

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE CRAVO (*EUGENIA
CARYOPHYLLUS*) E CANELA (*CINNAMOMUM
ZEYLANICUM*) EM DIETAS PARA TILÁPIA DO NILO
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*)**

Autor: Cesar Sary
Orientador: Ricardo Pereira Ribeiro

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro – 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE CRAVO (*EUGENIA
CARYOPHYLLUS*) E CANELA (*CINNAMOMUM
ZEYLANICUM*) EM DIETAS PARA TILÁPIA DO NILO
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*)**

Autor: Cesar Sary
Orientador: Ricardo Pereira Ribeiro

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de Concentração Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro – 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

S779o Sary, Cesar
Óleos essenciais de cravo (*Eugenia caryophyllus*) e
canela (*Cinnamomum Zeylanicum*) em dietas para Tilápia
do Nilo (*Oreochromis Niloticus*) / Cesar Sary. --
Maringá, 2018.
89 f. : il., tabs.

Orientador(a): Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia - Área de Concentração:
Produção Animal, 2018.

1. Antioxidante natural. 2. Desempenho animal. 3.
Expressão gênica. 4. Oxidação lipídica. I. Ribeiro,
Ricardo Pereira, orient. II. Universidade Estadual de
Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia: Área de Concentração: Produção
Animal. III. Título.

CDD 21.ed. 639.3774

AHS-CRB-9/1065



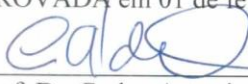
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ÓLEOS ESSENCIAIS DE
CRAVO (*EUGENIA CARYOPHYLLUS*)
E CANELA (*CINNAMOMUM ZEYLANICUM*) EM DIETAS
PARA TILÁPIA DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)


Autor: Cesar Sary
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

TITULAÇÃO: Doutor em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 01 de fevereiro de 2018.



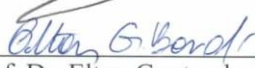
Prof. Dr. Carlos Antonio Lopes de
Oliveira



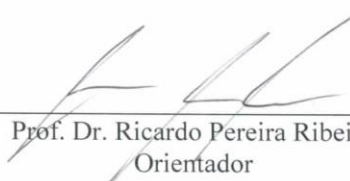
Prof. Dr. Ivanor Nunes do Prado



Prof. Dr. Oscar de Oliveira Santos
Junior



Prof. Dr. Elton Guntendorfer
Bonafé



Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro
Orientador

“Não importa o quanto a vida possa ser ruim, sempre existe algo que você pode fazer, e triunfar”.

(Stephen Hawking)

Aos meus pais, Paulo Sary e Maria Ochelisky Sary,

por todo o apoio e incentivo que proporcionam conforto e renovam as energias para seguir em frente.

Aos meus irmãos, Gilmar Sary e Osmar Sary,

pela amizade.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Paulo Sary e Maria Ochelisky Sary, pelo apoio e conselhos;

Aos meus irmãos, Gilmar Sary e Osmar Sary, pela amizade;

A Vanessa Lewandowski (esposa), pela amizade e carinho;

Ao professor, orientador Dr Ricardo Pereira Ribeiro, pelos ensinamentos e confiança na condução dos trabalhos;

Aos professores, Carlos Antonio Lopes de Oliveira, Lauro Daniel Vargas Mendez, Ivanor Nunes do Prado e Jesuí Vergílio Visentainer, pelo incentivo para realização dos trabalhos;

Aos colegas do Grupo de Pesquisa PeixeGen, pelo apoio profissional e incontáveis momentos de alegria;

Aos colegas do Departamento de Química, pelo auxílio nas análises;

Aos demais colegas do Departamento de Zootecnia e Departamentos de Química da Universidade Estadual de Maringá, pela amizade e apoio na realização das análises;

Aos funcionários da estação de piscicultura (CODAPAR), Vitor Moisés, Cleiton Wellington dos Santos e José Geraldo, pela ajuda na condução dos experimentos;

Aos funcionários da Unidade Demonstrativa em Tanque Rede, Campus Regional de Diamante do Norte, pelo auxílio para realização do trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro (bolsa e taxa de bancada);

A todos, o meu muito obrigado.

BIOGRAFIA

Cesar Sary, filho de Paulo Sary e Maria Ochelisky Sary, nasceu em São José dos Pinhais – PR, no dia 01 de maio de 1987.

Em março de 2005, ingressou no Curso de Graduação em Zootecnia pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR campus São Jose dos Pinhais. Em dezembro de 2008, conclui a graduação, obtendo o título de Zootecnista.

Nos anos de 2009 e 2010, desenvolveu atividades como bolsista recém-formado na Universidade Estadual do Oeste do Paraná e 2011 retornou a PUCPR, como técnico de laboratório.

Em março de 2012, ingressou no Programa de Pós-Graduação nível de mestrado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, submetendo-se aos exames finais de defesa de dissertação em 2014.

Em março de 2014, ingressou no Programa de Pós-Graduação, nível de doutorado em Zootecnia, na Universidade Estadual de Maringá. Submeteu-se ao Exame de qualificação e defesa em 2017.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
I - INTRODUÇÃO	14
1. Panorama da aquicultura.....	14
2. Qualidade dos filés de tilápias do Nilo	15
3. Oxidação lipídica	16
3.1. Determinação da oxidação lipídica.....	18
4. Antioxidantes	19
4.1. Determinação da capacidade antioxidante.....	21
5. Óleos essenciais de cravo e canela	24
6. Utilização dos óleos essenciais na aquicultura	26
7. Análise sensorial	28
8 - Referências bibliográficas	29
II - OBJETIVOS GERAIS.....	38
III - Efeito dos óleos essenciais de cravo (<i>Eugenia caryophyllus</i>) e canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>) em rações para tilápia do Nilo sobre o desempenho e capacidade antioxidante e oxidação lipídica nos filés.	39
Resumo	39
Introdução	40
Material e Métodos	41

Resultados.....	46
Discussão	47
Conclusão.....	49
Referências.....	49
IV – Óleo essencial de cravo (<i>Eugenia caryophyllus</i>) como fonte antioxidante em rações para tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	58
Resumo	58
Introdução	59
Material e Métodos	60
Resultados.....	66
Discussão	68
Conclusão.....	72
Referências bibliográficas.....	72
CONSIDERAÇÕES FINAIS	88

LISTA DE TABELAS

III - Efeito dos óleos essenciais de cravo (*Eugenia caryophyllus*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum*) em rações para tilápia do Nilo sobre o desempenho e capacidade antioxidante e oxidação lipídica nos filés.

Tabela 1. Ingredientes e composição aproximada da ração experimental..... 53

Tabela 2. Peso (PF) e comprimento final (CF), conversão alimentar (CA) e ganho em peso diário (GPD) de tilápias do Nilo alimentadas com rações com inclusão (0,35 e 0,70 g.kg⁻¹ na ração) de óleo essencial de cravo (OEcl) e canela (OEci). 54

Tabela 3. Poder antioxidante (μmol ET g⁻¹) das rações com inclusão (0,35 e 0,70 g.kg⁻¹ na ração) de óleo essencial de cravo (OEcl) e canela (OEci). 55

Tabela 4. Poder antioxidante (μmol ET g⁻¹) em filés de tilápias Nilo alimentadas com rações com inclusão (0,35 e 0,70 g.kg⁻¹ na ração) de óleo essencial de cravo (OEcl) e canela (OEci). 56

Tabela 5. Oxidação lipídica (mg.kg⁻¹ de malonaldeído nos filés) pelo ensaio de TBARS em filés de tilápias do Nilo alimentadas com rações com níveis de inclusão (0,35 e 0,70 g.kg⁻¹ de ração) de óleo essencial de cravo (OEcl) e canela (OEci). 57

IV - Óleo essencial de cravo (*Eugenia caryophyllus*) como fonte antioxidante em rações para tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Tabela 1. Características dos primers utilizados neste estudo. 79

Tabela 2. Efeito isolado entre níveis de óleo essencial de cravo nas rações e período de fornecimento para tilápias do Nilo antes do abate para desempenho animal

(PF – peso final, CF – comprimento final, GPD – ganho de peso final, CA – conversão alimentar, RF – rendimento de filé), poder antioxidante (DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, FRAP – Ferric Reducing Ability Power, ABTS – Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)), análise instrumental, oxidação lipídica, expressão gênica (CAT – catalase, GPX – glutaciona peroxidase, GSS – glutaciona sintetase) e análise sensorial..... 80

Tabela 3. Poder antioxidante das rações experimentais..... 82

Tabela 4. Interação entre níveis de óleo essencial de cravo nas rações e períodos de fornecimento para tilápias do Nilo antes do abate sobre o poder antioxidante nos filés pelos ensaios DPPH e FRAP..... 83

Tabela 5. Interação entre níveis de óleo essencial de cravo nas rações e períodos de fornecimento para tilápias do Nilo sobre a oxidação lipídica (mg malonaldeído.kg⁻¹) nos filés armazenados em expositor a 4 °C por 14 dias. 84

Tabela 6. Faixa etária dos consumidores da análise sensorial. 85

Tabela 7. Frequência de consumo de diferentes tipos de carnes pelos consumidores da análise sensorial. 86

Tabela 8. Perfil dos consumidores em relação a compra de carne de peixe e informação sobre os óleos essenciais. 87

RESUMO

Foram conduzidos dois experimentos com o objetivo de avaliar a inclusão dos óleos essenciais de cravo (OEcl) ou canela (OEci) em rações para tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem Gift/Tilamx sobre o desempenho animal e capacidade antioxidante pelos ensaios ORAC_{FL} (Oxigen Radical Absorbance Capacity – fração lipofílica (L-ORAC_{FL}) e hidrofílica (H-ORAC_{FL}), DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), FRAP (Ferric Reducing Ability Power) e ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)), oxidação lipídica pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), expressão gênica, textura, pH e cor por meio de medidas instrumentais e análise sensorial. No experimento I (condições controladas), foi avaliado os OEcl e OEci com dois níveis de inclusão (0,35 e 0,70 g.kg⁻¹ de ração) e tratamento controle sem inclusão de óleo essencial. Os peixes foram alimentados durante 45 dias e avaliado o desempenho, capacidade antioxidante e oxidação lipídica. Para oxidação lipídica, os filés foram armazenamento em vitrine a 2°C e analisados por 7 dias. O desempenho dos peixes (peso e comprimento final, conversão alimentar e ganho em peso diário) não foram afetados pelos óleos essenciais e níveis de inclusão. A capacidade antioxidante nos filés foi maior (p < 0,05) para os peixes do tratamento com 0,35 g.kg⁻¹ de OEcl pelo ensaio L-ORAC_{FL}. O OEcl reduziu em até 40,3% a oxidação lipídica; enquanto o OEci apresentou efeito pró-oxidante em comparação ao controle. A inclusão de 0,35 g.kg⁻¹ de OEcl na ração de tilápias do Nilo, durante 45 dias, aumentou a capacidade antioxidante e reduziu a oxidação lipídica nos filés, sem alterar o desempenho dos peixes. No experimento II (condições a campo), foram avaliados três níveis de OEcl nas rações (0,70; 1,05 e 1,40 g.kg) fornecidas em três períodos antes do abate dos peixes (15; 45 e 60 dias). Os dados foram analisados em esquema fatorial (níveis x períodos) em contraste ao grupo controle sem inclusão do OEcl. A oxidação

lipídica foi determinada em filés armazenados em vitrine a 4 °C durante 14 dias. A interação entre níveis e período afetou a capacidade antioxidante (ensaios DPPH e FRAP) e a oxidação lipídica nos filés. A oxidação lipídica foi reduzida em até 43,3% em comparação ao grupo controle. A expressão gênica, textura, pH, cor e análise sensorial não foram afetadas pela interação. A capacidade antioxidante, oxidação lipídica, expressão gênica e textura dos filés diferiram do grupo controle. A inclusão de 1,05 g.kg⁻¹ de OEcl na ração por 15 dias, antes do abate, contribuiu para maior capacidade antioxidantes, redução da oxidação lipídica e expressão dos genes catalase e glutathione sintetase e maior firmeza dos filés, sem afetar o pH, cor e aceitação sensorial pelos consumidores.

Palavra-chave: Antioxidante natural, desempenho animal, expressão gênica, oxidação lipídica.

ABSTRACT

Two experiments were carried out to evaluate the inclusion of clove (cLEO) or cinnamon (ciEO) essential oils in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diets, Gift/Tilamax strain on animal performance and antioxidant capacity by the trials ORACFL (Oxygen Radical Capacity), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), FRAP (Ferric Reducing Ability Power) and ABTS ((2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), lipid oxidation by test of thiobarbituric acid reactive substances (TBARs), gene expression, texture, pH and color by means of instrumental measurements and sensorial analysis. In the first experiment (controlled conditions) cLEO and ciEO were evaluated with two inclusion levels (0.35 and 0.70 g.kg⁻¹ of feed) and control treatment without inclusion of essential oil. The fishes were fed for 45 days and evaluated the performance, antioxidant capacity and lipid oxidation. For lipid oxidation the fillets were stored in a showcase at 2°C and analyzed for 7 days. Fish performance (weight, final length, feed conversion and daily weight gain) were not affected by essential oils and inclusion levels. Fillets antioxidant capacity was higher ($p < 0.05$) in the treatment with 0.35 g.kg⁻¹ of cLEO by the L-ORAC_{FL}. The cLEO reduced lipid oxidation by up to 40.3%; while the ciEO presented pro-oxidant effect in comparison to the control group. The inclusion of 0.35 g.kg⁻¹ of cLEO in diet of Nile Tilapia for 45 days increased the antioxidant capacity and reduced lipid oxidation in the fillets without affecting the animal performance. In the second experiment three levels of cLEO were evaluated in the diets (0.70, 1.05 and 1.40 g.kg⁻¹) provided in three periods before slaughtered (15, 45 and 60 days). The data were analyzed in a factorial scheme (levels x periods) in contrast to a control group without inclusion of cLEO. Lipid oxidation was determined in fillets stored in a showcase at 4 °C for 14 days. The interaction among levels and period affected antioxidant capacity (DPPH and FRAP

assays) and lipid oxidation in the fillets. The lipid oxidation was reduced by up to 43.3% in comparison to the control group. Gene expression, texture, pH, color and sensory analysis were not affected by the interaction. The antioxidant capacity, lipid oxidation, gene expression and texture of the fillets differed from the control group. The inclusion of 1.05 g.kg⁻¹ of cLEO in the diet for 15 days before slaughter contributes to higher antioxidant capacity, decreases the lipid oxidation, gene expression of catalase and glutathione synthetase, increases firmness of fillets, without affecting the pH, color and sensorial acceptance of fillets by consumers.

Key words: Natural antioxidants, animal performance, lipid oxidation, gene expression.

I - INTRODUÇÃO

1. Panorama da aquicultura

A produção de organismos aquáticos no mercado somou em 2014 cerca de 167 milhões de toneladas (peixes, moluscos, crustáceos, entre outros), correspondendo a 93 milhões de toneladas da pesca e 74 milhões de toneladas da aquicultura (FAO, 2016). Os dois setores apresentaram cenário de crescimento, a aquicultura de 4,8% (FAO, 2016) e a pesca de 1,6% (FAO, 2017).

Segundo dados da FAO (2016), a China é o maior produtor (aquicultura) com 45,4 milhões de toneladas, seguido da Índia e Indonésia com 4,8 e 4,2 milhões de toneladas, respectivamente. No continente americano, o destaque é o Chile com 1,2 milhões de toneladas voltada para produção de salmão (*Salmo salar* L.) e o Brasil com 561,8 mil toneladas, especialmente a produção de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e espécies nativas (peixes redondos e surubins). As espécies de água doce mais produzidas no mundo são as carpas com 14,6 milhões de toneladas, principalmente nos países asiáticos, e as tilápias com 3,7 milhões de toneladas.

No Brasil, segundo dados do IBGE (2015), a produção de peixes é concentrada em espécies de água doce e correspondeu a 483,2 mil toneladas. Os maiores produtores são os estados de Rondônia e Paraná com produção estimada de 84,5 e 69,3 mil toneladas, respectivamente. A tilápia do Nilo e o tambaqui (*Colossoma macropomum*) foram as principais espécies cultivadas. A produção de tilápias do Nilo chegou a 219,33 mil toneladas que correspondeu a 45,4% de toda a produção aquícola do país. Os principais municípios produtores da espécie foram Jaguaribara no estado do Ceará (13,8 mil toneladas) em tanque rede no Açude Castanhão, seguido dos municípios de Nova Aurora (9,1 mil toneladas), Assis Chateaubriand (7 mil toneladas) e Toledo (5,80 mil

toneladas) no estado do Paraná com produção exclusiva em viveiro escavado de terra. Somente a tilapicultura, entre os anos de 2014 e 2015, apresentou crescimento de 9,7% (IBGE, 2015).

Dados estatísticos publicados no Anuário PeixeBR da Piscicultura 2016 pela Associação Brasileira da Piscicultura, indicam a produção de 640,5 mil toneladas de peixe (PEIXE BR, 2017). Segundo a entidade, tudo indica um crescimento sólido e exponencial, resultado da liberação de novas áreas (parque aquícolas), linhas de crédito específica para o setor e iniciativas de produtores independentes e integrados (cooperativas). O estado do Paraná, segundo a PEIXE BR, é o maior produtor com 93,6 mil toneladas com crescimento de 17% em relação ao ano de 2015, voltada principalmente para produção de tilápias do Nilo. Seguindo do estado de Rondônia com 74,7 mil toneladas e crescimento de 15%, com destaque para produção de tambaqui, pirarucu (*Arapaima gigas*), jatuarana (*Brycon* spp.) e pintado-da-amazônia (fêmea *Pseudoplatystoma punctifer* x macho *Leiarius marmoratus*). A tilápia do Nilo respondeu por aproximadamente 50% da produção nacional de peixes e a 74% no estado do Paraná.

O crescimento da tilapicultura se dá por inúmeros fatores, entre eles o aumento na produtividade proporcionado pelos programas de melhoramento genético para taxa de crescimento, que é medida por meio do ganho em peso diário. A seleção para essa característica, tem proporcionado ganhos significativos no desempenho dos animais a cada geração, com ganho genético próximo a 4% (Oliveira et al., 2015, 2016). Recentemente, características de rendimento de filé e qualidade da carne (deposição de lipídios total) foram avaliadas (Garcia et al., 2017).

2. Qualidade dos filés de tilápias do Nilo

O filé fresco ou congelado de tilápias do Nilo é o principal produto comercializado. Este apresenta ótimas características sensoriais e de aceitabilidade pelos consumidores, perfil de proteínas de alto valor biológico com balanço amino-ácídico e fração lipídica com ácidos graxos poli-insaturados em especial da família ômega 3. Entre os poli-insaturados, o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) responsável por atuar nos processos anti-inflamatórios e o ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) que desempenha funções neuroprotetoras (Rapoport et al., 2011). Também estão associados a redução no risco de inúmeras doenças em humanos, principalmente cardíacas, sendo

altamente indicado o consumo de alimentos com esses ácidos graxos reduzindo os riscos e proporcionando melhor qualidade de vida (Visentainer et al., 2005).

Estudos recentes têm demonstrado que a modulação da dieta permite melhorar o perfil de ácidos graxos nos filés de tilápias do Nilo, em especial para deposição na musculatura de ácidos graxos ômega 3, transformando os filés em um produto funcional com propriedades bioativas (Carbonera et al., 2014a; Montanher et al., 2016; Sarker et al., 2016; Tocher, 2015).

A porcentagem de ácidos graxos poli-insaturados em filés de tilápia do Nilo apresenta variação de 12,6 a 44,7% do lipídio total (Carbonera et al., 2014a; Herath et al., 2016; Justi et al., 2003; Santos et al., 2014; Sarker et al., 2016; Teoh and Ng, 2016) dependendo da idade e peso dos animais, como da composição de ácidos graxos da ração fornecida. O perfil de ácidos graxos nos filés de tilápias do Nilo reflete a composição de ácidos graxos das rações, permitindo modular seu perfil pela alimentação (Carbonera et al., 2014a; Montanher et al., 2016; Sarker et al., 2016; Tocher, 2015).

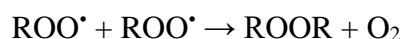
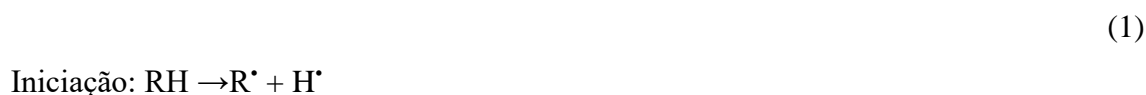
No entanto, a presença de insaturações nos ácidos graxos confere baixa estabilidade, conseqüentemente maior oxidação lipídica (Bernardi et al., 2016; Kumar et al., 2015; Vieira et al., 2017) com alterações, mas características sensoriais e nutricionais (Bernardi et al., 2016). Em casos mais avançados, os produtos primários e secundários da oxidação lipídica, como os peróxidos e malonaldeídos (MDA), apresentam alta toxicidade e quando ingeridos podem ocasionar risco à saúde humana (Vieira et al., 2017).

3. Oxidação lipídica

O processo de oxidação lipídica em alimentos leva a alterações indesejáveis e irreversíveis (Vieira et al., 2017). Retardar ou inibir a oxidação é fundamental para manter a qualidade e aumentar a vida de prateleira dos alimentos. Entre os métodos descritos, a adição de substâncias com ação antioxidantes vem se demonstrando eficiente, inibindo ou retardando a oxidação lipídica, aumentando a vida de prateleira dos alimentos sem provocar alterações na qualidade nutricionais e sensoriais (Falowo et al., 2014; Shahidi and Ambigaipalan, 2015). As alterações nos lipídios ocorrem principalmente após o abate dos animais e no período de armazenamento dos produtos (Falowo et al., 2014). Entretanto, a oxidação lipídica também é observada antes e

durante o abate dos animais (Kumar et al., 2015). Em peixes como salmão e tilápias do Nilo em condições de estresse pré-abate apresentaram características indesejáveis como menor firmeza dos filés em salmão (Bahuaud et al., 2010) e menor capacidade de retenção de água em tilápias do Nilo (Goes et al., 2015).

As reações de oxidação lipídica são provocadas pelas espécies reativas de oxigênio (EROs), como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical peróxido (ROO^{\cdot}), radical hidroxila (OH^{\cdot}), oxigênio singlete (1O_2), entre outros fatores pró-oxidantes. As reações são de natureza radicalar envolvendo oxigênio e substrato oxidável, neste caso os ácidos graxos, e ocorrem em três etapas, sendo estas: iniciação, propagação e terminação (Frankel, 1980):



Em que; RH - Substrato, R^{\cdot} - radical livre, O_2 - oxigênio atmosférico; ROO^{\cdot} - radical peróxido; RR - produto estável.

Na fase de iniciação (1), ocorre formação dos radicais livres pela remoção de hidrogênio do substrato oxidável, os ácidos graxos. Essa reação ocorre na presença de iniciadores, como a luz, calor, metal de transição e EROs. Quando formado e não estabilizado, os radicais livres agem com outras moléculas do substrato. Na fase de propagação (2) os radicais livres que são prontamente susceptíveis ao ataque do oxigênio, são convertidos em produtos primários da oxidação, como os peróxidos (ROO^{\cdot}) e hidroperóxidos ($ROOH$), que atuam como propagadores da reação, resultando em um processo autocatalítico.

Os produtos primários da oxidação são caracterizados como compostos com baixa estabilidade (lábeis) dando origem aos produtos secundários da oxidação, como hidrocarbonetos, aldeídos e cetonas. Esses produtos são os principais responsáveis por

alterar as características sensoriais e nutricionais, reduzindo a vida de prateleira e aceitabilidade sensorial dos produtos oxidados. Por fim, na fase de terminação (3) ocorre a formação de produtos estáveis pela combinação dos radicais ou na presença de uma molécula antioxidante, interrompendo a reação de oxidação.

Embora inúmeros estudos indiquem os efeitos tóxicos dos produtos primários e secundários da oxidação lipídica, como o MDA (malonaldeído), poucas evidências indicam para uma ação direta que leve ao surgimento de doenças crônicas, mas ao aumento da susceptibilidade do corpo em condições pré-existentes, associada a redução do poder de inibição dos radicais livres pelos sistemas de defesa antioxidante (enzimático e dietético) que envolve dezenas de mecanismos de ação, esse sistema de defesa é extremamente eficaz em indivíduos saudáveis (Vieira et al., 2017).

Neste sentido, a determinação dos produtos da oxidação lipídica é importante para assegurar a qualidade dos filés ou avaliar a inclusão de substâncias com atividade antioxidante via alimentação dos animais ou durante o processamento. Entre os produtos estão os hidrocarbonetos, aldeídos e cetonas determinados por diferentes ensaios; cada um apresentando vantagens e limitações.

3.1. Determinação da oxidação lipídica

O MDA é um dos produtos secundários da oxidação lipídica que apresenta características mutagênicas e concebe risco à saúde humana, quando presente em alimentos e consumido (Esterbauer, 1993). Desta forma, sua concentração tem sido utilizada para estimar a oxidação lipídica em produtos cárneos (Vyncke, 1970).

A formação do MDA ocorre principalmente a partir do ácido linolênico (18:3 n-3) ou ácidos graxos que apresentam duas ou mais insaturações (Fennema et al., 2010; Vieira et al., 2017), não observando formação de MDA em ácidos graxos como o oleico (18:1) que apresenta insaturação (Barriuso et al., 2013).

A partir do ácido araquidônico (20:4 n-6), por exemplo, a formação do MDA inicia-se com a retirada do átomo de hidrogênio do carbono 14 (carbono metileno) seguido da reorganização da molécula e a formação do radical no carbono 15 e a insaturação entre os carbonos 16 e 17. Em seguida, o radical na presença de oxigênio atmosférico (O_2) forma o radical peróxido (ROO^{\cdot}), um produto primário da oxidação lipídica e altamente reativo, transformando-se em endoperóxido entre os carbonos 13 e 15, seguido da hidrólise do ácido graxo entre os carbonos 12 e 16 dando origem a

molécula de MDA, que apresenta três carbonos com dois grupos carbonila na posição 1 e 3 (Vieira et al., 2017).

Entre os ensaios descritos na literatura para determinar a estabilidade lipídica, o TBARs é o mais utilizado e aceito (Barriuso et al., 2013; Osawa et al., 2005). O ensaio baseia-se na reação do MDA com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) em condições controladas formando o composto TBA:MDA (2:1). Esse composto é cromogênio permitindo a leitura em espectrofotômetro em absorvância de 532nm (Vyncke, 1970). O grupo cromóforo ocorre pela reação do MDA aos grupos metileno de TBA em pH e temperatura adequada, sendo realizada por procedimentos que envolvem aquecimento direto da amostra, destilação da amostra, extração da fração lipídica com solventes orgânicos ou extração em meio ácido com TCA (ácido tricloroacético), seguido da reação com TBA em temperatura de 90 a 100° C (Barriuso et al., 2013).

No entanto, o ensaio apresenta diferenças entre laboratórios quanto as condições de reação, como o tempo de aquecimento, concentração do TCA, utilização de antioxidante durante a reação e padrão analítico utilizado. Essas variáveis podem levar a leituras errôneas (Barriuso et al., 2013) somado as interações do TBA com outros compostos, como aldeídos, carboidratos, ácidos nucleicos, entre outros (Salih et al., 1987). Apesar das variáveis, o ensaio de TBARs é utilizado pela simplicidade em relação a outros ensaios que determinam a oxidação lipídica (Barriuso et al., 2013).

Em estudos com adição de antioxidantes no alimento ou via alimentação dos animais, o emprego do ensaio de TBARs é importante para avaliar estabilidade lipídica e determinar o efeito antioxidante dos compostos bioativos adicionados.

4. Antioxidantes

Os antioxidantes são definidos como substâncias ou moléculas capazes de retardar ou inibir a oxidação de outras moléculas como lipídios e proteínas por inúmeros mecanismos. Esse controle envolve dois mecanismos pela transferência de elétrons e/ou átomo de hidrogênio estabilizando os radicais livres.

O primeiro mecanismo baseia-se na transferência de um hidrogênio do antioxidante para o radical (4). Como a transferência de hidrogênio é mais rápida do que o ataque de moléculas pró-oxidantes, a reação de oxidação do substrato é inibida e o antioxidante consumido formando um radical estável (AO^{*}). O segundo mecanismo,

muito semelhante ao primeiro, mas com fatores envolvidos distintos, baseia-se na doação de elétrons para o radical (5), seguido da transferência de próton (6).

Os antioxidantes também podem atuar na fase de iniciação da auto-oxidação pela complexação de metais, sequestro de oxigênio, absorção da radiação UV e neutralização do oxigênio singlete (Amorati et al., 2013; Boroski et al., 2015; Foti, 2007; Shahidi and Zhong, 2010).



Em que; ROO^\bullet - radical peróxido; AOH - antioxidante; ROOH - radical hidroperóxido; AO^\bullet - radical estável/

Portanto, os antioxidantes podem ser classificados em dois grupos conforme os mecanismos envolvidos no controle da oxidação e de fatores pró-oxidantes, sendo: antioxidantes primários que atuam interrompendo a reação radicalar pela transferência de elétrons e/ou átomo de hidrogênio aos radicais livres; e antioxidantes secundários que apresentam pouca ou nenhuma atividade antioxidante, mas potencializam a atividade de outras moléculas pela complexação, sequestro, absorção, neutralização e decomposição de agentes pró-oxidantes como metais e oxigênio. Esses mecanismos ocorrem tanto em matrizes alimentares como em sistemas biológicos (Boroski et al., 2015).

Os antioxidantes também são classificados em relação a sua origem, em antioxidantes sintéticos ou naturais. Entre os antioxidantes sintéticos, os fenólicos butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxito-lueno (BHT), terc-butilhidroquinona (TBHQ) e galato de propila (PG) são os principais e amplamente utilizados pela indústria alimentícia (Takemoto et al., 2009). No grupo dos antioxidantes naturais, é descrito uma ampla variedade substâncias que corresponde a enzimas, vitaminas, carotenoides e

compostos fenólicos que compreendem o principal e mais abundante grupo entre os antioxidantes naturais, dividido em ácidos fenólicos e flavonoides (Boroski et al., 2015).

Segundo Kiokias et al. (2008), os antioxidantes devem ser eficazes em baixas concentrações, não tóxicos, estáveis durante o processamento do alimento, sem odor, cor e gosto, fácil incorporação, boa solubilidade e valor acessível. Os antioxidantes sintéticos apresentam algumas características mencionadas, no entanto, são associados a danos ao organismo, principalmente carcinogênico e a sua substituição por antioxidantes naturais com atividade equivalente é recomendada e aceita pelos consumidores cientes sobre os malefícios dos antioxidantes sintéticos perante os benefícios dos antioxidantes naturais (Amorati et al., 2013; Bakkali et al., 2008; Carocho et al., 2015; Gülçin et al., 2012).

As pesquisas com os antioxidantes naturais são recentes, iniciaram-se no final do século 20 e intensificaram nos últimos anos, em especial na identificação dos compostos bioativos e seus efeitos em sistemas biológicos e matrizes alimentares, avaliando principalmente a transferência de compostos bioativos e sua atividade antioxidante pelos ensaios de capacidade antioxidante (Boroski et al., 2015). O grande número de substâncias com atividade antioxidante e mecanismos de ação exigem múltiplos ensaios de capacidade antioxidante, reunindo os diferentes mecanismos de inibição e redução dos radicais livres e fatores pró-oxidantes.

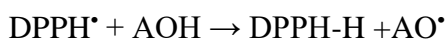
4.1. Determinação da capacidade antioxidante

Para determinar a capacidade antioxidante é indicada a aplicação de múltiplos ensaios com diferentes mecanismos de reação. Entre os ensaios mais utilizados o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) e FRAP (Ferric Reducing Ability Power) são baseados na transferência de elétrons dos antioxidantes para estabilizar o elétron desemparelhado (N^{\bullet}) do radical DPPH $^{\bullet}$ (7), estabilizar o cátion radicalar do radical ABTS $^{\bullet+}$ (8) e promover a redução do complexo ferroso $[Fe^{3+}(TPTZ)_2]$ a $[Fe^{2+}(TPTZ)_2]^{2+}$ (9). O radical DPPH $^{\bullet}$ é obtido com a diluição do composto sólido (DPPH) em solução de metanol ou etanol, e o radical ABTS $^{\bullet+}$ pela reação química, enzimática ou eletroquímica de oxidação do composto ABTS, usualmente, utiliza-se a reação química com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$).

Nos ensaios DPPH e ABTS, a capacidade antioxidante é observada pela redução na absorbância em espectrofotômetro ($\lambda = 517$ e 734 nm, respectivamente) devido a

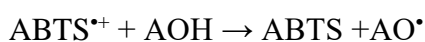
descoloração das soluções com os radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, pela reação de oxirredução do radical DPPH[•] em DPPH-H e do radical ABTS^{•+} a sua forma neutra (ABTS). Enquanto no ensaio FRAP a capacidade antioxidante é observada pelo aumento da absorbância ($\lambda = 593 \text{ nm}$) pela maior concentração do complexo ferroso $[\text{Fe}^{2+}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$.

(7)



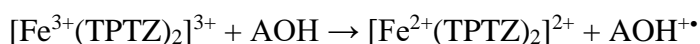
Coloração púrpura → amarela (menor absorbância)

(8)



Coloração verde escura → verde claro (menor absorbância)

(9)



Poder de redução → coloração azul (maior absorbância)

Em que; DPPH[•] - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil radical; ABTS^{•+} - ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) radical; TPTZ - 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina; AOH – Antioxidante; AO[•] - radical estável.

Outro ensaio empregado para determinar a capacidade antioxidante é o ORAC_{FL} (Oxygen Radical Absorbance Capacity). Neste ensaio, ocorre a transferência de átomo de hidrogênio empregando radical peroxila (ROO[•]) e substrato oxidável, a fluoresceína ou a β -ciclodextrina. Na presença de antioxidante na amostra, a fluoresceína é protegida da oxidação provocada pelos radicais peroxila pela doação de um átomo de hidrogênio do antioxidante, neutralizando o ROO[•] evitando o decréscimo de fluorescência da fluoresceína monitorada em espectrofluorímetro ($\lambda_{\text{excitação}} = 485 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 515 \text{ nm}$). O ensaio ORAC_{FL}, em comparação aos demais, utiliza um pró-oxidante, radical peroxila, encontrado em sistemas biológicos e a reação acontece em temperatura semelhante ao do corpo humano, motivo pelo qual o ensaio é indicado para determinação da capacidade antioxidante em matrizes alimentares equivalendo a condições encontradas em sistemas biológicos (Boroski et al., 2015). O ensaio é dividido em fração hidrofílica (H-ORAC_{FL}) e lipofílica (L-ORAC_{FL}) e a soma das frações em Capacidade Antioxidante Total (CAT).

Os radicais também apresentam diferença de afinidade, importante pela complexidade de compostos antioxidantes com características hidrofílicas e lipofílicas. Os ensaios DPPH, FRAP, ABTS e H-ORAC_{FL} apresentam afinidade em sistemas hidrofílicos, enquanto os ensaios ABTS e L-ORAC_{FL} em sistemas lipofílicos. ABTS e ORAC_{FL} apresentam afinidade com antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos; no entanto, com mecanismo de reação distintos.

A aplicação de dois ou mais ensaios com diferentes mecanismos de reação e afinidade é fundamental para determinar a capacidade antioxidante pela complexidade e número de compostos antioxidantes presentes em matrizes alimentares (Biondo et al., 2017; Boroski et al., 2015; Carbonera et al., 2014b; Montanher et al., 2016). No entanto, alguns ensaios, como o ABTS e DPPH são criticados por utilizar radicais não encontrados em sistemas biológicos, mas são amplamente aplicados por reproduzir resultados confiáveis, rápidos e de alta sensibilidade (Boroski et al., 2015).

A utilização de um mesmo padrão analítico para diferentes técnicas também é indicado. O Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) é um dos padrões mais recomendados para apresentação dos resultados, permitindo converter a capacidade de inibição ou redução de cada amostra para capacidade antioxidante, facilitando a comparação dos resultados entre laboratórios (Boroski et al., 2015). Os resultados são expressos em μmol equivalentes a Trolox (TE) (Serpen et al., 2012).

Para o ensaio FRAP, os resultados também são expressos em $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$ de amostra. Como o ensaio indica a capacidade redutora do complexo ferroso $[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ a $[\text{Fe}^{2+}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$, seu aumento observado em espectrofotômetro indica elevada capacidade redutora do antioxidante pela capacidade de doar elétrons, conseqüentemente, elevada capacidade antioxidante. Ensaios que indicam o poder de redução pelas substâncias doadoras de elétrons são importantes por indicar a capacidade redox em reagir e tornar as EROs mais estáveis interrompendo as reações radicalares (Benzie and Strain, 1996).

A preparação das amostras para aplicação dos ensaios é uma etapa importante e deve receber ampla atenção por influenciar os resultados. De modo geral, as amostras são trituradas para aumentar a área de contato, peneiradas para obter partículas mais homogêneas e liofilizadas no caso de amostras úmidas, seguido da extração com solventes orgânicos ou análise direta da capacidade antioxidante (Boroski et al., 2015).

O procedimento QUENCHER (*QU*ick, *E*asy, *N*ew, *CHE*ap and *R*eproducible) é um método para determinar a capacidade antioxidante diretamente nas amostras. O

procedimento agrega diferentes metodologias dispensando as etapas de extração dos compostos antioxidantes das amostras (Gökmen et al., 2009). As etapas de extração apresentam importante fonte de variação nos resultados entre laboratórios pelas diferenças nos solventes, temperatura de reação, agitação, entre outros (Gökmen et al., 2009; Serpen et al., 2012, 2008). Pelo procedimento QUENCHER as partes solúveis e insolúveis das amostras reagem simultaneamente com os radicais empregados determinando a capacidade antioxidante em uma única operação (Gökmen et al., 2009). O tamanho das partículas das amostras é fundamental nesse procedimento para evitar possíveis interferências pelo contato direto com os radicais, sendo indicado para amostras com partículas entre 0,1 a 0,3 mm (Serpen et al., 2008).

5. Óleos essenciais de cravo e canela

Os óleos essenciais são misturas complexas extraídas de plantas por métodos como destilação a vapor, prensagem a frio e extração com solventes, sendo os métodos por destilação o mais utilizado pela indústria (Masango, 2005; Nakatsu et al., 2000). São obtidos de diferentes partes das plantas como folhas, flores, caules, raízes e tubérculos, apresentando grande variedade de compostos químicos, como terpenoides e fenilpropanoides (Prakash et al., 2015; Raut and Karuppayil, 2014).

Entre os compostos encontrados nos óleos essenciais, a presença do grupo hidroxila e anel aromático determina sua propriedade antioxidante a exemplo dos compostos fenólicos (Amorati et al., 2013; Carochi et al., 2015; Nakatsu et al., 2000). Os compostos fenólicos são metabólitos secundários das plantas e a quantidade está relacionada ao momento da colheita, a parte da planta obtida, o método de extração empregado, entre outros (Prakash et al., 2015).

Biondo et al. (2017) determinaram a capacidade antioxidante de 18 óleos essenciais de especiarias, ervas e *citrus*. Entre os óleos essenciais analisados pelos múltiplos ensaios de capacidade antioxidante empregando diferentes mecanismos de reação, os autores destacam o óleo essencial de cravo obtido da planta *Eugenia caryophyllus*, originária das Ilhas Molucas (Indonésia) e o óleo essencial de canela obtida da planta *Cinnamomum zeylanicum*, nativa do Sri Lanka, ambos os óleos essenciais extraídos das folhas por destilação a vapor. A capacidade antioxidante equivalente a trolox ($\mu\text{mol ET.g}^{-1}$) encontrada por Biondo et al. (2017) foi de 1753,36 (DPPH), 1546,32 (ABTS), 779,06 (ORAC_{FL}) e 2688,27 (FRAP) para o óleo essencial

de cravo e 1514,56 (DPPH), 1205,40 (ABTS), 720,37 (ORAC_{FL}) e 2399,72 (FRAP) para o óleo essencial de canela.

Capacidade antioxidante elevada também foi constatada por Jirovetz et al. (2006) e Tomaino et al. (2005), por meio do ensaio DPPH para os mesmos óleos essenciais. Para o óleo essencial de cravo é descrito atividade inibitória superior a do antioxidante sintético BHT, amplamente utilizado pela indústria alimentícia (Jirovetz et al., 2006). A verificação de atividade antioxidante dos óleos essenciais de cravo e canela permite sua aplicação na produção animal em substituição aos antioxidantes sintéticos (Biondo et al., 2017; Rivaroli et al., 2016).

O eugenol (2-Methoxy-4-(prop-2-en-1-yl)phenol), um fenilpropanoide é o principal composto bioativo com propriedades antioxidantes nos óleos essenciais de cravo extraídos de plantas como a *E. caryophyllus* (84,5%) (Biondo et al., 2017), *E. caryophyllata* (82,6 a 88,6%) (Chaieb et al., 2007; Tomaino et al., 2005) e *Caryophyllus aromaticus* L. (83,7%) (Scherer et al., 2009). O eugenol também é encontrado como principal composto bioativo em alguns óleos essenciais de canela extraído da folha de *C. zeylanicum* (78,8 a 79,8%) (Biondo et al., 2017; Wang et al., 2009) e *C. pauciflorum* (54,74%) (Wang et al., 2009).

Em outras espécies do gênero *Cinnamomum* são descritos outros compostos. O cinamaldeído ((2E)-3-Phenylprop-2-enal) ou *trans*-cinamaldeído é encontrado como principal composto bioativo com propriedades antifúngicas em óleos essenciais extraídos da casca de *C. loureirii* (82,0%), *C. verum* (74,5%) e *C. cassia* (71,7%) (Li et al., 2013) e *C. zeylanicum* (66,28%) (Van Haute et al., 2016). Também foi encontrado em óleo essencial obtido das folhas de *C. burmanni* (60,2%) (Wang et al., 2009).

Entre os compostos majoritários, o eugenol apresenta em sua estrutura molecular um grupo funcional hidroxila (OH⁻) e anel aromático que caracteriza uma molécula com atividade antioxidante pela capacidade de transferência de elétrons e/ou átomo de hidrogênio estabilizando os radicais livres. Tomaino et al. (2005) analisando a capacidade de eliminação do radical DPPH[•] pelos óleos essenciais de cravo (*E. caryophyllata*) e canela (*C. zeylanicum*) observaram valores semelhantes ao encontrado no controle com eugenol purificado ($\geq 99\%$). Os autores relacionam a atividade antioxidante dos óleos essenciais à presença de eugenol entre os compostos majoritários. O eugenol purificado também apresenta alta atividade antimicrobiana (Yadav et al., 2015).

Alguns óleos essenciais de canela, obtidos de outras espécies do gênero *Cinnamomum*, apresentam o cinamaldeído como composto majoritário, apresentando alta atividade antimicrobiana pela capacidade de interagir com a parede celular de microrganismos alterando sua estrutura e danificando a camada fosfolipídica levando a maior permeabilidade com perda de conteúdo celular e subsequente morte das células microbianas (Burt, 2004; Jayasena and Jo, 2013; Majeed et al., 2016; Solórzano-Santos and Miranda-Navales, 2012).

Pela complexidade de compostos, algumas indústrias buscam moléculas específicas para obter esses efeitos, isolando os compostos bioativos responsáveis pela atividade antioxidante ou antimicrobiana, excluindo possíveis compostos com atividade indesejável (Carocho et al., 2015) ou citotóxica em sistemas biológicos aumentando a concentração de radicais livres e desencadeando um estado de estresse oxidativo (Bakkali et al., 2008).

6. Utilização dos óleos essenciais na aquicultura

A caracterização dos óleos essenciais com a identificação dos compostos bioativos tem permitido sua aplicação em diferentes áreas (Carocho et al., 2015; Prakash et al., 2015; Raut and Karuppaiyl, 2014) incluindo na aquicultura, seja via alimentação dos animais como promotor de crescimento, imunoestimulante, antioxidante e antibacteriano (Acar et al., 2015; Baba et al., 2016; Diler et al., 2016; Hernández et al., 2015, 2014) ou durante o processamento do pescado com aplicação direta no filé, com a finalidade de inibir a oxidação lipídica, melhorar a qualidade microbiológica e estender a vida de prateleira (Cai et al., 2015; Raeisi et al., 2015; Van Haute et al., 2016).

Hernández et al. (2015) avaliaram o óleo essencial de tomilho (*Thymus zygis*) sobre a qualidade da carne e vida de prateleira de douradas (*Sparus aurata*) alimentadas com rações contendo níveis de 0,5 a 2,0 g.kg⁻¹ de óleo essencial durante 84 dias. Segundo os autores, a inclusão de 1,0 g.kg⁻¹ de óleo essencial tomilho na ração melhorou os parâmetros avaliados, principalmente microbiológicos. A atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho está relacionada especialmente aos compostos timol e carvacrol, principais compostos do óleo essencial de tomilho, que são altamente hidrofóbicos e se acumulam na membrana celular das bactérias levando a perda de componentes intracelulares e morte da célula.

Em dietas de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) com inclusão de até 3,0 mL.kg⁻¹ de óleo essencial de orégano (*Origanum onites* L.) fornecidas durante 90 dias, Diler et al. (2016) encontraram melhor desempenho dos animais, conversão alimentar e atividade da lisozima plasmática que contribui para a proteção contra patógenos por promover fagocitose, e quando os animais foram desafiados com *Lactococcus garvieae* a mortalidade foi reduzida nos tratamentos com óleo essencial. Esse patógeno causa lesões no endotélio vascular levando a hemorragia com alto índice de mortalidade.

Para tilápias Mozambique (*O. mossambicus*) os pesquisadores (Baba et al., 2016) incluíram o óleo essencial de limão (*Citrus limon*) obtido da casca em até 1,0 g.kg⁻¹ na ração, durante 60 dias e encontraram melhora nos parâmetros bioquímicos no sangue e resposta imune dos animais. Quando submetidos a desafio com *Edwardsiella tarde*, que provoca lesões hemorrágicas na pele e brânquias com nódulos em órgãos como fígado e baço, os animais com ração suplementada com óleo essencial de limão apresentaram menor mortalidade.

Resultado semelhante foi obtido com o óleo essencial extraído da casca da laranja (*Citrus sinensis*) para mesma espécie em até 0,5 g.kg⁻¹ de óleo essencial na ração (Acar et al., 2015). Os pesquisadores encontraram melhora nos parâmetros de desempenho dos animais, resposta imune, variáveis hematológicas e bioquímicas no sangue e maior sobrevivência dos animais submetidos a infecção com *Streptococcus iniae*. Patógenos encontrados em peixes de água doce e salgados, sendo considerado um dos principais patógenos de importância econômica pela alta mortalidade.

Brum et al. (2017) avaliaram os óleos essenciais de manjeriço (*Ocimum gratissimum*) e gengibre (*Zingiber officinale*) em até 1,5 g.kg⁻¹ na ração de juvenis de tilápia do Nilo durante 55 dias e encontraram maior peso final e melhor conversão alimentar em animais que receberam a ração com 0,5 g.kg⁻¹ de óleo essencial de manjeriço e maior sobrevivência quando submetidos a desafio com *Streptococcus agalactiae* para ração com 0,5 g.kg⁻¹ de óleo essencial de gengibre. Segundo os pesquisadores, a suplementação dietética com óleos essenciais de manjeriço e gengibre melhora o crescimento, resposta imune e resistência a doenças, sendo uma alternativa aos produtos sintéticos para redução da mortalidade ocasionada por *S. agalactiae* e demais doenças.

O efeito dos óleos essenciais sobre o desempenho dos animais (Acar et al., 2015; Brum et al., 2017; Diler et al., 2016) é relacionada aos compostos bioativos que induzem a secreção de enzimas digestíveis contribuindo para maior eficiência alimentar

(Radhakrishnan et al., 2015) e ao efeito sobre o sistema imune dos animais durante o cultivo melhorando a resistência a patógenos (Acar et al., 2015; Baba et al., 2016) pela atividade da lisozima plasmática que promove maior fagocitose (Diler et al., 2016).

No entanto, o efeito antioxidante no filé após o abate dos animais suplementados com óleos essenciais sobre qualidade, capacidade antioxidante, oxidação lipídica e aceitabilidade dos filés é desconhecida até no momento, exceto, pelos efeitos antioxidantes e antimicrobianos em filés de peixes quando adicionado o óleo essencial em biofilmes e aplicados diretamente nos filés após o abate.

Raeisi et al. (2015) encontraram maior capacidade antioxidante com redução da oxidação lipídica e microrganismos em filés de truta arco-íris com revestimento comestível à base de carboximetilcelulose mais óleo essencial de *Zataria multiflora* Boiss. Os principais compostos bioativos do óleo essencial de *Z. multiflora* Boiss são os monoterpenos carvacrol (41,2%) e timol (27,4%), ambos com grupo hidroxila na molécula que confere sua atividade antioxidante. No entanto, a presença de compostos aromáticos atribuem forte odor quando aplicado diretamente no filé provocando mudanças acentuadas nas características sensoriais com baixa aceitação do produto (Raeisi et al., 2015; Van Haute et al., 2016).

Considerando os compostos e propriedades bioativas dos óleos essenciais e os resultados de pesquisas encontradas na literatura até o momento, a incorporação dos óleos essenciais na produção animal tende a trazer ampla contribuição, principalmente em substituição aos aditivos sintéticos.

7. Análise sensorial

Nos últimos anos, a mudança no hábito alimentar da população é observada pela preferência por produtos de maior conveniência e praticidade, mas que preservem as características nutricionais e sensoriais (Oetterer et al., 2014).

A análise sensorial é o método mais confiável para determinar a qualidade do pescado, sendo aplicada pela indústria para avaliar a matéria-prima e o produto elaborado (Sant'Ana and Freitas, 2011). Variáveis como idade, sexo, renda, origem cultural e hábito de consumo dos avaliadores são consideradas no momento da aplicação da análise por interferirem na aceitabilidade sensorial (Oetterer et al., 2014; Samant et al., 2015). Características do animal também determinam a aceitabilidade sensorial. O peso ao abate de tilápias do Nilo como a porção do filé, dorso ou ventre,

apresentam variação quanto à composição química e características físicas que interferem na aceitabilidade sensorial (Kayan et al., 2015).

Os principais atributos avaliados são sabor, textura e aroma (Behrens et al., 2010). Por apresentar rápida deterioração de origem fisiológica, química e microbiológica, essas características são rapidamente alteradas no pescado e facilmente observadas pelos avaliadores (Sant'Ana and Freitas, 2011). A adição de produtos químicos e naturais (óleos essenciais e extratos) com o objetivo de reduzir essas alterações pode melhorar aceitabilidade, entretanto, esses aditivos também podem alterar os atributos sensoriais (Fennema et al., 2010; Sant'Ana and Freitas, 2011).

Segundo Vital et al. (2016), o uso dos óleos essenciais em produtos cárneos deve considerar a aceitabilidade sensorial do produto final pelos consumidores. Por apresentar compostos aromáticos em sua complexa composição (Amorati et al., 2013), os óleos essenciais podem alterar as características sensoriais do pescado e não agradar o paladar dos consumidores (Raeisi et al., 2015; Van Haute et al., 2016). Além disso, a presença de compostos aromáticos pode mascarar a oxidação lipídica (produtos secundários, como aldeídos e cetonas) induzindo o consumidor a uma avaliação errônea quanto ao frescor e qualidade nutricional do alimento (Vieira et al., 2017).

8 - Referências bibliográficas

- Acar, Ü., Kesbiç, O.S., Yılmaz, S., Gültepe, N., Türker, A., 2015. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. *Aquaculture* 437, 282–286. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.12.015
- Amorati, R., Foti, M.C., Valgimigli, L., 2013. Antioxidant activity of essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 61, 10835–10847. doi:10.1021/jf403496k
- Baba, E., Acar, Ü., Öntaş, C., Kesbiç, O.S., Yılmaz, S., 2016. Evaluation of Citrus limon peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture* 465, 13–18. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.08.023
- Bahuaud, D., Mørkøre, T., Østbye, T.-K., Veiseth-Kent, E., Thomassen, M.S., Ofstad, R., 2010. Muscle structure responses and lysosomal cathepsins B and L in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) pre- and post-rigor filets exposed to short and

- long-term crowding stress. *Food Chem.* 118, 602–615. doi:10.1016/j.foodchem.2009.05.028
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
- Barriuso, B., Astiasarán, I., Ansorena, D., 2013. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. *Eur. Food Res. Technol.* 236, 1–15. doi:10.1007/s00217-012-1866-9
- Behrens, J.H., Barcellos, M.N., Frewer, L.J., Nunes, T.P., Franco, B.D.G.M., Destro, M.T., Landgraf, M., 2010. Consumer purchase habits and views on food safety: A Brazilian study. *Food Control* 21, 963–969. doi:10.1016/j.foodcont.2009.07.018
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76. doi:10.1006/abio.1996.0292
- Bernardi, D.M., Bertol, T.M., Pflanzler, S.B., Sgarbieri, V.C., Pollonio, M.A.R., 2016. ω -3 in meat products: benefits and effects on lipid oxidative stability. *J. Sci. Food Agric.* 96, 2620–2634. doi:10.1002/jsfa.7559
- Biondo, P., Carbonera, F., Zawadzki, F., Chiavelli, L., Pilau, E., Prado, I., Visentainer, J., 2017. Antioxidant capacity and identification of bioactive compounds by GC-MS of essential oils from spices, herbs and citrus. *Curr. Bioact. Compd.* 13, 137–143. doi:10.2174/1573407212666160614080846
- Boroski, M., Visentainer, J.V., Cottica, S.M., Morais, D.R., 2015. Antioxidantes: princípios e métodos analíticos. Curitiba.
- Brum, A., Pereira, S.A., Owatari, M.S., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Mouriño, J.L.P., Martins, M.L., 2017. Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture* 468, 235–243. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.10.020
- Burt, S., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- Cai, L., Cao, A., Li, Y., Song, Z., Leng, L., Li, J., 2015. The effects of essential oil treatment on the biogenic amines inhibition and quality preservation of red drum (*Sciaenops ocellatus*) filets. *Food Control* 56, 1–8. doi:10.1016/j.foodcont.2015.03.009

- Carbonera, F., Bonafe, E.G., Martin, C.A., Montanher, P.F., Ribeiro, R.P., Figueiredo, L.C., Almeida, V.C., Visentainer, J.V., 2014a. Effect of dietary replacement of sunflower oil with perilla oil on the absolute fatty acid composition in Nile tilapia (GIFT). *Food Chem.* 148, 230–234. doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.038
- Carbonera, F., Montanher, P.F., Palombini, S. v., Maruyama, S.A., Claus, T., Santos, H.M.C., Sargi, S.C., Matsushita, M., Visentainer, J.V., 2014b. Antioxidant capacity in tilapia fillets enriched with extract of acerola fruit residue. *J. Braz. Chem. Soc.* 25, 1237–1245. doi:10.5935/0103-5053.20140101
- Carocho, M., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R., 2015. Natural food additives: Quo vadis? *Trends Food Sci. Technol.* 45, 284–295. doi:10.1016/j.tifs.2015.06.007
- Chaieb, K., Zmantar, T., Ksouri, R., Hajlaoui, H., Mahdouani, K., Abdelly, C., Bakhrouf, A., 2007. Antioxidant properties of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* and its antifungal activity against a large number of clinical *Candida* species. *Mycoses* 50, 403–406. doi:10.1111/j.1439-0507.2007.01391.x
- Diler, O., Gormez, O., Diler, I., Metin, S., 2016. Effect of oregano (*Origanum onites* L.) essential oil on growth, lysozyme and antioxidant activity and resistance against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac. Nutr.* 1–8. doi:10.1111/anu.12451
- Esterbauer, H., 1993. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am. J. Clin. Nutr.* 57, 779S–786.
- Falowo, A.B., Fayemi, P.O., Muchenje, V., 2014. Natural antioxidants against lipid–protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Res. Int.* 64, 171–181. doi:10.1016/j.foodres.2014.06.022
- FAO, 2017. Global Capture Production database updated to 2015.
- FAO, 2016. Fishery and Aquaculture Statistics 2014.
- Fennema, O.R., Damodaran, S., Parkin, kirk. L., 2010. *Química de Alimentos de Fennema*, 4th ed. Artmed, Porto Alegre.
- Foti, M.C., 2007. Antioxidant properties of phenols. *J. Pharm. Pharmacol.* 59, 1673–1685. doi:10.1211/jpp.59.12.0010
- Frankel, E.N., 1980. Lipid oxidation. *Prog. Lipid Res.* 19, 1–22. doi:10.1016/0163-7827(80)90006-5
- Garcia, A.L.S., Oliveira, C.A.L., Karim, H.M., Sary, C., Todesco, H., Ribeiro, R.P., 2017. Genetic parameters for growth performance , fillet traits , and fat percentage

- of male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) 58, 527–533. doi:10.1007/s13353-017-0413-6
- Goes, E.S.R., Lara, J.A.F., Gasparino, E., Del Vesco, A.P., Goes, M.D., Alexandre Filho, L., Ribeiro, R.P., 2015. Pre-slaughter stress affects ryanodine receptor protein gene expression and the water-holding capacity in fillets of the Nile tilapia. *PLoS One* 10, e0129145. doi:10.1371/journal.pone.0129145
- Gökmen, V., Serpen, A., Fogliano, V., 2009. Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the “QUENCHER” approach. *Trends Food Sci. Technol.* 20, 278–288. doi:10.1016/j.tifs.2009.03.010
- Gülçin, I., Elmastaş, M., Aboul-Enein, H.Y., 2012. Antioxidant activity of clove oil - A powerful antioxidant source. *Arab. J. Chem.* 5, 489–499. doi:10.1016/j.arabjc.2010.09.016
- Herath, S.S., Haga, Y., Satoh, S., 2016. Effects of long-term feeding of corn co-product-based diets on growth, fillet color, and fatty acid and amino acid composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 464, 205–212. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.06.032
- Hernández, A., García García, B., Jordán, M.J., Hernández, M.D., 2015. Study of the dose of thyme essential oil in feed to prolong the shelf life of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquac. Nutr.* 21, 740–749. doi:10.1111/anu.12196
- Hernández, a., García García, B., Jordán, M.J., Hernández, M.D., 2014. Natural antioxidants in extruded fish feed: Protection at different storage temperatures. *Anim. Feed Sci. Technol.* 195, 112–119. doi:10.1016/j.anifeedsci.2014.06.003
- IBGE, 2015. Produção da pecuária municipal.
- Jayasena, D.D., Jo, C., 2013. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 34, 96–108. doi:10.1016/j.tifs.2013.09.002
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A., Schmidt, E., 2006. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Clove Leaf Essential Oil. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6303–6307. doi:10.1021/jf060608c
- Justi, K., Hayashi, C., Visentainer, J., de Souza, N., Matsushita, M., 2003. The influence of feed supply time on the fatty acid profile of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed on a diet enriched with n-3 fatty acids. *Food Chem.* 80, 489–493. doi:10.1016/S0308-8146(02)00317-5

- Kayan, A., Boontan, I., Jaturssitha, S., Wicke, M., Kreuzer, M., 2015. Effect of slaughter weight on meat quality of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Agric. Sci. Procedia* 5, 159–163. doi:10.1016/j.aaspro.2015.08.024
- Kiokias, S., Varzakas, T., Oreopoulou, V., 2008. In Vitro Activity of Vitamins, Flavonoids, and Natural Phenolic Antioxidants Against the Oxidative Deterioration of Oil-Based Systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48, 78–93. doi:10.1080/10408390601079975
- Kumar, Y., Yadav, D.N., Ahmad, T., Narsaiah, K., 2015. Recent trends in the use of natural antioxidants for meat and meat products. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 14, 796–812. doi:10.1111/1541-4337.12156
- Li, Y., Kong, D., Wu, H., 2013. Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC–MS and FTIR spectroscopy. *Ind. Crops Prod.* 41, 269–278. doi:10.1016/j.indcrop.2012.04.056
- Majeed, H., Liu, F., Hategekimana, J., Sharif, H.R., Qi, J., Ali, B., Bian, Y.-Y., Ma, J., Yokoyama, W., Zhong, F., 2016. Bactericidal action mechanism of negatively charged food grade clove oil nanoemulsions. *Food Chem.* 197, 75–83. doi:10.1016/j.foodchem.2015.10.015
- Masango, P., 2005. Cleaner production of essential oils by steam distillation. *J. Clean. Prod.* 13, 833–839. doi:10.1016/j.jclepro.2004.02.039
- Montanher, P.F., Costa e Silva, B., Bonafé, E.G., Carbonera, F., Santos, H.M.C. de, Figueiredo, I. de L., Maruyama, S.A., Matsushita, M., Visentainer, J.V., 2016. Effects of diet supplementation with chia (*Salvia hispanica* L.) oil and natural antioxidant extract on the omega-3 content and antioxidant capacity of Nile tilapia fillets. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 118, 698–707. doi:10.1002/ejlt.201400334
- Nakatsu, T., Lupo, A.T., Chinn, J.W., Kang, R.K.L., 2000. Biological activity of essential oils and their constituents. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 21, 571–631. doi:10.1016/S1572-5995(00)80014-9
- Oetterer, M., Galvão, J.A., Savay-da-Silva, L.K., 2014. Tilápia: controle de qualidade, beneficiamento e industrialização. Tilápia minimamente processada, in: Galvão, J.A., Oetterer, M. (Eds.), *Qualidade E Processamento de Pescado*. Rio de Janeiro, p. 237.
- Oliveira, C.A.L., Yoshida, G.M., Oliveira, S.N. de, Kunita, N.M., Santos, A.I. dos, Alexandre Filho, L., Ribeiro, R.P., 2015. Avaliação genética de tilápias-do-nilo

- durante cinco anos de seleção. *Pesqui. Agropecuária Bras.* 50, 871–877. doi:10.1590/S0100-204X2015001000002
- Oliveira, C.A.L. de, Ribeiro, R.P., Yoshida, G.M., Kunita, N.M., Rizzato, G.S., Oliveira, S.N. de, Santos, A.I. dos, Nguyen, N.H., 2016. Correlated changes in body shape after five generations of selection to improve growth rate in a breeding program for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* in Brazil. *J. Appl. Genet.* 57, 487–493. doi:10.1007/s13353-016-0338-5
- Osawa, C.C., De Felício, P.E., Gonçalves, L.A.G., 2005. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: Métodos tradicionais, modificados e alternativos. *Quim. Nova* 28, 655–663. doi:10.1590/S0100-40422005000400019
- PEIXE BR, 2017. Anuário Brasileiro da Piscicultura - edição 2016. [WWW Document]. URL <http://www.peixebr.com.br/parana-rondonia-e-sao-paulo-puxam-crescimento-da-piscicultura-no-brasil/>
- Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P.K., Dubey, N.K., 2015. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – Potentials and challenges. *Food Control* 47, 381–391. doi:10.1016/j.foodcont.2014.07.023
- Radhakrishnan, S., Saravana Bhavan, P., Seenivasan, C., Muralisankar, T., Shanthi, R., 2015. Effects of native medicinal herbs (*Alternanthera sessilis* , *Eclipta alba* and *Cissus quadrangularis*) on growth performance, digestive enzymes and biochemical constituents of the monsoon river prawn *Macrobrachium malcolmsonii*. *Aquac. Nutr.* 21, 496–506. doi:10.1111/anu.12180
- Raeisi, M., Tajik, H., Aliakbarlu, J., Mirhosseini, S.H., Hashem Hosseini, S.M., 2015. Effect of carboxymethyl cellulose-based coatings incorporated with *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and grape seed extract on the shelf life of rainbow trout fillets. *LWT - Food Sci. Technol.* 64, 898–904. doi:10.1016/j.lwt.2015.06.010
- Rapoport, S.I., Ramadan, E., Basselin, M., 2011. Docosahexaenoic acid (DHA) incorporation into the brain from plasma, as an in vivo biomarker of brain DHA metabolism and neurotransmission. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 96, 109–113. doi:10.1016/j.prostaglandins.2011.06.003
- Raut, J.S., Karuppayil, S.M., 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind. Crops Prod.* 62, 250–264. doi:10.1016/j.indcrop.2014.05.055
- Rivaroli, D.C., Guerrero, A., Velandia Valero, M., Zawadzki, F., Eiras, C.E., Campo, M. del M., Sañudo, C., Mendes Jorge, A., Nunes do Prado, I., 2016. Effect of

- essential oils on meat and fat qualities of crossbred young bulls finished in feedlots. *Meat Sci.* 121, 278–284. doi:10.1016/j.meatsci.2016.06.017
- Salih, A.M., Smith, D.M., Price, J.F., Dawson, L.E., 1987. Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry. *Poult. Sci.* 66, 1483–1488.
- Samant, S.S., Crandall, P.G., O'Bryan, C., Lingbeck, J.M., Martin, E.M., Seo, H.-S., 2015. Sensory impact of chemical and natural antimicrobials on poultry products: a review. *Poult. Sci.* 94, 1699–1710. doi:10.3382/ps/pev134
- Sant'Ana, L.S., Freitas, M.Q. de, 2011. Aspectos sensoriais do pescado, in: Golçalves, A.A. (Ed.), *Tecnologia Do Pescado: Ciência, Tecnologia, Inovação E Legislação*. Atheneu, São Paulo, p. 608.
- Santos, H.M.C., Nishiyama, M.F., Bonafe, E.G., Oliveira, C.A.L., Matsushita, M., Visentainer, J.V., Ribeiro, R.P., 2014. Influence of a diet enriched with perilla seed bran on the composition of omega-3 fatty acid in Nile tilapia. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 91, 1939–1948. doi:10.1007/s11746-014-2545-8
- Sarker, P.K., Kapuscinski, A.R., Lanois, A.J., Livesey, E.D., Bernhard, K.P., Coley, M.L., 2016. Towards sustainable aquafeeds: Complete substitution of fish oil with marine microalga *Schizochytrium* sp. improves growth and fatty acid deposition in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PLoS One* 11, e0156684. doi:10.1371/journal.pone.0156684
- Scherer, R., Wagner, R., Duarte, M.C.T., Godoy, H.T., 2009. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Rev. Bras. Plantas Med.* 11, 442–449. doi:10.1590/S1516-05722009000400013
- Serpen, A., Gökmen, V., Fogliano, V., 2012. Total antioxidant capacities of raw and cooked meats. *Meat Sci.* 90, 60–65. doi:10.1016/j.meatsci.2011.05.027
- Serpen, A., Gökmen, V., Pellegrini, N., Fogliano, V., 2008. Direct measurement of the total antioxidant capacity of cereal products. *J. Cereal Sci.* 48, 816–820. doi:10.1016/j.jcs.2008.06.002
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P., 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *J. Funct. Foods* 18, 820–897. doi:10.1016/j.jff.2015.06.018
- Shahidi, F., Zhong, Y., 2010. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chem. Soc. Rev.* 39, 4067. doi:10.1039/b922183m

- Solórzano-Santos, F., Miranda-Novales, M.G., 2012. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 136–141. doi:10.1016/j.copbio.2011.08.005
- Takemoto, E., Teixeira Filho, J., Godoy, H.T., 2009. Validação de metodologia para a determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por CLAE/UV. *Quim. Nova* 32, 1189–1194. doi:10.1590/S0100-40422009000500020
- Teoh, C.-Y., Ng, W.-K., 2016. The implications of substituting dietary fish oil with vegetable oils on the growth performance, fillet fatty acid profile and modulation of the fatty acid elongase, desaturase and oxidation activities of red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp. *Aquaculture* 465, 311–322. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.09.023
- Tocher, D.R., 2015. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture* 449, 94–107. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.01.010
- Tomaino, A., Cimino, F., Zimbalatti, V., Venuti, V., Sulfaro, V., De Pasquale, A., Saija, A., 2005. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chem.* 89, 549–554. doi:10.1016/j.foodchem.2004.03.011
- Van Haute, S., Raes, K., Van der Meeren, P., Sampers, I., 2016. The effect of cinnamon, oregano and thyme essential oils in marinade on the microbial shelf life of fish and meat products. *Food Control* 68, 30–39. doi:10.1016/j.foodcont.2016.03.025
- Vieira, S.A., Zhang, G., Decker, E.A., 2017. Biological implications of lipid oxidation products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* doi:10.1007/s11746-017-2958-2
- Visentainer, J. V., de Souza, N.E., Makoto, M., Hayashi, C., Franco, M.R.B., 2005. Influence of diets enriched with flaxseed oil on the α -linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acid in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food Chem.* 90, 557–560. doi:10.1016/j.foodchem.2004.05.016
- Vital, A.C.P., Guerrero, A., Monteschio, J. de O., Valero, M.V., Carvalho, C.B., de Abreu Filho, B.A., Madrona, G.S., do Prado, I.N., 2016. Effect of edible and active coating (with rosemary and oregano essential oils) on beef characteristics and consumer acceptability. *PLoS One* 11, e0160535. doi:10.1371/journal.pone.0160535

- Vyncke, W., 1970. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette Seifen Anstrichm.* doi:10.1002/lipi.19700721218
- Wang, R., Wang, R., Yang, B., 2009. Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 10, 289–292. doi:10.1016/j.ifset.2008.12.002
- Yadav, M.K., Chae, S.-W., Im, G.J., Chung, J.-W., Song, J.-J., 2015. Eugenol: A Phyto-Compound Effective against Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Clinical Strain Biofilms. *PLoS One* 10, e0119564. doi:10.1371/journal.pone.0119564

II - OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito da inclusão dos óleos essenciais de cravo e canela em dietas para tilápia do Nilo com base no desempenho animal e capacidade antioxidante, oxidação lipídica, expressão gênica, análise instrumental e sensorial dos filés.

III - Efeito dos óleos essenciais de cravo (*Eugenia caryophyllus*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum*) em rações para tilápia do Nilo sobre o desempenho e capacidade antioxidante e oxidação lipídica nos filés.

Resumo

Este trabalho foi realizado para avaliar a inclusão de óleo essencial de cravo (OEcl) ou óleo essencial de canela (OEci) em rações de tilápia do Nilo sobre o desempenho animal e poder antioxidante e oxidação lipídica nos filés. Os tratamentos foram constituídos dos OEcl ou OEci em dois níveis de inclusão (0,35 e 0,70 g.kg⁻¹ de ração) e o tratamento controle sem inclusão de óleos essenciais. Os peixes foram alimentados durante 45 dias. O poder antioxidante (rações e filés) foi determinada pelos ensaios ORAC_{FL}, DPPH, FRAP e ABTS e a oxidação lipídica pelo ensaio de TBARs. Para oxidação lipídica os filés foram armazenados em vitrine à 2° C e analisados durante 7 dias. O desempenho dos animais não foi alterado pelos óleos essenciais e níveis de inclusão. O poder antioxidante foi superior nas rações com óleos essenciais e nos filés do tratamento com 0,35 g.kg⁻¹ de OEcl pelo ensaio L-ORAC_{FL} com redução de até 40,3% da oxidação lipídica; enquanto que, o OEci apresentou efeito pró-oxidante em relação ao tratamento controle. A inclusão de 0,35 g.kg⁻¹ de OEcl na dieta de tilápias do Nilo durante 45 dias, não alterou o desempenho animal, aumentou o poder antioxidante e inibiu a oxidação lipídica nos filés.

Palavra-chave: Antioxidante natural, composto bioativo, desempenho animal, nutrição, ORAC_{FL}, TBARs.

Abstract

This work was carried out to evaluate the inclusion of clove (OEcl) or cinnamon essential oil (OEci) in Nile tilapia rations on animal performance and antioxidant power and lipid oxidation in fillets. The treatments were composed of OEcl or OEci at two inclusion levels (0.35 and 0.70 g.kg⁻¹ of feed) and the control treatment without inclusion of essential oils. The fish were fed for 45 days. The antioxidant power (rations and fillets) was determined by the ORAC_{FL}, DPPH, FRAP and ABTS assays and the lipid oxidation by the TBAR assay. For lipid oxidation the fillets were stored in a showcase at 2 °C and analyzed for 7 days. The performance of the animals was not altered by the essential oils and levels of inclusion. The antioxidant power was higher in the essential oils rations and in the fillets in the 0.35 g.kg⁻¹ OEcl treatment by the L-

ORACFL assay with reduction of up to 40.3% of the lipid oxidation; while the OEci presented a pro-oxidant effect in relation to the control treatment. The inclusion of 0.35 g.kg⁻¹ of OEci in the Nile tilapia diet for 45 days did not alter animal performance, increased antioxidant power and inhibited lipid oxidation in fillets.

Key words: Natural antioxidant, bioactive compound, animal performance, nutrition, ORACFL, TBARs

Introdução

Os filés de tilápia do Nilo apresentam ótimas características sensoriais, proteínas de alto valor biológico e fração lipídica com ácidos graxos poli-insaturados benéficos à saúde humana (Visentainer et al., 2005). No entanto, o pescado apresenta rápida deterioração (Hernández et al., 2015) pelos fatores intrínsecos e extrínsecos, como atividade enzimática e microbiológica (Ozpolat and Duran, 2017). Para obter um produto com elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados, os filés de tilápia, apresentam oxidação lipídica intensa, levando a formação de produtos, como peróxidos, hidroperóxidos, hidrocarbonetos voláteis, álcoois, aldeídos e cetonas, que são responsáveis pelo sabor e cheiro desagradável, deterioração dos filés, redução da qualidade e aceitabilidade do pescado (Hernández et al., 2015). Reações lipídica podem ser evitados ou retardados pela utilização de substâncias antioxidantes que impedem o desencadeamento de reações oxidativas, seja por meio da transferência de elétrons e/ou átomo de hidrogênio para o radical, pela quelação de metais, impedindo a formação de espécies reativas, ou pela complexação, sequestro, absorção, neutralização e decomposição de agentes pró-oxidantes (Amorati et al., 2013; Boroski et al., 2015; Foti, 2007; Shahidi and Zhong, 2010).

Há uma série de antioxidantes sintéticos utilizados na indústria alimentar, cosmética e terapêutica. No entanto, devido à legislação rigorosa sobre o uso de aditivos alimentares sintéticos, a natureza cancerígena e as preferências dos consumidores, há um interesse em utilizar antioxidantes naturais ao invés dos sintéticos. Nesse sentido, há uma tendência em usar substâncias naturais presentes em plantas medicinais e plantas alimentares como antioxidantes terapêuticos. A maioria destes antioxidantes naturais provêm de frutas, vegetais, especiarias, grãos e ervas (Anbudhasan et al., 2014; Nakatani, 2000).

Duas especiarias muito populares são o cravo da Índia (*Eugenia caryophyllus*) e a canela (*Cinnamomum zeylanicum*). O óleo essencial extraído delas apresenta alto poder antioxidante, pela presença de grupos fenólicos (Biondo et al., 2017; Ghosh et al., 2015). Os compostos fenólicos estão associados à redução de doenças crônicas e seu poder antioxidante está relacionado com a presença do grupo hidroxila em sua estrutura (Boroski et al., 2015).

Atualmente, foram aplicadas e avaliadas várias estratégias para melhorar o desempenho animal e diminuir a oxidação lipídica dos seus filés. Uma das estratégias é a suplementação da dieta do peixe com substâncias antioxidantes. Estudos recentes envolvendo a suplementação das rações com óleos essenciais mostraram redução na atividade microbiana nos filés de dourada (*Sparus aurata*) (Hernández et al., 2015), melhora no desempenho e resistência às doenças em trutas (Diler et al., 2016), maior resposta imune em tilápias Mozambique (Baba et al., 2016).

Desta forma, este trabalho foi realizado para avaliar o efeito da adição de óleos essenciais de cravo (OECl) ou canela (OEci) sobre o desempenho animal, o poder antioxidante e oxidação lipídica em filés de tilápia do Nilo.

Material e Métodos

Local

O experimento foi desenvolvido no setor de piscicultura (Codapar – UEM) e as análises químicas no Laboratório de Controle e Qualidade de Produtos de Origem Animal Departamento de Zootecnia e no Laboratório de Métodos Cromatográficos Departamento de Química, ambos na Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, Paraná – Brasil. O projeto foi aprovado pelo comitê Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá, protocolo n° 9976190415.

Animais e condição experimental

Para realização do estudo foram utilizadas 120 tilápias do Nilo, linhagem Gift/Tilamax, provenientes do programa de melhoramento genético de tilápias do Nilo da UEM, com peso médio de $107,3 \pm 0,9$ g e comprimento total de $17,4 \pm 0,1$ cm. Os animais foram distribuídos em 15 caixas de polietileno com capacidade de 500 litros, sistema de ar difuso e renovação de água constante. As caixas estavam dispostas em

estufa com foto período natural. Cada caixa correspondeu a uma unidade experimental com oito tilápias do Nilo, totalizando 24 animais por tratamento.

O delineamento foi inteiramente ao acaso com cinco tratamentos e três repetições, com duração de 45 dias. Os tratamentos foram constituídos de dois níveis, 0,35 e 0,70 g.kg⁻¹ de OEcl ou OEci nas dietas, e tratamento controle sem adição de óleo essencial. A inclusão dos óleos essenciais foi realizada por aspersão após a extrusão da dieta (Tabela 1). O arraçoamento foi realizado às 08h, 11h, 14h e 17 horas até a saciedade aparente dos animais.

Coleta de material para análise

Ao final do período experimental, as tilápias foram pesadas, medidas (comprimento total), evisceradas e filetadas. Os filés foram embalados a vácuo, devidamente identificados para análise posterior do poder antioxidante e oxidação lipídica.

Poder antioxidante

Para a realização das análises de poder antioxidante, as amostras trituradas (dietas e filés) foram previamente liofilizadas (liofilizador CHRIST, ALPHA 1-2 LD plus), a -52 °C e 0,060 mbar durante 24 horas e passadas por uma peneira de 80 mesh (177 µm) para evitar qualquer influência granulométrica nos ensaios.

Os ensaios DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), FRAP (Ferric Reducing Ability Power) e ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) foram aplicados nas amostras de ração e filés seguindo procedimento QUENCHER. As soluções de trabalho desses ensaios foram preparadas de acordo com Serpen et al. (2012).

A solução estoque de DPPH foi preparada pela dissolução de 40 mg do radical DPPH em 200 mL de uma mistura etanol/água (50:50, v/v). O valor de absorbância entre 0,75 e 0,80 em 525 nm foi determinado diluindo-se os 200 mL da solução estoque com aproximadamente 800 mL de uma mistura etanol/água (50:50, v/v).

A solução de FRAP foi preparada pela diluição de uma solução aquosa 10 mmol L⁻¹ de TPTZ (2,4,6-Tris(2 piridil)-1,3,5-triazina) e 20 mmol L⁻¹ de cloreto férrico em uma solução tampão 300 mmol L⁻¹ de acetato de sódio (pH 3,6) na proporção de 1:1:10 (v/v/v), como descrito por (Benzie and Strain, 1996).

Para o ensaio ABTS, a solução de trabalho foi preparada de acordo com Re et al. (1999) reagindo a solução estoque de ABTS (7 mmol L^{-1}) com uma solução de persulfato de potássio ($2,45 \text{ mmol L}^{-1}$). A solução final foi deixada em repouso no escuro à temperatura ambiente durante 12-16 horas antes da utilização. O valor de absorvância entre 0,75 e 0,80 em 734 nm foi determinado diluindo-se 10 mL da solução estoque com aproximadamente 800 mL de uma mistura etanol/água (50:50, v/v) (Serpen et al., 2012).

Para a aplicação dos ensaios DPPH, FRAP e ABTS seguindo procedimento QUENCHER, 10 mg de cada amostra seca e peneirada foram pesados em tubos de centrífuga protegidos da luz, onde 10 mL das respectivas soluções de trabalho foram adicionados aos tubos para iniciar as reações. Todos os tubos foram agitados por 60 min e, posteriormente, centrifugados a 4000 rpm por 5 min. A absorvância dos sobrenadantes foi medida em um espectrofotômetro UV-visível (Thermo SCIENTIFIC, GENESYS 10uv Scanning) nos comprimentos de onda de 525 nm (para ensaio DPPH), 593 nm (para ensaio FRAP) e 734 nm (para ensaio ABTS) (Serpen et al., 2012).

Como padrão de referência foi utilizado o Trolox (ácido (\pm) -6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) para converter a capacidade de inibição de cada amostra para poder antioxidante em equivalente Trolox (ET), como descrito por Serpen et al. (2012).

Os procedimentos de preparo dos extratos hidrofílicos (H-ORACFL) e lipofílicos (L-ORACFL) para análise ORACFL foram realizados de acordo com Prior et al. (2003). Para isso, 0,5 g de cada amostra seca foram pesadas em tubos de centrífuga sendo o conteúdo lipofílico primeiramente extraído com 10 mL de hexano. Depois da adição de solvente, os tubos foram agitados por 30 s, seguido de sonicação a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min. Os tubos foram agitados duas vezes durante a etapa de sonicação para suspender as amostras. Na sequência, os tubos permaneceram à temperatura ambiente por 10 min com agitação ocasional. Posteriormente, todas as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 min e os sobrenadantes foram coletados em balões de fundo chato. O resíduo de cada amostra foi submetido ao mesmo procedimento descrito anteriormente. Os sobrenadantes resultantes das duas extrações sequenciais foram combinados, concentrados sob pressão reduzida a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e o extrato hexânico seco foram dissolvidos em 1,5 mL de acetona e 4,5 mL de uma solução 7% de RMCD (β -ciclodextrina aleatoriamente metilada) (50% acetona:50% água, v/v).

As extrações hidrofílicas foram realizadas com os resíduos resultantes das extrações lipofílicas pela adição de 10 mL de acetona/água/ácido acético (70:29,5:0,5, v/v/v) e aplicando o mesmo procedimento utilizado nas extrações lipofílicas. As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 min. e os sobrenadantes coletados em balões volumétricos. A extração foi repetida, sendo os sobrenadantes combinados e diluídos para um volume final de 25 mL.

Os ensaios H-ORACFL e L-ORACFL foram realizados a 37 °C em um fluorímetro da marca Perkin Elmer, modelo VictorTMX4, utilizando microplacas pretas de 96 poços com excitação/emissão a partir do topo da placa.

Para o ensaio L-ORACFL, os extratos foram diluídos com uma solução 7% de RMCD em acetona/água (50:50, v/v) até a concentração apropriada para estar dentro do intervalo de concentração da curva padrão. A solução 7% de RMCD foi utilizada como branco e para dissolver os padrões de Trolox no ensaio lipofílico. Para os extratos hidrofílicos, as soluções das amostras foram diluídas com acetona/água/ácido acético (70:29,5:0,5, v/v/v) até o intervalo de concentração apropriado para a curva padrão. Padrões de Trolox foram preparados em acetona/água/ácido acético (70:29,5:0,5, v/v/v) bem como o branco para o ensaio H-ORACFL.

Uma porção de 20 µL das amostras diluídas foi adicionada a cada uma das células da microplaca seguida pela adição de 200 µL de uma solução 95,7 nmol L⁻¹ de fluoresceína sódica preparada como descrito por (Prior et al., 2003). A microplaca foi inserida no fluorímetro por 5 min para estabilizar a temperatura. Em seguida, 75 µL de uma solução de AAPH (2,2'-azobis-(2-amidino-propano) dihidrocloro), diluída em tampão fosfato 0,075 mol L⁻¹ (pH 7,0) com concentração de 17,2 mg mL⁻¹ para o ensaio L-ORACFL e 8,6 mg mL⁻¹ para o ensaio H-ORACFL foram adicionados a cada célula. As leituras foram iniciadas imediatamente em intervalos de 1 min durante 30 ciclos de análise. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão foram de 485 e 515 nm, respectivamente.

Os valores finais de H-ORACFL e L-ORACFL foram calculados utilizando um modelo de regressão linear ($y = ax + b$) entre concentração de Trolox (µmol L⁻¹) e a área líquida sob a curva de decaimento da fluoresceína de acordo com Prior et al.(2003).A área abaixo da curva (AUC) foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$AUC = (1 + f^1/f^0 + f^2/f^0 + \dots + f^{n+1}/f^0)$$

Em que, f_0 é a intensidade de fluorescência inicial e f_n é a intensidade de fluorescência no tempo n.

O valor de AUC líquido foi obtido subtraindo-se a área abaixo da curva de decaimento da fluorescência do branco do valor da amostra ou padrão (Wu et al., 2008). O poder antioxidante total (CAT) foi calculado somando-se os valores obtidos nos ensaios H-ORACFL e L-ORACFL. Todos os resultados obtidos nas determinações do poder antioxidante foram expressos em $\mu\text{mol ET g}^{-1}$.

Oxidação lipídica

A oxidação lipídica nos filés foi quantificada pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) conforme preconizado por Vyncke (1970). Para ao ensaio os filés de tilápia do Nilo foram picados e colocados em bandejas de isopor fechadas com filme de PVC e armazenados em expositor refrigerado a 2 °C com foto período controlado (12:12). As análises de oxidação foram realizadas nos dias 1, 3 e 7 de exposição. Os filés foram picados com o objetivo de acelerar a oxidação lipídica e verificar o efeito antioxidante dos óleos essenciais adicionados nas rações. O ensaio seguiu as etapas de extração, reação ao ácido tiobarbitúrico e leitura em espectrofotômetro. Para extração foram pesados 10 g de amostra em tubo Falcon e adicionado 20 ml de TCA (ácido tricloroacético) a 10%, em seguida foram homogeneizadas em Ultra Turrax e centrifugadas a 4.000 rpm a temperatura de 4° C por 15 minutos, e o sobrenadante filtrado em papel filtro 80 g/m². Para reação com o ácido tiobarbitúrico, foi pipetado 2,0mL da solução filtrada e 2,0 mL de ácido tiobarbitúrico 1% em tubo de ensaio, homogeneizado em vortex e levada a banho-maria a 97° C por 20 minutos. A leitura em espectrofotômetro foi realizada em absorvância de 532 nm e os resultados expressos em mg.kg^{-1} de malonaldeído (MDA) nos filés. Como padrão para curva foi utilizado o 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP).

Análise estatísticas

Os dados de desempenho, poder antioxidante (dietas e filés) e oxidação lipídica (efeito dos óleos essenciais e dias de exposição em vitrine) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido do teste de médias (Tukey) a 5% de significância. Para verificar o efeito dos óleos essenciais foi realizado análise de contraste entre o tratamento controle e os tratamentos com OEcl (C1) e OEci (C2). Os tratamentos foram considerados como variáveis classificatórias e as análises realizadas no programa Statistica 7.0.

Resultados

Desempenho animal

Peso e comprimento final, ganho em peso diário e conversão alimentar não foram alterados ($p > 0,05$) pelas dietas (controle, OEcl e OEci) e contrastes (C1 e C2) (Tabela 2). Além disso, não foi observado mortalidade dos animais dos diferentes tratamentos.

Poder antioxidante das dietas

O poder antioxidante das dietas com OEcl ou OEci foi maior ($p < 0,05$) em comparação com a dieta controle (Tabela 3), exceto nos tratamentos 0,35 g.kg⁻¹ de OEcl e OEci pelo ensaio H-ORACFL e CAT. Para contrastes, o C2 não diferiu ($p = 0,6918$) pelo ensaio H-ORACFL. Para demais ensaios, C1 e C2 foram significativos. A inclusão nas rações de OEcl ou OEci garantiram uma fonte dietética de antioxidante de origem natural para as tilápias do Nilo.

Poder antioxidante dos filés

O poder antioxidante foi maior ($p < 0,05$) nos filés das tilápias da dieta com 0,35 g.kg⁻¹ de OEcl pelo ensaio L-ORAC. Nos demais ensaios, o poder antioxidante foi semelhante ($p > 0,05$) ou menor em comparação ao grupo controle (Tabela 4). O C1 pelos ensaios FRAP e ABTS não diferiu. Nos demais ensaios os contrastes (C1 e C2) foram significativos; no entanto, apenas o OEcl pelo ensaio L-ORAC promoveu aumento do poder antioxidante.

Oxidação lipídica dos filés

A inclusão de OEcl e OEci nas dietas e o período de armazenamento em expositor a 2° C alterou ($p < 0,05$) a oxidação lipídica nos filés (Tabela 5). Em todo o período de avaliação houve redução da oxidação lipídica nos filés dos tratamentos com OEcl (0,35 e 0,70 g.kg⁻¹ na ração), que variou de 4,1 a 40,3% em comparação ao grupo controle, também verificado pelo C1 (dias 3 e 7 de avaliação). Nos dias 1 e 7, a oxidação lipídica não diferiu entre os níveis de OEcl nas rações. Diferença foi observada no dia 3 com o menor valor de MDA (0,156 mg.kg⁻¹ de filé) para o tratamento com 0,35 g.kg⁻¹ de OEcl.

Para o OEci foi observado efeito pró-oxidante com aumentando da oxidação lipídica de até 47,1% em relação ao grupo controle. Efeito pró-oxidante também é verificado pela análise de contraste (C2) no dia 1 ($p < 0,05$) com valor de MDA maior em filés com OEci, mas não diferindo nos dias 3 e 7.

Discussão

Poder antioxidante nas rações

A inclusão de 0,35 e 0,70 g.kg⁻¹ de OEcl e OEci promoveu aumento no poder antioxidante das rações, verificados nos ensaios realizados. O método de aplicação dos óleos essenciais, após a extrusão, foi eficiente e garantiu a presença de compostos com ação antioxidante nas rações.

Desempenho animal

Os OEcl e OEci fornecido por 45 dias na ração não afetou o desempenho produtivo dos animais. Em dietas para tilápia Mozambique, óleo essencial extraído da casca da laranja melhorou o desempenho animal (Acar et al., 2015), resultados não observados para mesma espécie com o óleo essencial extraído da casca de limão (Baba et al., 2016). No entanto, os autores (Acar et al., 2015; Baba et al., 2016) descrevem melhor resposta imune dos animais que receberam as dietas com os óleos essenciais.

O efeito dos óleos essenciais sobre o desempenho dos animais está relacionado aos compostos bioativos que induzem a secreção de enzimas digestíveis contribuindo para maior eficiência alimentar (Radhakrishnan et al., 2015) e principalmente ao efeito sobre o sistema imune, melhorando a resistência dos animais contra agentes estressores, reduzindo problemas com mortalidade durante o cultivo (Acar et al., 2015; Baba et al., 2016).

Os trabalhos com óleos essenciais na aquicultura são recentes e o emprego desses compostos como promotores de crescimento e da resposta imune nos animais devem ser considerados em trabalhos futuros permitindo o desenvolvimento de aditivos naturais, contribuindo com o desempenho animal sem agressão ao meio ambiente (Diler et al., 2016).

Poder antioxidante nos filés

Não foi verificado a transferência do poder antioxidante dos óleos essenciais para os filés, exceto para o tratamento com 0,35 g.kg⁻¹ de OEcl pelo ensaio L-ORACFL (6,67 μ mol ET g⁻¹). Este ensaio difere dos demais por apresentar afinidade lipofílica e mecanismo de ação baseado na transferência de hidrogênio empregando o radical peroxila. Por utilizar um radical encontrado em sistema biológico com temperatura de reação semelhante ao do corpo humano, o ensaio é recomendado para determinar o poder antioxidante em matrizes alimentares por reproduzir um mecanismo antioxidante verificado no corpo humano (Boroski et al., 2015). Carbonera et al. (2014) avaliando a suplementação de extrato de resíduo de acerola em dieta para tilápias do Nilo, encontraram maior poder antioxidante nas dietas e nos filés, mas verificaram que o poder antioxidante nos filés não aumentou de forma linear no período de suplementação. Resultado semelhante encontrado por Carbonera et al. (2016) com a suplementação de óleo de chia, óleo de tungue, CLA (Conjugated Linoleic Acid) e vitamina E.

Segundo Carbonera et al. (2016) alguns antioxidantes dietéticos podem contribuir no crescimento dos animais ou atuar na proteção contra o estresse oxidativo durante o cultivo, não observando aumento no poder antioxidante nos filés. Carbonera et al. (2016, 2014) verificaram maior poder antioxidante pelo ensaio L-ORACFL em filés de tilápias do Nilo com 30 dias de suplementação, e verificaram comportamento semelhante pelos ensaios DPPH, FRAP, ABTS e H-ORACFL com picos de poder antioxidante em diferentes tempos dentro do período de suplementação.

Oxidação lipídica nos filés

A oxidação lipídica pode iniciar no pré-abate, durante e após o abate dos animais (Kumar et al., 2015). Incorporar os óleos essenciais via alimentação, como um fator pré-abate, fornece uma fonte de antioxidante natural aos animais, contribuindo para o equilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes, atuando na prevenção da oxidação no sistema biológico, e após o abate retardando ou inibindo as reações de oxidação lipídica nos filés.

A inclusão OEcl nas rações apresentou efeito antioxidante reduzindo a oxidação lipídica nos filés armazenados a temperatura de 2° C por 7 dias. O tratamento com 0,35 g.kg⁻¹ de OEcl não diferiu do tratamento com 0,70 g.kg⁻¹ de OEcl e do tratamento controle nos dias 1 e 7, mas apresentou menor oxidação lipídica no dia 3, corroborando com os dados do ensaio L-ORACFL, aonde, maior poder antioxidante confere menor

oxidação (0,35 g.kg⁻¹ de OEcl), menor poder antioxidante confere maior oxidação lipídica (0,70 g.kg⁻¹ OEci).

O poder antioxidante do OEcl é superior ao BHT (butil-hidroxito-lueno) (Jirovetz et al., 2006), um dos principais antioxidantes sintéticos utilizados em alimentos industrializados e rações, mas associado a danos ao organismo. Desta forma, a substituição por antioxidantes naturais com atividade equivalente é aconselhada e aceita pelos consumidores preocupados em adquirir alimentos mais saudáveis (Amorati et al., 2013; Bakkali et al., 2008; Carochi et al., 2015; Gülçin et al., 2012).

O composto majoritário dos OEcl (84,5%) e OEci (78,8%) é o eugenol (4-Allyl-2-methoxyphenol) (Biondo et al., 2017) que apresenta em sua estrutura molecular um grupo hidroxila (OH) e aromático que caracteriza moléculas com atividade antioxidante estabilizando os radicais livres, reduzindo e inibindo a oxidação lipídica.

Os antioxidantes, em matrizes alimentares, podem seguir dois caminhos: desempenhar sua função mantendo o equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes ou em níveis elevados sofrer auto-oxidação e apresentar função pró-oxidante (Shahidi and Zhong, 2010), efeito verificado nos filés dos animais que receberam rações com OEci. Esse efeito pode ser atribuído a citotoxicidade dos óleos essenciais. Segundo Bakkali et al. (2008) alguns óleos essenciais a nível celular afetam o estado redox ocasionando a oxidação de elementos celulares como proteínas e DNA, desencadeando um estado de estresse oxidativo.

Conclusão

A inclusão dos óleos essenciais não afetou o desempenho dos animais. O OEcl aumentou a poder antioxidante (ensaio L-ORAC_{FL}) e inibiu a oxidação lipídica em até 40,3% em relação ao grupo controle. O OEci apresentou efeito pró-oxidante com aumento da oxidação lipídica. Em 45 dias de suplementação, é indicado a inclusão de 0,35 g.kg⁻¹ de OEcl na ração de tilápias do Nilo.

Referências

Acar, Ü., Kesbiç, O.S., Yılmaz, S., Gültepe, N., Türker, A., 2015. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against

- Streptococcus iniae*. *Aquaculture* 437, 282–286.
doi:10.1016/j.aquaculture.2014.12.015
- Amorati, R., Foti, M.C., Valgimigli, L., 2013. Antioxidant activity of essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 61, 10835–10847. doi:10.1021/jf403496k
- Anbudhasan, P., Surendraraj, A., Karkuzhali, S., Sathishkumar, P., 2014. Natural antioxidants and its benefits. *Int. J. Food Nutr. Sci.* 3, 225–232.
- Baba, E., Acar, Ü., Öntaş, C., Kesbiç, O.S., Yılmaz, S., 2016. Evaluation of Citrus limon peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture* 465, 13–18. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.08.023
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76. doi:10.1006/abio.1996.0292
- Biondo, P., Carbonera, F., Zawadzki, F., Chiavelli, L., Pilau, E., Prado, I., Visentainer, J., 2017. Antioxidant capacity and identification of bioactive compounds by GC-MS of essential oils from spices, herbs and citrus. *Curr. Bioact. Compd.* 13, 137–143. doi:10.2174/1573407212666160614080846
- Boroski, M., Visentainer, J.V., Cottica, S.M., Morais, D.R., 2015. Antioxidantes: princípios e métodos analíticos. Curitiba.
- Carbonera, F., Montanher, P.F., Figueiredo, I.L., Bonafé, E.G., Santos Júnior, O.O., Sargi, S.C., Gonçalves, R.M., Matsushita, M., Visentainer, J.V., 2016. Lipid composition and antioxidant capacity evaluation in tilapia fillets supplemented with a blend of oils and vitamin E. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 93, 1255–1264. doi:10.1007/s11746-016-2869-7
- Carbonera, F., Montanher, P.F., Palombini, S. v., Maruyama, S.A., Claus, T., Santos, H.M.C., Sargi, S.C., Matsushita, M., Visentainer, J.V., 2014. Antioxidant capacity in tilapia fillets enriched with extract of acerola fruit residue. *J. Braz. Chem. Soc.* 25, 1237–1245. doi:10.5935/0103-5053.20140101
- Carocho, M., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R., 2015. Natural food additives: Quo vadis? *Trends Food Sci. Technol.* 45, 284–295. doi:10.1016/j.tifs.2015.06.007

- Diler, O., Gormez, O., Diler, I., Metin, S., 2016. Effect of oregano (*Origanum onites* L.) essential oil on growth, lysozyme and antioxidant activity and resistance against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac. Nutr.* 1–8. doi:10.1111/anu.12451
- Ghosh, T., Basu, A., Adhikari, D., Roy, D., 2015. Antioxidant activity and structural features of *Cinnamomum zeylanicum*. *3 Biotech* 5, 939–947. doi:10.1007/s13205-015-0296-3
- Gülçin, I., Elmastaş, M., Aboul-Enein, H.Y., 2012. Antioxidant activity of clove oil - A powerful antioxidant source. *Arab. J. Chem.* 5, 489–499. doi:10.1016/j.arabjc.2010.09.016
- Hernández, A., García García, B., Jordán, M.J., Hernández, M.D., 2015. Study of the dose of thyme essential oil in feed to prolong the shelf life of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquac. Nutr.* 21, 740–749. doi:10.1111/anu.12196
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A., Schmidt, E., 2006. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Clove Leaf Essential Oil. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6303–6307. doi:10.1021/jf060608c
- Kumar, Y., Yadav, D.N., Ahmad, T., Narsaiah, K., 2015. Recent trends in the use of natural antioxidants for meat and meat products. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 14, 796–812. doi:10.1111/1541-4337.12156
- Nakatani, N., 2000. Phenolic antioxidants from herbs and spices. *BioFactors* 13, 141–146.
- Ozpolat, E., Duman, M., 2017. Effect of black cumin oil (*Nigella sativa* L.) on fresh fish (*Barbus grypus*) fillets during storage at 2 ± 1 ° C. *Food Sci. Technol.* 1–5.
- Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., Jacob, R., 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC FL)) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3273–3279. doi:10.1021/jf0262256
- Radhakrishnan, S., Saravana Bhavan, P., Seenivasan, C., Muralisankar, T., Shanthi, R., 2015. Effects of native medicinal herbs (*Alternanthera sessilis* , *Eclipta alba* and *Cissus quadrangularis*) on growth performance, digestive enzymes and biochemical constituents of the monsoon river prawn *Macrobrachium malcolmsonii*. *Aquac. Nutr.* 21, 496–506. doi:10.1111/anu.12180

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- Serpen, A., Gökmen, V., Fogliano, V., 2012. Total antioxidant capacities of raw and cooked meats. *Meat Sci.* 90, 60–65. doi:10.1016/j.meatsci.2011.05.027
- Shahidi, F., Zhong, Y., 2010. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chem. Soc. Rev.* 39, 4067. doi:10.1039/b922183m
- Visentainer, J. V., de Souza, N.E., Makoto, M., Hayashi, C., Franco, M.R.B., 2005. Influence of diets enriched with flaxseed oil on the α -linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acid in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food Chem.* 90, 557–560. doi:10.1016/j.foodchem.2004.05.016
- Vyncke, W., 1970. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette Seifen Anstrichm.* doi:10.1002/lipi.19700721218
- Wu, C., Duckett, S.K., Neel, J.P.S., Fontenot, J.P., Clapham, W.M., 2008. Influence of finishing systems on hydrophilic and lipophilic oxygen radical absorbance capacity (ORAC) in beef. *Meat Sci.* 80, 662–667. doi:10.1016/j.meatsci.2008.03.003

Tabela 1. Ingredientes e composição aproximada da ração experimental.

Ingredientes	%	Composição aproximada ^a	%
Milho	39,38	Umidade	89,36
Farelo de soja	34,21	Fibra total	4,03
Farinha de vísceras	4,89	Energia digestível (kcal/kg ⁻¹)	2487
Farelo de arroz	12,71	Proteína bruta	28,45
Farinha de sangue (80%)	5,86	Lipídio total	3,65
DL- metionina	0,12	Cálcio	0,68
Óleo soja (sem aditivo)	0,73	Fósforo disponível	0,52
L-lisina	0,12	Lisina	1,74
L-triptofano	0,03	Arginina	1,69
Cloreto de colina	0,15	Histidina	0,81
Sal comum	0,34	Metionina	0,47
Fósforo bicálcio	1,47		

^a Valor estimado pelo SuperCrac Premium (TD software, Viçosa, MG, Brazil)

Tabela 2. Peso (PF) e comprimento final (CF), conversão alimentar (CA) e ganho em peso diário (GPD) de tilápias do Nilo alimentadas com rações com inclusão (0,35 e 0,70 g.kg⁻¹ na ração) de óleo essencial de cravo (OEcl) e canela (OEci).

Itens	PF (g)	CF (cm)	CA (g.g)	GPD (g.dia)
Controle ^a	201,42	21,72	1,17	2,07
OEcl 0,35	202,96	21,3	1,13	2,10
OEcl 0,70	204,08	21,38	1,14	2,18
OEci 0,35	203,04	21,53	1,21	2,16
OEci 0,70	206,79	20,57	1,16	2,21
SEM ^b	3,03	0,20	0,05	0,07
Valor de p				
Efeito	0,9886	0,5013	0,2875	0,9784
C1 ^c	0,8323	0,5063	0,7652	0,7423
C2 ^d	0,7018	0,2569	0,3694	0,6242

^a Ração sem inclusão de óleo essencial.

^b Erro padrão da média.

^c Contraste entre tratamento controle e OEcl

^d Contraste entre tratamento controle e OEci

Tabela 3. Poder antioxidante ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$) das rações com inclusão (0,35 e 0,70 g.kg^{-1} na ração) de óleo essencial de cravo (OEcl) e canela (OEci).

Itens	H-ORAC _{FL} ^b	L-ORAC _{FL} ^c	CAT ^d	DPPH ^e	FRAP ^f	ABTS ^g
Controle ^a	55,50 ^C	4,94 ^D	60,44 ^C	9,98 ^C	14,59 ^C	19,62 ^B
OEcl 0,35	37,81 ^E	13,84 ^B	51,65 ^D	11,29 ^B	18,00 ^B	24,20 ^A
OEcl 0,70	93,42 ^A	16,00 ^B	109,42 ^A	12,46 ^A	21,04 ^A	23,99 ^A
OEci 0,35	45,37 ^D	10,35 ^C	55,72 ^{DC}	10,44 ^{BC}	17,85 ^B	20,29 ^B
OEci 0,70	64,00 ^B	20,64 ^A	84,64 ^B	12,47 ^A	20,57 ^A	24,23 ^A
SEM ^h	5,19	1,43	5,85	0,25	0,54	0,48
Valor de p						
Efeito	<0,0000	<0,0000	<0,0000	<0,0000	<0,0000	<0,0000
C1 ⁱ	0,0005	<0,0000	<0,0000	<0,0000	<0,0000	<0,0000
C2 ^j	0,6918	<0,0000	0,0007	<0,0000	<0,0000	0,0002

Letras maiúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) na coluna.

^a Ração sem inclusão de óleo essencial.

^b Oxigen Radical Absorbance Capacity / fração hidrofílica.

^c Oxigen Radical Absorbance Capacity / fração lipofílica.

^d Poder antioxidante total (H-ORAC_{FL} + L-ORAC_{FL}).

^e 2,2-difenil-1-picril-hidrazil.

^f Ferric Reducing Ability Power.

^g Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico).

^h Erro padrão da média.

ⁱ Contraste entre tratamento controle e OEcl

^j Contraste entre tratamento controle e OEci

Tabela 4. Poder antioxidante ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$) em filés de tilápias Nilo alimentadas com rações com inclusão (0,35 e 0,70 g.kg^{-1} na ração) de óleo essencial de cravo (OEcl) e canela (OEci).

Itens	H-ORAC _{FL} ^b	L-ORAC _{FL} ^c	CAT ^d	DPPH ^e	FRAP ^f	ABTS ^g
Controle ^a	19,06 ^A	3,74 ^B	22,80 ^A	15,33 ^A	5,85 ^{AB}	21,56 ^A
OEcl 0,35	12,76 ^{CD}	6,67 ^A	19,43 ^B	14,45 ^B	6,08 ^A	21,33 ^A
OEcl 0,70	14,69 ^{BC}	2,04 ^C	16,73 ^C	14,38 ^B	5,45 ^B	20,95 ^{AB}
OEci 0,70	16,90 ^{AB}	0,55 ^E	17,45 ^{BC}	14,06 ^B	5,61 ^{AB}	21,00 ^{AB}
OEci 0,35	12,07 ^D	0,45 ^E	12,52 ^D	14,25 ^B	5,50 ^B	19,97 ^B
SEM ^h	0,72	0,62	0,92	0,13	0,07	0,19
Valor de p						
Efeito	<0,0000	<0,0000	<0,0000	0,0030	0,0163	0,0184
C1 ⁱ	<0,0000	0,0009	<0,0000	0,0013	0,5619	0,3088
C2 ^j	<0,0000	<0,0000	<0,0000	0,0002	<0,0000	<0,0000

Letras maiúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) na coluna

^a Ração sem inclusão de óleo essencial.

^b Oxigen Radical Absorbance Capacity / fração hidrofílica.

^c Oxigen Radical Absorbance Capacity / fração lipofílica.

^d Poder antioxidante total (H-ORAC_{FL} + L-ORAC_{FL}).

^e 2,2-difenil-1-picril-hidrazil.

^f Ferric Reducing Ability Power.

^g Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico).

^h Erro padrão da média.

ⁱ Contraste entre tratamento controle e OEcl

^j Contraste entre tratamento controle e OEci

Tabela 5. Oxidação lipídica (mg.kg^{-1} de malonaldeído nos filés) pelo ensaio de TBARs em filés de tilápias do Nilo alimentadas com rações com níveis de inclusão (0,35 e 0,70 g.kg^{-1} de ração) de óleo essencial de cravo (OEcl) e canela (OEci).

Itens	Tempo de armazenamento a 2 °C			Valor de p
	Dia 1	Dia 3	Dia 7	
Controle ^a	0,192 ^{ABa}	0,261 ^{Ca}	1,322 ^{ABb}	0,0001
OEcl 0,35	0,168 ^{Aa}	0,156 ^{Aa}	0,862 ^{Ab}	<0,0000
OEcl 0,70	0,185 ^{ABa}	0,218 ^{Ba}	1,071 ^{Ab}	<0,0000
OEci 0,35	0,283 ^{Ba}	0,285 ^{Ca}	1,715 ^{Bb}	<0,0000
OEci 0,70	0,272 ^{ABa}	0,267 ^{Ca}	1,287 ^{ABb}	0,0026
SEM ^b	0,02	0,01	0,10	
Valor de p				
Efeito	0,0202	<0,0000	0,0070	
C1 ^c	0,6020	<0,0000	0,0246	
C2 ^d	0,0171	0,0570	0,3047	

Letra maiúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) na coluna.

Letra minúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) na linha.

^a Ração sem inclusão de óleo essencial.

^b Erro padrão da média.

^c Contraste entre tratamento controle e OEcl

^d Contraste entre tratamento controle e OEci

IV – Óleo essencial de cravo (*Eugenia caryophyllus*) como fonte antioxidante em rações para tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Resumo

Este trabalho foi realizado para avaliar o efeito da inclusão de óleo essencial de cravo (OEcl) em rações para tilápia do Nilo (linhagem Gift/Tilamx) sobre o desempenho animal e poder antioxidante, oxidação lipídica, expressão gênica, textura, pH, cor e análise sensorial dos filés. Foram avaliados três níveis de OEcl nas rações (0,70; 1,05 e 1,40 g.kg⁻¹) fornecidas em três períodos antes do abate dos animais (15; 45 e 60 dias). Os dados foram analisados em esquema fatorial (níveis x períodos) em contraste a um grupo controle sem inclusão do OEcl. A oxidação lipídica foi determinada em filés armazenados em expositor a 4° C durante 14 dias. O poder antioxidante nas rações aumentou com a inclusão do OEcl. A interação afetou o poder antioxidante (ensaios DPPH e FRAP) e a oxidação lipídica. A oxidação lipídica foi reduzida em até 43,3% em relação ao grupo controle. A textura, pH, cor e análise sensorial não foram alteradas pela interação. O poder antioxidante (ensaio FRAP), oxidação lipídica, expressão gênica (CAT e GSS) e textura dos filés diferiram dos filés do grupo controle. A inclusão de 0,70 g.kg⁻¹ de OEcl na ração durante 15 dias antes do abate contribuiu para maior poder antioxidante, redução da oxidação lipídica, expressão gênica e maior firmeza dos filés, sem alterar o pH, cor e aceitação sensorial dos filés pelos consumidores.

Palavra-chave: TBARs, FRAP, Oxidação lipídica, Poder antioxidante, Expressão gênica.

Abstract

This work was carried out to evaluate the effect of inclusion of clove essential oil (OEcl) on Nile tilapia (Gift / Tilamx) rations on animal performance and antioxidant power, lipid oxidation, gene expression, texture, pH, color and sensory analysis of fillets. Three levels of OEcl were evaluated in the rations (0.70, 1.05 and 1.40 g.kg⁻¹) provided in three periods before the animals were slaughtered (15, 45 and 60 days). The data were analyzed in a factorial scheme (levels x periods) in contrast to the control group without inclusion of OEcl. Lipid oxidation was determined in fillets stored in a showcase at 4 ° C for 14 days. The antioxidant power in the rations increased with the inclusion of OEcl. The interaction affected the antioxidant power (DPPH and FRAP assays) and lipid oxidation. Lipid oxidation was reduced by up to 43.3% in relation to

the control group. The texture, pH, color and sensory analysis were not altered by interaction. The antioxidant power (FRAP assay), lipid oxidation, gene expression (CAT and GSS) and fillet texture differed from the control group. The inclusion of 0.70 g.kg⁻¹ of OEcl in the ration for 15 days before slaughtering contributes to greater antioxidant power, reduction of lipid oxidation, gene expression and greater firmness of the fillets, without altering the pH, color and sensorial acceptance of consumers.

Key words: TBARs, FRAP, lipid oxidation, antioxidant power, gene expression.

Introdução

O filé de peixe, ainda que armazenado em condições ideais de temperatura, apresenta rápida deterioração (Ahmed et al., 2015; Ozpolat and Duman, 2017) e quando não controladas reduzem a qualidade nutricional e sensorial do produto (Kayan et al., 2015; Khalafalla et al., 2015; Liu et al., 2010). Segundo Hernández et al. (2015) os produtos à base de peixe são particularmente sensíveis à oxidação lipídica pelo seu elevado nível de ácidos graxos de cadeia insaturada.

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a segunda espécie de água doce mais cultivada no mundo (FAO, 2016) e o principal produto comercializado é o filé, que apresenta ótima característica nutricional e sensorial, com proteínas de alto valor biológico e fração lipídica com ácidos graxos poli-insaturados em especial os ômega-3. Entre eles, o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) responsável por atuar nos processos anti-inflamatórios e o ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) em funções neuroprotetoras (Rapoport et al., 2011). Os ácidos graxos poli-insaturados também estão associados à redução no risco de inúmeras doenças, principalmente cardíacas (Visentainer et al., 2005).

O perfil de ácidos graxos no filé de tilápia do Nilo é facilmente alterado com a modulação da dieta rica em poli-insaturados (Carbonera et al., 2014a; Montanher et al., 2016; Sarker et al., 2016; Tocher, 2015). No entanto, a oxidação lipídica é proporcional ao aumento de ácidos graxos poli-insaturados (Bernardi et al., 2016; Kumar et al., 2015; Vieira et al., 2017), com alterações nas características nutricionais e sensoriais reduzindo a aceitação do produto pelos consumidores (Bernardi et al., 2016). Em casos mais avançados, os produtos secundários da oxidação lipídica, como o malonaldeído (MDA), apresentam alta toxicidade quando presentes nos alimentos (Vieira et al., 2017).

O emprego de soluções de imersão e biofilmes contendo óleos essenciais com alto poder antioxidante, contribuem no controle da oxidação lipídica e redução da

atividade microbiana (Cai et al., 2015; Ozogul et al., 2017; Raeisi et al., 2015; Van Haute et al., 2016). No entanto, a aceitação sensorial dos filés é baixa em função da necessidade de níveis altos de óleo essencial para obter o efeito antioxidante esperado comprometendo o sabor e odor (Raeisi et al., 2015; Van Haute et al., 2016).

Na alimentação dos peixes, Hernández et al. (2015) encontraram redução da atividade microbiana nos filés quando adicionado óleo essencial de tomilho (*Thymus zygis*) na ração de dourada (*Sparus aurata*). Diler et al. (2016) observaram melhor desempenho e resposta imune avaliando o óleo essencial de orégano para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e Baba et al. (2016) para tilápias Mozambique (*O. mossambicus*) melhor resposta imune com rações suplementadas com óleo essencial de Citrus limon.

O óleo essencial de cravo (OEcl) obtido por prensagem a frio das folhas de *Eugenia caryophyllus* apresenta alto poder antioxidante atribuída ao seu principal composto, o eugenol (84,5%) (Biondo et al., 2017).

Este estudo foi realizado para avaliar o efeito da inclusão por 60, 45 e 15 dias antes do abate de três níveis de óleo essencial de cravo em rações para tilápias do Nilo sobre o desempenho animal, poder antioxidante, oxidação lipídica, textura, pH, cor, expressão gênica e análise sensorial dos filés.

Material e Métodos

Local

O experimento foi desenvolvido na Unidade Demonstrativa de Produção em Tanques-rede, localizada no reservatório de Rosana no Rio Paranapanema, tributário rio do Corvo, município de Diamante do Norte, Paraná – Brasil (-22.6569 -52.7803). As análises laboratoriais foram realizadas na Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná – Brasil.

Animais e rações experimentais

Foram utilizadas 1400 tilápias do Nilo da linhagem Gift/Tilamx proveniente do programa de melhoramento genético de tilápias do Nilo da UEM, com peso médio de $186,5 \pm 4,9$ g, as quais foram distribuídas em 40 tanques-rede de 1 m³. Cada tanque-rede correspondeu uma unidade experimental com 35 peixes.

O delineamento foi inteiramente ao acaso com dez tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos de três níveis (0,70, 1,05 e 1,40 g.kg⁻¹) de OEcl nas rações fornecidas em três períodos (60, 45 e 15 dias) antes do abate dos animais. O OEcl foi diluído (1:5) em solução hidroalcolica e por aspersão adicionado a ração extrusada. O arraçamento foi realizado as 08h, 11h, 14h e 17h horas e biometrias quinzenais foram realizadas para calcular a biomassa e ajustar a quantidade de ração fornecida.

Coleta de material para análise

Ao final do período experimental os animais permaneceram em jejum por 24 horas e 240 animais foram abatidos, eviscerados e filetados. Os filés (lado esquerdo) foram identificados e transportados para análises. Sendo: 40 filés para poder antioxidante; 40 filés para oxidação lipídica; 40 filés para textura, pH e cor (medidas aferidas no mesmo filé) e 120 filés para análise sensorial. Amostras de músculo para análise de expressão foram coletadas de seis animais (filés do lado direito) de cada tratamento.

Desempenho animal

Foram avaliados o peso final (PF), comprimento padrão final (CF), ganho em peso diário (GPD), conversão alimentar (CA), rendimento de filé (RF) e sobrevivência (SO). Todos os animais foram avaliados.

Poder antioxidante

Para a realização das análises de poder antioxidante as amostras (rações e filés) foram previamente liofilizadas em liofilizador (CHRIST, ALPHA 1-2 LD plus), a -52 °C e 0,060 mbar durante 24h e passadas por uma peneira de 80 mesh (177 µm) para evitar qualquer influência granulométrica nos ensaios.

Os ensaios DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), FRAP (Ferric Reducing Ability Power) e ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) foram aplicados seguindo procedimento QUENCHER. As soluções de trabalho desses ensaios foram preparadas de acordo com Serpen et al. (2012).

A solução estoque de DPPH foi preparada pela dissolução de 40 mg do radical DPPH em 200 mL de uma mistura etanol/água (50:50, v/v). O valor de absorvância

entre 0,75 e 0,80 em 525 nm foi determinado diluindo-se os 200 mL da solução estoque com aproximadamente 800 mL de uma mistura etanol/água (50:50, v/v).

A solução de FRAP foi preparada pela diluição de uma solução aquosa 10 mmol L⁻¹ de TPTZ (2,4,6-Tris(2 piridil)-1,3,5-triazina) e 20 mmol L⁻¹ de cloreto férrico em solução tampão 300 mmol L⁻¹ de acetato de sódio (pH 3,6) na proporção de 1:1:10 (v/v/v), como descrito por Benzie and Strain (1996).

Para o ensaio ABTS, a solução foi preparada de acordo com Re et al. (1999) reagindo-se a solução estoque de ABTS (7 mmol L⁻¹) com uma solução de persulfato de potássio (2,45 mmol L⁻¹). A solução final foi deixada em repouso no escuro à temperatura ambiente durante 12-16 horas antes da utilização. O valor de absorbância entre 0,75 e 0,80 em 734 nm foi determinado diluindo-se 10 mL da solução estoque com aproximadamente 800 mL de uma mistura etanol/água (50:50, v/v) (Serpen et al., 2012).

Para a aplicação dos ensaios DPPH, FRAP e ABTS seguindo procedimento QUENCHER, 10 mg de cada amostra seca e peneirada foram pesados em tubos de centrífuga protegidos da luz, onde 10 mL das respectivas soluções de trabalho foram adicionados aos tubos para iniciar as reações. Todos os tubos foram agitados por 60 min e, posteriormente, centrifugados a 4000 rpm por 5 min. A absorbância dos sobrenadantes foi medida em um espectrofotômetro UV-visível (Thermo SCIENTIFIC, GENESYS 10uv Scanning) nos comprimentos de onda de 525 nm (para ensaio DPPH), 593nm (para ensaio FRAP) e 734nm (para ensaio ABTS) (Serpen et al., 2012).

Trolox (ácido (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) foi utilizado como padrão de referência para converter a poder de inibição de cada amostra para poder antioxidante em equivalente Trolox (ET), como descrito por (Serpen et al., 2012).

Oxidação lipídica

A oxidação lipídica nos filés foi determinada pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) conforme preconizado por Vyncke (1970) com modificações. Os filés foram moídos e distribuídos em bandejas de isopor fechadas com filme de PVC e armazenadas em expositor refrigerado (± 4 °C) e foto período controlado (12:12). Os ensaios foram realizados nos dias 1, 7 e 14 de armazenamento. Os filés foram moídos com o objetivo de acelerar a oxidação lipídica e verificar o efeito antioxidante do OEcl na alimentação.

Para extração foi utilizado solução contendo ácido tricloroacético 7,5%, ácido gálico 0,1% e EDTA 0,1%. As amostras (5,0 g) foram homogeneizadas com a solução (10mL) usando um Ultra Turrax, em seguida centrifugadas a 4000 rpm (4 °C) por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado e 1,5mL misturado (1:1 v/v) com ácido tiobarbitúrico 1% em tubo de ensaio, homogeneizado e levada a banho-maria a 100 °C por 15 minutos. A leitura em espectrofotômetro foi realizada em absorvância de 532 nm e os resultados expressos em mg.kg^{-1} de MDA nos filés.

Textura, pH e cor dos filés

A textura foi determinada em quatro amostras com 1x1x2cm obtidas da região dorsal de cada filé e analisadas perpendicularmente à direção das fibras musculares em texturômetro da marca TAXT Plus Texture Analyser com lâmina de corte Warner-Bratzler com célula de carga de 5 kg, velocidade de 5,0 mm/s e distância de 20 mm.

O pH (potencial de hidrogênio) foi determinado em três pontos na parte interna dos filés utilizando um pHmetro da marca Hanna modelo HI99163.

A cor foi avaliada em seis pontos aleatórios na parte interna dos filés utilizando um colorímetro Minolta CR-400 com ângulo de visão de 10° e eluminante D65. Os valores de L* (luminosidade), a* (componente verde-vermelho) e b* (componente azul-amarelo) foram expressos conforme o sistema de cor da Commission Internationale de L'Eclairage (CIElab).

Análises de expressão gênica

Para avaliar a expressão dos genes catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPX) e glutathiona sintetase (GSS), foram coletadas cerca de 2 g de músculo branco de três peixes de cada tratamento. As amostras de músculo foram armazenadas em RNA Later (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) à -20 °C até o momento da extração de RNA.

O RNA total foi extraído com uso do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acordo com as normas do fabricante, na proporção de 1 mL para cada 70 mg de tecido. Todos os materiais utilizados foram previamente tratados com inibidor de RNase - RNase AWAY® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Inicialmente, o tecido foi triturado com homogeneizador elétrico Polytron (tecido + Trizol) até a completa dissociação, sendo mantido a temperatura ambiente por cinco minutos. Logo após foram adicionados 200 μL de clorofórmio e homogeneizados manualmente por 15 segundos. Após permanecer em temperatura ambiente por três minutos, o material foi centrifugado

por 15 minutos a 12.000 x g a 4 °C, sendo a fase líquida coletada e transferida para tubo limpo. Ao sobrenadante foram adicionados 500 µL de isopropanol, e após dez minutos a temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados por dez minutos a 12.000 x g, a 4 °C. Foi descartado o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75%. Após nova centrifugação a 7.500 x g por cinco minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado, sendo que o pelet foi seco por 15 minutos e ressuscitado em água ultrapura livre de RNase. Por fim, as amostras foram incubadas a 60 °C por 15 minutos, sendo posteriormente armazenadas a -80 °C.

Para avaliar a concentração total de RNA, as amostras foram mensuradas pelo método fluorimétrico utilizando o kit Qubit RNA BR Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad CA, USA). A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1%, corado com SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) e visualizado em aparelho transluminador com luz ultravioleta.

As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico, de acordo com as recomendações do fabricante.

O cDNA foi confeccionado utilizando o kit SuperScript™ TM III First-Strand Syntesis Super Mix (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acordo com as normas do fabricante. Em tubo estéril e RNA free foram adicionados 6 µl de RNA total, 1 µL de oligo (dT), 50 µM oligo (dT) 20 e 1 µL de tampão de anelamento (Annealing buffer). A reação foi incubada por 5 minutos a 65 °C e então colocadas sobre o gelo por 1 minuto. Foi adicionado em seguida 10 µL de solução 2x First-Strand Reaction Mix e 2 µL de solução contendo a enzima transcriptase reversa SuperScript III e inibidor de RNase. A solução foi incubada por 50 minutos a 50 °C e posteriormente 5 minutos a 85 °C, sendo imediatamente colocada sobre o gelo. As amostras foram armazenadas a -20 °C até o momento do uso.

Para avaliar por PCR em tempo real (qRT-PCR) os genes GPX, GSS e CAT, foram desenhados primers de acordo com as sequências depositados no site www.ncbi.nlm.nih.gov para *Oreochromis niloticus*, utilizando o site www.idtdna.com (Tabela 1). Para controle endógeno, foi utilizado o gene da β-actina (XM_003455949), sendo escolhido o primer desenvolvido por (Yang et al., 2013).

Para as reações de qRT-PCR, foi utilizado o corante fluorescente SYBR® GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), conforme recomendações do fabricante. Todas as análises foram realizadas em um volume de 25 µL e em duplicatas.

As reações foram conduzidas em strips, no aparelho StepOne Plus. As concentrações de primer e cDNA foram determinadas através de testes de eficiência utilizando três concentrações de primer (100, 200 e 400 nM) e quatro concentrações de cDNA (10, 100, 200 e 400 ng). O método $2^{-\Delta CT}$ foi utilizado para as análises de quantificação relativa, sendo os dados expressos em unidade arbitrária (UA).

Os primers para os genes analisados neste estudo provaram ser adequados para a análise de PCR em tempo real. A eficiência de amplificação foi semelhante para os genes de interesse, variando entre 90 e 110%. A análise das curvas de dissociação não revelou presença de produtos não específicos, ou formação de dímeros de primers, o que demonstra a confiabilidade dos dados na expressão de mRNA dos genes estudados. Análise estatística da β -actina como controle endógeno não mostrou diferença significativa entre os tratamentos, comprovando desta forma a eficiência de seu uso como controle endógeno.

Análise sensorial

Análise sensorial foi realizada em laboratório apropriado com cabines individuais localizado na Universidade Estadual de Maringá. Foram selecionados 120 consumidores respeitando gênero e faixa etária conforme perfil da população brasileira. A análise foi dividida em 12 sessões com 10 consumidores por sessão, que avaliaram uma amostra de cada tratamento.

Os filés foram descongelados sobre refrigeração e a região dorsal foi dividida em 10 pedaços (1x2 cm). Em seguida foram envolvidos com papel alumínio e cozidos em grill (Grill Philco Jumbo Inox, Philco AS, Brasil) pré-aquecido a 200 °C até atingirem temperatura interna de 85 °C, aferido com termômetro tipo espeto (Incoterm, 145 mm, Incoterm LTDA, Brasil). As amostras identificadas por código permaneceram em estufa a 50 °C até serem servidas em um delineamento randomizado. Os consumidores receberam uma amostra de cada vez e avaliaram a aceitabilidade para os atributos odor, textura, sabor e aceitação geral, usando uma escala de 9 pontos (1 - me desagrada extremamente e 9 – gosto extremamente). Pontuação intermediária (nota 5) foi excluída da escala (Font-i-Furnols et al., 2008). Também foi aplicado um questionário para caracterizar os consumidores quanto a preferência e consumo de carnes, compra de pescado e conhecimento sobre óleos essenciais.

Análise estatística

Os dados de poder antioxidante das rações experimentais foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguido de teste de médias (Tukey) a 5% de significância. Para desempenho animal e poder antioxidante, oxidação lipídica, cor, pH, textura, expressão gênica e análise sensorial dos filés foi realizada análise estatística em esquema fatorial, considerando níveis de OEcl nas rações e períodos de fornecimento aos animais antes do abate como fatores. O efeito para níveis e períodos é apresentado para todos os parâmetros analisados juntamente com análise de contraste entre tratamentos com OEcl e controle (sem adição de OEcl). Quando verificado interação (níveis x período) foi realizado o desdobramento fatorial com teste de médias (Tukey) a 5% de significância, sendo apresentado as médias de cada tratamento. As análises foram realizadas no programa Statistica 7.0.

Resultados

Desempenho animal

A interação entre níveis de OEcl e períodos de fornecimento às tilápias não afetou o desempenho dos animais (Tabela 2).

Poder antioxidante nas rações

O poder antioxidante nas rações aumentou com a inclusão de OEcl em todas as metodologias usadas (Tabela 3). As dietas com inclusão de OEcl permitiram uma fonte dietética de substâncias antioxidante presentes no óleo essencial. O poder antioxidante foi maior pelo ensaio ABTS, seguido pelos ensaios FRAP e DPPH.

Poder antioxidante nos filés

A interação foi significativa ($p < 0,000$) para os ensaios DPPH e FRAP (Tabela 2), e somente pelo ensaio DPPH o contraste entre grupo controle e filés com OEcl foi significativo ($p < 0,000$). Para o ensaio ABTS, o efeito isolado entre as variáveis não foi significativo ($p 0,098$). As maiores médias da interação entre níveis e períodos (Tabela 4) foi para 0,70/45, 0,70/60 e 1,05/60 no ensaio DPPH e 1,05/15, 1,05/45, 1,05/60 e 1,40/60 no ensaio FRAP.

Para o grupo controle com o uso da metodologia de DPPH, os filés das tilápias que receberam as rações com OEcl por 15 dias antes do abate e $1,40 \text{ mg.kg}^{-1}$ de OEcl

nos períodos de 45 e 60 dias apresentaram o menor poder antioxidante, em comparação com os filés das tilápias alimentadas com a dieta controle (Tabela 4). Para metodologia FRAP, o poder antioxidante foi maior nos filés de tilápia que receberam as dietas com $1,05 \text{ mg.kg}^{-1}$ de OEcl nos períodos de 15 e 45 dias e $1,40 \text{ mg.kg}^{-1}$ em 60 dias antes do abate. Para demais interações, as médias não diferiram do controle e nenhuma apresentou valor inferior ao controle.

Oxidação lipídica dos filés

A interação entre níveis de OEcl nas rações e períodos de fornecimento às tilápias antes do abate influenciou ($p < 0,05$) os valores de MDA (Tabela 2), um produto secundário da oxidação lipídica, como o contraste nos dias 7 e 14 entre grupo controle e tratamentos com OEcl.

O tempo de armazenamento dos filés (1, 7, e 14 dias), também resultou no aumento do MDA.

As médias das interações são apresentadas na Tabela 5. A redução da oxidação lipídica nos filés com o OEcl variou de 2,8 a 43,3% em relação ao grupo controle. Para o 7º dia, houve redução significativa da oxidação lipídica em relação ao grupo controle, exceto para interação 1,40/15. Nos dias 1º e 14º, algumas interações apresentaram efeito pró-oxidante, no entanto, os valores de MDA não diferiram ($p > 0,05$) do grupo controle.

Textura, pH e cor dos filés

A interação não afetou os valores de textura, pH e cor (L^* , a^* e b^*) dos filés (Tabela 2). Em relação ao grupo controle (contraste), somente os valores de textura foram significativos ($p < 0,05$). Os filés de tilápias que receberam as rações com OEcl apresentaram filés com maior firmeza (maior força de cisalhamento).

Expressão gênica

Os valores de CAT, GPX e GSS não foram afetados pela interação (Tabela 2), no entanto, na análise de contraste a expressão dos genes CAT e GSS foi significativa ($p < 0,05$).

Frequência de consumo e perfil de compra de carnes

O painel sensorial foi realizado com 120 consumidores, sendo homens (47,5%) e mulheres (52,5%) conforme faixa etária da população brasileira (Tabela 6). A

frequência (Tabela 7) semanal do consumo de carne bovina foi superior, seguida por ave, suína e peixe. A frequência de consumo semanal de carne bovina é elevada, com 89% dos participantes respondendo que consomem esta carne duas ou mais vezes por semana. A segunda carne com maior consumo é a carne de frango com 60% dos entrevistados respondendo que consomem esta carne de duas ou mais vezes por semana. De modo geral, a maior parte (33%) dos entrevistados consome carne de suíno apenas uma vez por semana.

O consumo de peixe é baixo; 58% dos entrevistados responderam que consomem esse alimento somente de uma a duas vezes por mês. Apenas 11% dos entrevistados responderam que consomem peixe de duas a mais de quatro vezes por semana. Somente 5,8% não consomem peixe; inferior a carne suína (6,7%). Por outro lado, a percentagem dos entrevistados que não consomem carne ovina é alta (53%). Além disso, somente 41% responderam que consomem carne ovina uma vez por mês.

Em relação ao perfil de compra de carne de peixe (Tabela 8), 58,3% adquire em supermercados, 48,33% têm preferência pelo produto resfriado e 41,67% considera a aparência no momento da compra.

Em relação aos óleos essenciais, 87,50% compraria um peixe alimentado com óleo essencial e 55,83% dos consumidores pagaria mais por esse produto.

Análise sensorial

A interação não afetou ($p < 0,05$) a aceitabilidade dos filés para os atributos avaliados (Tabela 2) como não diferiu ($p < 0,05$) do grupo controle (contraste). As notas de aceitação geral dos filés apresentaram correlação positiva (correlação de Pearson) com os atributos aroma, textura e sabor (0,780, 0,845 e 0,906, respectivamente) indicando que os consumidores consideram todos os atributos para avaliar a aceitabilidade geral de filés de tilápia do Nilo.

Discussão

Poder antioxidante das rações e filés e expressão gênica

O OEcl e o seu principal composto com propriedade antioxidante, o eugenol, são de natureza lipofílica (Kumar et al., 2015; Prakash et al., 2015; Raut and Karuppayil, 2014; Yadav et al., 2015). Portanto, o ensaio ABTS resultou nos maiores valores de poder antioxidante nas rações e filés.

A inclusão do OEcl aumentou o poder antioxidante das rações, por outro lado, não foi verificado aumento nos filés devido aos níveis e período de fornecimento das rações com OEcl.

O poder antioxidante em filés de tilápia do Nilo alimentada com rações suplementadas com antioxidante natural foi investigada por outros autores (Carbonera et al., 2016, 2014b; Fogaça et al., 2009; Montanher et al., 2016) que encontraram pequenas alterações no poder antioxidante conforme o ensaio aplicado. Segundo Carbonera et al. (2016, 2014b), alguns antioxidantes dietéticos desempenham funções que contribuem para o crescimento dos animais ou proteção contra a oxidação gerada pelo estresse durante o cultivo, não observando aumento significativo no poder antioxidante nos filés pela deposição dos compostos antioxidantes na musculatura.

Acar et al. (2015) e Baba et al. (2016) verificaram em tilápia moçambique (*O. mossambicus*) alimentadas com rações suplementadas com óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis*) e limão (*Citrus limon*), respectivamente, efeito positivo nos parâmetros hematológicos e bioquímicos no sangue com maior resposta imune dos animais indicando o efeito dos óleos essenciais no período de cultivo. Da mesma forma, que os óleos essenciais melhoraram a resposta imune dos animais, os compostos antioxidantes do EOcl podem ter desempenhado sua função durante o cultivo contribuindo para o controle do estresse oxidativo ocasionado por fatores ambientais, biológicos e de manejo. Abdel-Tawwab et al. (2017) verificaram em tilápias do Nilo expostas a metais pesados menor atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase em animais que receberam ração suplementada com antioxidante EDTA, indicando que os antioxidantes dietéticos contribuíram para o controle e reparação do estresse oxidativo indicado pela menor atividade do sistema antioxidante enzimático. Resultado verificado com a inclusão do OEcl nas rações, com redução da expressão da gênica da CAT e GSS.

Oxidação lipídica dos filés

O efeito antioxidante dos óleos essenciais é atribuído principalmente aos compostos majoritários, como o eugenol no OEcl (Biondo et al., 2017), que apresenta um grupo hidroxila (OH) e anel aromático, permitindo transferência de elétrons ou átomo de hidrogênio para o radical (Amorati et al., 2013; Foti, 2007; Kumar et al., 2015). O eugenol purificado ($\geq 99\%$) apresenta alta capacidade de eliminação do radical DPPH• (Tomaino et al., 2005) com atividade antioxidante superior ao BHT (butil-

hidroxito-lueno) (Jirovetz et al., 2006). O eugenol também apresenta alta atividade antimicrobiana (Tomaino et al., 2005) e sua concentração no OEcl extraído de folhas de *E. caryophyllus* e de 84,46% (Biondo et al., 2017).

O efeito benéfico dos óleos essenciais também é atribuído ao sinergismo entre seus compostos, principalmente dos minoritários que correspondem a dezenas de compostos com atividade variável (Burt, 2004). De modo geral, o efeito antioxidante dos óleos essenciais está relacionado a dose incluída nos alimentos e a concentração de moléculas com atividade antioxidante, igualmente, doses inadequadas dos óleos essenciais no alimento pode ocasionar efeito indesejável (Burt, 2004; Carochi et al., 2015, 2014) com redução na qualidade nutricional (efeito pró-oxidante) e sensorial (odor e sabor) dos filés (Raeisi et al., 2015; Van Haute et al., 2016).

Efeito pró-oxidante dos OEcl foi verificado no 1º dia, no entanto, o MDA não diferiu do grupo controle. Esse efeito é relacionado a auto-oxidação dos antioxidantes em concentrações elevadas nos alimentos (Shahidi e Zhong, 2010). No caso dos óleos essenciais, também é atribuído ao efeito citotóxico que contribui com a oxidação de elementos celulares, como proteínas e DNA, aumentando a concentração de radicais livres e desencadeando um estado de estresse oxidativo nos animais (Bakkali et al., 2008). Peixes em condições de estresse pré-abate apresentam características indesejáveis como menor firmeza dos filés em salmão (*Salmo salar* L.) (Bahuaud et al., 2010b) e capacidade de retenção de água em tilápias do Nilo (Goes et al., 2015).

Textura, pH e cor dos filés

A textura dos filés é um importante parâmetro sensorial, e filés com textura mais firme apresentam maior aceitabilidade (Bahuaud et al., 2010a). A atividade microbiana, autólise (Cai et al., 2015; Liu et al., 2010) e o estresse pré-abate com redução na capacidade de retenção de água nos filés (Goes et al., 2015) são fatores que contribuem para redução da firmeza dos filés de tilápias do Nilo. A perda de firmeza dos filés tem início pós-abate e avança durante o armazenamento, principalmente pela degradação das proteínas do tecido conjuntivo (Ahmed et al., 2015)

OEcl apresenta atividade antimicrobiana (Jayasena e Jo, 2013; Solórzano-Santos e Miranda-Navales, 2012) que poderia inibir o desenvolvimento de microrganismos nos filés afetando a textura. No entanto, a análise foi realizada após o abate (dia 1), período com baixa atividade microbiana e enzimática que levaria a redução da firmeza dos filés do grupo controle.

A textura também é afetada pelas catepsinas e calpaínas que provocam a redução da integridade das células levando a liberação de proteases e degradação muscular durante o armazenamento (Ahmed et al., 2015; Bahuaud et al., 2010a; Kemp et al., 2010). Em salmão, Bahuaud et al. (2010b) encontraram correlação de Pearson significativa entre atividade e expressão de genes de catepsinas com a firmeza dos filés de animais submetidos a períodos de estresses antes do abate. Portanto, o OEcl pode ter contribuído para uma condição de menor estresse dos animais pré-abate, conseqüentemente, melhor firmeza dos filés. Acar et al. (2015) e Baba et al. (2016) encontraram baixo estresse avaliando parâmetros bioquímicos no sangue de tilápias moçambique alimentadas com rações suplementadas com óleo essencial de laranja (*C. sinensis*) e limão (*C. limon*).

O efeito na integridade das células também explica a textura. Antioxidantes lipofílicos apresentam maior interação com a membrana lipoproteica (Roleira et al., 2010). Os óleos essenciais e seus compostos, como o eugenol, são de natureza lipofílica (Kumar et al., 2015; Prakash et al., 2015; Raut and Karuppayil, 2014; Yadav et al., 2015), portanto, os compostos do OEcl podem ter contribuído para integridade da membrana celular reduzindo as perdas de conteúdo intracelular.

O pH é um parâmetro associado ao frescor do pescado. Está relacionado ao manejo dos animais antes do abate e conseqüentemente o consumo de glicogênio no músculo. Animais menos estressados, o pH muscular é mais elevado em relação a animais estressados que apresentam queda acentuada do pH após o abate prejudicando a qualidade filé (Goes et al., 2015). O pH permaneceu conforme indicado para filés frescos para espécie.

A cor é uma característica altamente desejável para espécies cultivadas como o salmão e truta, porém menos importante para espécies que apresentam carne branca como a tilápia do Nilo. A presença de pigmentos nos óleos essenciais é pequena e não prejudicou a cor dos filés. Em filés de dourada, Hernández et al. (2015) não verificaram alteração na coloração em animais alimentados com rações suplementadas com óleo essencial de tomilho.

Análise sensorial

A inclusão de OEcl nas rações, não afetou a aceitabilidade dos atributos avaliados e a análise de correlação indicou que os consumidores consideram todos os atributos avaliados para determinar a aceitabilidade geral do filé de tilápia do Nilo.

Trabalhos aplicando óleo essencial em filés de peixes pela inclusão em cobertura comestível (Raeisi et al., 2015) ou marinado (Van Haute et al., 2016) descrevem efeito positivo no controle da oxidação lipídica e aumento da vida de prateleira, mas na avaliação sensorial as notas para os atributos avaliados foram inferiores ao controle sem adição de óleo essencial. Segundo os autores, esse resultado é atribuído ao cheiro característico dos óleos essenciais que não agradou o paladar dos consumidores. Problema não observado nesse estudo com inclusão de OEcl nas rações dos animais e corroborando com os resultados encontrados por Hernández et al. (2015) avaliando a inclusão de óleo essencial de tomilho em rações para dourada quando aplicado o Método de Índice de Qualidade (MIQ) em animais armazenados em gelo.

Conclusão

Óleo essencial de cravo (OEcl) em rações para tilápias do Nilo, aumentou o poder antioxidante, reduziu a oxidação lipídica e a expressão gênica da CAT e GSS e melhorou a firmeza dos filés. Não alterou o pH, cor e aceitação sensorial. Considerando as interações, a inclusão de 1,05 g.kg⁻¹ de OEcl na ração, por 15 dias antes do abate, contribui para maior qualidade dos filés após o abate.

Referências bibliográficas

- Abdel-Tawwab, M., El-Sayed, G.O., Monier, M.N., Shady, S.H., 2017. Dietary EDTA supplementation improved growth performance, biochemical variables, antioxidant response, and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) to environmental heavy metals exposure. *Aquaculture* 473, 478–486. doi:10.1016/j.aquaculture.2017.03.006
- Acar, Ü., Kesbiç, O.S., Yılmaz, S., Gültepe, N., Türker, A., 2015. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. *Aquaculture* 437, 282–286. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.12.015
- Ahmed, Z., Donkor, O., Street, W.A., Vasiljevic, T., 2015. Calpains- and cathepsins-induced myofibrillar changes in post-mortem fish: Impact on structural softening

- and release of bioactive peptides. *Trends Food Sci. Technol.* doi:10.1016/j.tifs.2015.04.002
- Amorati, R., Foti, M.C., Valgimigli, L., 2013. Antioxidant activity of essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 61, 10835–10847. doi:10.1021/jf403496k
- Baba, E., Acar, Ü., Öntaş, C., Kesbiç, O.S., Yılmaz, S., 2016. Evaluation of Citrus limon peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture* 465, 13–18. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.08.023
- Bahuaud, D., Gaarder, M., Veiseth-Kent, E., Thomassen, M., 2010a. Fillet texture and protease activities in different families of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 310, 213–220. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.10.008
- Bahuaud, D., Mørkøre, T., Østbye, T.-K., Veiseth-Kent, E., Thomassen, M.S., Ofstad, R., 2010b. Muscle structure responses and lysosomal cathepsins B and L in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) pre- and post-rigor fillets exposed to short and long-term crowding stress. *Food Chem.* 118, 602–615. doi:10.1016/j.foodchem.2009.05.028
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76. doi:10.1006/abio.1996.0292
- Bernardi, D.M., Bertol, T.M., Pflanzler, S.B., Sgarbieri, V.C., Pollonio, M.A.R., 2016. ω -3 in meat products: benefits and effects on lipid oxidative stability. *J. Sci. Food Agric.* 96, 2620–2634. doi:10.1002/jsfa.7559
- Biondo, P., Carbonera, F., Zawadzki, F., Chiavelli, L., Pilau, E., Prado, I., Visentainer, J., 2017. Antioxidant capacity and identification of bioactive compounds by GC-MS of essential oils from spices, herbs and citrus. *Curr. Bioact. Compd.* 13, 137–143. doi:10.2174/1573407212666160614080846
- Boroski, M., Visentainer, J.V., Cottica, S.M., Morais, D.R., 2015. *Antioxidantes: princípios e métodos analíticos*. Curitiba.
- Burt, S., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022

- Cai, L., Cao, A., Li, Y., Song, Z., Leng, L., Li, J., 2015. The effects of essential oil treatment on the biogenic amines inhibition and quality preservation of red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets. *Food Control* 56, 1–8. doi:10.1016/j.foodcont.2015.03.009
- Carbonera, F., Bonafe, E.G., Martin, C.A., Montanher, P.F., Ribeiro, R.P., Figueiredo, L.C., Almeida, V.C., Visentainer, J.V., 2014a. Effect of dietary replacement of sunflower oil with perilla oil on the absolute fatty acid composition in Nile tilapia (GIFT). *Food Chem.* 148, 230–234. doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.038
- Carbonera, F., Montanher, P.F., Figueiredo, I.L., Bonafé, E.G., Santos Júnior, O.O., Sargi, S.C., Gonçalves, R.M., Matsushita, M., Visentainer, J.V., 2016. Lipid composition and antioxidant capacity evaluation in tilapia fillets supplemented with a blend of oils and vitamin E. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 93, 1255–1264. doi:10.1007/s11746-016-2869-7
- Carbonera, F., Montanher, P.F., Palombini, S. v., Maruyama, S.A., Claus, T., Santos, H.M.C., Sargi, S.C., Matsushita, M., Visentainer, J.V., 2014b. Antioxidant capacity in tilapia fillets enriched with extract of acerola fruit residue. *J. Braz. Chem. Soc.* 25, 1237–1245. doi:10.5935/0103-5053.20140101
- Carocho, M., Barreiro, M.F., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R., 2014. Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13, 377–399. doi:10.1111/1541-4337.12065
- Carocho, M., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R., 2015. Natural food additives: Quo vadis? *Trends Food Sci. Technol.* 45, 284–295. doi:10.1016/j.tifs.2015.06.007
- Diler, O., Gormez, O., Diler, I., Metin, S., 2016. Effect of oregano (*Origanum onites* L.) essential oil on growth, lysozyme and antioxidant activity and resistance against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac. Nutr.* 1–8. doi:10.1111/anu.12451
- FAO, 2016. *Fishery and Aquaculture Statistics 2014*.
- Fogaça, F.H. dos S., Sant’Ana, L.S., Carneiro, D.J., 2009. Dietary α -tocopheryl acetate on fillet quality of tilapia. *Acta Sci. Anim. Sci.* 31. doi:10.4025/actascianimsci.v31i4.6929
- Font-i-Furnols, M., Gispert, M., Guerrero, L., Velarde, A., Tibau, J., Soler, J., Hortós, M., García-Regueiro, J.A., Pérez, J., Suárez, P., Oliver, M.A., 2008. Consumers’ sensory acceptability of pork from immunocastrated male pigs. *Meat Sci.* 80, 1013–1018. doi:10.1016/j.meatsci.2008.04.018

- Foti, M.C., 2007. Antioxidant properties of phenols. *J. Pharm. Pharmacol.* 59, 1673–1685. doi:10.1211/jpp.59.12.0010
- Goes, E.S.R., Lara, J.A.F., Gasparino, E., Del Vesco, A.P., Goes, M.D., Alexandre Filho, L., Ribeiro, R.P., 2015. Pre-slaughter stress affects ryanodine receptor protein gene expression and the water-holding capacity in fillets of the Nile tilapia. *PLoS One* 10, e0129145. doi:10.1371/journal.pone.0129145
- Hernández, A., García García, B., Jordán, M.J., Hernández, M.D., 2015. Study of the dose of thyme essential oil in feed to prolong the shelf life of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquac. Nutr.* 21, 740–749. doi:10.1111/anu.12196
- Jayasena, D.D., Jo, C., 2013. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 34, 96–108. doi:10.1016/j.tifs.2013.09.002
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A., Schmidt, E., 2006. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Clove Leaf Essential Oil. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6303–6307. doi:10.1021/jf060608c
- Kayan, A., Boontan, I., Jaturssitha, S., Wicke, M., Kreuzer, M., 2015. Effect of slaughter weight on meat quality of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Agric. Agric. Sci. Procedia* 5, 159–163. doi:10.1016/j.aaspro.2015.08.024
- Kemp, C.M., Sensky, P.L., Bardsley, R.G., Buttery, P.J., Parr, T., 2010. Tenderness – An enzymatic view. *Meat Sci.* 84, 248–256. doi:10.1016/j.meatsci.2009.06.008
- Khalafalla, F.A., Ali, F.H.M., Hassan, A.-R.H.A., 2015. Quality improvement and shelf-life extension of refrigerated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets using natural herbs. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* 4, 33–40. doi:10.1016/j.bjbas.2015.02.005
- Kumar, Y., Yadav, D.N., Ahmad, T., Narsaiah, K., 2015. Recent trends in the use of natural antioxidants for meat and meat products. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 14, 796–812. doi:10.1111/1541-4337.12156
- Liu, S., Fan, W., Zhong, S., Ma, C., Li, P., Zhou, K., Zhu, M., 2010. Quality evaluation of tray-packed tilapia fillets stored at C based on sensory , microbiological , biochemical and physical attributes. *African J. Biotechnol.* 9, 692–701. doi:10.5897/AJB09.1369
- Montanher, P.F., Costa e Silva, B., Bonafé, E.G., Carbonera, F., Santos, H.M.C. de, Figueiredo, I. de L., Maruyama, S.A., Matsushita, M., Visentainer, J.V., 2016. Effects of diet supplementation with chia (*Salvia hispanica* L.) oil and natural

- antioxidant extract on the omega-3 content and antioxidant capacity of Nile tilapia fillets. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 118, 698–707. doi:10.1002/ejlt.201400334
- Ozogul, Y., Yuvka, İ., Ucar, Y., Durmus, M., Kösker, A.R., Öz, M., Ozogul, F., 2017. Evaluation of effects of nanoemulsion based on herb essential oils (rosemary, laurel, thyme and sage) on sensory, chemical and microbiological quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during ice storage. *LWT - Food Sci. Technol.* 75, 677–684. doi:10.1016/j.lwt.2016.10.009
- Ozpolat, E., Duman, M., 2017. Effect of black cumin oil (*Nigella sativa* L.) on fresh fish (*Barbus grypus*) fillets during storage at 2 ± 1 °C. *Food Sci. Technol.* 1–5.
- Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P.K., Dubey, N.K., 2015. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – Potentials and challenges. *Food Control* 47, 381–391. doi:10.1016/j.foodcont.2014.07.023
- Raeisi, M., Tajik, H., Aliakbarlu, J., Mirhosseini, S.H., Hashem Hosseini, S.M., 2015. Effect of carboxymethyl cellulose-based coatings incorporated with *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and grape seed extract on the shelf life of rainbow trout fillets. *LWT - Food Sci. Technol.* 64, 898–904. doi:10.1016/j.lwt.2015.06.010
- Rapoport, S.I., Ramadan, E., Basselin, M., 2011. Docosahexaenoic acid (DHA) incorporation into the brain from plasma, as an in vivo biomarker of brain DHA metabolism and neurotransmission. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 96, 109–113. doi:10.1016/j.prostaglandins.2011.06.003
- Raut, J.S., Karuppayil, S.M., 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind. Crops Prod.* 62, 250–264. doi:10.1016/j.indcrop.2014.05.055
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- Roleira, F.M.F., Siquet, C., Orrù, E., Garrido, E.M., Garrido, J., Milhazes, N., Podda, G., Paiva-Martins, F., Reis, S., Carvalho, R.A., Silva, E.J.T. da, Borges, F., 2010. Lipophilic phenolic antioxidants: Correlation between antioxidant profile, partition coefficients and redox properties. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 5816–5825. doi:10.1016/j.bmc.2010.06.090
- Sarker, P.K., Kapuscinski, A.R., Lanois, A.J., Livesey, E.D., Bernhard, K.P., Coley, M.L., 2016. Towards sustainable aquafeeds: Complete substitution of fish oil with

- marine microalga *Schizochytrium* sp. improves growth and fatty acid deposition in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PLoS One* 11, e0156684. doi:10.1371/journal.pone.0156684
- Serpen, A., Gökmen, V., Fogliano, V., 2012. Total antioxidant capacities of raw and cooked meats. *Meat Sci.* 90, 60–65. doi:10.1016/j.meatsci.2011.05.027
- Shahidi, F., Zhong, Y., 2010. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chem. Soc. Rev.* 39, 4067. doi:10.1039/b922183m
- Solórzano-Santos, F., Miranda-Novales, M.G., 2012. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 136–141. doi:10.1016/j.copbio.2011.08.005
- Tocher, D.R., 2015. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture* 449, 94–107. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.01.010
- Tomaino, A., Cimino, F., Zimbalatti, V., Venuti, V., Sulfaro, V., De Pasquale, A., Saija, A., 2005. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chem.* 89, 549–554. doi:10.1016/j.foodchem.2004.03.011
- Van Haute, S., Raes, K., Van der Meeren, P., Sampers, I., 2016. The effect of cinnamon, oregano and thyme essential oils in marinade on the microbial shelf life of fish and meat products. *Food Control* 68, 30–39. doi:10.1016/j.foodcont.2016.03.025
- Vieira, S.A., Zhang, G., Decker, E.A., 2017. Biological implications of lipid oxidation products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* doi:10.1007/s11746-017-2958-2
- Visentainer, J. V., de Souza, N.E., Makoto, M., Hayashi, C., Franco, M.R.B., 2005. Influence of diets enriched with flaxseed oil on the α -linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acid in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food Chem.* 90, 557–560. doi:10.1016/j.foodchem.2004.05.016
- Vyncke, W., 1970. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette Seifen Anstrichm.* doi:10.1002/lipi.19700721218
- Yadav, M.K., Chae, S.-W., Im, G.J., Chung, J.-W., Song, J.-J., 2015. Eugenol: A Phyto-Compound Effective against Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Clinical Strain Biofilms. *PLoS One* 10, e0119564. doi:10.1371/journal.pone.0119564

Yang, C.G., Wang, X.L., Tian, J., Liu, W., Wu, F., Jiang, M., Wen, H., 2013. Evaluation of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gene* 527, 183–192. doi:10.1016/j.gene.2013.06.013

Tabela 1. Características dos primers utilizados neste estudo.

Primer	Sequência	(pb) ^a	Número de acesso
GPX	F: CGCCGAAGGTCTCGTTATTT R: TCCCTGGACGGACATACTT	107	NM_001279711.1
GSS	F: TACCGAGCGTACAGCCTATATT R: TCACTGAGGCAGTTGCTTATTT	108	XM_003460466.3
CAT	F: CCCAGCTCTTCATCCAGAAAC R: GCCTCCGCATTGTACTIONTCTT	103	JF801726.1
β -actina	F: TGGTGGGTATGGGTCAGAAAG R: CTGTTGGCTTTGGGGTTCA	217	XM_003455949

^aTamanho do amplicon.

Tabela 2. Efeito isolado entre níveis de óleo essencial de cravo nas rações e período de fornecimento para tilápias do Nilo, antes do abate para desempenho animal (PF – peso final, CF – comprimento final, GPD – ganho de peso final, CA – conversão alimentar, RF – rendimento de filé), poder antioxidante (DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, FRAP – Ferric Reducing Ability Power, ABTS – Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico)), análise instrumental, oxidação lipídica, expressão gênica (CAT – catalase, GPX – glutathione peroxidase, GSS – glutathione sintetase) e análise sensorial.

Itens	Controle ^a	Níveis ^b			Períodos ^c			SEM ^d	Efeito (valor de p)			Contraste ^e
		0.70	1.05	1.40	15	45	60		Níveis	Períodos	N x P	
Desempenho animal												
PF (g)	675,32	667,81	691,43	698,02	696,9	674,26	686,1	8,48	0,5075	0,7054	0,9631	0,6210
CF (cm)	25,8	25,68	26,09	26,23	26,04	25,89	26,07	0,14	0,4332	0,9102	0,8278	0,5683
GPD (g)	5,76	5,67	5,95	6,00	6,02	5,72	5,88	0,10	0,5544	0,6462	0,9720	0,6395
CA	1,81	1,81	1,77	1,77	1,72	1,82	1,81	0,02	0,8648	0,2672	0,8141	0,7002
RF (%)	31,4	31,06	31,7	31,84	31,5	31,49	31,6	0,17	0,3050	0,9744	0,8633	0,8296
Poder antioxidante (µmol ET g ⁻¹)												
DPPH	18.61	17.62 ^A	17.68 ^A	16.37 ^B	16.31 ^a	17.20 ^b	18.15 ^c	0.21	<0.0000	<0.0000	<0.0000	<0.0000
FRAP	4.65	4.57 ^B	4.99 ^A	4.67 ^B	4.73	4.77	4.73	0.04	<0.0000	0.7347	<0.0000	0,2422
ABTS	32.79	32.79	32.22	32.41	30.03 ^b	33.39 ^a	34.01 ^b	0.29	0.1760	<0.0000	0.0977	0,4213
Oxidação lipídica (mg malonaldeído.kg-1)												
1 dia	0,030	0,030 ^{AB}	0,033 ^B	0,029 ^A	0,033 ^a	0,029 ^{ab}	0,030 ^b	0,00	0.0270	0.0426	0.0103	0,8423
7 dias	0,106	0,062 ^A	0,065 ^A	0,077 ^B	0,074 ^b	0,066 ^b	0,064 ^a	0,00	0.0001	0.0134	0.0110	<0,0000
14 dias	0,173	0,149 ^B	0,151 ^B	0,123 ^A	0,124 ^a	0,171 ^b	0,129 ^a	0,00	0.0001	<0.0000	0.0021	0,0004

Continua

Tabela 2. (Continua)

Itens	Controle ^a	Níveis ^b			Períodos ^c			SEM ^d	Efeito (valor de p)			Contraste ^e	
		0.70	1.05	1.40	15	45	60		Níveis	Períodos	N x P		
Análise instrumental													
Textura (N)	3,37	4,43	4,36	4,49	4,53	4,37	4,39	0,08	0,6393	0,4844	0,9802	<0,0000	
pH	6,00	6,11	6,03	6,07	6,05	6,04	6,07	0,01	0,3225	0,784	0,1517	0,2152	
	L*	49,31	48,49	49,97	49,61	49,59	49,36	49,11	0,30	0,1926	0,8486	0,4965	0,9682
Cor	a*	-3,08	-3,27	-3,45	-3,45	-3,38	-3,44	-3,35	0,06	0,4234	0,8297	0,2218	0,1269
	b*	1,72	1,38	1,41	1,06	1,48	1,52	0,84	0,21	0,7892	0,4124	0,3408	0,5436
Expressão gênica (UA)													
CAT	0,281	0,050	0,020	0,036	0,043	0,036	0,026	0,02	0,0979	0,4301	0,6835	<0,0000	
GPX	0,076	0,305	0,285	0,235	0,322	0,344	0,160	0,04	0,7757	0,1628	0,0838	0,1194	
GSS	0,881	0,031	0,032	0,036	0,053	0,033	0,013	0,05	0,9699	0,1378	0,1178	<0,0000	
Análise sensorial													
Aroma	6,77	6,91	6,92	6,8	6,88	6,86	6,90	0,05	0,9269	0,5378	0,5522	0,4791	
Textura	7,24	7,36	7,33	7,28	7,20	7,42	7,35	0,04	0,1261	0,7576	0,2266	0,5618	
Sabor	6,89	7,13	7,03	7,05	7,02	7,06	7,05	0,05	0,9304	0,4668	0,9643	0,3379	
Aceitação geral	6,93	7,18	7,12	7,00	7,04	7,16	7,10	0,05	0,5964	0,3191	0,6556	0,2820	

^aRação sem inclusão de óleo essencial.

^bg kg⁻¹ de óleo essencial de cravo nas rações.

^cDias de fornecimento das rações.

^dErro padrão da média.

^eContraste entre tratamento controle e OEcl

Letras maiúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) na linha para efeito de níveis.

Letras minúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) na linha para efeito de período.

Tabela 3. Poder antioxidante das rações experimentais.

Itens	Poder antioxidante ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$)		
	DPPH ^b	FRAP ^c	ABTS ^d
Controle ^a	10,34	9,86	24,85
g kg ⁻¹ de OEcl			
0,70	14,21 ^{B*}	14,60 ^{C*}	25,10 ^C
1,05	14,74 ^{B*}	16,63 ^{B*}	28,00 ^{B*}
1,40	16,22 ^{A*}	20,38 ^{A*}	30,93 ^{A*}
SEM ^e	0,57	0,98	0,67
Valor de p			
Efeito	< 0,000	< 0,000	< 0,000

* Difere ($p < 0,05$) em relação ao tratamento controle.

Letras maiúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) na coluna.

^aRação sem inclusão de óleo essencial.

^b2,2-difenil-1-picril-hidrazil.

^cFerric Reducing Ability Power.

^dÁcido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico).

^eErro padrão da média.

Tabela 4. Interação entre níveis de óleo essencial de cravo nas rações e períodos de fornecimento para tilápias do Nilo, antes do abate sobre o poder antioxidante nos filés pelos ensaios DPPH e FRAP.

Níveis ^d	Períodos ^e			Controle ^a	SEM ^f
	15	45	60		
DPPH ^b				18,61	
0,70	15,64 ^{Bb*}	18,56 ^{Aa}	18,66 ^{Aa}		0,21
1,05	16,44 ^{Ac*}	17,60 ^{Ab}	18,99 ^{Aa}		
1,40	16,86 ^{Aa*}	15,45 ^{Bb*}	16,80 ^{Ba*}		
FRAP ^c				4,65	
0,70	4,55 ^B	4,74 ^{AB}	4,41 ^B		0,04
1,05	5,09 ^{A*}	5,04 ^{A*}	4,81 ^A		
1,40	4,55 ^{Bb}	4,52 ^{Bb}	4,95 ^{Aa*}		

*Difere ($p < 0,05$) em relação ao tratamento controle.

Letras maiúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) na coluna.

Letras minúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) na linha.

^aRação sem inclusão de óleo essencial.

^b2,2-difenil-1-picril-hidrazil.

^cFerric Reducing Ability Power.

^dg kg⁻¹ de óleo essencial de cravo nas rações.

^eDias de fornecimento das rações.

^fErro padrão da média.

Tabela 5. Interação entre níveis de óleo essencial de cravo nas rações e períodos de fornecimento para tilápias do Nilo sobre a oxidação lipídica (mg malonaldeído.kg⁻¹), nos filés armazenados em expositor a 4 °C por 14 dias.

Período de avaliação	Níveis ^b	Períodos ^c			Controle ^a	SEM ^f
		15	45	60		
Dia 1					0,030	
	0,70	0,032	0,031 ^{AB}	0,026		0,001
	1,05	0,034	0,032 ^B	0,032		
	1,40	0,031 ^{ab}	0,023 ^{Aa}	0,032 ^b		
Dia 7					0,106	
	0,70	0,063 ^{A*}	0,062 [*]	0,061 [*]		0,003
	1,05	0,066 ^{A*}	0,069 [*]	0,059 [*]		
	1,40	0,093 ^{Bb}	0,067 ^{a*}	0,072 ^{a*}		
Dia 14					0,173	
	0,70	0,123 ^{a*}	0,199 ^{Bb}	0,116 ^{Aa*}		0,005
	1,05	0,134 [*]	0,168 ^A	0,152 ^B		
	1,40	0,105 ^{a*}	0,148 ^{Ab}	0,117 ^{ABab*}		

*Difere (p< 0,05) em relação ao tratamento controle.

Letras maiúsculas indicam diferença significativa (p<0,05) na coluna.

Letras minúsculas indicam diferença significativa (p<0,05) na linha.

^aRação sem inclusão de óleo essencial.

^bg kg⁻¹ de óleo essencial de cravo nas rações.

^cDias de fornecimento das rações.

Tabela 6. Faixa etária dos consumidores da análise sensorial.

Faixa etária (anos)	Total	Men	Women
<24 (%)	43,33	42,11	44,44
25-39 (%)	30,00	26,32	33,33
40-54(%)	10,83	12,28	9,52
>54 (%)	15,83	19,30	12,70
Total (%)	100	47,50	52,50
Total (n°)	120	57	63

Tabela 7. Frequência de consumo de diferentes tipos de carnes pelos consumidores da análise sensorial.

	Bovino	Aves	Suíno	Peixe	Ovino
Não consome	2,50	1,67	6,67	5,83	53,33
1 vez por mês	0,83	2,50	20,83	29,17	40,83
2 vezes ao mês	0,83	8,33	24,17	29,17	3,33
1 vez por semana	6,67	27,50	33,33	25,00	1,67
2-4 vezes por semana	60,00	44,17	12,50	9,17	0,00
Mais de 4 vezes por semana	29,17	15,83	2,50	1,67	0,83

Tabela 8. Perfil dos consumidores em relação a compra de carne de peixe e informação sobre os óleos essenciais.

Perguntas		%
Aonde você compra seu peixe?	Peixaria	21,77
	Supermercado	58,33
	Pesque pague	9,17
	Outros	10,00
Como você prefere comprar o peixe?	Vivo	15,00
	Resfriado	48,33
	Congelado	36,67
Qual é o fator mais importante para você escolher o peixe para comprar?	Preço	6,67
	Aparência	41,67
	Frescor	14,17
	Espécie	36,67
O óleo essencial é um produto natural. Você compraria um peixe que foi alimentado com esse produto?	Sim	87,50
	Não	12,50
Você pagaria mais caro por um peixe alimentado com óleo essencial?	Sim	55,83
	Não	44,17

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção aquícola no Brasil, apresentou crescimento significativo na última década. As tilápias destacam-se entre as espécies produzidas no país, apresentando um pacote tecnológico desenvolvido e difundido, além de uma carne (filés) com sabor neutro e muito bem aceita pelos consumidores.

Na tilapicultura, a nutrição, sanidade, manejo e melhoramento genético são linhas de pesquisa desenvolvidas no Brasil. Entretanto, novos desafios são enfrentados diariamente pelos produtores e indústria para atender as exigências do mercado. A aparência do peixe foi o principal fator mencionado para compra pelos consumidores (painel sensorial) neste trabalho, todavia, os produtores e a indústria devem atender outros fatores como preço, espécie e frescor.

Uma das linhas de pesquisa para melhorar a qualidade do pescado, neste caso o filé de tilápia, é o emprego de substâncias que inibem os processos que levam a redução da qualidade por ação fisiológica, química e microbiológica. Uma das propostas é o emprego de antioxidantes diretamente nos filés, entretanto, algumas substâncias químicas apresentam riscos ao consumidor e ao mesmo tempo alguns produtos naturais alteram o odor e sabor do filé.

Conhecendo o poder antioxidante dos óleos essenciais e sua limitação quando aplicado diretamente no produto (filés), o objetivo do trabalho foi avaliar via alimentação das tilápias. Óleo essencial de cravo e canela foram escolhidos para este estudo por apresentarem maior poder antioxidante entre 20 óleos essenciais anteriormente estudados. Para isso, o trabalho foi realizado em duas etapas: experimento em condições controladas dividido em dois trabalhos sendo o 1º avaliando os dois óleos essenciais escolhidos (artigo 1) e o segundo avaliando o tempo de fornecimento da ração (dados não apresentados nesta tese). Na segunda etapa em

condições comerciais de produção (tanque rede) avaliando níveis e períodos de fornecimento do óleo essencial de cravo (artigo 2).

Nas condições em que os experimentos foram realizados e com base nos resultados, pode-se concluir que o óleo essencial de cravo apresenta boa eficiência como agente antioxidante nos filés de tilápias, proporcionado por um período (15 dias) curto de alimentação dos animais com a ração suplementada ($1,05 \text{ g.kg}^{-1}$ de ração). Deve-se considerar o valor desse produto na ração e seu impacto no produto final (custo dos filés para o consumidor).

O aumento do poder antioxidante nos filés não foi observado, em outras palavras, as substâncias com atividade antioxidante, exemplo o eugenol, não foi depositada nos mesmos, entretanto, foi observado menor oxidação lipídica que pode estar relacionado ao menor estresse oxidativo observado com a análise de expressão gênica.

Concluindo que o óleo essencial de cravo é uma alternativa para melhorar a qualidade dos filés via alimentação das tilápias, sem prejudicar o desempenho dos animais e aceitação sensorial. Em relação ao óleo de canela, que apresentou ação pró-oxidante outros estudos devem ser realizados empregando doses menores.