

Estabilidade lipídica de filés de carpa húngara congelados tratados com extratos de *Lippia alba*

Lipid stability of frozen common carp fillets treated with *Lippia alba* extract

Ana Paula de Lima Veeck^{I,II} Bruna Klein^{II} Amanda Roggia Ruviano^{II}
Andréia Quatrin^{II} Lauren Fresinghelli Ferreira^{II} Ana Paula Daniel^{II}
Jaqueline Piccolo^{II} Maurício Schneider Oliveira^{III} Carlos Augusto Mallmann^{III}
Berta Maria Heinzmann^{IV} Tatiana Emanuelli^{*}

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da aspersão de extratos de *Lippia alba* na estabilidade lipídica de filés de carpa húngara armazenados a $-18\pm 2^{\circ}\text{C}$. Filés não tratados (controle sem aspersão) ou aspergidos ($1\text{mL } 10\text{g}^{-1}$ de filé) com água destilada (controle água destilada) ou com extratos de *L. alba* ($0,10\text{g mL}^{-1}$) hidrometanólico ou aquoso foram analisados durante o armazenamento nos dias zero, 90 e 180. Independente do tempo de congelamento, o extrato hidrometanólico reduziu os valores de dienos conjugados (DC) dos filés em relação aos demais tratamentos, além de reduzir os valores de ácidos graxos livres aos 90 dias ($P<0,05$). O extrato aquoso resultou em maior teor de peróxidos após 180 dias de congelamento comparado aos demais tratamentos ($P<0,05$). Os extratos hidrometanólico e aquoso reduziram os valores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) após 180 dias, comparados aos filés tratados com água destilada e sem aspersão ($P<0,05$). Ambos os extratos de *L. alba* retardaram a oxidação lipídica, sendo que o extrato aquoso retardou a degradação de produtos primários da oxidação lipídica (peróxidos) em produtos secundários (TBARS), enquanto o extrato hidrometanólico parece ser mais eficiente, pois inibiu de forma similar tanto a formação de DC e peróxidos, quanto a sua degradação em produtos secundários (TBARS).

Palavras-chave: *Lippia alba*, pescado, *Cyprinus carpio*, antioxidante.

ABSTRACT

The effect of sprinkling with *Lippia alba* extracts was evaluated on the lipid stability of common carp fillets stored at $-18\pm 2^{\circ}\text{C}$. Fillets that received no treatment (no spray control) or that were sprayed ($1\text{mL } 10\text{g}^{-1}$ fillet) with distilled water (water control) or with hydro-methanolic or aqueous extract of *L. alba* (0.10g

mL^{-1}) were evaluated immediately (time zero) and after 90 and 180 days. Regardless of the storage time, the hydro-methanolic extract reduced the conjugated dienes (CD) values of fillets compared to the other treatments, and reduced the free fatty acid levels at 90 days ($P<0.05$). The aqueous extract caused higher peroxide value after 180 days of frozen storage compared to the other treatments ($P<0.05$). The hydro-methanolic and aqueous extracts reduced thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) values after 180 days compared to the non-treated fillets or to the water-sprayed fillets ($P<0.05$). Both extracts have delayed lipid oxidation. While the aqueous *L. alba* extract delayed the degradation of primary oxidation products (peroxides) into secondary products (TBARS), the hydro-methanolic extract was more efficient as it inhibited both the CD and peroxide formation and its degradation into secondary products (TBARS).

Key words: *Lippia alba*, fish, *Cyprinus carpio*, antioxidant.

INTRODUÇÃO

Devido ao elevado conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados, os pescados são bastante suscetíveis a reações de oxidação lipídica durante o armazenamento congelado (HOSSEINI et al., 2010). O monitoramento de produtos primários (dienes conjugados, DC e peróxidos, VP) e secundários da oxidação (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, TBARS) permite acompanhar a evolução deste processo de perda de qualidade do pescado congelado (DAMODARAN et al., 2007).

^IInstituto Federal de Santa Catarina (IFSC), 88506-400, Lages, SC, Brasil. E-mail: tatiemanuelli@gmail.com. * Autor para correspondência.

^{II}Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais (NIDAL), Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

^{III}Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, CCR, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

^{IV}Departamento de Farmácia Industrial, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

A oxidação lipídica resulta em sabores e odores desagradáveis e mudanças de cor, fatores que limitam a validade comercial do produto (DAMODARAN et al., 2007). Outra alteração lipídica que pode comprometer a qualidade dos pescados congelados é a hidrólise de triglicerídeos em ácidos graxos livres (AGL). Esta reação é catalisada por lipases e fosfolipases endógenas, que podem continuar ativas em temperaturas de até -40°C , e resulta na rancificação hidrolítica do produto (FIDALGO et al., 2014).

Dessa forma, diversos métodos de conservação têm sido avaliados para prevenir ou retardar as alterações oxidativas na fração lipídica de alimentos congelados, tais como embalagens ativas e aditivos antioxidantes (GÓMEZ-ESTACA et al., 2014). No entanto, tem crescido a preocupação dos consumidores quanto aos efeitos nocivos dos aditivos químicos na saúde humana, exigindo da indústria alimentícia fontes naturais que possam substituir os antioxidantes sintéticos (DOLATABADI & KASHANIAN, 2010), cuja segurança vem sendo questionada (CAROCHO & FERREIRA, 2013). Naturalmente presentes nos vegetais, compostos bioativos como os compostos fenólicos e o tocoferol são alguns dos responsáveis pela atividade antioxidante de diversas plantas, apresentando efeito semelhante aos compostos sintéticos (KRISHNAIAH et al., 2011).

A *Lippia alba* (*Verbenaceae*) é uma planta nativa da América do Sul, conhecida popularmente como erva-cidreira-de-arbusto (BIASI & COSTA, 2003). A ação antioxidante do óleo essencial de *L. alba* já foi demonstrada em alguns trabalhos *in vitro* (STASHENKO et al., 2003; 2004) e a adição do óleo essencial como sedativo na água de transporte de jundiá (*Rhamdia quelen*) retardou a oxidação lipídica dos filés durante o armazenamento congelado (VEECK et al., 2013). Além disso, o extrato metanólico de folhas e flores de *L. alba* apresentou potencial antioxidante semelhante ao do ácido ascórbico para remover o radical sintético 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) e para reduzir o Fe^{3+} a Fe^{2+} (ARA & NUR, 2009). No entanto, o efeito de diferentes extratos de *L. alba* durante o armazenamento de alimentos congelados ainda não foi avaliado.

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da aspersão com extratos aquoso e hidrometanólico de *L. alba* sobre a estabilidade lipídica de filés de carpa húngara congelados durante 180 dias, para determinar o seu potencial como antioxidante em pescados. A carpa húngara, que é uma variedade melhorada da carpa comum, originária da Europa Oriental e da Ásia Ocidental e cultivada na região sul do Brasil, foi escolhida por ser uma espécie

rústica, resistente a diferentes temperaturas e de fácil criação, além de, possuir uma carne tenra e de boa digestibilidade (SEBBEN et al., 2000).

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das plantas e extratos de *L. alba*

Amostras de *L. alba* foram coletadas de três exemplares localizados em Santa Maria ($29^{\circ}41'S$, $53^{\circ}48'N$), RS, Brasil. As folhas e galhos *in natura* (3kg) foram secos em estufa a vácuo ($60^{\circ}\text{C}/24\text{h}$) e em seguida triturados. Para a obtenção do extrato hidrometanólico, as amostras trituradas (7,5g) foram dissolvidas em metanol (225mL) e tratadas em banho de ultrassom (Thornton, modelo T14) por 180min a 75°C (JACQUES et al., 2007). Após, o extrato foi filtrado em papel filtro qualitativo (gramatura 80g) e evaporado em rotaevaporador (aprox. $60^{\circ}\text{C}/$ rotação 5rpm /aprox. 1h) e o resíduo seco foi ressuspensão em água destilada (75mL). Para obtenção do extrato aquoso, as amostras trituradas (10g) foram misturadas à água destilada (100mL) a 75°C , agitadas e filtradas em papel filtro.

Análise de compostos fenólicos

A identificação e quantificação de compostos fenólicos dos extratos hidrometanólico e aquoso de *L. alba* foi realizada utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent série 1200), acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (Applied Biosystems API 5000). As amostras foram diluídas (1:100) e injetadas (20 μL) em uma coluna C18 (4,6mm x 150mm, 5 μm de diâmetro de partículas), utilizando como fase móvel solução aquosa de ácido acético 1% (A) e metanol (B), com fluxo de 0,5mL min^{-1} a 45°C . O perfil do gradiente foi de 100% (A) durante 1min, 50% (B) por 3min e 80% (B) até 7min, em seguida, foi mantida constante durante 2min, seguido de 100% (B) até 12min, após foi novamente mantido constante durante 2min. A fase móvel foi então retornada às condições iniciais após 6min. As soluções dos padrões de ácido clorogênico, apigenina, luteolina, quercetina, rutina, isoquercitrina, taxifolina (Sigma-Aldrich, St Louis, MA, EUA), foram preparadas na fase móvel, em concentrações que variaram entre 10 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os parâmetros dos compostos e as transições de massa utilizadas para identificação de cada analito foram otimizados através da técnica de infusão a um fluxo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ (energia de colisão, potencial de saída da cela de colisão e potencial de orifício). Os parâmetros da fonte foram otimizados por análise de injeção em fluxo, sendo pressão do gás

de cortina 10psi, pressão do gás nebulizador 60psi, pressão do gás de aquecimento 30psi, voltagem do *eletrospray* -3700V, pressão do gás de colisão 8psi). A temperatura da fonte foi otimizada em 650°C. A identificação e quantificação dos analitos foi realizada com padrão externo, comparando o tempo de retenção e a relação entre as transições de cada analito encontrado nas amostras aos padrões.

Obtenção e tratamento de filés de carpa húngara

Dezoito peixes (*Cyprinus carpio*, 493,1±119,6g, 28,3±1,9cm de comprimento total) foram adquiridos no comércio local, imediatamente após o abate e transportados até o laboratório em caixas térmicas com gelo em escamas. Após lavagem com água corrente, os peixes foram filetados manualmente. Os filés (36 filés, peso unitário: 78,0±11,3g) foram divididos aleatoriamente em três lotes (repetições) e cada lote foi dividido igualmente entre os quatro tratamentos: filés não aspergidos (controle não aspergido); filés aspergidos (1mL 10g⁻¹ de filé) com água destilada (controle água destilada); filés aspergidos com extrato hidrometanólico; filés aspergidos com extrato aquoso. Após o tratamento dos filés, uma porção das amostras de cada repetição foi utilizada para avaliar a composição centesimal, a hidrólise lipídica e os indicadores de oxidação lipídica. O restante dos filés foi embalado em bandejas de poliestireno cobertas com filme plástico e armazenadas a -18±2°C, sendo avaliadas após 90 e 180 dias quanto à hidrólise e oxidação lipídica. Três filés independentes de cada tratamento foram utilizados em cada tempo de armazenagem (n=3).

Análise dos filés

A composição centesimal dos filés foi determinada imediatamente após os tratamentos, sendo a umidade determinada pela perda de peso após 4h a 60°C, em estufa de circulação forçada de ar, seguido de 8h a 105°C. O teor de cinzas foi determinado a 550°C e a proteína bruta (N × 6,25) foi avaliada através do método de micro Kjeldahl (AOAC, 1995). O teor de gordura foi determinado gravimetricamente (BLIGH & DYER, 1959).

DC, VP e AGL foram determinados na gordura previamente extraída segundo BLIGH & DYER (1959). O teor de DC foi determinado através da absorvância em 233nm, utilizando ciclohexano como solvente (RECKNAGEL & GLENDE, 1984). VP foi avaliado pelo método do tiocianato férrico (CHAPMAN & MACKAY, 1949) e AGL foi determinado em 725nm, usando acetato cúprico-piridina como reagente de cor (LOWRY & TINSLEY, 1976).

Amostras (1g) de filés foram homogeneizadas com solução de KCl 1,5%, na proporção de 1:5 (m/v), centrifugadas a 3000×g, durante 10min e o sobrenadante foi usado para a determinação de TBARS conforme BUEGE & AUST (1978) modificado por VEECK et al. (2013), utilizando uma curva padrão de 1,1,3,3-tetra-etoxipropano.

Análise estatística

Os resultados da composição centesimal foram analisados usando análise de variância (ANOVA) e os demais resultados foram analisados usando ANOVA em arranjo fatorial (4 tratamentos x 3 tempos), através do programa Statistica® 9.0 (StatSoft Inc.; Tulsa, OK, EUA). As diferenças entre as médias foram verificadas pelo teste de Duncan, sendo que as diferenças foram consideradas significativas quando P<0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extratos de *L. alba*

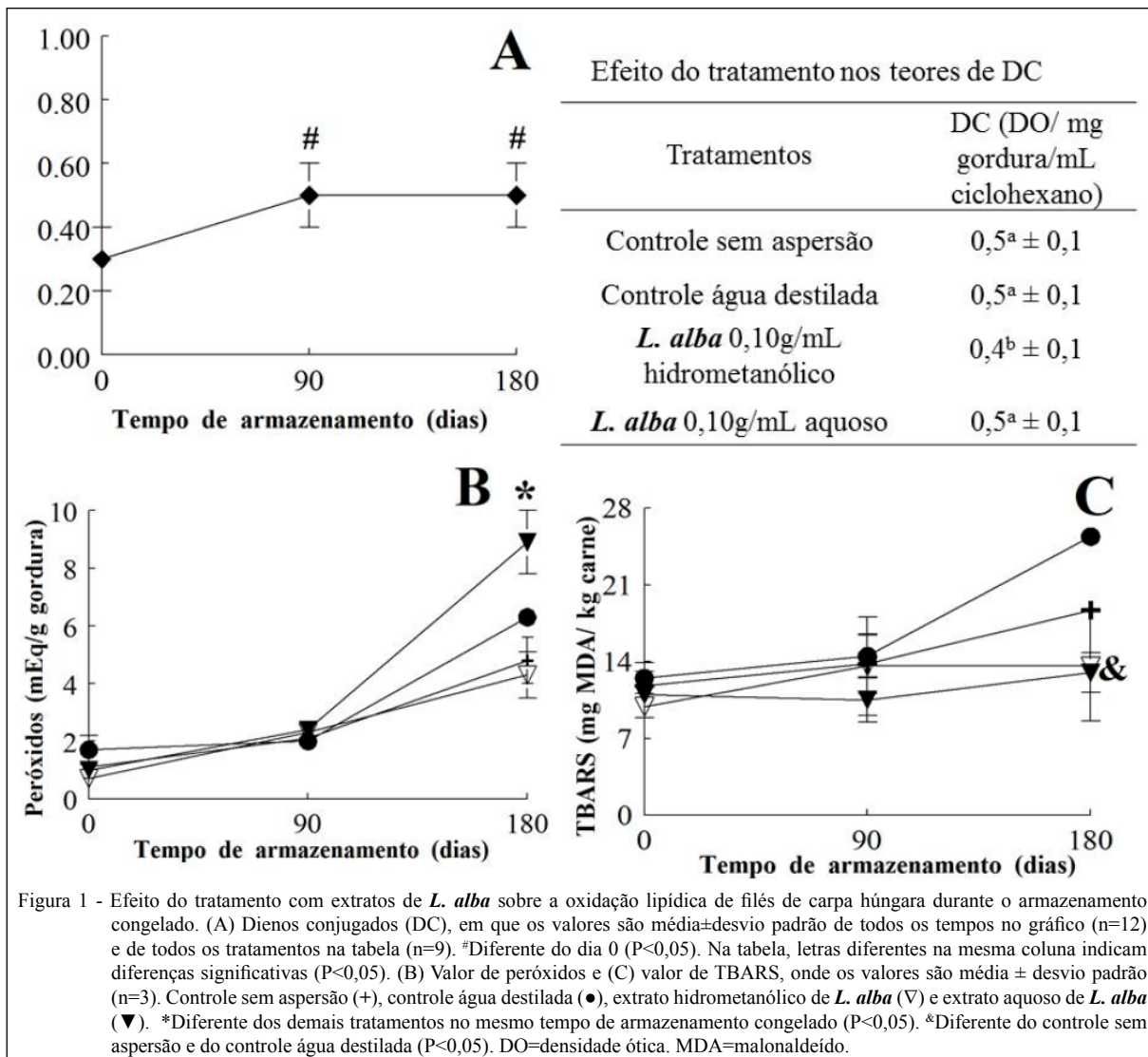
No extrato hidrometanólico, que foi obtido com o uso de ultrassom, os compostos encontrados em maior concentração foram: luteolina (7,0µg mL⁻¹), rutina (6,1µg mL⁻¹), apigenina (2,9µg mL⁻¹) e taxifolina (1,4µg mL⁻¹), seguidos de quercetina (0,5µg mL⁻¹) e isoquercitrina (0,4µg mL⁻¹). O extrato aquoso de *L. alba* apresentou maior concentração de rutina (2,0µg mL⁻¹) e luteolina (1,4µg mL⁻¹), seguidos do ácido clorogênico (0,8µg mL⁻¹) e apigenina (0,6µg mL⁻¹). O maior teor de compostos fenólicos no extrato hidrometanólico, em comparação com o extrato aquoso, pode estar relacionado à maior eficiência do metanol para extrair estes compostos e também ao uso do ultrassom, que aumenta a eficiência na extração de compostos fenólicos, devido aos efeitos de cavitação acústica, produzidos no solvente, os quais permitem sua melhor penetração na amostra, facilitando a liberação dos compostos para o solvente (ROSTAGNO, 2003). Tanto a rutina quanto a luteolina são eficientes antioxidantes *in vitro* (YANG et al., 2008; YOKOZAWA et al., 1997). Estudos recentes comprovam a atividade antioxidante de extratos de plantas, que foi correlacionada principalmente com a concentração de compostos fenólicos, como a luteolina ou a luteolina glicosada (JEONG et al., 2010; TSAI et al., 2014). Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* usando a rutina extraída de plantas revelaram diversas atividades biológicas, incluindo a atividade antioxidante (CHUA, 2013). Assim, por também terem sido encontrados em maior concentração, sugere-se que a rutina e a luteolina sejam os principais contribuintes para a atividade antioxidante dos extratos de *L. alba*.

Avaliação dos filés

A composição centesimal média (g 100g⁻¹ de peso úmido) dos filés utilizados foi de 75,4±1,2 de umidade, 1,3±0,3 de cinzas, 13,4±0,8 de proteína, e 5,6±1,4 de gordura, sem diferença estatística entre os tratamentos.

Houve efeito significativo do tempo de armazenamento congelado e dos tratamentos (P<0,05), sem interação entre esses parâmetros sobre os valores de DC (Figura 1A). Os valores de DC dos filés de carpa húngara aumentaram após 90 dias de armazenamento em relação ao tempo zero (P<0,05) (Figura 1A), resultado semelhante ao encontrado em filés de jundiá armazenados congelados (VEECK et al., 2013). Independente do tempo de armazenagem, o extrato hidrometanólico de *L. alba* reduziu os valores de DC dos filés em relação a todos os demais

tratamentos (P<0,05). Este resultado indica que o extrato hidrometanólico inibe a etapa de iniciação da oxidação lipídica, pois os DC resultam do rearranjo das duplas ligações dos ácidos graxos insaturados após a remoção do hidrogênio do grupo metilênico adjacente à dupla ligação (DAMODARAN et al., 2007). Os ácidos graxos contendo um elétron desemparelhado, além de sofrer rearranjo da dupla ligação, também reagem rapidamente com o oxigênio molecular para formar radicais peroxil, que podem atacar um novo ácido graxo insaturado, formando hidroperóxidos e novos radicais livres de ácidos graxos, que propagam a reação em cadeia (DAMODARAN et al., 2007). Em relação ao VP, houve interação tempo de armazenamento x tratamento (P<0,05, figura 1B). Os VPs aumentaram entre 90 e 180 dias de congelamento, sendo que, em 180 dias, os filés



tratados com o extrato aquoso de *L. alba* apresentaram VP superior aos demais ($P < 0,05$; Figura 1B).

Os hidroperóxidos são instáveis e decompõe-se facilmente em hidrocarbonetos de cadeia curta como os aldeídos, que podem ser avaliados pelo valor de TBARS (DAMODARAN et al., 2007). Houve uma interação significativa tempo x tratamento nos valores de TBARS ($P < 0,05$, Figura 1C). Em 180 dias de armazenamento, os valores de TBARS aumentaram apenas nas amostras controle sem aspersão e água destilada, resultando em menores valores de TBARS nos filés tratados com ambos os extratos de *L. alba* ($P < 0,05$; Figura 1C).

O maior VP associado ao menor valor de TBARS dos filés tratados com o extrato aquoso de *L. alba* aos 180 dias de congelamento indicam que este extrato retardou a degradação de peróxidos (produtos primários da oxidação lipídica) em produtos secundários da oxidação lipídica (TBARS), quando comparado com os filés controle. Por outro lado, o extrato hidrometanólico de *L. alba* parece inibir de forma similar tanto a formação de peróxidos, quanto a sua degradação em produtos secundários, já que, em 180 dias, a redução no valor de TBARS dos filés tratados com este extrato não foi acompanhada por um

aumento nos níveis do seu precursor (peróxidos). Estes resultados estão de acordo com evidências anteriores sobre o potencial antioxidante dos extratos de *L. alba* que foram capazes de remover o radical sintético de DPPH *in vitro* (ARA & NUR, 2009). Além disso, os aldeídos resultantes da oxidação lipídica (avaliados pelo valor de TBARS) são os responsáveis pelo odor característico de ranço e consequentemente pela rejeição dos alimentos oxidados (DAMODARAN et al., 2007). Dessa forma, o retardo na formação de TBARS, observado nos filés tratados com *L. alba*, em relação ao controle, no final do armazenamento, pode contribuir para estender a validade comercial do pescado, em se tratando da oxidação lipídica.

A hidrólise de ésteres de glicerol de ácidos graxos liberando AGL é uma importante alteração *post mortem* que ocorre nos lipídeos do pescado, resultando na rancificação hidrolítica (FIDALGO et al., 2014). O conteúdo de AGL foi afetado pelo tempo de armazenamento congelado e pelos tratamentos, com interação entre ambas as variáveis ($P < 0,05$, Figura 2). O conteúdo de AGL apresentou um pico aos 90 dias de armazenamento, retornando posteriormente aos valores iniciais (Figura 2). Este aumento pode ser explicado pela

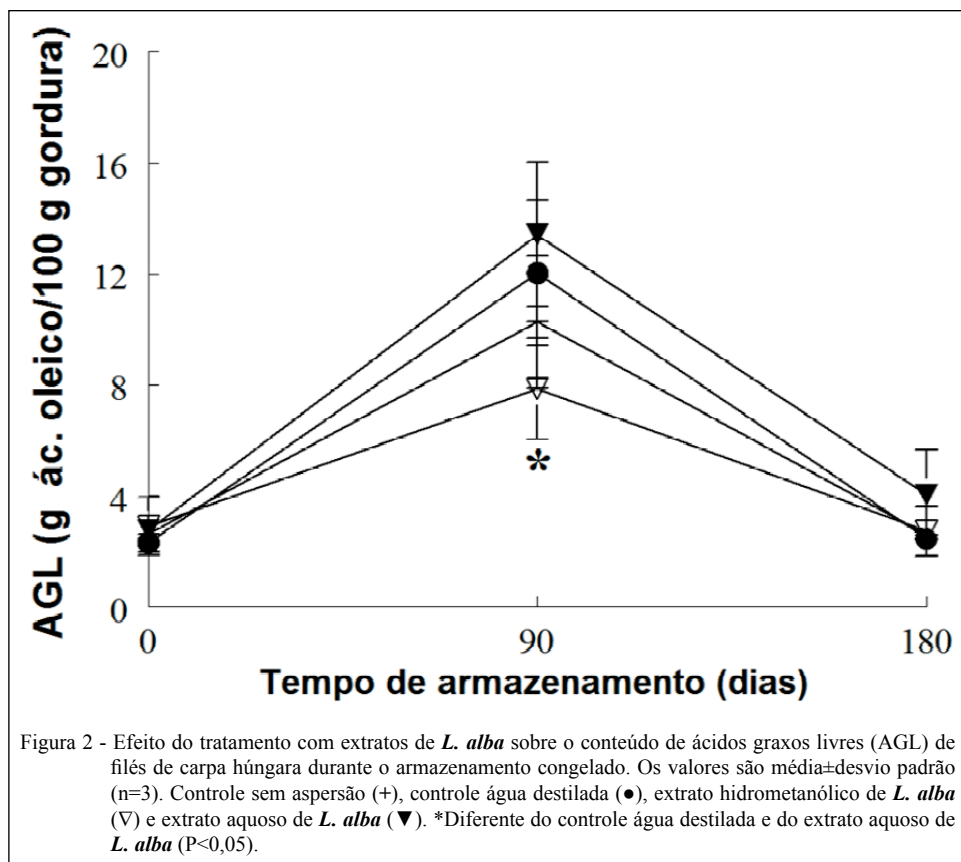


Figura 2 - Efeito do tratamento com extratos de *L. alba* sobre o conteúdo de ácidos graxos livres (AGL) de filés de carpa húngara durante o armazenamento congelado. Os valores são média±desvio padrão (n=3). Controle sem aspersão (+), controle água destilada (●), extrato hidrometanólico de *L. alba* (▽) e extrato aquoso de *L. alba* (▼). *Diferente do controle água destilada e do extrato aquoso de *L. alba* ($P < 0,05$).

presença de lipases e fosfolipases endógenas dos filés, que continuam ativas durante o congelamento (FIDALGO et al., 2014). Comportamento similar foi encontrado em filés de jundiás (*R. quelen*) que foram expostos *in vivo* ao óleo essencial de *L. alba* durante o armazenamento congelado (VEECK et al., 2013). Aos 90 dias de armazenamento, os filés tratados com o extrato hidrometanólico de *L. alba* apresentaram menores valores de AGL que os filés tratados com o extrato aquoso ou os filés controle água destilada ($P < 0,05$). Este menor valor de AGL aos 90 dias de congelamento indica que o extrato hidrometanólico pode inibir a atividade das lipases endógenas. Sendo os AGL mais propensos à oxidação que os ácidos graxos esterificados (DAMODARAN et al., 2007), o menor valor de AGL pode ter contribuído para retardar a oxidação dos filés tratados com o extrato hidrometanólico de *L. alba* a partir dos 90 dias, resultando em menor VP destes filés aos 180 dias de congelamento. Por outro lado, nos filés tratados com o extrato aquoso de *L. alba*, sugere-se que, além do retardo na degradação de peróxidos em TBARS (constatado após 180 dias), o maior valor de AGL observado em 90 dias de armazenagem também tenha contribuído para aumentar o VP em 180 dias, uma vez que os AGL são mais propensos à oxidação.

Os resultados obtidos demonstram o potencial de utilização do extrato de *L. alba* para retardar a oxidação lipídica de filés de pescado, principalmente no caso do extrato hidrometanólico, obtido por extração assistida com ultrassom. Este extrato apresentou maior concentração de luteolina (5x maior) e rutina (3x maior) que o extrato aquoso, o que pode explicar a maior proteção conferida por este extrato contra a oxidação lipídica dos filés ao longo do congelamento.

A legislação brasileira (BRASIL, Resolução CNS/MS n.04, de 24 de novembro de 1988) não permite a adição de aditivos alimentares antioxidantes em filés de pescado. No entanto, por ser uma planta amplamente consumida na forma de chá, o extrato de *L. alba* poderia ser considerado como condimento e, dessa forma, ser utilizado na água de glaceamento de filés de pescado ou mesmo em filés marinados. Esta planta parece ser segura para uso humano, visto que vem sendo consumida pelo homem como chá (extrato aquoso) há muitos anos (BIASI & COSTA, 2003; ARA & NUR, 2009).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que ambos os extratos de *L. alba* retardaram a oxidação lipídica de filés de pescado armazenados congelados, sendo que o extrato aquoso retardou a degradação de

produtos primários da oxidação lipídica (peróxidos) em produtos secundários (TBARS), enquanto o extrato hidrometanólico parece ser mais eficiente, pois inibiu de forma similar tanto a formação de dienos conjugados e peróxidos, quanto a sua degradação em produtos secundários (TBARS).

AGRADECIMENTOS

Financiamento PRONEX - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) -, Inovação em Pesca e Aquicultura - Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT)/Ministério da Pesca e Agricultura (MPA)/Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)/CT-AGRO -, Casadinho/PROCAD - MCT/CNPq/Ministério da Educação (MEC)/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), bolsas de iniciação científica e produtividade em pesquisa do CNPq.

REFERÊNCIAS

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analysis Chemists**. 16.ed. Arlington VA, 1995. 2v.

ARA, N.; NUR, H. *In vitro* antioxidant activity of methanolic leaves and flowers extracts of *Lippia alba*. **Research Journal of Medicine and Medical Sciences**, v.4, p.107-110, 2009. Disponível em: <<http://aensiweb.com/rjmms/rjmms/2009/107-110.pdf>>. Acesso em: 26 nov. 2013.

BIASI, L.A.; COSTA, G. Propagação vegetativa de *Lippia alba*. **Ciência Rural**, v.33, p.455-459, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782003000300010&script=sci_arttext>. Acesso em: 03 nov. 2013.

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

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

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.52, p.302-309, 1978.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v.51, p.15-25, 2013.

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

CHUA, L.S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v.150, p.805-817, 2013.

DAMODARAN, S. et al. **Fennema's food chemistry**. 4.ed. Boca Raton, FL, CRC, 2007. 1160p.

- DOLATABADI, J.E.N.; KASHANIAN, S. A review on DNA interaction with synthetic phenolic food additives. **Food Research International**, v.43, p.1223-1230, 2010.
- FIDALGO, L.G. et al. Effect of high-pressure pre-treatments on enzymatic activities of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) during frozen storage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.23, p.18-24, 2014.
- GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Advances in antioxidant active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v.35, p.42-51, 2014.
- HOSSEINI, S.V. et al. Influence of the *in vivo* addition of alpha-tocopheryl acetate with three lipid sources on the lipid oxidation and fatty acid composition of Beluga sturgeon, *Huso huso*, during frozen storage. **Food Chemistry**, v.118, p.341-348, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609006104>>. Acesso em: 26 nov. 2013.
- JACQUES, R.A. et al. The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.14, p.6-12, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417705001148>>. Acesso em: 04 nov. 2013.
- JEONG, C. et al. Antioxidant activities from the aerial parts of *Platycodon grandiflorum*. **Food Chemistry**, v.118, p.278-282, 2010.
- KRISHNAIAH, D. et al. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v.89, p.217-233, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308510000520>>. Acesso em: 26 nov. 2013.
- LOWRY, R.R.; TINSLEY, I.J. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.53, p.470-472, 1976.
- RECKNAGEL, R.O.; GLENDE, J.R.E.A. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. **Methods in Enzymology**, v.105, p.331-337, 1984.
- ROSTAGNO, M.A. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. **Journal Chromatography A**, v.1012, p.119-128, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967303011841>>. Acesso em: 11 nov. 2013.
- SEBBEN, C.L. et al. Rendimento e avaliação sensorial de hambúrgueres de carpa (*Cyprinus carpio*) com diferentes conduções de processamento e armazenagem sob congelamento. **Boletim CEPPA**, v.18, n.1, p.1-12, 2000. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/alimentos/article/view/1120>>. Acesso em: 04 nov. 2013.
- STASHENKO, E.E. et al. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundários volátiles de plantas de la familia verbenaceae. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias**, v.XXVII, n.105, p.579-597, 2003. Disponível em: <http://www.accefyn.org.co/revista/Vol_27/105/8-COMPARACION.pdf>. Acesso em: 03 nov. 2013.
- STASHENKO, E.E. et al. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. **Journal of Chromatography A**, v.1025, p.93-103, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967303019307>>. Acesso em: 04 nov. 2013.
- TSAI, Y. et al. Antioxidant, anti-inflammatory, and anti-proliferative activities of extracts from different parts of farmed and wild *Glossogyne tenuifolia*. **Industrial Crops and Products**, v.57, p.98-105, 2014.
- VEECK, A.P.L. et al. Lipid stability during the frozen storage of fillets from silver catfish exposed *in vivo* to the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.93, p.955-960, 2013. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.5833/abstract>>. Acesso em: 07 nov. 2013.
- YANG, J. et al. In vitro antioxidant properties of rutin. **LWT - Food Science and Technology**, v.41, p.1060-1066, 2008.
- YOKOZAWA, T. et al. Antioxidative activity of flavones and flavonols *in vitro*. **Phytotherapy Research**, v.11, p.446-449, 1997.