utilizado como sedativo de peixes, melhorando a qualidade pós-abate dos pescados refrigerados (Artigo 1 e 2), bem como a qualidade dos filés congelados (Artigo 3).

Os filés de jundiás expostos ao OAT (Artigo 3) mantiveram sua qualidade nutricional (composição centesimal) e durante o armazenamento congelado os filés dos peixes que haviam sido tratados com OAT apresentaram menor pH que o controle ( $p < 0,05$ ), o que pode ser resultante da redução do estresse do peixe durante o transporte. Os valores de pH dos filés congelados de jundiás expostos ao OAT durante o transporte (Artigo 3), bem como os filés de jundiás imersos na IAT (Artigo 4) mantiveram-se abaixo de 6,8, limite máximo para aceitabilidade segundo a legislação brasileira (BRASIL, 1974).

A vida útil dos pescados congelados é limitada por reações de hidrólise e especialmente de oxidação lipídica, que resultam em alterações indesejáveis na cor, sabor, odor e valor nutritivo (SAMPELS, 2013). A estabilidade lipídica dos filés congelados de jundiás expostos ao OAT durante o transporte (Artigo 3), bem dos filés imersos na IAT (Artigo 4) foram avaliados através dos indicadores de oxidação lipídica como os compostos primários, dienos conjugados (DC), e os compostos secundários, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A transformação de compostos primários de oxidação (DC) em produtos secundários caracteriza a evolução do processo de peroxidação lipídica que ocorre em três estágios principais: iniciação, propagação e terminação (LÓPEZ-DE-DICASTILLO et al., 2012).

Para os indicadores de oxidação lipídica (Artigo 3) foram observados maiores teores iniciais de DC nos filés dos peixes expostos a 30 e 40  $\mu\text{L/L}$  de OAT e menor valor de TBARS nos filés dos peixes expostos a 40  $\mu\text{L/L}$  de OAT após 6, 9 e 17 meses de congelamento, em comparação com os filés controle ( $p < 0,05$ ). Em conjunto, os resultados de DC e TBARS indicam que a exposição a 40  $\mu\text{L/L}$  de OAT durante o transporte apresentou um efeito antioxidante nos filés de jundiás congelados, pois retardou a degradação dos produtos primários da oxidação lipídica (DC) em produtos secundários (TBARS). Este retardo na velocidade da oxidação lipídica, e em especial os menores valores de TBARS podem ser importantes para estender a vida útil dos filés de jundiás congelados, pois os aldeídos resultantes da oxidação lipídica (avaliados pelo valor de TBARS) são responsáveis pelo odor de ranço característico e consequente rejeição dos alimentos oxidados (DAMODARAN et al., 2008). O OAT teve seu efeito antioxidante demonstrado em sistema biológico *in vivo* pela ativação das enzimas antioxidantes catalase e glutatona S-transferase (GRESSLER et al., 2012), assim como em ensaios *in vitro*, nos quais o OAT apresentou atividade antioxidante moderada para a remoção do radical de DPPH em comparação à atuação do BHA, um antioxidante sintético (HOSSAM, et al., 2011).

Já para os filés imersos na IAT (Artigo 4) o efeito antioxidante (IAT 1-5%) foi constatado pelos menores teores de DC após 7 meses de congelamento, bem como valor de TBARS inferior ao controle nos tempos 4, 7 e 10 meses de congelamento. Neste caso, provavelmente o efeito antioxidante apresentado está relacionado com os teores de fenólicos totais das soluções de IAT, que variaram entre 238,7 e 832,3 mg equivalentes de ácido clorogênico/100 mL, tendo sido identificados como compostos majoritários a



isoquercetrina > ácido rosmarínico > luteolina. Os valores de DPPH e FRAP apresentaram correlação direta com o teor de compostos fenólicos totais das infusões de IAT ( $r=0,85$  para ambos,  $p<0,05$ ), indicando que estes compostos são responsáveis pela atividade antioxidante *in vitro*. Outros estudos *in vitro* e em sistemas biológicos têm indicado o potencial antioxidante de infusões e extratos de *A. triphylla* (VALENTÃO et al., 2002; ZAMARANO-PONCE et al., 2006; PEREIRA & MEIRELES, 2007; FUNES et al., 2009).

Estudos relatam que a oxidação protéica muitas vezes pode estar associada à oxidação lipídica (VILJANEN et al., 2004). Os produtos resultantes da reação entre lípidos oxidados e proteínas podem ser de cor amarela, e a intensidade da cor está correlacionada com o aumento da produção de TBARS (THANONKAEW et al., 2006). Neste caso, os fosfolípidios presentes em estruturas celulares são suscetíveis à oxidação e como contêm grupos amina, a oxidação pode levar a interações de aldeído-amina, que produzem cor (THANONKAEW et al., 2006). A oxidação das proteínas resulta em alterações conformacionais que podem modificar a incidência da luz refletida, e com isso aumentar os valores de  $L^*$  (MORKORE, 2006).

No Artigo 4, independente do tempo de armazenagem, o tratamento com IAT 5% reduziu a luminosidade, aumentou a tendência ao amarelo e o croma comparado aos filés controle, enquanto o tratamento com IAT 2,5% aumentou apenas a tendência ao amarelo. No entanto, a variação total de cor dos filés tratados com IAT 2,5 e 5% ao longo do congelamento ( $\Delta E^*ab$ ) foi menor que nos filés controle ( $p<0,05$ ). O menor valor  $L^*$  dos filés tratados com IAT 5% e menores valores de  $\Delta E^*ab$  sugerem que, a IAT possivelmente protegeu os filés de jundiás da oxidação de proteínas durante o armazenamento congelado. O aumento da intensidade da cor amarela é muitas vezes associada à oxidação lipídica, porém este comportamento difere muito entre as espécies de pescado (HAMRE et al., 2003). A maior intensidade de amarelo dos filés tratados com IAT está relacionada provavelmente à presença de pigmentos carotenóides extraídos das folhas, pois já foi observada no mês zero ( $13,5\pm 0,9$  no IAT 5% vs.  $10,6\pm 0,7$  no controle,  $p<0,05$ ).

Existem diversas formas para prevenir ou retardar as reações de oxidação lipídica e alterações de coloração, sendo uma das alternativas a utilização de aditivos alimentares, como os antioxidantes naturais. Embora, a legislação brasileira proíba o uso de antioxidantes e conservantes em filés de pescado (BRASIL, Resolução CNS/MS n.º 04, de 24 de novembro de 1988), o IAT pode ser considerado como condimento, podendo, portanto, ser adicionado à solução de glaceamento utilizada como barreira protetora dos

filés de pescado durante o processo de congelamento, e estender a vida útil de filés de pescado congelados. Além disso, a IAT é amplamente usada como chá na medicina popular, e nenhum efeito de toxicidade oral ou efeito adverso foi observado em humanos ou em ensaio em ratos quando foram tratados com extrato de *A. triphylla* contendo 25% de verbascosídeo na dose de 2000 mg/kg (FUNES et al., 2009), indicando sua segurança para consumo humano.

## CONCLUSÃO

Os resultados dos experimentos indicaram que o óleo essencial de *A. triphylla* apresenta atividade antimicrobiana contra várias cepas de patógenos de origem alimentar e micro-organismos indicadores de qualidade dos alimentos, e poderia ser explorada como um potencial agente antimicrobiano natural na indústria de alimentos, especialmente quando aplicado diretamente no alimento, já que a imersão em solução de óleo essencial retardou o crescimento microbiano em filés de pescado refrigerados. No entanto, a exposição ao óleo essencial no pré-abate resultou em efeito antimicrobiano menos evidente, limitando-se a uma pequena redução na contagem de micro-organismos psicrotróficos em alguns tempos de armazenagem.

A utilização do óleo essencial de *A. triphylla* na concentração de 30 ou 40  $\mu\text{L/L}$ , como um sedativo na água de transporte de jundiás (*Rhamdia quelen*) retardou a perda das características de pescado fresco (o início do *rigor mortis* e a degradação de nucleotídeos) e aumentou sua vida útil durante o armazenamento refrigerado, além de ter retardado a oxidação lipídica dos filés durante o armazenamento congelado.

A imersão de filés de jundiás na infusão de *A. triphylla* (1 a 5%) retardou a oxidação lipídica, sendo que as maiores concentrações retardaram também as alterações de coloração durante o armazenamento congelado, podendo estender a vida útil dos filés.

Os resultados revelam o grande potencial de uso da *A. triphylla* na área de processamento pescados, onde o uso do seu óleo essencial (40  $\mu\text{L/L}$ ), na etapa pré-abate (sedativo) pode contribuir para prolongar a vida útil do pescado refrigerado e de filés congelados, enquanto a sua infusão (2,5 e 5%) pode ser usada como tratamento pós-abate para prolongar a vida útil de filés congelados.

## REFERENCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, 10 jan. 2001.

AHMAD, I. et al. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus Bloch*) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochem. Biophys. Acta.** 1523, 3748, 2000.

AHN, D.U.; NAM, K.C. Effects of ascorbic acid and antioxidants on color, lipid oxidation and volatiles of irradiated ground beef. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 71, p. 149–154, 2004.

AL-ZOREKY, N.S. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit peels. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, p. 244–248, 2009.

AMARAL JUNIOR, H. ; GARCIA, S. ; MELLO, G. L. Jundiá: Um peixe sob medida para a Região Sul do Brasil. **Panorama da AQUICULTURA**, março, abril, 2011. Disponível em: [http://intranetdoc.epagri.sc.gov.br/producao\\_tecnico\\_cientifica/DOC\\_6932.pdf](http://intranetdoc.epagri.sc.gov.br/producao_tecnico_cientifica/DOC_6932.pdf)  
Acesso: 20 junho 2014.

ARAB-TEHRANY, E. et al. Beneficial effects and oxidative stability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. **Trends in Food Science & Technology**, v. 25, p. 24-33, 2012.

ASHELY, P.J. Fish welfare: Current issues in aquaculture. **Applied Animal Behaviour Science**, v.104, p.199–235, 2007.

AUBOURG, S.P. Review: Loss of Quality during the Manufacture of Canned Fish Products. **Food Science and Technology International**, v. 7, p. 199–215, 2001.

BAGNI, M. et al. Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v. 263, p. 52-60, 2007.

BALAN, K; PAPER, D. 2006, Patent Application 20060280820 “Use of an extract of Aloysia/Verbena/Lippia triphylla/citriodora for the treatment of chronic and/or inflammatory diseases” - United States, Dec, 14, 2006. Disponível em: <http://www.freepatentsonline.com/y2006/0280820.html>. Acesso em: 22 jun. 2010.

BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ, J.N. **Criação de jundiá**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2004, 232p.

BARATTA, T.M., DORMAN, D.H.J., DEANS, S.G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **Flavour and Fragrance Journal** 13, 235–244, 1998.

BARCELLOS, L.J.G.; FAGUNDES, M.; FERREIRA, D. **Workshop sobre jundiá: história e perspectiva**. Passo fundo: UPF, 2013, 266p.

BARCELLOS, L.J.G. et al. Comparative analysis of different fish polyculture systems. **Journal of the World Aquaculture Society**, 43, 778-789, 2012.

BARCELLOS, L.J.G. et al. Influence of color background and shelter availability on jundiá (*Rhamdia quelen*) stress response. **Aquaculture**, v. 288, p. 51–56, 2009.

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 catfishes. **Aquaculture Research**, v. 32, p. 123–125, 2001.

BARCELLOS, L.J.G. et al. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard) fingerlings. **Aquaculture**, v. 253, p. 317–321, 2006.

BARCELLOS, L. J. G. et al. Chemical communication of handling stress in fish. **Physiology & Behavior**, v. 103, p. 372-375, 2011.

BARTON B.A. Stress. In: Stickney, R.R. (Ed.), **Encyclopedia of Aquaculture**. John Wiley and Sons, New York, pp. 892–898, 2000.

BASER, K. H.C.; BUCHBAUER, G. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. 1a edition. CRC Press: New York, 2009, 991 p.

BECKER, A.G. et al. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 789-796, 2012.

BOSWORTH, B.G. et al. Effects of rested-harvest using the anesthetic AQUI-S (TM) on channel catfish, *Ictalurus punctatus*, physiology and fillet quality. **Aquaculture** v. 262, 302–318, 2007.

BRANCH, A. C.; VAIL, A. M. A. Bringing fish inspection into computer age. **Food Technology in Australia**, v. 37, n. 8, p. 352-355, 1985.

BRASIL, Portaria no. 540, SVS/MS, de 27 de outubro de 1997, Aprova o regulamento técnico: aditivos alimentares – definições, classificação e emprego. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 28 de outubro de 1997.

BRASIL, Resolução CNS/MS n.º 04, de 24 de novembro de 1988. Aprova a revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a Aditivos Intencionais, bem como os Anexos I, II, III e VII, todas do Decreto n.º 55.871, de 26 de março de 1995. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 19 de dezembro de 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília, 1974.

BRASIL. Portaria n. 101 de 11 de agosto de 1993. Aprova e oficializa os métodos analíticos para o controle de produtos de origem animal e seus ingredientes – métodos microbiológicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, n. 156, 17 de agosto de 1992. Seção 1, Brasília.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2010**. Brasília: MPA, 2010. 128p.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. Brasília: MPA, 2011. 60p.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in foods – a review, **International Journal of Food Microbiology**. v. 94, n.3, p. 223-253, 2004.

CAKLI, S., et al. Quality diferences of whole ungutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. **Food Control**, v. 18, p. 391–397, 2007.

CARNAT, A. et al. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. **Fitoterapia**. v. 70, n.1, p. 44-49, 1999.

CAROVIC-STANKO, K. et al. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum taxa*. **Food Chemistry** 119, 196-201, 2010.

CASTRO, D.M. et al. Composição fitoquímica dos óleos essenciais de folhas da *Lippia alba* (Mill). N.E.Br em diferentes épocas de colheita e partes do ramo. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v.4, p.75-79, 2002.

CHAPMAN, R.A.; MACKAY, K. The estimation of peroxides in fats and oils by the ferric thiocyanate method. **The Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 26, p. 360-363, 1949.

CRUZ-ROMERO, M. et al. Changes in the microbiological and physicochemical quality of high-pressure-treated oysters (*Crassostrea gigas*) during chilled storage. **Food Control**, v. 19, p. 1139–1147, 2008.

CUNHA, M.A. da 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, p. 403-406, 2010b.

DAMODARAN, S. et al. Fennema's Food Chemistry. (4th ed.). CRC Press, Boca Raton (2008).

DEMO, M. et al. Antimicrobial activity of essential oils obtained from aromatic plants of Argentina. **Pharmaceutical Biology**, v. 43:2, 129-134, 2005.

DOLATABADI, J.E.N.; KASHANIAN, S. A review on DNA interaction with synthetic phenolic food additives. **Food Research International**, v. 43, p. 1223–1230, 2010.

DUARTE, M. et al. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology** 111, 197-201, 2007.

EMANUELLI, T; PICCOLO, J. Qualidade da carne de jundiá (*Rhamdia quelen*). In: BARCELLOS, L.J.G.; FAGUNDES, M.; FERREIRA, D. **Workshop sobre jundiá: história e perspectiva**. Passo fundo: UPF, 2013, 266p.

FAÇANHA, M.F.; GOMES, L. de C. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, *Characiformes: Characidae*). **Acta Amazonica**, v. 35, p. 71-75, 2005.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, v.1, 5ª ed., Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília: Anvisa, 2010. 546p.

FAUSTMAN, C. et al. Review Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. **Meat Science**, v. 86, p. 86–94, 2010.

FENNEMA, R.O. Química de los Alimentos. 3ª ed., Acríbia S.A., Zaragoza, Spain, 2000. 1258 p.

FLORA DIGITAL DE PORTUGAL. In: JARDIM BOTÂNICO DA UTAD. Disponível em:

<[http://aguiar.hvr.utad.pt.pt/herbario/cons\\_reg\\_fam2.asp?familia=Verbenaceae&ID=2240](http://aguiar.hvr.utad.pt.pt/herbario/cons_reg_fam2.asp?familia=Verbenaceae&ID=2240)>. Acesso em: 20 set. 2010.

FOGAÇA, F. S. H.; SANT'ANA, L. S. Oxidação lipídica em peixes: Mecanismo de ação e prevenção. **Archives of Veterinary Science**. v. 14, n. 2, p. 117-127, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The state of world fisheries and aquaculture 2012. Rome: FAO, 2012. 209p.

FOTUHI; MOHASSEL; YAFFE. Fish consumption, long-chain omega-3 fatty acids and risk of cognitive decline or Alzheimer disease: a complex association. **Nature Reviews Neurology**, V5, p140-152, 2009.

FRANCO, A. L. P.; et al. Avaliação da composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Aloysia Gratissima* (Gillies & Hook) Tronc. (Alfazema), *Ocimum Gratissimum* L. (Alfavaca-Cravo) e *Curcuma Longa* L. (Açafrão). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.IV, n. 2, p.208-220, 2007.

FUKUMOZO, L.R.; MAZZA, G. Assesing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3597–3604, 2000.

FURUICHI, Y.; TANIGUCHI, J.; MURABAYASHI, J. A rapid and convenient method for the determination of amide nitrogen in food proteins. **Nippon Nogeikagaku Kaishi—Journal of the Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry**, v. 71, p. 395–401, 1997.

FUNES, L. et al. Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract. **Food Chemistry** 117, 589–598, 2009.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas Medicinais: fatores que interferem no teor de metabólitos secundários. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p.374 – 381, 2007.

GOMES, L.C. et al. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE). **Ciência Rural**, v. 30, p. 179-185, 2000.

GRAM, L. Evaluation of the bacteriological quality of seafood. In Huss, H.H. et al. (Eds.), *Quality assurance in the fish industry* (pp. 377-388). Amsterdam: Elsevier Science Publishing, 1992.

GRAM, L.; HUSS, H.H. Microbiological spoilage of fish and fish products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 121-137, 1996.

GRAM, L.; MELCHIORSEN, J. Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas* sp. and *Shewanella putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 80, p. 589-595, 1996.

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**, p. 1–12, 2012.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2a ed. London: Oxford: University Press, New York, 1999. 936 p.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid-peroxidation—its mechanism, measurement, and significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. S715–S725, 1993.

HAMRE, K. et al. Development of lipid oxidation and flesh colour in frozen stored fillets of Norwegian spring-spawning herring (*Clupea harengus* L.). Effects of treatment with ascorbic acid. **Food Chemistry**, v. 82, p. 447-453, 2003.

HARTMAN, L.; LAGO, B.C. A rapid preparation of fatty methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, p. 475-477, 1973.

HEINZMANN B.M., BALDISSEROTTO B., PARODI T.V., CUNHA M.A., SILVA L.L. & MALLMANN C.A. Composições anestésicas para animais aquáticos e métodos de anestesia de animais aquáticos compreendendo as mesmas. Patente nº 016090005905. **Revista da Propriedade Industrial**, 2107, 2161, 2011.

HOSSAIN, M.A. Fish as Source of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs), Which One is Better-Farmed or Wild? **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 3, p. 455-466, 2011.

HOSSEINI, S.V. et al. Influence of the in vivo addition of alpha-tocopheryl acetate with three lipid sources on the lipid oxidation and fatty acid composition of Beluga sturgeon, *Huso huso*, during frozen storage. **Food Chemistry**, v. 118, p. 341-348, 2010.



HOU, D.X. Potential mechanism of cancer chemoprevention by anthocyanin. **Current Advancements in Molecular Medicines**, v. 3, p. 149–159, 2003.

HOWGATE, P.A. Review of the kinetics of degradation of inosine monophosphate in some species of fish during chilled storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 341-353, 2006.

HULTMANN, L. et al. Effects of pre-slaughter stress on proteolytic enzyme activities and muscle quality of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Food Chemistry** 134:1399–408, 2012.

HUSS, H.H. 1995. Quality and Quality Changes in Fresh Fish. FAO Fisheries Technical Paper 348. Rome, Italy: Food and Agriculture of the United Nations.

IWAMOTO, M. et al. Effects of storage temperature on *rigor mortis* and ATP degradation in place (*Paralichthys olivaceus*) muscle. **Journal of Food Science**, v. 52, 1514-1517, 1987.

INOUE, L.A.K.A. et al. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 943-947, 2003.

IVERSEN, M. et al. The efficacy of metomidate, clove oil, Aquí-STM and Benzoak as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture**, v. 221, p. 549–566, 2003.

KIM, J., MARSHALL, M.R., WEI, C.I., Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.43, 2839– 2845, 1995.

KRISHNAIAH, D. et al. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v.89, p.217-233, 2011.

KUBOTA, E. H.; EMANUELLI, T. **Processamento do pescado**. In: BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ, J.N. Criação de jundiá. Santa Maria: Ed. UFSM, 2004. 232p.

LAWLESS, H. T.; HEYMANN, H. (Ed.) **Sensory Evaluation of Food, Principles and Practices**. New York: Chapman and Hall, 1998.

LAZZARI, R. et al. Different protein sources for jundiá (*Rhamdia quelen*) feeding. **Ciência Rural**, v. 36, p. 240-246, 2006.

LI, T. Shelf-life extension of crucian carp (*Carassius auratus*) using natural preservatives during chilled storage. **Food Chemistry**, v. 135, p. 140–145, 2012.

LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C. et al. Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. **Food Chemistry**, v. 131, p.1376–1384 2012.

LUSHCHAK, V.L. Review Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, p. 13–30, 2011.

MEDINA, I. et al. Effect of molecular structure of phenolic families as hydroxycinnamic acids and catechins on their antioxidant effectiveness in minced fish muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 3889-3895, 2007.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 36, p. 1-11, 2002.

MEINERTZ, J.R., et al. Depletion of eugenol residues from the skin-on fillet tissue of rainbow trout exposed to <sup>14</sup>C-labeled eugenol. **Aquaculture**, v. 430, p.74–78, 2014.

MORKORE, T. Relevance of dietary oil source for contraction and quality of pre-rigor filleted Atlantic cod, *Gadus morhua*. **Aquaculture**, v. 256, p. 56-65, 2006.

NAKAYAMA, T. et al. Tension changes of stresses and unstressed carp muscle isometric rigor contraction and resolution. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 58, p.1517-1522, 1992.

OCAÑO-HIGUERA, V.M. et al. Freshness assessment of ray fish stored in ice by biochemical, chemical and physical methods. **Food Chemistry**, v. 125, p. 49-54, 2011.

OCAÑO-HIGUERA, V.M. et al. *Postmortem* changes in cazon fish muscle stored on ice. **Food Chemistry**, v. 116, p. 933-938, 2009.

OETTERER, M. **Industrialização do pescado cultivado**. Guaíba, RS: Livraria e editora Agropecuária, 2002. 200 p.

OLIVEIRA, C. M. A. et al. Kauranes, phenylethanoids and flovone from *Aloysia virgata*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p.1191-1193, 2005.

OLSEN, Y.A., EINARSDOTTIR, I.E., NILSSEN, K.J. Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon, *Salmo salar*, prevents plasma cortisol increase during stress. **Aquaculture**, 134, 155–168, 1995.

PARODI, T. V. Atividade antibacteriana e composição química dos extratos de *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton obtidos por fluido supercrítico (CO<sub>2</sub>). 2010. 60f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

PARODI, T.V. et al. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 155, p. 462–468, 2012.

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 Biochemistry**, v. 40, n.2, p. 323-334, 2013a.

PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, p.201-214, 2001.

PACHECO-AGUILAR, R. et al. Postmortem biochemical and functional characteristic of monterey sardine muscle stored at 0°C. **Journal of Food Science**, v. 65, 40–47, 2000.

PEDRAZZANI, A.S. et al. Impacto negativo de secção de medula e termonarrose no bem-estar e na qualidade da carne da tilápia-do-Nilo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, n.1, p.188-197, 2009.

PEREIRA, C.G.; MEIRELES, M. A. A. Evaluation of global yield, composition, antioxidant activity and cost of manufacturing of extracts from lemon verbena (*Aloysia triphylla* [L'Herit.] Britton) and mango (*Mangifera indica* L.) leaves. **Journal of Food Process Engineering**, v. 30,150–173, 2007.

PERÉZ, G. S. et al. Antidiarrhoeal activity of C-9 aldehyde isolated from *Aloysia triphylla*. **Phytotherapy Research**. v. 12, n. S1, p. S45-S46, 1998.

PICCOLO, J. et al. Oxidative stability of refrigerated fish patês containing loquat seed extract. **Ciência Rural**, Santa Maria, Online, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-847cr20140066>. Acesso em: 06 de julho de 2014.

RECKNAGEL, R.O.; GLENDE JR, E.A. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. **Methods in Enzymology**. **Academic Press**, v. 105, p. 331-337, 1984.

RIBAS, L. et al. Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: Stress responses and final product quality. **Aquaculture**, v. 269, p. 250-258, 2007.

ROCHA, C. M. C.; RESENDE, E. K.; ROUTLEDGE, E. A. B.; LUNDSTEDT, L. M. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n.8, pp. iv-vi, 2013.

ROJAS, L.B. et al. Chemical composition and antibacterial effects of the essential oil of *Aloysia triphylla* against genito-urinary pathogens. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, 9, 56-62, 2010.

ROSS, L.G.; ROSS, B. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. 3rd Ed. John Wiley & Sons, 2008. 240 p.

RUFF, N. et al. The effect of dietary vitamin E and C level on market-size turbot (*Scophthalmus maximus*) fillet quality. **Aquaculture Nutrition**, v.9, p.91-103, 2003.

RUFF, N. et al. Distribution of  $\alpha$ -tocopherol in fillets of turbot (*Scophthalmus maximus*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), following dietary  $\alpha$ -tocopheryl acetate supplementation. **Aquaculture Nutrition**, v. 10, n. 2, p. 75-81, 2004.

SAMPLES, S. Oxidation and Antioxidants in Fish and Meat from Farm to Fork. Chapter 6. **Food Industry**, INTECH, 2013.

SÁNCHEZ, L.C. et al. Influencia de los antioxidantes naturales y artificiales en el deterioro oxidativo del aceite semirrefinado de pescado. **Anales Científicos U.N.A**, v. L., Enero-Febrero, 2002.

SÁNCHEZ-ALONSO et al. Effect of grape antioxidant dietary fibre on the prevention of lipid oxidation in minced fish: Evaluation by different methodologies. **Food Chemistry**, v. 101, p. 372-378, 2007.

SANTOS, S. C. et al. Antifungal activity of *Eugenia uniflora* L. fractions against *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore) Almeida, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n. 1, p. 30-33, 2004.

SANTOS-GOMES, P.; FERNADES-FERREIRA, M.; VICENTE, A. M. S. Composition of the essential oils from flowers and leaves of vervain [*Aloysia triphylla*] (L'Her, Britton)] grown in Portugal. **Journal of Essential Oils**, v. 17, p. 73-78, 2005.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 35, 275- 280, 2004.

SCHERER, R. Efeito do método de abate e da cloração do gelo sobre a vida de prateleira da Carpa Carpim (*Ctenopharyngodon idella*) armazenada sob refrigeração. 2004. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

SCHERER, R. et al. Chemical and microbiological quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) slaughtered by different methods. **Food Chemistry**, v. 99, p. 136-142, 2006.

SCHERER, R. et al. Efeito do gelo clorado sobre parâmetros químicos e microbiológicos da carne de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 680-684, 2004b.

SCHERER, R. et al. Effect of slaughter method on *postmortem* changes of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) stored in ice. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 348-353, 2005.

SEBRA, Idéias de novos negócios 2014. Agronegócios: Piscicultura – Criação de Peixes. Disponível em: <http://www.sebrae2014.com.br/sebrae/sebrae%202014/Ideias%20de%20negocios/Agronegocios%20-%20Pscicultura%20-%20Criacao%20de%20Peixes01.pdf>.

SILVA, L.V.A. et al. Effect of preservatives on microbial safety and quality of smoked blue catfish (*Ictalurus furcatus*) steaks during room-temperature storage. **Food Microbiology**, v. 25, p. 958–963, 2008.

SILVA, L.L. et al. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture** 350, 91–97, 2012.

SINGH, P. et al. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, 1734-1740, 2010.

STASHENKO, E.E. et al. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundários voláteis de plantas de La familia verbenaceae. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias**, v. XXVII, n. 105, p. 579-597, 2003.

STASHENKO, E.E. et al. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, p. 93–103, 2004.

TAJKARIMI, M.M. et al. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, p.1199-1218, 2010.

THANONKAEW, A. et al. Development of yellow pigmentation in squid (*Loligo peali*) as a result of lipid oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 956–962, 2006.

TORT, L., PUIGSERVER, M., CRESPO, S., PADRÓS, F. Cortisol and haematological response in sea bream and trout subjected to the anaesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. **Aquaculture Research**. 33, 907–910, 2002.

VALENTÃO, P. et al. Studies on the antioxidant activity of *Lippia citrodora* infusion: a scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.18, p.1324-1327, 2002.

VALERGA, J. et al. Polyphenol input to the antioxidant activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, p. 28-35, 2012.

VALLÉ, M., MALLE, P.; BOUQUELET, S. Evaluation of fish decomposition by liquid chromatographic assay of ATP degradation products. **Journal of AOAC International**, v. 81, n. 3, p. 571 – 575, 1998.

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.) N.E. Brown. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p.955-960, 2013a.

VEECK, A.P.L. et al. Mate extract on lipid and color changes of dourado fillets during frozen storage. **Ciência Rural**, v.43, n.7, p. 1317-1322, 2013b.

VENUGOPAL, V. Biosensors in fish production and quality control. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 17, p. 147–157, 2002.

VERMA, J. et al. Effects of frozen storage on lipid freshness parameters and some functional properties of oil sardine (*Sardinella longiceps*) mince. **Food Research International**, v. 28, p. 87-90, 1995.

VILJANEN, K.; KIVIKARI, R.; HEINONEN, M. Protein-lipid interactions during liposome oxidation with added anthocyanin and other phenolic compounds. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p-1104-1111, 2004.

WANG, D. et al. *Postmortem* changes of cultivated Atlantic salmon and their effects on salt uptake. **Journal of Food Science**, v. 63, 634–637, 1998.

WEBER, E.S. Fish Analgesia: Pain, Stress, Fear Aversion, or Nociception? **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 14, p. 21–32, 2011.

WEBER, J. et al. Effect of different cooking methods on the oxidation, proximate and fatty acid composition of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fillets. **Food Chemistry**, v. 106, p. 140–146, 2008.

YOUNG, I.S.; MCENENY, J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. **Biochemical Society Transactions**, v. 29, p. 358-362, 2001.

ZAHL, I.H., SAMUELSEN, O., KIESSLING, A. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. **Fish Physiol. Biochem.** 38, 201–218, 2012.

ZAMARIA N. Alteration of polyunsaturated fatty acid status and metabolism in health and disease. **Reproduction Nutrition Development**, 44, 273–282, 2004.

ZAMBUCHINI, B. et al. Inhibition of microbiological activity during sole (*Solea solea L.*) chilled storage by applying ellagic and ascorbic acids. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 1733-1738, 2008.

ZAMORANO-PONCE, E. et al. Anti-genotoxic effect of *Aloysia triphylla* infusion against acrylamide-induced DNA damage as shown by the comet assay technique. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. Mutation Research** 603, p.145-150, 2006.

ZEPPENFELD, C.C. et al. Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. **Aquaculture**, v. 418-419, p.101-107, 2014.