

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Avaliação do efeito do extrato aquoso e da fração fenólica livre do Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o estado antioxidante e o perfil lipídico em ratos com hipercolesterolemia induzida pela dieta

Milessa da Silva Afonso

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Jorge Mancini Filho

São Paulo
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**Avaliação do efeito do extrato aquoso e da fração fenólica
livre do Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o estado
antioxidante e o perfil lipídico em ratos com
hipercolesterolemia induzida pela dieta**

Milessa da Silva Afonso

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Jorge Mancini Filho

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

A257a	<p>Afonso, Milessa da Silva</p> <p>Avaliação do efeito do extrato aquoso e da fração fenólica livre do alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) sobre o estado antioxidante e o perfil lipídico em ratos com hipercolesterolemia induzida pela dieta / Milessa da Silva Afonso. -- São Paulo, 2010. 83p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.</p> <p>Orientador: Mancini Filho, Jorge</p> <p>1. Nutrição experimental: Ciência dos alimentos 2. Alimentos funcionais: Ciência dos alimentos 3. Antioxidante: Ciência dos alimentos 4. Hipercolesterolemia : Doenças I. T. II. Mancini Filho, Jorge, orientador.</p> <p style="text-align: right;">641.1 CDD</p>
-------	---

Milessa da Silva Afonso

**Avaliação do efeito do extrato aquoso e da fração fenólica
livre do Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o estado
antioxidante e o perfil lipídico em ratos com
hipercolesterolemia induzida pela dieta**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

1º. examinador
Prof. Dr. Jorge Mancini Filho
Orientador/Presidente

2º. examinador

3º. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2010

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Antônio e Maria Luiza
e familiares pelo incentivo e apoio
incondicionais à minha formação.*

*"A grande face da pesquisa deve ser
o semblante da humanidade"*

Milessa da Silva Afonso

AGRADECIMENTOS

Agradecimento primordial a Deus que esteve, está e sempre estará abençoando meu caminho;

Aos meus queridos pais, Antônio Benedicto Afonso e Maria Luiza da Silva Afonso por serem sempre minha fortaleza, por me mostrarem que a honestidade, a humildade, a saúde, o amor e a amizade são os maiores tesouros do ser humano;

Às minhas irmãs Jacira e Melissa por me proporcionar brilho, alegria e confiança tão espetaculares;

Às minhas lindas sobrinhas Cecília e Raissa por trazerem o sorriso doce e sincero da infância;

Aos meus cunhados Júnior e Macota por me darem apoio no caminho escolhido;

Às orações e conselhos da minha querida madrinha Benedita e da minha vovó Aparecida;

Ao Prof. Dr. Jorge Mancini Filho por me ensinar a amar a ciência cada dia mais e por ser mais que um orientador, um amigo, um pai e principalmente, um conselheiro;

À minha mãe científica Profa. Dra. Léa Sílvia Sant'Ana pelos conselhos e pelo "colo";

Aos professores doutores Marcelo Macedo Rogero e Sílvia Berlanga de Moraes Barros pelo apoio durante minha caminhada científica;

Aos professores doutores Eduardo Purgatto e Elizabete Wenzel de Menezes pelo aprendizado durante o estágio supervisionado em Bromatologia;

À Rosângela Pavan pelos momentos de alegria, risadas e sufocos;

As queridas Rose e Suzi por estarem sempre prontas a me ajudar;

À Elaine e ao Jorge, da secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelas orientações e pela amizade;

A todos os amigos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química que direta ou indiretamente me auxiliaram durante a caminhada do mestrado;

Ao pessoal do Biotério de Experimentação Animal, do Comitê de Ética, dos Departamentos de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica e de Análise de Alimentos (FCF-USP), de Bioquímica (IQ-USP), da biblioteca, tesouraria e da informática pelo suporte técnico durante meu trabalho;

Aos “secretários-amigos” Edílson, Mônica e Cléo pela atenção, eficiência e pelos momentos de risada;

Às queridas Joana e Lurdinha pelo carinho e companheirismo incondicional;

Sem palavras para agradecer aos meus irmãos de São Paulo: Alexandra Tavares de Melo (Alê), Cleverson Busso (Clevim); Liliane Pires (Lila); Sandra Mara de Andrade (Sandrex);

Aos queridos amigos do laboratório de lípidos Ana Mara, Claudimar, Eliane, Felipe, Fernanda, Gabriela, Illana, Lucillia, Mahyara e Paula por serem meus companheiros e me mostrarem a cada dia o quanto é bom fazer ciência em um ambiente agradável com amizades memoráveis;

Aos amigos do CRUSP que conviveram comigo durante esses dois anos de trabalho;

Aos companheiros de apartamento e irmãos de coração Antônio Sales e Jairo por me darem conselhos nos momentos tristes e alegres;

À assistente social Lucimara e a todo pessoal do COSEAS pelo apoio irrestrito;

Ao querido amigo Diogo Rivelli e a todo o pessoal do Laboratório de Patologia (Bloco 17) por me receberem sempre tão bem e não medirem esforços para me auxiliar;

Aos alunos, funcionários e professores do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental pela amizade e apoio inesquecíveis;

À Neuza Hassimoto por ser uma amiga sem limites e estar sempre disposta a me escutar e acalantar;

À Ivanir (mãezona) por estar sempre ao meu lado, me escutando e me dando força;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro processos 08/54319-0 e 08/51333-1.

Nomes são muitos para serem lembrados e tentar cita-los abre uma boa oportunidade para o esquecimento. Por isso, agradeço de coração todos aqueles que estiveram ao meu lado!

Obrigada por tudo!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
LISTA DE REAGENTES	VII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Metabolismo do colesterol	3
2.2 Hipercolesterolemia	7
2.3 Hipercolesterolemia e estresse oxidativo.....	9
2.4 Mecanismos antioxidantes.....	15
2.5 Antioxidantes na hipercolesterolemia.....	17
2.6 Compostos fenólicos.....	18
2.7 Alecrim como fonte antioxidante	21
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo geral.....	24
3.2 Objetivos específicos	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Amostras.....	25
4.1.1 Obtenção dos extratos aquosos de alecrim.....	25
4.1.2 Obtenção dos ácidos fenólicos presentes no alecrim.....	25
4.1.3 Determinação dos fenólicos totais	26
4.2 Identificação dos ácidos carnósico e rosmarínico	27
4.3 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	27
4.3.1 Atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	27
4.3.2 Atividade antioxidante no ensaio DPPH'	28
4.4 Composição química das rações	29
4.4.1 Homogeneização das amostras	29
4.4.2 Determinação de umidade.....	30
4.4.3 Determinação de cinzas ou resíduo mineral fixo	30

4.4.4	Determinação de lipídeos ou extrato etéreo (Método de Soxhlet)	30
4.4.5	Determinação de proteína	31
4.4.6	Determinação de fibra alimentar total	32
4.4.7	Determinação dos carboidratos disponíveis por diferença	33
4.5	Determinação do perfil de ácidos graxos da ração e do tecido hepático	33
4.5.1	Extração da fração lipídica	33
4.5.2	Preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos.....	34
4.5.3	Condições cromatográficas	34
4.6	Ensaio biológico	35
4.6.1	Preparo da Dieta.....	36
4.6.2	Eutanásia dos animais.....	36
4.6.3	Preparo dos homogenatos dos tecidos	37
4.7	Avaliação da atividade antioxidante <i>in vivo</i>	38
4.7.1	Determinação das enzimas antioxidantes na fração citosólica dos tecidos	38
4.7.2	Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	38
4.7.3	Atividade da Catalase (CAT)	39
4.7.4	Atividade da Glutaciona peroxidase (GPx).....	39
4.7.5	Quantificação de proteínas nos tecidos e soro	39
4.7.6	Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ...	40
4.7.7	Lipidograma	40
4.7.8	Enzimas marcadoras de lesão hepática	41
4.8	Monitoramento do experimento	41
4.9	Análise estatística	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	Quantificação e perfil de compostos fenólicos	42
5.2	Avaliação da capacidade antioxidante	43
5.3	Quantificação dos compostos fenólicos presentes no extrato aquoso obtido em temperatura ambiente (AQ) e na fração fenólica livre (AFL) do alecrim	46
5.4	Análise das rações.....	48
5.5	Estudo <i>in vivo</i>	50

5.5.1	Efeito da administração do extrato aquoso obtido em temperatura ambiente (AQ) e da fração fenólica livre (AFL) do alecrim por 30 dias em ratos hipercolesterolêmicos.....	50
5.5.2	Efeito do extrato aquoso (AQ) e da fração fenólica livre (AFL) do alecrim sobre o lipidograma	51
5.5.3	Efeito do extrato aquoso (AQ) e da fração fenólica livre (AFL) do alecrim sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no soro	53
5.5.4	Efeito do extrato aquoso (AQ) e da fração fenólica livre (AFL) do alecrim sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) tecidual.....	55
5.5.5	Efeito do extrato aquoso (AQ) e da fração fenólica livre (AFL) do alecrim sobre as enzimas antioxidantes nos tecidos cardíaco, cerebral, hepático e renal.....	57
5.5.6	Avaliação do perfil de ácidos graxos no tecido hepático	62
5.5.7	Efeito do extrato aquoso (AQ) e da fração fenólica livre (AFL) do alecrim sobre as enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST)	65
6	CONCLUSÕES	67
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição e características das lipoproteínas plasmáticas humanas	5
Tabela 2. Quantidade de fenólicos totais nos extratos e frações de ácidos fenólicos obtidos a partir do alecrim expressa por miligrama de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama da folha de alecrim.....	42
Tabela 3. Porcentagem de inibição da oxidação no sistema beta caroteno/ácido linoleico dos diferentes extratos e frações.	44
Tabela 4. Quantidade dos ácidos carnósico e rosmarínico no extrato e na fração de ácidos fenólicos livres do alecrim oferecida aos animais	47
Tabela 5. Composição química das rações	48
Tabela 6. Perfil de ácidos graxos das rações oferecidas aos animais em porcentagem do total de ácidos graxos	49
Tabela 7. Ganho de peso (g), consumo de ração (g) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais	51
Tabela 8. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ($\mu\text{mol MDA/mg proteína}$) nos tecidos dos animais.....	56
Tabela 9. Perfil de ácidos graxos no tecido hepático (%) dos animais	63

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Via do mevalonato nas células animais (adaptado de GOLDSTEIN e BROWN, 1990).3
- FIGURA 2 - Estrutura química do colesterol (CHORILLI *et al.*, 2007).4
- FIGURA 3 - A LDL oxidada estimula a quimiotaxia de monócitos (A), impede o egresso de monócitos (B), e favorece a formação de células espumosas (C), as quais ficam necróticas devido ao acúmulo das LDL modificadas (E). Além disso, as lipoproteínas oxidadas levam à disfunção endotelial e injúria (D). Adaptado de DIAZ *et al.*, 1997 citado por STOCKER e KEANEY, 2004.10
- FIGURA 4 - Interação entre as enzimas antioxidantes endógenas.17
- FIGURA 5 - Estrutura química dos principais compostos fenólicos presentes no alecrim, ácido carnósico (CA), carnosol (C) e ácido rosmarínico (RA) (TRONCOSO *et al.*, 2005).22
- FIGURA 6 - Atividade antioxidante e valores de IC₅₀ dos extratos aquosos obtidos em temperatura ambiente (AQ 23), 20°C (AQ 20) e 60°C (AQ 60) e das frações de ácidos fenólicos livres (AFL), esterificados solúveis (AFS) e insolúveis (AFI) das folhas de alecrim em sistema de varredura do radical DPPH.45
- FIGURA 7 - Determinação de colesterol total, LDL colesterol, triacilgliceróis e HDL colesterol sérico de ratos controle (C) e hipercolesterolêmicos tratados com água (HC), extrato aquoso (AQ) nas concentrações 70 (AQ70) e 140 mg/kg (AQ140) ou fração fenólica livre do alecrim nas concentrações 7 (AFL7) e 14 mg/kg (AFL14) por 30 dias.52
- FIGURA 8 - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (µmol MDA/mg proteína) sérico dos animais controle (C) e hipercolesterolêmicos tratados com água (HC), extrato aquoso (AQ) nas concentrações 70 (AQ70) e 140 mg/kg (AQ140) ou fração fenólica livre do alecrim nas concentrações 7 (AFL7) e 14 mg/kg (AFL14) por 30 dias.54
- FIGURA 9 - Determinação da atividade das enzimas: superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase no tecido cardíaco de animais controle (C) e hipercolesterolêmicos tratados com água (HC), extrato aquoso (AQ) nas concentrações 70 (AQ70) e 140 mg/kg (AQ140) ou fração fenólica livre do alecrim nas concentrações 7 (AFL7) e 14 mg/kg (AFL14) por 30 dias. Resultados expressos em média e desvio padrão (n = 6).58

FIGURA 10 - Determinação da atividade das enzimas: superóxido dismutase e glutathiona peroxidase no tecido cerebral de animais controle (C) e hipercolesterolêmicos tratados com água (HC), extrato aquoso (AQ) nas concentrações 70 (AQ70) e 140 mg/kg (AQ140) ou fração fenólica livre do alecrim nas concentrações 7 (AFL7) e 14 mg/kg (AFL14) por 30 dias. Resultados expressos em média e desvio padrão (n = 6).59

FIGURA 11 - Determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase no tecido renal de animais controle (C) e hipercolesterolêmicos tratados com água (HC), extrato aquoso (AQ) nas concentrações 70 (AQ70) e 140 mg/kg (AQ140) ou fração fenólica livre do alecrim nas concentrações 7 (AFL7) e 14 mg/kg (AFL14) por 30 dias. Resultados expressos em média e desvio padrão (n = 6).60

FIGURA 12 - Determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase no tecido hepático de animais controle (C) e hipercolesterolêmicos tratados com água (HC), extrato aquoso (AQ) nas concentrações 70 (AQ70) e 140 mg/kg (AQ140) ou fração fenólica livre do alecrim nas concentrações 7 (AFL7) e 14 mg/kg (AFL14) por 30 dias. Resultados expressos em média e desvio padrão (n = 6).61

FIGURA 13 - Determinação das enzimas marcadoras de dano hepático (alanina aminotransferase - ALT e aspartato aminotransferase - AST) de ratos controle (C) e hipercolesterolêmicos tratados com água (HC), extrato aquoso (AQ) nas concentrações 70 (AQ70) e 140 mg/kg (AQ140) ou fração fenólica livre do alecrim nas concentrações 7 (AFL7) e 14 mg/kg (AFL14) por 30 dias. Resultados expressos em média e desvio padrão (n = 6).65

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA-1	<i>ATP Binding Cassete - 1</i>
ACAT	Acil C α : Colesterol Aciltransferase
AFI	Ácidos Fenólicos Insolúveis
AFL	Ácidos Fenólicos Livres
AFS	Ácidos Fenólicos Solúveis
AGMI	Ácidos Graxos Monoinsaturados
AGPI	Ácidos Graxos Poli-insaturados
AGS	Ácidos Graxos Saturados
ALT	Alanina Aminotransferase
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
AOCS	<i>American Oil Chemists' Society</i>
Apo	Apolipoproteína
AQ	Extrato aquoso
AST	Aspartato Aminotransferase
bFGF	Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
BHT	Hidroxitolueno Butilado
CAT	Catalase
CEA	Coeficiente de Eficiência Alimentar
CETP	Proteína de Transferência de Esteres de Colesterol
COX	Cicloxigenase
CRP	Proteína semelhante ao colágeno
CT	Colesterol Total
CYP7A1	7- α -Hidroxilase
DCV	Doenças Cardiovasculares
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	Radical 2,2 – Difenil – 1 – Picrilhidrazil
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial

EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FAS	Fibra Alimentar Solúvel
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione Reduzida
GSSG	Glutathione Oxidada
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HC	Hipercolesterolemia
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
H(P)ETE	Hidro(pero)xiicosatetraenoico
HMG-CoA	3-Hidroxi-3-Metil-Glutaril-CoA
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir em 50% a ação do radical
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular
IκBα	Inibidor da Ativação do Fator de Transcrição Nuclear κB
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
KCl	Cloreto de Potássio
KCN	Cianeto de Potássio
LCAT	Lecitina Colesterol Aciltransferase
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LLH	Lipase de Lipoproteínas Hepática
LLP	Lípase de Lipoproteínas Periférica
LOX	Lipoxigenase
LRP-1	Proteína Relacionada ao Receptor de LDL
LX A ₄ /B ₄	Lipoxinas A ₄ /B ₄
MCP-1	Proteína Quimioatrativa de Macrófagos-1
MDA	Malonaldeído
M/ μM/ mM	Molar/ Micromolar/ Milimolar
min	Minutos
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
Na ₂ CO ₃	Carbonato de Sódio

NaOH	Hidróxido de Sódio
NFκB	Fator de Transcrição Nuclear κB
nm	Nanômetros
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
O ₂ ⁻	Ânion Superóxido
OH•	Radical Hidroxila
ONOO-	Peroxinitrito
ORAC	Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio
PKC	Proteína Quinase C
PLTP	Proteína de Transferência de Fosfolípidos
PP	Pirofosfato
PTN	Proteína
QM	Quilomícrons
rpm	Rotações Por Minuto
SDS	Diocetil Sulfo-Succinato
SOD	Superóxido Dismutase
SRATB	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobartúrico
TEP	Tetraetoxipropano
TG	Triacilgliceróis
THF	Tetrahidrofurano
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VCAM-1	Molécula de Adesão Celular Vascular
VEGF	Fator de Crescimento Vasoendotelial
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
XDH	Xantina Desidrogenase
XO	Xantina Oxidase

LISTA DE REAGENTES

Acetona (Synth, A1017.01.BL);
Acetonitrila (Merck, padrão cromatográfico);
Ácido acético (Synth, A1019.01.BL);
Ácido clorídrico (Merck, 1.00317.1000);
Ácido cólico (Sigma C1129);
Ácido linoleico (Sigma, L1258);
Ácido metafosfórico (Carlo Erba, Rodano/ITA, padrão analítico);
Ácido tiobarbitúrico (Sigma- Aldrich T550-0);
Ácidos fenólicos - Sigma: rosmarínico (536954), carnósico (C0609), gálico (G7384);
Acetato de etila (Synth, A1010.01.BJ);
Álcool etílico (Synth, A1084.01.BL);
Álcool metílico (Synth, A1085.01.BJ);
 α -Amilase (Sigma A3306);
Amiloglicosidase (Sigma A9913);
 β -caroteno (Sigma, C9750);
BHT (Sigma B1378);
Tartarato de sódio e potássio (Ecibra 1791);
Carbonato de sódio (Synth, C2011.01.AH);
Citocromo c (Sigma C7752);
Cianeto de potássio (Merck 1.04967.0100);
Cloreto de potássio (Synth S5180);
Cloridrato de cetamina 10% (Syntec);
Cloridrato de xilazina 2% (Syntec);
Clorofórmio (Synth C1062.01.BJ);
Colesterol (Sigma C8503);
Diocetil sulfo-succinato (Sigma D-0885);
DPPH (Sigma D9132);
EDTA (Merck 1.08418.250);
Éter etílico (Synth, E1017.01.BJ);
Etanol (Merck – Darmstadt, ALE grau HPLC)
Folin-Ciocalteau (Dinâmica);

Fosfato de potássio dibásico (Sigma P3786);
Fosfato de potássio monobásico (QEEL indústria química S.A.)
Glutaciona redutase (Sigma 3664);
Glutaciona reduzida (Sigma 4251);
Hexano (Merck grau HPLC);
(Synth, H1007.01.BJ);
Heptano (Merck 1.04379.1000);
Hidróxido de sódio (Synth, H101.01.AH);
Kit lipidograma (Labtest, Triglicérides Liquiform (87) e colesterol (76);
Kit transaminases (Labtest, Aspartato aminotransferase (52-200) e Alanina
aminotransferase (53-200);
MES-Tris: Hidrato de MES (Sigma M8250) e Trizma (Sigma T1503);
Etanol e Metanol (Merck – Darmstadt, ALE grau HPLC)
Metil éster de ácido heptadecanoico (C17:0) (Sigma, H3500);
N-butanol (Sigma- Aldrich 154679);
NADPH (Sigma N1630);
Peridrol (Sigma H1009);
Protease (Sigma P3910);
Sulfato de Cobre (Nuclear 1260);
Sulfato de Sódio anidro (Synth, 52032.01.AH);
Terc-Butila (Sigma - Aldrich B2633);
Tetrahidrofurano (Synth, T1008.01.BJ);
Tetraetoxipropano (Sigma T9889);
Trifluoreto de Boro (Sigma B1252);
Tris HCl (Sigma T3253);
Tween 40 (Sigma P1504);
Xantina (Sigma X4002);
Xantina Oxidase (Sigma X1875).

RESUMO

AFONSO, M.S. **Avaliação do efeito do extrato aquoso e da fração fenólica livre do Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o estado antioxidante e o perfil lipídico em ratos com hipercolesterolemia induzida pela dieta.** São Paulo, 2010. 83 p. Defesa (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.

A hipercolesterolemia é considerada um importante fator de risco para as doenças cardiovasculares, já que a hiperlipidemia associada ao estresse oxidativo é um dos fatores para estabelecimento destas doenças. Neste contexto, antioxidantes presentes em alimentos como vitaminas, compostos fenólicos, entre outros têm recebido crescente atenção devido sua função quimiopreventiva contra danos oxidativos. O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) é um membro da família *Labiatae*, cujas propriedades antioxidantes têm sido atribuídas a uma variedade de compostos fenólicos capazes de finalizar as reações de radicais livres e varrer as espécies reativas de oxigênio. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos e frações de ácidos fenólicos obtidos das folhas de alecrim e seu efeito sobre ratos com hipercolesterolemia induzida pela dieta suplementada com 0,50% de colesterol e 0,25% de ácido cólico. Os resultados mostraram que tanto os extratos quanto as frações apresentaram altos teores de compostos fenólicos totais e expressiva atividade antioxidante *in vitro* nos métodos de cooxidação de substratos β -caroteno/ácido linoleico e na varredura do radical DPPH. No ensaio *in vivo*, observou-se aumento significativo ($p \leq 0,05$) de colesterol total e de LDL colesterol nos animais que consumiram a dieta hipercolesterolêmica. Os compostos fenólicos presentes tanto no extrato aquoso quanto na fração não esterificada do alecrim foram capazes de atuar sobre a atividade das enzimas antioxidantes endógenas CAT, GPx e SOD, confirmando a ação dos compostos antioxidantes presentes nesta especiaria sobre parâmetros do estresse oxidativo. O extrato aquoso na concentração 70 mg/Kg reduziu os valores de colesterol total (39,8%) e LDL-c (45,6%) e melhorou o estado antioxidante dos animais, uma vez que aumentou a atividade da GPx no tecido cardíaco (43,2%) e reduziu a formação de SRATB (32,3%) no soro dos animais. Não foi observado efeito dose resposta no lipidograma destes animais, sugerindo um limiar de atuação do extrato aquoso. Em um contexto geral, o extrato aquoso e a fração não esterificada do alecrim apresentaram capacidade antioxidante *in vitro* significativa e, nas condições do estudo, exerceram um papel importante sobre o estresse oxidativo presente na hipercolesterolemia experimental, uma vez que os resultados obtidos para o extrato aquoso administrado na concentração de 70 mg/Kg sugerem um papel importante dos compostos fenólicos presentes neste extrato sobre o metabolismo de colesterol.

Palavras-chave: Hipercolesterolemia. Perfil lipídico. Estresse oxidativo. Alecrim.

ABSTRACT

AFONSO, M.S. **Evaluation of the effect of aqueous extract and free phenolic fraction from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on antioxidant status and lipid profile in rats with hypercholesterolemia induced by diet.** São Paulo, 2010. 83 p. Defesa (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.

Hypercholesterolemia is considered an important risk factor for cardiovascular diseases, since hyperlipidemia associated to oxidative stress is one of the risk factors for these diseases. In this context, antioxidants derived from foods such as vitamins, phenolic compounds and others have been receiving increased attention due to their chemopreventive function against oxidative damages. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) belongs to the *Labiatae* family, whose antioxidant properties have been attributed to a variety of phenolic compounds capable of reacting with free radicals and quenching reactive oxygen species. The aim of this work was to evaluate the *in vitro* antioxidant capacity of extracts and phenolic acids fractions obtained from rosemary leaves and their effect on rats fed with 0.50% cholesterol and 0.25% cholic acid enriched diet. The results showed that extracts and fractions had high levels of total phenolic compounds and expressive antioxidant activity *in vitro* in both methods β -caroteno/ linoleic acid cooxidation and in the DPPH radical scavenge. Analysis *in vivo* showed a significant increase ($p \leq 0.05$) in total cholesterol and LDL cholesterol in hypercholesterolemic animals. Phenolic compounds present in rosemary aqueous extract and non-esterified fraction were capable to act on the activity of CAT, GPx and SOD, confirming the action of antioxidant compounds present in this spice on parameters of oxidative stress. Aqueous extract in concentration of 70 mg/Kg had reduced total cholesterol (39.8%) and LDL-c (45.6%) values and improved the animals' antioxidant status, once it increased heart GPx activity (43.2%) and decreased SRATB production (32.3%) in the serum of this group. There was no dose response effect on serum lipids of these animals, suggesting a threshold of the aqueous extract activity. In a general context, the aqueous extract and non-esterified fraction of rosemary presented significant antioxidant capacity *in vitro* and in the conditions of the study, played an important role on the oxidative stress in experimental hypercholesterolemia, and the results obtained for the aqueous extract administered in the concentration of 70 mg/kg suggests an important role of phenolic compounds present in this extract on cholesterol metabolism.

Key words: Hypercholesterolemia. Lipid profile. Oxidative stress. Rosemary.

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas as doenças cardiovasculares passaram a ser a principal causa de morbimortalidade nos países desenvolvidos e também em proporções cada vez maiores nos países em desenvolvimento (FALUDI e BERTOLAMI, 2005; REHRAH *et al.*, 2007). Dentre os eventos cardiovasculares, a doença aterosclerótica é responsável por aproximadamente cinquenta por cento das mortes em países ocidentais (ARAÚJO *et al.*, 2005) e, no Brasil, cerca de 300.000 pessoas por ano são vítimas desta doença (COSTA e SILVA, 2005).

O aumento na incidência de doenças cardiovasculares em nosso país deve-se à transição nos padrões nutricionais e à inatividade física, o que possibilitou o aumento na prevalência de dislipidemia, considerada um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares e caracterizada pela elevação dos níveis plasmáticos de triacilgliceróis, colesterol total e sua fração LDL-c, associados à diminuição nos valores de HDL-c (BRUCKNER, 2008).

O excesso de colesterol nos eritrócitos, leucócitos, plaquetas e células endoteliais estimula a produção de espécies reativas, contribuindo para a disfunção endotelial e a modificação da LDL (FORSTERMANN, 2008; SUDHAHAR, KUMAR e VARALAKSHMI, 2006). Além disso, a hipercolesterolemia leva à redução do potencial dos sistemas de defesa antioxidante, tal como a diminuição na atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase (ANILA e VIJAYALAKSHMI, 2003). Estes fatores favorecem o aumento significativo de espécies reativas estabelecendo um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, o que levará à alteração nos processos de sinalização e controle redox e/ou dano molecular (JONES, 2006), condição conhecida como estresse oxidativo (SEIFRIED *et al.*, 2007).

Desta forma, um sistema de defesa que impeça ou minimize os efeitos dos radicais livres sobre o organismo é importante para reduzir o risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares (YOKOZAWA, NAKAGAWA e KITANI, 2002).

Como os antioxidantes aumentam a resistência da LDL-c à oxidação (RIQUE, SOARES e MEIRELES, 2002), maior atenção tem sido dada para avaliar a resposta cardiovascular em animais alimentados com dieta hipercolesterolêmica e suplementadas com ervas naturais (ASHRAF, HUSSAIN e FAHIM, 2005).

Entre os antioxidantes naturais, os polifenóis têm recebido grande atenção por estarem amplamente distribuídos em plantas e exibirem propriedades antioxidante (GLADINE *et al.*, 2007) e hipolipidêmica (EL-BESHBISHY, 2006; KOSHY, 2001).

Em experimentos utilizando ratos com hipercolesterolemia induzida por dieta, os polifenóis presentes no chá verde (YOKOZAWA, NAKAGAWA e KITANI, 2002), na manga (*Mangifera indica* L.) e no fruto emblica (*Emblica officinalis* L.) (ANILA e VIJAYALAKSHMI, 2003) demonstraram reduzir os níveis de colesterol e LDL séricos. Os mesmos resultados foram relatados por Koshy (2001) e El-Beshbishy (2006) utilizando garcínia (*Garcinia cambogia* L.) e amoreira branca (*Morus alba* L.), respectivamente.

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) é um membro da família *Labiatae* e tem sido utilizado por suas propriedades medicinais desde a antiguidade (ANGIONI *et al.*, 2004). Sua propriedade antioxidante tem sido atribuída à variedade de isoprenoides quinonas, diterpenos fenólicos como o ácido carnósico e o carnosol, o ácido rosmarínico, além de antioxidantes adicionais incluindo ácidos fenólicos e flavonoides (DEL BAÑO *et al.*, 2003; SEWALT, ROBBINS e GAMBLE, 2005).

A formação de radicais livres e a capacidade antioxidante têm papel importante nas doenças crônicas não transmissíveis e, neste contexto, sugere-se que uma intervenção com antioxidantes da dieta poderá auxiliar o organismo nesta defesa.

Embora estudos tenham apontado a ação dos compostos presentes no alecrim sobre algumas doenças, o uso desta especiaria na hipercolesterolemia continua sendo relevante para se obter mais informações visando à redução do risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Metabolismo do colesterol

A síntese bioquímica dos lipídeos acontece a partir do acetil-CoA do qual pode ocorrer a formação tanto de ácidos graxos quanto dos isoprenoides (GLEW, 2007). A primeira reação do acetil-CoA leva à formação de um composto com cinco carbonos em sua estrutura e a partir deste originam-se os esteróis por meio de diversas reações, formando os compostos observados na Figura 1.

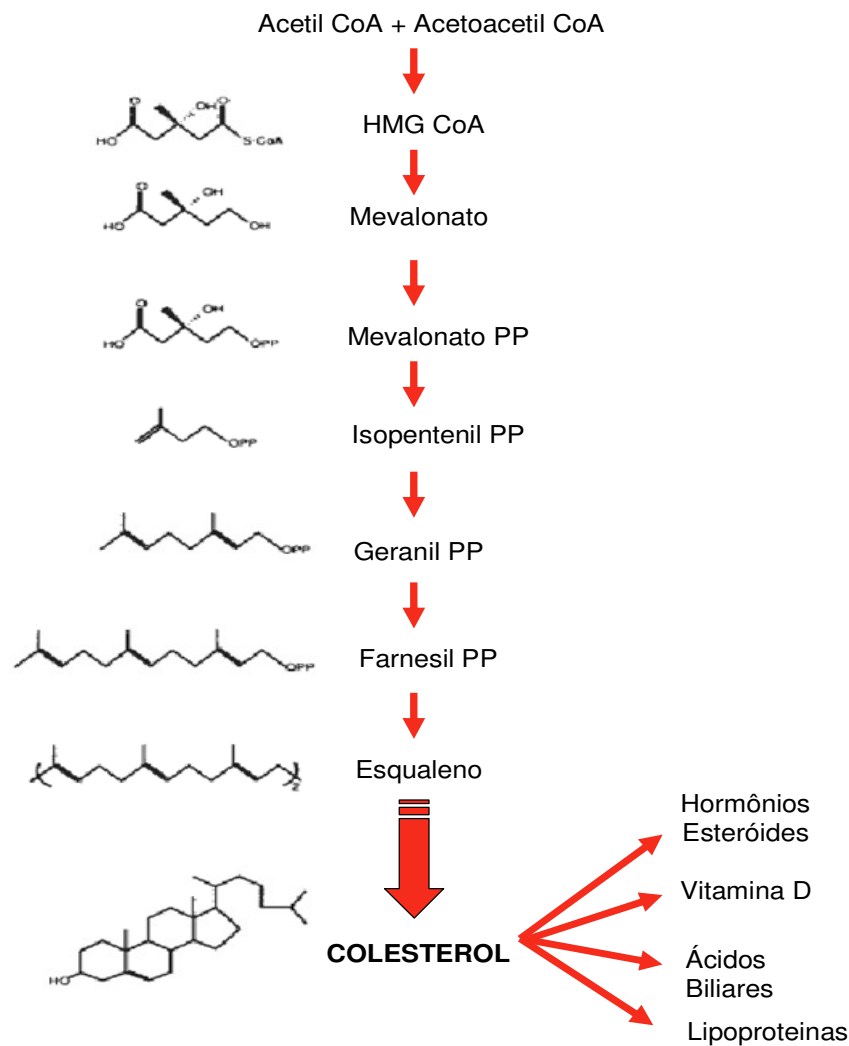


FIGURA 1 - Via do mevalonato nas células animais (adaptado de GOLDSTEIN e BROWN, 1990).

O colesterol é um esteroide cuja formação é regulada pela hidroximetilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA), enzima chave para síntese intracelular de colesterol hepático (WIVIOTT e CANNON, 2006). Este esteroide é um importante constituinte dos tecidos em virtude de seu duplo papel como componente estrutural de membranas biológicas, nas quais atua na fluidez e na ativação de enzimas, e como precursor dos hormônios esteroides, dos ácidos biliares e da vitamina D (SPOSITO *et al.*, 2007). A estrutura química do colesterol está representada na Figura 2.

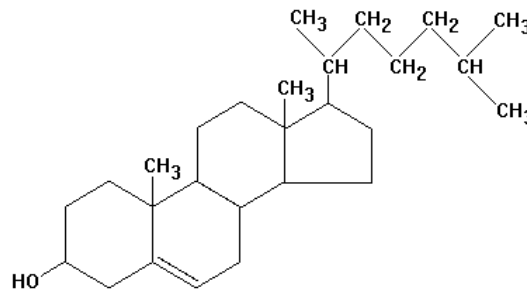


FIGURA 2 - Estrutura química do colesterol (CHORILLI *et al.*, 2007).

Para que ocorra a absorção de colesterol, bem como de lipídeos e de vitaminas lipossolúveis no lúmen intestinal, é essencial a presença dos ácidos biliares, uma vez que estes possuem uma característica anfipática e habilidade de formar micelas nas quais o lipídeo é transmitido da barreira aquosa luminal para a membrana da borda em escova das células epiteliais intestinais. Nos humanos, a maioria dos sais biliares circulantes está conjugada aos aminoácidos glicina e taurina, normalmente conhecidos como ácido cólico e quenodesoxicólico, respectivamente (HUI e HOWLES, 2005; KULLAK-UBLICK, STIEGER E MÉIER, 2004).

Após a absorção, o colesterol livre, fosfolipídeos, mono e diacilgliceróis e os ácidos graxos livres são reesterificados e reorganizados em uma forma mais estável no enterócito para que possam ser transportados na circulação. A reesterificação ocorre pela ação da enzima acil CoA: colesterol aciltransferase (ACAT), cuja atividade é estimulada por altas concentrações de colesterol dietético (LU, LEE e PATEL, 2001; RAMOS *et al.*, 2008).

Nos animais, os lipídeos são transportados entre os órgãos como ácidos graxos não esterificados complexados com albumina ou na forma de lípidos complexos associados com lipoproteínas (GURR, FRAYN e HARWOOD, 2002). Por ser insolúvel em ambientes hidrofílicos, o colesterol é transportado no sangue essencialmente pelas lipoproteínas, as quais são classificadas de acordo com a sua densidade, conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Composição e características das lipoproteínas plasmáticas humanas

	QM	VLDL	LDL	HDL
Proteína (% mp)	2	7	20	50
Triacilgliceróis (% mp)	83	50	10	8
Colesterol (% mp)	8	22	48	20
Fosfolípidos (% mp)	7	20	22	22
Massa partícula (daltons)	0,4-30 x 10 ⁶	10-100 x 10 ⁶	2-3,5 x 10 ⁶	1,75-3,6 x 10 ⁵
Densidade (g/mL)	<0,950	0,950-1,006	1,019-1,063	1,063-1,210
Diâmetro (nm)	80-1000	30-90	18-22	5-12
Apolipoproteínas	AI, AII, AIV, B-48, CI, CII, CIII, E	B-100, CI, CII, CIII, E	B-100	AI, AII, AIV, CI, CII, CIII, D, E

% mp: percentual com relação à massa da partícula

QM – quilomícron; VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade; LDL – lipoproteína de baixa densidade; HDL – lipoproteína de alta densidade.

Fonte: GURR, FRAYN e HARWOOD, 2002.

Didaticamente o mecanismo de transporte das lipoproteínas é dividido em três vias: a exógena, a endógena e a reversa. Contudo, vale ressaltar que fisiologicamente, essas etapas ocorrem de forma simultânea e interativa.

A via exógena envolve os componentes lipídicos provenientes da dieta. Os ácidos graxos de cadeia longa são transportados pelos quilomícrons, os quais são secretados no ducto linfático, alcançam o ducto torácico e entram na circulação pela veia subclávia chegando ao coração para distribuição em todo o organismo. Os quilomícrons contêm as apolipoproteínas B48, A-I, A-II e A-IV e, na circulação, eles adquirem a apo E e a apo C da lipoproteína de alta densidade (HDL) circulante. Quando a apo CII entra em contato com os

capilares endoteliais, a enzima lipase de lipoproteínas periférica (LLP) hidrolisa os triacilgliceróis formando os remanescentes de quilomícrons, os quais são reconhecidos por receptores de LDL (tipo B/E) ou pela proteína relacionada ao receptor de LDL (LRP-1) e, em seguida catabolizados no fígado. Ácidos graxos com menos de 12 átomos de carbono são absorvidos na forma não esterificada, passando diretamente para a circulação portal e atingindo o fígado no qual serão metabolizados pela β -oxidação (GURR, FRAYN e HARWOOD, 2002; WELCH e BORLAK, 2008).

A via endógena configura a secreção da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) pelo fígado e seu consequente metabolismo, ou seja, envolve a liberação de ácidos graxos presentes nas lipoproteínas aos tecidos pela ação das lípases de lipoproteínas periférica (LLP) e hepática (LLH) (WELCH e BORLAK, 2008). Após sucessiva ação dessas lípases são formadas as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais são responsáveis pelo transporte de 65 a 70% do colesterol plasmático. Em condições normais, a maior parte destas lipoproteínas é removida da circulação após ligação com receptores celulares específicos (tipo B/E) formando complexos LDL-receptor que são internalizados e degradados (LOTTENBERG, 2009).

A terceira via consiste no transporte reverso de colesterol, o qual envolve a ação das proteínas *ATP Binding Cassete* (ABCA1) e *Cholesteryl Ester Transfer* (CETP). A proteína ABCA1 é um passo limitante para a formação e manutenção dos níveis plasmáticos de HDL, uma vez que transporta o colesterol intracelular para a superfície, ligando-se à apoproteína A1, a qual transfere os fosfolípidos e colesterol para a HDL discoidal. Pela ação da proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) e da lecitina:colesterol aciltransferase (LCAT), enzima envolvida na esterificação do colesterol com ácidos graxos de cadeia longa, a HDL torna-se esférica e madura. Já a CETP facilita a transferência de ésteres de colesterol da HDL para lipoproteínas que contenham apo B, tais como a VLDL e LDL (GURR, FRAYN e HARWOOD, 2002; YOKOYAMA, 2000). Todos estes mecanismos têm como finalidade transferir o colesterol dos tecidos para o fígado via receptores específicos, no qual poderá ser armazenado na forma de éster de colesterol nas VLDL para secreção no plasma ou ser excretado na bile tanto na forma livre como ácidos biliares após sofrer a ação da enzima 7- α -hidroxilase (CYP7A1). O colesterol e os ácidos

biliares poderão ser reabsorvidos no intestino delgado, propagando o chamado ciclo enterohepático, ou excretados nas fezes (IKONEN, 2008).

2.2 Hipercolesterolemia

Conforme observado no item anterior, a concentração de colesterol plasmático no organismo é regulada pela biossíntese do colesterol, absorção de colesterol dietético, remoção do colesterol circulante e excreção de colesterol e ácidos biliares nas fezes (SUDHAHAR, KUMAR e VARALAKSHMI, 2006).

Contudo, as dietas ricas em colesterol, bem como a modificação dos padrões dietéticos que incluem aumento no consumo de energia, açúcares, sal, gorduras totais, trans e saturadas (MAGALHÃES, CHAGAS e LUZ, 2005), aliadas à inatividade física, possibilitam o aumento na prevalência de dislipidemia, a qual é considerada um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares e caracterizada pela elevação dos níveis plasmáticos de triacilgliceróis, colesterol total e sua fração LDL-c, associados à diminuição nos valores de HDL-c (BRUCKNER, 2008).

Nas últimas décadas as doenças cardiovasculares (DCVs) passaram a ser a principal causa de morbimortalidade nos países desenvolvidos e também em proporções cada vez maiores nos países em desenvolvimento (FALUDI e BERTOLAMI, 2005; REHRAH *et al.*, 2007). Dentre os fatores de risco para enfermidades cardiovasculares, Martinez e colaboradores (2003) determinaram os níveis de colesterol em 81.262 indivíduos com mais de 18 anos em 13 cidades brasileiras e observaram que a prevalência dos níveis de colesterol acima de 200 e 240 mg/dL foram de 40% e 13%, respectivamente. Além disso, os mesmos observaram que quanto maior a quantidade de fatores de risco associados, maiores os níveis de colesterol ($p < 0,0001$) e a proporção de indivíduos com colesterol > 200 mg/dL ($p = 0,032$) (Martinez *et al.*, 2003). Em estudo transversal realizado na cidade de São Paulo com pessoas de 15 a 59 anos de idade, Marcopito *et al.* (2005) constataram prevalência de 8,1% de indivíduos com colesterol total ≥ 240 mg/dL; 27,1% com HDL-colesterol < 40 mg/dL; 14,4% com triacilgliceróis ≥ 200 mg/dL.

Nas dislipidemias, a principal conduta terapêutica até então adotada por muitos profissionais de saúde é o controle do LDL-c, composto conhecido popularmente como o “colesterol ruim” por depositar o colesterol nas células (COSTA e SILVA, 2005). Tal preocupação provém de dados científicos que indicaram a elevação deste componente como a maior causa de doença arterial coronariana (DAC), pois quando oxidada, esta molécula atua no início e na progressão da aterosclerose (ARAÚJO *et al.*, 2005; MATSUURA *et al.*, 2006; NOVELLI e DINIZ, 2005).

As recomendações nutricionais para dislipidemias são, entre outras, ingerir frutas, legumes e verduras variados, grãos, leguminosas, peixes, frango sem pele e carnes magras, leite e derivados desnatados; adequar a ingestão de calorias para promoção da perda de peso quando necessária; reduzir a ingestão de gorduras saturadas e trans (< 7% e 2% do valor calórico total da dieta, respectivamente) e do colesterol total (< 200 mg/dia) (COSTA e SILVA, 2005; SPOSITO *et al.*, 2007).

Tais condutas, aliadas à substituição isocalórica de ácidos graxos saturados pelos insaturados provocam redução do colesterol total e do LDL-c (CAVALCANTI e BENSEÑOR, 2005). Conforme relatado por Moreira e Mancini-Filho (2004), as dietas dos países da costa do Mediterrâneo são um bom exemplo, pois a incidência de mortalidade por DCV é menor possivelmente pelo maior aporte de ácidos graxos insaturados e antioxidantes obtidos do alto consumo de azeite, peixes, frutas, verduras e legumes, bem como especiarias, vinho tinto e chás. Em estudos que utilizaram adaptações desta dieta, como o *Lyon Diet Heart Study* (LORGERIL *et al.*, 1999) e o *Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico* (GISSI) (BARZI *et al.*, 2003), observou-se importante redução de mortalidade por doença cardiovascular.

Dentre os antioxidantes, Hertog e colaboradores (1993) observaram no *Zutphen Elderly Study* que todos os índices de causa da mortalidade diminuíram com o aumento da ingestão de flavonoides, mesmo após o ajuste para potenciais variáveis de confundimento.

Portanto, acredita-se que os antioxidantes dietéticos são responsáveis, ao menos em parte, pelos efeitos benéficos das dietas ricas em frutas e

vegetais, recomendadas mundialmente para prevenção de doenças (SIES, STAHL e SEVANI, 2005).

2.3 Hipercolesterolemia e estresse oxidativo

A formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) é uma consequência natural do metabolismo aeróbico e é importante para manter a homeostase de oxigênio nos tecidos (SEIFRIED *et al.*, 2007). Entretanto, o excesso de colesterol nos eritrócitos, leucócitos, plaquetas e células endoteliais estimula a produção de espécies reativas, contribuindo para a disfunção endotelial e a modificação da LDL (FORSTERMANN, 2008; SUDHAHAR, KUMAR e VARALAKSHMI, 2006). A oxidação da LDL é uma reação em cadeia da peroxidação lipídica que transforma os ácidos graxos poli-insaturados e colesterol em hidroperóxidos lipídicos e oxicolesterol, respectivamente, causando danos em células endoteliais e promovendo a formação da placa aterosclerótica (FKI, SAHNOUN e SAYADI, 2007). A oxidação de lipídeos em lesões ateroscleróticas humanas e o excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitrito ($ONOO^-$), são as evidências da presença da LDL oxidada *in vivo* (GRIENDLING e FITZGERALD, 2003).

O acúmulo e a oxidação da LDL-c na parede vascular promovem um aumento na expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais (VCAM-1 e ICAM-1), ativação de células musculares lisas e endoteliais e a secreção de mediadores inflamatórios, levando ao recrutamento de monócitos e linfócitos para a íntima (ROCHA e LIBBY, 2009). Os monócitos, por sua vez, se diferenciam em macrófagos, os quais possuem receptores sequestrantes da LDL modificada, tais como CD-36 e SR-BI. Estes receptores não têm a expressão regulada pelas concentrações intracelulares de colesterol e, portanto, observa-se um acúmulo de colesterol nos macrófagos, desencadeando a formação de células espumosas ricas em lipídeos (LECUMBERRI *et al.*, 2007).

A Figura 3 ilustra a hipótese da modificação oxidativa na aterosclerose.

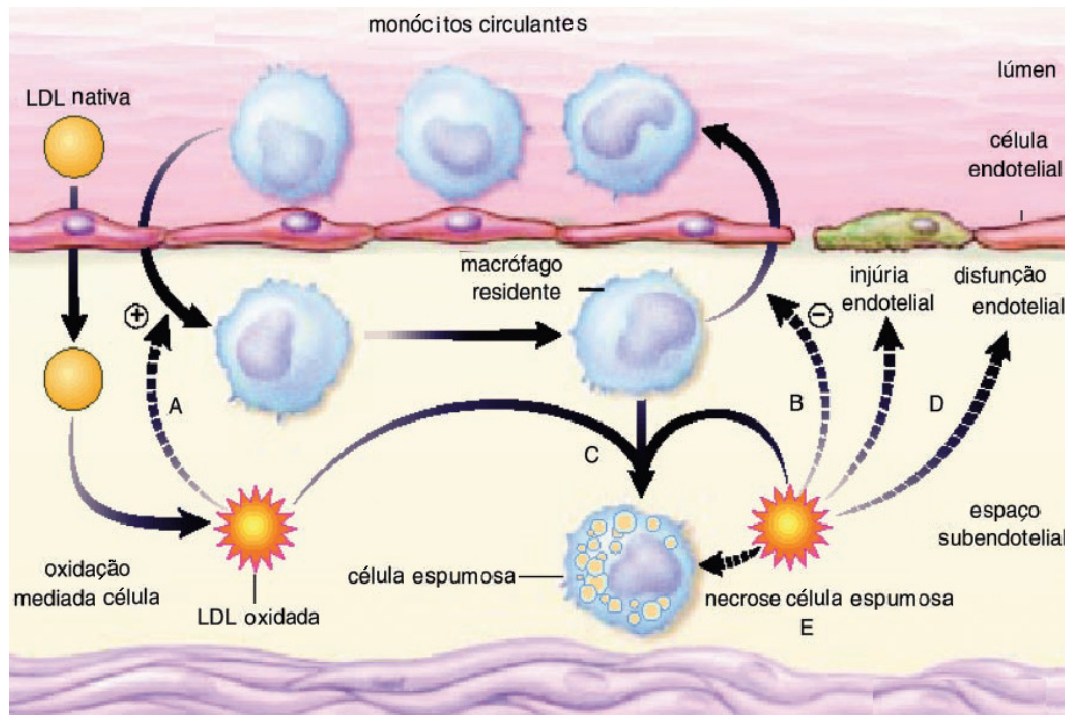


FIGURA 3 - A LDL oxidada estimula a quimiotaxia de monócitos (A), impede o egresso de monócitos (B), e favorece a formação de células espumosas (C), as quais ficam necróticas devido ao acúmulo das LDL modificadas (E). Além disso, as lipoproteínas oxidadas levam à disfunção endotelial e injúria (D). Adaptado de DIAZ *et al.*, 1997 citado por STOCKER e KEANEY, 2004.

Os efeitos da LDL oxidada sobre a parede vascular também incluem danos ao DNA e consequente apoptose de células endoteliais, macrófagos e células musculares lisas, o que pode favorecer a ativação de genes próinflamatórios e de fatores de crescimento bem como o aumento dos fosfolípidos oxidados capazes de induzir a interação monócito-endotélio (GIOVANNINI *et al.*, 2007; TIROSH e ARONIS, 2008).

Em sistemas biológicos, uma variedade de espécies reativas, tais como o ânion superóxido, alcoxilas, peroxilas, hidroxilas, óxido nítrico, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, oxigênio *singlet* e peroxinitritos, podem ser encontradas (HALLIWELL, 2006). Na parede vascular estas espécies podem ser originadas em vias enzimáticas e não enzimáticas. Dentre as vias enzimáticas podemos destacar a xantina oxidase (XO), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase), óxido nítrico sintase (NOS), mieloperoxidase (MPO), lipoxigenases (LOX) e cicloxigenases (COX).

Xantina Oxidase (XO)

Esta enzima doa elétrons para o oxigênio molecular, produzindo superóxido e peróxido de hidrogênio. A fonte da xantina oxidase ainda não está clara, mas níveis aumentados de colesterol têm mostrado que é possível estimular o deslocamento desta enzima do fígado para a circulação (FORSTERMANN, 2008). Em trabalho realizado em células endoteliais da aorta de bovinos submetidas a estresse por estiramento oscilatório, McNally *et al.* (2003) observaram um aumento na produção de superóxido dependente de xantina, bem como a redução nos níveis e na atividade enzimática da xantina desidrogenase (XDH) resultando em uma razão aumentada de xantina oxidase (XO) e XDH.

Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase (NADPH oxidase)

Esta enzima proporciona o aumento dos níveis de ânions superóxido, os quais podem reagir com óxido nítrico e, dessa forma, contribuir para a disfunção endotelial e alterar a vasodilatação e o relaxamento do endotélio (PAPAHARALAMBUS e GRIENDLING, 2007).

Em lesões ateroscleróticas mais avançadas, as espécies reativas de oxigênio derivadas de NAD(P)H oxidase podem exercer um papel crucial na sua progressão, uma vez que os radicais podem contribuir para a oxidação da LDL, a produção local da proteína quimioatrativa de macrófagos-1 (MCP-1), o estímulo das moléculas de adesão, o recrutamento de macrófagos, a disfunção endotelial e o remodelamento da matriz extracelular através da degradação de colágeno, o que favorece uma eventual ruptura da placa (GRIENDLING, SORESCU e USHIO-FUKA, 2000).

Óxido Nítrico Sintase (NOS)

É uma família de enzimas que catalisa a oxidação da L-arginina a L-citrulina e óxido nítrico (NO) e, no contexto cardiovascular, as mais relevantes são NOS endotelial (eNOS) e NOS induzível (iNOS) (STOCKER e KEANEY, 2004).

O NO é um potente oxidante produzido tanto pelas células endoteliais quanto por macrófagos e pode exercer efeitos aterogênicos ou protetores, dependendo da sua fonte de produção. Quando sintetizado a partir da eNOS, sua função vasodilatadora oferece proteção contra a hipertensão e a progressão da aterosclerose. Ao contrário, o NO produzido pela via iNOS nos macrófagos contribui para a oxidação da LDL *in vivo* (DEANFIELD, HALCOX e RABELINK, 2007). Além disso, o aumento da produção de EROs nos vasos sanguíneos reduz a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) e favorece o desacoplamento da eNOS pela oxidação da tetrahydrobiopterina podendo induzir a disfunção endotelial (TOUSOULIS *et al.*, 2008).

A hipercolesterolemia induzida pela dieta proporciona a diminuição na atividade da óxido nítrico sintase (NOS) favorecendo as complicações cardiovasculares via redução do relaxamento endotelial (DEVIRIM *et al.*, 2007). Em estudos realizados com coelhos e ratos hipercolesterolêmicos, observou-se que a suplementação oral com L-arginina e a administração de extratos fitoquímicos, respectivamente, possibilitaram o aumento de óxido nítrico e reduziram a severidade dos eventos coronarianos (BOUDERBALA *et al.*, 2008; KUMAR, AGARWAL e KUMAR, 2007).

Mieloperoxidase (MPO)

Derivada de leucócitos, esta enzima catalisa reações com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para gerar compostos oxidantes mais potentes como o ácido hipocloroso e o radical tiroxil e tem sido apontada como participante central do elo entre inflamação e doença cardiovascular (ROMAN, WENDLAND e POLANGZYK, 2007). Na aterosclerose, a MPO está envolvida na oxidação da LDL e na ativação de metaloproteinases, participando da instabilização e da ruptura da placa, além de interferir na biodisponibilidade do óxido nítrico (ESPORCATE *et al.*, 2007). De acordo com Stocker e Keaney (2004), as MPO também tornam a superfície endotelial trombogênica pela expressão de vários fatores pró-trombóticos e antifibrinolíticos.

Lipoxigenases (LOX)

Estas enzimas catalisam a introdução estereoespecífica do oxigênio molecular nos ácidos graxos poli-insaturados (preferencialmente no ácido araquidônico) para dar origem a uma família complexa de lipídeos biologicamente ativos, tais como os leucotrienos e lipoxinas (PRASAD *et al.*, 2004).

A 15-LOX tem sido associada à inflamação e aterosclerose, já que citocinas próinflamatórias específicas estimulam a expressão desta enzima em macrófagos e sua forma ativa está superexpressa em lesões ateroscleróticas (PIRILLO *et al.*, 2008).

Da mesma forma, a 5-LOX também tem sido associada a processos ateroscleróticos, uma vez que em estudo conduzido por Spanbroek, Grabner e Lotzer (2003) observou-se aumento no número de células que expressam esta enzima na parede arterial, tais como os macrófagos, células espumosas e dendríticas, conforme a progressão da doença coronariana.

Outra lipoxigenase importante no contexto cardiovascular é a 12-LOX, a qual possui três isoformas nomeadas de acordo com o local de sua descoberta: plaquetas, leucócitos e epiderme. Em trabalho realizado por Nie e colaboradores (2000) observou-se que a inibição da 12-LOX reduzia a proliferação de células endoteliais estimuladas pelos fatores de crescimento fibroblástico básico (bFGF) ou vasoendotelial (VEGF), demonstrando o importante papel que esta via apresenta na angiogênese.

Os eicosanoides anti-inflamatórios também podem ser sintetizados pelas lipoxigenases, tais como as lipoxinas A_4 (LXA₄) e B_4 (LXB₄). Estas normalmente são formadas pela interação de células envolvendo a mucosa, como, por exemplo, a observada entre os leucócitos e as plaquetas dos vasos sanguíneos. A principal ação das lipoxinas é limitar o recrutamento, a quimiotaxia e a adesão de polimorfonucleares no local da inflamação e no contexto cardiovascular inibem a proliferação e migração de células endoteliais (FIERRO, KUTOK e SERHAN, 2002; SERHAN, 2008).

Ciclooxigenases (COX)

O ácido araquidônico também pode ser metabolizado via ciclooxigenase formando as prostaglandinas e tromboxanos (SCHNEIDER e BUCAR, 2005).

As duas isoformas conhecidas são COX 1 e 2 (também denominadas prostaglandinas H sintases 1 e 2). A expressão da COX 2 é aumentada após exposição a citocinas (processos inflamatórios), enquanto a COX 1 é uma enzima constitutiva expressa em diversas células (BAI e ZHU, 2008).

A COX-2 tem um papel importante na angiogênese, já que sua expressão pode ser detectada em neovasos e é regulada nas células endoteliais por fatores pró-angiogênicos tais como os fatores de crescimento vasoendotelial (VEGF) e fibroblástico básico (bFGF) (ALFRANCA *et al.*, 2006). Alguns compostos bioativos tais como curcumina, resveratrol e epigallocatequina galato, presentes respectivamente na cúrcuma, uva e chá verde, têm mostrado ação antiinflamatória já que são capazes de dificultar a translocação do fator nuclear κ B (NF κ B) ao núcleo e, conseqüentemente, a transcrição de genes que codificam para COX-2, 5-LOX, interleucinas (IL), iNOS entre outros (RAHMAN, BISWAS e KIRKHAM, 2006).

Todas essas enzimas podem contribuir para um aumento significativo na concentração de espécies reativas de oxigênio, favorecendo o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, o que levará a uma ruptura da sinalização e controle redox e/ou dano molecular (JONES, 2006). Esta condição é conhecida como estresse oxidativo, o qual está relacionado a diversas enfermidades crônicas não transmissíveis (SEIFRIED *et al.*, 2007).

Desta forma, um sistema de defesa que impeça ou minimize os efeitos dos radicais livres presentes na circulação sobre a parede arterial é importante para prevenir a oxidação da LDL e, portanto, o risco de doenças cardiovasculares (YOKOZAWA, NAKAGAWA e KITANI, 2002).

Assim, foi formulada a hipótese de que os antioxidantes possam, ao menos parcialmente, prevenir riscos cardiovasculares normalmente causados pelo excesso de radicais livres (FKI, SAHNOUN e SAYADI, 2007).

2.4 Mecanismos antioxidantes

Nos seres humanos, a proteção contra o estresse oxidativo é realizada por uma variedade de mecanismos que incluem enzimas como catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) (CHOI e HWANG, 2005; TOUSOULIS *et al.*, 2008), enzimas reparadoras como as DNA glicosilases, bem como antioxidantes hidrossolúveis como o ácido ascórbico (Vitamina C) e lipossolúveis, como o α -tocoferol (Vitamina E) e os carotenoides (PRATICÒ, 2005). Será discutido a seguir o papel das enzimas SOD, CAT e GPx, as quais constituem os componentes principais do sistema antioxidante enzimático.

Superóxido Dismutase (SOD)

Esta enzima tem a capacidade de dismutar o ânion superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Em humanos existem três formas enzimáticas: uma citoplasmática (cobre zinco SOD), uma mitocondrial (manganês SOD) e uma extracelular (SOD3 - cobre zinco SOD) (WASSMANN, WASSMANN e NICKENIG, 2004). Estudos conduzidos com ratos da linhagem Wistar com hipercolesterolemia induzida pela dieta mostraram um aumento da atividade desta enzima em tecidos e plasma após tratamento com antioxidantes naturais *Piper cubeba* (fruta), *Physalis angulata* (flor) e *Rosa hybrida* (flor) (CHOI e HWANG, 2005) e *Ajuga iva* (BOUDERBALA *et al.*, 2008).

Catalase (CAT)

A principal função da catalase é promover a decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2), protegendo as células do estresse oxidativo, uma vez que o peróxido reage diretamente com resíduos tióis das proteínas redox-sensíveis ou modifica a razão da glutathiona reduzida para glutathiona oxidada (GSH/GSSG) (ANDERSON *et al.*, 2009).

Em animais de laboratório com hipercolesterolemia induzida por dieta, Anila e Vijayalakshmi (2003) observaram aumento na atividade desta enzima após o tratamento com manga (*Mangifera indica* L.) e emblica (*Emblica officinalis* L.) na dose de 10 mg/Kg.

De acordo com Forstermann (2008), a expressão aumentada desta enzima possibilita a inibição da hipertrofia da parede aórtica induzida pela angiotensina II e a redução no desenvolvimento da aterosclerose, exercendo, portanto, efeitos protetores no sistema cardiovascular.

Glutationa Peroxidase (GPx)

A função bioquímica da glutatona peroxidase é reduzir os hidroperóxidos lipídicos em seus alcoóis correspondentes, bem como o peróxido de hidrogênio livre em água e glutatona oxidada (GSSG) (WASSMANN, WASSMANN e NICKENIG, 2004). A família GPx possui quatro isoformas e integra o grupo de selenoproteínas, pois contêm selênio em seu sítio ativo e atua em membranas, no citosol e na mitocôndria (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Trabalhos recentes mostraram o efeito positivo de compostos fenólicos sobre a atividade desta enzima em tecidos como fígado, coração, rins (CHENNI *et al.*, 2007) e também em eritrócitos (BOUDERBALA *et al.*, 2008) de animais submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica. A interação entre tais enzimas antioxidantes está apresentada na Figura 4.

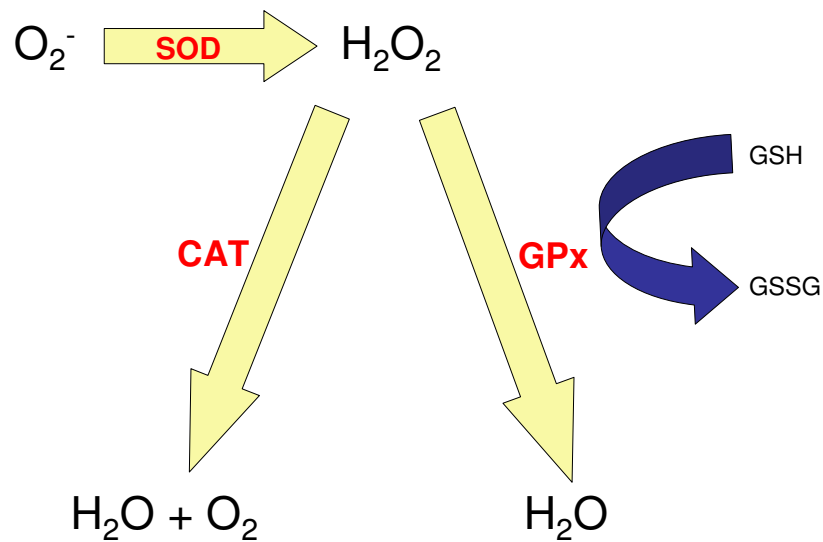


FIGURA 4 - Interação entre as enzimas antioxidantes endógenas.

Se a hipótese de que o desequilíbrio entre a formação de radicais livres e a capacidade do endotélio de destruí-las tem um papel importante sobre a função endotelial, este pode ser prevenido por moléculas com capacidade de sequestrar as espécies reativas. Portanto, uma intervenção com antioxidantes exógenos poderá proteger o endotélio vascular, principalmente via atividade de sequestro de radicais livres e restaurando a biodisponibilidade de óxido nítrico (PRATICÒ, 2005).

2.5 Antioxidantes na hipercolesterolemia

Os efeitos dos antioxidantes sobre a hipercolesterolemia são atribuídos à capacidade dos mesmos em aumentar a resistência da LDL-c à oxidação e, portanto, reduzir o risco de doenças cardiovasculares. Em modelos animais, observou-se que a vitamina E e o probucol preveniram a oxidação de LDL e retardaram o desenvolvimento de placas ateroscleróticas (YOKOZAWA, NAKAGAWA e KITANI, 2002). A oxidação da LDL também foi reduzida de modo dose dependente em humanos após a suplementação com vitamina E e

carotenoides (UPRITCHARD *et al.*, 2003). No estudo *Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention* (ASAP), a combinação de 272 UI de α -tocoferol e 500 mg de ácido ascórbico diariamente possibilitaram uma redução significativa da espessura da camada íntima-média em homens hipercolesterolêmicos (SALONEN *et al.*, 2003). Já Yusuf *et al.* (2000) observaram no *Heart Outcomes Prevention Evaluation* (HOPE) que a suplementação com 400 UI de vitamina E em pacientes com alto risco cardiovascular não proporcionou proteção contra a mortalidade por doenças cardiovasculares. No *Cambridge Heart Antioxidant Study* (CHAOS), a suplementação diária com 400-800 UI vitamina E em pacientes com doença arterial coronariana, reduziu a frequência de infartos não-fatais, mas aumentou a incidência de mortes por eventos cardiovasculares (STEPHENS *et al.*, 1996).

Os resultados controversos encontrados nos estudos alertam para a importância do uso de fontes alimentares destas vitaminas para atingir o perfil antioxidante adequado de forma segura, evitando possíveis danos causados por doses elevadas.

Nesse contexto, alimentos naturais e antioxidantes presentes em alimentos, tais como vitaminas e compostos fenólicos, têm recebido crescente atenção (SHAHIDI, ALASALVAR e LIYANA-PATHIRANA, 2007).

Os antioxidantes naturais são compostos de baixo peso molecular capazes de sequestrar diretamente as espécies reativas e compreendem os tocoferóis, ascorbato, carotenoides, tióis e polifenóis (SIES, STAHL e SEVANI, 2005).

2.6 Compostos fenólicos

Os polifenóis normalmente estão presentes em vegetais e representam mais de 8.000 diferentes compostos, classificados em categorias baseadas na sua estrutura química (ÂNGELO e JORGE, 2007).

Compostos cuja estrutura contém pelo menos um anel aromático ligado a um ou mais grupamentos hidroxila, os compostos fenólicos estão divididos em dois grandes grupos: os flavonoides e seus derivados e os ácidos fenólicos e cumarinas (SOARES, 2002).

Dentre os ácidos fenólicos existem os derivados do ácido benzoico, tais como os ácidos elágico, gálico, gentíssico, p-hidroxibenzoico, protocatequínico, salicílico, siríngico e vanílico, e os derivados do ácido cinâmico, como cafeico, ferúlico, sinápico e p-cumárico (MANACH *et al.*, 2004).

Conhecidos como potentes antioxidantes *in vitro* (GHISELLI *et al.*, 2000; GIOVANNINI *et al.*, 2007) e, devido sua similaridade estrutural com várias moléculas sinalizadoras e efetoras, os compostos fenólicos podem participar dos processos de sinalização, atuando sobre proteínas, enzimas e fatores de transcrição de vias metabólicas (YEH e YEN, 2006). Além disso, como estas substâncias protegem os constituintes lipídicos da oxidação, julga-se que as mesmas tenham um papel importante na prevenção de muitas doenças crônico-degenerativas (KULISIC *et al.*, 2007; SEIFRIED *et al.*, 2007). Porém, mesmo que estudos epidemiológicos tenham sugerido a existência de uma correlação positiva entre a ingestão de alimentos ricos em polifenóis e a redução de mortalidade por doença cardiovascular (DCV), os mecanismos e alvos moleculares envolvidos precisam ser melhor investigados.

Postula-se que os compostos fenólicos inibem a agregação plaquetária; promovem o relaxamento endotelial induzido pelo óxido nítrico (GHISELLI *et al.*, 2000); protegem contra radicais livres devido à sua propriedade redox; reduzem a expressão de moléculas de adesão e a taxa de oxidação da LDL mediada por macrófagos (AVIRAM, 2004; GIOVANNINI *et al.*, 2007); atuam sobre a inflamação (MOREIRA e MANCINI-FILHO, 2004; RAHMAN, BISWAS e KIRKHAM, 2006) e induzem a hipolipidemia pela redução de colesterol e triacilglicerol plasmáticos (MICELI *et al.*, 2007).

No que condiz aos mecanismos de ação dos compostos fenólicos sobre a hipercolesterolemia, um dos mais importantes é a redução na absorção intestinal de colesterol e na atividade da lipase pancreática conforme comprovado por Rehrh *et al.* (2007) utilizando o chá verde. Neste estudo houve um aumento da excreção de lipídeos totais, colesterol (60%) e ácidos biliares (50%) nas fezes e redução do armazenamento excessivo de lipídeos no tecido hepático em ratos com hipercolesterolemia induzida pela dieta. Kumar, Sudhahar e Varalakshmi (2005) também discutem a ação hipocolesteremiante dos polifenóis em decorrência da redução na secreção da apoB e aumento da atividade da lipase de lipoproteínas, o que favorece o

aumento da excreção de sais biliares e estimula a enzima hepática 7- α -hidroxilase (MICELI *et al.*, 2007), indicando maior degradação de colesterol.

Raederstorff *et al.* (2003) observaram em um modelo de micela biliar *in vitro* que a epigalocatequina galato (EGCG), composto presente no chá verde, altera o tamanho da micela e diminui a solubilidade do colesterol, reduzindo por sua vez a absorção de colesterol.

Em ratos alimentados com uma dieta suplementada com 1% de colesterol e 0,5% de extrato da casca de tangerina ou uma mistura 0,5% de naringina e hesperidina tiveram a excreção de esteroides fecais neutros e a atividade das enzimas 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) redutase e acil CoA: colesterol aciltransferase (ACAT) diminuídas quando comparados ao grupo controle (BOK *et al.*, 1999), indicando um aumento na degradação do colesterol.

Outro possível mecanismo é o acúmulo de compostos fenólicos em macrófagos presentes nas lesões ateroscleróticas, tal como comprovado por Aviram (2004) em camundongos deficientes na apolipoproteína E (apo E) recebendo 20 mg de glabridina por dia. Esta conduta afetou os processos de sinalização celular, o que possibilitou uma inibição da oxidação da LDL mediada por células em até 80% com concomitante diminuição da lesão aterosclerótica (50%). Utilizando um anticorpo monoclonal para localizar os órgãos alvos do principal metabólito secundário da quercetina no plasma humano, a quercetina-3-glicuronídeo, Kawai *et al.* (2008) constataram que o macrófago ativado pode ser um alvo potencial de flavonoides dietéticos na aorta, uma vez que o estudo imuno-histoquímico demonstrou coloração positiva acumulada especificamente nas lesões ateroscleróticas e não em aortas normais.

Além disso, os polifenóis podem aumentar a atividade e expressão dos receptores de LDL hepáticos proporcionando uma diminuição das concentrações plasmáticas de LDL colesterol (LECUMBERRI *et al.*, 2007).

Em experimentos utilizando ratos com hipercolesterolemia induzida pela dieta, os polifenóis presentes no chá verde (*Camellia sinensis* L.), na manga (*Mangifera indica* L.) e no fruto emblica (*Emblica officinalis* L.) demonstraram reduzir os níveis de colesterol e LDL séricos (ANILA e VIJAYALAKSHMI, 2003; YOKOZAWA, NAKAGAWA e KITANI, 2002). Os mesmos resultados foram

relatados por Koshy (2001) e El-Beshbishy (2006) utilizando garcínia (*Garcinia cambogia* L.) e amoreira branca (*Morus alba* L.), respectivamente.

Neste cenário, extratos de especiarias como alecrim, coentro, sálvia, tomilho e manjerição com reconhecido poder antioxidante atribuído ao seu conteúdo de compostos fenólicos (MOREIRA e MANCINI-FILHO, 2004), despertam grande interesse como possíveis agentes protetores de doenças que envolvam estresse oxidativo.

2.7 Alecrim como fonte antioxidante

Em sistemas lipídicos, o alecrim é reconhecido como um importante agente antioxidante (PEARSON *et al.*, 1997) e, além disso, seus componentes bioativos têm mostrado possuir atividade antioxidante (AFONSO e SANT´ANA, 2008; WELLWOOD e COLE, 2004), antimicrobiana (AFONSO *et al.*, 2008; PRASAD e SEENAYYA, 2000), anti-inflamatória, antitumoral e quimiopreventiva (PÉREZ-FONS *et al.*, 2006).

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) é um membro da família *Labiatae* e tem sido utilizado por suas propriedades medicinais desde a antiguidade (ANGIONI *et al.*, 2004). Sua propriedade antioxidante tem sido atribuída a uma variedade de isoprenoides quinonas, diterpenos fenólicos como o ácido carnósico e o carnosol, o ácido rosmarínico, além de antioxidantes adicionais incluindo ácidos fenólicos e flavonoides (DEL BAÑO *et al.*, 2003; SEWALT, ROBBINS e GAMBLE, 2005) capazes de finalizar as reações de radicais livres e varrer as espécies reativas de oxigênio (SÁNCHEZ-ESCALANTE *et al.*, 2001) e, portanto, prevenir a oxidação do colesterol e de ácidos graxos insaturados (VALENZUELA, SANHUEZA e NIETO, 2003).

De acordo com Pérez-Fons *et al.* (2006), a natureza lipofílica dos diterpenos derivados do alecrim permite sua ação antioxidante em membranas biológicas, impedindo a difusão de espécies reativas pela mesma. Além disso, um efeito inibidor direto sobre a agregação plaquetária e a formação de trombos arteriais pelos compostos presentes no alecrim foram relatados (NAEMURA *et al.*, 2008; YAMAMOTO *et al.*, 2005).

A Figura 5 ilustra os diterpenos fenólicos presentes no alecrim.

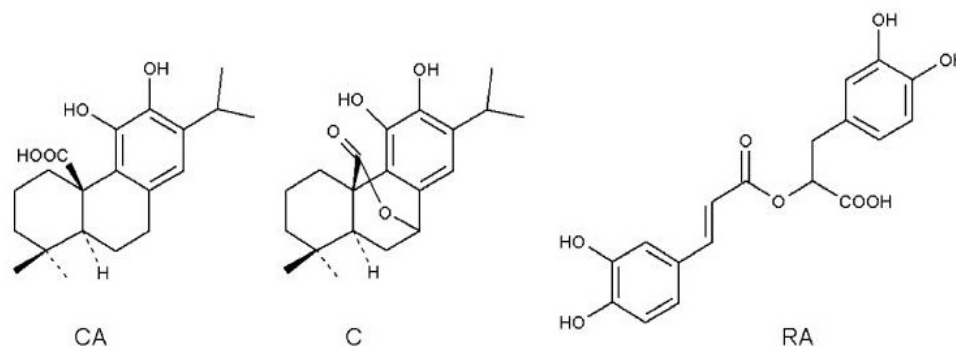


FIGURA 5 - Estrutura química dos principais compostos fenólicos presentes no alecrim, ácido carnósico (CA), carnosol (C) e ácido rosmarínico (RA) (TRONCOSO *et al.*, 2005).

Diante destas características, o alecrim pode ser um aliado na proteção contra o risco cardiovascular, uma vez que a administração de antioxidantes aliada à redução dos níveis de LDL plasmáticos podem auxiliar na prevenção da oxidação da LDL. Baseados nesta afirmação alguns estudos têm sido conduzidos, porém os resultados são controversos.

A administração do extrato aquoso de alecrim em codornas por três semanas causou significativa redução nos níveis de triacilgliceróis (45,47%), colesterol (29,54%), LDL-c (76,98%) e VLDL-c (45,47%), bem como aumentou o HDL-c (19,86%) (AL-ATTAR, 2006). Contudo, em estudos com roedores, Soares *et al.* (2005) mostraram que a infusão com folhas de alecrim na concentração 500 mg/Kg peso corporal possibilitou aumento dos níveis de LDL em 33,82%, apesar de não ter sido encontrada diferença estatística.

Por isso, a despeito da reconhecida capacidade antioxidante, o possível benefício do extrato de alecrim sobre as dislipidemias precisa ser mais bem elucidado, já que diferentes métodos de extração refletem na composição de constituintes antioxidantes presentes nesta especiaria.

Utilizando extrato de alecrim comercial, Pearson *et al.* (1997) observaram a capacidade do mesmo em reduzir a formação de dienos conjugados e a oxidação da LDL em células endoteliais. Em trabalho realizado por Wijeratne e Cuppett (2007) observou-se que a suplementação de ácido carnósico e carnosol por 24 h em células humanas de câncer de cólon (Caco-2) submetidas a estresse por hidroperóxidos lipídicos foi capaz de aumentar a atividade das enzimas glutathiona peroxidase e superóxido dismutase, reduzir o dano de membranas e do DNA e inibir a lipoperoxidação dependendo das concentrações utilizadas.

Quanto ao ácido rosmarínico, Chlopčíková e colaboradores (2004) observaram que o mesmo foi capaz de estabilizar as membranas de cardiomiócitos após préincubação com doxorubicina, um potente agente cardiotoxíco. Em trabalho utilizando linhagem de macrófagos ativados por lipopolissacarídeos, Qiao e colaboradores (2005) observaram que o ácido rosmarínico foi capaz de inibir a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e constataram que tal ação está relacionada a sua capacidade em impedir a fosforilação do inibidor do fator nuclear kappa B ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$) e, conseqüentemente, a translocação do NF- κ B ao núcleo. Ainda neste trabalho, os pesquisadores observaram menor produção do ânion superóxido e redução na produção da 3-nitrotirosina, indicando que o ácido rosmarínico atua tanto sobre espécies reativas de oxigênio quanto de nitrogênio.

Embora não tenham sido capazes de inibir ou retardar a fase de propagação nas partículas de LDL após o início da oxidação, Dorman *et al.* (2003) relataram que os extratos aquosos da família *Lamiaceae* prolongaram a fase *lag* antes do início da oxidação induzida pelo cobre. Esta também foi a conclusão obtida no trabalho de Kulisic *et al.* (2007), os quais utilizaram o mesmo modelo e atribuíram o efeito protetor dos extratos aquosos de orégano e tomilho à grande quantidade de ácido rosmarínico encontrado nestas especiarias.

Além do extrato aquoso, trabalhos anteriores mostraram a importante capacidade antioxidante das frações de ácidos fenólicos esterificados e não esterificados (livres) em sistemas *in vitro* (ANDRADE-WHARTA, 2007; BROINIZI *et al.*, 2007; LIMA, 2008). Moreira (2003) observou capacidade de inibição da cooxidação beta caroteno/ácido linoleico maior que 90% em uma mistura de especiarias contendo canela, erva doce e mostarda. Da mesma maneira, Silva (2008) relatou uma expressiva atividade antioxidante dos ácidos fenólicos presentes no alecrim nos métodos β -caroteno/ácido linoleico, varredura do radical 2,2 – difenil – 1 – picrilhidrazil (DPPH) e *Oxygen radical absorbance capacity assay* (ORAC) abrindo a perspectiva de estudos em sistemas biológicos envolvendo situações de estresse.

Embora pesquisas tenham apontado a ação de compostos com atividade antioxidante presentes no alecrim sobre algumas doenças, o uso desta especiaria na hipercolesterolemia continua sendo relevante para se obter mais informações visando à redução do risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do extrato aquoso e da fração fenólica não esterificada do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o perfil lipídico e o estado antioxidante sérico e tecidual em ratos com hipercolesterolemia induzida pela dieta.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos aquosos e das frações fenólicas das folhas de alecrim, obtidos em diferentes condições de extração, nos sistemas modelo β -caroteno/ácido linoleico e varredura do radical DPPH^{*};
- Identificar e quantificar os compostos majoritários presentes no extrato aquoso e na fração fenólica livre do alecrim;
- Determinar o efeito do extrato e da fração do alecrim administrados durante 30 dias sobre o perfil lipídico sérico e o perfil de ácidos graxos hepático de ratos com hipercolesterolemia induzida pela dieta;
- Verificar o *status* antioxidante nos tecidos cardíaco, cerebral, hepático e renal no que concerne à atividade de enzimas antioxidantes endógenas (catalase – CAT, superóxido dismutase – SOD e glutathione peroxidase – GPx);
- Avaliar a oxidação lipídica nos tecidos estudados após a intervenção.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

As folhas desidratadas do alecrim foram obtidas em estabelecimento comercial da cidade de São Paulo. As mesmas foram trituradas em moinho analítico (modelo IKA A11 basic, Wilmington, USA) à temperatura ambiente, passadas por tamis 32 Mesh e, posteriormente, acondicionadas a -20°C , conforme descrito por Moreira e Mancini-Filho (2003).

4.1.1 Obtenção dos extratos aquosos de alecrim

Para obtenção dos extratos foram adicionados 100 mL de água destilada a 20 g de alecrim triturado. As soluções foram homogeneizadas com auxílio de agitador magnético por 1 hora à temperatura ambiente (23°C) e a 60°C . Para o extrato a $20 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ foram utilizados o banho maria do rotaevaporador da Micronal (modelo B18, Piracicaba, BRA) e o homogeneizador Glas-Col[®] GKH (modelo GT24, Vineland, USA). As soluções obtidas foram centrifugadas a 15.000 rpm com temperatura entre $4-9^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos em centrífuga da Sorvall Instruments (modelo RC5S, São Paulo, BRA), utilizando rotor SS34. Em seguida, as suspensões foram filtradas em filtro qualitativo e o volume foi completado para 100 mL com água destilada, conforme descrito por Moreira (2003).

4.1.2 Obtenção dos ácidos fenólicos presentes no alecrim

Os ácidos fenólicos do alecrim foram obtidos de acordo com a metodologia de Krygier, Sosulski e Hogge (1982) que permite separar as frações de ácidos fenólicos livres, bem como os esterificados solúveis e insolúveis. Para obtenção da fração livre, 1 g de alecrim triturado e tamisado previamente desengordurado foi extraído seis vezes em Ultra-Turrax IKA[®] (modelo DI 25 basic, Staufen, DEU) por 1 minuto com 20 mL de tetrahidrofurano (THF), à temperatura ambiente, e protegido da luz. Os sobrenadantes obtidos foram

combinados, desidratados com sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado sob vácuo, a 30°C em rotaevaporador Micronal (modelo B525, Piracicaba, BRA). O concentrado foi ressuspenso em 5 mL de metanol e filtrado em filtro qualitativo. O volume resultante foi completado com auxílio de balão volumétrico de 5 mL e transferido para frasco âmbar.

O resíduo obtido foi novamente extraído seis vezes em Ultra-Turrax com uma solução de metanol:acetona:água (7:7:6), em temperatura ambiente. A seguir os sobrenadantes foram filtrados e rotaevaporados sob vácuo a 40°C até obtenção de uma fase aquosa. Esta e o resíduo formado foram hidrolisados com volume igual e 20 mL de NaOH 4 N, respectivamente, por 4 horas sob fluxo de nitrogênio, à temperatura ambiente, e protegidos da luz. Após este período, o pH das soluções foi ajustado para 2 com HCl 6 N. Após a acidificação, os sobrenadantes foram extraídos cinco vezes com hexano para remoção dos contaminantes lipídicos e dos ácidos graxos livres. Tanto os ácidos fenólicos liberados de compostos solúveis quanto insolúveis foram, então, reextraídos seis vezes com éter etílico:acetato de etila:THF (1:1:1). Ao final de cada extração, as frações foram combinadas, desidratadas com sulfato de sódio anidro, filtradas, evaporadas sob vácuo a 40°C e, em seguida, ressuspenso em 5 mL de metanol e filtrado em filtro qualitativo. O volume obtido de cada fração foi completado com auxílio de balão volumétrico de 5 mL e transferido para frasco âmbar.

Todas as frações permaneceram em freezer (-20°C) para análises posteriores.

4.1.3 Determinação dos fenólicos totais

A quantificação de fenólicos totais dos extratos e frações foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Swain e Hills (1959) com algumas modificações. Foram tomados 0,5 mL da solução teste, adicionados 8 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente de Folin Ciocalteu. Após 3 minutos, adicionou-se 1 mL de solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3). As misturas foram mantidas em repouso, ao abrigo de luz, por uma hora em temperatura ambiente e então a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro

Genesys (modelo Spectronic 20, Rochester, USA) a 720 nm. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico, determinados por uma curva padrão.

4.2 Identificação dos ácidos carnósico e rosmarínico

Os ácidos carnósico e rosmarínico foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), empregando-se a metodologia descrita por Almela *et al.* (2006), com algumas modificações. Para tanto, um sistema de gradiente binário constituído de 0,2% ácido metafosfórico (solvente A – padrão analítico - Carlo Erba, Rodano, ITA) e acetonitrila (solvente B – padrão cromatográfico - Merck, São Paulo, BRA) foi utilizado para eluição, sendo 0 min 80% de A, 10 min 80% de A, 20 min 60% de A, 30 min 0% de A e 40 min 0% de A. Utilizando espectrometria UV-VIS, os picos dos ácidos rosmarínico e carnósico, com limites de detecção 1,58 µg/mL e 1,46 µg/mL, foram analisados tanto em 230 nm quanto 330 nm, respectivamente. Os picos encontrados nas amostras foram identificados comparando os tempos de retenção dos padrões injetados separadamente. Em seguida, foram adicionadas concentrações conhecidas dos respectivos padrões comerciais (Sigma Aldrich, C0609 e 536954, Saint Louis, USA) às amostras para confirmação dos picos analisados. As análises foram feitas à temperatura ambiente em coluna analítica de fase reversa Luna C18 (Phenomenex, Torrance, USA), nas dimensões 250 x 4,3 x 10 µm, com fluxo de 1 mL/min em um sistema constituído de duas bombas Constametric SP (modelos 3500 e 3200, Fremont, USA), injetor Rheodyne (modelo 7125, Cotati, USA), com *loop* de 20 µL e detector LabAlliance (modelo 525, State College, USA).

4.3 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

4.3.1 Atividade antioxidante no sistema β-caroteno/ácido linoléico

Este método foi realizado conforme preconizado por Miller (1971) e modificado por Moreira e Mancini-Filho (2003). Preparou-se um meio emulsionado contendo 40 µL da solução de β-caroteno (20 mg/ mL clorofórmio), 40 µL de ácido

linoleico, 530 mg de Tween 40 e 1 mL de clorofórmio. Este foi totalmente evaporado com nitrogênio. Em seguida, adicionou-se 100 mL de água previamente oxigenada por 30 minutos e agitou-se vigorosamente. A absorbância desta solução permaneceu entre 0,6 e 0,7 em comprimento de onda de 470 nm mensurada em espectrofotômetro Genesys (modelo Spectronic 20, Rochester, USA).

Os extratos foram avaliados nas concentrações 500 e 1000 µg e as frações nas concentrações 50 e 100 µg. Nos tubos espectrofotométricos foram pipetadas as soluções teste, bem como 5 mL da emulsão descrita anteriormente.

As amostras foram mantidas em banho maria a 50°C e suas absorbâncias medidas a cada 15 minutos num período de 2 horas em espectrofotômetro. O antioxidante padrão utilizado foi o butil hidroxitolueno (BHT).

Como parâmetro de oxidação total (100%) foi preparado um branco, o qual não possuía antioxidantes e os cálculos foram feitos em relação ao decaimento da absorbância do controle.

Os resultados foram expressos como percentual de inibição da oxidação, conforme a seguinte equação:

$$\% I = \frac{(\text{Abs controle } t_0 - \text{Abs controle } t_{240}) - (\text{Abs amostra } t_0 - \text{Abs amostra } t_{240})}{(\text{Abs controle } t_0 - \text{Abs controle } t_{240})} \times 100$$

Onde: t_0 é o valor de absorbância inicial e
 t_{240} é o valor de absorbância final.

4.3.2 Atividade antioxidante no ensaio DPPH*

A atividade antioxidante dos extratos e frações, bem como do padrão butil hidroxitolueno (BHT), também foi avaliada pelo ensaio baseado na redução do radical 2,2 – difenil – 1 – picrilhidrazil (DPPH*), conforme descrito por Blois (1958). Homogeneizou-se 0,5 mL de várias diluições tanto dos extratos

quanto das frações com 1,5 mL da solução metanólica de DPPH[•] (6x10⁻⁵ mol/L). Após um período de incubação de 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz, as absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro Genesys (modelo Spectronic 20, Rochester, USA) num comprimento de onda de 517 nm, a qual constitui a maior absorvância do DPPH[•].

Foi feito um branco sob as mesmas condições, porém sem a solução teste.

A atividade de sequestro de radicais de cada solução foi então calculada como porcentagem de inibição de acordo com a seguinte equação:

$$\% I = \frac{(\text{Abs branco} - \text{Abs amostra})}{\text{Abs branco}} \times 100$$

As atividades antioxidantes dos extratos e frações testes foram expressas como IC₅₀, ou seja, a concentração de material necessária para reduzir 50% do radical.

4.4 Composição química das rações

4.4.1 Homogeneização das amostras

Tanto a ração comercial quanto a suplementada com colesterol e ácido cólico foram trituradas em moinho analítico (modelo IKA A11 basic, Wilmington, USA) à temperatura ambiente, passadas por tamis 32 *mesh* e armazenadas a -20°C para análises posteriores. Todos os parâmetros foram avaliados em triplicata.

4.4.2 Determinação de umidade

Foram pesados 10 g de cada ração em cápsulas de alumínio previamente taradas. As amostras foram colocadas em estufa a 105°C da Fanem LTDA (modelo 311 CG, São Paulo, BRA) por 6 horas e, após o resfriamento em dessecador até peso constante, foram novamente pesadas (AOAC 926.12, 2005). A perda de peso das amostras submetidas ao aquecimento em estufa possibilitou o cálculo da umidade com auxílio da seguinte fórmula:

$$\frac{(\text{Peso cadinho} + \text{amostra}) - (\text{Peso cadinho} + \text{amostra dessecada})}{\text{Peso amostra (g)}} \times 100$$

4.4.3 Determinação de cinzas ou resíduo mineral fixo

Foram pesados 2 g da amostra em cadinho de porcelana calcinado e tarado. As amostras foram previamente carbonizadas em chapa de aquecimento e, posteriormente, submetidas a aquecimento em altas temperaturas (550°C) para destruição da matéria orgânica. Os cadinhos foram resfriados em dessecador até peso constante e foram novamente pesados para a determinação do resíduo mineral fixo (AOAC 900.02, 2005).

4.4.4 Determinação de lipídeos ou extrato etéreo (Método de Soxhlet)

Previamente o balão de Soxhlet dessecado foi pesado e, cerca de 5 g de amostra foram pesados em cartucho de Soxhlet, para montagem do sistema. A extração dos lipídeos foi feita com éter etílico, em fluxo constante por 8 horas, com aquecimento mantido por chapas elétricas. Após este período e a completa evaporação do solvente, o balão foi novamente submetido a

aquecimento em estufa a 105°C da Fanem LTDA (modelo 311 CG, São Paulo, BRA) e resfriado até obtenção de peso constante (AOAC 920.39, 2005). O valor obtido possibilitou o cálculo de lipídeos totais de acordo com a fórmula:

$$\text{Lipídeos Totais} = \frac{\text{extrato etéreo obtido (g)} \times 100}{\text{peso amostra (g)}}$$

4.4.5 Determinação de proteína

Neste caso foi utilizado o método de *Micro-Kjeldahl* o qual avalia a quantidade de nitrogênio total presente no alimento (AOAC 976.06, 2005).

Em tubos apropriados foram pesados cerca de 60 ± 2 mg da ração, $1,9 \pm 0,1$ g de sulfato de potássio (K_2SO_4) e 50 ± 10 mg de sulfato de cobre ($CuSO_4$). Em seguida, foram adicionados $2,5 \pm 0,1$ mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado e as amostras foram colocadas em bloco digestor a 350°C por 3 horas efetivas. Após este período, as amostras já resfriadas foram submetidas à destilação. Para tanto, foram adicionados 10 mL de NaOH 60% e o destilado foi recebido em um *erlenmeyer* de 125 mL contendo 5 mL de solução saturada de ácido bórico e 4 gotas do indicador que contém vermelho de metila e azul de metileno. A titulação do íon borato, cujos valores são estequiometricamente proporcionais à quantidade de nitrogênio formado foi feita com HCl 0,02N.

A partir dos valores de nitrogênio total obtido foi possível quantificar o valor proteico das amostras utilizando-se o fator de conversão de 6,25. Os cálculos foram feitos a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ PTN} = \frac{\text{Volume HCl} \times \text{Normalidade HCl} \times \text{Fator Correção HCl} \times 14,007 \times 6,25}{\text{Peso amostra (mg)}}$$

Todos os procedimentos foram monitorados paralelamente com uma prova em branco.

4.4.6 Determinação de fibra alimentar total

Este parâmetro foi determinado pelo método enzimático-gravimétrico (AOAC 991.43, 2005), o qual está baseado na determinação do peso do resíduo obtido da eliminação do amido e da proteína por hidrólise enzimática, seguida da precipitação da fibra alimentar solúvel (FAS) em etanol a 78%.

Foram pesadas, em quadruplicata, $1,0 \pm 0,02$ g das amostras dessecadas e desengorduradas e transferidas para um béquer de 250 mL contendo 50 mL de tampão MES-Tris 0,05 M e pH 8,2. Em seguida, foram adicionados 0,1 mL de α -amilase termoresistente (Sigma A-3306). As misturas foram aquecidas em banho maria em ebulição por 30 minutos, sendo que a cada 5 minutos as mesmas eram agitadas. As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e, então, acrescentou-se 0,1 mL de protease (Sigma P-3910) (5 mg/0,1 mL de tampão MES-Tris) e as amostras foram incubadas a 60°C por 30 minutos sob agitação horizontal (100 rpm). O pH foi ajustado para $4,3 \pm 0,3$ adicionando-se HCl 0,525N nas amostras resfriadas à temperatura ambiente. Por fim, adicionou-se 0,1 mL de amiloglicosidase (Sigma A-9913) e as amostras foram incubadas sob as mesmas condições descritas para a protease.

O hidrolisado foi transferido, quantitativamente, para um béquer de 600 mL, no qual se adicionou etanol 98% a 60°C na ordem de quatro vezes o volume obtido. A mistura permaneceu em repouso à temperatura ambiente por 60 minutos para precipitação da fibra alimentar solúvel. Em seguida, a mistura foi transferida quantitativamente sob vácuo, para um cadinho filtrante com placa porosa 40-60 μ m e 1 g de lã de vidro, montado em kitassato.

O resíduo foi lavado duas vezes com 20 mL de etanol 78%, duas vezes com 20 mL de etanol 95% e duas vezes com 20 mL de acetona. O solvente orgânico foi totalmente evaporado e o cadinho submetido à aquecimento em estufa Fanem LTDA a 105°C (modelo 311 CG, São Paulo, Brasil) por 12 horas. Após o resfriamento em dessecador, os cadinhos foram pesados para determinação do resíduo. Todos os procedimentos também foram monitorados em quadruplicata com uma prova em branco.

Para o cálculo final foram descontados os pesos de cinza (C), proteína (P) e branco (B) contidos no resíduo (R), conforme a fórmula abaixo:

$$\% \text{ FAT} = \frac{\text{R} - \text{P} - \text{C} - \text{B} \times 100}{\text{Peso amostra (g)}}$$

4.4.7 Determinação dos carboidratos disponíveis por diferença

Após a totalização da quantidade de umidade, proteína, lipídeos, fibra alimentar total e resíduo mineral, o valor obtido foi subtraído de 100 (representando 100%) e expresso em g/ 100g de amostra.

4.5 Determinação do perfil de ácidos graxos da ração e do tecido hepático

4.5.1 Extração da fração lipídica

Os lipídeos foram extraídos conforme método preconizado por Folch, Lees e Stanley (1957). Para tanto, foram pesados cerca de 2 g de amostra a qual foram adicionados 10 mL de metanol e homogeneizados por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 20 mL de clorofórmio e homogeneizados por mais 2 minutos. A mistura obtida foi filtrada a vácuo e coletada em *kitassato*. O resíduo contido no filtro foi então homogeneizado com 30 mL da solução clorofórmio:metanol (2:1) por 3 minutos e novamente filtrado. O tubo de extração foi lavado com 20 mL de clorofórmio e o resíduo contido no filtro foi lavado com 10 mL de metanol. O filtrado contido no *kitassato* foi transferido para uma proveta e o volume foi medido para acréscimo de 1/4 de cloreto de potássio (KCl 0,88%). A mistura foi agitada manualmente e a fase superior foi aspirada a vácuo. O volume residual foi aferido para adicionar 1/4 da solução metanol:água (1:1). Após agitação, a fase superior foi aspirada a vácuo e a solução restante foi filtrada em sulfato de sódio anidro. O solvente foi

evaporado em rotaevaporador Micronal (modelo B525, Piracicaba, BRA) sob vácuo a 35°C.

O lipídeo foi ressuspensão em 2 mL de clorofórmio, transferido para tubos de vidro com tampa rosqueada e o solvente foi evaporado com nitrogênio gasoso.

4.5.2 Preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos

A metodologia utilizada para preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi a AOCS Ce 2-66 (2004). Em cada tubo contendo o lipídeo extraído foram adicionados 2 mL de NaOH metanólico (0,5 N). Em seguida, os tubos foram agitados manualmente e colocados em banho fervente por 10 minutos. Após resfriamento, foram acrescentados 2,5 mL de trifluoreto de boro (BF₃) 14% e os tubos foram novamente colocados no banho fervente por 2 minutos. A mistura foi então resfriada para posterior adição de 2 mL de heptano e nova submissão dos tubos ao banho por 1 minuto.

Os tubos foram retirados do banho, nos quais se acrescentaram 5 mL de solução saturada de cloreto de sódio (NaCl). A mistura foi agitada vigorosamente e 1 mL da fase superior foi transferida para vial contendo sulfato de sódio anidro.

4.5.3 Condições cromatográficas

As amostras foram analisadas em cromatografo a gás Shimadzu (modelo GC 17A, Kyoto, JPN) acoplado com *software* Class GC, utilizando-se coluna de sílica fundida SP-2560 (bis-cianopropilpolisiloxana) de 100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,2 µm de espessura da fase estacionária. A temperatura inicial de 140°C foi mantida em isotérmico por 5 minutos, seguida de aquecimento a 4°C por minuto até atingir 240°C onde permaneceu isotérmico por 20 minutos. As temperaturas do injetor e detector foram 250 e 260°C, respectivamente, o gás de arraste foi o Hélio (fluxo 1 mL/min) e a razão de divisão da amostra no injetor 1:200.

Os picos foram identificados comparando os tempos de retenção dos padrões de metil ésteres (Supelco 18919, Bellefonte, USA).

4.6 Ensaio biológico

O estudo utilizando animais de laboratório foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (Anexo 1) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP.

Ratos (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) da linhagem *Wistar* recém desmamados machos, pesando $66,97 \pm 2,66$ g foram adquiridos do Biotério de Experimentação Animal do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os mesmos passaram por um período de aclimatação de 7 dias.

Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa ($55 \pm 10\%$) controladas e um ciclo claro/escuro de 12 horas. Para o estudo, os mesmos foram divididos aleatoriamente, em seis grupos de seis animais conforme a seguinte descrição:

- Grupo C (controle negativo): ração padrão, sem tratamento com antioxidantes (água destilada);
- Grupo HC (controle positivo): ração hipercolesterolêmica, sem tratamento com antioxidantes (água destilada);
- Grupo AQ 70 (extrato de alecrim): ração hipercolesterolêmica, tratado com extrato aquoso de alecrim (70 mg/kg peso corporal);
- Grupo AQ 140 (extrato de alecrim): ração hipercolesterolêmica, tratado com extrato aquoso de alecrim (140 mg/kg peso corporal);
- Grupo AFL 7 (fração fenólica livre): ração hipercolesterolêmica, tratado com fração fenólica (7 mg/kg peso corporal);

- Grupo AFL 14 (fração fenólica livre): ração hipercolesterolêmica, tratado com fração fenólica (14 mg/kg peso corporal).

4.6.1 Preparo da Dieta

A dieta hipercolesterolêmica foi preparada baseada no trabalho de Yokozawa, Nakagawa e Kitani (2002). Para tanto, a ração comercial da marca Nuvilab[®] CR-1 Irradiada (Nuvital, Paraná, BRA) foi previamente triturada e, em seguida, foram adicionados 0,5% de colesterol (SIGMA C8503) e 0,25% de ácido cólico (SIGMA C1129), utilizando-se como veículos uma mistura de éter etílico e etanol. Em seguida, a ração permaneceu em capela de exaustão por 24 horas para evaporação completa dos solventes. Em seguida, a ração foi homogeneizada em misturador industrial por uma hora para posterior elaboração dos *pellets*, os quais foram secos em estufa ventilada (Fabre-Primar, São Paulo, Brasil) a 50°C por 48 horas. A dieta e a água foram disponibilizadas *ad libitum* aos animais.

As soluções teste ou a água foram administradas por gavagem diariamente no ciclo claro aos animais por um período de 30 dias. Os grupos controle negativo (C) e positivo (HC) receberam água com o mesmo procedimento para minimizar as diferenças nos níveis de estresse.

4.6.2 Eutanásia dos animais

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura de cetamina (90 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg), sendo as doses recomendadas pelo Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química - USP.

Os tecidos cardíaco, hepático, renal e cerebral foram perfundidos e separados para análise da atividade de enzimas antioxidantes e do índice de peroxidação lipídica através do método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O sangue foi coletado para determinação do

lipidograma e das enzimas marcadoras de lesão hepática AST e ALT, bem como a peroxidação lipídica. Para expressar os resultados da atividade de enzimas antioxidantes e índice de peroxidação lipídica foram quantificadas as proteínas dos tecidos e do soro.

4.6.3 Preparo dos homogenatos dos tecidos

Os rins e o cérebro foram homogeneizados com um volume de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 igual a quatro vezes o valor absoluto da massa da amostra e o coração foi homogeneizado com um volume de tampão correspondente a duas vezes o valor absoluto da massa. O homogeneizado foi centrifugado a 3.500 rpm por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante reservado para avaliação da peroxidação lipídica. Uma alíquota do sobrenadante (1 mL) foi novamente centrifugado, desta vez a 10.500 rpm por 15 minutos a 4°C, empregando-se o novo sobrenadante para a determinação da atividade enzimática da SOD, CAT e GPx.

O fígado também foi homogeneizado pelo mesmo procedimento. Entretanto, o volume de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 utilizado foi três vezes o valor absoluto da massa da amostra. O homogeneizado passou pelas mesmas etapas de centrifugação e, além disso, 1 mL do sobrenadante obtido foi ultracentrifugado a 30.000 rpm por 1 hora a 4°C, obtendo-se a fração citosólica para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes.

Para obtenção do soro, o sangue coletado foi centrifugado a 3.500 rpm por 5 minutos a 4°C.

Tanto os homogenatos quanto o soro foram armazenados em ultrafreezer (- 80°C) para análises posteriores.

4.7 Avaliação da atividade antioxidante *in vivo*

4.7.1 Determinação das enzimas antioxidantes na fração citosólica dos tecidos

A capacidade antioxidante foi determinada avaliando-se a atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) nos tecidos dos mesmos conforme metodologia descrita por Beutler (1975), McCord e Fridovich (1969) e Sies *et al.* (1979), respectivamente.

4.7.2 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Para determinação da atividade da SOD, o meio de reação foi composto por Citocromo C (100 μ M), Xantina (500 μ M), EDTA (1 mM) e cianeto de potássio (KCN - 200 μ M) em tampão fosfato de potássio a 0,05 M (pH 7,8). O volume de Xantina oxidase (0,6 unidades/mg de proteína), determinada através de um "branco", foi o último item adicionado. Em uma cubeta de quartzo, foi inicialmente adicionado 1 mL do meio, 15 μ L da fração citosólica do tecido e o volume determinado de Xantina oxidase. A medição foi feita em espectrofotômetro da Varian Inc. (modelo CARY 50 Probe, Mulgrave, AUS) em duplicata a 550 nm, a 25°C.

O fundamento baseia-se na produção do ânion superóxido produzido pela xantina oxidase na presença de xantina. O superóxido oxida o citocromo C, gerando um aumento da densidade ótica nas condições espectrofotométricas acima preconizadas.

Os resultados foram expressos em U/mg de proteína, onde a unidade U é compreendida como a atividade da enzima que promove 50% de inibição da reação da Xantina nas condições citadas.

4.7.3 Atividade da Catalase (CAT)

O meio de reação para a atividade da catalase é composto por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 10 mM (obtidos a partir de 10 μ L de peridrol 30% em 10 mL de H_2O miliQ) em tampão Tris HCl 1M EDTA 5 mM (pH 8,0). Foram utilizados 980 μ L deste meio de reação e 20 μ L do homogenato. A leitura foi feita a 37°C em espectrofotômetro Varian Inc. (modelo CARY 50 Probe, Mulgrave, AUS) a 230 nm.

Os resultados foram expressos em U/mg de proteína, onde U corresponde à atividade da enzima que promove a hidrólise de 1 μ mol de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por minuto, a 37°C em pH 8,0.

4.7.4 Atividade da Glutaciona peroxidase (GPx)

Este método mede o decréscimo da densidade ótica a 340 nm, devido à oxidação do NADPH a 30°C, durante a redução da glutaciona oxidada (GSSG), catalisada pela glutaciona reduzida (GR).

Para promover o meio de reação, foram utilizados glutaciona reduzida (GSH), NADPH (20 mM), GR (0,1U/mL), EDTA 5 mM (pH 7,0) e tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0). A 1 mL deste meio, foram acrescentados 10 μ L da amostra e 10 μ L de peróxido de terc-butila (0,5 mM), os quais foram incubados a 30°C para realização das leituras em espectrofotômetro Varian Inc. (modelo CARY 50 Probe, Mulgrave, AUS).

Os resultados foram expressos em U/mg de proteína, onde U refere-se à atividade da enzima que oxida 1 μ mol de NADPH por minuto nas condições definidas.

4.7.5 Quantificação de proteínas nos tecidos e soro

Para determinar o conteúdo de proteínas no soro e nos tecidos analisados foi empregado o método de Lowry *et al.* (1951). Para tanto foram

utilizados 500 µL da amostra, com os respectivos ajustes de diluições, 1250 µL de mistura alcalina (composta por sulfato cúprico 2%, bitartarato de sódio e potássio 4% e carbonato de sódio 2% em NaOH 0,1 M) e 150 µL do reagente de Folin Ciocalteu. A leitura da absorbância foi realizada em triplicata em espectrofotômetro Genesys (modelo Spectronic 20, Rochester, USA) a 660 nm contra um branco.

A concentração de proteínas foi determinada por uma curva padrão utilizando solução de albumina (500 µg/mL).

4.7.6 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

O método utilizado foi descrito por Ohkawa, Ohisi e Yagi (1979) e adaptado por Andrade-Wharta (2007).

Para realização desta análise foram utilizados 200 µL de soro e dos homogenatos dos tecidos obtidos segundo descrito no item 3.6.3. A esta alíquota foram adicionados 200 µL de diocetil sulfo-succinato (SDS) 8,1%, 1,5 mL de ácido acético 20%, 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (0,8%) e 600 µL de água destilada. Em seguida a mistura reativa foi aquecida em banho maria a 95°C por 1 hora. Após o resfriamento em banho de gelo, 1 mL de água destilada e 3 mL de n-butanol foram adicionados e os tubos foram agitados vigorosamente em vortex. O material foi centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos, a camada superior foi removida e sua absorbância foi medida a 532 nm em espectrofotômetro Genesys (modelo Spectronic 20, Rochester, USA). As leituras foram determinadas em triplicata e o aparelho calibrado com um “branco” contendo apenas n-butanol.

A curva padrão foi feita a partir de uma solução de 1,1',3,3'- tetraetoxipropano (TEP) a uma concentração de 10×10^{-5} mol/L e os resultados expressos em µMol de equivalentes de MDA/mg de proteína.

4.7.7 Lipidograma

A concentração de colesterol total (CT), triacilgliceróis (TG) e lipoproteína de alta densidade (HDL-C) sérica foi determinada por método

enzimático colorimétrico utilizando kits comerciais (Labtest®). A lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) foi calculada de acordo com a fórmula descrita por Friedwald, Levy e Fradrickson (1972).

4.7.8 Enzimas marcadoras de lesão hepática

As concentrações de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) séricas foram determinadas por método enzimático colorimétrico utilizando kits comerciais (Labtest®).

4.8 Monitoramento do experimento

A ingestão e o peso dos animais foram monitorados durante todo o experimento para elaboração das curvas de ganho de peso e crescimento. O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{CEA} = \frac{\text{Ganho de peso do animal (g)}}{\text{Média do consumo de ração}}$$

4.9 Análise estatística

Para comparação de três ou mais amostras independentes utilizou-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste Tukey. O teste t Student foi utilizado para comparação entre duas amostras independentes usando o software Prism 4.0 (GraphPad). Os dados foram expressos como média e desvio padrão, adotando um nível de significância de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Quantificação e perfil de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram quantificados nos extratos aquosos obtidos das folhas de alecrim nas temperaturas de 20°C, 23°C (ambiente) e 60°C, bem como nas frações de ácidos fenólicos (AFL, AFS e AFI).

Os resultados estão apresentados na Tabela 2 e foram expressos como equivalentes de ácido gálico obtendo-se uma curva padrão, a qual possibilitou a determinação da equação de reta $y = 0,0281x - 0,0072$ ($R^2 = 0,9997$).

Tabela 2. Quantidade de fenólicos totais nos extratos e frações de ácidos fenólicos obtidos a partir do alecrim expressa por miligrama de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama da folha de alecrim.

Extratos e Frações	mg EAG/g de amostra
Aquoso 20°C (AQ 20)	13,44 ± 0,09
Aquoso 23°C (AQ 23)	16,67 ± 0,40
Aquoso 60°C (AQ 60)	18,14 ± 0,17
Ácidos fenólicos livres (AFL)	8,59 ± 0,31
Ácidos fenólicos esterificados solúveis (AFS)	5,38 ± 0,10
Ácidos fenólicos esterificados insolúveis (AFI)	3,42 ± 0,04

Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n=3).

Pode-se observar que os extratos aquosos de alecrim obtidos em diferentes temperaturas contêm uma quantidade considerável desses constituintes, um dado essencial na avaliação do potencial antioxidante. Embora pudesse ocorrer desnaturação de membranas e diminuição de compostos fenólicos a temperaturas mais elevadas, nossos dados corroboram com o encontrado por Jerez *et al.* (2006), os quais observaram aumento significativo no rendimento e na atividade antiradical de compostos fenólicos

quando utilizaram temperatura superior na extração etanólica de pinheiro-bravo (*Pinus pinaster* L.). Segundo estes autores, o aumento da temperatura favorece a extração pelo aumento da solubilidade do soluto e do coeficiente de difusão.

5.2 Avaliação da capacidade antioxidante

Muitos métodos têm sido desenvolvidos para avaliar a capacidade antioxidante total de um extrato, independentemente da quantidade de compostos individuais presentes na amostra. As metodologias mais utilizadas estão normalmente relacionadas à medida da capacidade redutora, da atividade de sequestro dos radicais livres ou da capacidade de quelar metais pró-oxidantes.

Para determinação do potencial antioxidante dos extratos e das frações do alecrim, foram realizados dois testes, o sistema de cooxidação de substratos β -caroteno/ácido linoleico e a varredura do radical DPPH. Os cálculos para determinação da quantidade de amostra necessária para realização destes testes basearam-se nos dados gravimétricos (matéria seca).

A capacidade em inibir a oxidação do β -caroteno pelos extratos e frações de alecrim está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Porcentagem de inibição da oxidação no sistema beta caroteno/ácido linoleico dos diferentes extratos e frações.

Extratos	500 µg	1.000 µg
AQ 20°C	65,30 ± 1,68 ^B	75,42 ± 0,53 ^{BC}
AQ 23°C	71,35 ± 1,94 ^{AB}	79,39 ± 2,72 ^{AB}
AQ 60°C	59,71 ± 1,29 ^C	69,70 ± 1,54 ^C
Frações	50 µg	100 µg
AFL	61,80 ± 1,90 ^C	67,89 ± 2,70 ^{CD}
AFS	70,32 ± 4,42 ^{AB}	78,16 ± 2,07 ^{AB}
AFI	50,53 ± 3,45 ^D	62,29 ± 3,85 ^D
Antioxidante sintético	10 µg	20 µg
BHT	76,26 ± 1,64 ^A	84,65 ± 1,22 ^A

Letras maiúsculas indicam diferenças na coluna pelo teste Tukey-Kramer ($p < 0,05$).
Resultados expressos em média ± desvio padrão ($n=3$).

Os resultados permitem inferir que o extrato aquoso obtido em temperatura ambiente apresentou percentual de proteção semelhante ao antioxidante sintético BHT (10 e 20 µg) inibindo a oxidação em torno de 70% na menor (500 µg) e 80% na maior concentração (1.000 µg). Este resultado também foi relatado por Moreira e Mancini-Filho (2004) em trabalho utilizando uma mistura das especiarias mostarda, canela e erva-doce.

Proteção ainda maior foi observada na fração solúvel (AFS), já que em quantidade dez vezes menor que a utilizada para os extratos, apresentou comportamento semelhante frente à oxidação. Contudo, as frações livre e esterificada insolúvel obtiveram valores de proteção acima de 50%, o que também caracterizam-nas como antioxidantes, já que presentes em baixas concentrações retardam a oxidação (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

Resultados semelhantes foram obtidos no laboratório de Lípidos da FCF - USP por Silva (2008) quando investigou o efeito antioxidante do extrato aquoso

obtido por extração sequencial em temperatura ambiente ($69,94\% \pm 0,80$ e $80,93\% \pm 0,60$ para as concentrações $500 \mu\text{g}$ e $1000 \mu\text{g}$, respectivamente) e a fração livre ($64,32\% \pm 0,05$ e $70,55\% \pm 0,60$ nas concentrações $50 \mu\text{g}$ e $100 \mu\text{g}$, respectivamente) de alecrim neste mesmo sistema. O padrão butil hidroxitolueno (BHT) apresenta a boa reprodutibilidade do método já que no trabalho citado anteriormente os valores foram $83,53\% \pm 0,40$ para a concentração $10 \mu\text{g}$ e $88,94\% \pm 0,30$ para a concentração $20 \mu\text{g}$.

Na avaliação da atividade antioxidante através do método de varredura do radical DPPH., pode-se verificar que nos extratos e nas frações do alecrim estão presentes substâncias com propriedade antirradical.

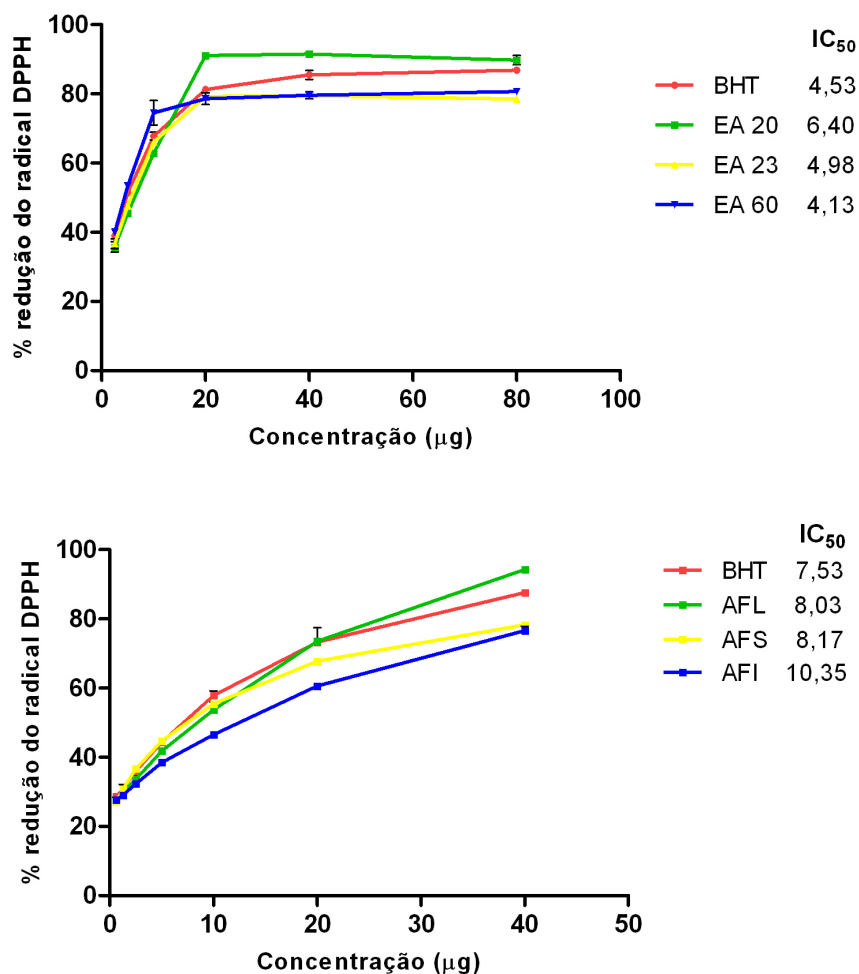


FIGURA 6 - Atividade antioxidante e valores de IC_{50} dos extratos aquosos obtidos em temperatura ambiente (AQ 23), 20°C (AQ 20) e 60°C (AQ 60) e das frações de ácidos fenólicos livres (AFL), esterificados solúveis (AFS) e insolúveis (AFI) das folhas de alecrim em sistema de varredura do radical DPPH.

Os valores de IC_{50} correspondem à quantidade de antioxidante requerida para um decréscimo de 50% na concentração inicial do radical DPPH e podem ser calculados a partir de uma curva construída pelas concentrações distintas do material analisado.

Neste estudo, os ácidos fenólicos livres (AFL) (8,03) e esterificados solúveis (AFS) (8,17), bem como os extratos aquosos 23 (4,98) e 60°C (4,13), tiveram valores de IC_{50} similares ao BHT. Almela *et al.* (2006) obtiveram resultados semelhantes com a amostra fresca de alecrim, cujos extratos apresentaram valores de IC_{50} próximos ao BHT.

Os resultados obtidos com os extratos e frações estão apresentados na Figura 6 e demonstram que o alecrim possui atividade antioxidante, o que justifica o grande nível de atenção que tem sido dado a esta especiaria.

Embora neste estudo não tenha sido possível fazer uma correlação entre os métodos de avaliação do potencial antioxidante das amostras, a atividade antioxidante das mesmas foi comprovada pela comparação com o padrão BHT.

Com a determinação da atividade antioxidante da amostra de alecrim *in vitro*, foi proposta a investigação da propriedade antioxidante do alecrim *in vivo*, a partir da hipótese de que o extrato aquoso e a fração fenólica livre de alecrim podem atuar de forma positiva sobre o estresse oxidativo causado pelo quadro de hipercolesterolemia induzida pela dieta em ratos e que esta proteção está associada aos seus constituintes químicos.

5.3 Quantificação dos compostos fenólicos presentes no extrato aquoso obtido em temperatura ambiente (AQ) e na fração fenólica livre (AFL) do alecrim

Alguns trabalhos têm apontado os ácidos carnósico (diterpeno fenólico) e rosmarínico (éster do ácido cafeico e 3,4-diidroxifenilactato) como os principais constituintes bioativos encontrados no alecrim (DEL BAÑO *et al.*, 2003; SEWALT, ROBBINS e GAMBLE, 2005; TRONCOSO *et al.*, 2005) e,

portanto, os mesmos foram identificados e quantificados conforme resultados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Quantidade dos ácidos carnósico e rosmarínico no extrato e na fração de ácidos fenólicos livres do alecrim oferecida aos animais

Amostra	Composto Bioativo	Quantidade (g/100g)
Extrato Aquoso	Ácido Carnósico	nd
	Ácido Rosmarínico	1,87 ± 0,02
Fração Livre	Ácido Carnósico	5,71 ± 0,05
	Ácido Rosmarínico	nd

Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=3). Nd = não detectável

Apesar da reconhecida capacidade antioxidante destes compostos, suas quantidades são variáveis, já que existem diversos fatores relacionados à origem, controle genético, fase de desenvolvimento durante a colheita, exposição a microrganismos, insetos e outros herbívoros, tipo de processamento pós-colheita e métodos de extração (incluindo tempo, temperatura, solventes, entre outros) que influenciam na quantidade e no tipo de compostos encontrados (JUSTO *et al.*, 2008; REHRAH *et al.*, 2007).

Almela *et al.* (2006), investigando também os compostos presentes no alecrim, encontraram 0,27 g de ácido rosmarínico e 2,8 g de ácido carnósico por 100 g de matéria seca no extrato metanólico desta especiaria.

Os resultados deste estudo mostram a presença apenas do ácido rosmarínico no extrato aquoso (1,87 g/100 g base seca), observação também descrita por Moreno *et al.* (2006), os quais não encontraram o ácido carnósico. Já na fração fenólica livre foi encontrado o ácido carnósico (5,71 g/ 100 g base seca), cuja propriedade química o caracteriza como lipofílico, explicando sua ausência no extrato aquoso.

Os cromatogramas do extrato aquoso e da fração fenólica livre estão apresentados em anexo.

5.4 Análise das rações

Kumar, Sudhahar e Varalakshmi (2005) observaram que ratos Wistar alimentados com uma dieta suplementada com colesterol e ácido cólico são um modelo de estresse oxidativo lipêmico para avaliar o papel de compostos com possíveis atividades hipolipidêmicas e antioxidantes. No estudo de Yokozawa *et al.* (2006) a dieta suplementada com 1% de colesterol e 0,5% de ácido cólico possibilitou um aumento de 65,7% e 80% nos índices de colesterol total e de LDL, respectivamente. Já uma dieta suplementada apenas com colesterol (1,5%) induz um discreto aumento de 25% nos índices de CT e 8% nos de LDL (SOARES *et al.*, 2005) ou até mesmo não chega a induzir a hipercolesterolemia. Estes dados mostram que os sais biliares, tal como o ácido cólico, são componentes essenciais para aumento efetivo dos níveis plasmáticos de colesterol, uma vez que auxiliam na absorção do colesterol presente no lúmen intestinal.

Na Tabela 5 encontram-se os dados da composição química da ração oferecida aos animais.

Tabela 5. Composição química das rações

Parâmetros (g/100g)	Padrão	Hipercolesterolêmica
Umidade	8,31 ± 0,27 ^a	7,59 ± 0,18 ^b
Cinzas	9,31 ± 0,21 ^a	9,09 ± 0,09 ^a
Proteínas	25,44 ± 0,10 ^a	25,43 ± 0,10 ^a
Lipídeos Totais	2,86 ± 0,07 ^a	2,91 ± 0,12 ^a
Fibra Alimentar Total	21,57 ± 1,12 ^a	22,37 ± 1,02 ^a
Carboidratos disponíveis*	32,48	32,61
Energia (Kcal/100g)	257,32	258,28

* Carboidratos disponíveis por diferença: 100- (umidade+cinzas+proteínas+lipídeos totais+FAT). Letras minúsculas indicam diferenças na linha pelo teste T (p<0,05). Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=3).

Neste estudo, para indução da hipercolesterolemia nos animais, a ração foi suplementada com 0,5% de colesterol e 0,25% de ácido cólico. Pode-se observar que as dietas estavam equalizadas, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa para os parâmetros cinzas, proteínas, lipídeos totais e fibra alimentar total.

O diferencial deste trabalho é que foi utilizada a metodologia de fibra alimentar total em substituição à fibra bruta. Na primeira determinação são utilizadas as enzimas α -amilase, protease e amiloglicosidase, enquanto na segunda a quantificação é feita após hidrólise básica e ácida, seguida de extração com acetona.

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados do perfil de ácidos graxos das rações oferecidas aos animais.

Tabela 6. Perfil de ácidos graxos das rações oferecidas aos animais em porcentagem do total de ácidos graxos

Parâmetros	Padrão	Hipercolesterolêmica
AGS	17,93 \pm 0,36 ^a	17,56 \pm 0,08 ^a
AGMI	24,70 \pm 0,11 ^a	24,81 \pm 0,13 ^a
AGPI	57,36 \pm 0,48 ^a	57,56 \pm 0,09 ^a

AGS – Ácidos Graxos Saturados; AGMI – Ácidos Graxos Monoinsaturados; AGPI - Ácidos Graxos Poli-insaturados.

Letras minúsculas indicam diferenças na linha pelo teste t Student ($p < 0,05$).

Resultados expressos em média \pm desvio padrão (n=3).

Corroborando com os dados de lipídeos totais, os resultados mostram que não houve diferença estatística do perfil de ácidos graxos entre as rações e que, por ter como base o óleo de soja, observa-se maior quantidade de ácidos graxos poli-insaturados.

5.5 Estudo *in vivo*

5.5.1 Efeito da administração do extrato aquoso obtido em temperatura ambiente (AQ) e da fração fenólica livre (AFL) do alecrim por 30 dias em ratos hipercolesterolêmicos

O peso corporal no início do estudo foi similar em todos os grupos e essa característica permaneceu até o final do período experimental. Os dados sobre ganho de peso, consumo de ração e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) estão apresentados na Tabela 7.

No trabalho desenvolvido por Ramos *et al.* (2008), os animais que consumiram uma dieta suplementada com 1% de colesterol e 0,5% de ácido cólico tiveram um ganho de peso e consumo alimentar maiores do que o grupo controle, os quais foram explicados pelo maior conteúdo de lipídeos na dieta hipercolesterolêmica. Contudo, conforme observado na Tabela 5, as dietas oferecidas aos animais experimentais eram isocalóricas e isoproteicas e, portanto, o ganho de peso e o consumo de ração não foram estatisticamente diferentes entre os grupos. Estes fatores proporcionaram um Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) equivalente entre os grupos, sugerindo que os compostos fenólicos presentes no alecrim não interferiram no aproveitamento dos nutrientes da ração. O mesmo resultado foi relatado por Ashraf, Hussain e Fahima (2005), Fki, Sahnoun e Sayadi (2007) e Rehrah *et al.* (2007).

Tabela 7. Ganho de peso (g), consumo de ração (g) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais

Grupos	Ganho de peso (g)	Consumo de ração (g/dia)	CEA
Controle	170,06 ± 14,90	20,24 ± 2,82	0,38
HC	172,52 ± 16,61 ^a	21,85 ± 3,77 ^a	0,36
AQ 70	178,34 ± 12,31 ^a	21,52 ± 3,38 ^a	0,38
AQ 140	171,98 ± 27,96 ^a	21,32 ± 3,20 ^a	0,37
AFL 7	181,00 ± 17,09 ^a	21,79 ± 3,53 ^a	0,38
AFL 14	187,23 ± 12,35 ^a	22,05 ± 4,63 ^a	0,40

Controle (C) e hipercolesterolêmicos (HC) tratados com água, extrato aquoso (AQ) nas concentrações 70 (AQ70) e 140 mg/kg (AQ140); fração fenólica livre do alecrim nas concentrações 7 (AFL7) e 14 mg/kg (AFL14).

Letras diferentes representam diferença estatística na coluna pelo teste Tukey-Kramer ($p < 0,05$) Média ± desvio padrão (n=6).

Ainda existem muitas controvérsias com relação ao comportamento dos animais frente a diferentes concentrações de colesterol e ácido cólico dietéticos. No trabalho de Bocanegra *et al.* (2008), ratos hipercolesterolêmicos (ração padrão suplementada com 2% de colesterol e 0,4% ácido cólico) tratados com algas apresentaram CEA significativamente maior do que o grupo controle, já no estudo de Brai, Odetola e Agomo (2007), o ganho de peso global dos ratos hipercolesterolêmicos em comparação com o controle normal não foi significativamente diferente ($p < 0.05$).

5.5.2 Efeito do extrato aquoso (AQ) e da fração fenólica livre (AFL) do alecrim sobre o lipidograma

A dieta foi capaz de induzir a hipercolesterolemia nos animais de modo significativo, observando-se aumento nos níveis séricos de colesterol total (CT) ($59,93 \pm 5,85$ mg/dL vs $178,54 \pm 33,31$ mg/dL) e da lipoproteína de baixa densidade (LDL) ($20,22 \pm 5,66$ mg/dL vs $145,89 \pm 36,42$ mg/dL) e redução do

nível sérico da lipoproteína de alta densidade (HDL) ($34,02 \pm 7,82$ mg/dL vs $20,60 \pm 3,10$ mg/dL) quando comparados ao grupo controle, conforme descrito na literatura (FKI, SAHNOUN e SAYADI, 2007; MICELI *et al.*, 2007; REHRAH *et al.*, 2007). Na Figura 7 estão apresentados os dados do lipidograma.

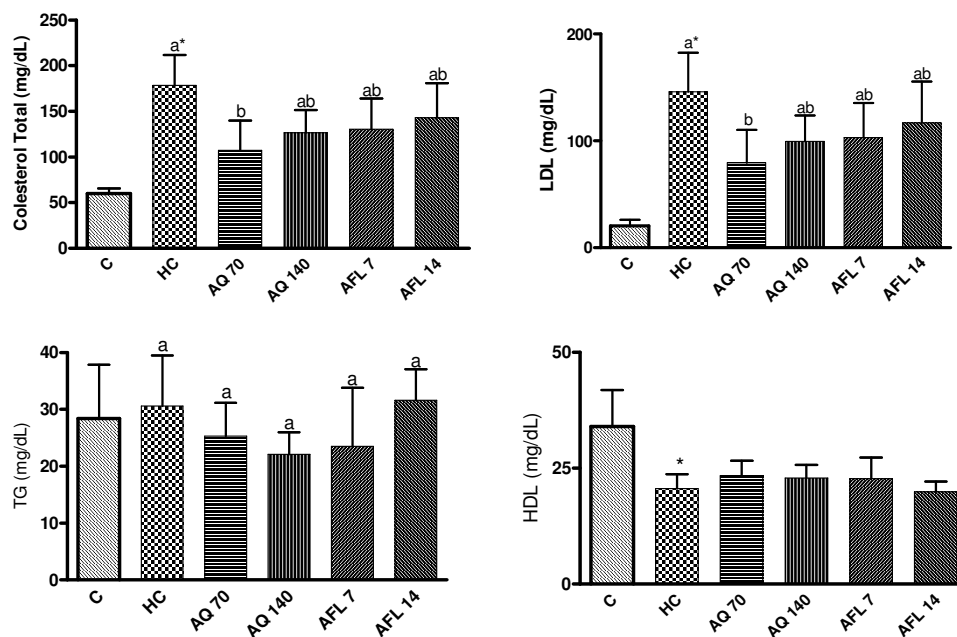


FIGURA 7 - Determinação de colesterol total, LDL colesterol, triacilgliceróis e HDL colesterol sérico de ratos controle (C) e hipercolesterolêmicos tratados com água (HC), extrato aquoso (AQ) nas concentrações 70 (AQ70) e 140 mg/kg (AQ140) ou fração fenólica livre do alecrim nas concentrações 7 (AFL7) e 14 mg/kg (AFL14) por 30 dias.

Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos hipercolesterolêmicos pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

* denota diferença estatística entre os grupos controle vs HC pelo teste t Student ($p < 0,05$).

Resultados expressos em média e desvio padrão ($n = 6$).

O extrato aquoso na concentração 70 mg/Kg foi capaz de reduzir os níveis de colesterol total (39,8%) e LDL-c (45,6%) de modo significativo, contudo não foram observados efeitos positivos sobre TG e HDL. Hirunpanich *et al.* (2006) trabalhando com hibisco e Soares *et al.* (2005) com gengibre, amoreira branca e alecrim também não observaram aumento nos níveis de HDL em ratos hipercolesterolêmicos.

Apesar desta dose (70 mg/Kg) não apresentar efeito sobre o colesterol HDL, vale ressaltar que a redução nos níveis de colesterol total e LDL

colesterol na circulação também é um passo primordial na prevenção da doença cardiovascular (LECUMBERRI *et al.*, 2007).

No que diz respeito à maior dose (140 mg/Kg), os animais hipercolesterolêmicos, mesmo submetidos à concentração mais elevada de compostos antioxidantes presentes no extrato, não tiveram uma redução significativa nos valores de colesterol total e LDL conforme se esperava, uma vez que a partir de resultados obtidos em um estudo piloto postulava-se um efeito também dose-resposta. Contudo, resultados semelhantes foram obtidos no Laboratório de Lípidos da FCF - USP por Silva (2008). Utilizando extrato aquoso de alecrim nas doses 25, 50 e 100 mg/Kg em animais diabéticos, apenas o extrato na dose intermediária foi capaz de reduzir os níveis de colesterol total (25,2%). Da mesma forma, os resultados mostram que as frações não tiveram uma ação significativa sobre o lipidograma dos animais experimentais.

5.5.3 Efeito do extrato aquoso (AQ) e da fração fenólica livre (AFL) do alecrim sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no soro

A hipercolesterolemia leva ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, as quais exercem seus efeitos citotóxicos por causar a peroxidação lipídica com a formação de malondialdeído (MDA). Este aldeído, obtido de hidroperóxidos lipídicos, é considerado um bom biomarcador dos danos causados por radicais livres em patologias associadas ao estresse oxidativo (MATEOS *et al.*, 2005).

Os dados apresentados na Figura 8 mostram que embora não tenha sido encontrada diferença estatística entre os grupos controle e hipercolesterolêmico ($p > 0,05$), o extrato na concentração 70 mg/Kg peso animal foi capaz de reduzir significativamente os índices de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (0,86 $\mu\text{mol MDA/mg proteína}$) com relação ao grupo hipercolesterolêmico (1,27 $\mu\text{mol MDA/mg proteína}$), perfil também encontrado por outros pesquisadores

(EL-BESHBISHY *et al.*, 2006; LECUMBERRI *et al.*, 2007; YOKOZAWA *et al.*, 2006).

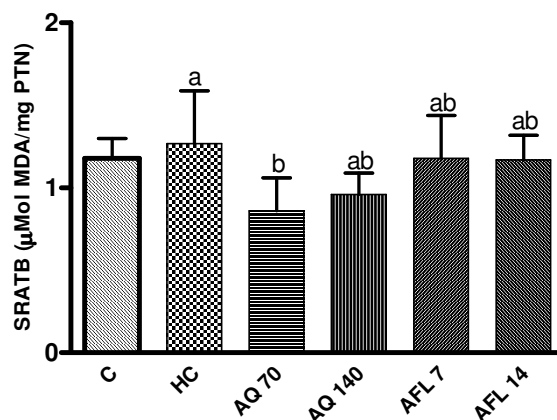


FIGURA 8 - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ($\mu\text{mol MDA/mg}$ proteína) sérico dos animais controle (C) e hipercolesterolêmicos tratados com água (HC), extrato aquoso (AQ) nas concentrações 70 (AQ70) e 140 mg/kg (AQ140) ou fração fenólica livre do alecrim nas concentrações 7 (AFL7) e 14 mg/kg (AFL14) por 30 dias.

Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos hipercolesterolêmicos pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

* denota diferença estatística entre os grupos controle vs HC pelo método t Student ($p < 0,05$). Resultados expressos em média e desvio padrão ($n = 6$).

A diminuição dos valores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e do colesterol total e LDL para o grupo AQ70 podem ser indicativos da ação dos compostos fenólicos presentes no extrato aquoso do alecrim sobre marcadores do estresse oxidativo relacionados ao risco cardiometabólico. Este fato corrobora com o descrito por Dorman *et al.* (2003) os quais relataram que os extratos aquosos da família *Lamiaceae* prolongaram a fase *lag* antes do início da oxidação da LDL induzida pelo cobre e comentaram que tal ação pode estar relacionada à quantidade de ácido rosmarínico presente nas amostras. Além disso, Qiao e colaboradores (2005) observaram a importante ação do ácido rosmarínico sobre a produção de espécies reativas em linhagem de macrófagos. Neste trabalho, este composto foi encontrado no extrato aquoso administrado nos animais e, portanto, sugere-se que este componente possa ter auxiliado na melhora do parâmetro da lipoperoxidação.

Assim como observado no lipidograma, as frações não exerceram efeito sobre a formação de SRATB e, apesar de não diferir estatisticamente do grupo

hipercolesterolêmico, 140 mg do extrato/Kg foi capaz de diminuir a peroxidação lipídica para 0,96 μmol MDA/mg proteína (24,2%).

5.5.4 Efeito do extrato aquoso (AQ) e da fração fenólica livre (AFL) do alecrim sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) tecidual

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nos tecidos cardíaco, cerebral, hepático e renal dos grupos experimentais.

O cérebro é um tecido importante para se avaliar o impacto da atividade antioxidante de compostos, uma vez que utiliza altas taxas de oxigênio e é muito susceptível à oxidação por ter uma quantidade significativa de lipídeos estruturais (KOTA, KRISHNA e POLASA, 2008). A concentração de substâncias reativas (TBARS) nos animais dos grupos controle e hipercolesterolêmico não diferiram entre si, indicando que a dieta *per se* não desencadeou um processo oxidativo neste tecido. Porém, pode-se observar uma ação significativa tanto do extrato quanto da fração sobre a peroxidação do tecido cerebral, indicando que os compostos presentes nesta especiaria exercem um efeito importante neste tecido tal como relatado por Montilla *et al.* (2006) para os compostos do vinho tinto.

No coração e rins também não foram observadas alterações significativas entre os grupos controle e hipercolesterolêmico. Este fato corrobora com a observação de Mahfouz e Kummerow (2000), os quais relataram que ratos submetidos a uma dieta suplementada com colesterol não tiveram alterações nos parâmetros oxidativos.

No fígado e rins, pode-se observar que os compostos fenólicos não foram capazes de diminuir a formação de espécies reativas, dado também encontrado por Fki, Sahnoun e Sayadi (2007), os quais relataram que a administração de hidroxitirosol e de extratos fenólicos obtidos da azeitona na concentração 5 mg/kg não exerceram efeito sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico teciduais. Ali et al (2000) observaram que o extrato aquoso de plantas, na dose de 4,0 g / kg

diminuiu significativamente a peroxidação lipídica no fígado, entretanto a concentração do extrato utilizada foi bem maior em relação à empregada neste estudo.

Tabela 8. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ($\mu\text{mol MDA/mg}$ proteína) nos tecidos dos animais

	Cérebro	Coração	Fígado	Rins
Controle	39,95 \pm 05,02	22,32 \pm 06,29	13,75 \pm 05,61	4,12 \pm 0,86
HC	41,03 \pm 21,77 ^a	20,00 \pm 02,59 ^a	6,89 \pm 1,78*	4,67 \pm 1,21
AQ 70	4,89 \pm 1,38 ^b	27,39 \pm 02,36 ^b	7,31 \pm 2,56	6,76 \pm 0,97
AQ 140	9,19 \pm 2,78 ^b	22,68 \pm 02,75 ^a	6,36 \pm 1,54	4,15 \pm 1,66
AFL 7	4,89 \pm 1,02 ^b	21,25 \pm 02,21 ^a	6,04 \pm 1,15	4,29 \pm 0,95
AFL 14	7,21 \pm 3,13 ^b	22,23 \pm 01,31 ^a	7,22 \pm 3,44	4,35 \pm 1,24

Controle (dieta padrão), HC (dieta hipercolesterolêmica), AQ 70 (HC + extrato aquoso 70 mg/kg), AQ 140 (HC + extrato aquoso 70 mg/kg), AFL 7 (HC + fração fenólica livre 7 mg/kg), AFL 14 (HC + fração fenólica livre 14 mg/kg).

Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos hipercolesterolêmicos pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

* denota diferença estatística entre os grupos controle vs HC pelo método t Student ($p < 0,05$).

Resultados expressos em média e desvio padrão ($n = 6$).

Ao contrário do observado para o soro, no tecido cardíaco do grupo experimental tratado com extrato aquoso na concentração 70 mg/Kg observou-se um aumento das substâncias reativas, sugerindo que o extrato aquoso atua de forma direta sobre os radicais presentes no soro. Contudo, no coração, os compostos presentes neste extrato poderiam agir sobre outros mecanismos de defesa, dentre eles as enzimas antioxidantes endógenas.

5.5.5 Efeito do extrato aquoso (AQ) e da fração fenólica livre (AFL) do alecrim sobre as enzimas antioxidantes nos tecidos cardíaco, cerebral, hepático e renal.

A hiperlipidemia tem sido associada ao aumento dos danos oxidativos afetando as lipoproteínas e o *status* antioxidante (SIES, STAHL e SEVANI, 2005), uma vez que favorece o aumento da produção de radicais livres, os quais desempenham um papel importante sobre as doenças cardiovasculares. Contudo, vários estudos mostram aumento da atividade das enzimas antioxidantes em ratos hipercolesterolêmicos após tratamento com compostos fenólicos comprovando a proteção que estes podem oferecer frente a um distúrbio patológico (VISAADIYA e NARASIMHACHARYA, 2008; YAZDANPARAST, BAHRAMIKIA e ARDESTANI, 2008; ZHU, LUO e JIN, 2008).

Na Figura 9 estão apresentados os valores de enzimas antioxidantes no tecido cardíaco de ratos controle e hipercolesterolêmicos tratados ou não. Os resultados mostram que os compostos antioxidantes presentes no alecrim não exerceram efeito sobre a atividade das enzimas SOD e CAT e, no grupo tratado com 7 mg/Kg peso animal, houve até mesmo uma redução na atividade destas enzimas.

De acordo com Dimitrios (2006), as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são produzidas continuamente no organismo e podem sofrer a ação das enzimas antioxidantes endógenas, porém quando estão em excesso são monitoradas também pelos antioxidantes e polifenóis dietéticos (DORMAN *et al.*, 2003). Já Andrade-Wharta (2007) comentou que os ácidos fenólicos podem exercer efeitos distintos nos diversos órgãos, potencializando a atividade das enzimas antioxidantes ou simplesmente atuando de forma direta sobre os radicais livres, preservando, desta maneira, o sistema antioxidante endógeno. Bouderbala *et al.* (2008) obtiveram níveis reduzidos da atividade da SOD nos rins de animais hipercolesterolêmicos tratados com a planta medicinal *Ajuga iva* (0,5% na dieta) e sugeriram que nestes tecidos não houve acúmulo do ânion superóxido.

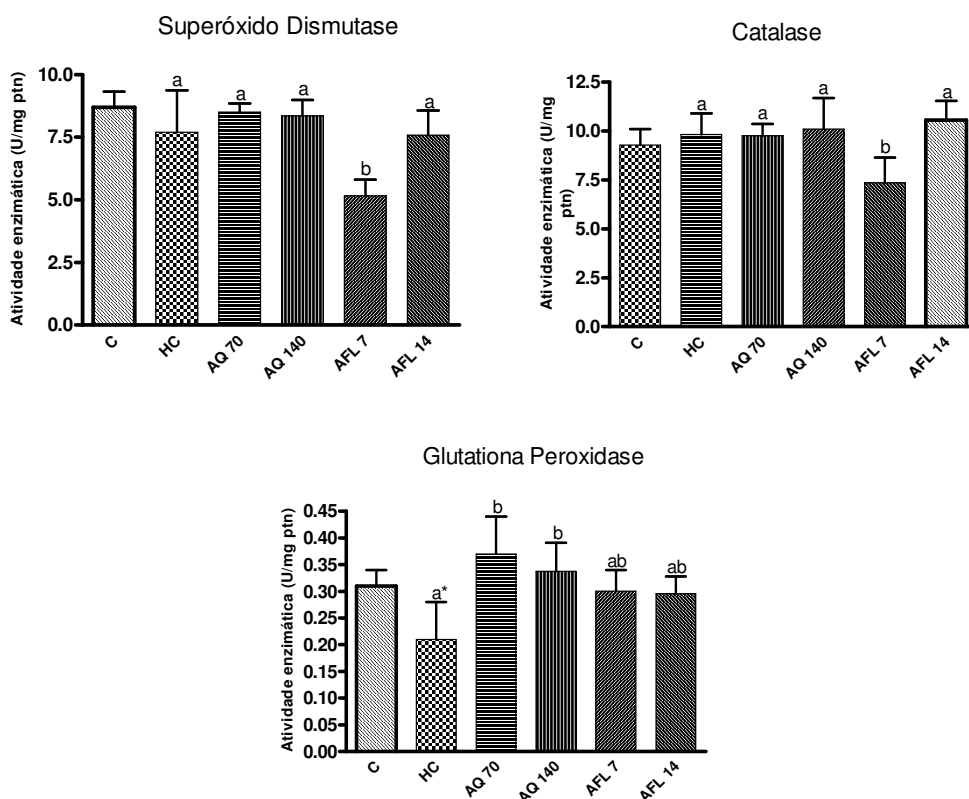


FIGURA 9 - Determinação da atividade das enzimas: superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase no tecido cardíaco de animais controle (C) e hipercolesterolêmicos tratados com água (HC), extrato aquoso (AQ) nas concentrações 70 (AQ70) e 140 mg/kg (AQ140) ou fração fenólica livre do alecrim nas concentrações 7 (AFL7) e 14 mg/kg (AFL14) por 30 dias. Resultados expressos em média e desvio padrão (n = 6).

Neste contexto, sugere-se que os constituintes fenólicos presentes na fração não esterificada do alecrim poderiam favorecer a menor concentração do ânion superóxido no tecido cardíaco destes animais, não estimulando o aumento da atividade da SOD e, conseqüentemente o produto desta reação (H_2O_2). As concentrações de peróxido de hidrogênio formadas pelo próprio metabolismo poderiam ser detoxificadas pela atividade da GPx, uma vez que mesmo diante do tratamento com compostos fenólicos a atividade desta enzima permaneceu semelhante a do grupo controle. O aumento simultâneo da SOD e da CAT dose-dependente demonstra uma interação importante entre essas duas enzimas.

A atividade das enzimas SOD e CAT estava normalizada no grupo hipercolesterolêmico ($p > 0,05$) e, da mesma forma que o encontrado neste

trabalho, Chenni *et al.* (2007) não observaram aumento na atividade da SOD cardíaca em animais com hipercolesterolemia induzida pela dieta suplementada com 0,5% de *Ajuga iva*.

Com relação à GPx, observa-se que os animais hipercolesterolêmicos tiveram uma redução significativa na atividade da mesma com relação ao grupo controle ($p < 0,01$), indicando o dano oxidativo ao tecido cardíaco. O extrato aquoso foi capaz de aumentar essa atividade de modo significativo, especialmente para o grupo AQ 70 ($p < 0,001$), o que poderia ser um possível agente protetor contra o aumento das SRATB encontrado nestes animais conforme comentado no item 4.5.4.

Da mesma forma, a Figura 10 mostra que os animais do grupo hipercolesterolêmico também tiveram uma diminuição significativa na atividade da GPx no cérebro, porém o extrato e a fração não exerceram efeito sobre esta enzima. Já a superóxido dismutase teve sua atividade aumentada nos grupos tratados com o extrato aquoso na maior concentração bem como as frações em ambas concentrações ($p < 0,05$).

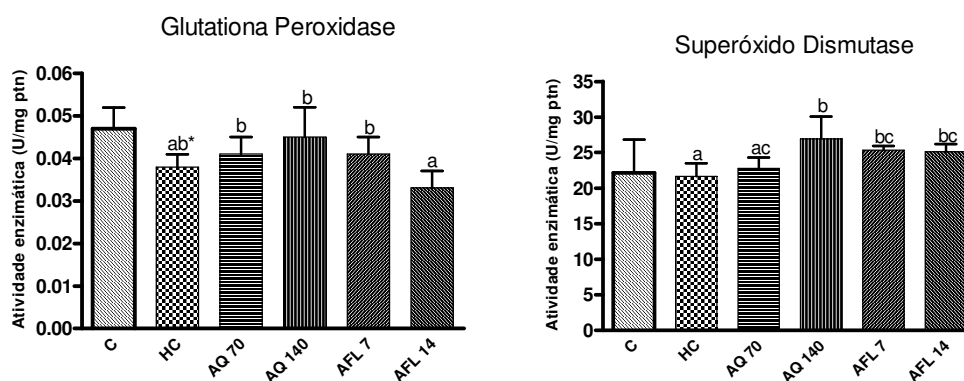


FIGURA 10 - Determinação da atividade das enzimas: superóxido dismutase e glutathione peroxidase no tecido cerebral de animais controle (C) e hipercolesterolêmicos tratados com água (HC), extrato aquoso (AQ) nas concentrações 70 (AQ70) e 140 mg/kg (AQ140) ou fração fenólica livre do alecrim nas concentrações 7 (AFL7) e 14 mg/kg (AFL14) por 30 dias. Resultados expressos em média e desvio padrão ($n = 6$).

Assim como no presente estudo, Montilla *et al.* (2006) observaram que o vinho tinto (400 mL/70 Kg) foi capaz de aumentar a atividade de enzimas

antioxidantes no cérebro de ratos com hipercolesterolemia induzida pela dieta. Estes resultados sugerem que o alecrim exerça um efeito importante neste tecido.

Na Figura 11, pode-se observar que os animais hipercolesterolêmicos tiveram uma diminuição significativa na atividade da catalase, contudo as frações exerceram um efeito positivo sobre esta enzima no tecido renal. As frações também foram eficientes em aumentar a atividade da SOD, enquanto o extrato apenas na maior concentração proporcionou tal efeito.

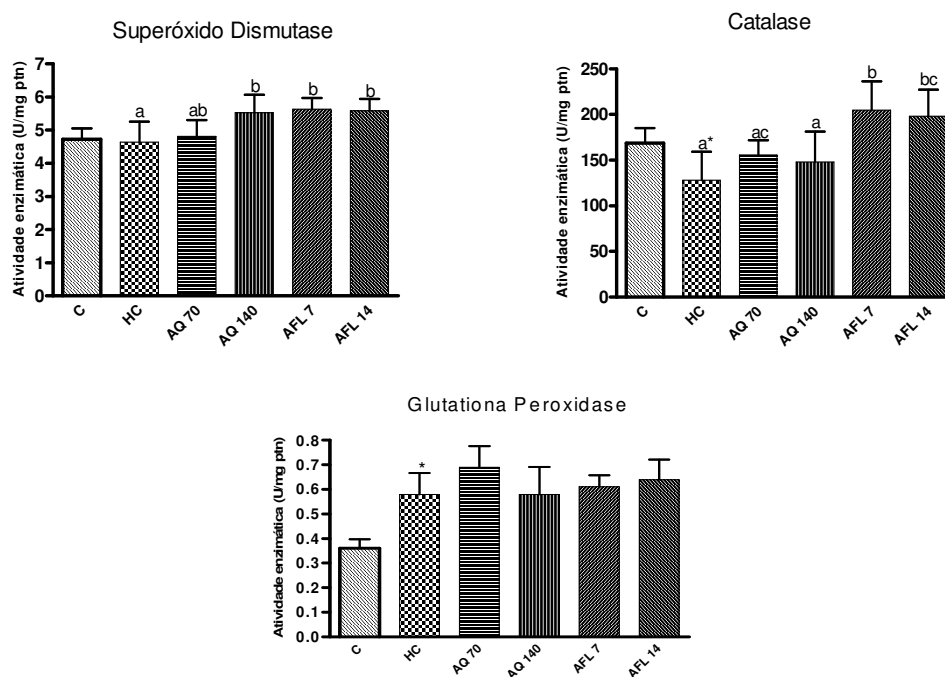


FIGURA 11 - Determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase no tecido renal de animais controle (C) e hipercolesterolêmicos tratados com água (HC), extrato aquoso (AQ) nas concentrações 70 (AQ70) e 140 mg/kg (AQ140) ou fração fenólica livre do alecrim nas concentrações 7 (AFL7) e 14 mg/kg (AFL14) por 30 dias. Resultados expressos em média e desvio padrão (n = 6).

O aumento na atividade de enzimas antioxidantes renais por compostos fenólicos também foi relatado por Montilla *et al.* (2006) e Chenni *et al.* (2007) os quais sugeriram um possível efeito nefroprotetor do vinho tinto e da planta medicinal *Ajuga iva*, respectivamente.

Uma ação positiva dos compostos fenólicos presentes nas frações não esterificadas sobre as enzimas antioxidantes teciduais também foi descrita por

Andrade-Wharta (2007) e Lima (2008), utilizando pedúnculo de cajú (*Anacardium occidentale* L.) e pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.), respectivamente. Além disso, na fração fenólica não esterificada administrada aos animais foi identificado o ácido carnósico (5,71 g/ 100g base seca) e, de acordo com Wijeratne e Cuppett (2007), esse composto mostrou capacidade em aumentar a atividade da SOD e inibir a lipoperoxidação em células Caco-2.

Quanto ao extrato aquoso, observou-se que a menor concentração (70 mg/Kg peso animal) não foi capaz de aumentar os valores da CAT, SOD e GPx de modo significativo em relação ao grupo hipercolesterolêmico, dados também relatados por Bouderbala *et al.* (2008) em animais hipercolesterolêmicos alimentados com uma dieta rica em colesterol e suplementada com 0,5% do extrato aquoso da planta medicinal *Ajuga Iva*.

Na Figura 12 estão apresentados os valores de enzimas antioxidantes no tecido hepático de ratos controle e hipercolesterolêmicos tratados ou não.

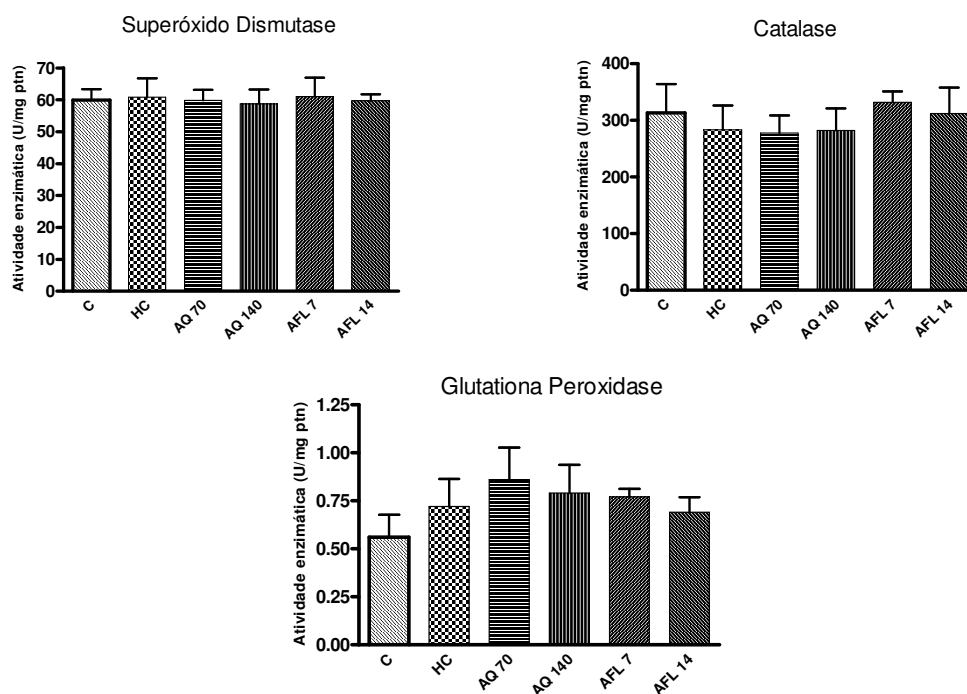


FIGURA 12 - Determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutaciona peroxidase no tecido hepático de animais controle (C) e hipercolesterolêmicos tratados com água (HC), extrato aquoso (AQ) nas concentrações 70 (AQ70) e 140 mg/kg (AQ140) ou fração fenólica livre do alecrim nas concentrações 7 (AFL7) e 14 mg/kg (AFL14) por 30 dias. Resultados expressos em média e desvio padrão (n = 6).

A administração oral dos compostos fenólicos presentes no extrato aquoso do alecrim não foi capaz de aumentar de modo significativo ($p < 0,05$) a atividade das enzimas antioxidantes presentes neste tecido. Utilizando o extrato aquoso de alecrim em animais diabéticos, Silva (2008) observou que apenas a catalase respondeu ao tratamento com o extrato na concentração de 50 mg/Kg e que o aumento da dose (100 mg/Kg) não proporcionou o mesmo efeito.

Os resultados obtidos nos tecidos cardíaco, cerebral e renal sugerem que o alecrim pode ter um efeito protetor contra os eventos oxidativos presentes na hipercolesterolemia, mas é importante salientar que embora o papel do estresse oxidativo sobre esta doença esteja bem elucidado, os efeitos de compostos com propriedades antioxidantes sobre as enzimas endógenas ainda não são bem compreendidos, uma vez que sua atividade parece depender do tempo de exposição à doença, da dose oferecida e do tecido analisado conforme observado em outros trabalhos (BOUDERBALA *et al.*, 2008; CHENNI *et al.*, 2007; FKI, SAHNOUN e SAYADI, 2007; SILVA, 2008).

5.5.6 Avaliação do perfil de ácidos graxos no tecido hepático

A adição de aproximadamente 0,5% a 3% de colesterol a uma dieta experimental aumenta o teor de lipídeos totais e pode favorecer a modificação da composição lipídica das membranas, especialmente no fígado, o qual desempenha um papel importante na síntese e no metabolismo das lipoproteínas (CHEN *et al.*, 2003; SUDHAHAR, KUMAR, VARALAKSHIMI, 2006). Por isso, torna-se interessante a avaliação da composição de ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) e poli-insaturados (AGPI), bem como a quantificação de lipídeos totais no tecido hepático dos animais experimentais conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9. Perfil de ácidos graxos no tecido hepático (%) dos animais

	Controle	HC	AQ 70	AQ 140	AFL 7	AFL 14
C16:0	20,06 ± 2,16	13,97 ± 0,46 ^{ab*}	13,79 ± 0,41 ^{ab}	14,82 ± 1,79 ^b	13,12 ± 0,62 ^a	12,77 ± 0,52 ^a
C18:0	17,88 ± 2,25	7,40 ± 1,18 [*]	6,88 ± 0,47	6,17 ± 1,17	6,45 ± 0,89	5,97 ± 0,43
Total AGS	39,27 ± 3,41	21,93 ± 1,55^{a*}	21,08 ± 0,75^{ab}	21,45 ± 1,90^a	20,78 ± 1,53^{ab}	19,09 ± 0,52^b
C16:1	0,65 ± 0,42	3,49 ± 0,83 ^{ab*}	2,90 ± 0,33 ^a	2,75 ± 0,54 ^a	3,49 ± 0,49 ^{ab}	3,85 ± 0,38 ^b
C18:1	11,73 ± 4,95	24,78 ± 1,93 [*]	25,08 ± 1,02	26,44 ± 1,77	25,09 ± 1,96	26,84 ± 1,60
Total AGMI	12,46 ± 5,47	28,94 ± 2,61[*]	28,46 ± 1,35	29,43 ± 1,99	29,10 ± 2,30	31,10 ± 1,66
C18:2	20,88 ± 4,16	31,34 ± 0,99 [*]	32,64 ± 0,59	32,10 ± 2,36	32,00 ± 1,34	31,98 ± 1,12
Total AGPI	46,38 ± 7,66	47,50 ± 1,12	49,64 ± 1,00	48,26 ± 2,68	48,26 ± 1,85	47,23 ± 1,45
AGMI + AGPI/AGS	1,50:1	3,49:1	3,70:1	3,62:1	3,72:1	4,10:1
C18:1/C18:0	0,66	3,35	3,65	4,29	3,89	4,50
Lipídeos Totais (mg)	11,33 ± 2,75	28,48 ± 3,75[*]	23,65 ± 5,18	26,05 ± 4,85	25,17 ± 3,27	26,63 ± 1,90

* Diferença estatística entre os grupos normal e HC pelo teste t Student (p<0,05).

Letras diferentes denotam diferença estatística na linha pelo teste de Tukey-Kramer (p<0,05).

Média ± desvio padrão (n=6)

Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre os grupos hipercolesterolêmicos tratados ou não no que concerne à quantidade de lipídeos totais, AGS, AGMI e AGPI totais. Contudo, o grupo hipercolesterolêmico obteve uma redução nos valores de ácidos graxos saturados (AGS) quando comparado ao grupo controle, dado também encontrado por Cintra *et al.* (2006) em tecido adiposo subcutâneo de ratos Wistar submetidos a uma dieta hiperlipídica e suplementada com 1% de colesterol.

Viejo *et al.* (2003) também observaram uma redução significativa de AGS e aumento de AGMI em animais que consumiram agentes hipercolesterolemiantes (colesterol e ácido cólico). Segundo estes autores, o aumento de ácidos graxos monoinsaturados tais como o oleico e palmitoleico sugerem a ocorrência do processo de esterificação, fato proporcionado pela ativação da enzima ACAT diante de dietas ricas em colesterol conforme descrito por Ramos *et al.* (2008).

Além disso, a dessaturação dos ácidos palmítico e esteárico pela ação da delta 9-dessaturase é um importante evento que leva ao aumento dos níveis de ácidos palmitoleico e oleico no fígado. Assim como encontrado por Viejo *et al.* (2003), os animais que consumiram a dieta hipercolesterolêmica apresentaram valores evidentemente maiores da razão oleico/esteárico (C18:1 /C18:0) com relação ao grupo controle, sugerindo maior atividade da enzima o que, portanto, favorece o aumento nos valores de monoinsaturados em relação aos saturados conforme encontrado neste trabalho. Não houve diferença estatística entre os grupos hipercolesterolemicos, indicando que os compostos fenólicos presentes no alecrim não tiveram efeito sobre o processo de esterificação no tecido hepático. Estes dados sugerem que a ação do extrato aquoso sobre a hipercolesterolemia não esteja relacionada à atividade da ACAT e que, portanto, outros mecanismos possam estar envolvidos.

5.5.7 Efeito do extrato aquoso (AQ) e da fração fenólica livre (AFL) do alecrim sobre as enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST)

Como o fígado é considerado o principal órgão responsável pela manutenção da homeostase de colesterol e após observação do aumento na concentração de lipídeos totais, bem como a modificação na composição de ácidos graxos, optou-se por determinar a atividade das enzimas marcadoras da lesão hepática alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase tal como apresentado na Figura 13.

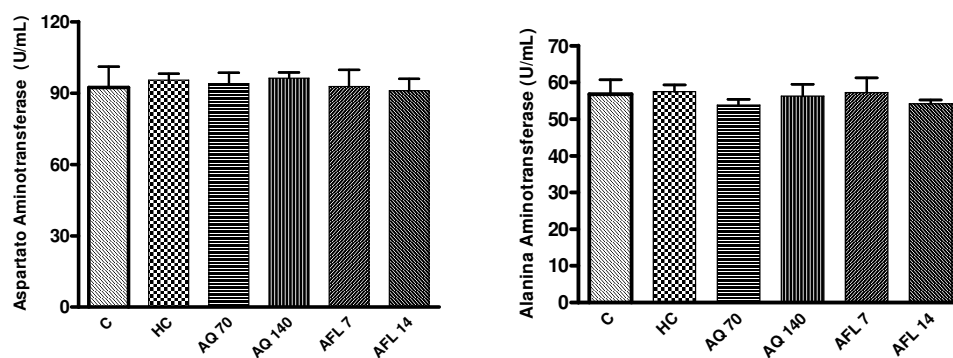


FIGURA 13 - Determinação das enzimas marcadoras de dano hepático (alanina aminotransferase - ALT e aspartato aminotransferase - AST) de ratos controle (C) e hipercolesterolêmicos tratados com água (HC), extrato aquoso (AQ) nas concentrações 70 (AQ70) e 140 mg/kg (AQ140) ou fração fenólica livre do alecrim nas concentrações 7 (AFL7) e 14 mg/kg (AFL14) por 30 dias. Resultados expressos em média e desvio padrão (n = 6).

Os resultados mostram que não houve diferença estatística entre os grupos, sugerindo que tanto o aumento de lipídeos totais como a administração de compostos fenólicos nas doses utilizadas nestas condições experimentais não causou dano nos hepatócitos.

Yokozawa *et al.* (2006) relataram um efeito hepatoprotetor dos compostos antioxidantes presentes no extrato de uma mistura de ervas (*Paeonia lactiflora*, *Cnidium officinale*, *Carthamus tinctorius*, *Cyperus rotundus*, *Aucklandia lappa* e *Salvia miltiorrhiza*) na concentração de 200 mg/Kg peso animal, dado não encontrado neste trabalho.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos ensaios *in vivo* e *in vitro* permitem inferir que:

- ✓ Tanto os extratos como as frações de ácidos fenólicos do alecrim apresentaram efeito antioxidante, conforme observado tanto no sistema de varredura do radical DPPH como na cooxidação do beta caroteno/ácido linoleico;
- ✓ Nas condições estudadas, verificou-se que o extrato aquoso de alecrim tem papel importante sobre o metabolismo de colesterol, reduzindo os níveis séricos de colesterol total e LDL-c. No entanto não foram observadas diferenças quanto à composição de lipídeos no tecido hepático;
- ✓ O alecrim atuou sobre a atividade das enzimas SOD, CAT e GPx nos tecidos de forma compartimentalizada, confirmando a ação de compostos presentes nesta especiaria sobre parâmetros do estresse oxidativo. Contudo, quanto à redução da oxidação lipídica nos tecidos verificou-se que os compostos atuaram parcialmente.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, M.S.; SANT'ANA, L.S. Effects of pretreatment with rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in the prevention of lipid oxidation in salted tilapia fillets. **Journal of Food Quality**, v.31, p.586-595, 2008.

AFONSO, M.S.; SANT'ANA, L.S.; PINTO, J.P.A.N.; XIMENES, B. Atividade antioxidante e antimicrobiana do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em filés de tilápia (*Oreochromis ssp*) salgados secos durante o armazenamento congelado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, p.12-17, 2008.

AL-ATTAR, A.M. Comparative physiological study on the effect of rosemary, tarragon and bay leaves extract on serum lipid profile of quail, *Coturnix coturnix*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.13, n.2, p.91-98, 2006.

ALFRANCA, A.; IÑIGUEZ, M.A.; FRESNO, M.; REDONDO, J.M. Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: role in cardiovascular diseases. **Cardiovascular Research**, v.70, p.446–456, 2006.

ALI, B.H.; ALQAWARI, A.A.; BASHIR, A.K.; TANIRA, M.O. Antioxidant action of extract of the traditional medicinal plant *Rhazya stricta* Decne. in rats. **Phytotherapy Research**, v.14, p.469–471, 2000.

ALMELA, L.; SÁNCHEZ-MUÑOZ, B.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A.; ROCA, M.J.; RABE, V. Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. **Journal of Chromatography, A**, v.1120, p.221-229, 2006.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 5.ed. Champaign: AOCS, 2004. p.1-2. [Official method Ce 2-66 - Preparation of Methyl Esters of Fatty Acids].

ANDERSON, E.J.; LUSTIG, M.E.; BOYLE, K.E.; WOODLIEF, T.L.; KANE, D.A.; LIN, C.T.; PRICE III, J.W.; KANG, L.; RABINOVITCH, P.S.; SZETO, H.H.; HOUMARD, J.A.; CORTRIGHT, R.N.; WASSERMAN, S.D.H.; NEUFER, P.D. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. **Journal of Clinical Investigation**, v.119, p.573–581, 2009.

ANDRADE-WARTHA, E.R.S. **Propriedades antioxidantes de clones do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.):** efeito sobre a lipoperoxidação e enzimas participantes do sistema antioxidante de defesa do organismo animal. São Paulo, 2007. 134p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.66, p.232-240, 2007.

ANGIONI, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; COÏSSON, J.D.; ARLORIO, M.; DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.3530-3535, 2004.

ANILA, L.; VIJAYALAKSHMI, N.R. Antioxidant action of flavonoids from *Mangifera indica* and *Embllica officinalis* in hypercholesterolemic rats. **Food Chemistry**, v.83, p.569–574, 2003.

ARAÚJO, R.G.; CASELLA FILHO, A.; GALVÃO, T.F.G.; CHAGAS, A.C.P. Dislipidemia, inflamação e aterosclerose. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v.6, p.470-476, 2005.

ASHRAF, M.Z.; HUSSAIN, M.E.; FAHIM, M. Antiatherosclerotic effects of dietary supplementations of garlic and turmeric: restoration of endothelial function in rats. **Life Sciences**, v.77, p.837–857, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 18.ed. Gaithersburg: AOAC International, 2005a. cap.4, p.27, 39, cap.32, p.7, cap.41, p.1, cap.44, p.3.

AVIRAM, M. Flavonoids-rich nutrients with potent antioxidant activity prevent atherosclerosis development: the licorice example. **International Congress Series**, v.1262, p.320-327, 2004.

BAI, H.W.; ZHU, B.T. Strong activation of cyclooxygenase I and II catalytic activity by dietary bioflavonoids. **Journal of Lipid Research**, v.49, p.2557–2570, 2008.

BARZI, F.; WOODWARD, M.; MARFISI, R.M.; TAVAZZI, L.; VALAGUSSA, F.; MARCHIOLI, R. Mediterranean diet and all-causes mortality after myocardial infarction: results from the GISSI-Prevenzione trial. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.57, p.604–611, 2003.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism**: manual of biochemical methods. 2.ed. New York: Grune e Stratton, 1975. p.89-90.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, n.26, p.1199-1200, 1958.

BOCANEGRA, A.; NIETO, A.; BASTIDA, S.; BENEDI, J.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F.J. A Nori but not a Konbu, dietary supplement decreases the cholesterolaemia, liver fat infiltration and mineral bioavailability in hypercholesterolaemic growing Wistar rats. **British Journal of Nutrition**, v.99, p.272-280, 2008.

BOK, S.H.; LEE, S.H.; PARK, Y.B.; BAE, K.H.; SON, K.H.; JEONG, T.S.; CHOI, M.S. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. **Journal of Nutrition**, v.129, p.1182-1185, 1999.

BOUDERBALA, S.; LAMRI-SENHADJI, M.; PROST, J.; LACAILLE-DUBOIS, M.A.; BOUCHENAK, M. Changes in antioxidant defense status in hypercholesterolemic rats treated with *Ajuga iva*. **Phytomedicine**, v.15, p.453-461, 2008.

BRAI, B.I.C.; ODETOLA, A.A.; AGOMO, P.U. Hypoglycemic and hypocholesterolemic potential of *Persea americana* leaf extracts. **Journal of Medicinal Food**, v.10, p.356–360, 2007.

BROINIZI, P.R.B.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; NOVOA, A.J.V.; TORRES, R.P.; AZEREDO, H.M.C.; ALVES, R.E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.902-908, 2007.

BRUCKNER, G. Fatty acids and cardiovascular disease. In: CHOW, C.K., ed. **Fatty acids in foods and their health implications**. 3.ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. cap.44, p.1061-1084. (Food science and technology, 170).

CAVALCANTI, E.F.A.; BENSEÑOR, I.M. Alimentação e risco cardiovascular. In: _____. **Orientação nutricional**: perda de peso e saúde cardiovascular. São Paulo: Sarvier, 2005. p.15-36. (Série-Medicina “Ciência e Arte”).

CHEN, J.-R.; CHIOU, S.-F.; SUETSUNA, K. YANG, H.-Y.; YANG, S.-C. Lipid metabolism in hypercholesterolemic rats affected by feeding cholesterol-free diets containing different amounts of non-dialyzed soybean protein fraction. **Nutrition**, v.19, n.7/8, p.676–680, 2003.

CHENNI, A.; YAHIA, D.A.; BOUKORTT, F.O.; PROST, J.; LACAILLE-DUBOIS, M.A.; BOUCHENAK, M. Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.207–213, 2007.

CHLOPCÍKOVÁ, S.; PSOTOVÁ, J.; MIKETOVÁ, P.; SOUSEK, J.; LICHNOVSKÝ, V.; SIMÁNEK, V. Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. Part II. Caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids. **Phytotherapy Research**, v.18, p.408-413, 2004.

CHOI, E.M.; HWANG, J.K. Effect of some medicinal plants on plasma antioxidant system and lipid levels in rats. **Phytotherapy Research**, v.19, p.382–386, 2005.

CHORILLI, M.; RIMÉRIO, T.C.; OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V. Estudo da estabilidade de lipossomas compostos de fosfatidilcolina de soja e fosfatidilcolina de soja hidrogenada adicionados ou não de colesterol por método turbidimétrico. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.26, p.31-37, 2007.

CINTRA, D.E.C.; COSTA, A.G.V.; PELUZIO, M.C.; MATTA, S.L.P.; SILVA, M.T.C.; COSTA, N.M.B. Lipid profile of rats fed high-fat diets base don flaxseed, peanut, trout, or chicken skin. **Nutrition**, v.22, p.197-205, 2006.

COSTA, R.P.; SILVA, C.C. Doenças cardiovasculares. In: CUPPARI, L., coord. **Guia de nutrição**: nutrição clínica no adulto. Barueri: Manole, 2005. cap.15, p.287-312. (Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar).

DEANFIELD, J.E.; HALCOX, J.P.; RABELINK, T.J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. **Circulation**, v.115, p.1285-1295, 2007.

DEL BAÑO, M.J.; LORENTE, J.; CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; DEL RÍO, J.A.; ORTUÑO, A.; QUIRIN, K.W.; GERARD, D. Phenolic diterpenes, flavones and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.4247-4253, 2003.

DEVIRIM, E.; ERGÜDERA, İ.B.; ÖZBEKB, H.; DURAK, I. High-cholesterol diet increases xanthine oxidase and decreases nitric oxide synthase activities in erythrocytes from rats. **Nutrition Research**, v.28, p.212-215, 2008.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Trends in Food Science e Technology**, v.17, p.505–512, 2006.

DORMAN, H.J.D.; PELTOKETO, A.; HILTUNEN, R.; TIKKANEN, M.J. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected *Lamiaceae* herbs. **Food Chemistry**, v.83, p.255–262, 2003.

EL-BESHBISHY, H.A. Hypolipidemic and antioxidant effects of *Morus alba* L. (*Egyptian mulberry*) root bark fractions supplementation in cholesterol-fed rats. **Life Sciences**, v.78, p.2724–2733, 2006.

ESPORCATE, R.; REY, H.C.V.; RANGEL, F.O.D.; ROCHA, R.M.; MENDONÇA FILHO, H.T.F.; DOHMANN, H.F.R.; ALBANESI FILHO, F.M. Valor preditivo da mieloperoxidase na identificação de pacientes de alto risco admitidos por dor torácica aguda. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.89, p.341-347, 2007.

FALUDI, A.A.; BERTOLAMI, M.C. Estratégia no seguimento a longo prazo de pacientes dislipidêmicos sob tratamento farmacológico. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v.15, p.546-549, 2005.

FIERRO, I.M.; KUTOK, J.L.; SERHAN, C.N. Novel lipid mediator regulators of endothelial cell proliferation and migration: aspirin-triggered-15R-lipoxin A4 and lipoxin A4. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.300, p. 385–392, 2002.

FKI, I.; SAHNOUN, Z.; SAYADI, S. Hypocholesterolemic effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol recovered from olive mill wastewater in rats fed a cholesterol-rich diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.624-631, 2007.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids. **Journal of Biological Chemistry**, v.226, p.497-509, 1957.

FORSTERMANN, U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. **Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine**, v.5, p.338-349, 2008.

FRIEDWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FRADRICKSON, D.S. Estimation of concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without the use of preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v.18, p.494-502, 1972.

GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology e Medicine**, v.29, p.1106–1114, 2000.

GIOVANNINI, C.; SCAZZOCCHIO, B.; VARÌ, R.; SANTANGELO, C.; D'ARCHIVIO, M.; MASELLA, R. Apoptosis in cancer and atherosclerosis: polyphenol activities. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v.43, p.406-416, 2007.

GLADINE, C.; MORAND, C.; ROCK, E.; BAUCHART, D.; DURAND, D. Plant extracts rich in polyphenols (PERP) are efficient antioxidants to prevent lipoperoxidation in plasma lipids from animals fed n-3 PUFA supplemented diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.136, p.281–296, 2007.

GLEW, R.H. Metabolismo de lipídeos II. Vias do metabolismo de lipídeos especiais. In: DEVLIN, T.M., coord. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Blucher, 2007. cap.18, p.683-724.

GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature**, v.343, p.425-430, 1990.

GRIENGLING, K.K.; FRITZGERALD, G.A. Oxidative stress and cardiovascular injury: animal and human studies. **Circulation**, v.108, p.2034-2040, 2003.

GRIENGLING, K.K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circulation Research**, v.86, p.494-501, 2000.

GURR, M.I.; FRAYN, K.N.; HARWOOD, J.L. Lipid transport. In: _____. **Lipid biochemistry**. 5.ed. Oxford: Blackwell Science, 2002. cap.5, p.170-214.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants: redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v.141, p.312-322, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 2.ed. Oxford: Clarendon Press, 1989. 543p.

HERTOG, M.G.L.; FESKENS, E.J.M.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. **Lancet**, v.342, p.1007-1011, 1993.

HIRUNPANICH, V.; UTAIPAT, A.; MORALES, N.P.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; SATO, H.; HERUNSALE, A.; SUTHISISANG, C. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.103, p.252–260, 2006.

HUI, D.Y.; HOWLES, P.N. Molecular mechanisms of cholesterol absorption and transport in the intestine. **Seminars in Cell e Developmental Biology**, v.16, p.183–192, 2005.

IKONEN, E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, p.125-138, 2008.

JEREZ, M.; PINELO, M.; SINEIRO, J.; NUÑEZ, M.J. Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark: assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis. **Food Chemistry**, v.94, p.406–414, 2006.

JONES, D.P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.8, n.9/10, p.1865-1879, 2006.

JUSTO, O.R.; MORAES, A.M.; BARRETO, G.P.M.; MERCADANTE, A.Z.; ROSA, P.T.V. Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração de fluido supercrítico. **Química Nova**, v.31, p.1699-1705, 2008.

KAWAI, Y.; NISHIKAWA, T.; SHIBA, Y.; SAITO, S.; MUROTA, K.; SHIBATA, N.; KOBAYASHI, M.; KANAYAMA, M.; UCHIDA, K.; TERAOKA, J. Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. **Journal of Biological Chemistry**, v.283, p.9424–9434, 2008.

KOSHY, A.S. Flavonoids from *Garcinia cambogia* lower lipid levels in hypercholesterolemic rats. **Food Chemistry**, v.72, p.289-294, 2001.

KOTA, N.; KRISHNA, P.; POLASA, K. Alterations in antioxidant status of rats following intake of ginger through diet. **Food Chemistry**, v.106, p.991–996, 2008.

KRYGIER, K.; SOSULSKI, F.; HOGGE, L. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids: extraction and purification procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.30, p.330-334, 1982.

KULISIC, T.; KRISKO, A.; DRAGOVIĆ-UZELAC, V.; MILOS, M.; PIFAT, G. The effects of essential oils and aqueous tea infusions of oregano (*Origanum vulgare* L. spp Hirtum), thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) on the copper-induced oxidation of human low-density lipoproteins. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.58, p.87-93, 2007.

KULLAK-UBLICK, G.A.; STIEGER, B.; MEIER, P.J. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. **Gastroenterology**, v.126, p.322–342, 2004.

KUMAR, P.; AGARWAL, J.L.; KUMAR, A. Effect of long term oral administration of L-arginine on experimentally produced myocardial ischemia in rabbits. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.51, p.147-152, 2007.

KUMAR, S.A.; SUDHAHAR, V.; VARALAKSHMI, P. Attenuation of serum lipid abnormalities and cardiac oxidative stress by eicosapentaenoate-lipoate (EPA-LA) derivative in experimental hypercholesterolemia. **Clinica Chimica Acta**, v.335, p.197-204, 2005.

LECUMBERRI, E.; GOYA, L.; MATEOS, R.; ALÍA, M.; RAMOS, S.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; BRAVO, L. A diet rich in dietary fiber from cocoa improves lipid profile and reduces malondialdehyde in hypercholesterolemic rats. **Nutrition**, v.23, p.332–341, 2007.

LIMA, A. **Caracterização dos principais compostos antioxidantes presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) e sua função na proteção do estresse oxidativo em ratos**. São Paulo, 2008. 178p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

LORGERIL, M.; SALÉN, P.; MARTIN, J.L.; MONJAUD, I.; DELAYE, J.; MAMELLE, N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. **Circulation**, v.99, p.779-785, 1999.

LOTTENBERG, A.M.P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.53, p.595-607, 2009.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

LU, K.; LEE, M.H.; PATEL, S.B. Dietary cholesterol absorption; more than just bile. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.12, p.314-320, 2001.

MAGALHÃES, C.C.; CHAGAS, A.C.P.; LUZ, P.L. Hipertrigliceridemia: implicações clínicas e terapêuticas. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v.15, p.483-488, 2005.

MAHFOUZ, M.M.; KUMMEROW, F.A. Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.11, p.293–302, 2000.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p.727-747, 2004.

MARCOPITO, L.F.; RODRIGUES, S.S.F.; PACHECO, M.A.; SHIRASSU, M.M.; GOLDFEDER, A.J.; MORAES, M.A. Prevalência de alguns fatores de risco para doenças crônicas na cidade de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v.39, 738-745, 2005.

MARTINEZ, T.L.R.; SANTOS, R.D.; ARMAGANIJAN, D.; TORRES, K.P.; LOURES-VALE, A.; MAGALHÃES, M.E.; LIMA, J.C.; MORIGUCHI, E.; AMODEO, C.; ORTIZ, J. National alert campaign about increased cholesterol. determination of cholesterol levels in 81.262 brazilians. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 80, p.635-638, 2003.

MATEOS, R.; LECUMBERRI, E.; RAMOS, S.; GOYA, L.; BRAVO, L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress: application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. **Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications**, v.827, p.76–82, 2005.

MATSUURA, E.; KOBAYASHI, K.; TABUCHI, M.; LOPEZ, L.R. Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis. **Progress in Lipid Research**, v.45, p.466-486, 2006.

MC CORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase, an enzyme function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v.244, p.6049-6055, 1969.

MCNALLY, J.S.; DAVIS, M.E.; GIDDENS, D.P.; SAHA, A.; HWANG, J.; DIKALOV, S.; JO, H.; HARRISON, D.G. Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v.285, p.H2290–H2297, 2003.

MICELI, N.; MONDELLO, M.R.; MONFORTE, M.T.; SDRAFKAKIS, V.; DUGO, P.; CRUPI, M.L.; TAVIANO, M.F.; PASQUALE, R.; TROVATO, A. Hypolipidemic effects of *Citrus bergamia* Risso et poiteau juice in rats fed a hypercholesterolemic diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.10671-10677, 2007.

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.48, p.91, 1971.

MONTILLA, P.; ESPEJO, I.; MUÑOZ, M.C.; BUJALANCE, I.; MUÑOZ-CASTAÑEDA, J.R.; TUNEZ, I. Protective effect of red wine on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in the brain and kidney induced by feeding high cholesterol in rats. **Clinical Nutrition**, v.25, p.146–153, 2006.

MOREIRA, A.V.B. **Efeito antioxidante dos compostos fenólicos de especiarias sobre os ácidos graxos das séries w3 e w6**. São Paulo, 2003. 153p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

MOREIRA, A.V.B.; MANCINI-FILHO, J. Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva doce em sistemas aquoso e lipídico. **Nutrire**, v.25, p.31-46, 2003.

MOREIRA, A.V.B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição da PUCCAMP**, v.17, n.4, p.411-424, 2004.

MORENO, S.; SCHEYER, T.; ROMANO, C.S.; VOJNOV, A.A. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. **Free Radical Research**, v.40, p.223-231, 2006.

NAEMURA, A.; URA, M.; YAMASHITA, T.; ARAI, R.; YAMAMOTO, J. Long term intake of rosemary and common thyme herbs exhibits experimental thrombosis without prolongation of bleeding time. **Thrombosis Research**, v.122, n.4, p.517-522, 2008.

NIE, D.; TANG, K.; DIGLIO, C.; HONN, K.V. Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate 12-lipoxygenase. **Blood**, v.95, p.2304-2311, 2000.

NOVELLI, E.L.B.; DINIZ, Y.S. Ingestão alimentar, síndrome metabólica, obesidade e alterações cardiovasculares. In: NOVELLI, E.L.B. **Nutrição e vida saudável**: estresse oxidativo e metabolismo energético. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2005. p.75-90.

OHKAWA, H.; OHISI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbitric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v.95, p.351-358, 1979.

PAPAHARALAMBUS, C.A.; GRIENGLING, K.K. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v.17, p.48-54, 2007.

PEARSON, D.A.; FRANKEL, E.N.; AESCHBACH, R.; GERMAN, J.B. Inhibition of endothelial cell-mediated oxidation of low-density lipoprotein by rosemary and plant phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.578-582, 1997.

PÉREZ-FONS, L.; ARANDA, F.J.; GUILLÉN, J.; VILLALÁIN, J.; MICOL, V. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes affect lipid polymorphism and fluidity in phospholipid membranes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.453, p.224-236, 2006.

PIRILLO, A.; UBOLDI, P.; BOLEGO, C.; KUHN, H.; CATAPANO, A.L. The 15-lipoxygenase-modified high density lipoproteins 3 fail to inhibit the TNF- α -induced inflammatory response in human endothelial cells. **Journal of Immunology**, v.181, p.2821-2830, 2008.

PRASAD, M.M.; SEENAYYA, G. Effect of spices on the growth of red halophilic cocci isolated from salted cured fish and solar salt. **Food Research International**, v.33, p.793-798, 2000.

PRASAD, V.S.; RAGHAVENDRA, R.; LOKESH, B.R.; NAIDU, K.A. Spice phenolics inhibit human PMNL 5-lipoxygenase. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.70, p.521-528, 2004.

PRATICÒ, D. Antioxidants and endothelium protection. **Atherosclerosis**, v.181, p.215-224, 2005.

QIAO, S.; LI, W.; TSUBOUCHI, R.; HANEDA, M.; TAKEUCHI, F.; MURAKAMI, K.; NISIMOTO, Y.; YOSHINO, M. Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264.7 macrophages. **Free Radical Research**, v.39, p.995-1003, 2005.

RAEDERSTORFF, D.G.; SCHLACHTER, M.F.; ELSTE, V.; WEBER, P. Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.14, p.326-332, 2003.

RAHMAN, I.; BISWAS, S.K.; KIRKHAM, P.A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochemical Pharmacology** v.72, p.1439-1452, 2006.

RAMOS, S.; MOULAY, L.; GRANADO-SERRANO, A.B.; VILANOVA, O.; MUGUERZA, B.; GOYA, L.; BRAVO, L. Hypolipidemic effect in cholesterol-fed rats cocoa husks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.6985-6993, 2008.

REHRAH, D.; AHMEDNA, M.; YU, J.; GOKTEPE, I.; HURLEY, S.; ANNER, T.; RAO-PATEL, A. Enhanced cholesterol- and triglyceride lowering effect of West African green tea. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.87, p.1323-1329, 2007.

RIQUE, A.B.R.; SOARES, E.A.; MEIRELLES, C.M. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.8, p.244-254, 2002.

ROCHA, V.Z.; LIBBY, P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. **Nature Reviews Cardiology**, v.6, p.399-409, 2009.

ROMAN, R.M.; WENDLAND, A.E.; POLANCZYK, C.A. Mieloperoxidase e doença arterial coronariana: da pesquisa à prática clínica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.91, p.E12-E19, 2007.

SALONEN, R.M.; NYSSÖNEN, K.; KAIKKONEN, J.; PORKKALA-SARATAHO, E.; VOUTILAINEN, S.; RISSANEN, T.H.; TUOMAINEN, T.P.; VALKONEN, V.P.; RISTONMAA, U.; LAKKA, H.M.; VANHARANTA, M.; SALONEN, J.T.; POULSEN, H.E. Six-year effect of combined vitamin C and E supplementation on atherosclerotic progression: the Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) study. **Circulation**, v.107, p.947-953, 2003.

SÁNCHEZ-ESCALANTE, A.; DJENANE, D.; TORRESCANO, G.; BELTRAN, J.A.; RONCALES, P. The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere. **Meat Science**, v.58, p.421–429, 2001.

SCHNEIDER, I.; BUCAR, F. Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 1: medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase/cyclooxygenase. **Phytotherapy Research**, v.19, p.81-102, 2005.

SEIFRIED, H.E.; ANDERSON, D.E.; FISHERA, E.I.; MILNER, J.A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.18, p.567-579, 2007.

SERHAN, C.N. Systems approach with inflammatory exudates uncovers novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.79, p.157–163, 2008.

SEWALT, V.; ROBBINS, K.; GAMBLE, W. Lipid-soluble antioxidant components of *Rosmarinus officinalis*. **Lipid Technology**, v.17, p.106-111, 2005.

SHAHIDI, F.; ALASALVAR, C.; LIYANA-PATHIRANA, C.M. Antioxidant phytochemicals in Hazelnut Kernel (*Corylus avellana* L.) and Hazelnut Byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.1212-1220, 2007.

SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **FEBS Letters**, v.103, p.287-290, 1979.

SIES, H.; STAHL, W.; SEVANIAN, A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. **Journal of Nutrition**, v.135, p.969-972, 2005.

SILVA, A.M.O. **Efeito dos compostos fenólicos presentes no alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre as enzimas antioxidantes e os parâmetros bioquímicos do sangue de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina**. São Paulo, 2008. 88p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

SOARES, D.; MARTHENDAL, G.; ZIMMERMANN, M.C.; ZENI, A.L.B. Estudo dos níveis lipídicos em ratos após tratamento com infusão de algumas plantas medicinais de uso popular. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.86, p.71-74, 2005.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, p.71-81, 2002.

SPANBROEK, R.; GRABNER, R.; LOTZER, K. Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, p.1238 -1243, 2003.

SPOSITO, A.C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F.A.H.; BERTOLAMI, M.C. IV Diretriz Brasileira Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.88, p.2-19, 2007.

STEPHENS, N.G.; PARSONS, A.; SCHOFIELD, P.M.; KELLY, F.; CHEESEMAN, K.; MITCHINSON, M.J. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). **Lancet**, v.347, p.781-786, 1996.

STOCKER, R.; KEANEY Jr., J.F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiological Reviews**, v.84, p.1381-1478, 2004.

SUDHAHAR, V.; KUMAR, S.A.; VARALAKSHMI, P. Role of lupeol and lupeol linoleate on lipemic-oxidative stress in experimental hypercholesterolemia. **Life Sciences**, v.78, p.1329-1335, 2006.

SWAIN, T.; HILLS, W.E. The phenolic constituents of *Punnus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.19, p.63-68, 1959.

TIROSH, O.; ARONIS, A. Lipid-induced death of macrophages: implication for destabilization of atherosclerotic plaques. In: PACKER, L.; SIES, H., eds. **Oxidative stress and inflammatory mechanisms in obesity, diabetes, and the metabolic syndrome**. Boca Raton, London: CRC Press, 2008. cap.16, p.251-260. (Oxidative stress and disease, 23).

TOUSOULIS, D.; ANDREOU, I.; ANTONIADES, C.; TENTOLOURIS, C.; STEFANADIS, C. Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: therapeutic implications for cardiovascular disease. **Atherosclerosis**, v.201, p.236-247, 2008.

TRONCOSO, N.; SIERRA, H.; CARVAJAL, L.; DELPIANO, P.; GUNTHER, G. Fast high performance liquid chromatography and ultraviolet-visible quantification of principal phenolic antioxidants in fresh rosemary. **Journal of Chromatography, A**, v.1100, p.20–25, 2005.

UPRITCHARD, J.E.; SCHUURMAN, C.R.W.C.; WIERSMA, A.; TIJBURG, L.B.M.; COOLEN, S.A.J.; RIJKEN, P.J.; WISEMAN, S.A. Spread supplemented with moderate doses of vitamin E and carotenoids reduces lipid peroxidation in healthy, nonsmoking adults. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.78, p.985-992, 2003.

VALENZUELA, A.; SANHUEZA, J.; NIETO, S. Cholesterol oxidation: health hazard and the role of antioxidants in prevention. **Biological Research**, v.36, p.291-302, 2003.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, p.1323-1338, 2007.

VIEJO, J.; GARCÍA-LINARES, M.C.; BASTIDA, S.; GARCÍA-ARIAS, M.T.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F.J. Effect of olive oil-fried sardine consumption on liver lipid composition and fatty acid cholesterol esterification in hypercholesterolemic rats. **Food Science and Technology International**, v.9, p.329–310, 2003.

VISAVADIYA, N.P.; NARASIMHACHARYA, A.V.R.L. Sesame as a hypocholesterolaemic and antioxidant dietary component. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.1889–1895, 2008.

WASSMANN, S.; WASSMANN, K.; NICKENIG, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. **Hypertension**, v.44, p.381-386, 2004.

WELCH, V.A.; BORLAK, J.T. Absorption and transport of dietary lipid. In: CHOW, C.K., ed. **Fatty acids in food and their health implications**. 3.ed. CRC Press, 2008. cap.22, p.561-590.

WELLWOOD, C.R.L.; COLE, R.A. Relevance of carnosic acid concentrations to the selection of rosemary, *Rosmarinus officinalis* (L.), accessions for optimization of antioxidant yield. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.6101-6107, 2004.

WIJERATNE, S.S.; CUPPETT, S.L. Potential of rosemary (*Rosemarinus officinalis* L.) diterpenes in preventing lipid hydroperoxide-mediated oxidative stress in Caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.1193-1199, 2007.

WIVIOTT, S.D.; CANNON, C.P. Update on lipid-lowering therapy and LDL cholesterol targets. **Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine**, v.3, p.424-436, 2006.

YAMAMOTO, J.; YAMADA, K.; NAEMURA, A.; YAMASHITA, T.; ARAI, R. Testing various herbs for antithrombotic effect. **Nutrition**, v.21, p.580-587, 2005.

YAZDANPARAST, R.; BAHRAMIKIA, S.; ARDESTANI, A. *Nasturtium officinale* reduces oxidative stress and enhances antioxidant capacity in hypercholesterolaemic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v.172, p.176-184, 2008.

YEH, C.; YEN, G. Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression. **Journal of Nutrition**, v.136, p.11-15, 2006.

YOKOYAMA, S. Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1529, p.231-244, 2000.

YOKOZAWA, T.; NAKAGAWA, T.; KITANI, K. Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.3549-3552, 2002.

YOKOZAWA, T.; CHO, E.J.; SASAKI, S.; SATOH, A.; OKAMOTO, T.; SEI, Y. The protective role of chinese prescription Kangen-karyu extract on diet-induced hypercholesterolemia in rats. **Biological e Pharmaceutical Bulletin**, v.29, p.760-765, 2006.

YUSUF, S.; DAGENAIS, G.; POGUE, J.; BOSCH, J.; SLEIGHT, P. Vitamin E, supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. **New England Journal of Medicine**, v.342, p.154-160, 2000.

ZHU, L.; LUO, X.; JIN, Z. Effect of resveratrol on serum and liver lipid profile and antioxidant activity in hyperlipidemia rats. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.21, p.890-895, 2008.

ANEXOS

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO


Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

Ofício CEEA nº 22 /2008

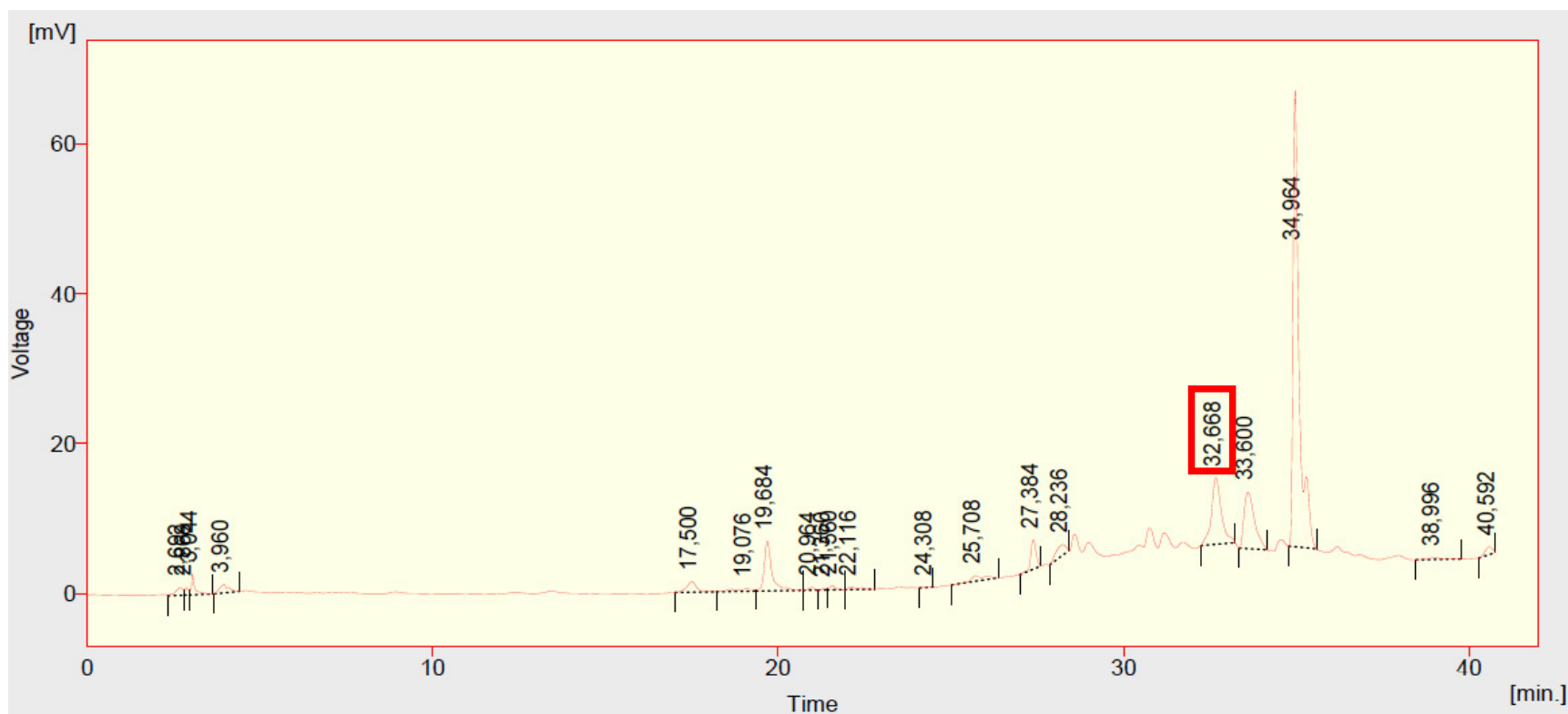
CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto “Avaliação do efeito do extrato aquoso e da fração fenólica do Alecrim (Rosmarinus officinalis L.) sobre o estado antioxidante e o perfil lipídico em ratos hipercolesterolêmicos” (Protocolo CEEA nº174), de responsabilidade da pesquisadora **Milessa da Silva Afonso** sob a orientação do Prof. Dr. Jorge Mancini Filho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) desta Faculdade, em 12/05/2008.*

São Paulo, 12 de maio de 2008.

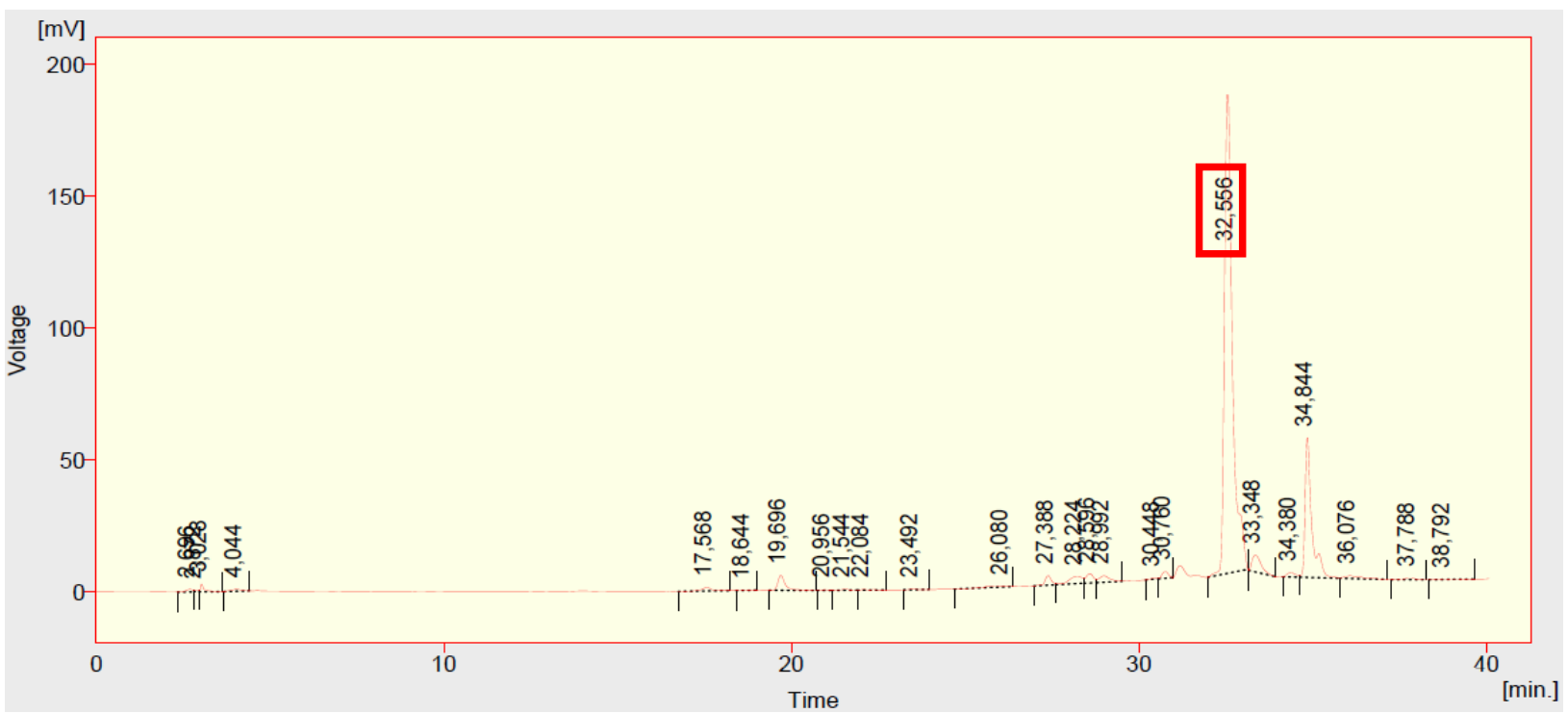

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA

ANEXO 2. Cromatograma da fração não esterificada do alicrim



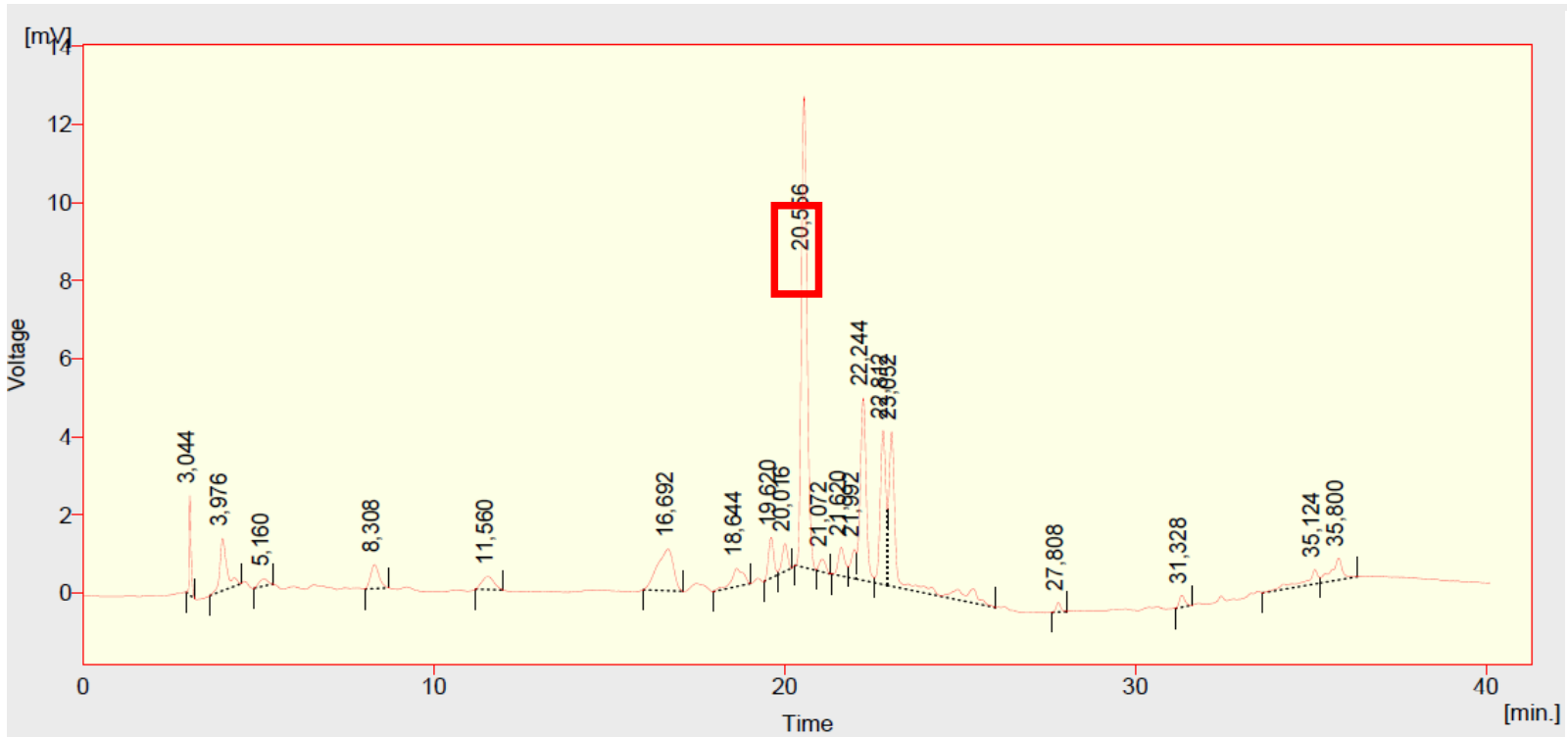
Em destaque encontra-se o ácido carnósico

ANEXO 3. Cromatograma da fração não esterificada do azeite com padrão ácido carnósico



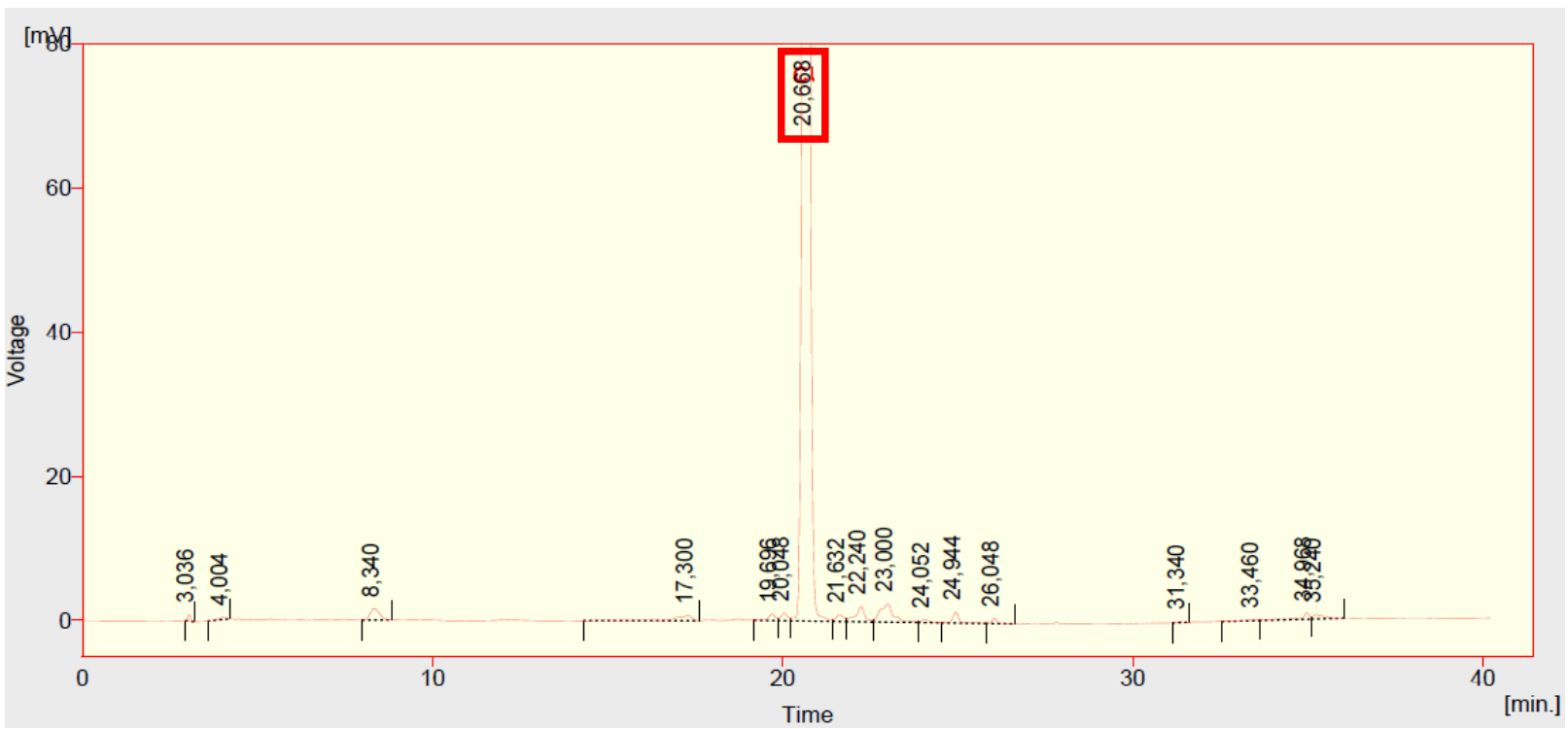
Em destaque encontra-se o ácido carnósico

ANEXO 4. Cromatograma do extrato aquoso de alecrim por cromatografia líquida de alta eficiência



Em destaque encontra-se o ácido rosmarínico

ANEXO 5. Cromatograma do extrato aquoso de alecrim com padrão ácido rosmarínico



Em destaque encontra-se o ácido rosmarínico

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)