

## PERFIL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO AQUOSO DO COMPLEXO: *LINUM USITATISSIMUM L.*, *GANODERMA LUCIDUM* E *SALVIA HISPANICA L.*

### ANTIOXIDANT PROFILE OF AQUEOUS EXTRACT OF COMPLEX: *LINUM USITATISSIMUM L.*, *GANODERMA LUCIDUM* AND *SALVIA HISPANICA L.*

Isabella Aparecida HEINRICH<sup>2</sup>, Harli PASQUINI NETTO<sup>2</sup>, Francine Alessandra MANENTE<sup>2</sup>, Josiane Aparecida SCHEMBERGER<sup>2</sup>, Ana Flávia TOSTES<sup>2</sup>, Antonio Carlos Matar MUNHOZ<sup>3</sup>, Flávio Luis BELTRAME<sup>3</sup>, José Carlos Rebuglio VELLOSA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Autor para contato: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Laboratório de Análises Moleculares e Bioquímicas. Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG. Avenida Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brasil. E-mail: jo-sevellosa@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Laboratório de Análises Moleculares e Bioquímicas. Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG. Avenida Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica. Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG. Avenida Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brasil.

Data de recebimento: 20/02/2014

Data da aprovação: 30/07/2014

#### RESUMO

A busca por compostos naturais eficazes e não tóxicos, com atividade antioxidante, tem se tornado cada vez mais uma questão de interesse, já que promovem a manutenção da saúde. Neste trabalho, objetivou-se caracterizar o perfil bioquímico antioxidante do extrato aquoso do complexo comercial composto de uma mistura de *Linum usitatissimum L.*, *Ganoderma lucidum* e *Salvia hispânica L.* Avaliaram-se as capacidades da amostra como *scavenger* de radical ABTS<sup>+</sup>, radical DPPH<sup>·</sup>, radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> e HOCl, bem como o potencial protetor contra o radical AAPH<sup>·</sup> em eritrócitos, utilizando-se a quercetina como controle positivo. A amostra não apresentou ação significativa contra o radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> (controle: 0,498±0,015; 50µg/mL: 0,427±0,044) ou contra o ácido hipocloroso (controle: 0,406±0,008; 40µg/mL: 0,411±0,010). Frente ao radical DPPH<sup>·</sup> (controle: 0,508±0,003; 50µg/mL: 0,357±0,002) a amostra foi fraco agente antioxidante. Contra o radical ABTS<sup>+</sup> a amostra atuou como *scavenger* de forma concentração-dependente, com maior captura do radical quando testada na maior concentração do estudo (controle: 0,604±0,010; 50µg/mL: 0,770±0,004). A amostra, na maior concentração testada, não apresentou ação hemolítica, também não foi capaz de impedir o dano ao eritrócito provocado pelo radical AAPH<sup>·</sup>. O presente estudo evidenciou, portanto, que o extrato obtido a partir do produto comercializado como uma mistura dos produtos naturais em questão não apresenta a mesma propriedade antioxidante descrita em literatura para cada uma das amostras isoladamente.

**Palavras-chave:** *Linum usitatissimum L.* *Ganoderma lucidum.* *Salvia hispânica L.* Radicais livres. Antioxidantes.

#### ABSTRACT

The search for natural compounds effective and non toxic, with antioxidant activity, has become increasingly a matter of interest, since they promote the maintenance of health. This study aimed to characterize the biochemical profile of antioxidant extract

of commercial complex consisting of a mixture of *Linum usitatissimum* L., *Ganoderma lucidum* and *Salvia hispanica* L. It was evaluated the capacity of the sample as a scavenger of ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> and HOCl, as well as the potential protective against radical AAPH<sup>•</sup> erythrocytes, using quercetin as positive control. The sample showed no significant action against O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (control: 0,498±0,015; 50µg/mL: 0,427±0,044) or against hypochlorous acid (0,406±0,008; 40µg/mL: 0,411±0,010). Front DPPH<sup>•</sup> (control: 0,508±0,003; 50µg/mL: 0,357±0,002) the sample showed weak antioxidant activity. Against ABTS<sup>•+</sup> sample served as scavenger in a concentration-dependent, with higher radical capture when tested at the highest concentration of the study (control: 0,604±0,010; 50µg/mL: 0,770±0,004). The sample at the highest concentration tested, showed no hemolytic, but was not able to prevent damage to the erythrocyte induced by AAPH<sup>•</sup> radical. The present study evidenced, therefore, that the extract obtained from the product marketed as a mixture of natural products does not present the same antioxidant activity described in the literature for each of the samples singly.

**Keywords:** *Linum usitatissimum* L. *Ganoderma lucidum*. *Salvia hispanica* L. Free radicals. Antioxidants

## 1. Introdução

A influência dos radicais livres sobre o desenvolvimento de diversas doenças tem atraído a atenção de profissionais envolvidos com a saúde humana e estimulado o desenvolvimento de muitas pesquisas.

Os radicais livres são constantemente gerados em sistemas biológicos como subprodutos do metabolismo em um grande número de reações. Embora os organismos possuam defesa antioxidante e mecanismos de reparo que evoluíram para protegê-los contra danos oxidativos, estes sistemas são muitas vezes insuficientes. (SMINA et al., 2011).

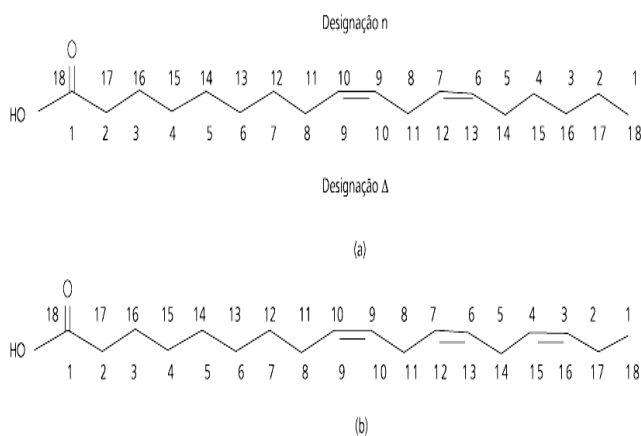
A deficiência na defesa antioxidante pode levar ao estresse oxidativo, que pode desencadear diversas doenças, incluindo aterosclerose (HARRISON et al., 2003), distúrbios neurais (BARNHAM et al., 2004), diabetes (WEI et al., 2009) e câncer (HALLIWELL, 2007). Portanto, o estresse oxidativo caracterizado pelo desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes causa danos ao organismo. (SIES et al., 1997).

Devido ao aumento da importância e demanda dos antioxidantes, a busca de compostos naturais eficazes e não tóxicos, com atividade antioxidante, tem se tornado cada vez mais uma questão de interesse, já que promovem a manutenção da saúde bem como a prevenção e cura de várias doenças. (SMINA et al., 2011).

Conhecida popularmente como linhaça ou linho, o *Linum usitatissimum* L. é uma planta pertencente

à família Linaceae (BASIRAN et al., 1987), originária da Ásia. O grão de linhaça é rico em ácidos graxos poli-insaturados  $\alpha$ -linolênico (ALA, 18:3n-3) e, em menor quantidade, linoleico (AL, 18:2n-6) (Figura 1). O ALA e o AL, depois de ingeridos, podem ser transformados em prostaglandinas e leucotrienos com atividades imunomoduladoras. (MARQUES et al., 2011).

**Figura 1.** Estruturas dos ácidos linoleico (a) e alfa-linolênico (b). Fonte: MARTIN et al., 2006



Segundo Molena-Fernandes et al. (2010), a linhaça se destaca por conter, além da grande quantidade de ácidos graxos essenciais, propriedades antioxidantes, como os compostos fenólicos e as lignanas.

A atividade antioxidante das lignanas na linhaça funcionaria inativando os radicais livres dos ácidos graxos e espécies reativas de oxigênio. Sendo

assim, a linhaça, por vincular conteúdos de lignanas (FAURÉ et al., 1990) e ômega 3 na composição, tem sido considerada alimento funcional de potente efeito antiaterogênico (MOLENA-FERNANDES et al., 2010).

Os fungos do gênero *Ganoderma* são populares cogumelos medicinais que têm sido amplamente utilizados na China, Japão e Coreia ao longo dos últimos dois milênios. A espécie com maior frequência em publicações de pesquisas sobre cultivo, análises químicas, farmacologia, efeitos de medicamento é o *Ganoderma lucidum*, da família Ganodermataceae. (SALTARELLI et al., 2009). Os principais constituintes químicos de *G. lucidum* são polissacarídeos, triterpenos, esteróis e algumas proteínas, com propriedades benéficas para a prevenção e tratamento de várias doenças. (Ibid.).

Estudos recentes mostram que os polissacarídeos são um dos principais componentes ativos de *G. lucidum* e exibem muitas atividades biológicas: antitumoral (WASSER et al., 2002), antioxidante (YUAN et al., 2005), hipoglicêmica, e efeitos imunostimulantes (HAN et al., 2006).

A *Salvia hispanica L.*, conhecida como chia, é uma planta herbácea anual que pertence à família Lamiaceae, sendo nativa do sul do México e do norte da Guatemala. A semente de chia é uma boa fonte de proteína e de fibra alimentar, além de seus compostos polifenólicos com atividade antioxidante. (CAPITANI et al., 2012). Esta semente pode ser usada como fonte de importantes antioxidantes naturais com aplicações comerciais. (REYES-CAUDILLO et al., 2008).

O teor de óleo das sementes varia de 25% a 35% e contém concentrações elevadas de ácidos graxos poli-insaturados. (TAGA et al., 1984). A ingestão da fibra dietética total (TDF) tem efeitos benéficos à saúde, como: redução da colesterolemia, alteração de respostas glicêmicas e insulinêmicas, mudanças na função intestinal e atividade antioxidante. (REYES-CAUDILLO et al., 2008).

Recentemente, segundo Taârit et al. (2012), foi demonstrado que o extrato de *Salvia* sp. é um dos antioxidantes mais ativos. Além disso, sementes de chia constituem uma fonte valiosa de óleo rico em ácidos graxos essenciais (linoleico e alfa-linolênico).

Com isto, objetivou-se neste trabalho caracterizar o perfil bioquímico antioxidante do extrato aquoso do complexo comercial denominado

“Linhaça Imperial”, composto de uma mistura de *Linum usitatissimum L.*, *Ganoderma lucidum* e *Salvia hispanica L.*, comercializado na forma de pó no Brasil.

## 2. Materiais e métodos

O complexo comercial composto de uma mistura de *Linum usitatissimum L.*, *Ganoderma lucidum* e *Salvia hispânica L.* foi comprado no comércio farmacêutico do município de Ponta Grossa, PR.

Todos os reagentes e solventes utilizados são analiticamente puros. Para a medida das absorvâncias, utilizou-se espectrofotômetro UV/Vis em sistema duplo feixe, com termostatização, marca Perkin Elmer - modelo Lambda 25.

### Preparo do extrato

O pó do complexo comercial (composto por *Linum usitatissimum L.*, *Ganoderma lucidum* e *Salvia hispanica L.*) foi pesado e submetido a um processo extrativo em que se utilizou como solvente água grau reagente tipo I, na proporção de 100 mL para cada 10 g de produto pesado. O material foi submetido a maceração por 2 h a 20 °C. Após extração a amostra foi submetida a uma filtração, a 20 °C, em filtro de papel qualitativo (J. Prolab). O eluente foi seco em liofilizador (Bucchi®) e armazenado em geladeira a 4 °C, até o momento de execução dos testes.

### Preparo das soluções para estudo das atividades

O extrato liofilizado foi pesado e dissolvido em água grau reagente tipo I para obter as concentrações de 1; 0,1 e 0,01 mg/ml para os ensaios antioxidantes.

Utilizou-se uma solução etanólica de quercetina (nas mesmas concentrações do extrato: 1; 0,1 e 0,01 mg/ml) como controle positivo, pois já é estabelecido que a quercetina é um flavonoide antioxidante. A quercetina pode inibir o processo de formação de radicais livres em três etapas diferentes: na iniciação (pela interação com íons superóxido), na formação de radicais hidroxil (por quelar íons de ferro) e na peroxidação lipídica (por reagir com radicais peroxi de lipídeos). (BEHLING et al., 2004).

### Ação scavenger sobre o radical ABTS<sup>+</sup> (Fluka)

Neste sistema avaliou-se a atividade sequestradora de radicais pelo extrato por meio do decréscimo

da absorvância em 734 nm, na presença do radical ABTS<sup>+</sup>. (PELLEGRINI et al., 1999).

#### **Ação scavenger sobre o radical DPPH**

A avaliação da ação sequestradora de radicais livres do extrato também foi feita por meio do decréscimo da absorvância da solução de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) 60 µM (Sigma –Aldrich) em 531nm. (SOARES et al., 1997).

#### **Atividade scavenger sobre o ácido hipocloroso**

As reações foram realizadas segundo Costa et al. (2004), com adaptações, em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4. Procedeu-se a uma incubação de 10 minutos do extrato com HOCl 30 µM e mais 5 minutos após adição de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) 2,8 mM (Sigma-Aldrich). A leitura das absorvâncias foi feita em 655 nm.

#### **Atividade scavenger sobre o ânion superóxido**

Neste ensaio o ânion superóxido foi gerado na reação do metassulfato de fenazina (Sigma-Aldrich) com a coenzima reduzida NADH (Sigma-Aldrich). O radical reagiu, então, com o NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*; Sigma-Aldrich), formando um cromóforo (formazana) cuja intensidade de cor foi medida em 560 nm. (KAKKAR et al., 1984).

#### **Atividade sobre a hemólise provocada por radicais livres**

Os testes foram realizados conforme protocolo de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, protocolo de nº 190.375. As hemácias utilizadas foram colhidas de voluntários sadios por meio de punção venosa do sangue periférico e separadas por centrifugação a 1.500 rpm por 10 minutos. Na sequência, efetuaram-se sucessivas lavagens em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4 contendo cloreto de sódio (NaCl) 150 mM, com o qual ajustou-se a concentração da suspensão (5%), e realizaram-se os ensaios. A ação dos extratos sobre os eritrócitos na ausência de radicais livres e sobre a hemólise promovida pelo radical AAPH 25mM (2,2'-azobis (2-amidinopropane dihydrochloride; Sigma-Aldrich) foi medida pela liberação de hemoglobina dos eritrócitos (VISSERS et al., 1998; YANG et al., 2006), após 5 horas de incubação a 37 °C. Realizaram-se centrifu-

gações (10 minutos – 2.500 rpm) após cada hora e o sobrenadante teve a absorvância lida em 414 nm.

#### **Análise estatística**

Os testes foram executados em triplicata. Os resultados obtidos estão apresentados como a média e desvio padrão (média ± DP) dos valores das absorvâncias obtidas experimentalmente. A análise estatística foi executada usando a análise monocaudal de variância (ANOVA) e ORIGIN® 8.0. Os valores de  $p < 0.05$  foram considerados significativos estatisticamente.

### **3. Resultados e discussão**

As atividades biológicas da linhaça (*Linum usitatissimum L.*) estão diretamente relacionadas com seus componentes, como compostos fenólicos e as lignanas (MOLENA-FERNANDES et al., 2010). A forte atividade antioxidante das lignanas (KITTS et al., 1999) pode sugerir um papel na proteção contra a peroxidação dos ácidos graxos altamente insaturados, que são abundantes na linhaça (HANO et al., 2006).

No cogumelo comestível *Ganoderma lucidum*, dentre seus principais componentes ativos estão os polissacarídeos. (FAN et al., 2012). Estes polissacarídeos possuem muitas atividades biológicas, incluindo a antioxidante. (LIU et al., 2010).

A semente de chia (*Salvia hispanica L.*) também apresenta muitas atividades biológicas, tais como a atividade antioxidante determinada por seus compostos polifenólicos. (JIMÉNEZ et al., 2010). Compostos polifenólicos possuem mais do que um mecanismo de ação de radicais livres e são capazes de suprimir as reações livres. Estes compostos também são capazes de atuar como antioxidantes pela capacidade de doar hidrogênio de seus grupos fenólicos. (REYES-CAUDILLO et al., 2008).

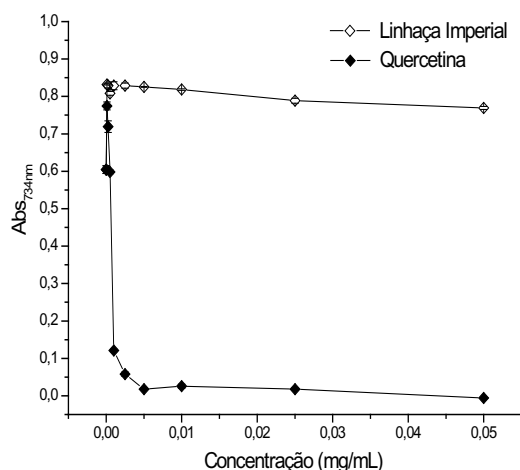
Pode-se observar na Figura 2 que contra o radical ABTS<sup>+</sup> o extrato de Linhaça Imperial atuou como *scavenger* de forma concentração-dependente, com maior captura do radical quando testada na maior concentração do estudo (controle: 0,604±0,010; 50µg/mL: 0,770±0,004). A solução etanólica de quercetina, por sua vez, demonstra grande eficiência como agente *scavenger* deste radical (controle: 0,604±0,010; 50µg/mL: -0,006±0,0006). As médias dos valores de absorvância obtidos nas distintas concentrações são



consideradas significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) tanto para o extrato de Linhaça Imperial quanto para a solução etanólica de quercetina.

O radical cátion  $ABTS^{*+}$ , de cor esverdeada, tem seus picos de absorção nos comprimentos de onda 630nm, 734 nm e 812 nm. (PELLEGRINI et al., 1999). O decréscimo da absorbância é diretamente proporcional à concentração e potencial antirradicalar de compostos presentes na amostra.

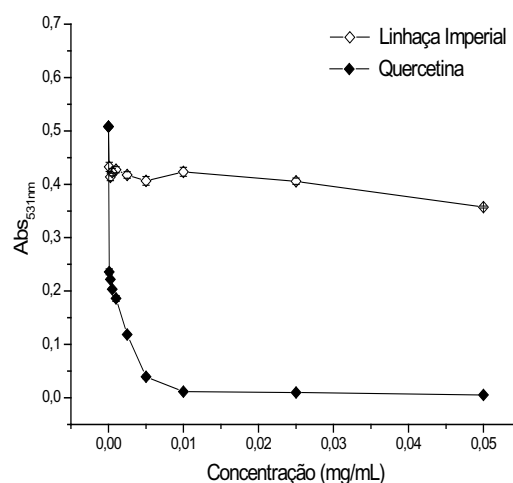
**Figura 2-** Ação *scavenger* do extrato aquoso da farinha de Linhaça Imperial (LI; composta por *Ganoderma lucidum*, linhaça dourada - *Linum usitatissimum* - e semente de chia - *Salvia* sp.) e da solução etanólica de quercetina sobre o radical  $ABTS^{*+}$  (55  $\mu$ M); fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4; incubação de 30 minutos (ausência de luz);  $\lambda = 734$ nm.



Os resultados da atividade das amostras sobre o  $DPPH^{\cdot}$  estão apresentados na Figura 3. Frente ao radical  $DPPH^{\cdot}$  o extrato de Linhaça Imperial foi fraco agente antioxidante (controle:  $0,508 \pm 0,003$ ;  $50 \mu\text{g/mL}$ :  $0,357 \pm 0,002$ ). A solução etanólica de quercetina mais uma vez demonstra grande eficiência na captura do radical. Podemos observar o conseqüente decréscimo da absorbância de acordo com o aumento da concentração da amostra (controle:  $0,508 \pm 0,003$ ;  $50 \mu\text{g/mL}$ :  $0,005 \pm 0,0006$ ). As médias dos valores de absorbância obtidos nas distintas concentrações são consideradas significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) tanto para o extrato de Linhaça Imperial quanto para a solução etanólica de quercetina.

A capacidade dos compostos em interagir com o radical livre  $DPPH^{\cdot}$  neutralizando-o foi analisada,

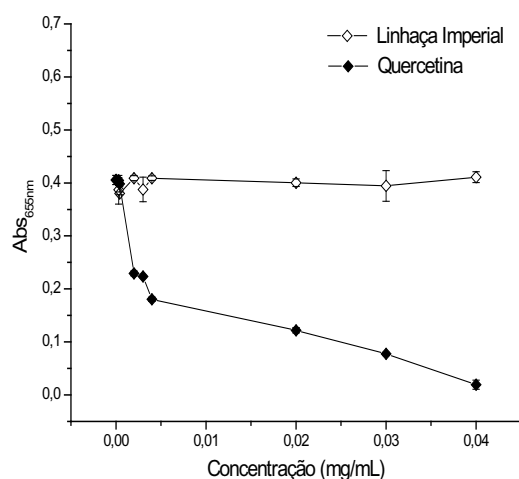
**Figura 3-** Ação *scavenger* do extrato aquoso da farinha de Linhaça Imperial (LI; composta por *Ganoderma lucidum*, linhaça dourada - *Linum usitatissimum* - e semente de chia - *Salvia* sp.) e da solução etanólica de quercetina sobre o radical  $DPPH^{\cdot}$  (60  $\mu$ M); incubação de 15 minutos (ausência de luz);  $\lambda = 531$  nm.



assim como no sistema com o radical  $ABTS^{*+}$ . Do mesmo modo, o decréscimo da absorbância foi diretamente proporcional à concentração e ao potencial antirradicalar de compostos presentes na amostra.

Na Figura 4 nota-se que o extrato de Linhaça Imperial não apresentou ação significativa contra o ácido hipocloroso (controle:  $0,406 \pm 0,008$ ;  $40 \mu\text{g/mL}$ :  $0,411 \pm 0,010$ ). Também se observa que a solução etanólica de quercetina apresenta ação diante do  $HOCl$  (controle:  $0,406 \pm 0,008$ ;  $40 \mu\text{g/mL}$ :  $0,02 \pm 0,009$ ). As médias dos valores de absorbância obtidos nas distintas concentrações são consideradas significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) para a solução etanólica de quercetina, mas não são consideradas significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) para o extrato de Linhaça Imperial.

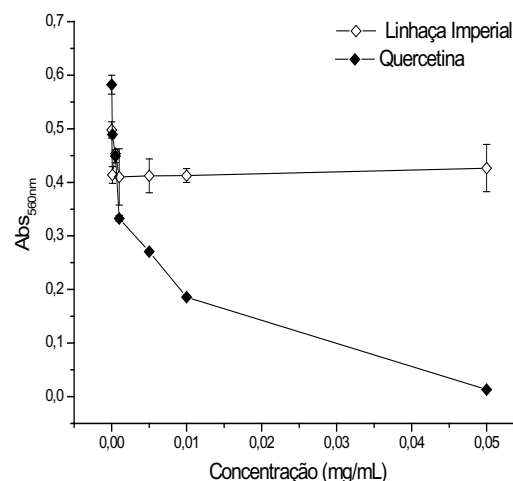
**Figura 4-** Ação *scavenger* do extrato aquoso da farinha de Linhaça Imperial (LI; composta por *Ganoderma lucidum*, linhaça dourada - *Linum usitatissimum* - e semente de chia - *Salvia* sp.) e da solução etanólica de quercetina sobre o HOCl (30  $\mu$ M); fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4; TMB 2,8 mM; incubação de 10 minutos do HOCl e revelação com TMB;  $\lambda = 655$  nm.



Segundo Alves et al. (2010), o ácido hipocloroso (HOCl) é um potente agente oxidante gerado nos neutrófilos pela reação de íons cloreto (Cl<sup>-</sup>) com peróxido de hidrogênio catalisado pela mieloperoxidase (MPO). Acredita-se que a produção de HOCl por este sistema constitui um importante mecanismo de defesa contra micro-organismos, entretanto, sua produção excessiva pode levar a danos nos tecidos, contribuindo para o desenvolvimento de doenças como aterosclerose e câncer.

Os resultados da atividade das amostras sobre o O<sub>2</sub><sup>-</sup> estão apresentados na Figura 5. O extrato de Linhaça Imperial não apresentou ação significativa contra o ânion superóxido (controle: 0,498±0,015; 50 $\mu$ g/mL: 0,427±0,044), já a solução etanólica de quercetina demonstra interação com o radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> (controle: 0,498±0,015; 50 $\mu$ g/mL: 0,002±0,003). As médias dos valores de absorbância obtidos nas distintas concentrações são consideradas significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) para a solução etanólica de quercetina, mas não são consideradas significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) para o extrato de Linhaça Imperial.

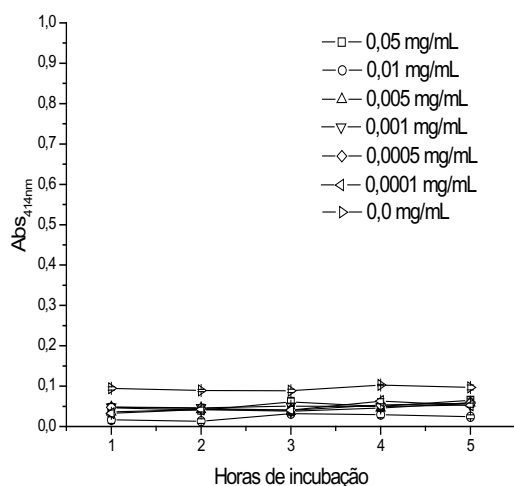
**Figura 5-** Ação *scavenger* do extrato aquoso da farinha de Linhaça Imperial (LI; composta por *Ganoderma lucidum*, linhaça dourada - *Linum usitatissimum* - e semente de chia - *Salvia* sp.) e da solução etanólica de quercetina sobre o O<sub>2</sub><sup>-</sup>; pirofosfato de sódio 25 mM, pH 8,3; NBT 45  $\mu$ M; PMS 9,3  $\mu$ M; NADH 78  $\mu$ M. Incubação de 2 minutos do sistema gerador de superóxido com as amostras na ausência de luz; adição de NADH e 10 minutos de incubação (ausência de luz);  $\lambda = 560$  nm.



O ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), formado a partir da reação entre metassulfato de fenazina (PMS) e NADH, tem sua revelação feita pelo azul de tetrazólio (NBT), gerando formazana, que, por sua vez, tem absorção máxima em 560 nm. A absorbância neste comprimento de onda é diretamente proporcional à quantidade de O<sub>2</sub><sup>-</sup> remanescente em solução. (KAKKAR et al., 1984).

A possibilidade de ação hemolítica das amostras pode ser analisada quando colocadas na presença de eritrócitos de pessoas saudáveis. Portanto, buscou-se avaliar se as amostras por si só apresentariam algum potencial citotóxico sobre os eritrócitos (Figuras 6 e 7). Elas foram avaliadas em diferentes concentrações na presença dos eritrócitos em diferentes tempos de incubação.

**Figura 6-** Ação hemolítica do extrato aquoso da farinha de Linhaça Imperial (LI; composta por *Ganoderma lucidum*, linhaça dourada - *Linum usitatissimum* - e semente de chia - *Salvia* SP) em suspensão de eritrócitos 5% na ausência de AAPH (25mM); 2 horas e meia de incubação; 37 °C; fosfato de sódio 10 mM/NaCl 150mM, pH 7,4;  $\lambda = 414$  nm



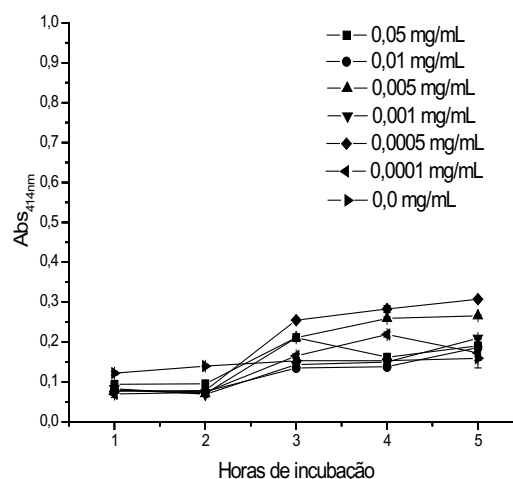
Conforme apresentado na Figura 6, o extrato, mesmo na maior concentração testada, não apresentou ação hemolítica, ou seja, não promoveu dano aos eritrócitos. As médias dos valores de absorbância obtidos nos tempos de 1, 2, 3, 4 e 5 h não são consideradas significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Da mesma forma, na Figura 7, a solução etanólica de quercetina por si só não apresenta dano aos eritrócitos. Observa-se certa hemólise somente à medida que se aumenta o tempo de incubação. As médias dos valores de absorbância obtidos nos tempos de 1, 2, 3, 4 e 5 h não são consideradas significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

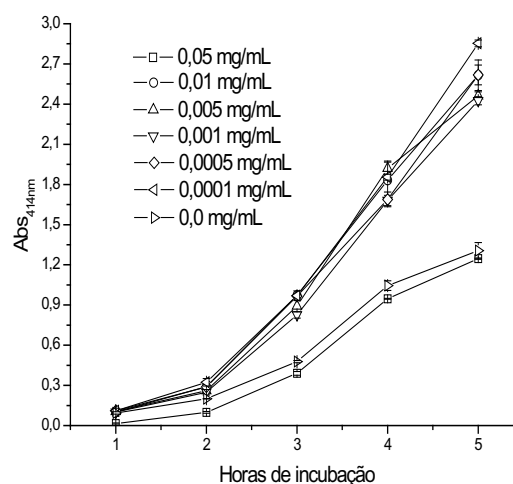
As hemácias, quando expostas apenas ao radical AAPH, sofrem lise e liberam hemoglobina, cuja absorbância é lida em 414 nm. O potencial protetor de eritrócitos e *scavenger* de radical livre pelas amostras foi estudado na presença de eritrócitos e radical AAPH, como se observa nas Figuras 8 e 9.

Na Figura 8, nota-se que o extrato de Linhaça Imperial não foi capaz de impedir o dano ao eritrócito provocado pelo radical AAPH, mesmo na maior concentração testada. As médias dos valores de absorbância obtidos nos tempos de 1, 2, 3, 4 e 5 h são consideradas significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

**Figura 7-** Ação hemolítica da solução etanólica de quercetina em suspensão de eritrócitos 5% na ausência de AAPH (25mM); 2 horas e meia de incubação; 37 °C; fosfato de sódio 10 mM/NaCl 150mM, pH 7,4;  $\lambda = 414$  nm



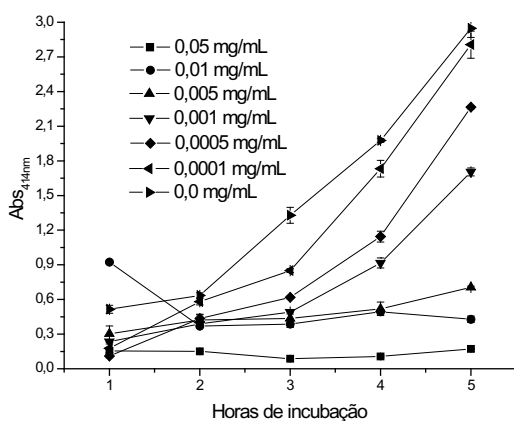
**Figura 8-** Ação de proteção antirradicalar do extrato aquoso da farinha de Linhaça Imperial (LI; composta por *Ganoderma lucidum*, linhaça dourada - *Linum usitatissimum* - e semente de chia - *Salvia* SP) em suspensão de eritrócitos 5% na presença de AAPH (25mM); 2 horas e meia de incubação; 37 °C; fosfato de sódio 10 mM/NaCl 150mM, pH 7,4;  $\lambda = 414$  nm



Já a ação de proteção antirradicalar da solução etanólica de quercetina é apresentada na Figura 9. Nota-se que a amostra, principalmente em suas maiores concentrações, foi capaz de impedir o dano

ao eritrócito provocado pelo radical AAPH. Com a diminuição da concentração da amostra, ocorre um decaimento no potencial protetor de eritrócitos e *scavenger* de radical livre. As médias dos valores de absorvância obtidos nos tempos de 1, 2, 3, 4 e 5 h são consideradas significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

**Figura 9** Ação de proteção antirradicalar da solução etanólica de quercetina em suspensão de eritrócitos 5% na presença de AAPH (25mM); 2 horas e meia de incubação; 37 °C; fosfato de sódio 10 mM/NaCl 150mM, pH 7,4;  $\lambda = 414$  nm



## Conclusões

Para as condições testadas no presente estudo, o extrato aquoso do complexo comercial de Linhaça Imperial (LI; composto por *Ganoderma lucidum*, linhaça dourada canadense - *Linum usitatissimum* L. - e semente de chia - *Salvia hispanica* L.) não apresentou um potencial *scavenger* contra os modelos testados. O presente estudo evidenciou, portanto, que o extrato obtido a partir do produto comercializado como uma mistura dos produtos naturais em questão não apresenta a mesma propriedade antioxidante descrita em literatura para cada uma das amostras isoladamente.

## Referências

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

BARNHAM, K. J.; MASTERS, C. L.; BUSH, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 205-214, 2004.

BASIRAN, N.; ARMITAGE, P.; SCOTT, R. J.; DRAPER, J. Genetic transformation of flax (*Linum usitatissimum*) by *A. grobacterium tumefaciens*: Regeneration of transformed shoots via a callus phase. **Plant Cell Reports**, v. 6, n. 5, p. 396-399, 1987.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

CAPITANI, M. I.; SPOTORNO, V.; NOLASCO, S. M.; TOMÁS, M. C. Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. **LWT - Food Science and Technology**, v.45, p.94-102, 2012.

COSTA, M.; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M. Hypochlorous Acid Inhibition by Acetoacetate: Implications on Neutrophil Functions. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 8, p. 1183-1187, 2004.

FAN, L.; LI, J.; DENG, K.; AI, L. Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1849-1854, 2012.

FAURÉ, M.; LISSI, E.; TORRES, R.; VIDELA, L. Antioxidant activities of lignans and flavonoids. **Phytochemistry**, v. 29, n. 12, p. 3773-3775, 1990.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? **Biochemical Journal**, v. 401, p. 1-11, 2007.

HAN, H.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M. Protective effects of an acidic polysaccharide isolated from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* against murine hepatic injury induced by *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide. **Journal of Natural Medicines**, v. 60, n. 4, p. 295-302, 2006.

HANO, C.; MARTIN, I.; FLINIAUX, O.; LEGRAND, B.; GUTIERREZ, L.; ARROO, R. R. J.; MESNARD, F.; LAMBLIN, F.; LAINÉ, E. Pinoresinol-lariciresinol reductase gene expression and secoisolariciresinol diglucoside accumulation in developing flax (*Linum usitatissimum*) seeds. **Planta**, v. 224, n. 6, p. 1291-1301, 2006.

HARRISON, D.; GRIENGLING, K. K.; LANDMESSER, U.; HORNING, B.; DREXLER, H. Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. **The American Journal of Cardiology**, v. 91, n. 3, p. 7-8, 2003.

JIMÉNEZ, F. E. G.; BELTRÁN-OROZCO, M. C.; MARTÍNEZ, M. G. V. The antioxidant capacity and phenolic content of chia's (*Salvia hispanica* L.) integral seed and oil. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 315, 2010.



- KAKKAR, P.; DAS, B.; VISWANATHAN, P. N. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. **Journal of Biochemical and Biophysics Methods**, v. 21, p. 130-132, 1984.
- KITTS, D. D.; YUAN, Y. V.; WIJEWICKREME, A. N.; THOMPSON, L. U. Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 202, n. 1- 2, p. 91- 100, 1999.
- LIU, W.; WANG, H.; PANG, X.; YAO, W.; GAO, X. Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 4, p. 451-457, 2010.
- MARQUES, A. C.; HAUTRIVE, T. P.; MOURA, G. B.; CALLEGARO, M. G. K.; HECKTHEUER, L. H. R. Efeito da linhaça (*Linum usitatissimum L.*) sob diferentes formas de preparo na resposta biológica em ratos. **Revista de Nutrição**, v. 24, p. 131-141, 2011.
- MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 19, p. 761-770, 2006.
- MOLENA-FERNANDES, C.A.; SCHIMIDT, G.; NETO-OLIVEIRA, E.R.; BERSANI-AMADO, C.A.; CUMAN, R.K.N. Avaliação dos efeitos da suplementação com farinha de linhaça (*Linum usitatissimum L.*) marrom e dourada sobre o perfil lipídico e a evolução ponderal em ratos Wistar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, p.201-207, 2010.
- PELLEGRINI, N.; RE, R.; YANG, M.; EVANS, C.R. Screening of dietary Carotenoids and Carotenoid-Rich Fruit Extracts for Antioxidant Activities Applying 2,2'-Azinobis (3-ethylenebenzothiazoline-6 sulfonic acid Radical Cation Decolorization Assay. **Methods Enzymology**, v.299, p.379-389, 1999.
- REYES-CAUDILLO, E.; TECANTE, A.; VALDIVIA-LO'PEZ, M. A. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica L.*) seeds. **Food Chemistry**, v. 107, p. 656-663, 2008.
- SALTARELLI, R.; CECCAROLI, P.; LOTTI, M.; ZAMBONELLI, A.; BUFFALINI, M.; CASADEI, L.; VALLORANI, L.; STOCCHI, V. Biochemical characterisation and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma lucidum* from Central Italy. **Food Chemistry**, v. 116, p. 143-151, 2009.
- SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 291-295, 1997.
- SMINA, T. P.; MATHEW, J.; JANARDHANAN, K. K.; DEVASAGAYAM, T. P. A. Antioxidant activity and toxicity profile of total triterpenes isolated from *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst occurring in South India. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 438-446, 2011.
- SOARES, J. R.; DINIS, T. C.; CUNHA, A. P.; ALMEIDA, L. M. Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. **Free Radical Research**, v. 26, p. 469-478, 1997.
- TAÂRIT, M. B.; MSAADA, K.; HOSNI, K.; MARZOUK, B. Fatty acids, phenolic changes and antioxidant activity of clary sage (*Salvia sclarea L.*) rosette leaves grown under saline conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 58-63, 2012.
- TAGA, M. S.; MILLER, E. E.; PRATT, D. E. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, n. 5, p. 928-931, 1984.
- VISSERS, M.C.M., CARR, A.C., CHAPMAN, A.L.P. Comparison of human red cell lysis by hypochlorous and hypobromous acids: insights into the mechanism of lysis. **The Biochemical Journal**, v. 330, p. 131-138, 1998.
- WASSER, S. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 258- 274, 2002.
- WEI, W.; LIU, Q.; TAN, Y.; LIU, L.; LI, X.; CAI, L. Oxidative Stress, Diabetes, and Diabetic Complications. **Hemoglobin**, v. 33, n. 5, p. 370- 377, 2009.
- YANG, H.L., CHEN, S.C., CHANG, N.W., CHANG, J.M., LEE, M.L., TSAI, P.C., FU, H.H., KAO, W.W., CHIANG, H.C., WANG, H.H., HSEU, Y.C. Protection from oxidative damage using *Bidens pilosa* extracts in normal human erythrocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p. 1513-1521, 2006.
- YUAN, H.; ZHANG, W.; LI, X.; LÜ, X.; LI, N.; GAO, X.; SONG, J. Preparation and in vitro antioxidant activity of  $\kappa$ -carrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 4, p. 685-692, 2005.