

Ação Antioxidante de Extratos de Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em Filés de Peixes da Espécie Pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg).

Sant'Ana, Léa S.¹, Mancini- Filho, Jorge².

¹FCA/UNESP/Botucatu, SP, ²FCF/USP, São Paulo, SP.

RESUMO: A ação de extratos de plantas como antioxidantes é um assunto que tem despertado o interesse de inúmeros pesquisadores nos últimos anos, sendo as especiarias identificadas como produtos com alta concentração destas substâncias. Das especiarias, o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) é a mais estudada. O efeito protetor destes antioxidantes tem sido verificado através de evidências que populações com elevada ingestão destas substâncias têm menor incidência de doenças coronarianas. O objetivo deste trabalho foi verificar a ação antioxidante de uma oleoresina comercial de alecrim, Herbalox® adicionada a ração de peixes da espécie pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg). Os peixes receberam dietas isocalóricas e isoprotéicas, sendo que em dois grupos foi utilizado óleo de soja como fonte lipídica e em outros dois, óleo de milho. Para um grupo de cada fonte lipídica, foi adicionado extrato de alecrim Herbalox® e no outro (controle) não foi adicionado antioxidante. Os resultados demonstraram que adição de extratos de alecrim à ração protege os filés contra oxidação, sendo a composição em ácidos graxos dos filés uma função da fonte lipídica que também influenciou nesta proteção.

Palavras chave: Antioxidantes, oxidação lipídica, extrato de alecrim, pacu, *Rosmarinus officinalis* L., *Piaractus mesopotamicus* Holmberg.

ABSTRACT: Antioxidant Action of Rosemary Extract (*Rosmarinus officinalis* L.) in "Pacu" (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg) Fillets. The antioxidant effect of plant extract has been an interesting issue for many researchers in past few years. Spices have been identified as products with large amounts of antioxidants, and rosemary is one the most studied spice. Studies have shown evidences that population with high intake of these substances have less incidence of coronary heart disease. The objective of this work was verify the antioxidant action of the commercial rosemary oleoresin Herbalox® (used to feed the pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fish. The juveniles pacu were fed with isocaloric and isoproteic diets, for two groups the lipid source was soybean oil and for the another it was corn oil. For each group of the different lipid sources, rosemary extract Herbalox® (were added in one lot and on the other which was used as control. The results showed that the addition of rosemary extracts to the ration protected them against peroxidation, when compared with the control, the lipid source also have influence on these protection.

Key words: Antioxidants, lipid oxidation, rosemary extracts, fish pacu, *Rosmarinus officinalis* L., *Piaractus mesopotamicus* Holmberg.

INTRODUÇÃO

Espécies reativas de oxigênio são substâncias formadas durante o metabolismo do mesmo nos organismos vivos, podendo ser radicais livres e não radicais.

Os processos mediados por reações com espécies reativas, quando não equilibrados, são responsáveis por diversas doenças, tais como: doenças cardiovasculares, cerebrais, e câncer (Kehrer, 1993).

Nos últimos anos, evidências demonstram que variações da dieta, como redução do consumo de gordura e aumento no consumo de frutas, grãos e vegetais, podem prevenir ou retardar os efeitos deletérios da oxidação (Halliwell, 1994). Assim, estudos epidemiológicos têm demonstrado que populações com elevada ingestão de frutas e vegetais, como as populações mediterrâneas, apresentam uma baixa incidência destas doenças (Ulbricht & Southgate, 1991).

Embora não existam dados conclusivos, há forte evidência que a prevenção da oxidação

nestas populações se realize pela ação de antioxidantes. Algumas especiarias são utilizadas tanto como flavorizante de alimentos, como produtos medicinais e antissépticos, desde a era pré-histórica (Nakatani, 1992).

O interesse sobre a ação benéfica dos antioxidantes presentes nas especiarias, tanto para os organismos vivos como para os alimentos têm levado à realização de inúmeras pesquisas com estes produtos. No Quadro 1 estão apresentadas as principais especiarias com atividade antioxidante pesquisadas por diversos autores (Nakatani, 1992; Shahidi & Wanasundara, 1992; Nakatani, 1994; Madsen & Bertelsen, 1995).

Apesar da documentação científica sobre os efeitos antioxidantes de muitas especiarias, somente o alecrim ou mais precisamente, os extratos de alecrim são utilizados comercialmente (Madsen & Bertelsen, 1995).

Herbalox® é o nome comercial de extratos naturais de alecrim na forma de oleoresina obtido através de tecnologia patenteada pela empresa Kalsec, nos Estados Unidos, sendo efetivo na

Recebido para publicação em 22/03/99 e aceito para publicação em 01/07/99

estabilidade de óleos e gorduras para proteção contra rancificação e perda de cor de carnes (Kalsec, 1993). A atividade antioxidante do Herbalox® tem sido testada em vários sistemas alimentares, tais como: óleos vegetais (Palic & Dikanovic - Lucan, 1995), carne bovina (Wong et al, 1995), peixes (Boyd et al, 1993), comparando sua eficiência contra oxidação com os respectivos antioxidantes: BHA, tocoferol e TBHQ.

A ação antioxidante do Herbalox® se deve à presença de compostos fenólicos (Kalsec, 1993), sendo que a oleoresina comercialmente disponível padronizada para aplicações em alimentos é

comercializada como flavorizante, por isso é importante a retenção de um sabor mínimo nestes extratos (Six, 1994).

Nos Estados Unidos o alecrim é um aditivo GRAS (generally regarded as safe), sendo classificado como extrato flavorizante natural - 21 CFR, 182.10 (especiarias, temperos e flavorizantes) ou 182.20 (óleos essenciais, oleoresinas livre de solventes) (Six, 1994).

O objetivo deste trabalho foi verificar a ação antioxidante de extrato de alecrim Herbalox® em filés de pacu, que tiveram a adição do antioxidante na ração.

QUADRO 1 - Especiarias com atividade antioxidante

Família	Espécie	Nome comum	Parte da planta
Labiatae	<i>Origanum vulgare</i> L.	Orégano	Folhas
	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Alecrim	Folhas
	<i>Salvia officinalis</i> L.	Sálvia	Folhas
	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Tomilho	Folha
Solanaceae	<i>Capsicum frutescens</i> L.	Pimenta malagueta	Frutos
	<i>Capsicum annum</i> L.	Pimenta vermelha	Frutos
Zingiberaceae	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Gengibre	Rizomas
Pedaliaceae	<i>Sesamun indicum</i> L.	Gergelim	Semente
Laureaceae	<i>Cinnamomun zeylanicum</i> Nees	Canela	Casca de caule
Myrtaceae	<i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb.	Cravo da Índia	Flores

Fonte: Nakatani, 1992; Shahidi & Wanasundara, 1992; Nakatani, 1994, Madsen & Bertelsen, 1995.

MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi conduzido no Centro de Aquicultura da UNESP, localizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, no período de julho a setembro. O experimento teve duração de 9 semanas (63 dias).

Foram utilizados 80 alevinos da fase II de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg), com peso médio de $(0,20 \pm 0,04)$ kg, divididos em quatro grupos experimentais, com 20 peixes por grupo. Cada grupo foi colocado em um tanque provisório permanecendo em adaptação por 30 dias, recebendo neste período ração comercial (marca Nutremix) à vontade. Após este período, os alevinos receberam dietas isocalóricas e isoprotéicas, sendo que em 2 grupos foi utilizado óleo de soja como fonte lipídica e em outros 2, óleo de milho. Para cada fonte lipídica um grupo recebeu a adição de 1,4 g de extrato de alecrim Herbalox® / kg de ração e outro não recebeu a adição de antioxidantes (grupo controle).

No final das 9 semanas foi realizada a despesca, sendo os peixes abatidos, eviscerados, retiradas a pele e a cabeça, embalados individualmente em sacos plásticos com fecho hermético, de tamanho 18x23 cm, marca New Bag,

de fabricação da empresa Minasa. Os peixes foram então armazenados a -35°C

Parte de cada grupo experimental foi submetida a irradiação, à doses de 2 e 3 KGy, a uma taxa de 3 KGy/h. A irradiação foi feita com raios γ , fonte de Co - 60, sendo realizada na empresa EMBRARAD SA, São Paulo. Os peixes foram irradiados embalados e congelados e após 30 dias do abate, sendo então iniciadas as análises.

A oxidação foi avaliada pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB), com três amostras de cada grupo experimental (não irradiado, 2KGy e 3 KGy), em triplicata. As SRATB foram obtidas por extração com ácido tricloroacético, e os valores medidos por espectrofotometria a 532nm. Para transformação dos valores em μg MDA foi construída uma curva padrão com tetrametoxipropano (TMP), sendo os valores convertidos em MDA através da relação 1 g de TMP equivale a 0,439 g de MDA. O método utilizado foi o descrito por Wyncke (1970).

A gordura foi extraída com misturas de clorofórmio (Merck, pa, 99,8%): metanol (Merck, pa, 99%) como descrito pelo método de Folch et al (1957)

e a esterificação dos ácidos graxos pelo uso de cloreto de amônio, metanol e ácido sulfúrico como descrito pelo método de Hartman & Lago (1973). A composição em ácidos graxos dos músculos foi determinada por cromatografia gás-líquido, sendo os ésteres de ácidos graxos analisados em cromatógrafo CG-500, com coluna capilar de sílica fundida Carbowax-20M (modelo FJ-547), 25m x 0,25 mm de d.i.

As condições operacionais foram por programação de temperatura, sendo a temperatura inicial da coluna de 150°C, velocidade de aquecimento de 6°C/ minuto até a temperatura final de 230°C. As temperaturas do detector e do vaporizador foram de 250°C.

As análises de média e desvio padrão foram realizadas pelo Microsoft Excel, versão 5.0, da Microsoft Inc., enquanto as análises de variância, teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer foram realizados pela ANOVA, através do programa GraphPad InStat, versão 2.01, da GraphPad Software.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Para verificar o grau de oxidação das amostras, em função da irradiação, foi realizada a análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB), nos diferentes grupos experimentais e para as amostras não irradiadas e as irradiadas a 2 e 3 KGy. Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 - Avaliação dos níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico µg aldeído malônico/ g de peixe) nos diferentes tratamentos.

Tratamento	0 KGy	2 KGy	3 KGy	AV ¹
Soja controle	0,40 ± 0,05 ^a	0,68 ± 0,09 ^b	0,63 ± 0,09 ^b	*
Soja + Alecrim	0,14 ± 0,05 ^a	0,4 ± 0,1 ^b	0,46 ± 0,08 ^b	**
Milho controle	0,31 ± 0,03	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,1	ns
Milho + Alecrim	0,23 ± 0,06 ^a	0,53 ± 0,06 ^b	0,5 ± 0,2 ^b	*

Valores média (desvio padrão (n= 3). 1 AV = Análise de variância ns= não significativo, * significativo, ** muito significativo, *** extremamente significativo. q = 4,339 * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças no teste de Tukey-Kramer (p<0,05).

Hampson et al (1996) avaliaram as SRATB, para carne de diferentes espécies animais e demonstraram um aumento do níveis destas com o aumento da dose de irradiação.

Nas Tabelas 2 e 3 estão apresentadas a composição em ácidos graxos de filés de pacu não irradiados e irradiados à doses de 2 e 3 KGy

O cálculo dos valores das absorbâncias medidas na análise das SRATB (em g aldeído malônico/ g de peixe) foi realizada pela elaboração de curva padrão com tetrametoxipropano como descrito em material e métodos, cuja equação é $y = 0,168 \cdot x$ ($r = 0,9968$).

A análise dos resultados para as SRATB nos diferentes tratamentos demonstra que tanto para as amostras não irradiadas, como para as irradiadas a 2 e 3 KGy, filés provenientes de amostras que tiveram a adição de Herbalox® na dieta têm uma menor tendência a oxidação, quando comparadas com o grupo controle (Tabela 1).

Na literatura pesquisada não foram encontrados estudos que relacionassem a formação de SRATB, utilização de antioxidantes e radiação γ. Porém, alguns trabalhos avaliam a proteção oferecida por antioxidantes através da formação de SRATB (Palic & Dikanovic - Lucan, 1995, Wong et al, 1995, Boyd et al, 1993).

Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho com as SRATB foram também encontrados por Wong et al. (1995) que utilizaram um sistema modelo, constituído de carne bovina moída e adição de acetato de α-tocoferil, extratos de alecrim e sálvia Herbalox® - tipo O e sem adição de antioxidantes. Os autores verificaram que a melhor proteção é oferecida pelo tocoferol, seguido dos extratos de alecrim ou de sálvia, e que as amostras não adicionadas de antioxidantes têm maior tendência à oxidação.

e que receberam óleo de soja como fonte lipídica.

Os ácidos graxos identificados segundo o número de duplas ligações foram: saturados (C14:0, C16:0 e C18:0), monoinsaturados (C16:1 n-7 e C18:1 n-9) e polinsaturados (C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:3 n-6, C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:5 n-6 e C22:6 n-3).

TABELA 2 - Efeito da irradiação sobre a composição em ácidos graxos de filés de pacu alimentados com dieta à base de óleo de soja e alecrim.

Ácido graxo	0 KGy	2 KGy	3 KGy	A.V. ¹
AGS ²	33 ± 3	32 ± 1	32,1 ± 0,4	ns
AGMI ³	44 ± 2	43,3 ± 0,3	44,3 ± 0,6	ns
AGPI ⁴	23,6 ± 0,4 ^a	24,7 ± 0,7 ^b	23,6 ± 0,2 ^{a,b}	*
n9	38 ± 2	37,9 ± 0,3 ^a	39,6 ± 0,5 ^b	ns
6	21,1 ± 0,5 ^a	22,3 ± 0,4 ^b	21,7 ± 0,3 ^{a,b}	*
n3	2,5 ± 0,1 ^a	2,5 ± 0,3 ^a	1,9 ± 0,2 ^b	*
n3/n6	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,01	

Valores média (desvio padrão n=3. ¹ Análise de variância ns = não significativo, * p(0,05, ** p(0,01, *** p(0,001. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças no teste de Tukey-Kramer (p(0,05).

² AGS = C14:0, C16:0 e C18:0 ³ AGMI = C16:1 n-7 e C18:1 n-9 ⁴ AGPI = C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:3 n-6, C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:5 n-6 e C22:6 n-3.

TABELA 3 - Efeito da irradiação sobre a composição em ácidos graxos de filés de pacu alimentados com dieta controle à base de óleo de soja .

Ácido graxo	0 KGy	2 KGy	3 KGy	A.V. ¹
AGS	27,9 ± 0,1 ^a	33±3 ^b	30±1 ^{a,b}	*
AGMI	44,3±0,2 ^a	44±2 ^b	46±2 ^a	***
AGPI	27,8±0,1 ^a	23,6±0,4 ^b	24,2±0,5 ^b	***
n9	39,9±0,2	38±2	40±1	Ns
n6	25,4±0,1 ^a	21,1±0,5 ^b	22,3±0,5 ^c	***
n3	2,43±0,05 ^a	2,5±0,1 ^a	1,92±0,05 ^b	***
n3/n6	0,10±0,00	0,10±0,01	0,09±0,01	

Valores média (desvio padrão n=3. ¹ Análise de variância ns = não significativo, * p(0,05, ** p< 0,01, *** p(0,001. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças no teste de Tukey-Kramer (p(0,05).

² AGS = C14:0, C16:0 e C18:0 ³ AGMI = C16:1 n-7 e C18:1 n-9 ⁴ AGPI= C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:3 n-6, C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:5 n-6 e C22:6 n-3.

Os resultados mostram que, para o grupo controle, são observadas diferenças significativas para todas as classes de ácidos graxos e em relação as séries apenas a n-9 (ω9) não apresenta diferença significativa. Por outro lado, o grupo com adição de Herbalox® apenas os ácidos graxos polinsaturados (AGPI) apresentam diferenças significativas, sendo também observadas diferenças entre as série n-6 (ω6) e n-3 (ω3) nas diferentes doses de irradiação, porém em um nível menor de significância (p<0,05).

Nas Tabelas 4 e 5 estão apresentados os resultados para os grupos com óleo de milho como fonte lipídica. Os ácidos graxos identificados foram os mesmos que os das amostras com óleo de soja, exceto o ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3), que

não foi detectado em nenhuma amostra com óleo de milho. Diferença significativa é observada apenas para os ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) no grupo com adição de Herbalox®.

Na Tabela 5 pode-se verificar que não foram realizadas as análises para as amostras irradiadas a 3 KGy, isto se deveu a problemas técnicos, pois estas amostras foram perdidas.

Os resultados que comparam a duas fontes lipídicas sugerem que a proteção antioxidante depende do perfil de AGPI do alimento, sendo que a maior quantidade de AGPI nos filés de peixes que receberam a adição de óleo de soja na dieta os torna mais susceptíveis à oxidação, quando comparados com os filés de peixes com óleo de milho como fonte lipídica (Tabela 2 e 4).

TABELA 4 - Efeito da irradiação sobre a composição em ácidos graxos de filés de pacu alimentados com dieta à base de óleo de milho e alecrim.

Ácido graxo	0 KGy	2 KGy	3 KGy	A. V. ¹
AGS ²	30,9 ± 0,4	33,3 ± 0,5	33 ± 2	ns
AGM I ³	45,4 ± 0,4 a	44,2 ± 0,4 a	43,9 ± 0,7 b	*
AGPI ⁴	23,8 ± 0,3	22,5 ± 0,1	23 ± 1	ns
n9	40,2 ± 0,7	39,6 ± 0,4	39 ± 1	ns
n6	22,4 ± 0,3	21,2 ± 0,1	22 ± 1	ns
n3	1,4 ± 0,2	1,32 ± 0,03	1,38 ± 0,09	ns
n3/n6	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,0	ns

Valores média (desvio padrão, n=3. ¹ Análise de variância ns = não significativo, * p(0,05, ** p(0,01, *** p(0,001. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças no teste de Tukey-Kramer (p(0,05).

² AGS = C14:0, C16:0 e C18:0 ³ AGMI= C16:1 n-7 e C18:1 n-9 ⁴ AGPI = C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:3 n-6, C20:4 n-6, C22:5 n-6 e C22:6 n-3.

TABELA 5 - Efeito da irradiação sobre a composição em ácidos graxos de filés de pacu alimentados com dieta controle à base de óleo de milho.

Ácido graxo	0 KGy a	2 KGy b
AGS ²	33 ± 1	30,9 ± 0,1
AGMI ³	43,0 ± 0,4	46,50 ± 0,02
AGPI ⁴	24 ± 1	22,5 ± 0,1
n9	38,3 ± 0,3	41,30 ± 0,02
n6	22 ± 1	21,4 ± 0,1
n3	1,31 ± 0,04	1,15 ± 0,01
n3/n6	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01

Valores são média (desvio padrão a n=3 b n=1 (Média de 3 cromatogramas)

² AGS = C14:0, C16:0 e C18:0 ³ AGMI = C16:1 n-7 e C18:1 n-9 ⁴ AGPI = C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:3 n-6, C20:4 n-6, C22:5 n-6 e C22:6 n-3.

CONCLUSÃO

O extrato de alecrim Herbalox® protege filés de peixes da espécie pacu contra à oxidação, sendo que o grau de proteção depende do perfil de ácidos graxos dos filés, mostrando a importância da dieta nos processos oxidativos in vivo.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- BOYD, L.C., GREEN, D.P., GIESBRECHT, F.B., KING, M.F. Inhibition of oxidative rancidity in frozen cooked flakes by tert- butylhydroquinone and rosemary extract. **Journal of Science and Food Agricultural**, v. 61, p. 87-93, 1993.
- FOLCH, J., LEE, M., SLOANE STANLEY, G.H. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissue. **Journal Biological Chemistry**, v.226, p.497-509, 1957.
- HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet**, v. 334, p. 721-724, 1994.
- HAMPSON, J.W., FOX, J.B., LAKRITZ, L., THAYER, D.W. Effect of low dose gamma radiation on lipids in five different meats. **Meat Science**, v.42, n. 3, p.271-6, 1996.
- HARTMAN, L., LAGO, B.C.A. Rapid preparation of fatty, methyl esters from lipids. **Laboratory Practical**, v.22, p.457-77, 1973.
- KALSEC. **Our quality comes naturally**. Kalamazoo: Kalsec, 1993. 10p.
- KEHRER, J.P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Critical Reviews in Toxicology**, v.23, n. 1, p. 21-48, 1993.
- MADSEN, H.L., BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends of Food Science and Technology**, v.6, n.8, p.271-7, 1995.
- NAKATANI, N. Natural antioxidants from spices. In:HUANG, M.-T., HO, C.-T., LEE, C. Y.(Eds.). **Phenolic compounds and their effects on health II - Antioxidants and cancer prevention**. Washington: Americam Chemical Society, 1992. cap. 6, p. 73-86.
- NAKATANI, N. Chemistry of antioxidants from Labiatae herbs. In:HO, C.-T., OSAWA, T., HUANG, M.-T., ROSEN, R.T. (Eds.). **Food phytochemicals for cancer prevention II : teas, spices, and herbs**. Washington: Americam Chemical Society, 1994. cap. 16, p. 144-153.
- PALIC, A., DIKANOVIC - LUCAN, Z. Antioxidative effect of "Herbalox" on edible oils. **Fett Wissenschaft und Technologie**, v.97, n.10, p.379-81, 1995. SHAHIDI, F., WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.32, n.1, p.67-103, 1992.
- SIX, P. Current research in natural food antioxidants. **Inform (Champaign)**, v.5, n.6, p.679-88, 1994.
- ULBRICHT, T.L.V., SOUTHGATE, D.A. T. Coronary heart disease: seven dietary factors. **Lancet**, v. 338, p. 985-92, 1991.
- WONG, J.W., HASHIMOTO, K., SHIBAMOTO, T. Antioxidant activities of rosemary and sage extracts and vitamin E in a model meat system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 10, p.2707-12, 1995.
- WYNCKE, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette-Seifen Anstrichmittel**, v.72, n. 12, p.1084-7, 1970.