

# Efeito antioxidante de especiarias: avaliação e comparação de métodos *in vitro* e *in vivo*

## *Antioxidant activity of spices: evaluation and comparison of in vitro and in vivo methods*

### ABSTRACT

CINTRA, R.M.G.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant activity of spices: Evaluation and comparison of *in vitro* and *in vivo* methods. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.* = J. Brazilian Soc. Food Nutr., São Paulo, SP. v.22, p. 49-62, dez., 2001.

*In addition of their use in food to prevent rancidity and to improve the sensorial and nutritional properties, antioxidants are proposed as having beneficial effects to health, protecting the organism against oxidative stress. The "in vitro" effects in cells or tissues have been related to the protective effect. However, the characteristic of the "in vitro" systems can indicate imprecise results as for the antioxidant capacity. Among natural antioxidants, spices are considered an excellent source. To evaluate the antioxidant capacity and to compare different systems, the oregano and rosemary were tested in both, "in vivo" and "in vitro" systems. Spices extracts were added into systems containing brain or liver tissues. The brain homogenate and microsomal fraction systems were obtained from experimental animals with no previous treatment. In the "in vivo" evaluation, the animals were treated with 50mg/day of each extract. In brain homogenate, the rosemary alcoholic extract showed the best capacity of inhibition. In the microsomal system, the alcoholic of rosemary followed by the oregano presented the best effect. Different results from "in vitro" experiments were found in the biological system. In these experiments, the oregano extracts were more efficient as antioxidant. The different experimental conditions indicated discordant results as for the power of the extracts, although the antioxidant capacity has been observed in these three systems. The data obtained show that the "in vivo" studies are necessary to the evaluation of the protective effect against the consequences of oxidative stress in the organism.*

**Key word: natural antioxidant; *in vivo* antioxidant; *in vitro* antioxidant; spices; oregano; alecrim**

**RENATA MARIA GALVÃO CINTRA; JORGE MANCINI-FILHO**  
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP.

**Endereço para correspondência:**  
Av. Prof. Lineu Prestes, 580  
Caixa Postal 66083  
CEP 05315-970  
São Paulo – SP  
e-mail: j Mancini@usp.br  
Desenvolvido no Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental/FCF/USP como parte de tese de doutoramento defendida no próprio departamento.

**Agradecimentos:**  
À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) pelas bolsas de estudo concedidas.

## RESUMEN

Además de la utilización en alimentos para la prevención de rancidez y mejor calidad sensorial y nutritiva, los antioxidantes son propuestos como teniendo efectos favorables a la salud, protegiendo el organismo contra el estrés oxidativo. El efecto *in vitro* en células o tejidos han sido relacionado al efecto protector. Sin embargo, las características de sistemas *in vitro* pueden causar resultados imprecisos cuanto a la capacidad antioxidante. Entre antioxidantes naturales, las especíerías son consideradas fuentes relevantes. Afín de evaluar la capacidad antioxidante y comparar sistemas distintos, el orégano y el alecrín fueron testados *in vivo* e en dos sistemas *in vitro*. Extractos de las especíerías fueron añadidos en sistemas teniendo tejidos del cerebro o hígado obtenidos de animales experimentales sin tratamiento previo. En la evaluación *in vivo*, los animales fueron tratados con 50 mg/día de cada extracto. Todos los extractos presentaron efecto antioxidante *in vitro* e *in vivo*. En el sistema de homogeneidad de cerebro, el extracto alcohólico de alecrín presentó la mejor capacidad de inhibición. En sistema fracción microsomal, el alcohólico de alecrín, después del orégano presentó los mayores efectos. Distintos resultados de los estudios *in vitro* fueron encontrados en sistema biológico, donde los extractos de orégano fueron los más efectivos como antioxidante. Por eso, las distintas condiciones experimentales indicaron resultados discordantes con relación a la potencia de los extractos, no obstante la capacidad antioxidante fue observada en los tres sistemas. Las informaciones obtenidas dicen que los estudios *in vivo* son indispensables para la evaluación del efecto antioxidante protector.

**Palabras-clave:** antioxidantes naturales; antioxidantes *in vivo*; antioxidantes *in vitro*; especíerías; orégano; alecrín

## RESUMO

Antioxidantes são substâncias que visam a prevenção da rancidez, mantendo a qualidade organoléptica e nutricional dos alimentos, além disto, estão relacionados com os efeitos benéficos à saúde, através da proteção do organismo contra o estresse oxidativo. O efeito *in vitro* em organelas ou tecidos tem sido correlacionado ao efeito protetor, contudo as características de sistemas *in vitro* podem levar a resultados imprecisos quanto à capacidade antioxidante. Entre os antioxidantes naturais, as especiarias são consideradas fontes relevantes. Afim de avaliar a capacidade antioxidante e comparar diferentes sistemas, extratos de orégano e alecrim foram testados *in vivo* e em dois sistemas *in vitro*. Extratos destas especiarias foram adicionados em sistemas *in vitro* contendo tecidos do cérebro ou do fígado, que foram obtidos de animais experimentais sem tratamento prévio. Na avaliação *in vivo* animais foram tratados com 50 mg/dia de cada extrato. Todos os extratos apresentaram efeito antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo*. No homogenato de cérebro, o extrato alcoólico de alecrim apresentou a melhor capacidade de inibição da oxidação. No sistema microsomal, o extrato alcoólico de alecrim, seguido do extrato de orégano apresentaram os maiores efeitos. Resultados diferentes dos estudos *in vitro* foram encontrados no sistema biológico, no qual os extratos de orégano foram os mais efetivos como antioxidante. Assim, as diferentes condições experimentais indicaram resultados discordantes quanto à potência dos extratos, embora a capacidade antioxidante tenha sido observada nos três sistemas. Os dados obtidos demonstram que estudos *in vivo* se fazem necessários na avaliação do efeito antioxidante protetor.

**Palavras-chave:** antioxidantes naturais; antioxidantes *in vivo*; antioxidantes *in vitro*; especiarias; orégano; alecrim

## INTRODUÇÃO

Os primeiros estudos sobre a capacidade antioxidante de especiarias datam dos anos 50, quando mais de 30 delas foram avaliadas quanto ao potencial de inibição da oxidação de óleos vegetais ou gordura animal (SEITH e AGGARWAL, 1950; CHIPAULT et al, 1952). Aqueles resultados demonstravam a alta capacidade antioxidante das especiarias, em especial as da família *Labiatae*. Estudos posteriores indicaram o alecrim, a sálvia e o orégano entre os mais efetivos em retardar a lipoperoxidação em óleos vegetais (MELO et al, 1986; SANT'ANA e MANCINI-FILHO, 2000; MANCINI e MANCINI-FILHO, 2001).

Por outro lado, o efeito de compostos de origem natural, incluindo aqueles de especiarias, contra o estresse oxidativo tem sido avaliado por meio de estudos *in vitro*. O emprego de sistemas *in vitro* propõe estimar um efeito antioxidante no organismo, combatendo a ação deletéria do estresse oxidativo e suas conseqüências. A proteção *in vivo* tem sido constatada experimentalmente e em estudos epidemiológicos, nos quais a presença de compostos antioxidantes na alimentação e maiores concentrações plasmáticas apresentam correlação inversa com a incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (WANG e LIN, 2000; ESPIN et al, 2000; HOLLIDAY e PHILLIPS, 2001).

Diversos substratos da peroxidação lipídica são utilizados em sistemas *in vitro*, como membrana de eritrócitos (FUNG e ZHANG, 1990; SAIJA et al, 1995), lipoproteínas plasmáticas (FRANKEL et al, 1993; NARDINI et al, 1995; ABUJA et al, 1998), tecido cerebral (KO et al, 1995), além de tecidos e organelas hepáticos. Nesse estudo foram empregados dois importantes sistemas para a avaliação do efeito antioxidante, o homogenato de cérebro e o tecido hepático.

O homogenato de cérebro de animais experimentais tem sido utilizado na avaliação da capacidade antioxidante, seja como parâmetro para avaliar a proteção das células do sistema nervosa central, submetida à isquemia e reperfusão (SAKAMOTO et al, 1991), seja como um substrato da lipoperoxidação, o qual permite a sua utilização sem adição de catalisadores.

Contudo, o tecido hepático, parece ser um substrato mais significativo que outros tecidos para a oxidação lipídica (OHKAMA et al, 1979), sendo a fração microssomal bastante utilizada para a avaliação de antioxidantes naturais. Esta fração apresenta menor interferência na reação de oxidação que a célula ou o próprio tecido, quando empregada como substrato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

Experimentos biológicos, contudo, são pouco empregados para avaliação antioxidante, sendo importante considerar que os dados a partir de estudos *in vitro* podem variar segundo as condições experimentais, como sugerem FRANKEL et al (1996) e MADSEN e BETELSEN (1995), o que implica em resultados imprecisos quanto à proteção *in vivo*.

Assim o objetivo deste estudo foi comparar as atividades antioxidantes das especiarias orégano (*Origanum vulgare*, L.) e alecrim (*Rosmarinus officinallis*, L.), empregando dois diferentes sistemas *in vitro*, e em sistema *in vivo*.

## MATERIAL E MÉTODOS

*Extratos de especiarias:* foram preparados extratos alcoólicos e aquosos de orégano, e alecrim. A extração seqüencial utilizando-se solventes de polaridade crescente, foi realizada a partir de 40g de cada especiaria pulverizada para 32 mesh. Após a extração com hexano, o resíduo foi adicionado de etanol e então filtrado para a obtenção dos extratos alcoólicos das especiarias. A seguir no resíduo do extrato alcoólico foi adicionada água destilada, com a qual os extratos aquosos foram obtidos. A concentração dos componentes sólidos dos extratos foi determinada por gravimetria. Para a adição nos sistemas *in vitro* e *in vivo*, os solventes foram evaporados e os compostos sólidos solubilizados em tampão fosfato.

*Homogenato de cérebro:* cérebros de ratos machos adultos sem qualquer tratamento prévio, foram obtidos após a perfusão com KCl 0,15 M. O homogenato foi preparado com solução tampão KPO<sub>4</sub> em NaCl (1:20), como proposto por LISSI et al. (1986). Após centrifugação a 4°C, o sobrenadante foi utilizado como meio para a lipoperoxidação.

*Avaliação da capacidade antioxidante in vitro:* concentrações de 10 a 500µg dos extratos aquosos e alcoólicos de orégano e alecrim foram adicionados aos sistemas *in vitro* e a lipoperoxidação comparada a do controle. A concentração de inibição de 50% da reação (CI<sub>50</sub>) foi determinada para cada um dos extratos a partir da porcentagem de inibição obtida com diferentes concentrações através da análise de regressão.

*Avaliação da capacidade antioxidante in vivo:* 30 ratos albinos da linhagem Wistar (peso médio de 180g) receberam, via gavagem, 50 mg dos extratos de especiarias diluídas em solução tampão (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M pH 7,4) ou apenas a solução tampão. Após o período de 6 semanas, os animais foram sacrificados, os fígados perfundidos e a fração microsossomal obtida.

Para comparação dos dados, foi utilizada análise de variância e teste de Sheffè.

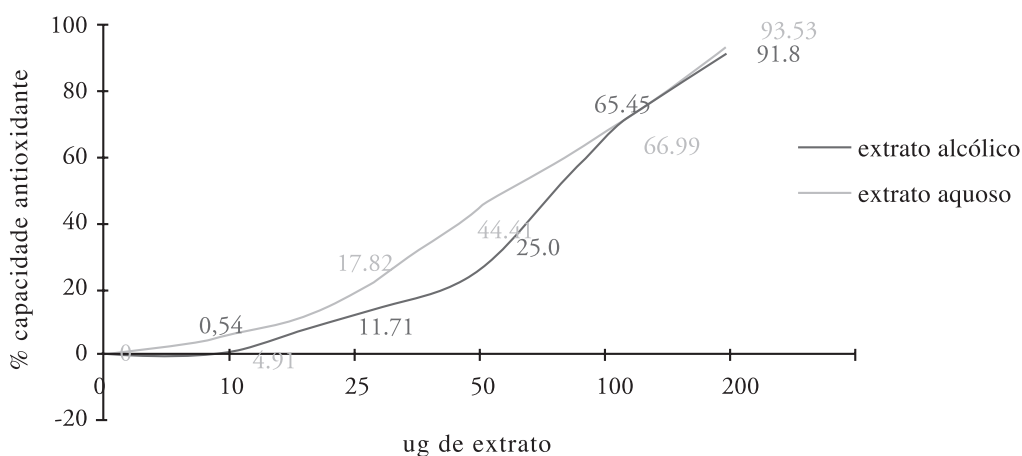
*Lipoperoxidação do sistema in vitro homogenato de cérebro:* a oxidação do homogenato foi induzida em banho-maria (BM) 37°C sob agitação, durante 2 horas. Para a determinação da lipoperoxidação, uma alíquota do homogenato foi adicionada de 1 mL de TCA 5%, a fim de interromper a reação. Após centrifugação (3000 rpm), foi realizada a determinação dos produtos da lipoperoxidação, representados pelas substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), utilizando-se solução aquosa de TBA 0,67%. Amostras adicionadas da solução de TBA foram submetidas ao BM, em temperatura de ebulição. As absorbâncias foram então obtidas (535 nm) e relacionadas aos produtos da oxidação das amostras de homogenato adicionadas aos extratos e ao controle. Essa quantificação de TBARS foi realizada antes e após a indução da oxidação do homogenato.

*Sistema in vitro fração microsossomal:* fígados de ratos adultos sem qualquer tratamento prévio, foram perfundidos com KCl 0,15 M, homogeneizados em tampão NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1:4) e centrifugados a 3000 rpm a 4°C, sendo o sobrenadante utilizado para a obtenção da fração microsossomal por meio de ultracentrifugação (37.000 rpm / 60 minutos / 4°C).

*Lipoperoxidação da fração microsossomal:* o sistema foi preparado com tampão  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  para conter 2 a 3 mg de proteína microsossomal/mL. Para indução da oxidação lipídica utilizou-se  $200\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4$  e temperatura de  $37^\circ\text{C}$  por 1 hora, segundo o método proposto por FRAGA et al (1988). Os produtos da lipoperoxidação foram quantificados nas amostras adicionadas de solução ácida (HCl 0,25M, ácido acético 15%) de TBA 0,37% e submetidos a  $90\text{-}95^\circ\text{C}$  para a formação do complexo de cor característica (FRAGA et al, 1988). Foi empregada a medida espectrofotométrica para a determinação dos produtos (TBARS) na fração microsossomal dos sistemas *in vitro* e *in vivo*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

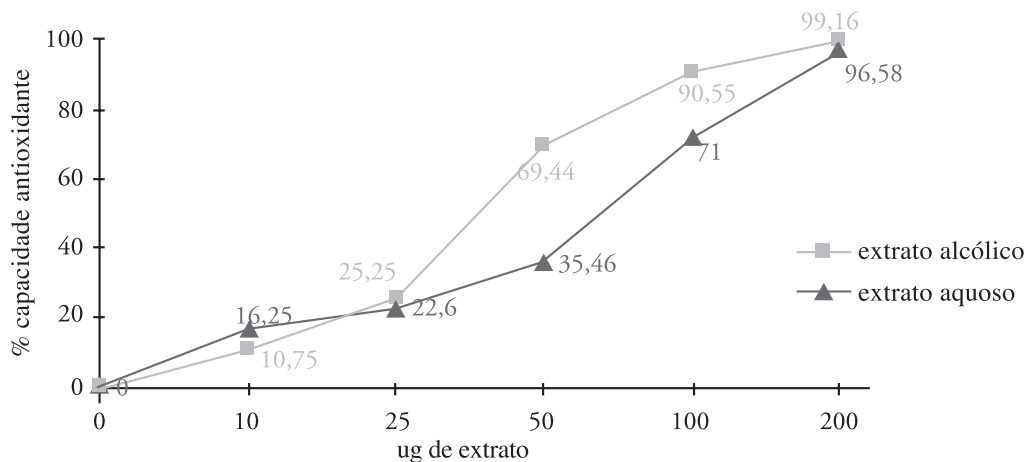
*Capacidade antioxidante in vitro dos extratos de orégano:* ambos extratos foram efetivos na inibição da oxidação espontânea do homogenato de cérebro como pode ser visto no Gráfico 1. Este gráfico apresenta a média da atividade antioxidante obtida a partir de 3 ensaios semelhantes, sendo que o coeficiente de variação entre os dados foi inferior a 20%. Além disso, o efeito antioxidante apresentou boa correlação com as doses dos extratos adicionadas ao sistema ( $r > 0,9$ ).



**Gráfico 1** Capacidade antioxidante de extratos de orégano em sistema homogenato de cérebro

Os resultados encontrados no sistema modelo fração microsossomal indicaram que o extrato alcoólico de orégano foi mais efetivo na proteção contra a lipoperoxidação que o aquoso como pode ser observado no Gráfico 2.

A capacidade antioxidante foi tanto maior, quanto maior a quantidade de extrato adicionado ao sistema fração microsossomal ( $r > 0,8$ ), sendo que o extrato alcoólico inibiu quase totalmente a oxidação do sistema modelo. O extrato aquoso, por outro lado, não alcançou uma inibição maior de 40% quando  $500\mu\text{g}$  do extrato foram adicionados, contrariamente ao resultado no sistema anterior.



**Gráfico 2** Capacidade antioxidante de extratos de alecrim em sistema homogenato de cérebro

Vários compostos fenólicos foram identificados em extratos de orégano, como ácidos fenólicos (KUZAKI e NAKATANI, 1989), um glicosídeo fenólico (NAKATANI e KIKUZAKI, 1987), a flavona apigenina, a quercetina e a deidroquercetina (VEKIARI et al, 1983), além de outros flavonóides (ECONOMOU et al, 1991). Esses compostos contribuíram com o efeito antioxidante observado nos sistemas.

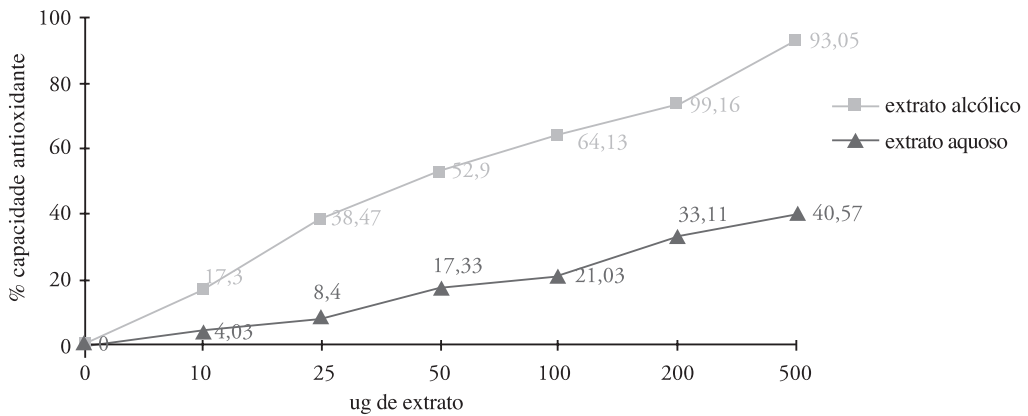
Alguns flavonóides, quando testados em sistema homogenato de cérebro, apresentaram atividade antioxidante, em especial a quercetina, cuja proteção alcançou cerca de 70% (100µM) (SAIJA et al, 1995). Esses dados são comparáveis aos obtidos nesse estudo quando 200µg de ambos extratos foram adicionados. Em sistema fração microssomal, novamente a quercetina, além do de outro flavonóide, o kaempferol, foram bastante efetivos na inibição da lipoperoxidação, embora outras flavonas não tenham apresentado o mesmo efeito (LAUGHTON et al, 1991).

Os resultados para a atividade antioxidante do extrato aquoso foram diferentes nos 2 sistemas *in vitro*, embora para o extrato alcoólico tenha sido semelhante. A efetividade da quercetina em ambos sistemas poderia sugerir que esse flavonóide contribui significativamente para a capacidade antioxidante do extrato alcoólico de orégano.

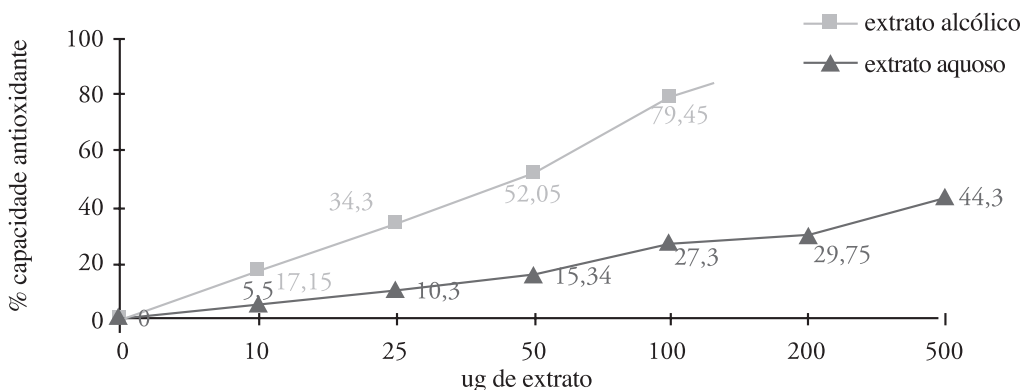
*Capacidade antioxidante in vitro dos extratos de alecrim:* tanto o extrato alcoólico como o aquoso foram efetivos como antioxidantes, mas o alcoólico apresentou maior atividade, inibindo cerca de 90% a lipoperoxidação do meio, quando 500µg foram adicionados (Gráfico 3). Os dados obtidos nesse estudo demonstraram que os extratos de alecrim apresentam maior capacidade antioxidante que 300µM de eugenol (fenólico presente no cravo) (60%), 100mM de glutaciona (44%) (CAÑAS et al, 1989; KO et al, 1995) e extrato de orégano, no sistema homogenato de cérebro.

No sistema fração microssomal, os extratos de alecrim também apresentaram efeito antioxidante, porém para o extrato aquoso esse efeito foi menor que 50% (Gráfico 4). O

extrato alcoólico de alecrim foi altamente efetivo na proteção contra a lipoperoxidação nesse sistema, o que também foi observado no sistema homogenato de cérebro, enquanto o extrato aquoso apresentou uma menor atividade.



**Gráfico 3** Capacidade antioxidante de extratos de orégano em sistema fração microssomal hepática



**Gráfico 4** Capacidade antioxidante de extratos de alecrim em sistema fração microssomal hepática

Os compostos fenólicos carnosol e ácido carnosico, considerados os principais constituintes e responsáveis pela ação antioxidante das folhas de alecrim (RECHEIMER et al, 1996), podem ter contribuído com os resultados obtidos. Em estudos conduzidos por ARUOMA et al (1992) esses compostos inibiram em até 95% (25µg) a oxidação lipídica em fração microssomal hepática induzida. Além deles, flavonóides, que também são encontrados no alecrim, (CUVALIER et al, 1996) apresentam efeito antioxidante em membranas microssomal e de eritrócitos, como relata RICE-EVANS et al (1996), bem como em sistema homogenato de cérebro.

A Tabela 1 apresenta o índice  $CI_{50}$ , obtido a partir das curvas dose-resposta de cada extrato nos dois sistemas utilizados para avaliação da atividade antioxidante *in vitro*.

**Tabela 1 Estimativa e intervalo de confiança de  $CI_{50}$  dos extratos de especiarias em sistemas *in vitro***

Sistema <i>in vitro</i>	Orégano		Alecrim	
	alcoólico	aquoso	alcoólico	aquoso
Homogenato de cérebro	103,61 <sup>b</sup> [87,0;120,2]	82,6 <sup>a,b</sup> [53,9;111,2]	44,64 <sup>a</sup> [30,7;58,6]	66,82 <sup>a</sup> [46,9;86,7]
Fração Microssomal	102,1 <sup>b</sup> [56,3;147,9]	526,0 <sup>c</sup> [403,1;649,0]	52,2 <sup>a,b</sup> [26,6;77,8]	449,8 <sup>c</sup> [289,5; 610,1]

<sup>a,b,c</sup> em cada coluna ou linha, os valores com subscritos diferentes são significativamente diferentes ao nível de  $p < 0,05$ .

\*Concentração de cada extrato capaz de inibir 50% da oxidação dos sistemas *in vitro* indicado

[] intervalo de 95% de confiança para a dose  $IC_{50}$  dos extratos de especiarias

No homogenato de cérebro e na fração microssomal, o extrato alcoólico de alecrim apresentou a menor concentração de inibição, 50% da lipoperoxidação nos sistemas *in vitro*, com  $CI_{50}$  de 44 e 52 mg, respectivamente (Tabela 1). Entre os extratos aquosos e alcoólicos da mesma especiaria, não foram observadas diferenças quanto à atividade antioxidante no sistema homogenato de cérebro, o que não ocorreu no sistema fração microssomal. Os extratos aquosos de orégano e alecrim foram muito menos efetivos contra a lipoperoxidação na fração microssomal do que no sistema homogenato de cérebro.

As condições experimentais diferentes dos sistemas *in vitro* empregados nesse estudo determinaram atividades antioxidantes diferentes. As características dos sistemas utilizados para a avaliação devem, portanto, ser consideradas.

A oxidação do homogenato de cérebro utilizado para avaliação *in vitro* ocorre espontaneamente (STOCKS et al, 1974) devido à presença de ácidos graxos polinsaturados, os quais são mais suscetíveis à oxidação. No entanto, a oxidação neste sistema também pode ser induzida pela presença de ferro que pode agir como catalisador endógeno (AZORIN et al, 1995). Apresentando este sistema maior velocidade da reação, com maior consumo de oxigênio, no início do processo (LISSI et al, 1986), com a formação de hidroperóxidos de fosfolípidios, os quais foram identificados por MIYZAWA et al (1992).

Por outro lado, a fração microssomal é obtida a partir da ruptura das células hepáticas e sedimentações das membranas plasmáticas e do retículo endotelial, apresentando elevadas concentrações de ácidos graxos polinsaturados, os quais constituem o principal substrato do processo oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). Destaca-se que neste sistema a possibilidade da perda do ferro devido a descompartmentalização deste mineral no processo de ruptura celular e separação das membranas, não podendo o mesmo atuar como pró-oxidante.

As reações de oxidação nos sistemas *in vitro* ocorrem por iniciação primária ou secundária, por meio de espécies reativas como o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, bem como por radicais alcoxila e peroxila, e ação de metais catalisadores (adicionados ao sistema fração microssomal), que agirão nas membranas (BUEGE e AUSTI, 1978; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989), ou endógenos que poderão agir nos fosfolípidios do tecido cerebral.

Os mecanismos propostos para compostos fenólicos, inclusive aqueles identificados nas especiarias, incluem a ação como quelantes de metais, seqüestradores de espécies radicalares ou também na captação de intermediários reativos bloqueando a reação em cadeia.

O efeito da flavona apigenina, encontrada no orégano e no alecrim (VEKIARI et al, 1993; CUVALIER et al, 1996) tem sido relacionado, em especial, ao seqüestro do radical hidroxila (ESPIN et al, 2000), enquanto outros flavonóides parecem agir principalmente como doadores de hidrogênio, podendo assim eliminar os radicais hidroxila e peroxila (RICE EVANS et al, 1996; SON e LEWIS, 2002). No alecrim diferentes compostos também agem na eliminação de peroxilas (ARUOMA et al, 1992).

Embora seja proposta a capacidade de alguns fenólicos em interagir com íons metálicos (RICE EVANS et al, 1996; CAO et al, 1997), esse efeito não foi ainda observado para aqueles compostos das especiarias orégano e alecrim identificados até o momento. Se bem que, o ácido carnósico e o carnosol tenham sido efetivos na inibição da peroxidação de microssoma induzida por ferro (ARUOMA et al, 1992), e podem ter contribuído com a alta capacidade antioxidante do extrato alcoólico de alecrim *in vitro*.

A menor capacidade antioxidante dos extratos aquosos no sistema adicionado de FeSO<sub>4</sub> sugere que os compostos presentes possuem ação mais efetiva, como redutores, que como complexantes de catalisadores metálicos. Além disso, os vários fenólicos presentes em folhas de orégano e de alecrim foram isolados a partir da extração com álcool, como os flavonóides e ácidos fenólicos do orégano, o ácido carnósico, o carnosol e o rosmanol do alecrim.

Outro fator a ser considerado é a interação entre o extrato e o sistema oxidável, que pode determinar a atividade antioxidante, limitando a atuação de compostos dos extratos aquosos no meio lipídico da fração microssomal. Contrariamente FRANKEL et al (1994) e HOPIA et al. (1996) sugerem um paradoxo polar, onde antioxidantes lipofílicos apresentariam maior eficiência em emulsões, enquanto os hidrofílicos seriam mais efetivos em sistema lipídico devido a maior afinidade interfacial dos lípides com o oxigênio.

*Capacidade antioxidante in vivo dos extratos de orégano e alecrim:* após o tratamento via oral com os extratos das especiarias, a fração microssomal do fígado dos animais experimentais apresentou uma capacidade de proteção da lipoperoxidação induzida de 30% a 70%, quando comparados ao grupo controles (Tabela 2).

Diferentemente do estudo *in vivo*, no qual os extratos aquosos foram menos efetivos, o extrato aquoso de orégano foi aquele que demonstrou maior efeito antioxidante *in*

*vivo*. Na Tabela 2 observa-se que os animais tratados com esse extrato apresentaram produtos de oxidação significativamente menores que os obtidos a partir dos demais grupos.

Em sistema biológico pró-oxidantes fisiológicos (como  $H_2O_2$ ,  $NO\bullet$ ) agem na iniciação do processo, especialmente na porção lipídica. Por outro lado, compostos endógenos (como enzimas, glutatona, vitaminas) ou exógenos presentes no citoplasma ou organelas agirão na proteção antioxidante. Os extratos de especiarias, portanto, contribuíram para a capacidade do tecido na resistência contra a lipoperoxidação induzida.

**Tabela 2 Valores médios e desvio padrão de TBARS (nmol/mg proteína) em fração microsomal dos fígados dos animais experimentais tratados com extratos de orégano e alecrim**

Sistema <i>in vivo</i>	Orégano		Alecrim		Controle
	alcoólico	aquoso	alcoólico	aquoso	
Fração microsomal hepática	2,47 <sup>b,c</sup> ± 1,38	1,31 <sup>b</sup> ± 0,62	2,60 <sup>c</sup> ± 0,18	3,05 <sup>c</sup> ± 0,19	4,38 <sup>a</sup> ± 1,38

<sup>a,b,c</sup> os valores com subscritos diferentes são significativamente diferentes ao nível de  $p < 0,05$ .

Os extratos de alecrim apresentaram efeito de proteção *in vivo* muito reduzido, comparando-os à avaliação *in vitro*. Uma ação *in vivo* também foi constatada por SANT'ANA e MANCINI-FILHO (2000), embora em condições diferentes das deste estudo.

Extratos de orégano, por sua vez, demonstraram alta efetividade *in vivo*. Compostos flavonóides de folhas de orégano podem ser os principais responsáveis pela atividade antioxidante observada nesse estudo devido ao seu potencial antioxidante, bem como à disponibilidade para o sistema biológico.

Os resultados da capacidade antioxidante *in vitro*, empregando a fração microsomal, foram bastante diferentes daqueles obtidos *in vivo*. Por outro lado, o sistema *in vitro* homogenato de cérebro apresentou uma melhor correlação com os dados obtidos nos experimentos biológicos. A partir das Tabelas 1 e 2, pode-se observar que o alecrim possui maior atividade *in vitro* em homogenato de cérebro do que o orégano, sendo que, o orégano apresentou maior efeito *in vivo*. Contudo para esses dois sistemas, o extrato aquoso de orégano é seguido do alcoólico de orégano quanto ao maior efeito antioxidante; enquanto para os extratos de alecrim, o alcoólico é seguido do aquoso. No entanto, é importante destacar que os diferentes extratos obtidos a partir do orégano e do alecrim apresentam na sua composição diversos compostos, que por sua vez podem apresentar efeitos antioxidantes distintos, somando-se a possibilidade da ocorrência de sinergismo entre eles, o qual pode potencializar a atividade antioxidante. Destaca-se ainda a característica estrutural dos compostos presentes nos extratos, a qual pode interferir diretamente na biodisponibilidade dos mesmos na efetivação da atividade

antioxidante. No entanto, a literatura não apresenta muitos estudos sobre os efeitos dos compostos fenólicos no organismo humano, pois os mesmos foram durante longo tempo considerados compostos não absorvíveis, sendo desconhecida a farmacocinética destas substâncias em humanos (CAO et al, 2001). Portanto, na avaliação da atividade antioxidante *in vivo* diversos fatores podem influenciar esta ação, destacando-se a capacidade de absorção, transporte e capacitação pelas células.

Tais observações sugerem a existência de uma barreira no sistema biológico que restringe a utilização do alecrim e seus constituintes. Dados experimentais demonstraram que os compostos fenólicos presentes em folhas de orégano são melhores absorvidos que aqueles das folhas do alecrim (aproximadamente entre 90% e 95% respectivamente), (CINTRA, 1999). Contudo, outros fatores interferentes, como anteriormente relatado, parecem contribuir com uma maior efetividade dos extratos de orégano *in vivo*.

## CONCLUSÕES

Os diferentes experimentos *in vitro* resultaram em diferentes atividades antioxidantes, para os extratos aquosos das especiarias nos sistemas de homogenato de cérebro e da fração microsomal. Porém, resultados semelhantes foram obtidos nos dois sistemas *in vitro* quando os extratos alcoólicos foram avaliados, indicando que na utilização desses sistemas deve-se considerar, a presença de catalisadores, os mecanismos de indução e proteção da lipoperoxidação, bem como os substratos utilizados e as próprias características dos compostos ou extratos avaliados.

Pode-se observar também, que os dados do experimento *in vivo* não corresponderam aos resultados dos experimentos *in vitro*, especialmente no sistema fração microsomal.

Além disso, o efeito antioxidante obtido *in vitro* não deveria ser diretamente relacionado a um efeito *in vivo*, especialmente para aqueles antioxidantes primários com ação queladora, sobre catalisadores metálicos, uma vez que, há controvérsias sobre a presença de íons livres e disponíveis para a ação na oxidação lipídica do organismo (HALLIWELL et al e GUTTERIDGE et al, 1989). E ainda, os diferentes fatores, como a presença de enzimas e de outros antioxidantes ou de oxidantes biológicos podem influenciar a reação de lipoperoxidação e a ação de antioxidantes.

Essas observações podem restringir a proposta de que resultados obtidos de experimentos *in vitro* indicariam um efeito benéfico ao organismo, e evidenciam a relevância de estudos *in vivo*, na avaliação de compostos potencialmente antioxidantes.

Embora os estudos *in vitro* revelem a efetividade de compostos como antioxidantes e indiquem os constituintes de maior atividade e seus possíveis mecanismos, os estudos *in vivo* se fazem necessários na avaliação da atividade antioxidante efetiva no sistema biológico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCE

- ABUJA, P.M.; MURKOVIC, M.; PFANNHAUSER, W. Antioxidant and prooxidant activities of elderberry (*Sambucus nigra*) extract in low density, lipoprotein. *J. Agric. Food Chem.* Washington DC., v.46, n.12, p.4091-96, 1998.
- ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J. Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica*, London, v.22, n.2, p.257-68, 1992.
- AZORIN, I.; BELLA, M.C.; IBORA, F. J.; FORNAS, E.; RENAU-PIQUERAS, J.E. Effect of tert-butyl hydroperoxide addition on spontaneous chemiluminescence in brain. *Free Radical Biol. Med.*, New York, v.19, n.6, p.795-803, 1995.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, New York, v.52, p.302-10, 1978.
- CAÑAS, P.; GUERRA, R.; VALENZUELA, A. Antioxidant properties of hypotaurine: comparison with taurine, glutathione and B-alanine. *Nutr. Rep.Int.*, Los Altos, v.39, n.2, p.434-38, 1989.
- CAO, G.; MUCCITELLI, H.U.; SANCHES-MORENO, C.; PRIOR, R.L. Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. *Amer.J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.73, n.4, p.920-26, 2001.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biol. Med.*; New York, v.22, n.5, p.749-760, 1997.
- CHIPAULT, J.R.; MIZUNI, G.R.; HAWKINS, J.M.; LUNDBERG, W.O. The antioxidant properties of natural spices. *Food Res.*, Champaign, v.17, p.46-55, 1952.
- CINTRA, R.M.G.C. *Efeito antioxidante de especiarias. Avaliação da salsa (Petroselinum sativum Hoffm), cebolinha verde (Allium schoenoprasum L.) orégano (Origanum vulgare L.) e alecrim (Rosmarinus officinalis L.)*. São Paulo, 1999. 152p. Tese [Doutorado em Ciência dos Alimentos] Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- CUVALIER, M.L.; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J.Am.Oil Chem.Soc.*, Champaign, v.73, n.5, p.645-53, 1996.
- ECONOMOU, K.D.; OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C.D. Antioxidant activity of some plant extracts of family Labiatae. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.68, p.109-13, 1991.
- ESPIN, J.C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H.J.; GARCIA-VIGUERA, C. Anthocyanin-based natural a new source of antiradical activity for foodstuff. *J. Agric. Food Chem.*, Washington DC., v.48, n.6, p.1588-1592, 2000.
- FRAGA, C.G.; LEIBOVITZ, B.E.; TAPPEL, A.L. Lipid peroxidation, measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slice: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radical Biol. Med.*, New York, v.4, p.155-61, 1988.
- FRANKEL, E.N.; HUANG, S.W.; AESCHBACH, R.; PRIOR, E. Antioxidant activity of a rosemary extracts and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *J. Agric. Food Chem.*, Washington DC., v.44, n.1, p.131-35, 1996.
- FRANKEL, E.N.; HUANG, S.W.; KANNER, J.; GERMAN, J.B. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *J. Agric. Food Chem.*, Washington DC., v.42, p.1054-59, 1994.
- FRANKEL, E.N.; KANNER, J.; GERMAN, J.B.; PARKIS, E.; KINSELLA, J.E. Inhibition of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, London, v.341, p.454-57, 1993.
- FUNG, L.W.M.; ZHANG, Y. A method to evaluate the antioxidant system for radicals in erythrocyte membranes. *Free Radical Biol. Med.*, New York, v.9, p.289-98, 1990.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radical in medicine and biology*. London, Clarendon Press, 1989. 543 p.

- HOLLIDAY, R.; PHILLIPS, R. Health benefits of sunflower kernel. *Cereal Food World*, Washington DC., v.46, n.1, p.205-08, 2001.
- HISAO, G.; TENG, C.M.; WU, C.L.; KO, F.N. Marchantin H as a natural antioxidant and free radical scavenger. *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, v.344, n.1, p.18-26, 1996.
- HOPIA, A.I., HUANG, S.W.; SCHWARZ, K.; GERMAN, J.B.; FRANKEL, E. Effect of different lipid system an antioxidant activity of Rosemary constituents carnosol and carnosic acid with and without tocoferol. *J. Agric. Food Chem.*, Washington DC, v.44, p.2030-2036, 1996.
- KAMAT, J.P.; SARMAH.D.; DEVASAGAYAM, T.P.A. NESARETNAM, K.; BASIRON, Y. Tocotrienols from palm oil as effective inhibitors of protein oxidation and lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Mol. Cell. Biochem.*, Amsterdam, v.70, p.131-38, 1997.
- KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N. Structure of a new antioxidative phenolic acid from oregano (*Oreganum vulgare*, L.) *Agric. Biol. Chem.*, Tokyo, v.53, p.519-524, 1989.
- KO, F.N.; LIAO, C.H.; KUO, Y.H.; LIN, Y.L. Antioxidant properties of demethyl-diisoeugenol. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.1258, p.145-52, 1995.
- LAUGHTON, M.J.; EVANS, P.J.; MARONEY, M.A.; HOULT, J.R.S.; HALLIWELL, B.; Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. *Biochem. Pharmacol.*, Oxford, v.42, n.9, p.1673-81, 1991.
- LISSI, E.A.; CÁRCERES, T.; VIDELA, L.A. Visible chemiluminescence from rat brain homogenates undergoing autoxidation. I. Effect of additives and products accumulation. *Free Radical Biol. Med.*, New York, v.2, p.63-9, 1986.
- MADSEN, H.L.; BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. *Trends Food Sci. Technol.*, Amsterdam, v.6, p.271-77, 1995.
- MANCINI, D.A.P., MANCINI-FILHO, J. Prevenção de reações oxidativas: antioxidantes nos vegetais de consumo humano. In: D'Angelis, R. *Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde*. São Paulo: Atheneu, 2001, 320p.
- MELO, M.S.O.N.; GRAÇAS, V.L.B.; MANCINI-FILHO, J. Atividade antioxidante de condimentos. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 9<sup>o</sup>, Curitiba. 1986. p.56. Resumo.
- MIYAZAWA, T. SUZUKI, T.; FUJIMOTO, K.; YASUDA, K. Chemiluminescent simultaneous determination of phosphatidylethanolamine hydroperoxide in the liver and brain of the rat. *J. Lipid Res.*, New York, v.33, p.1051-58, 1992.
- NAKATANI, N.; KIKUZAKI, H. A new antioxidative glucoside isolated from oregano (*Origanum vulgare*, L.). *Agric. Biol. Chem.*, Tokio, v.51, n.10, p.2727-732, 1987.
- NARDINI, M.; D'AQUINO, M.; TOMASSI, G.; GENTILI, V.; DI FELICE, SCACCINI, C. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radical Biol. Med.*, New York, v.19, n.5, p.541-52, 1995.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, Baltimore, v.95, p.351-58, 1979.
- RAUHALA, P.; SZIRAKI, I.; CHIUEH, C.C. Peroxidation of brain lipids *in vitro*: nitric oxide versus hydroxyl radicals. *Free Radical Biol. Med.*, New York, v.21, n.3, p.391-94, 1996.
- RECHEIMER, S. BERNART, M.W.; KING, G.A.; KENT, M.C.; BAILEY, D.T. Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.73, p.507-14, 1996.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant relationships of flavonóides and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.*, New York, v.20, n.7, p.933-56, 1996.
- SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARLUZZO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biol. Med.*, New York, v.19, n.4, p.481-86, 1995.

- SAKAMOTO, A.; OHNISHI, S.T.; OHNISHI, T.; OGAWA, R. Protective effect of a new antioxidant on the rat brain exposed to ischemia-reperfusion injury: inhibition of free radical formation and lipid peroxidation. *Free Radical Biol. Med.*, New York, v.11, p.385-391, 1991.
- SANT'ANA, L.S.; MANCINI-FILHO, J. Influence of the addition of antioxidants *in vivo* on the fatty acid composition of fish fillets. *Food Chemistry*, Barking, v.68, p.175-78, 2000.
- SEHTI, S.C.; AGGARWAL, J.S. Stabilization of edible fats by condiments or spices. *Nature*, London, v.166, n.2, p.518-19, 1950.
- SON, S.; LEWIS, B.A. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. *J. Agric. Food Chem.*, Washington DC., v.50, n.3, p. 468-72, 2002.
- STOCKS, J. GUTTERIDGE, J.M.C.; SHARP, R.J.; DORMANDY, T.L. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. *Clin. Sci. Mol. Med.*, Oxford, v.47, p.215-22, 1974.
- VEKIARI, S.A.; OREOPOULOU, V.; TZIA, C.; THOMOPOULOS, C.D. Oregano flavonoids as lipid antioxidant, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.70, p.483-487. 1993.
- WANG, S.Y.; LIN, H.S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varieties from different cultivar and development stage. *J. Agric. Food Chem.*, Washington DC., v.48, n.1, p.140-146, 2000.

Recebido para publicação em 07/01/02.