



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DEUSA DO SOCORRO TEIXEIRA COSTA LEITÃO

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA
CHICÓRIA (*Eryngium foetidum* L.) POR MÉTODOS QUÍMICOS (*in
vitro*).**

BELÉM – PA

2022

DEUSA DO SOCORRO TEIXEIRA COSTA LEITÃO

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA
CHICÓRIA (*Eryngium foetidum* L.) POR MÉTODOS QUÍMICOS (*in
vitro*).**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade
Federal do Pará como requisito para obtenção do título
de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Santos Lopes

Coorientador: Prof. Dr. Renan Campos Chisté

BELÉM – PA

2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

T266p Teixeira Costa Leitão, Deusa do Socorro.
POTENCIAL antioxidante de compostos bioativos da Chicória
(*Eryngium foetidum* L.) por métodos químicos (in vitro). / Deusa
do Socorro Teixeira Costa Leitão. — 2022.
120 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^ª. Dra. Alessandra Lopes
Coorientador(a): Prof. Dr. Renan Campos Chisté
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de
Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos, Belém, 2022.

1. Antioxidantes . 2. Compostos bioativos. 3. Solventes
verdes. 4. Espécies reativas de oxigênio. 5. Espécies reativas
de nitrogênio. I. Título.

CDD 664.022

DEUSA DO SOCORRO TEIXEIRA COSTA LEITÃO

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA CHICÓRIA
(Eryngium foetidum L.) POR MÉTODOS QUÍMICOS (in vitro).

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade
Federal do Pará como requisito para obtenção do título
de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Santos Lopes

Coorientador: Prof. Dr. Renan Campos Chisté

Avaliada em. ____/____/____ Conceito: _____

BANCA EXAMINADORA

<hr/> Prof^a. Dr^a. Alessandra Santos Lopes Orientadora PPGCTA/ITEC/UFPA	<hr/> Prof. Dr. Renan Campos Chisté Coorientador PPGCTA/ITEC/UFPA
<hr/> Prof^a. Dr^a. Luiza Helena da Silva Martins Membro Interno PPGCTA/ITEC/UFPA	<hr/> Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior Membro Interno PPGCTA/ITEC/UFPA
<hr/> Prof^a. Dr^a. Carolina Vieira Bezerra Membro Externo FANUT/ICS/UFPA	<hr/> Prof^a. Dr^a. Laura Figueiredo Abeu Membro Externo EMBRAPA/CPATU
<hr/> Prof^a. Dr. Gustavo Araujo Pereira Membro Interno PPGCTA/ITEC/UFPA	<hr/> Prof^a. Dr^a. Geormenny Rocha dos Santos Membro Externo FEA/ITC/UFPA

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

“Só Deus faz as coisas certas logo da primeira vez”

Stephen King

Dedico este trabalho a maior riqueza que recebi de Deus na vida: meus filhos Vinícius, Lorenzo e Vitória Leitão, que embora não tivessem conhecimento disto, iluminaram de maneira especial os meus pensamentos me levando a buscar mais conhecimentos, e principalmente pelo amor e carinho que me dispensaram mesmo em minhas horas de estresse. Ao meu esposo, Lindolfo Leitão, que de forma especial sempre esteve ao meu lado me incentivando, me apoiando e me ajudando sempre quando precisei. À minha querida e adorada mãe Sodrelia Teixeira, a quem eu agradeço sempre pela minha existência, por suas palavras de incentivo e principalmente por sua luta diária para que eu pudesse um dia ter acesso a educação.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e graça concedida, por me fortalecer quando me sentia fraca, por me dar esperança e confiança, por iluminar meus passos durante esta caminhada, assim como em tudo que já realizei até aqui, o que seria de mim sem a fé que tenho nele. Obrigada de todo coração, pois NUNCA FOI SORTE, SEMPRE FOI DEUS;

Ao meu amado esposo-amigo Lindolfo Leitão, por todo seu apoio, companheirismo, carinho e paciência. Por inúmeras vezes ser pai e mãe dos nossos filhos para suprir minha ausência ao longo deste trabalho;

À minha amada e querida Prof^a. Dr^a. Alessandra Santos Lopes, obrigada por aceitar ser minha orientadora, por confiar e acreditar em mim, por fazer parte da minha vida, pelo apoio, convivência e aprendizado, pelos conselhos e compreensão nas horas difíceis, serei eternamente grata, por tudo que fez por mim. Você é uma pessoa muito especial;

Ao professor Dr Renan Campos Chisté, um agradecimento especial. Obrigada por aceitar o desafio de ser meu coorientador neste trabalho. És uma pessoa muito especial na minha vida e que vou guardar com todo carinho e admiração no meu coração. Só tenho a agradecer por tudo que fez para meu crescimento profissional e pessoal e agradecer por sua paciência, carinho, incentivo, e, principalmente por depositar sua confiança em mim e acreditar que eu poderia ser capaz até mesmo quando nem eu acreditava. Obrigada por tudo que fez, você é um exemplo a ser seguido;

À Prof^a. Dr^a. Adriana Z. Mercadante por permitir a realização de parte das análises fundamentais desde trabalho;

À minha amiga Francilia Campos de Siqueira, pela ajuda, companheirismo, força, incentivo e puxões de orelha nas várias horas de estudo e trabalho, sem você provavelmente isso não seria possível. Agradeço a você por tudo, mas agradeço principalmente a Deus por ter colocado você nessa minha trajetória de vida, sinto que fui muito abençoada quando tracei com ele este plano lá em cima;

Ao meu amigo Gilson Chagas Junior, pela paciência, pelo carinho e por estar sempre disposto a ajudar. Obrigada também pela formatação deste trabalho;

Aos amigos Railson e Kaleb, pela ajuda incondicional na realização das infinitas análises feitas neste trabalho, pelo carinho, dedicação, paciência e responsabilidade. A ajuda de vocês foi fundamental para este trabalho;

À amiga Mayara Galvão e Daniela Gaspar pela ajuda e companheirismo, por estarem presentes na alegria e nas angústias ao longo deste trabalho, bem como pelo incentivo e principalmente pela amizade;

À Ana Paula Barbosa, amada e carinhosa amiga, obrigada pelas conversas, pelo apoio, e pelas noites divididas na execução de parte das análises. Realmente nosso trio é o melhor!

Ao colega Paulo Chada pela amizade e tradução do primeiro artigo publicado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de minha bolsa de estudos;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA/UFGA) por oportunizar a realização deste trabalho e contribuir para meu desenvolvimento profissional;

Aos membros da banca examinadora, titulares e suplentes, pelas correções e sugestões que contribuíram para a melhoria da qualidade científica deste trabalho;

À Prof^a. Dr^a. Luiza Helena Martins pelos conselhos, apoio e pelos momentos de descontração;

Ao meu amigo prof^o Dr. Vladimir de Araújo Távora pela confiança, conselhos, apoio e pelos momentos de descontração;

Aos amigos do LABIOTEC, pelas experiências trocadas, pela ajuda e colaboração;

Agradeço aos demais professores do Curso, colegas e funcionários do Laboratório de Tecnologia de alimentos (LTA), LAMEF, LAPOA e aos outros integrantes destes laboratórios, pelo apoio na execução de parte das análises e por deixarem essa trajetória mais leve e por me ajudarem a alcançar os meus objetivos;

Ao Laboratório de Citogenética Humana, em especial a Lorena Cunha e Ingrid Ramos, cuja boa vontade, ajuda e amizade foi fundamental para realização de parte das análises realizadas neste trabalho;

Ao Laboratório de Óleos da Amazônia – PPGQ/UFGA, em especial a Ruth Bezerra, por se propor a ajudar em todas as etapas do processo de liofilização das amostras.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Que Deus nos abençoe.

Meus sinceros agradecimentos.

Deusa do Socorro Teixeira Costa Leitão

RESUMO GERAL

A chicória (*Eryngium foetidum* L.), planta nativa da região Amazônica e América Central, é uma das principais hortaliças não convencionais (PANCs) cultivadas no Brasil, e considerada uma fonte promissora de compostos bioativos. O objetivo deste trabalho consistiu na determinação da composição de compostos fenólicos e carotenoides nas folhas de chicória utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (HPLC-DAD-MS/MS), bem como a avaliação do potencial antioxidante *in vitro* contra espécies reativas de importância fisiológica e alimentícia. As folhas de chicória apresentaram elevados teores de água (87 %), baixos teores de lipídios (2,8 %), proteínas (1,99%) e baixo valor energético total (52,23 kcal/100 g). Os principais compostos fenólicos identificados nas folhas foram o ácido clorogênico (4328 µg/g), seguido por um derivado do ácido ferrúlico (3892 µg/g). Os principais carotenoides identificados foram a luteína (205 µg/g) seguido pelo β-caroteno (161 µg/g). Em relação à avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*, o extrato hidrometanólico das folhas de chicória foi capaz de eliminar o radical DPPH• (91,6% a 5 mg/mL), ABTS•⁺ (15,77 µM Trolox equivalente/g de extrato) e exibiu alta eficiência para proteger o triptofano contra o oxigênio singlete (¹O₂) de forma dependente da concentração (IC₅₀ = 343 µg/mL). No âmbito deste trabalho, procedeu-se ainda a obtenção de extratos de folhas de chicória utilizando solventes verdes com diferentes polaridades [H₂O, EtOH/H₂O, EtOH (1:1, v/v)], através de extração assistida por ultrassom. A capacidade antioxidante na desativação de diferentes espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) foi avaliada, nomeadamente o radical ânion superóxido (O₂⁻), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o ácido hipocloroso (HOCl), e o ânion peroxinitrito (ONOO⁻). Os extratos obtidos com EtOH/H₂O apresentou o maior teor de compostos fenólicos (5781,00 mg/g extrato), sendo o ácido clorogênico o composto majoritário (38%). Todos os extratos foram eficientes na eliminação de todas as ROS e RNS testadas de maneira dependente da concentração. O extrato EtOH/H₂O foi o mais eficaz (IC₅₀ 45.00 – 1000 µg/mL) para quase todas as espécies, exceto para o ¹O₂. Em relação à desativação do ROO•, o extrato mais eficiente foi o EtOH. Com base nos resultados deste estudo, os solventes verdes testados mostraram-se promissores para a obtenção de extratos de folhas de chicória com alto teor de compostos bioativos e capacidade antioxidante. Portanto, tais informações possuem grande relevância para as indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, uma vez que a chicória é uma fonte natural

rica em compostos bioativos para serem usados como potencial matéria-prima para obtenção de extratos contra os danos oxidativos em alimentos ou sistemas fisiológicos.

Palavras-chave: Antioxidantes; Compostos bioativos; Solventes verdes; ROS; RNS.

ABSTRACT

Amazonian chicory (*Eryngium foetidum* L.), a native plant to the Amazon and Central America, is one of the main unconventional vegetables (PANCs) grown in Brazil and considered as a promising source of bioactive compounds. The main objective of this work was to determine the composition of phenolic compounds and carotenoids in amazonian chicory leaves using high performance liquid chromatography coupled to diode array detectors and mass spectrometer (HPLC-DAD-MS /MS), as well as the evaluation of the *in vitro* antioxidant potential. The leaves of Amazonian chicory presented high contents of water (87%), low contents of lipids (2.8%), proteins (1.99%) and low total energy value (52.23 kcal/100 g). The main phenolic compounds in the leaves were chlorogenic acid (4328 µg/g), followed by ferrulic acid derivative (3892 µg/g), while the main carotenoids were lutein (204.86 µg/g), followed by β-carotene (161 µg/g leaves). Regarding the evaluation of the *in vitro* antioxidant capacity, the hydromethanolic extract of Amazonian chicory leaves was able to eliminate DPPH• (91.6%, at 5 mg/mL), ABTS•⁺ (15.77 µM Trolox equivalent/g of extract) and exhibited high efficiency to protect tryptophan against ¹O₂ in a concentration-dependent manner (IC₅₀ = 343 µg/mL). Furthermore, Amazonian chicory leaf extracts were obtained using green solvents with different polarities [H₂O, EtOH/H₂O, EtOH (1:1, v/v)], through ultrasound-assisted extraction. The scavenging capacity of the extracts against the main reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species was evaluated, namely the superoxide anion radical (O₂^{•-}), hydrogen peroxide (H₂O₂), hypochlorous acid (HOCl), and the peroxynitrite anion (ONOO⁻). The EtOH/H₂O extract presented the highest phenolic compound contents (5781.00 mg/g extract) and the highest scavenging efficiency, being chlorogenic acid the major compound (38%). All the extracts were efficient in scavenging all the tested ROS and RNS in a concentration-dependent manner. The EtOH/H₂O extract was the most effective (IC₅₀ of 45.00 – 1000 µg/mL) for almost all species, with the exception of ¹O₂. Regarding ROO[•]-scavenging capacity, the most efficient extract was EtOH. Based on the results of this study, the green solvents used in this study were promising for obtaining amazonian chicory leaf extracts with a high content of bioactive compounds and antioxidant capacity. Therefore, such information have great relevance for the food, cosmetic and pharmaceutical industries, since amazonian chicory is a natural rich source of bioactive compounds to be used as potential raw material for obtaining extracts against oxidative damage both in food and physiological systems.

Keywords: Antioxidants; Bioactive Compounds; Green Solvents; ROS;RNS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1 – Revisão da Literatura

Figura 1 – *Eryngium foetidum* L. Cultivada em Santa Izabel – Comunidade João Novo (Belém, PA, Brasil) 26

Figura 2 – Estruturas químicas dos compostos fenólicos identificados nas folhas de chicória por HPLC-DAD 31

Figura 3 – Estrutura dos carotenoides identificados em folhas de chicória por HPLC-DAD 33

Figura 4 – Inter-relações entre as formações de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio 34

Figura 5 – Mecanismos de ação de agentes antioxidantes 36

Capítulo 2 – Artigo 1: “*Amazonian Eryngium foetidum leaves exhibited very high contents of bioactive compounds and high singlet oxygen quenching capacity*”

Figure 1 – HPLC-DAD chromatogram of the carotenoids of Amazonian *Eryngium foetidum* L. leaves 58

Figure 2 – HPLC-DAD chromatogram of phenolic compounds of *Eryngium foetidum* L. leaves 63

Figure 3 – (a) Decay of the intensity of the absorbance of tryptophan in the presence of the methylene blue and extract of the *Eryngium foetidum* L. leaves and (b) percentage of inhibition of the $^1\text{O}_2$ as a function of the concentration of the extract of the *Eryngium foetidum* L. leaves 68

Capítulo 3 – Artigo 1: “*Extratos liofilizados de folhas de Eryngium foetidum da Amazônia com alto teor de ácido clorogênico, obtidos com solventes verdes, são eficientes sequestradores de ROS/RNS para futuras aplicações como antioxidantes naturais*”

Figura 1 – Cromatograma HPLC-DAD de compostos fenólicos do extrato de folhas de *Eryngium foetidum* L. Condições cromatográficas: ver texto. A caracterização dos picos é dada na Tabela 1. Identificação do pico: 1: Ácido clorogênico; 2: Ácido Feruloylquinico; 3: Quercetina glucuronide; 4: Luteolina hexoside; 5: Luteolina glucuronide; 6: Ácido ferrúlico derivativo 85

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 2** – Capacidade de desativação das folhas de *Eryngium foetidum* L contra o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Cada ponto mostra as barras de erro padrão e representa os valores obtidos de quatro experimentos independentes, em cinco concentrações 90
- Figura 3** – Capacidade de desativação dos extratos liofilizados das folhas de *Eryngium foetidum* L contra o peroxinitrito (ONOO^-) na ausência (esquerda) e na presença (direita) do NaHCO_3 . Cada ponto mostra as barras de erro padrão e representa os valores obtidos de quatro experimentos independentes, em cinco concentrações 95

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2 – Artigo 1: “Amazonian *Eryngium foetidum* leaves exhibited very high contents of bioactive compounds and high singlet oxygen quenching capacity”

Table 1 – Chromatographic, UV-Visible, mass spectroscopy characteristics and content of carotenoids from *Eryngium foetidum* leaves, obtained by HPLC-DAD-APCI-MS/MS 59

Table 2 – Chromatographic, spectroscopic characteristics and content of phenolic compounds from *Eryngium foetidum* leaves, obtained by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ 64

Capítulo 3 – Artigo 1: “Extratos liofilizados de folhas de *Eryngium foetidum* da Amazônia com alto teor de ácido clorogênico, obtidos com solventes verdes, são eficientes sequestradores de ROS/RNS para futuras aplicações como antioxidantes naturais”

Tabela 1 – Teor de compostos fenólicos dos extratos liofilizados de folhas de *Eryngium foetidum* L. obtidos por solventes de diferentes polaridades 86

Tabela 2 – Capacidades de desativação dos extratos de folhas de *Eryngium foetidum* L contra oxigênio singlete (¹O₂), ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical superóxido (O₂^{•-}) e radical peroxila (ROO[•]) 89

Tabela 3 – Capacidades de desativação dos extratos de folhas de *Eryngium foetidum* L contra peroxinitrito (ONOO⁻) 94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\cdot\text{NO}$	Óxido nítrico
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
ABTS	Ácido 2,2-Anzino-Bis(3-Etilbenzotiazolina-6-Sulfônico)
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
CGA	Ácido clorogênico
CUPRAC	Testes de Redução do Cobre
DAF-2	4,5-diaminofluoresceína
DHR	di-hidrorodamina 123
DHR 123	dihidrorodamina 123
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EPM	Erro Padrão da Média
ESI	Electrospray
EtOH	Etanol
EtOH/ H ₂ O	Etanol/Água
EXT	<i>E. foetidum</i> extracts
EXT	Extrato de <i>E. foetidum</i>
FOS	Fruto oligossacarídeos
FRAP	Testes de Redução do Ferro
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
GSH	Glutathione
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HAT	Hydrogen Atom Transfer
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HO \cdot	Radical Hidroxila
HOCl	Ácido hipocloroso
HPLC- DAD-MS	Cromatografia Líquida acoplada aos detectores de arranjo de diodos e espectrômetro de massas
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LOD	Limites de Detecção
LOQ	Limites de Quantificação
MB	Methylene blue
MTBE	Éter metil <i>tert</i> -butílico
NADH	β -nicotinamida dinucleídeo de adenina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT	Cloreto de nitroazul de tetrazo
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
NOC-5	3-(aminopropil)-1-hidroxi-3-isopropil-2-oxo-1-triazeno
O ₂ ^{•-}	Radical Ânion Superóxido
O ₃	Ozônio
OH	Grupo Hidroxílico
ONOO ⁻	Ânion peroxinitrito
ONOOH	Ácido peroxinitroso
ORAC	Capacidade de Absorvância do Radical Oxigênio
PANCs	Hortaliças não convencionais
PMS	Metossulfato de fenazina
RAE	Retinol Activity Equivalent
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROO [•]	Radical Peroxila
ROOH	Hidroperóxido orgânico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SET	Single Electron Transfer
SOD	Superóxido Dismutase
t _{1/2}	Meia-vida
TEAC	Capacidade Antioxidante Equivalente do Trolox
TRAP	Parâmetro antioxidante de retenção de radicais totais
TRP	Triptofano

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	19
OBJETIVOS	24
CAPÍTULO 1 – REVISÃO DA LITERATURA	25
1 CHICÓRIA (<i>Eryngium foetidum</i> L.)	25
2 COMPOSTOS BIOATIVOS	27
2.1 COMPOSTOS FENÓLICOS	29
2.2 CAROTENOIDES	31
3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO	33
3.1 ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO	35
4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	35
5 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE ..	37
REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO 2 – “AMAZONIAN <i>Eryngium foetidum</i> LEAVES EXHIBITED VERY HIGH CONTENTS OF BIOACTIVE COMPOUNDS AND HIGH SINGLET OXYGEN QUENCHING CAPACITY”	50
ABSTRACT	51
1 INTRODUCTION	51
2 MATERIAL AND METHODS	52
2.1 CHEMICALS	52
2.2 SAMPLES	53
2.3 PROXIMATE COMPOSITION	53
2.4 BIOACTIVE COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT CAPACITY	54
2.4.1 Equipment	54
2.4.2 Bioactive compounds	54
2.4.3 <i>In vitro</i> antioxidant capacity	55
3 RESULTS AND DISCUSSION	57
3.1 PROXIMATE COMPOSITION OF <i>Eryngium foetidum</i> LEAVES	57
3.2 CAROTENOID PROFILE OF <i>Eryngium foetidum</i> LEAVES	57
3.3 PHENOLIC COMPOUNDS PROFILE <i>Eryngium foetidum</i> LEAVES	63
3.4 ANTIOXIDANT CAPACITY OF <i>Eryngium foetidum</i> LEAF EXTRACT	67

SUMÁRIO

4 CONCLUSION	69
REFERENCES	69
CAPÍTULO 3 – “Extratos liofilizados de folhas de <i>Eryngium foetidum</i> da Amazônia com alto teor de ácido clorogênico, obtidos com solventes verdes, são eficientes sequestradores de ROS/RNS para futuras aplicações como antioxidantes naturais”	75
RESUMO	76
1 INTRODUÇÃO	76
2 MATERIAL E MÉTODOS	78
2.1 REAGENTES	78
2.2 FOLHAS DE <i>E. foetidum</i> (SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO – SISGEN SOB O CÓDIGO A89EDD3)	79
2.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	79
2.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC-DAD	80
2.5 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE <i>E. foetidum</i> NA DESATIVAÇÃO DE ROS E RNS (<i>in vitro</i>)	81
2.5.1 Percentagem de Proteção Contra o Oxigênio Singlete ($^1\text{O}_2$)	81
2.5.2 Ensaio de desativação do radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)	82
2.5.3 Ensaio de desativação do ácido hipocloroso (HOCl)	82
2.5.4 Ensaio de desativação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	83
2.5.5 Ensaio de desativação do radical peroxila (ROO^{\cdot})	83
2.5.6 Ensaio de desativação do ânion peroxinitrito (ONOO^-)	83
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	84
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
3.1 COMPOSIÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DOS EXTRATOS DE <i>E. foetidum</i>	84
3.2 CAPACIDADE DE ELIMINAÇÃO DE ROS E RNS DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE <i>E. foetidum</i> L.	88

SUMÁRIO

4 CONCLUSÃO	96
REFERÊNCIAS	97
CONCLUSÃO GERAL	106
ANEXOS	107

INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas décadas, muita atenção tem sido dada às plantas, como novos agentes terapêuticos alternativos para o tratamento de doenças relacionadas com a oxidação devido a presença de compostos bioativos em sua composição (DEVI et al., 2015). Compostos bioativos, como os carotenoides e compostos fenólicos, possuem importantes funções e ações biológicas e podem ser considerados promotores da saúde humana (MILANI et al., 2016; TAUCHEN et al., 2016; EISENHAUER et al., 2017).

Os compostos bioativos provenientes de plantas possuem propriedades antioxidantes devido sua ação na proteção das células contra o efeito nocivo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) (DAWILAI et al., 2013; BARALIC et al., 2015).

Quando presentes em baixas concentrações, em relação a um substrato oxidável, os antioxidantes são substâncias que podem agir retardando ou prevenindo reações de oxidação (HALLIWELL, 2012). As defesas antioxidantes humanas são mantidas por um eficiente sistema de defesa antioxidante endógeno elaborado, que inclui enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase, além de outras proteínas e compostos de baixo peso molecular, como o ácido úrico, tocoferóis (vitamina E) e a coenzima Q (LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009). No sistema fisiológico, essas substâncias minimizam os níveis de ROS e RNS, e ao mesmo tempo permitem a ocorrência das funções úteis das ROS/RNS desempenhadas na sinalização celular e no sistema redox.

Por outro lado, a superprodução ou a exposição prolongada das ROS/RNS podem sobrecarregar os mecanismos endógenos de defesa, contribuindo para o desenvolvimento do estresse oxidativo/nitrosativo, que vem sendo associado ao surgimento de diversas desordens crônico-degenerativas, como por exemplo o câncer, coronárias, entre outras (HALLIWELL, 2009).

Os antioxidantes exógenos, oriundos da dieta, podem contribuir para a manutenção das defesas antioxidantes endógenas. Substâncias como o ácido ascórbico (vitamina C), tocoferóis, carotenoides e compostos fenólicos são atualmente as principais fontes de compostos bioativos exógenos oriundos da dieta humana. Os benefícios de uma dieta rica em alimentos vegetais como frutas, hortaliças e cereais integrais estão do ponto de vista epidemiológico, associados à

baixa incidência de certos tipos de câncer e doenças degenerativas (CROWE et al., 2011; BOEING et al., 2012; MILANI, 2016).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, 80% dos habitantes do mundo recorrem à medicina tradicional para os cuidados básicos de saúde; a maior parte das terapias envolve o uso de extratos vegetais e seus componentes bioativos (NEWMAN & CRAGG, 2012). Há milhares de anos as plantas são à base da medicina tradicional em todo o mundo e, ainda continuam a fornecer alternativas terapêuticas para o tratamento de diversas doenças, conforme a crença de cada região. Portanto, um grande esforço tem sido feito na pesquisa de compostos bioativos que poderão reforçar as defesas antioxidantes endógenas, evitando ou retardando as consequentes lesões celulares, sendo este um campo em grande desenvolvimento na área de estudo das ROS e RNS.

Assim, pode-se dizer que a busca por compostos bioativos em produtos naturais é promissora. Por outro lado, é inegável que a biodiversidade da Amazônia brasileira apresenta grande importância no cenário mundial, dado o valor intrínseco de seus recursos naturais vegetais (nativas e/ou adaptadas). Além disso, a necessidade de preservação e do uso sustentável desta diversidade biológica é inquestionável, tornando-a assim um campo de grande exploração para busca de compostos bioativos. Dentro deste cenário encontra-se a chicória da Amazônia (*Eryngium foetidum* L).

A chicória é uma hortaliça não convencional, condimentar, que vem atraindo a atenção de pesquisadores em função de sua utilização como uma planta etnomedicinal, ainda que sua principal utilização seja como especiarias culinárias em regiões tropicais. Esta versatilidade de uso, a torna uma hortaliça propícia a maiores investigações. Os compostos bioativos em suas folhas têm sido alvo de estudos por serem os responsáveis por atividades anti-inflamatória e antioxidante (GARCIA et al.; 1999; SINGH et al., 2011; 2013; DAWILAI et al., 2013).

A avaliação química das folhas da chicória indicou alta concentração de compostos fenólicos (taninos, antocianinas, flavonoides), a presença de saponinas, carotenoides, ácido ascórbico, vários triterpenoides e também atividade antioxidante (WONG et al., 2006; NANASOMBAT & TECKCHUEN, 2009; PAUL et al., 2011; SINGH et al., 2011; 2013). No entanto, a identificação e a quantificação desses compostos bioativos presentes na chicória, ainda não foi realizada por técnicas mais avançadas, a exemplo da cromatografia líquida acoplada aos detectores de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (HPLC-DAD-MS).

As análises dos constituintes químicos da chicória têm sido concentradas principalmente nos óleos essenciais (PAUL et al, 2011). Sendo que as informações sobre a composição química das folhas da chicória da Amazônia ainda são insuficientes, o que justifica a necessidade de aprofundar o conhecimento sistemático sobre a presença de substâncias bioativas na espécie, através da avaliação de diferentes extratos, e ação antioxidante destas por diferentes métodos. Estes fatos tomados em conjunto fazem desta planta uma fonte promissora para estudos de exploração de compostos bioativos. Portanto, neste estudo, os compostos bioativos presentes nas folhas da chicória foram investigados, assim como o potencial antioxidante de seus extratos contra espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitroênio (RNS) de importância fisiológica e alimentícia. Para facilitar o entendimento, a tese está dividida em três capítulos: o Capítulo 1 apresenta a revisão da literatura; no Capítulo 2 foi determinado o perfil de compostos bioativos das folhas de chicória e seu potencial antioxidante; no Capítulo 3 foi avaliado o efeito protetor de extratos de chicória obtidos com solventes verdes contra ROS e RNS (*in vitro*).

REFERÊNCIAS

- BARALIC, I. et al. Effect of astaxanthin supplementation on salivary IgA, oxidative stress, and inflammation in young soccer players. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2015, 2015.
- BOEING, H. et al. Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. **European Journal of Nutrition**, v. 51, n. 6, p. 637-663, 2012.
- CROWE, F. L. et al. Fruit and vegetable intake and mortality from ischaemic heart disease: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Heart study. **European Heart Journal**, v. 32, n. 10, p. 1235-1243, 2011.
- DAWILAI, S. et al. Anti-inflammatory activity of bioaccessible fraction from *Eryngium foetidum* leaves. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- DEVI, K. P. et al. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. **Pharmacological Research**, v. 99, p. 1-10, 2015.

EISENHAUER, B. et al. Lutein and zeaxanthin—food sources, bioavailability and dietary variety in age-related macular degeneration protection. **Nutrients**, v. 9, n. 2, p. 120, 2017.

GARCIA, M. D. et al. Topical antiinflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation models. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 13, n. 1, p. 78-80, 1999.

HALLIWELL, B. The wanderings of a free radical. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 5, p. 531-542, 2009.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 5, p. 257-265, 2012.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1-2, p. 137-147, 2009.

MILANI, A. et al. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1290-1324, 2017.

NANASOMBAT, S.; TECKCHUEN, N. Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 5, p. 443-449, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

PAUL, J. H.; SEAFORTH, C. E.; TIKASINGH, T. *Eryngium foetidum* L.: a review. **Fitoterapia**, v. 82, n. 3, p. 302-308, 2011.

SINGH, S. et al. Determination of bioactives and antioxidant activity in *Eryngium foetidum* L.: a traditional culinary and medicinal herb. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 83, n. 3, p. 453-460, 2013.

SINGH, S. et al. Estimation of proximate composition, micronutrients and phytochemical compounds in traditional vegetables from Andaman and Nicobar Islands. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 62, n. 7, p. 765-773, 2011.

TAUCHEN, J. Et al. Phenolic composition, antioxidant and anti-proliferative activities of edible and medicinal plants from the Peruvian Amazon. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 6, p. 728-737, 2016.

WONG, S. P.; LEONG, L. P.; KOH, J. H. W. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. **Food Chemistry**, v. 99, n. 4, p. 775-783, 2006.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Determinar o perfil de compostos bioativos e o potencial antioxidante de extratos das folhas de chicória como estratégia para a valorização desta planta Amazônica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as características físico-químicas das folhas de chicoria;
- Identificar e quantificar os compostos bioativos presentes nas folhas da chicoria;
- Determinar o potencial antioxidante de extratos de folhas da chicória obtidos com solventes de diferentes polaridades contra espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio de importância fisiológica.

1

Revisão da Literatura

1 CHICÓRIA (*Eryngium foetidum* L.)

A chicória (*Eryngium foetidum* L.), pertencente à família Apiaceae, é uma planta herbácea, aromática, bianual, de 8-40 cm de altura (Figura 1), nativa da região Amazônica e América Central e atualmente cosmopolita; a espécie é encontrada em regiões tropicais e subtropicais (SHE; WATSON, 2005; VILLACHICA et al., 1996).

A chicória encontra-se incluída entre as principais hortaliças não-convencionais cultivadas no Brasil (BRASIL, 2010), sendo conhecida popularmente como coentro, coentrão, coentro-da-índia, coentro-castelo, coentro-bravo, coentro-da-folha-larga, coentro japonês, chicória, chicória-de-caboclo, chicória-do-amazonas, chicória-do-pará, entre outras (VILLACHICA et al., 1996).

Figura 1 – *Eryngium foetidum* L. cultivada em Santa Izabel - Comunidade João Novo (Belém, PA, Brasil).



Fonte: Autor.

A espécie ocorre naturalmente em solos úmidos, pouco ácidos e adequa-se a elevadas temperaturas e umidades relativas, condições predominantes na região Amazônica. Nas proximidades das áreas onde a planta é cultivada, os ventos e as chuvas espalham as sementes maduras criando novas plantas. Na fase de reprodução, ocorre o aparecimento de uma haste floral, cuja flores são hermafroditas, dispostas em pequenos e densos capítulos sésseis, cilíndricos ou ovóides, longo-pedunculadas, com elevada produção de sementes fecundas (VILLACHICA et al., 1996; GOMES et al., 2013).

A maior produção e produtividade de chicória da Amazônia foi obtida nas plantas cultivadas no espaçamento de $0,25 \times 0,25$ m e $0,15 \times 0,15$ m, respectivamente, e quando submetidas à poda do pendão floral (GOMES et al., 2013). Estes dados são importantes, pois auxiliam no aumento e eficiência da produtividade, favorecem o desenvolvimento do cultivo e influenciam no crescimento e morfologia vegetativa, em razão de fatores ambientais, especialmente de temperatura e luminosidade (PEREZ JUNIOR et al., 2006; ZÁRATE et al., 2010).

No Brasil, a chicória é cultivada para alimentação em quintais urbanos e hortas (MORAIS et al., 2009). Em Belém-PA o cultivo da chicória é realizado utilizando sementes que são adquiridas nas próprias áreas ou em áreas vizinhas e a produção é voltada tanto para o atendimento as necessidades familiares, como para a comercialização, gerando emprego e renda aos produtores desta hortaliça (GUSMÃO et al., 2003; PINTO et al., 2009).

Possui substâncias aromáticas, seu atributo mais marcante, que conferem sabor e aroma característicos aos alimentos em que é utilizada. Dentre os componentes, o eringial (E-2-dodecenal) possui maior destaque (PAUL et al., 2011).

A chicória possui inúmeros usos tradicionais, mas, principalmente, possui uma vasta utilização etnomedicinal. Na América tropical e Caribe, onde a espécie é nativa, prevalece o uso da planta para tratar febres, resfriados e gripes (DUKE, 2008). As dores de cabeça nas comunidades tradicionais da América Central e Caribe são curadas com a utilização de várias preparações a partir desta planta (KALA, 2005), ou são usadas para aliviar dores abdominais e digestivas (flatulência, azia e dor de estômago), diminuir dores nas costas e pós-parto, reduzir a febre e infecções vaginais (COE, 2008); contribui também para o aumento das contrações reduzindo do trabalho de parto, cólicas menstruais e remoção da placenta (LANS, 2007).

Na Costa Rica, a planta é usada como afrodisíaco; entretanto, não há nenhuma referência em relação ao sexo afetado (DUKE, 2008). No Brasil, o trabalho de parto é facilitado pelo uso do chá, feito a partir da cocção da planta inteira, porém, não é indicado na gravidez, por haver risco de provocar contrações uterinas (RODRIGUES, 2007).

Estudo realizados sobre a composição química das folhas da chicória indicou a presença de cálcio, ferro, potássio, fósforo, zinco, manganês, magnésio, carotenoides (SINGH et al., 2011), e óleo essencial (PAUL et al., 2011). Os extratos da chicória foram avaliados em relação à atividade anti-helmíntica, anticonvulsante, anti-inflamatória, analgésica, antimalárica e bactericida, observadas no uso tradicional. Entretanto, foram confirmadas apenas as três primeiras atividades citadas inicialmente (DAWILAI et al., 2013; GARCIA et al., 1999; PAUL et al., 2011).

2 COMPOSTOS BIOATIVOS

Os compostos bioativos podem ser definidos como nutrientes e/ou não nutrientes com ação metabólica ou fisiológica específica, que podem ser encontrados em vegetais e/ou frutas. Os compostos bioativos provenientes da alimentação são de grande interesse para a comunidade científica por possuírem importantes funções e ações biológicas, e pelas evidências de seu papel na prevenção de doenças degenerativas (JARAMILLO et al., 2010; BOEING et al., 2012; ZHU; DU; XU, 2018).

Os ácidos fenólicos, ácidos graxos (monoinsaturados, ω -3 e ω -6), bicarbonato de sódio, cafeína, estearato de sódio, fruto oligossacarídeos (FOS), inulina, fibras, fitoesteróis, lactulose,

licopeno, manitol, sorbitol, quitosanas, Coenzima Q10 e xilitol são alguns dos compostos bioativos que já possuem alegações comprovadas (BRASIL, 2018).

Nos últimos anos, evidências substanciais têm apontado os radicais livres e outros oxidantes como grandes desencadeadores de doenças degenerativas e envelhecimento. Diversos estudos epidemiológicos têm demonstrado uma positiva correlação entre uma alta ingestão alimentos vegetais e a diminuição do risco de certas patologias, entre elas, o envelhecimento precoce, câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular, decaimento do sistema imunológico, disfunções cerebrais e outras (BOEING et al., 2012; EISENHAUER et al., 2017; LIU et al., 2014; MILANI et al., 2016; ROJAS; BUITRAGO, 2019; ZHU, DU & XU, 2018).

A possibilidade de reduzir o risco destas patologias, por meio de uma dieta rica em frutas e vegetais, tem atraído a atenção tanto da comunidade científica como das indústrias alimentícias, com o propósito comum de desenvolver produtos com elevados teores de compostos bioativos, sendo os compostos fenólicos, alguns compostos nitrogenados (alcalóides, aminas, betalaínas), vitaminas, terpenoides (incluindo carotenoides), e alguns outros metabólitos endógenos alguns dos grupos aos quais são atribuídas tais ações (LIU et al., 2014; MILANI et al., 2016; EISENHAUER et al., 2017; ZHU, DU & XU, 2018; ROJAS & BUITRAGO, 2019).

Alguns autores em seus estudos encontraram alta concentração de compostos bioativos nas folhas e extratos de chicória, incluindo compostos fenólicos e carotenoides, bem como atividade antioxidante utilizando a combinação de vários solventes de diferentes polaridades (metanol, acetona, éter de petróleo, clorofórmio e água) através de diferentes métodos (GARCIA et al., 1999; WONG et al., 2006; NANASOMBAT; TECKCHUEN, 2009; SINGH et al., 2011; 2013). No entanto, alguns desses solventes não são permitidos para uso em alimentos pois os resíduos após evaporação possuem alguma toxicidade para o sistema fisiológico (metanol, clorofórmio, éter de petróleo) (COMISSÃO DIRETIVA 95/45 /EC DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,1995).

2.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários que estão presentes, geralmente, em altos níveis, em quase todos os alimentos vegetais. Englobam desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização, como flavonoides, taninos e ligninas, e podem estar presentes na forma livre, ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas em diversas partes das plantas (comestíveis e não-comestíveis). Atualmente, são conhecidas mais de 8.000 estruturas, cujas origens orgânicas são ligadas ao caminho metabólico por ácido chiquímico (participa da biossíntese da maioria dos compostos fenólicos em vegetais) e por ácido malônico (ANTOLOVICH et al., 2000; DREOSTI, 2000).

Os compostos fenólicos representam uma importante classe de antioxidantes hidrossolúveis, que são eficientemente extraídos com solventes com características polares, a exemplo da água e do etanol. A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos ocorre em função da facilidade com que um átomo de hidrogênio do grupo hidroxílico (OH) destes compostos pode ser doado a um radical livre, assim como com a presença de elétrons doadores (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; RAMIREZ-TORTOSA et al., 2001).

Dentre estes, os compostos mais estudados são os flavonoides, uma grande classe de compostos estruturalmente diferentes, sintetizados pelas plantas via rota dos fenilpropanoides. Elas incluem as chalconas, flavonas, flavonois, flavononas, antocianinas e isoflavonoides. Os flavonoides estão envolvidos na resistência aos patógenos, atração de polinizadores e dispersores, na defesa contra insetos e predadores e, também, são conhecidos por inibir a peroxidação lipídica e as lipoxigenases *in vitro*, através da capacidade em desativar radicais livres, tais como o radical hidroxila (HO^\bullet), radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e os radicais peroxila (ROO^\bullet), os quais reconhecidamente são responsáveis por gerarem o estresse oxidativo celular (LEONG; SHUI, 2002; LEONTOWICZ et al., 2007; OKONOJI, et al., 2007; TACHAKITTIRUNGROD et al., 2007; IACOPINI et al., 2008).

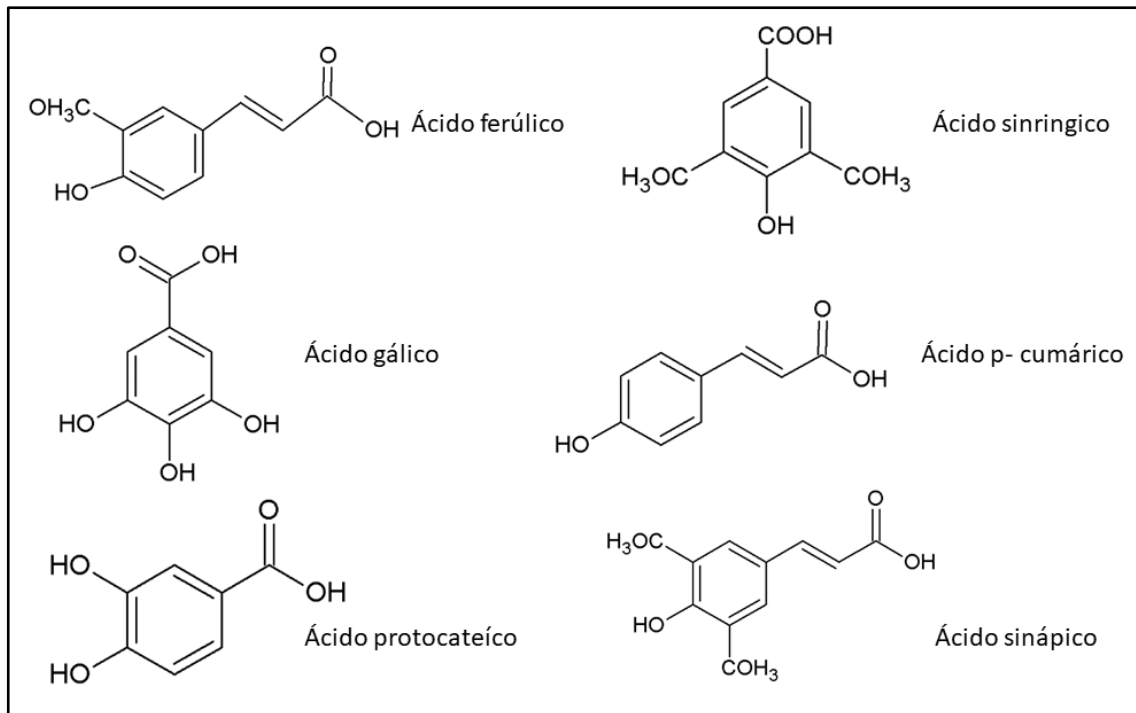
Diversos estudos apontam que os flavonoides presentes em frutas e vegetais, estão associados à prevenção de patologias cardiovasculares e degenerativas como cânceres (côlon, estômago, próstata, entre outros) (DAVIS et al., 2009; JARAMILLO et al., 2010; GROSSO et al., 2016; VAN DIE et al., 2014) e atuam contra doenças como Parkinson e Alzheimer (VAUZOUR et al., 2008), possuem ação anti-inflamatórias, anti-hepatotóxica, antiviral, antialérgica e antitrombótica (MAZZA; GIRARD, 1998; DEVI et al., 2015; ZHU, DU & XU, 2018), além de prevenir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) contribuem para

o aumento das lipoproteínas de alta densidade (HDL), com a conseqüente redução do risco de doenças cardiovasculares, atuam também na absorção de produtos tóxicos provenientes da peroxidação lipídica (CHIANG et al., 2004; FRANKE et al., 2004; GORELIK et al., 2008).

Diversos estudos apontam que os compostos fenólicos, de maneira geral, podem ser extraídos de suas matrizes por meio de diversos métodos e sistemas de solventes (podendo ser na sua forma pura ou em diferentes concentrações na água) (ALOTHMAN; BHAT; KARIM, 2009; DIMITROVA et al., 2013; AZZAHRA LAHLO et al., 2014; BUITRAGO et al., 2016).

A polaridade do solvente, razão entre massa e volume de solvente podem influenciar na solubilidade do composto e, conseqüentemente, na sua recuperação. Os métodos de extração podem variar, as condições de extração como temperatura e tempo utilizados, o que pode, também, influenciar na quantificação precisa do teor e capacidade antioxidante do composto, bem como no tipo de composto fenólico extraído, sendo essa diversidade de método de extração um fator que dificulta a comparação de resultados obtidos com relatos na literatura (ALOTHMAN; BHAT; KARIM, 2009). Análise por HPLC-DAD em extratos metanólicos das folhas de chicória, indicou a presença dos seguintes compostos fenólicos: ácido ferrúlico, ácido siringico, ácido gálico, ácido *p*-coumarico, ácido protocatecuico e ácido sinapico (Figura 2) (SINGH et al., 2013).

Figura 2 – Estruturas químicas dos compostos fenólicos identificados nas folhas de chicória por HPLC-DAD.



Fonte: Autor.

2.2 CAROTENOIDES

Os carotenoides são compostos lipossolúveis produzidos como metabólitos secundários das frutas, vegetais, algas, fungos e algumas bactérias. Eles são responsáveis por conferir as colorações amarela, vermelha e laranja das frutas, vegetais e alguns animais (KIM et al., 2015; URSACHE et al., 2018). Esta coloração é atribuída ao extenso sistema de ligações duplas conjugadas, que constituem um cromóforo que absorve luz e proporciona um espectro de absorção visível que serve de base para a sua identificação e quantificação (ZAGHDOUDI et al., 2015).

Aproximadamente 50 carotenoides apresentam atividade provitamina A. São chamados compostos provitamina A, por serem capazes de converterem-se em retinol, uma forma ativa da vitamina A (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008). Estes, particularmente o β -caroteno, representa a principal fonte de vitamina A da dieta. Estes pigmentos possuem várias funções atuando como fotoprotetor contra dano oxidativo durante a fotossíntese, bem como agem na

prevenção de vários tipos de cânceres, doenças degenerativas e cardiovasculares, catarata e envelhecimento, fortalecem o sistema imunológico, tem ação antioxidante, sequestrando e inativando radicais livres (BOWEN et al., 2015). Os vegetais verdes especialmente as folhas, contêm β -caroteno e são boas fontes de luteína (COSTA et al., 2003).

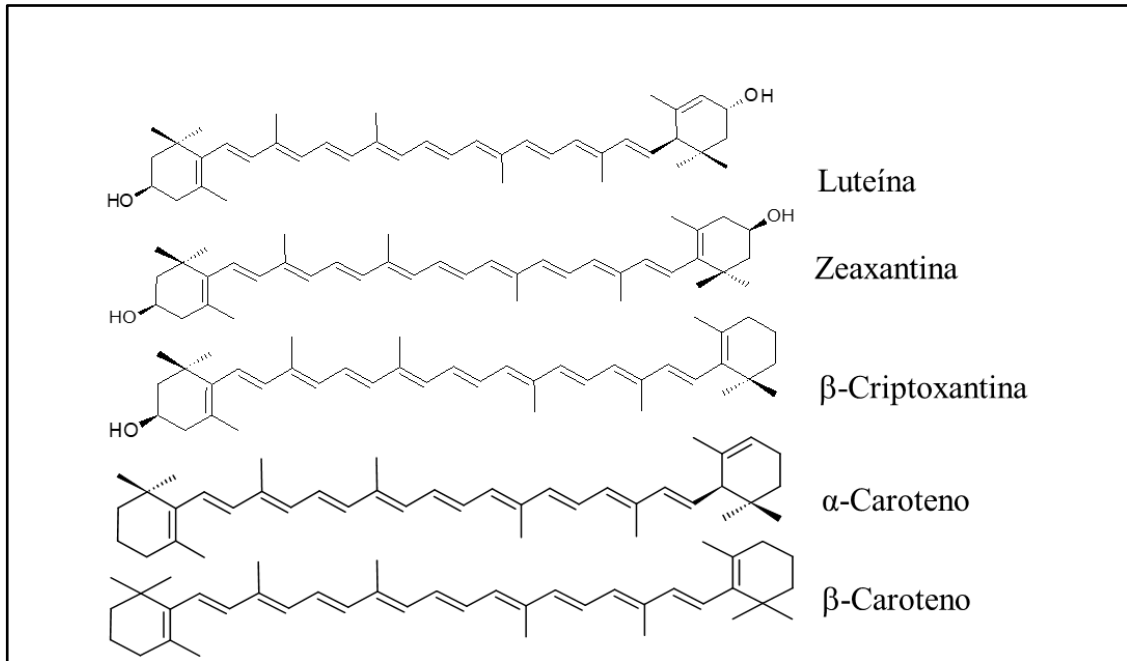
Devido a sua natureza lipofílica, os carotenoides são insolúveis em água e muito solúveis em solventes orgânicos como éter de petróleo, hexano e tolueno (ZAGHDOUDI et al., 2015). Em virtude da natureza altamente insaturada de sua molécula, os carotenoides são susceptíveis a isomerização e oxidação, reações que podem facilmente ocorrer durante a análise. Por este motivo, os carotenoides devem ser protegidos da luz, oxigênio e não devem ser submetidos a temperaturas superiores a 40 °C e nem estarem em contato com ácidos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

A maioria dos carotenoides existente apresenta atividade antioxidante, em função de sua atuação na proteção das células contra o efeito deletérios de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) por meio da desativação dessas espécies (CHISTÉ; MERCADANTE, 2012; SCHULZ et al., 2015). Os carotenoides, presentes naturalmente nos alimentos, ou adicionados propositalmente, proporcionam cor aos alimentos, contribuindo no aspecto visual, atributo de fundamental importância na aceitação e escolha de um alimento por seus consumidores (CLYDESDALE, 1993).

Os carotenoides, juntamente com outros compostos bioativos, em função de seus potenciais antioxidantes, estão sendo amplamente utilizados como ingredientes ativos em matérias-primas alimentares e alimentos (SILVA et al., 2010). Em particular, os carotenoides possuem inúmeras aplicações na indústria de alimentos como corantes, aditivos para a alimentação e antioxidantes, contribuindo para o aumento sua vida útil destes alimentos (RIVERA & CANELAGARAYOA, 2011).

Análise por HPLC-DAD em extratos metanólicos das folhas de chicória, indicou a presença de luteína (majoritário), zeaxantina, β -criptoxantina, α -caroteno e o β -caroteno (Figura 3) (SINGH et al., 2013). No entanto, a identificação desses compostos por técnicas espectroscópicas mais avançadas, a exemplo da espectrometria de massa, ainda não foi reportada na literatura.

Figura 3 – Estrutura dos carotenoides identificados em folhas de chicória por HPLC-DAD.



Fonte: Autor.

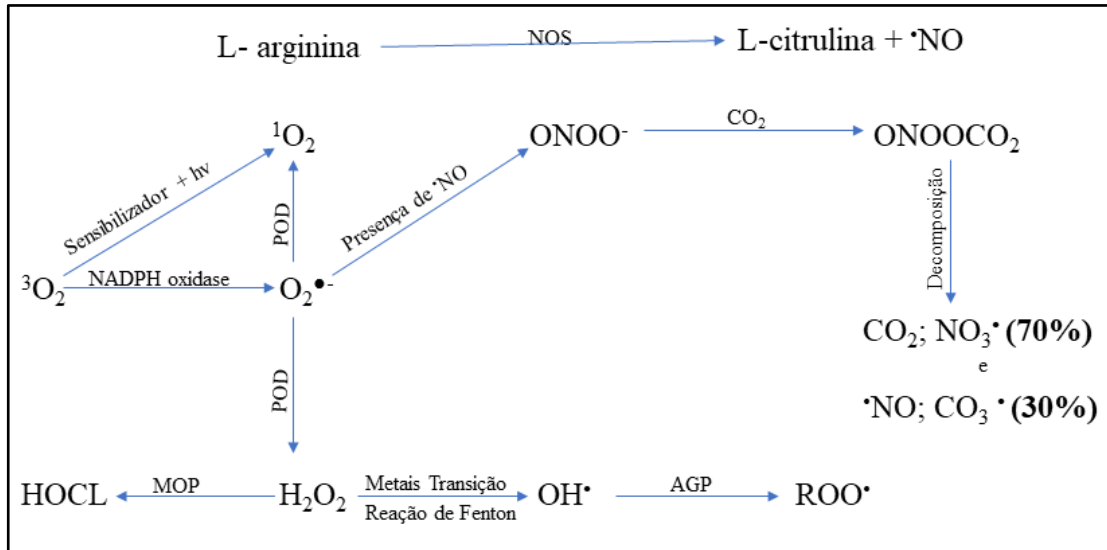
3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DE NITROGÊNIO

As principais espécies reativas de importância fisiológica, provenientes do metabolismo celular, compreendem as espécies reativas de oxigênio (ROS), que são derivados do oxigênio molecular com atividade redox e maior reatividade que o oxigênio. Exemplos de ROS são: radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (OH^{\bullet}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical peroxila (ROO^{\bullet}), hidroperóxido orgânico ($ROOH$), oxigênio singlete (1O_2) ácido hipocloroso ($HOCl$) e ozônio (O_3). Bem como as espécies reativas de nitrogênio (RNS), que são derivadas do óxido nítrico ($^{\bullet}NO$). Exemplos de RNS são NO^{\bullet} , peroxinitrito ($ONOO^-$), ácido peroxinitroso ($ONOOH$) e dióxido de nitrogênio (NO_2) (FANG et al., 2002; LABAT-ROBERT et al., 2014).

Há uma inter-relação entre a formação das diferentes ROS e RNS, conforme pode ser observado na Figura 4. As ROS e RNS produzidas endogenamente são essenciais à vida, estando envolvidas em variadas funções biológicas, como por exemplo, na produção de energia, na fagocitose, na regulação do crescimento celular, na sinalização celular, na síntese de

importantes compostos biológicos e no metabolismo dos xenobióticos (GOMES et al., 2005, GOMES et al., 2006).

Figura 4 – Inter-relações entre as formações de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.



Fonte: CHISTÉ et al., 2011

Radicais livres normalmente são produzidos pelas células durante a atividade mitocondrial de transporte de elétrons ou por oxido-redutases (FORMAN; TORRES, 2002). Em condições fisiológicas normais, a membrana interna das mitocôndrias incorpora uma série de captadores de radicais livres e sistemas de remoção enzimática.

No entanto, quando a geração destas espécies reativas for maior do que a capacidade dos mecanismos de defesa antioxidante endógenos de removê-las dos sistemas biológicos, estas espécies reativas tornam-se extremamente prejudiciais, provocando a oxidação de biomoléculas, como a peroxidação lipídica de membranas, oxidação de proteínas, enzimas dos tecidos, carboidratos e DNA, conduzindo a danos estruturais e/ou funcionais nas células, enzimas e material genético, que a partir de determinado nível se tornam irreversíveis, estes fatores são causados pelo chamado estresse oxidativo/nitrosativo (CHUNG et al., 2005; GOMES et al., 2005, GOMES et al., 2006; MENDIS et al., 2007;).

3.1 ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO

O estresse oxidativo/nitrosativo é definido como um desequilíbrio entre moléculas antioxidantes e oxidantes, causada por um distúrbio entre a produção de ROS e de RNS e a sua desativação através de sistemas biológicos, o que pode estar relacionado à patogênese de várias doenças, incluindo doenças degenerativas como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, câncer e problemas cardíacos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SAYRE et al., 2007; MATÉS et al., 2010).

A prevenção da produção de ROS/RNS é a forma mais eficiente de proteger as células contra seus efeitos deletérios. Nessa perspectiva, entram em ação os antioxidantes, formados por um grupo de substâncias como enzimas, compostos de baixa massa molecular, tais como ácido ascórbico (vitamina C) e tocoferóis (vitamina E), glutatona (GSH), carotenoides e ácido úrico, sendo estas capazes de inibir ou retardar a oxidação de substratos, mesmo que o composto esteja presente em uma concentração significativamente mais baixa do que o substrato oxidado (BARREIROS et al., 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; LUSHCHAK, 2011).

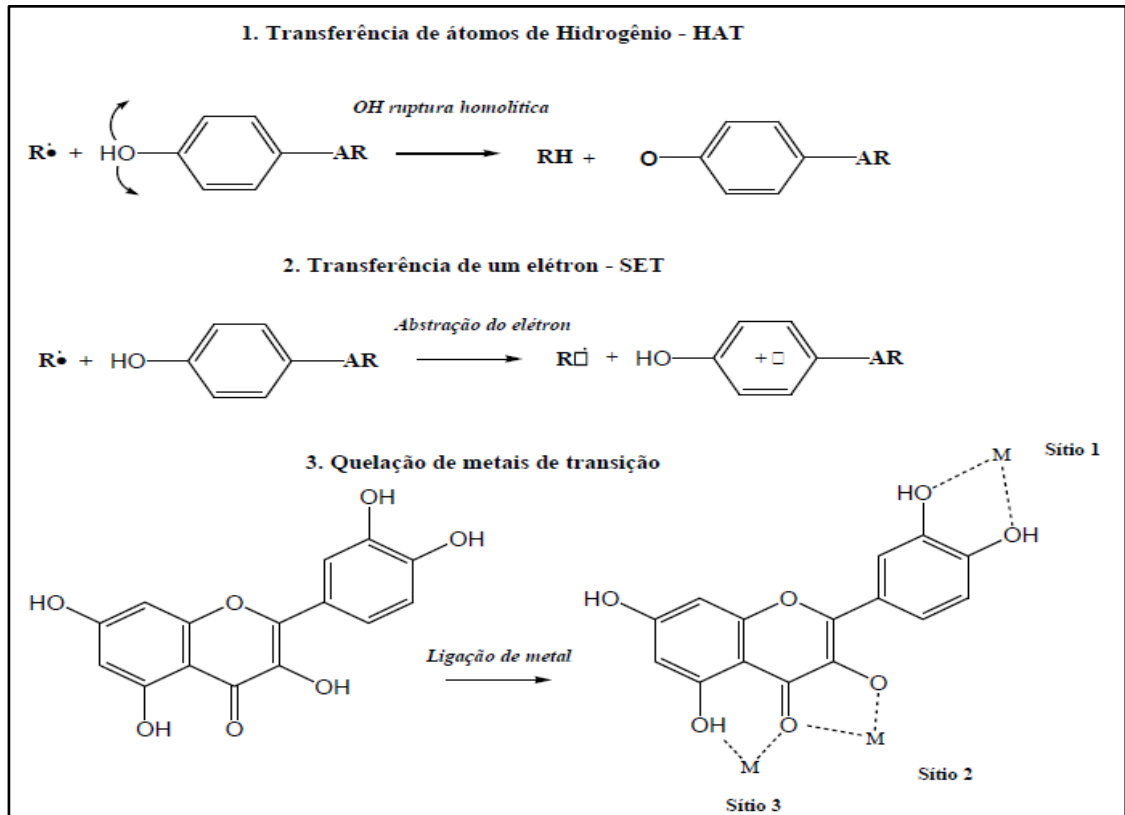
4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

O sistema de defesa antioxidante é composto normalmente por espécies antioxidantes e pró-antioxidantes, em um sistema sincronizado, onde, a deficiência em um componente pode afetar a eficiência de outros (VERTUANI et al., 2004). Os pró-oxidantes são substâncias endógenas ou exógenas que possuem a capacidade de oxidar moléculas-alvo. De modo geral, os antioxidantes são compostos orgânicos facilmente oxidáveis pelas espécies reativas, com consequente destruição das mesmas. Os antioxidantes podem ser não-enzimáticos, tais como: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH), carotenoides, ácido ascórbico, α -tocoferol e GSH e os enzimáticos tais como: superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase (CABISCOL et al., 2000).

O delicado equilíbrio entre as defesas antioxidantes e a produção de ROS/RNS pode ser interrompido por qualquer anomalia na defesa antioxidante, por inibição do fluxo de elétrons ou exposição à xenobióticos. Assim, a presença dos antioxidantes no organismo é fundamental, uma vez que as reações de desativação de radicais livres não são favorecidas, sendo assim a incorporação na dieta de substâncias antioxidantes é uma alternativa viável (BARREIROS et al., 2006).

Os principais mecanismos de ação de compostos antioxidantes incluem transferência de átomos de hidrogênio, a transferência de elétrons e a quelação de metais (Figura 5) (LEOPOLDINI et al., 2011).

Figura 5 – Mecanismos de ação de agentes antioxidantes.



Fonte: Leopoldini et al., 2011

Nas reações transferência de um átomo de hidrogênio (*Hydrogen Atom Transfer*, HAT) o antioxidante, ArOH, reage com os radicais livres, R, transferindo a ele um átomo de hidrogênio, por meio de ruptura homolítica da ligação O-H. O antioxidante inibe, por competição, a oxidação do substrato pela espécie reativa de oxigênio. Em experimentos *in vitro*, a transferência de átomos de hidrogênio (HAT) de compostos naturais como flavonoides é responsável pela atividade anti-radical (VALKO, 2013).

A transferência de elétrons (*Single Electron Transfer*, SET) prevê a doação de um elétron do antioxidante para o radical R, tornando o ânion radical uma espécie energeticamente estável. No mecanismo SET, o potencial de ionização é o parâmetro mais importante para a avaliação da atividade antioxidante. Nos ensaios SET, a capacidade antioxidante é representada

pela habilidade que o antioxidante possui para reduzir o composto oxidante em um tempo predeterminado (LEOPOLDINI et al., 2004; HUANG et al., 2005).

Outro mecanismo antioxidante é a quelação de metais, que decorre da possibilidade de que alguns íons de metais de transição podem ser quelados, se associando quimicamente a uma ligação covalente como agente quelante, levando à formação de um composto estável (BROWN et al., 1998; JOVANOVIĆ et al., 1998). Os quelantes são compostos que competem especificamente promovendo a ligação química com o metal e não com as enzimas ou proteínas normais, alterando assim o potencial redox. Além disso, o uso de quelantes de metais, tais como os compostos fenólicos naturais devem ser favorecidos, uma vez que formam produtos intermediários estáveis, o que faz dos produtos fenólicos eficazes (RICE-EVANS et al., 1997; PIETTA, 2000; ATOUI et al., 2005).

Vale ressaltar que o conhecimento destas reações é muito importante para a compreensão e seleção dos métodos utilizados para medir a capacidade antioxidante de compostos bioativos (PRIOR et al., 2005).

É razoável esperar que o efeito benéfico dos antioxidantes na manutenção da nossa saúde venha diminuir o risco de doenças. Assim, a avaliação dos antioxidantes bem como sua capacidade tem sido os temas de estudos extensivos (NIKI, 2010).

5 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Existem diversos métodos para identificar e avaliar compostos com propriedades antioxidantes (*in vitro*) de substâncias biologicamente ativas, puras ou de frações e extratos brutos, que utilizam desde ensaios químicos com substratos lipídicos à ensaios mais complexos que usam as mais variadas técnicas instrumentais. Estes testes são ferramentas importantes para o monitoramento de compostos bioativos naturais e sintéticos (SÁNCHEZ-MORENO, 2002; ALVES et al., 2010).

A capacidade antioxidante *in vitro* pode ser medida por diferentes ensaios, em função dos diferentes tipos de radicais livres e também por suas mais variadas formas de ação nos organismos vivos. Em virtude disso, dificilmente será possível utilizarmos um método simples e universal no qual esta capacidade antioxidante possa ser avaliada de forma precisa e quantitativamente. Assim, a procura por testes mais rápidos e eficientes tem gerado um grande

número de métodos para avaliar a atividade de antioxidantes naturais pelo uso de uma grande variedade de sistemas geradores de radicais livres (FRANKEL; FINLEY, 2008).

Os ensaios antioxidantes atualmente disponíveis podem ser classificados em duas categorias: ensaios onde há transferência de hidrogênio (HAT), geralmente baseados em estudos de cinética química, também denominados de métodos diretos, incluem-se nessa categoria os ensaios de Capacidade de Absorvância do Radical Oxigênio (ORAC), Parâmetro antioxidante de retenção de radicais totais (TRAP) e ensaios de peroxidação lipídica *in vitro*, entre outros (BADARINATH et al., 2010). E ensaios mediados pela transferência de elétrons (SET) também denominados de métodos indiretos, onde incluem-se os Testes de Redução do Ferro (FRAP), Redução do Cobre (CUPRAC), Capacidade Antioxidante Equivalente do Trolox (TEAC), que utiliza o radical ABTS e o ensaio de captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), embora o ABTS e DPPH utilizem os dois mecanismos (HUANG et al., 2005; PRIOR; WU; SCAICH, 2005). Técnicas celulares, também foram desenvolvidas para avaliar se os antioxidantes são capazes de penetrar nas células humanas protegendo-as de danos oxidativos (FREITAS et al., 2009; CHISTÉ et al., 2014).

Existem testes para avaliar o potencial antioxidante de extratos ricos em compostos bioativos através de técnicas que fazem uso de espécies reativas de importância fisiológica, como as ROS e as RNS, ao contrário de métodos como o ABTS e DPPH que utilizam radicais estáveis e não-biológicos (HUANG et al., 2005). Entretanto até o momento, não foram encontrados dados na literatura que reportem o efeito antioxidante de extratos de chicória na desativação direta dos efeitos oxidantes das principais ROS e RNS de relevância fisiológica.

Portanto, a seleção de plantas com propriedades potencialmente antioxidantes parece ser de importância fundamental, a fim de identificar os extratos ou frações que possuem a capacidade de desativação tanto em ambos os radicais livres e cadeia de reações de iniciação ou na ligação com catalisadores das reações oxidativas (DORMAN et al., 2003). Assim, a chicória destaca-se como uma hortaliça promissora uma vez que possui em sua constituição uma grande diversidade de compostos bioativos, potencialmente antioxidantes (GARCIA et al.; 1999; DAWILAI et al., 2013; SINGH et al., 2011, 2013) e farmacologicamente testados.

Com base no exposto, o estudo da composição da chicória, bem como a obtenção de extratos vegetais com potencial antioxidante, a partir dessa fonte acessível de compostos bioativos, devem ser realizados com a finalidade de fornecer uma importante base de conhecimento para as indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica no desenvolvimento de produtos em potencial contra os danos oxidativos em alimentos ou sistemas biológicos,

sendo necessário também estudos que assegurem a manutenção dos requisitos de qualidade durante o processamento e o armazenamento destes extratos.

REFERÊNCIAS

ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 785-788, 2009.

ALVES, C. Q. et al. Methods for determination of in vitro antioxidant activity for extracts and organic compounds. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ANTOLOVICH, M. et al. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Analyst**, v. 125, n. 5, p. 989-1009, 2000.

ATOUI, A. K. et al. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 27-36, 2005.

BADARINATH, A. et al. A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 2, p. 1276-1285, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113, 2006.

BOEING, H. et al. Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. **European Journal of Nutrition**, v. 51, n. 6, p. 637-663, 2012.

BOWEN, E. et al. Carotenoids in Human Nutrition. In C. Chen (Ed.), *Pigments in Fruits and Vegetables: Genomics and Dietetics*, New York, NY: Springer New York. p. 31-67, 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Manual das hortaliças não-convencionais. Secretaria de desenvolvimento agropecuário e

cooperativismo. Brasília, 2010. 92 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Resolução RDC nº 243, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares. Disponível em:http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC_243_2018_.pdf/0e39ed31-1da2-4456-8f4a-afb7a6340c15. Acesso em: 24 maio de 2019.

BROWN, E. J. et al. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. **Biochemical Journal**, v. 330, n. 3, p. 1173-1178, 1998.

BUITRAGO, A.; ROJAS-VERA, J.; PENALOZA, Y. Actividad antioxidante in vitro y analisis fitoquimico cualitativo de dos especies de Vismia (Hypericaceae) recolectadas en Los Andes, Venezuela. **Revista de Biología Tropical**, v. 64, n. 4, p. 1431-1440, 2016.

CABISCOL CATALÀ, E.; TAMARIT SUMALLA, J.; ROS SALVADOR, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **International Microbiology**, 2000, v. 3, n. 1, p. 3-8, 2000.

CHIANG, L. C. et al. In vitro evaluation of antileukemic activity of 17 commonly used fruits and vegetables in Taiwan. **LWT-Food Science and Technology**, v. 37, n. 5, p. 539-544, 2004.

CHISTÉ, R. C. et al. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 419-426, 2011.

CHISTÉ, R. C. et al. The potential of extracts of Caryocar villosum pulp to scavenge reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1740-1749, 2012.

CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of carotenoids and phenolic compounds from the Amazonian fruit Caryocar villosum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 23, p. 5884-5892, 2012.

CHISTÉ, R. C. et al. Carotenoids are effective inhibitors of in vitro hemolysis of human erythrocytes, as determined by a practical and optimized cellular antioxidant assay. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 9, p. H1841-H1847, 2014.

CHUNG, K. K.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Nitric oxide, S-nitrosylation and neurodegeneration. **Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 51, n. 3, p. 247-254, 2005.

CLYDESDALE, F. M. Color as a factor in food choice. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 1, p. 83-101, 1993.

COE, F. G. Rama midwifery in eastern Nicaragua. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, n. 1, p. 136-157, 2008.

COMMISSION DIRECTIVE 95/45/EC. Laying down specific purity criteria concerning colours for use in foodstuffs. **Official Journal of the European Community**, L226: 1-41, 1995.

COSTA, S. M. D. et al. Characterization of fresh *Beta vulgaris* from Santiago del Estero (Argentina). Nutrient and carotenoid content of stem and leaves. **Food Science and Technology**, v. 23, n. 1, p. 33-37, 2003.

DAVIS, C. D.; MILNER, J. A. Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 10, p. 743-752, 2009.

DAWILAI, S. et al. Anti-inflammatory activity of bioaccessible fraction from *Eryngium foetidum* leaves. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

DEVI, K. P. et al. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. **Pharmacological Research**, v. 99, p. 1-10, 2015

DIMITROVA, M. et al. Antioxidant activity and secondary metabolites in different extracts of *Euphrasia officinalis* L. growing in Bulgaria. **Science & Technologies. Medicine**, p. 128-132, 2013.

DORMAN, H. J. D. et al. Characterization of antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs, **Food Chemistry**, v. 83, p. 255-262, 2003.

DREOSTI, I, E. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 16, n. 7-8, p. 692, 2000.

DUKE, J. A. Duke's handbook of medicinal plants of Latin America. crc press, 2008.

EISENHAUER, B. et al. Lutein and zeaxanthin-food sources, bioavailability and dietary variety in age-related macular degeneration protection. **Nutrients**, v. 9, n. 2, p. 120, 2017.

FANG, Y.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Nutrition**, v. 18, p. 872-879, 2002.

FREITAS, M.; LIMA, J. L.; FERNANDES, E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. **Analytica Chimica Acta**, v.649, p.8–23, 2009.

FORMAN, H. J.; TORRES, M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 166, n. supplement_1, p. S4-S8, 2002.

FRANKE, A. A. et al. Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, n. 1, p. 1-35, 2004.

FRANKEL, E. N.; FINLEY, J. W. How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 13, p. 4901-4908, 2008.

GARCIA, M. D. et al. Topical antiinflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation models. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of**

Natural Product Derivatives, v. 13, n. 1, p. 78-80, 1999.

GEORGE, J.P.; DATTA, A. K. Desenvolvimento and validation of heat and massa transfer models for freeze-drying of vegetable slices. **Journal of Food Engineering**, v 52, pp.89-93. 2002.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 65, n. 2-3, p. 45-80, 2005.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. C. Use of fluorescence probes for detection of reactive nitrogen species: A review. **Journal of Fluorescence**, v.16, p.119–139, 2006.

GOMES, R. F. et al. Produção de chicória da Amazônia cultivada sob densidades de cultivo e poda do pendão floral. **Revista Caatinga**, v. 26, n. 3, p. 9-14, 2013.

GORELIK, S. et al. The stomach as a “bioreactor”: when red meat meets red wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 13, p. 5002-5007, 2008.

GROSSO, G. et al. Dietary flavonoid and lignan intake and mortality in prospective cohort studies: Systematic review and dose-response meta-analysis. **American Journal of Epidemiology**, v. 185, n. 12, p. 1304-1316, 2017.

DE GUSMÃO, S. A. L. et al. Caracterização do cultivo de chicória do Pará nas áreas produtoras que abastecem a grande Belém. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p.1-4, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine, 4ed. Clarendon, Oxford, UK; 2007.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

IACOPINI, P. et al. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content,

in vitro antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 8, p. 589-598, 2008.

JARAMILLO, S. et al. The flavonol isorhamnetin exhibits cytotoxic effects on human colon cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 20, p. 10869-10875, 2010.

JOVANOVIC, S. V. S. S. Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. **Flavonoids in Health and Disease**, p. 137-161, 1997.

KALA, C. P. Ethnomedicinal botany of the Apatani in the Eastern Himalayan region of India. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 1, n. 1, p. 11, 2005.

LABAT-ROBERT, J.; ROBERT, L. Longevity and aging. Role of free radicals and xanthine oxidase. A review. **Pathologie Biologie**, v. 62, p. 61-66, 2014.

LANS, C. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, n. 1, p. 13, 2007.

LEONG, L. P.; SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. **Food Chemistry**, v. 76, n. 1, p. 69-75, 2002.

LEONTOWICZ, M. et al. Two exotic fruits positively affect rat's plasma composition. **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 192-200, 2007.

LEOPOLDINI, M. et al. Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 108, n. 22, p. 4916-4922, 2004.

LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 288-306, 2011.

LIU, R. et al. Lutein and zeaxanthin supplementation and association with visual function in

age-related macular degeneration. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 56, n. 1, p. 252-258, 2015.

LUSHCHAK, V. I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 175-190, 2011.

MATÉS, J. M. et al. Roles of dioxins and heavy metals in cancer and neurological diseases using ROS-mediated mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 9, p. 1328-1341, 2010.

MAZZA, G.; GIRARD, B. Functional grape and citrus products. In: **Functional Foods Biochemical and Processing Aspects**. Lancaster: Technomic Publishing Co, p. 139-159. 1998.

MENDIS, E. et al. An in vitro cellular analysis of the radical scavenging efficacy of chitooligosaccharides. **Life Sciences**, v. 80, n. 23, p. 2118-2127, 2007.

MILANI, A. et al. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1290-1324, 2017.

MORAIS, F. F.; MORAIS, R. F.; DA SILVA, C. J. Conhecimento ecológico tradicional sobre plantas cultivadas pelos pescadores da comunidade Estirão Comprido, Pantanal matogrossense, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 4, n. 2, p. 277-294, 2009.

NANASOMBAT, S.; TECKCHUEN, N. Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 5, p. 443-449, 2009.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 4, p. 503-515, 2010.

OKONOJI, S. et al. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 839-846, 2007.

PAUL, J. H.; SEAFORTH, C. E.; TIKASINGH, T. *Eryngium foetidum* L.: a review. **Fitoterapia**, v. 82, n. 3, p. 302-308, 2011.

PEREZ JUNIOR, J. H.; OLIVEIRA, L. M. D.; COSTA, R. G. **Gestão estratégica de custos**. São Paulo: Atlas, v. 2, 1999.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PINTO, I.C.; MACEDO, R.L.G. Agricultura Familiar nas Várzeas do Alto Rio Amazonas. **Cadernos de Agroecologia**, [S.l.], v. 4, n. 1, dec. 2009. ISSN 2236-7934. Disponível em: <<http://revistas.aba-agroecologia.org.br/index.php/cad/article/view/3813>>. Acesso em: 24 abril. 2019.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

RAMIREZ-TORTOSA, C. et al. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 9, p. 1033-1037, 2001.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: review. **Journal of Food Engineering, Oxford**, v. 49, n. 2, p. 311-319, 2001.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RIVERA, S.M.; CANELA-GARAYOA, R. Analytical tools for the analysis of carotenoids in

diverse materials. **Journal Chromatography A**, v. 1224 p.1–10, 2012.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington: ILSI press, 2001.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. et al. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoids composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 445–463, 2008.

RODRIGUES, E. Plants of restricted use indicated by three cultures in Brazil (Caboclo-river dweller, Indian and Quilombola). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 295-302, 2007.

ROJAS, J.; BUITRAGO, A. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Biosynthesized by Plants and Its Relationship with Prevention of Neurodegenerative Diseases. In: **Bioactive Compounds**. Woodhead Publishing, 2019. p. 3-31.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.

SANTAS, J. et al. Comparison of the antioxidant activity of two Spanish onion varieties. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 1210-1216, 2008.

SAYRE, L. M.; PERRY, G.; SMITH, M. A. Oxidative stress and neurotoxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 172-188, 2007.

SCHULZ, M. et al. Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. **Food Research International**, v. 77, p. 125-131, 2015.

SHE, M.; WATSON, M. *Eryngium* Linnaeus, Sp. Pl. 1: 232.1753. **Flora of China**, v. 14, n. 1,

p. 23-24, 2005.

SILVA, H. D. et al. Nanoemulsions of β -carotene using a high-energy emulsification–evaporation technique, J. **Journal of Food Engineering**, v.102, p.130– 135, 2011.

SILVA, J. A. **Tópicos da tecnologia de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2000.

SINGH, S. et al. Estimation of proximate composition, micronutrients and phytochemical compounds in traditional vegetables from Andaman and Nicobar Islands. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 62, n. 7, p. 765-773, 2011.

SINGH, S. et al. Determination of bioactives and antioxidant activity in *Eryngium foetidum* L.: a traditional culinary and medicinal herb. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 83, n. 3, p. 453-460, 2013.

TACHAKITTIRUNGROD, S.; OKONOGLI, S.; CHOWWANAPOONPOHN, S. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 381-388, 2007.

URSACHE, F.M. et al. Valorizations of carotenoids from sea buckthorn extract by microencapsulation and formulation of value-added food products. **Journal of Food Engineering**, v. 219, p. 16- 24, 2018.

VALKO, M.; JOMOVA, K.; LAWSON, M. Mechanisms of antioxidant activity. In: **Food oxidants and antioxidants: chemical, biological, and functional properties**, ed. G. Bartosz, CRC Press, Taylor & francis group, Boca Raton, FLp. 325-342. 2013

VAN DIE, M. et al. Soy and soy isoflavones in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **BJU International**, v. 113, n. 5b, p. E119-E130, 2014.

VAUZOUR, D. et al. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. **Genes & Nutrition**, v. 3, n. 3, p. 115, 2008.

VERTUANI, S.; ANGUSTI, A.; MANFREDINI, S. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 14, p. 1677-1694, 2004.

VILLACHICA, H. et al. **Frutales y hortalizas promissórios de la Amazônia**. Lima: Tratado de Cooperacion Amazônica, 385p. 1999

WONG, S. P.; LEONG, L. P.; KOH, J. H. W. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. **Food Chemistry**, v. 99, n. 4, p. 775-783, 2006.

ZAGHDOUDI, K. et al. Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (*Diospyros kaki* L.), peach (*Prunus persica* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.). **Food Chemistry**, v. 184, p. 131-139, 2015.

ZÁRATE, N. A. H. et al. Produção agroeconômica de três variedades de alface: cultivo com e sem amontoa. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 4, p. 646-653, 2010.

ZHU, F.; DU, B.; XU, B. Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 8, p. 1260-1270, 2018.

Artigo 1

Amazonian *Eryngium foetidum* leaves exhibited very high contents of bioactive compounds and high singlet oxygen quenching capacity

Manuscrito do artigo publicado no International Journal of Food Properties (Qualis A2, Capes).

<https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1811311>

A versão publicada pode ser encontrada no Anexo A.

ABSTRACT

Phenolic compounds and carotenoids profile of Amazonian *Eryngium foetidum* leaves and the quenching ability of their hydrophilic extract against singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) were determined. Chlorogenic acid (4327 $\mu\text{g/g}$, dry basis, d.b.) was the major phenolic compound in the leaves at very high concentrations, while lutein (205 $\mu\text{g/g}$, d.b.) and β -carotene (161 $\mu\text{g/g}$, d.b.) were the major carotenoids. The extract of *E. foetidum* leaves was able to scavenge DPPH \bullet (91.6% at 5 mg/mL), ABTS \bullet^+ (15.77 μM Trolox equivalent/g extract) and it exhibited high efficiency to protect tryptophan against $^1\text{O}_2$, with IC_{50} at 343 $\mu\text{g/mL}$ and 78% of protection at the highest tested concentration (625 $\mu\text{g/mL}$). Therefore, *E. foetidum* leaves can be exploited as an accessible natural source of bioactive compounds with antioxidant properties to be used by the food or pharmaceutical industries.

Keywords: Amazonian plant; phenolic compounds; carotenoids; antioxidant capacity; LC-MS

1 INTRODUCTION

Most of the natural vegetal resources found in Amazonia are exceptionally rich in bioactive compounds with antioxidant properties (RIBEIRO et al., 2014; BERTO et al., 2015a, 2015b). Given this scenario, *E. foetidum*, a green leafy native of the Amazon region and Central America, is known as “chicory” in the Amazonian States of Brazil, has been included among the main non-conventional cultivated vegetables (MAPA, 2018) and it has attracting the attention of researchers for its versatility as both phytotherapeutic plant and spice herb in Amazonian dishes (GARCÍA et al., 1999; SINGH et al., 2011).

The chemical evaluation of *E. foetidum* leaves indicated a high concentration of phenolic compounds (total tannins and total flavonoids, as determined by spectrophotometry), presence of saponins, carotenoids, ascorbic acid, various triterpenoids, as well as antioxidant and anti-inflammatory activities (GARCÍA et al., 1999; SINGH et al., 2011, 2013). However, as far as we are concerned, there is no data in the literature describing the composition of individual phenolic compounds and carotenoids from *E. foetidum* leaves.

The importance of describing the composition of bioactive compounds in vegetables has been widely reported, due to the association between their ingestion and the decrease of the risk of developing chronic degenerative diseases, such as arteriosclerosis, cataracts, macular degeneration, cancer and others (PEREIRA et al., 2014; ROJAS; BUITRAGO, 2019).

Bioactive compounds, such as phenolic compounds and carotenoids, play important role in human health due to modulatory effects on physiological or cellular activities. As examples, these compounds were reported to inhibit the induction of several proinflammatory cytokines and the impairment of endogenous antioxidant enzymatic systems during inflammation (RIBEIRO et al., 2015), and they are frequently associated with changes in the expression of genes implicated in cancer development, transcription, apoptosis, xenobiotic metabolism, inflammation, redox process, among others (POKIMICA; GARCÍA-CONESA, 2018). Furthermore, one of the main biological actions of these compounds is related to their antioxidant capacity to scavenge reactive species, such as reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species. ROS and RNS exert normal physiological functions in the human organism; however, the overproduction of these species can damage cellular components, such as proteins, lipids and DNA, inducing the increased development of chronic degenerative diseases and premature aging (ROJAS; BUITRAGO, 2019).

Considering that *E. foetidum* leaves are widely used in traditional dishes in the Amazonia, the knowledge concerning their bioactive compound profiles and the associated antioxidant capacity are of paramount importance to support any claimed potential health benefits. Therefore, this study was designed to carry out the identification and quantification of phenolic compounds and carotenoids, by HPLC-DAD-MS/MS, in *E. foetidum* leaves cultivated in the Amazonia, as well as to evaluate the *in vitro* antioxidant potential of their hydrophilic extract against singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) free radicals.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 CHEMICALS

Quercetin, all-*trans*- β -carotene, gallic acid, chlorogenic acid, ethanol, methanol, methyl *tert*-butyl ether (MTBE), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-

2-carboxylic acid), potassium persulphate, methylene blue (MB), L-tryptophan, acetonitrile, formic acid, and all other analytical grade salts and solvents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Ultrapure water was obtained from the Pro arium® system (Sartorius, Germany). For chromatographic analysis, samples and solvents were filtered using 0.22 and 0.45 µm Millipore membranes, respectively (Billerica, MA, USA).

2.2 SAMPLES

Fifty plants were collected in ten rows of a producing property in Santa Izabel, Pará State, Brazil (Latitude: -1.29938, Longitude: -48.161, 1°17'58"South, 48°9'40"West), in July 2017. The *E. foetidum* leaves (approximately 500 g) were washed with distilled water and dried at 25 °C/2 h. After that, part of the material was used to the proximate composition characterization and another one was freeze-dried (Liotop, L101, São Paulo, Brazil) at -55 °C, in a continuous vacuum for 24 h and used for the bioactive compound determination and the assessment of the in vitro antioxidant capacity. The freeze-dried leaves were grinded, vacuum packed in plastic bags and stored under free-light conditions at -18 °C until analysis.

2.3 PROXIMATE COMPOSITION

Analysis of moisture, ashes, lipids and protein (conversion factor of 5.75 of total nitrogen to total protein for plants) were determined according to AOAC (2000). Carbohydrate were calculated by difference [Total carbohydrates=100-(%moisture+% ashes+% total proteins+% total lipids)]. Total energetic value was calculated according to the specific Atwater conversion factor for vegetables, as follows: total energetic value (kcal/100g)=(protein×2.44kcal/g)+(lipid×8.37kcal/g)+(total carbohydrate×3.57kcal/g) (FAO/WHO, 2003). The experiments were carried out in triplicate and expressed in g/100 g (%) (fresh weight, f.w.).

2.4 BIOACTIVE COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT CAPACITY

2.4.1 Equipment

The identification of carotenoids and phenolic compounds in the samples was carried out in a Shimadzu HPLC (Prominence UFLC model, Kyoto, Japan) equipped with a binary pump (LC-20AD), a degasser unit (DGU-20A3R), an automatic injector (SIL-20AHT), an oven (CTO-20A), a DAD detector (SPD-M20A) and connected in series to a MS from Bruker Daltonics (Amazon speed ETD, Bremen, Germany) with an ion-trap as the m/z analyzer and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and electrospray (ESI) and as the ionization sources for carotenoids and phenolic compounds, respectively. The quantification of phenolic compounds and carotenoids was carried out in an Agilent HPLC (Agilent 1260 Infinity model, Santa Clara, CA, USA) equipped with a quaternary pump (G1311C), an automatic injector (G7129), an oven (G1316A) and a DAD detector (G1328C).

2.4.2 Bioactive compounds

The carotenoids were extracted from 0.5 mg of freeze-dried leaves and the final extract was solubilized in MTBE and filtered immediately before injecting into the HPLC systems. The carotenoids were separated on a C30 YMC column (5 μm , 250 mm \times 4.6 mm) at 29 °C, with a linear gradient of methanol (solvent A) and MTBE (solvent B) at 0.9 mL/min.¹⁴ The UV-Visible spectra were recorded between 200 and 600 nm and the chromatograms were processed at 450 nm. The column eluent was directed to the APCI interface, the MS spectra were obtained after ionization in the positive ion mode, with a scan interval at m/z 100 to 800, and the MS parameters were set as described by Chisté and Mercadante (2012). The carotenoids were identified according to the following combined information: elution order and retention time at C₃₀ column, co-elution with authentic standards, UV-visible [λ_{max} , spectral thin structure (%III/II) and *cis* peak intensity (%AB/AII)] and MS spectra, in comparison to the analyzed standards and data available in the literature (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007a, 2007b; FARIA; DE ROSSO; MERCADANTE, 2009; FARIA et al., 2009; CHISTÉ; MERCADANTE, 2012; BERTO et al., 2015a, 2015b). The identification of *cis* isomers of carotenoids was carried out based on the observed decrease in %III/II values and increase in %A_B/A_{II} values (\approx 7-11% = 9-*cis*, \approx 45% = 13-*cis* and \approx 56% = 15-*cis* carotenoid) (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007a).

The carotenoids were quantified using β -carotene as the external standard at concentrations varying from 3.12 to 100 $\mu\text{g/mL}$ [$R^2 = 0.99$, limit of detection (LOD) = 0.97

$\mu\text{g/mL}$ and limit of quantification (LOQ) = 2.96 $\mu\text{g/mL}$ and lutein [$R^2 = 0.98$, LOD = 0.20 $\mu\text{g/mL}$ and LOQ = 0.62 $\mu\text{g/mL}$]. The LOD and LOQ were calculated using the parameters of the analytical curves (standard deviation and slope) ICH (2005). For the calculation of the vitamin A content, the NAS-IOM conversion factor was used, considering 12 μg of all-*trans*- β -carotene in the extract corresponding to 1 μg of retinol activity equivalent (RAE), and the activity was of 100% for all-*trans*- β -carotene (NAS-IOM, 2001). The carotenoid contents were expressed in $\mu\text{g/g}$ (dry basis, d.b.), considering three independent extraction procedures ($n = 3$). The phenolic compounds were extracted from the freeze-dried leaves (0.5 g) with a methanol/water solution (80:20 v/v), were separated on a C18 Synergi Hydro column (Phenomenex, 4 μm , 250 \times 4.6mm), set at 29 °C. The UV-visible spectra were obtained between 200 and 600 nm, and the chromatograms were processed at 270, 320 and 360 nm. The MS spectra were obtained at m/z from 100 to 1000 after ionization in an ESI source (CHISTÉ; MERCADANTE, 2014). The phenolic compounds were identified based on the following data: elution order and retention times, UV-visible and MS spectra features in comparison with authentic standards (data not shown) and analyzed under the same conditions and data available in the literature (RIBEIRO et al., 2014; CHISTÉ; MERCADANTE, 2014; PEREIRA et al., 2014). Quantitation was carried out by external standards with six-point analytical curves (3.12 – 100 $\mu\text{g/mL}$, in duplicate): quercetin (360 nm, $R^2 = 0.99$, LOD = 0.15 $\mu\text{g/mL}$ and LOQ = 0.62 $\mu\text{g/mL}$), kaempferol (360 nm, $R^2 = 0.99$, LOD = 0.15 $\mu\text{g/mL}$ and LOQ = 0.62 $\mu\text{g/mL}$) and chlorogenic acid (320 nm, $R^2 = 0.99$, LOD = 0.15 $\mu\text{g/mL}$ and LOQ = 0.62 $\mu\text{g/mL}$). The contents were expressed in $\mu\text{g/g}$ of freeze-dried leaves (d.b.), considering three independent extraction procedures ($n = 3$).

2.4.3 *In vitro* antioxidant capacity

The extracts of *E. foetidum* leaves used for the antioxidant capacity assays were obtained according to the same procedure described for phenolic compounds identification.

Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay was determined according to a procedure proposed by Re et al., (1999) with modifications. Aliquots of 30 μL of *E. foetidum* leaf extracts reacted with ABTS \bullet^+ and the absorbance was read at 734 nm after 6 min. The antioxidant capacity was calculated using analytical curves (duplicate) of trolox at concentrations varying from 102- 2048 μM and the results were expressed in μM Trolox equivalent (TE)/g leaves (f.w.).

The DPPH assay was carried out according to the procedure described by Cheng; Moore; Yu (2006), by monitoring the reaction between the *E. foetidum* leaf extracts and DPPH radical at 515 nm after 27 min. The antioxidant capacity was calculated according to Eq. 1 and the results were expressed as % of inhibition of the DPPH[•] (d.b.).

$$\% \text{ of inhibition of the } DPPH^{\bullet} = \frac{(A1-A0)}{(A0)} \times 100 \quad \text{Equation 1}$$

where, A1: absorbance before reaction (DPPH[•] + methanol), A0: absorbance after reaction (DPPH + extract).

The quenching ability of *E. foetidum* leaf extract against singlet oxygen (¹O₂) was carried out according to the procedure described by Siqueira et al., (2019). The extracts (125 to 600 µg/mL) and quercetin standard (positive control) (0.78 to 4.75 µg/mL) were tested at four concentrations. The kinetic data obtained from the decay intensity of TRP absorbance at 219 nm were fitted to a first order reaction (Equation 2) using Origin Pro 8 software (OriginLab Corporation, Northampton, MA) and the rate constants were calculated (Equation 3). The percentage of protection of TRP that the *E. foetidum* extracts (EXT) or quercetin exhibited against ¹O₂ was calculated through Equation 4.

$$Y = Y_{\infty} + A \cdot \exp(-k \cdot x) \quad \text{Equation 2}$$

$$k = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \quad \text{Equation 3}$$

$$\text{Protection (\%)} = \frac{k_{obs}^{TRP} - k_{obs}^{TRP+EXT}}{k_{obs}^{TRP}} \times 100 \quad \text{Equation 4}$$

where Y is the absorbance of TRP; Y_{∞} is the absorbance of TRP in infinite time; A is a pre-existing factor; k is a pseudo-first order rate constant; x is the reaction time; $t_{1/2}$ is the half-life time (min); k_{obs}^{TRP} is the observed pseudo-first order rate constant fitted to the TRP decay curve (obtained in the blank experiment); and $k_{obs}^{TRP+EXT}$ is the observed pseudo-first order rate constant fitted to the TRP decay curve in the presence of the *E. foetidum* extract (EXT) or quercetin standard.

3 RESULTS AND DISCUSSION

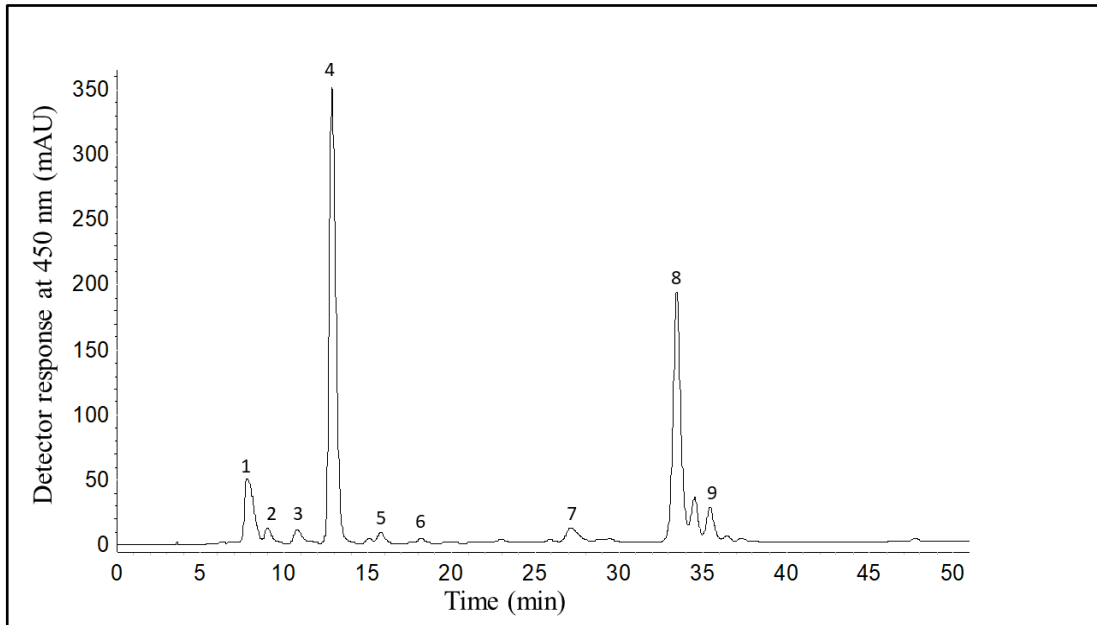
3.1 PROXIMATE COMPOSITION OF *Eryngium foetidum* LEAVES

The main chemical constituents of the *E. foetidum* leaves showed a moisture content of $\approx 87\%$, similar to those reported for *E. foetidum* leaves cultivated in Asia (SINGH et al., 2011) and Alta Verapaz, in Guatemala (BOOTH; BRESSANI; JOHNS, 1992) with values varying from 86 to 89%. The lipid content (2.8%) and protein content (1.99%) were approximately 10 and 3 fold higher, respectively, than those reported for the leaves of *E. foetidum* from Andaman and Nicobar Islands (SINGH et al., 2011). The values of carbohydrates were 1.5 times higher than those found for the leaves of *E. foetidum* from Alta Verapaz (Guatemala) (BOOTH; BRESSANI; JOHNS, 1992). Regarding the energetic value, the leaves of *E. foetidum* exhibited 52.23 (± 5.46) kcal/100 g.

3.2 CAROTENOID PROFILE OF *Eryngium foetidum* LEAVES

The HPLC-DAD-APCI-MSⁿ analysis allowed the identification and quantification of nine carotenoids. The MS/MS experiment confirmed the assignment of the protonated molecule ($[M+H]^+$) of all carotenoids identified through the expected fragments from the polyene chain of carotenoids and functional groups, along with the UV-Vis spectra (Figure 1, Table 1). Peak 1 was tentatively identified as a mix of all-*trans*-violaxanthin + 9-*cis*-neoxanthin due to the presence of a protonated molecule ($[M+H]^+$) at m/z 601 and fragments at m/z 583, 565, and 547 corresponding to neutral losses of one, two and three OH groups (-18 u), respectively, along with a fragment at m/z 509, showing the neutral loss of a toluene moiety ($[M+H-92]^+$). In addition, other fragments were detected at m/z 393, resulting from the cleavage of the allylic double bond to the allenic carbon (9-*cis*-neoxanthin), as well as the fragment at m/z 221 corresponding to the presence of a β -ring epoxy substituent with a OH group (FARIA et al., 2009a; DE ROSSO; MERCADANTE, 2007a, 2007b). This same carotenoid mixture was previously reported in Brazilian loquat (FARIA et al., 2009b).

Figure 1 – HPLC-DAD chromatogram of the carotenoids of Amazonian *Eryngium foetidum* L. leaves.



Notes: Peak identification: **1** = Mix of all-*trans*-violaxanthin+9-*cis*-neoxanthin; **2** = all-*trans*-Luteoxanthin; **3** = Mix of *cis*-lutein + epoxy-carotenoid; **4** = all-*trans*-Lutein; **5** = all-*trans*-Zeaxanthin; **6** = 9-*cis*-Lutein; **7** = 13-*cis*- β -Carotene; **8** = all-*trans*- β -Carotene; **9** = 9-*cis*- β -Carotene.

Table 1 – Chromatographic, UV-Visible, mass spectroscopy characteristics and content of carotenoids from *Eryngium foetidum* leaves, obtained by HPLC-DAD-APCI-MS/MS.

(to be continued)

Peak	Carotenoid ^a	Concentration ($\mu\text{g/g}$ leaves) ^b	t_R (min) ^c	λ_{max} (nm) ^d	% III/ II	% A _B /A _{II}	[M+H] ⁺ (m/z)	MS/MS (+) (m/z)
1	Mix of all- <i>trans</i> -violaxanthin + 9- <i>cis</i> -Neoxanthin ^f	43.81 \pm 6.97	7.6	415, 438, 468 326, 412, 435, 464	88 90	0 12	601	583[M+H-18] ⁺ , 565[M+H-18-18] ⁺ , 547[M+H-18-18-18] ⁺ , 509[M+H-92] ⁺ , 491[M+H-18-92] ⁺ , 393, 221
2	All- <i>trans</i> -luteoxanthin ^f	12.84 \pm 1.92	8.8	398, 421, 448	100	0	601	583 [M+H-18] ⁺ , 565 [M+H-18-18] ⁺ , 547[M+H-18-18-18] ⁺ , 509[M+H-92] ⁺ , 491[M+H-18-92], 221
3	Mix of <i>cis</i> -lutein + epoxy- carotenoid ^f	37.85 \pm 1.21	10.5	330, 420, 442, 470	50	24	585 ^e 569	567[M+H-18] ⁺ , 549[M+H-18-18] ⁺ , 531[M+H-18-18-18] ⁺ , 493[M+H-92] ⁺ , 475[M+H-18-92] ⁺ , 221 551[M+H-18] ⁺ , 533[M+H-18-18] ⁺ , 477[M+H-92] ⁺ , 463[M+H- 106] ⁺ , 459[M+H-18-92] ⁺
4	All- <i>trans</i> -lutein ^f	204.86 \pm 3.15	12.8	420, 444, 472	64	0	569	551[M+H-18] ⁺ , 533[M+H-18-18] ⁺ , 477[M+H-92] ⁺ , 463[M+H- 106] ⁺ , 459[M+H-18-92] ⁺
5	All- <i>trans</i> -zeaxanthin ^f	9.37 \pm 0.42	15.3	420, 450, 477	33	0	569	551[M+H-18] ⁺ , 533[M+H-18-18] ⁺ , 477[M+H-92] ⁺
6	9- <i>cis</i> -Lutein ^f	33.42 \pm 0.21	18.4	332, 420, 444, 472	60	nc	569 ^e	551[M+H-18] ⁺ , 533[M+H-18-18] ⁺ , 477[M+H-92] ⁺ , 459[M+H- 18-92], 431
7	13- <i>cis</i> - β -carotene ^f	20.55 \pm 5.11	28.9	337, 420, 444, 469	11	46	537	444[M-92] ⁺
8	All- <i>trans</i> - β -carotene ^f	160.73 \pm 17.62	32.9	420, 451, 478	29	0	537	444[M-92] ⁺

Table 1 – Chromatographic, UV-Visible, mass spectroscopy characteristics and content of carotenoids from *Eryngium foetidum* leaves, obtained by HPLC-DAD-APCI-MS/MS.

(conclusion)

Peak	Carotenoid ^a	Concentration ($\mu\text{g/g}$ leaves) ^b	t_R (min) ^c	λ_{max} (nm) ^d	% III/ II	% A _B /A _{II}	[M+H] ⁺ (m/z)	MS/MS (+) (m/z)
9	9- <i>cis</i> - β -carotene ^f	29.70 ± 7.54	34.8	336, 420, 446, 472	25	9	537	444[M-92] ⁺
Total sum of carotenoids ($\mu\text{g/g}$ leaves)		552.57 ± 25.53						
Vitamin A value ($\mu\text{g RAE/g}$ leaves)^g		16.76 ± 0.29						

^aTentative identification based on Uv-Visible and mass spectra as well as relative HPLC retention times and published data. ^bMean \pm standard deviation (n = 3, dry weight) and the peaks were quantified as equivalent of β -carotene. ^cRetention time on C₃₀ column. ^dLinear gradient of methanol/MTBE. ^eIn-source detected fragment. ^fThe peaks were quantified as equivalent of β -carotene and lutein. ^gRAE=retinol activity equivalent.

Peak 2 was identified as all-*trans*-luteoxanthin due to the λ_{\max} at 421 nm and the high %III/II value (100%), which are characteristic of this epoxy-carotenoid, and also due to the [M+H]⁺ at m/z 601, and the fragment at m/z 583 [M+H-18]⁺, as well as the m/z 221, similar to that reported for Amazonian fruits (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007b).

Peak 3 was identified as a mixture of *cis*-lutein + epoxy-carotenoid because two protonated molecules were detected, one at m/z 585 and another at m/z 569. The m/z 585 showed fragments at m/z 567, 549 and 531, corresponding to consecutive losses of one, two and three hydroxyl groups, respectively, at m/z 493 [M+H-92]⁺ corresponding to the neutral loss of toluene, at m/z 475 [M+H-18-92]⁺ and at m/z 221. The [M+H]⁺ at m/z 569 showed the following characteristic lutein fragments: m/z 551 and m/z 533 due to the removal of one and two water molecules, respectively, together with the fragment at m/z 477, corresponding to the loss of toluene ([M+H-92]⁺), m/z 463 [M+H-106]⁺ corresponding to loss of a xylene group, as well as fragment at m/z 459 [M+H-92], resulting from the loss of toluene and one water molecule. These fragmentation patterns were also reported in *Couepia bracteosa* fruit (BERTO et al., 2015a, 2015b) and in *Dovyalis* and tamarillo fruits (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007a).

Peaks 4 and 5 were tentatively identified as all-*trans*-lutein and all-*trans*-zeaxanthin, respectively. Both the compounds are isomers and, therefore, present the same [M+H]⁺ at m/z 569. Lutein has a β -ring and a ϵ -ring and zeaxanthin two β -rings. Thus, one of the OH groups of lutein are allylic to the double bond in the ϵ -ring and not conjugated to the polyene chain, resulting in ten conjugated double bonds (c.d.w.). On the other hand, zeaxanthin the two β -rings double bonds are conjugated to the polyene chain and, consequently, the chromophore shows 11 c.d.w. Based on these characteristics, it is possible to identify these two compounds by the UV-visible and MS spectra features. As expected, λ_{\max} values of lutein were lower than those of zeaxanthin, the MS spectrum of all-*trans*-zeaxanthin showed a more intense [M+H]⁺ at m/z 569 compared to the m/z 551 [M+H-18]⁺ fragment, while the opposite was observed for lutein, as previously reported (CHISTÉ; MERCADANTE, 2012; DE ROSSO; MERCADANTE, 2007a; 2007b).

Peak 6 presented the same MS spectra features observed to all-*trans*-lutein and was identified as 9-*cis*-lutein, as its UV-visible spectra was similar to the all-*trans*-carotenoid, but taking into account the presence of the *cis* peak at 332 nm. Peaks 7, 8 and 9 showed the same [M+H]⁺ at m/z 537 with a characteristic neutral loss of toluene at m/z 444 [M-92]⁺. These peaks were identified as 13-*cis*- β -carotene, all-*trans*- β -carotene and 9-*cis*- β -carotene, respectively, based on their UV-visible characteristic differentiation as the increased %A_B/A_{II} values (\approx 7-11% = 9-*cis*; \approx 45% = 13-*cis*-carotenoid). Peaks 7 and 9 were characterized as *cis*-isomers

considering the presence of the *cis* peak at the 336-337 nm. The assignment of *cis*-isomers also considered that the fine spectral structure (%III/II) decreased and the intensity of the *cis* peak (%AB/AII) increased as the *cis*-double bond is approaching the center of the molecule (BERTO et al., 2015a). The identification of all-*trans*- β -carotene was positively confirmed by co-elution and comparison of the UV-Visible and MS spectra with an authentic standard.

The major carotenoids were all-*trans*-lutein (37%), and all-*trans*- β -carotene (29%), the other seven carotenoids represented approximately 25% of the total sum. The total sum of the carotenoids identified from the leaves of *E. foetidum* (Table 1) was which was high when compared to other plants, such as *Brassica oleracea*, broccoli (*B. oleracea* L. var. *Italica*) (222.8 - 367.6 $\mu\text{g/g}$ d.b.) and cauliflower (*B. oleracea* L. var. *Botrytis*) (36.5 - 146.8 $\mu\text{g/g}$ d.b.) (GUZMAN; YOUSEF; BROWN, 2012). The vitamin A value found in *E. foetidum* leaves was 16.76 μg RAE/g (d.b.). For vitamin A activity, it should be remembered that a carotenoid must have at least one unsubstituted β -ionone ring attached to the polyene chain with at least eleven carbons. According to these structural requirements, among the nine identified carotenoids, only β -carotene (100% conversion) and its isomers (50% conversion) showed vitamin A activity. Therefore, the main contribution to the total vitamin A value was from β -carotene (86.5%).

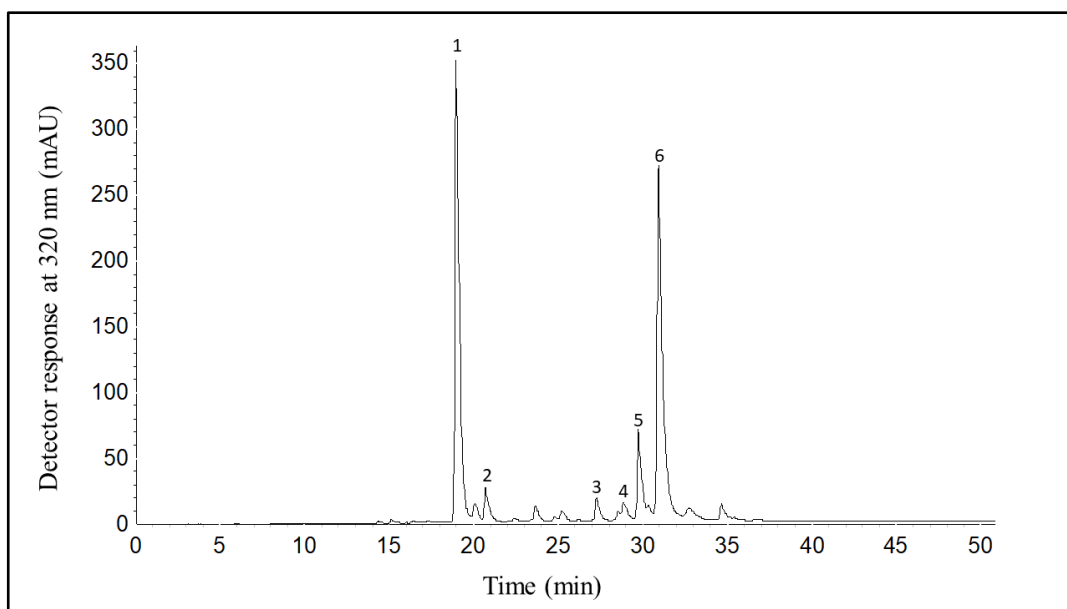
Scientific studies have shown a positive correlation between high fruit and vegetable intake, especially rich in lutein and zeaxanthin, with a reduced risk of macular degeneration (LIU et al., 2015; EISENHAUER et al., 2017). Other benefits are also associated with the ingestion of these pigments, such as reduction of the risk of cataract, protective effect against atherosclerosis, prevention of the onset and progression of some types of cancer and other chronic degenerative diseases (CALVO, 2005). Lutein and zeaxanthin contents reported here were higher than those reported previously for India mustard (lutein; 53.8 ± 4.2 ; zeaxanthin; 0.8 ± 0.1), broccoli (lutein; 1.4 ± 0.2 ; zeaxanthin; not detected), spinach (lutein; 43.7 ± 3.8 ; zeaxanthin; 0.7 ± 0.1), watercress (lutein; 42.8 ± 4.1 ; zeaxanthin; 0.4 ± 0.1), endive (lutein; 34.2 ± 4.0 ; zeaxanthin; 0.4 ± 0.1), lettuce (lutein; 2.0 ± 0.1 ; zeaxanthin; 0.1 ± 0.1) and cabbage (lutein; 2.5 ± 0.1 ; zeaxanthin; 0.1 ± 0.1) (MURILLO; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ; PORTUGAL, 2010). Importantly, the values indicated by Britton and Khachik (2009), to classify individual carotenoid levels as high (500-2000 $\mu\text{g}/100$ g or 5-20 $\mu\text{g}/\text{g}$) and very high (> 2000 $\mu\text{g}/100$ g or > 20 $\mu\text{g}/\text{g}$) suggested that *E. foetidum* leaves can be considered as a very high source of lutein and β -carotene and a high source of zeaxanthin. Furthermore, based on the daily intake ranges of carotenoids reported by Meléndez-Martínez (2019) the intake of 30

g of *E. foetidum* fresh leaves correspond to dietary intake of 7% and 156% of β -carotene and lutein, respectively.

3.3 PHENOLIC COMPOUNDS PROFILE OF *Eryngium foetidum* LEAVES

Regarding the profile of phenolic compounds, the HPLC-DAD-ESI-MSⁿ allowed the identification and quantification of six phenolic compounds (Table 2, Figure 2). Peak 1 was identified as chlorogenic acid since it exhibited a deprotonated molecule ($[M-H]^-$) at m/z 353 and an intense fragment at m/z 191 ($[M-H-162]^-$) corresponding to the loss of a caffeoyl moiety releasing quinic acid. Chlorogenic acid was the main phenolic compound found in leaf extract of *E. foetidum* accounting for 43.28% of the total sum, and was positively confirmed based on the same UV-visible features and MS fragmentation pattern observed for the authentic standard. The content of the chlorogenic acid found in this study (Table 2) was 9 times higher than that found in artichoke leaves (*Cynara cardunculus* var. *Scolymus* Hayek L.) (481 μ g/g, d.b.) (NOURAEI; RAHIMMALEK; SAEDI, 2018).

Figure 2 – HPLC-DAD chromatogram of phenolic compounds of *Eryngium foetidum* L. leaves.



Notes: Chromatographic conditions: see text. Peak characterization is given in Table 2. Peak identification: 1: Chlorogenic acid; 2: Feruloylquinic acid; 3: Quercetin glucuronide; 4: Luteolin hexoside; 5: Luteolin glucuronide; 6: Ferulic acid derivative.

Table 2 – Chromatographic, spectroscopic characteristics and content of phenolic compounds from *Eryngium foetidum* leaves, obtained by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ.

Peak	Phenolic compound ^a	Concentration ($\mu\text{g/g}$ leaves) ^b	t_R (min) ^c	λ_{max} (nm) ^d	$[\text{M} - \text{H}]^-$ (m/z)	MS^2 (-) (m/z) ^e	MS^3 (m/z) ^j
1	Chlorogenic acid ^f	4327.62 \pm 752.97	19.2	300(sh), 326	353	191 , 179, 173	[353 \rightarrow 191]: 127
2	Feruloylquinic acid ^f	147.66 \pm 19.64	23.3	265, 326	367	193	[367 \rightarrow 193]: 173
3	Quercetin glucuronide ^g	334.34 \pm 24.78	27.5	354	477	301	[477 \rightarrow 301]: 273, 257, 229, 179, 151, 107
4	Luteolin hexoside ^h	226.72 \pm 44.99	28.8	265,300(s), 347	447	327, 285 , 257	[447 \rightarrow 285]: 268, 257, 243, 229
5	Luteolin glucuronide ^h	1071.47 \pm 248.78	30.0	265, 347	461	285	[461 \rightarrow 285]: 268, 258, 243
6	Ferulic acid derivative ^f	3891.94 \pm 402.28	31.3	285(sh), 330	359	341, 225, 200, 182, 165, 137	[359 \rightarrow 165]: nd

(conclusion)

Total sum of phenolic ($\mu\text{g/g}$
leaves) 9999.76 ± 172.82

^aTentative identification based on Uv-Visible and mass spectra as well as relative HPLC retention times and published data. ^b $n = 3$ (dry weight). ^cRetention time on the C₁₈ Synergi Hydro (4 μm) column. ^dSolvent: gradient of 0.5% formic acid in water and acetonitrile with 0.5% formic acid. ^eIn the MS/MS, the most abundant ion is shown in boldface. Peaks were quantified as equivalent to ^fchlorogenic acid, ^gquercetin and ^hapigenin. ^jThe MS³ fragments were obtained from the most abundant ion in the MS/MS experiment.

Peak 2 was tentatively identified as feruloylquinic acid, with $[M-H]^-$ at m/z 367 and a MS^2 fragment at m/z 193 $[M-H-174]^-$, corresponding to ferulic acid after losing the quinic acid attached to the molecule. This fragmentation pattern corresponds to those previously described for feruloylquinic acid found in artichoke extracts (PISTÓN et al., 2014).

Peak 3 was identified as quercetin-glucuronide with $[M-H]^-$ at m/z 477 and MS^2 fragment at m/z 301 $[M-H-176]^-$ showing the quercetin molecule after the removal of a glucuronic acid unit. The fragments of quercetin (m/z 301) in the MS^3 experiment was the same as reported in studies where quercetin-glucuronide was identified (PEREIRA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2014).

Peaks 4 and 5 showed $[M-H]^-$ at m/z 447 and 461, respectively, and were identified as luteolin derivatives according to their UV-Visible and MS spectra and data available in the literature (PEREIRA et al., 2014; PISTÓN et al., 2014). Peak 4 presented an intense fragment at m/z 285 ($[M-H-162]^-$) in the MS^2 spectrum, corresponding to the loss of an hexose unit and was identified as a luteolin hexoside. Peak 5 was identified as luteolin glucuronide due to the same fragment at m/z 285 ($[M-H-176]^-$) in the MS^2 spectrum, which corresponds to the loss of one glucuronic acid unit. Both the peaks showed the same fragmentation pattern for luteolin (m/z 285) in the MS^3 spectra, as compared to previous data (PEREIRA et al., 2014; PISTÓN et al., 2014). The intake of luteolin and apigenin (flavones) in the diet is usually lower than that of flavonols, such as quercetin and kaempferol, since they occur in significant concentrations in few foods. A luteolin was identified in artichoke leaves with a concentration ranging from 53 (± 1) a 69 (± 2) $\mu\text{g} / \text{g}$ d.b. (NOURAEI; RAHIMMALEK; SAEIDI, 2018), whose values are lower than those reported in this study for leaves of *E. foetidum*.

Peak 6 exhibited the $[M-H]^-$ at m/z 359 with an MS^2 fragment at m/z 165 ($[M-H-194]^-$) corresponding to the loss of ferulic acid, being tentatively identified as a ferulic acid derivative. The MS characteristics of this compound were similar to those previously reported for ferulic acid derivatives in strawberry (*Fragaria ananassa*) (AABY; EKEBERG; SKREDE, 2007).

The content of phenolic compounds found in this study was higher than previously reported for leaves of *E. foetidum* from the Andaman and Nicobar Islands (India) whose value of 283.10 $\mu\text{g}/\text{g}$ (d.b.) (35 times less) was determined by spectrophotometry (SINGH et al., 2011). When compared to other plants, such as artichoke leaves (*Cynara cardunculus* var. Scolymus Hayek L.), the phenolic content of *E. foetidum* leaves was approximately 7 times higher (1387 $\mu\text{g}/\text{g}$, d.b.) (NOURAEI; RAHIMMALEK; SAEIDI, 2018). The average consumption of total phenolic compounds and, more specifically phenolic acids, by the Brazilian population was reported to be 460.15 and 314 mg/day, respectively (CORRÊA et al.,

2015). Based on this information, the ingestion of 30 g of *E. foetidum* leaves can contribute with $\approx 10.4\%$ and 8.5% of the total phenolic compounds and phenolic acids, respectively.

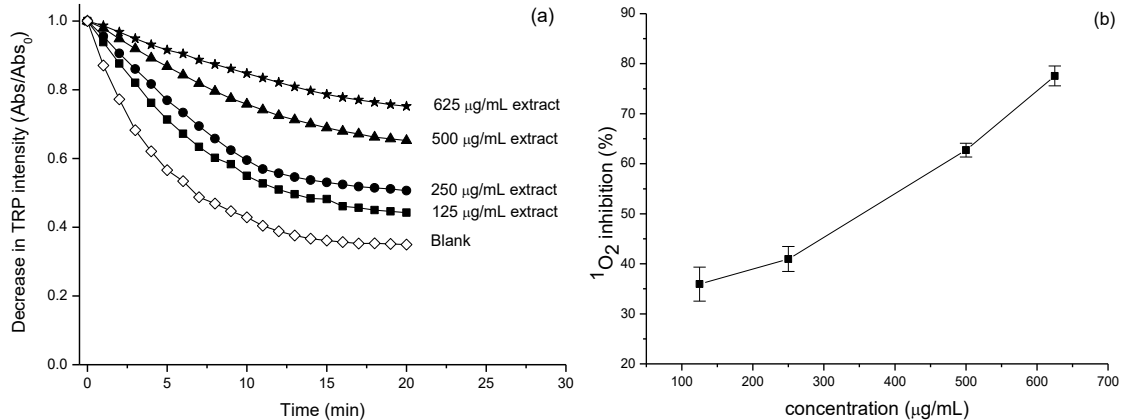
3.4 ANTIOXIDANT CAPACITY OF *Eryngium foetidum* LEAF EXTRACT

The methanolic extract of *E. foetidum* were able to scavenge both ABST and DPPH radicals. However, the leaf extract of *E. foetidum* showed low efficiency in removing ABTS $^{\bullet+}$ ($15.77 \pm 0.92 \mu\text{M Trolox} / \text{g, FW}$) when compared to *Arrabidaea chica* leaves (86.81 TE/g, FW) (SIQUEIRA et al., 2019). This is the first time that the scavenging capacity of *E. foetidum* leaf extract against ABTS $^{\bullet+}$ was reported. The methanolic extract of *E. foetidum* leaves may also be able to capture DPPH $^{\bullet}$ with inhibition percentage of $91.60 \pm 0.45\%$ at the tested concentration of $0.06 \mu\text{g} / \text{g}$, a value similar to that found for the extracts of *E. foetidum* leaves previously reported by Singh et al., (2013) (92.7%), but superior to the authors of a previous study (73.93%) (SINGH et al., 2011).

ABTS $^{\bullet+}$ and DPPH $^{\bullet}$ are stable, synthetic and non-biological free radicals; however, due to their chemical stability, sensitivity and operational ease in antioxidant capacity protocols, they are widely used in determining the in vitro antioxidant potential of isolated compounds or plant extracts from food samples (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Regarding the $^1\text{O}_2$ -quenching capacity, the extract of *E. foetidum* leaves, at the studied concentrations, was efficient to inhibit tryptophan degradation, as induced by the photosensitization reaction in the presence of methylene blue, showing excellent fitting to first order reaction, with a high determination coefficient ($R^2 = 0.99$) (Fig. 3a). According to Figure 4b, $^1\text{O}_2$ was inhibited in a concentration-dependent manner and the extract of *E. foetidum* leaves presented an IC_{50} at $343.32 \mu\text{g/mL}$ with high percentage of protection (77.50%) at the highest tested concentration ($625 \mu\text{g/mL}$). Quercetin (positive control) showed higher $^1\text{O}_2$ -quenching ability (IC_{50} of $1.9 \mu\text{g/mL}$) than the extracts of *E. foetidum* leaves. The extract of *E. foetidum* leaves was more effective against $^1\text{O}_2$ than fruit extracts of *Terminalia chebula* ($\text{IC}_{50} = 424.50 \mu\text{g/ml}$) and *Emblica officinalis* (IC_{50} of $490.42 \mu\text{g/ml}$) (HAZRA et al., 2010). However, it was less efficient than the artichoke extracts ($\text{IC}_{50} = 20.5 - 30.1 \mu\text{g/ml}$) (PISTÓN et al., 2014) and for *Caryocar villosum* fruit extracts ($\text{IC}_{50} = 156 \mu\text{g/ml}$) (CHISTÉ et al., 2012).

Figure 3 – (a) Decay of the intensity of the absorbance of tryptophan in the presence of the methylene blue and extract of the *Eryngium foetidum* L. leaves and (b) percentage of inhibition of the $^1\text{O}_2$ as a function of the concentration of the extract of the *Eryngium foetidum* L. leaves.



Notes: The experiments were carried out in four concentrations and $n = 3$ (Mean \pm standard deviation).

$^1\text{O}_2$ is an important ROS with high reactivity that can be found both in human body and in food systems. The formation of $^1\text{O}_2$ can generate other physiological reactive species, such as alkyl (R^\bullet), alkoxy (RO^\bullet), organic hydroperoxides (ROOH), superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($^\bullet\text{OH}$) and peroxynitrite (ONOO^-), and these ROS are often responsible for several biological deleterious effects (BLÁZQUEZ-CASTRO; BREITENBACH; OGILBY, 2014; CARRASCO et al., 2015). Therefore, the investigation of plant extracts, such as *E. foetidum*, with high contents of bioactive compounds and high ability to inhibit $^1\text{O}_2$ is highly desirable to support and stimulate deeper studies aiming the inhibition of the oxidation of biomolecules present in both the human body and food systems.

The high antioxidant potential of the *E. foetidum* leaf extract may be mainly attributed to the high contents of phenolic compounds in the hydrophilic extract (Table 2), which corroborates to the fact that the antioxidant action of phenolic compounds from plants is associated to the inhibition of the oxidizing effect of reactive species by delaying chain reactions and/or scavenging free radicals (PISTÓN et al., 2014; ROJAS; BUITRAGO, 2019). Chlorogenic acid was the major phenolic compound found in the extract of *E. foetidum* leaves, and epidemiological studies showed a positive association between the consumption of foods containing chlorogenic acid and health benefits (ABU-AMSHA et al., 1996; NATELLA et al., 2008; CLIFFORD; KERIMI; WILLIAMSON, 2020). These combined information makes Amazonian *E. foetidum* leaves an interesting plant source for research of food supplementation aiming increasing human health.

Importantly, the biological properties of chlorogenic acid, or any bioactive compound, depend on its bioavailability in the gut, which can be affected by several factors, such as the bioaccessibility of each compound, bioactive compounds–gut microbiota interactions, different mechanisms of absorption of water-soluble and lipid-soluble molecules, interactions with other nutrients, among others (REIN et al., 2012). Pharmacokinetic studies involving chlorogenic acid and its metabolites suggest that they bound to human serum albumin and/or may be sequestered in tissues to exhibit its biological activity (CLIFFORD; KERIMI; WILLIAMSON, 2020).

The relevance of researches on bioactive constituents from plants is fully justified by the association that fruits, vegetables, and food legumes are therapeutic agents useful for treating a wide range of human disorders (ZHU; DU; XU, 2018). Regarding the application on food industries, the safety concerns regarding some synthetic antioxidants could be relieved with the use of natural plant extracts with high contents of bioactive compounds at lower concentrations. Thus, *E. foetidum* leaves can be seen as a dietary source of natural antioxidants with potential health benefits whose consumption should be stimulated.

4 CONCLUSIONS

All-*trans*-lutein and all-*trans*- β -carotene were the major carotenoids in *E. foetidum* leaves, while chlorogenic acid and a ferulic acid derivative were the major phenolic compounds. Amazonian *E. foetidum* leaves, besides its traditional use in cooking and folk medicine, may represent a valuable source of bioactive compounds with antioxidant properties, with undeniable nutraceutical value and great potential to be explored and used in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. Furthermore, future systematic studies based on cellular antioxidant capacity assays should be applied to understand the protective effects of the bioactive compounds of this plant species on different oxidative/nitrosative stress pathways.

REFERENCES

- AABY, K.; EKEBERG, D.; SKREDE, G. Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 4395-4406, 2007.
- ABU-AMSHA, R. et al. Phenolic Content of Various Beverages Determines the Extent of

Inhibition of Human Serum and Low-Density Lipoprotein Oxidation in Vitro: Identification and Mechanism of Action of Some Cinnamic Acid Derivatives from Red Wine. **Clinical Science**, v. 91, p. 449-458, 1996.

AOAC (Association of Analytical Chemists), 2000. *Official methods of analysis*, 17th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.

BERTO, A. et al. Bioactive compounds and scavenging capacity of pulp, peel and seed extracts of the Amazonian fruit *Quararibea cordata* against ROS and RNS. **Food Research International**, v. 77, p. 236-243, 2015a.

BERTO, A. The seed of the Amazonian fruit *Couepia bracteosa* exhibits higher scavenging capacity against ROS and RNS than its shell and pulp extracts. **Food & Function**, v. 6, p. 3081-3090, 2015b.

BLÁZQUES-CASTRO, A.; BREITENBACH, T.; OGILBY, P. R. Singlet oxygen and ROS in a new light: low-dose subcellular photodynamic treatment enhances proliferation at the single cell level. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 13, p. 1235-1240, 2014.

BOOTH, S.; BRESSANI, R.; JOHNS, T. Nutrient content of selected indigenous leafy vegetables consumed by the Kekchi people of Alta Verapaz, Guatemala. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 5, p. 25-34, 1992.

BRITTON, G.; KHACHIK, F. Carotenoids in food. In: BRITTON, G., LIAAEN-JENSEN, S., PFANDER, H. (Eds.), **Carotenoids: Nutrition and health**. v. 5, Birkhauser, Basel, pp. 45-66, 2009.

CALVO, M. M. Lutein: A valuable ingredient of fruit and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 671-696, 2005.

CARRASCO, E. et al. Photoactivation of ROS Production in Situ Transiently Activates Cell Proliferation in Mouse Skin and in the Hair Follicle Stem Cell Niche Promoting Hair Growth and Wound Healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, p. 2611-2622, 2015.

CHENG, Z.; MOORE, J.; YU, L. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity

assay. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, p. 7429-7436, 2006.

CHISTÉ, R. C. et al. The potential of extracts of *Caryocar villosum* pulp to scavenge reactive oxygen and nitrogen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 135, p. 1740-1749, 2012.

CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of carotenoids and phenolic compounds from the Amazonian fruit *Caryocar villosum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5884-5892, 2012.

CLIFFORD, M.N.; KERIMI, A.; WILLIAMSON, G. Bioavailability and metabolism of chlorogenic acids (acyl-quinic acids) in humans. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, p. 1299-1352, 2020.

CORRÊA, V. G. et al. Estimate of consumption of phenolic compounds by Brazilian population. **Revista de Nutrição**, v. 28, p. 185-196, 2015.

DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9135-9141, 2007a.

DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5062-5072, 2007b.

EISENHAUER, B. et al. Lutein and zeaxanthin – Food sources, bioavailability and dietary variety in age-related macular degeneration protection. **Nutrients**, v. 9, p. 1-14, 2017.

FAO/WHO, 2003. Food energy—*methods of analysis and conversion factors. Report of a technical workshop*. FAO Food and Nutrition Paper No. 77 Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome <http://www.fao.org/3/Y5022E/y5022e00.htm>/Accessed 20 December 2018.

FARIA, A. F. et al. Cultivar influence on carotenoid composition of loquats from Brazil.

Journal of Food Composition and Analysis, v. 22, p. 196-203, 2009.

FARIA, A. F.; DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoid composition of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*), determined by HPLC-PDA-MS/MS. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 64, p. 108-115, 2009a.

GARCÍA, M. D. et al. Topical antiinflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation models. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 78-80, 1999.

GUZMAN, I.; YOUSEF, G. G.; BROWN, A. F. Simultaneous extraction and quantitation of carotenoids, chlorophylls, and tocopherols in Brassica vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7238-7244, 2012.

HAZRA, B. et al. Comparative study of the antioxidant and reactive oxygen species scavenging properties in the extracts of the fruits of *Terminalia chebula*, *Terminalia belerica* and *Emblica officinalis*. **BCM Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, p. 1-15, 2010.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

ICH, 2005. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). *Guidance for industry, Q2B validation of analytical procedures: Methodology*. Geneva: ICH Secretariat c/o IFPMA7–10.

LIU, R. et al. Lutein and zeaxanthin supplementation and association with visual function in age-related macular degeneration. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 56, p. 252-258, 2015.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2010. Manual de hortaliças não-convencionais. Brasília: MAPA/ACS, 92 p. Available on: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/vegetal/Qualidade/Qualidade%20dos%20Alimentos/manual%20hortali%C3%A7as_WEB_F.pdf. Acesso 10 fev. 2018.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J. An Overview of Carotenoids, Apocarotenoids and Vitamin A in Agro-Food, Nutrition, Health and Disease. **Molecular Nutrition & Food Research**,

MURILLO, E.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; PORTUGAL, F. Screening of vegetables and fruits from Panama for rich sources of lutein and zeaxanthin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 122, p. 167-172, 2010.

NAS-IOM, 2001. Dietary reference intakes for vitamin a, vitamin k, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. WA: National Academy Press 92.

NATELLA, F. et al. Effect of coffee drinking on platelets: inhibition of aggregation and phenols incorporation. **British Journal of Nutrition**, v. 100, 2008.

NOURAEI, S.; RAHIMMALEK, M.; SAIDI, G. Variation in polyphenolic composition, antioxidants and physiological characteristics of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* Hayek L.) as affected by drought stress. **Scientia Horticulturae**, v. 233, p. 378-385, 2018.

PEREIRA, C. et al. Infusions of artichoke and milk thistle represent a good source of phenolic acids and flavonoids. **Food and Function**, v. 6, p. 56-62, 2014.

PISTÓN, M. et al. Infusion, decoction and hydroalcoholic extracts of leaves from artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *cardunculus*) are effective scavengers of physiologically relevant ROS and RNS. **Food Research International**, v. 64, p. 150-156, 2014.

POKIMICA, B.; GARCÍA-CONESA, M. T. Critical evaluation of gene expression changes in human tissues in response to supplementation with dietary bioactive compounds: moving towards better-quality studies. **Nutrients**, v. 10, p. 1-38, 2018.

RE, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REIN, M .J. et al. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, p. 588-602, 2013.

RIBEIRO, A B. et al. Psidium cattleianum fruit extracts are efficient in vitro scavengers of physiologically relevant reactive oxygen and nitrogen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 165, p. 140-148, 2014.

RIBEIRO, D. et al. Proinflammatory pathways: the modulation by flavonoids. **Medicinal Research Reviews**, v. 35, p. 1-57, 2015.

ROJAS, J.; BUITRAGO, A. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Biosynthesized by Plants and Its Relationship with Prevention of Neurodegenerative Diseases. In: CAMPOS, M. R. S. **Bioactive Compounds**, p. 3-31, 2019.

SINGH, S. et al. Determination of bioactives and antioxidant activity in *Eryngium foetidum* L.: A traditional culinary and medicinal herb. **Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences**, v. 83, p. 453-460, 2013.

SINGH, S. et al. Estimation of proximate composition, micronutrients and phytochemical compounds in traditional vegetables from Andaman and Nicobar Islands. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 62, p. 765-773, 2011.

SIQUEIRA, F. C. et al. Profile of phenolic compounds and carotenoids of *Arrabidaea chica* leaves and the in vitro singlet oxygen quenching capacity of their hydrophilic extract. **Food Research International**, v. 126, 108597, 2019.

ZHU, F.; DU, B.; XU, B. Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, p. 1260-1270, 2018.

3

Artigo 2

“Extratos liofilizados de folhas de *Eryngium foetidum* da Amazônia com alto teor de ácido clorogênico, obtidos com solventes verdes, são eficientes sequestradores de ROS/RNS para futuras aplicações como antioxidantes naturais”

Manuscrito do artigo a ser submetido no periódico Antioxidants (MDPI Publisher), Fator de Impacto 6.313.

RESUMO

Eryngium foetidum L. é uma hortaliça comestível amplamente difundida em pratos típicos na Amazônia e possui elevados teores de compostos fenólicos promissores para a produção de extratos para serem empregados como aditivos naturais antioxidantes. Neste estudo, o potencial antioxidante, *in vitro*, de três extratos liofilizados de *E. foetidum*, obtidos utilizando solventes verdes (água (H₂O), etanol (EtOH) e etanol/água (EtOH/H₂O)), foi investigado em relação à desativação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) geradas comumente tanto em sistemas fisiológicos quanto alimentícios. Seis compostos fenólicos foram identificados nos extratos, cujo o principal foi o ácido clorogênico (2198, 1816 e 506 µg/g) para os extratos EtOH/H₂O, H₂O e EtOH, respectivamente e todos os extratos de folhas de *E. foetidum* foram eficientes na eliminação das ROS e RNS testadas (IC₅₀ = 45.00 – 1000 µg/mL). O extrato EtOH/H₂O apresentou o maior teor de compostos fenólicos (5781 µg/g), e apresentou a maior eficiência na desativação de todas as espécies, com alta eficiência para o O₂^{•-} (IC₅₀ = 45.00 µg/mL), exceto para o ROO[•], cujo extrato EtOH foi o mais eficiente. Portanto, os extratos de *E. foetidum*, principalmente o obtido com EtOH/H₂O, demonstraram excelente potencial antioxidante para serem aplicados como aditivo antioxidante em alimentos e nutracêuticos.

Palavras-chave: ácido clorogênico; ácido ferrúlico; radicais livres; vegetais não-convencionais; fenólicos.

1 INTRODUÇÃO

Eryngium foetidum L., uma das principais hortaliças não convencionais (PANCs) cultivadas no Brasil (BRASIL, 2010), é nativa da região Amazônica e América Central (SHE & WATSON, 2005). É uma hortaliça muito usada como condimento na culinária amazônica, e vem despertando a atenção de pesquisadores por serem usadas na medicina tradicional no tratamento de patologias diversas e em função da presença de compostos bioativos com potencial antioxidante (PAUL et al., 2011; SINGH et al., 2011; MEKHORA et al., 2012; DAWILAI et al., 2013; SINGH et al., 2013; LEITÃO et al., 2020).

Os antioxidantes exógenos oriundos da dieta alimentar, assim como os antioxidantes endógenos produzidos pelo organismo humano são capazes de prevenir ou retardar o dano celular gerados por espécies reativas de oxigênio (ROS) e/ou nitrogênio (RNS) (AZEEZ et al., 2017). Apesar das ROS e RNS desempenharem efeitos fisiológicos benéficos, como a

sinalização celular, as ROS e RNS podem danificar ou destruir o funcionamento normal das células quando em superprodução no sistema fisiológico em decorrência do estresse oxidativo (VALKO et al., 2007). Embora os mecanismos endógenos de defesa do corpo humano, como por exemplo a glutatona e os sistemas enzimáticos superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase, sejam capazes de diminuir os danos oxidativos causados pela superprodução de ROS e RNS (HALLIWELL et al, 1995; OKAYAMA, 2005; VALKO et al., 2007), em geral, os antioxidantes endógenos não são suficientes, sendo necessário, portanto, o fornecimento de antioxidantes a partir de uma fonte exógena.

A ação das ROS e RNS em alimentos é de grande importância do ponto de vista da indústria alimentícia, uma vez que estas espécies são responsáveis pelo início das reações de oxidação, alterando a qualidade nutricional, química e física dos mesmos durante seu processamento, armazenamento e comercialização, tornando-os pouco aceitáveis ou até mesmo inaceitáveis sensorialmente para os consumidores (LEE et al., 2003).

Em função da natureza biológica dos alimentos, a ocorrência de ROS e RNS é inevitável. Estudos sobre a química de ROS e RNS e seus efeitos sobre os alimentos tem sido reportados, uma vez que as ROS são as principais responsáveis pelo início da reação de oxidação dos alimentos, interagindo com lipídios, proteínas, açúcares e vitaminas, produzindo compostos voláteis indesejáveis, degradando ácidos graxos essenciais, aminoácidos, vitaminas e formando compostos de caráter carcinogênico (CARR et al., 2000; CHOE & MIN, 2006). Os antioxidantes presentes naturalmente nos alimentos ou adicionados durante o processamento atuam na redução e inibição do processo de oxidação lipídica, retardando a formação de produtos tóxicos, muitos destes responsáveis pelo ranço oxidativo, auxiliam na manutenção da qualidade nutricional e aumento da vida útil dos alimentos e ingredientes alimentícios (BREWER, 2011). Além disso, os antioxidantes também podem ser adicionados para minimizar as mudanças no sabor, aroma, cor ou valor nutritivo de diversos alimentos processados, quando oriundas de processos oxidativos.

Neste contexto, para assegurar a eficiência da capacidade antioxidante de um alimento, planta ou extrato como uma fonte exógena é necessário que se realizem investigações sistemáticas (*in vitro* e *in vivo*) que determinem a sua eficiência na desativação de ROS e RNS de importância fisiológica. Essa eficiência se dá em função da associação positiva entre a ingestão frequente destes alimentos ou ingredientes alimentícios e a diminuição do risco de desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas, como por exemplo, as doenças

cardiovasculares (TAJIK et al., 2017), aterosclerose (TAJIK et al., 2017; ROJAS; BUITRAGO, 2019), Alzheimer e câncer (VALKO et al., 2007; PHANIENDRA; BABU, 2015).

Em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisas, as folhas de *E. foetidum* apresentaram alta concentração de compostos bioativos, especialmente os compostos fenólicos, elevada atividade antioxidante (ABTS e DPPH) e capacidade de desativação do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), uma ROS altamente reativa (LEITÃO et al, 2020). No entanto, não há informações na literatura sobre o potencial antioxidante de extratos de *E. foetidum* cultivados na região amazônica na desativação das demais ROS e RNS de relevância fisiológica e alimentar, como o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$), ácido hipocloroso (HOCl), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) radical peroxila (ROO^{\cdot}) e ânion peroxinitrito (ONOO^-).

Portanto, este trabalho teve como objetivo a obtenção e caracterização de extratos com elevados teores de compostos fenólicos obtido de folhas de *E. foetidum* cultivadas na Amazônia, com a utilização de três diferentes solventes verdes comumente reconhecidos como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) para consumo humano EtOH, H_2O e EtOH/ H_2O , seguido da investigação do potencial antioxidante dos extratos, *in vitro*, na desativação das principais ROS e RNS de relevância fisiológica e alimentar.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES

Quercetina, ácido clorogênico, ácido ascórbico, etanol, metanol, éter metil *tert*-butílico (MTBE), persulfato de potássio e azul de metileno (MB), L-triptofano, acetonitrila, ácido fórmico, di-hidrorodamina 123 (DHR), 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2), 3- (aminopropil) -1-hidroxi-3-isopropil-2-oxo-1-triazeno (NOC-5) peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30%, solução de hipoclorito de sódio com 4% disponível, cloro, β -nicotinamida dinucleído de adenina (NADH), metossulfato de fenazina (PMS), cloreto de nitroazul de tetrazio (NBT), lucigenina e todos os outros sais e solventes de qualidade analítica foram adquiridos Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). A água ultrapura foi obtida a partir do sistema Milli-Q System (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). Para análise cromatográfica, amostras e solventes foram filtrados usando membranas de filtração de nylon de 0,22 e 0,45 μm (Billerica, MA, USA).

2.2 FOLHAS DE *E. foetidum*

As folhas de *E. foetidum* (SISGEN- A89EDD3) foram obtidas de uma propriedade produtora de hortaliças em Santa Izabel do Pará, Brasil (Latitude: -1.29938, Longitude: -48.161, 1 ° 17'58 "Sul, 48 ° 9'40" West) em julho de 2017. As folhas de *E. foetidum* (aproximadamente 500 g) foram lavadas com água destilada e secas a 25 °C/2 h. Em seguida, o material foi liofilizado (Liotop, L101, São Paulo, Brasil) a -60 °C, em vácuo contínuo por 24 h. As folhas secas foram trituradas, embaladas e armazenadas sob condições livre da incidência da luz a -18 °C.

2.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

As extrações foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Chisté et. al. (2011) com algumas modificações. Três extratos foram obtidos a partir das folhas liofilizadas (1:1, v/v) utilizando os seguintes solventes: EtOH, EtOH/H₂O e H₂O. Estes solventes foram escolhidos considerando a permissibilidade do resíduo em extratos após evaporação, de acordo com a Diretiva da Comissão 95/45/CE das Comunidades Europeias (DIRETIVA DA COMISSÃO 95/45/CE, 1995). Para cada extrato, as folhas foram misturadas com o solvente e os compostos fenólicos foram extraídos na razão sólido-líquido de 1:10 (m/v) durante 5 min em banho de ultrassom (Quimis, modelo 03350, Diadema- São Paulo- Brasil) com frequência fixa de 25 KHz e temperatura ambiente. Após o tempo no banho ultrassom, os extratos foram centrifugados (centrifuga Heraeus multifuge X1r, Thermo Electron Led GMBH, São Paulo, Brasil) a 11627.2 ×g por 5 min à temperatura ambiente e a fração líquida foi coletada. O resíduo sólido foi submetido a mais 7 extrações nas mesmas condições e todas as frações líquidas centrifugadas foram combinadas para compor o extrato. Em seguida, os extratos contendo EtOH foram submetidos à evaporação a pressão reduzida em um evaporador rotativo (T < 38 °C) e os extratos líquidos EtOH/H₂O e H₂O foram congelados, liofilizados (Liotop, L101, São Paulo, Brazil). Todos os extratos secos obtidos foram acondicionados em frascos âmbar, saturado com fluxo de N₂ e armazenados a -18 °C até a realização das análises. O procedimento de extração foi realizado em triplicata (n = 3) para cada solvente.

2.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC-DAD

Os extratos liofilizados foram dissolvidos em metanol/água (80:20, v/v) e injetados em um HPLC Agilent (modelo Agilent 1260 Infinity, Santa Clara, CA, EUA) equipado com uma bomba quaternária (G1311C), um injetor automático (G7129), um forno (G1316A) e um detector DAD (G1328C). Os compostos fenólicos foram separados numa coluna Synergi Hydro C₁₈ usando um gradiente linear de água/ácido fórmico (99,5: 0,5, v/v) e acetonitrila/ácido fórmico (99,5: 0,5 v/v) como fase móvel, conforme procedimento descrito em detalhes por Chisté e Mercadante (2012). Os espectros UV-visível foram obtidos entre 200 e 600 nm, e os cromatogramas foram processados a 270, 320 e 360 nm. Os compostos fenólicos foram quantificados por padrões externos e foram calculados os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) usando os parâmetros das curvas analíticas (ICH, 2005). As curvas analíticas de seis pontos (3,12 - 100 µg / mL, em duplicado) foram: quercetina (360 nm, R² = 0,99, LOD = 0,15 µg/mL e LOQ = 0,62 µg/mL), apigenina (320 nm, R² = 0,99, LOD = 0,15 µg/mL e LOQ = 0,62 µg/mL) e ácido clorogênico (320 nm, R² = 0,99, LOD = 0,15 µg/mL e LOQ = 0,62 µg/mL). Os teores de compostos fenólicos foram expressos em µg/g de extrato (base seca), considerando três procedimentos independentes de extração (n = 3). Os compostos fenólicos foram identificados combinando as seguintes informações: ordem de eluição, tempo de retenção na coluna C₁₈, comparação com padrões autênticos analisados sob as mesmas condições e espectros UV-vis em comparação com os compostos identificados e quantificados previamente pelo nosso grupo de pesquisa por espectrometria de massas utilizando electrospray como fonte ionização e dados de fragmentação sequencial (HPLC-DAD-ESI-MSⁿ) (LEITÃO et al., 2020).

2.5 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *E. foetidum* NA DESATIVAÇÃO DE ROS E RNS (*in vitro*)

Os ensaios foram realizados em leitor de microplacas (Synergy HT, BioTek, Vermont, EUA) equipado com termostato e detectores para medições de fluorescência, absorvância e quimioluminescência. Em função da preservação dos compostos bioativos, os ensaios foram realizados imediatamente após a pesagem do extrato liofilizado. Dois ensaios de controle foram realizados em todas as microplacas, sendo um para verificar a interação entre a sonda e a solução de extrato, sem a adição de um gerador da espécie reativa, e a outra usando o ácido clorogênico (0,06 - 500 µg/mL) ou a quercetina (0,001 - 30 µg/mL) ou o ácido ascórbico (15,62 - 500 µg/mL) como controle positivo. Cada ensaio de desativação de ROS/RNS corresponde a quatro experimentos independentes, cada um realizado em triplicata (n=3) e em seis diferentes concentrações do extrato de *E. foetidum* (3,9 a 1000 µg/mL).

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição das ROS e RNS (média ± erro padrão da média, EPM) e as concentrações de extrato capazes de inibir 50% do efeito de cada ROS e RNS testado (IC₅₀) foram calculadas a partir das curvas da porcentagem de inibição *versus* concentração de antioxidantes utilizando o software Origin Pro v8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

2.5.1 Porcentagem de Proteção Contra o Oxigênio Singlete (¹O₂)

A porcentagem de inibição do oxigênio singlete (¹O₂) foi avaliada de acordo com o método descrito por Leitão et al. (2020). Foram testadas quatro concentrações tanto para o extrato de *E. foetidum* (125 a 1000 µg/mL) e como para o padrão de quercetina (0,78 a 4,75 µg/mL) e ácido clorogênico (0,78 a 4,75 µg/mL), usados como controle positivo na análise. Dados cinéticos obtidos a partir da intensidade do decaimento da absorvância do triptofano (219 nm) foram ajustados a uma reação de primeira ordem (Equação 1), utilizando o software Origin Pro 8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA) e as constantes de velocidade foram calculadas (equação 2). A porcentagem de proteção que o extrato de *E. foetidum* (EXT) ou a quercetina ofereceu ao triptofano (TRP) foi calculado através da Equação 3.

$$Y = Y_{\infty} + A \cdot \exp(-k \cdot x)$$

Equação 1

$$k = \frac{\ln 2}{t^{1/2}} \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{Proteção (\%)} = \frac{k_{obs}^{TRP} - k_{obs}^{TRP+EXT}}{k_{obs}^{TRP}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

onde Y é a absorbância do TRP; Y_{∞} é o intensidade de absorbância do TRP no tempo infinito; A é o fator pré-exponencial; k é uma constante de taxa de pseudo-primeira ordem; x é o tempo de reação; $t_{1/2}$ é meia-vida (min); k_{obs}^{TRP} é a constante de taxa de pseudo-primeira ordem observada ajustada a curva de decaimento do TRP (obtida no experimento em branco); e $k_{obs}^{TRP+EXT}$ é a constante de taxa de pseudo-primeira ordem observada ajustado à curva de decaimento do TRP na presença do extrato de *E. foetidum*.

2.5.2 Ensaio de desativação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

O $O_2^{\cdot-}$ foi gerado pelo sistema NADH/PMS/ O_2 e a capacidade de desativação de $O_2^{\cdot-}$ foi determinada pelo monitoramento do efeito dos extratos testados e o padrão de ácido clorogênico na redução do NBT induzida por $O_2^{\cdot-}$ a 560 nm após 10 min de incubação (CHISTÉ et al., 2011). O ensaio foi realizado à temperatura ambiente. Os efeitos foram expressos como a inibição, em porcentagem, da redução do NBT para formazan. As concentrações para extrato de *E. foetidum* variaram de 3,91 a 125 $\mu\text{g/mL}$, para os padrões de quercetina a faixa foi de 0.001 a 30 $\mu\text{g/mL}$ e o ácido clorogênico de 12,50 a 250 $\mu\text{g/mL}$.

2.5.3 Ensaio de desativação do ácido hipocloroso (HOCl)

A capacidade de desativação de HOCl pelos extratos de *E. foetidum* foi medida pelo monitoramento da inibição do aumento da fluorescência resultante da oxidação da DHR 123 (dihidrorodamina 123) a rodamina 123 induzida pelo HOCl (CHISTÉ et al., 2011). A medida de fluorescência foi realizada a um comprimento de onda de excitação de 485 ± 20 nm e emissão 528 ± 20 nm. O HOCl foi preparado ajustando o pH de uma solução de NaOCl a 1% (m / v) para 6,2 com adição gota a gota de H_2SO_4 a 10%. A concentração de HOCl foi determinada por espectrofotometria a 235 nm usando o coeficiente de absorção molar de $100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e a diluição apropriada feita em tampão fosfato 100 mM a pH 7,4. O extrato de *E. foetidum* foi usado nas concentrações (31,5 a 650 $\mu\text{g/mL}$) e como controle positivo foi usado o padrão de quercetina (0.001 a 30 $\mu\text{g/mL}$) e ácido clorogênico (0,24 a 7,81 $\mu\text{g/mL}$).

2.5.4 Ensaio de desativação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A capacidade de desativação de H₂O₂ foi medida através do monitoramento do efeito dos extratos de *E. foetidum* na inibição da quimioluminescência resultante da oxidação da lucigenina induzida pelo H₂O₂ (CHISTÉ et al., 2011). A leitura foi realizada após 5 minutos de reação. As concentrações para extrato de *E. foetidum* (3,91 a 125 µg/mL) e para os padrões de quercetina (0,001 a 30 µg/mL) e ácido clorogênico (12,50 a 250 µg/mL).

2.5.5 Ensaio de desativação do radical peroxila (ROO[•])

A avaliação da capacidade de desativação de ROO[•] foi realizada conforme descrito por Chisté et al. (2011), e medida pelo monitoramento do efeito do extrato de *E. foetidum* na inibição do decaimento da fluorescência da fluoresceína resultante da oxidação induzida pelo ROO[•]. A mistura foi pré-incubada no leitor de microplacas a 37 °C durante 15 min. O sinal de fluorescência foi monitorado a cada minuto no comprimento de onda de emissão a 528 ± 20 nm com excitação a 485 ± 20 nm até o decaimento total da fluorescência. Como controle positivo foi utilizado o trolox. Em resumo, a proteção fornecida pelos extratos antioxidantes ou padrão foi calculada usando a diferença entre a área sob a curva de decaimento de fluorescência na presença da amostra (AUC antioxidante) e na sua ausência (AUC blank). A capacidade de eliminação de ROO[•] foi expressa como a razão entre a inclinação de cada extrato (ou controle positivo) e as inclinações obtidas para o trolox segundo descrito por Rodrigues et al. (2013).

2.5.6 Ensaio de desativação do ânion peroxinitrito (ONOO⁻)

A capacidade de desativação de ONOO⁻ foi avaliada monitorando ao efeito do extrato de *E. foetidum* na inibição do aumento da fluorescência resultante da oxidação da DHR não fluorescente a rodamina fluorescente 123 induzida por ONOO⁻ (CHISTÉ et al., 2011). O ONOO⁻ foi sintetizado conforme descrito por Gomes et al., (2007). A medida de fluorescência

foi realizada a um comprimento de onda de excitação de 485 ± 20 nm e emissão 528 ± 20 nm após 2 minutos de incubação. Foram realizados, em paralelo, ensaios na presença de 25 mM de NaHCO_3 para simular a reação da concentração de CO_2 fisiológica. A concentração do extrato de *E. foetidum* variou de 400 a 900 $\mu\text{g/mL}$ e do padrão de ácido clorogênico, usado como controle positivo, foi de 0,06 a 1,95 $\mu\text{g/mL}$.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

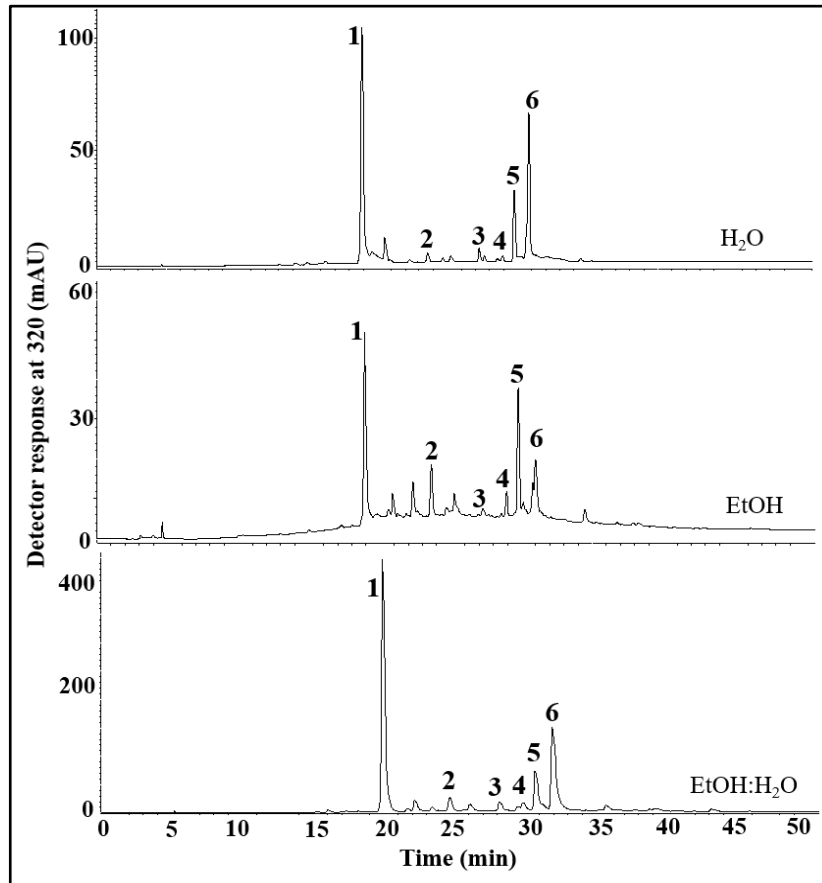
Todos os resultados (média \pm desvio padrão ou erro padrão da média) foram calculados e submetido à análise de variância (ANOVA de um fator) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ou *t*-est de Student, ao nível de significância de 95% ($p < 0,05$) com o software Statistica 8.1(Statsoft).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 COMPOSIÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DOS EXTRATOS DE *E. foetidum*

A análise por HPLC do extrato liofilizado de folhas de *Eryngium foetidum* permitiu a separação e quantificação de seis compostos fenólicos, e os perfis destes compostos são mostrados na Figura 1 e na Tabela 1.

Figura 1 - Cromatograma HPLC-DAD de compostos fenólicos do extrato de folhas de *Eryngium foetidum* L. Condições cromatográficas: ver texto. A caracterização dos picos é dada na Tabela 1. Identificação do pico: 1: Ácido clorogénico; 2: Ácido Feruloylquinico; 3: Quercetina glucuronide; 4: Luteolina hexoside; 5: Luteolina glucuronide; 6: Ácido ferrúlico derivativo.



Fonte: Autor.

Tabela 1 – Teor de compostos fenólicos dos extratos liofilizados de folhas de *Eryngium foetidum* L. obtidos por solventes de diferentes polaridades.

Pico	t _R (min) ^B	λ _{max} (nm) ^C	Compostos fenólicos*	Concentração (mg/g extrato) ^A		
				EtOH/H ₂ O	EtOH	H ₂ O
1	18.18 - 19.20	300(sh), 326	Chlorogenic acid ^D	2198,00 ± 37,98 ^a	506,00 ± 32,61 ^b	1816,00 ± 160,12 ^a
2	25.10 - 25.70	265, 326	Feruloylquinic acid ^D	169,00 ± 9,39 ^a	120,00 ± 9,74 ^b	121,00 ± 1,35 ^b
3	27.23 -27.76	354	Quercetin glucuronide ^E	258,00 ± 5,49 ^a	28,00 ± 3,69 ^c	77,00 ± 12,18 ^b
4	28.80 -28.86	265,300(s), 347	Luteolina hexoside ^F	225,00 ± 74,26 ^b	36,20 ± 3,0 ^c	373,00 ± 51,87 ^a
5	29.70 - 29.73	265, 347	Luteolina glucoronide ^F	956,00 ± 20,60 ^a	248,00 ± 5,50 ^b	17,00 ± 8,17 ^c
6	30.94 - 31.03	285(sh), 330	Ferulic acid derivative ^D	1976,00 ± 43,51 ^a	166,00 ± 4,38 ^c	1012,00 ± 114,72 ^b
			Soma dos compostos	5781,00 ± 191,23 ^a	1104,00 ± 50,16 ^c	3416,00 ± 348,41 ^b

Dado: *Identificação baseada em espectros Uv-Visíveis, bem como tempos de retenção de HPLC e dados reportados por Leitão et al.,^[9]. ^A n = 3 (base seco). ^BTempo de retenção na coluna C18 Synergi Hydro (4 μm). ^C Solvente: gradiente de 0,5% de ácido fórmico água e acetonitrila com 0,5% de ácido fórmico. Os picos foram quantificados como equivalentes a ácido ^Dclorogênico, ^Equercetina e ^Fapigenina.

O perfil dos compostos fenólicos (Figura 1) mostrou que o ácido clorogênico foi o principal composto fenólico encontrado (Tabela 1), confirmando o que foi reportado anteriormente para os perfis de compostos fenólicos para folhas de *E. foetidum* (LEITÃO et al., 2020).

O ácido clorogênico (CGA), é um importante composto fenólico biologicamente ativo e, é um dos ácidos fenólicos amplamente encontrados naturalmente em extratos de certas espécies de plantas e chá, sendo um dos principais componentes do café. O ácido clorogênico apresenta propriedades versáteis por agir tanto como aditivo nutracêutico quanto alimentar. Como nutracêutico, exibe propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, anti-hipertensivas, entre outros, que podem contribuir para a prevenção e tratamento de diversas patologias associados (SANTANA-GÁLVEZ et al., 2017; NAVEED et al., 2018; SONG et al., 2018; STEFANELLO et al., 2019). Por outro lado, como aditivo alimentar, o ácido clorogênico inibe a oxidação de lipídios, previne a degradação de outros compostos bioativos, apresenta atividade antimicrobiana, e pode atuar como prebiótico (SANTANA-GÁLVEZ et al., 2017; TAJIK et al., 2017).

Dentre os extratos obtidos, o extrato EtOH/H₂O foi o que apresentou maior teor de compostos fenólicos (5.581 µg/g extrato), seguido pelo extrato H₂O (3.416 µg/g extrato). O conteúdo total de compostos fenólicos identificados no extrato EtOH (1.104 µg/g extrato) foi 3 e 5 vezes menor que o teor total desses compostos nos extratos H₂O e EtOH/H₂O, respectivamente. Foi possível observar a grande diferença entre os teores obtidos para as extrações com os solventes estudados, e tal efeito se deve à afinidade dos compostos fenólicos pelo solvente de extração utilizado (GHASEMZADEH et al., 2011; RAHMAN et al., 2011; BARCHAN et al., 2014; GHASEMZADEH et al., 2015; ABDULLAH et al., 2017; NAWAZ et al., 2020). Além disso, o uso combinado de dois ou mais solventes durante o processo de extração pode extrair uma quantidade de compostos fenólicos superior, quando comparado ao uso de um solvente isolado (SHAFIQUE et al., 2013; ALCÂNTARA et al., 2019). Entretanto, o uso misto de solventes depende intimamente da matriz alimentícia para que se extraia quantitativos superiores (GARCIA- SALAS et al., 2010; ALCÂNTARA et al., 2019).

O extrato EtOH não foi muito eficiente para extrair os ácidos fenólicos em comparação com H₂O. Entretanto o extrato EtOH/H₂O apresentou a maior eficiência de extração dos compostos que possuíam ácido glucurônico na estrutura, isso é explicado pela diferença de polaridade dos solventes utilizados. Os diferentes valores de classes de compostos fenólicos considerando o uso de extratos com polaridades diferentes foram amplamente discutidas na

literatura (MARTINEZ-CORREA et al., 2016; KUMAR et al, 2019; GUPTA, et al, 2020; ABATE et al., 2021).

3.2 CAPACIDADE DE ELIMINAÇÃO DE ROS E RNS DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE *E. foetidum* L.

De forma geral, os extratos das folhas de *E. foetidum* foram capazes de inibir o efeito oxidante de todas as espécies reativas testadas (Tabela 2), de forma dependente da concentração (Figura 2). Este é o primeiro relato sobre a capacidade antioxidante dos extratos de folhas de *E. foetidum* L. da Amazônia contra a ROS ($O_2^{\cdot-}$, HOCl, H_2O_2 e ROO^{\cdot}) e RNS (ONOO) de importância tanto em sistemas fisiológicos como alimentares.

O extrato EtOH/H₂O foi o que apresentou a mais alta eficiência de eliminação de quase todas as espécies testadas, provavelmente devido a presença dos mais elevados teores de compostos fenólicos entre os extratos, majoritariamente representado pelos ácidos fenólicos ($\approx 75\%$ da soma total) (Tabela 1). Recentemente, os ácidos fenólicos vêm recebendo atenção especial em função de suas várias contribuições, biológicas e farmacológicas, associadas a melhoria da saúde, principalmente devido a sua ação antioxidante e propriedades anti-inflamatórias, proporcionando proteção contra doenças relacionadas ao dano oxidativo (TAJIK et al., 2017; NAVEED et al., 2018; RASHMI; NEGI, 2020). Os ácidos fenólicos também têm sido reportados como eficientes antioxidantes em sistemas alimentares (FARHOOSH et al., 2016).

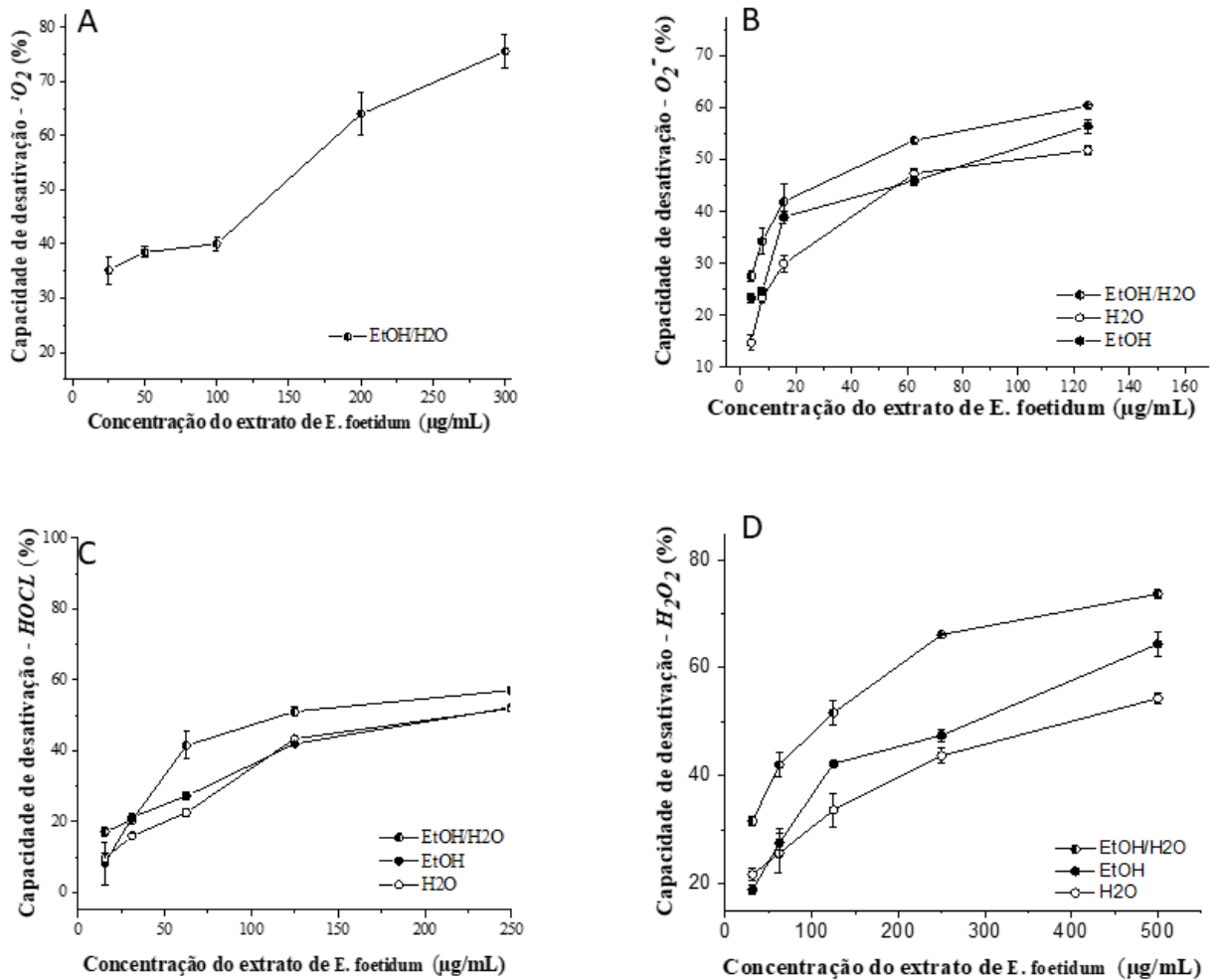
Tabela 2 – Capacidades de desativação dos extratos de folhas de *Eryngium foetidum* L contra oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e radical peroxila (ROO^\bullet).

Extrato	IC ₅₀ (μg/mL) (n = 4)				ROO• (S _{sample} /S _{Trolox})
	$^1\text{O}_2$	$\text{O}_2^{\bullet-}$	HOCl	H_2O_2	
EtOH/ H_2O	76 ± 7	45 ± 3 ^b	118 ± 9 ^b	110 ± 2 ^c	0.23 ± < 0.01 ^c
EtOH	50.0* ± 0.3	87 ± 5 ^a	222 ± 1 ^a	279 ± 12 ^b	1.75 ± < 0.01 ^a
H_2O	NA	103 ± 3 ^a	221 ± 4 ^a	400 ± 3 ^a	1.00 ± < 0.01 ^b
Controle positivo	$^1\text{O}_2$	$\text{O}_2^{\bullet-}$	HOCl	H_2O_2	ROO• (S _{sample} /S _{Trolox})
Ácido Clorogênico	2.1 ± 0.1	20 ± 2	1.2 ± 0.1	100 ± 4	25.00 ± < 0.01
Quercetina	1.9 ± 0.1	12.9 ± 0.5	14 ± 1	NA	1.34 ± < 0.07
Ácido Ascórbico	ND	ND	ND	40 ± 5	ND
Trolox	ND	ND	ND	ND	1

Dado: IC₅₀ = concentração inibitória, *in vitro*, para diminuir em 50% os efeitos oxidantes das espécies reativas no meio testado (média ± erro padrão da média).

S_{sample} = slope das curvas dos extratos de *E. foetidum*. S_{Trolox} = slope da curva de trolox. * efeito na maior concentração testada. NA = nenhuma atividade até a máxima concentração testada. ND: não determinado.

Figura 2 – Capacidade de desativação das folhas de *Eryngium foetidum* L contra o oxigênio singlete (1O_2), radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Cada ponto mostra as barras de erro padrão e representa os valores obtidos de quatro experimentos independentes, em cinco concentrações.



Fonte: Autor.

O extrato EtOH/H₂O apresentou eficiência superior na desativação do ¹O₂ (IC₅₀ de 76 µg/mL) em relação ao extrato EtOH (IC₅₀ de 1000 µg/mL), enquanto o extrato H₂O não foi apresentado atividade na máxima concentração de extrato testada (1000 µg/mL). A capacidade de desativação de ¹O₂ pelo extrato de folhas de *E. foetidum* originou uma maior eficiência para o extrato EtOH/H₂O, sendo, aproximadamente 3,5 vezes mais eficiente que o extrato de *S. diploconos* (IC₅₀ = 269 µg/mL) (RIBEIRO et al., 2016) e próximo aos valores relatados para os extratos das folhas de *Caesalpinia crista* (IC₅₀ = 61.13 µg/mL) (MANDAL, et.al., 2011), porém inferior ao ácido clorogênico e a quercetina (Tabela 2). O ¹O₂ pode gerar os radicais alquila (-R[•]), radicais alcoxila (RO[•]), ROO[•], hidroperóxidos orgânicos (ROOH), O₂^{-•}, H₂O₂, radical hidroxila (OH[•]) e ONOO⁻ (PRYOR et al., 2006; KALYANARAMAN, 2013; BLÁZQUEZ-CASTRO, 2014; KRUMOVA & COSA, 2016; SIES, 2017), e causar efeitos biológicos deletérios (BLÁZQUEZ-CASTRO, 2014; CARRASCO et al., 2015; CARRASCO et al., 2016; WESTBERG et al., 2016). Nos alimentos, o ¹O₂ promove a oxidação de aminoácidos e vitaminas; entretanto, reage muito rapidamente com ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos aromáticos em função da maior reatividade devido a presença de ligações duplas nas moléculas, e quanto maior a insaturação dos ácidos graxos, maior a taxa reação com o ¹O₂ (CHOE; MIN, 2006). Assim, plantas e extratos que apresentam elevada capacidade de desativar o ¹O₂ são altamente desejáveis e promissores como ingredientes da classe dos antioxidantes naturais para aumentar a estabilidade de alimentos.

Os valores de IC₅₀ encontrados para o radical O₂^{-•} mostram a maior capacidade de desativação para o extrato EtOH/H₂O (45 µg/mL) (Tabela 2), atingindo eficiência superior a 1,9 e 2,3 vezes quando comparado aos extratos EtOH e H₂O, respectivamente. Considerando os valores de IC₅₀ do ácido clorogênico (20 µg/mL) e quercetina (12.9 µg/mL), observou-se uma efetividade menor para o extrato *E. foetidum* em cerca de 2,3 e 3,5, respectivamente. Entretanto este extrato teve eficiência semelhante aos extratos de folhas de walnut (*Ruglans regia*) cujo IC₅₀ foi de 47.6 ± 4.6 µg/mL (ALMEIDA et al., 2007) e superior ao extrato de folhas de *Vismia cauliflora* (51 ± 1 µg/mL) (RIBEIRO et al., 2015).

Dentre as ROS, o O₂^{-•} é considerada uma importante precursora de uma variedade de outras espécies pro-oxidantes altamente reativas (VALKO et al., 2007). O O₂^{-•} pode sofrer dismutação gerando, espontaneamente, H₂O₂ em baixo pH, ou através de catálise enzimática (superóxido dismutase, SOD), e a maior parte do H₂O₂ gerado é utilizado na formação do HOCl, que é 100 a 1000 vezes mais tóxico que o O₂^{-•} (FREITAS et al., 2009).

Portanto, os antioxidantes capazes de desativar todas essas ROS podem ser utilizados para retardar processos oxidativos, incluindo a peroxidação lipídica, que é uma das principais

vias de deterioração dos alimentos e produtos farmacêuticos durante o processamento e armazenamento (HALLIWELL et al., 1995).

A desativação do HOCl foi cerca de duas vezes mais efetiva para o extrato EtOH/H₂O, quando comparado aos extratos EtOH e H₂O. Quando comparado a literatura, o extrato de *E. foetidum* foi mais eficiente que os extratos das folhas de *Caesalpinia crista* (IC₅₀ = 170,51 µg/mL) (MANDAL, et al., 2011). A importância de ser um eficiente sequestrador de HOCl se deve principalmente ao fato de que este ROS, por si só, é considerado um forte oxidante e que pode reagir com o O₂^{•-} para gerar o radical hidroxila (HO[•]), outro potente agente pró-inflamatório (ARUOMA, 1997), e que também diminui a estabilidade de alimentos.

Para a espécie H₂O₂ foi observada diferença estatística significativa (p >0.05) entre os três extratos estudados, e o extrato EtOH/H₂O apresentou maior capacidade de desativação desse ROS, com cerca de 2,5 a 3,5 vezes maior que os extratos EtOH e H₂O, respectivamente. Importante ressaltar, o extrato EtOH/H₂O (IC₅₀ de 110 µg/mL) apresentou atividade desativadora de H₂O₂ semelhante ao ácido clorogênico (IC₅₀ de 100 µg/mL), entretanto cerca de 2,7 vezes menor que o ácido ascórbico (Tabela 2). O extrato EtOH/H₂O de *E. foetidum* apresentou maior eficiência na desativação do H₂O₂ (IC₅₀ = 110 µg/mL) quando comparado aos extratos de folha de *Castanea sativa* e *Quercus robur* (IC₅₀ = 410 e 251 µg/mL, respectivamente) (ALMEIDA et al., 2008), e extratos de folhas de *Vismia cauliflora* (IC₅₀ = 289 µg/mL), uma planta medicinal muito abundante na região amazônica (RIBEIRO et al., 2015), e extratos de folhas de *Meyna spinosa*, uma planta medicinal da Índia (IC₅₀ = 126,8 mg/mL) (SEN et al., 2013). H₂O₂ é uma espécie reativa capaz de atravessar células e oxidar vários compostos celulares originando muitos dos seus efeitos tóxicos (GÜLÇİN et al., 2006). Em alimentos, embora o H₂O₂ não esteja diretamente envolvido na iniciação da oxidação lipídica, uma vez que seu potencial de redução (320 mV) é menor do que os dos ácidos graxos insaturados (600 mV), ele pode provocar indiretamente a oxidação dos lipídios, pois o H₂O₂ é precursor na geração de [•]OH, que são fortes iniciadores da oxidação lipídica (CHOE; MIN, 2006). Portanto, extratos capazes de eliminar o H₂O₂ são de grande relevância para a promoção da saúde humana e possuem grande potencial para serem utilizados em produtos farmacêuticos e sistemas alimentícios.

No presente estudo, também foi avaliado o potencial dos extratos de folhas de *E. foetidum* para eliminar ROO[•]. Diferentemente dos resultados anteriores, o extrato EtOH foi mais eficiente que os extratos EtOH/H₂O e H₂O. Quando comparado a literatura, o extrato apresentou eficiência superior ao extrato hidroalcoólico de folhas de alcachofra (*Cynara*

cardunculus L.) (0.31) (PISTON et al., 2014). Os resultados aqui encontrados constituem um achado importante, considerando a relevância da oxidação de lipídios para o sistema fisiológico, bem como em sistemas alimentícios. O HO[•] é uma ROS altamente reativa e induz graves danos através do início da peroxidação lipídica, devido à sua conhecida reatividade com ácidos graxos poliinsaturados, que ao abstrair o oxigênio de outras moléculas resulta na produção de ROO[•], bem como na formação de outros agentes citotóxicos como os hidroperóxidos (GOMES et al., 2008). A maioria dos hidroperóxidos são estáveis à temperatura ambiente. No entanto, calor, luz ultravioleta ou metais de transição aceleram a homólise de hidroperóxidos para produzir ROO[•] (CHOE; MIN, 2006).

Estudos anteriores apontam uma alta eficiência do ácido clorogênico na proteção contra os danos do H₂O₂, ¹O₂ e O₂^{•-}, demonstrando claramente sua capacidade de eliminação de ROS (KIM et al., 2018; RAJAN et al., 2019), e este estudo corrobora para a nossa afirmação, que os resultados aqui obtidos, podem estar relacionados a presença majoritária deste composto bioativo em todos os nossos extratos.

Os resultados resumidos na Tabela 3 mostram que os extrato das folhas de *E. foetidum* foram capazes de inibir o efeito oxidante de RNS testado de forma dependente da concentração (Figura 3). O extrato EtOH/H₂O das folhas de *E. foetidum* foi o que apresentou uma maior eficiência na desativação desta espécie na ausência do carbonato de cálcio (NaHCO₃).

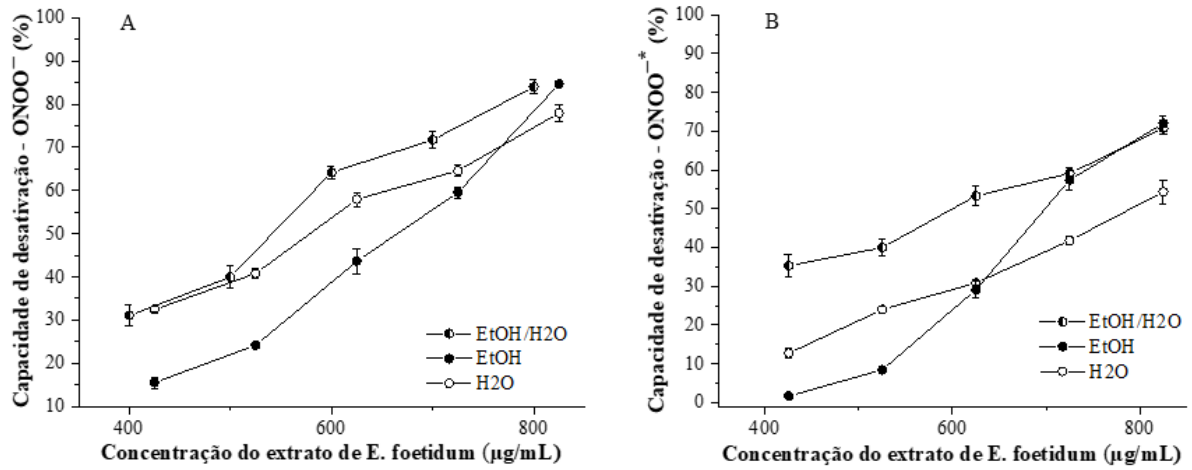
Tabela 3 – Capacidades de desativação dos extratos de folhas de *Eryngium foetidum* L contra peroxinitrito (ONOO⁻).

Extrato	IC ₅₀ (µg/mL) (n = 4)	
	ONOO ⁻	
	Ausência de NaHCO ₃	Presença de 25 mM NaHCO ₃
EtOH/H ₂ O	537 ± 1	596 ± 4
EtOH	663 ± 9	704 ± 1
H ₂ O	675 ± 6	783 ± 2
Controle positivo	Ausência de NaHCO ₃	Presença de 25 mM NaHCO ₃
Ácido Clorogênico	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,01
Quercetina	0,010 ± <0,002	0,010 ± <0,006

Dado: IC₅₀ = concentração inibitória, in vitro, para diminuir em 50% os efeitos oxidantes das espécies reativas no meio testado (média ± erro padrão da média).

A eficiência dos extratos de folhas de *E. foetidum* na desativação do ONOO⁻ foi pouco expressiva quando comparado aos extratos de folhas de *Vismia cauliflora* (5.8 µg/mL) (RIBEIRO et al., 2015) valores estes superiores, respectivamente, a aproximadamente 20 e 94 vezes. No entanto, em comparação com o ácido gálico (IC₅₀ = 876µg/mL) (MANDAL, et.al., 2011) este extrato apresentou maior eficiência na ordem de aproximadamente 1.6 vezes. O ácido clorogênico e a quercetina apresentaram valores de IC₅₀ de 0.23 e 0.010 µg/mL, respectivamente, valores estes bastantes significativos na desativação do ONOO⁻. A quercetina apresentou valor de IC₅₀ semelhante aos reportados anteriormente na desativação do ONOO⁻ (RIBEIRO et al., 2015; RIBEIRO et al., 2016).

Figura 3 – Capacidade de desativação dos extratos liofilizados das folhas de *Eryngium foetidum* L contra o peroxinitrito (ONOO^-) na ausência (Fig 3A) e na presença (Fig 3B) do NaHCO_3 . Cada ponto mostra as barras de erro padrão e representa os valores obtidos de quatro experimentos independentes, em cinco concentrações.



Fonte: Autor.

O peroxinitrito é uma das RNS mais potencialmente prejudiciais e é um oxidante gerado *in vivo* pela combinação dos radicais óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) e $\text{O}_2\cdot^-$. O ONOO^- pode sofrer homólise da ligação O–O, gerando $\cdot\text{NO}_2$ e o $\text{OH}\cdot$ extremamente reativo (FERRER-SUETA; RADI, 2009; KOPPENOL et al., 2012). A formação de $\text{OH}\cdot$ pela homólise do ONOO^- é considerada aproximadamente um milhão de vezes mais rápida do que a geração de $\text{OH}\cdot$ catalisada por metal a partir de H_2O_2 por meio da reação de Fenton (BECKMAN, 1996). Outro fator de grande relevância é que o ONOO^- participa de reações de oxidação de um e dois elétrons com lipídios, proteínas e DNA, desempenhando um papel fundamental no processo de lesão celular/tecidual em condições patológicas (CARR et al., 2000). Estes fatores em conjunto justificam a pesquisa para descobrir eficientes desativadores desta espécie.

4 CONCLUSÃO

O estudo, demonstra de forma clara, que os extratos de folhas de *E. foetidum* apresentaram eficiente capacidade antioxidante contra ROS e RNS biologicamente relevantes. O extrato EtOH/H₂O foi o extrato com maior teor de compostos fenólicos, e apresentou, de maneira geral, a maior eficiência para a desativação tanto das ROS quanto das RNS testadas. A maior eficiência de capacidade antioxidante foi contra as ROS, com destaque para o $\text{O}_2\cdot^-$, resposta muito interessante já que essa espécie participa da formação de várias outras espécies pró-oxidantes.

A capacidade antioxidante dos extratos de folhas de *E. foetidum* na desativação de todos as ROS e RNS testados podem estar intimamente relacionadas aos teores e perfis de compostos fenólicos, e principalmente em função da presença majoritária do ácido clorogênico.

Portanto, este estudo, demonstra a importância de mais pesquisas sobre o potencial biológico de folhas de *E. foetidum*, devido ao seu alto conteúdo de compostos fenólico e elevada capacidade antioxidante. As folhas de *E. foetidum* podem ser vistas como uma matéria-prima Amazônica promissora com grande potencial de exploração para a obtenção de antioxidantes naturais e de alto valor nutracêutico tanto para a aplicação em sistemas alimentícios, aumentando a vida de prateleira de produtos susceptíveis a reações de oxidação, quanto direcionados para sistemas fisiológicos para diminuir os efeitos deletérios do estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

ABATE, G. et al. Phytochemical Analysis and Anti-Inflammatory Activity of Different Ethanolic Phyto-Extracts of *Artemisia annua* L. **Biomolecules**, v. 11, p. 975, 2021.

ABDULLAH, M. Z. et al. Anti-proliferative, in vitro antioxidant, and cellular antioxidant activities of the leaf extracts from *Polygonum minus* Huds: Effects of solvent polarity. **International journal of food properties**, v. 20, p. 846-862, 2017.

ALCÂNTARA, M. A. et al. Effect of the solvent composition on the profile of phenolic compounds extracted from chia seeds. **Food Chemistry**, v.275, p. 489-496, 2019.

ALMEIDA, I. F. et al. Protective effect of *Castanea sativa* and *Quercus robur* leaf extracts against oxygen and nitrogen reactive species. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 91, p. 87-95, 2008.

ARUOMA, O. I. Scavenging of hypochlorous acid by carvedilol and ebselen in vitro. **General pharmacology**, v. 28, p. 269-272, 1997.

AZEEZ, L.; LATEEF, A.; ADEBISI, S. A. Silver nanoparticles (AgNPs) biosynthesized using pod extract of *Cola nitida* enhances antioxidant activity and phytochemical composition of *Amaranthus caudatus* Linn. **Applied Nanoscience**, v. 7, p. 59-66, 2017.

BECKMAN, J. S. The Physiological and Pathological Chemistry of Nitric Oxide. In *Nitric Oxide: Principles and Actions*; Lancaster, J., Jr., Ed.; Academic Press, 1996; p 1–82.

BLÁZQUEZ-CASTRO, A.; BREITENBACH, T.; OGILBY, P. R. Singlet oxygen and ROS in a new light: low-dose subcellular photodynamic treatment enhances proliferation at the single cell level. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 13, p. 1235-1240, 2014.

BRASIL Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de vegetais não convencionais. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília, 2010, 92pp.

BREWER, M. S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food science and Food Safety**, v. 10, p. 221-247, 2011.

CARR, A. C.; MCCALL, M. R.; FREI, B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 20, p. 1716-172, 2000.

CARR, A. C.; MCCALL, M. R.; FREI, B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v.20, p. 1716-1723, 2000.

CARRASCO, E. et al. Photoactivation of ROS production in situ transiently activates cell proliferation in mouse skin and in the hair follicle stem cell niche promoting hair growth and wound healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, p. 2611-2622, 2015.

CARRASCO, E. et al. Switching on a transient endogenous ROS production in mammalian cells and tissues. **Methods**, v. 109, p. 180-189, 2016.

CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification, by HPLC-DADMS/MS, of carotenoids and phenolic compounds from the Amazonian fruit *Caryocar villosum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5884-5892, 2012.

CHISTÉ, R. C. et al. *In vitro* scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 127, p. 419-426, 2011.

CHOE, E.; MIN, D. B. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 1-22, 2006.

COMMISSION DIRECTIVE 95/45/EC. Laying down specific purity criteria concerning colours for use in foodstuffs. **Official Journal of the European Community**, L226: 1-41, 1995.

DAWILAI, S. et al. Anti-inflammatory activity of bioaccessible fraction from *Eryngium foetidum* leaves. **BioMed research international**, 2013.

FARHOOSH, R. et al. Structure–antioxidant activity relationships of o-hydroxyl, o-methoxy, and alkyl ester derivatives of p-hydroxybenzoic acid. **Food Chemistry**, v. 194, p. 128-134, 2016.

FERRER-SUETA, G.; RADI, R. Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. **ACS Chemical Biology**, v. 4, p. 161-177, 2009.

FREITAS, M.; LIMA, J. L.; FERNANDES, E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 649, p.8-23, 2009.

GARCIA-SALAS, P. et al. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v. 15, p. 8813-8826, 2010.

GHASEMZADEH, A.; JAAFAR, H. Z.; RAHMAT, A. Effects of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in two varieties of young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 1147-1154, 2011.

GHASEMZADEH, A. et al. Comparative evaluation of different extraction techniques and solvents for the assay of phytochemicals and antioxidant activity of hashemi rice bran. **Molecules**, v. 20, p. 10822-10838, 2015.

GOMES, A. et al. 2-Styrylchromones: Novel strong scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 6027-6036, 2007.

GÜLÇİN, I. et al. Screening of antiradical and antioxidant activity of monodesmosides and crude extract from *Leontice smirnowii* tuber. **Phytomedicine**, v. 13, p. 343-351, 2006.

HALLIWELL, B. et al. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 601-617, 1995.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Guidance for industry, Q2B validation of analytical procedures: Methodology. Geneva: ICH Secretariat c/o IFPMA7–10, 2005.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biology**, v. 1, p. 244-257, 2013.

KAVI RAJAN, R. et al. Increased ROS scavenging and antioxidant efficiency of chlorogenic acid compound delivered via a chitosan nanoparticulate system for efficient in vitro visualization and accumulation in human renal adenocarcinoma cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 1-29, 2019.

KIM, H. et al. Chlorogenic acid ameliorates alcohol-induced liver injuries through scavenging reactive oxygen species. **Biochimie**, v. 150, p. 131-138, 2018.

KOPPENOL, W. H. et al. Peroxynitrous acid: controversy and consensus surrounding an enigmatic oxidant. **Dalton Transactions**, v.41, p. 13779-13787, 2012.

KRUMOVA, K.; COSA, G. Chapter 1: Overview of Reactive Oxygen Species, In **Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences**, v. 1, p. 1-21, 2016.

KUMAR, A. et al. Cannabimimetic plants: are they new cannabinoidergic modulators?. **Planta**, v. 249, p. 1681-1694, 2019.

LEE, J. H.; JOHNSON, J. V.; TALCOTT, S. T. Identification of ellagic acid conjugates and other polyphenolics in muscadine grapes by HPLC-ESI-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6003-6010, 2005.

LEITÃO, D. S. T. C. et al. Amazonian *Eryngium foetidum* leaves exhibited very high contents of bioactive compounds and high singlet oxygen quenching capacity. **International Journal of Food Properties**, v. 23, p. 1452-1464, 2020.

MANDAL, S. et al. Assessment of the antioxidant and reactive oxygen species scavenging activity of methanolic extract of *Caesalpinia crista* leaf. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-12, 2011.

MARTINEZ-CORREA, H. A. et al. Integrated extraction process to obtain bioactive extracts of *Artemisia annua* L. leaves using supercritical CO₂, ethanol and water. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 535-542, 2016.

MEKHORA, C. et al. *Eryngium foetidum* suppresses inflammatory mediators produced by

macrophages. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, p. 653-664, 2012.

NAVEED, M. et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 67-74, 2018.

NAWAZ, H. et al. Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, p. 1-9, 2020.

OKAYAMA, Y. Oxidative stress in allergic and inflame matory skin diseases. **Current Drug Targets-Inflammation & Allergy**, v. 4, p. 517-519, 2005.

PAUL, J. H.; SEAFORTH, C. E.; TIKASINGH, T. *Eryngium foetidum* L.: a review. *Fitoterapia*, v. 82, p. 302-308, 2011.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, p. 11-26, 2015.

PISTÓN, M. et al. Infusion, decoction and hydroalcoholic extracts of leaves from artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *cardunculus*) are effective scavengers of physiologically relevant ROS and RNS. **Food Research International**, v. 64, p. 150-156, 2014.

PRYOR, W. A. et al. Free radical biology and medicine: it's a gas, man!. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, R491-R511, 2006.

RAHMAN, M. et al. Antioxidant activity of *Centella asiatica* (Linn.) Urban: Impact of extraction solvent polarity. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 1, p. 1-6, 2013.

RASHMI, H. B.; NEGI, P. S. Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. **Food Research International**, v. 136, p. 1-14, 2020.

RIBEIRO, A. B. et al. Bioactive compounds and scavenging capacity of extracts from different parts of *Vismia cauliflora* against reactive oxygen and nitrogen species. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, p. 1267-1276, 2015.

RIBEIRO, A. B. et al. *Solanum diploconos* fruits: profile of bioactive compounds and *in vitro* antioxidant capacity of different parts of the fruit. **Food & Function**, v. 7, p. 2249-2257, 2016.

RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and phenolic compounds from *Solanum sessiliflorum*, an unexploited Amazonian fruit, and their scavenging capacities against reactive oxygen and nitrogen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 3022-3029, 2013.

ROJAS, J.; BUITRAGO, A. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Biosynthesized by Plants and Its Relationship with Prevention of Neurodegenerative Diseases. In: **Bioactive Compounds**. Woodhead Publishing, 2019. p. 3-31.

SANTANA-GÁLVEZ, J.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A. Chlorogenic acid: Recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome. **Molecules**, v. 22, p. 1-21, 2017.

SEN S, DE B.; DEVANNA, N.; CHALCRABORTY, R. Total phenolic, total flavonoid content, and antioxidant capacity of the leaves of *Meyna spinosa* Roxb., an Indian medicinal

plant. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, p. 149-157, 2013.

SHAFIQUE, M. et al. Thermodynamic characteristics of solvents: A review. **Research Journal of Chemical Sciences**, v. 3, p. 98-104, 2013.

SHE, M.; WATSON, M. *Eryngium linnaeus*, Sp. Pl. 1: 232.1753. Flora of China, v. 14, n. 1, p. 23-24, 2005.

SIES, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress. **Redox biology**, v. 11, p. 613-619, 2017.

SINGH, S. et al. Determination of Bioactives and Antioxidant Activity in *Eryngium foetidum* L.: A Traditional Culinary and Medicinal Herb. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 83, p. 453-460, 2013.

SINGH, S. et al. Estimation of proximate composition, micronutrients and phytochemical compounds in traditional vegetables from Andaman and Nicobar Islands. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 62, 765-773, 2011.

SONG, J.; GUO, D.; BI, H. Chlorogenic acid attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative stress in lens epithelial cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 41, p. 765-772, 2018.

STEFANELLO, N. et al. Coffee, caffeine, chlorogenic acid, and the purinergic system. **Food and Chemical Toxicology**, v. 123, p. 298-313, 2019.

TAJIK, N. et al. The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. **European Journal of Nutrition**, v. 56, p. 2215-2244, 2017.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

WESTBERG, M. et al.. Control of singlet oxygen production in experiments performed on single mammalian cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 321, p. 297-308, 2016.

CONCLUSÃO GERAL

A chicooia (*E. foetidum*) é uma fonte promissora para a pesquisa de compostos bioativos no Pará, Brasil. Os principais carotenoides identificados na chicoria foram a lutein e β -caroteno. As folhas apresentaram um alto teor de atividade provitamina A. Seus compostos químicos majoritários são potencialmente benéficos para a manutenção da saúde humana. A chicoria também apresenta elevado teor de compostos fenólicos, com destaque para o ácido clorogênico e o ácido ferúlico derivativo. Os compostos bioativos aqui reportados têm sido associados com a redução de patologias degenerativas. O extrato hidroetanólico apresentou boa capacidade antioxidante contra ROS e RNS, entretanto, a maior eficiência na desativação de espécies reativa foi frente as ROS, com destaque para o $O_2^{\cdot-}$, resposta significativa, uma vez que essa espécie participa da formação de várias outras espécies com maior reatividade e toxicidade. Pela primeira vez o perfil de compostos bioativos por HPLC-DAD-MS, bem como o potencial antioxidante de folhas de chicoria contra ROS e RNS de importância fisiológica estão sendo reportados e dão suporte para a caracterização este vegetal como uma fonte promissora de compostos bioativos de interesse para as indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosmética. Este estudo contribui de forma positiva para valorização desta planta nativa da região amazônica.

ANEXO A

Amazonian *Eryngium foetidum* leaves exhibited very high contents of bioactive compounds and high singlet oxygen quenching capacity

Deusa do Socorro Teixeira Costa Leitão^a, Francilia Campos Siqueira^a, Sérgio Henrique Brabo de Sousa^a, Adriana Zerlotti Mercadante^{ib}, Renan Campos Chisté^{id a,c}, and Alessandra Santos Lopes^{id ac}

^aPostgraduate Program of Food Science and Technology (PPGCTA), Institute of Technology (ITEC), Federal University of Pará (UFPA), Belém, PA, Brazil; ^bDepartment of Food Science, University of Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brazil; ^cFaculty of Food Engineering (FEA), Institute of Technology (ITEC), Federal University of Pará (UFPA), Belém, PA, Brazil

ABSTRACT

Phenolic compounds and carotenoids profile of Amazonian *Eryngium foetidum* leaves and the quenching ability of their hydrophilic extract against singlet oxygen (1O_2) were determined. Chlorogenic acid (4327 $\mu\text{g/g}$, dry basis, d.b.) was the major phenolic compound in the leaves at very high concentrations, while lutein (205 $\mu\text{g/g}$, d.b.) and β -carotene (161 $\mu\text{g/g}$, d.b.) were the major carotenoids. The extract of *E. foetidum* leaves was able to scavenge DPPH $^{\bullet}$ (91.6% at 5 mg/mL), ABTS $^{\bullet+}$ (15.77 μM Trolox equivalent/g extract) and it exhibited high efficiency to protect tryptophan against 1O_2 , with IC_{50} at 343 $\mu\text{g/mL}$ and 78% of protection at the highest tested concentration (625 $\mu\text{g/mL}$). Therefore, *E. foetidum* leaves can be exploited as an accessible natural source of bioactive compounds with antioxidant properties to be used by the food or pharmaceutical industries.

ARTICLE HISTORY

Received 30 April 2020
Revised 11 August 2020
Accepted 12 August 2020

KEYWORDS

Amazonian plant; phenolic compounds; carotenoids; antioxidant capacity; LC-MS

Introduction

Most of the natural vegetal resources found in Amazonia are exceptionally rich in bioactive compounds with antioxidant properties.^[1–3] Given this scenario, *E. foetidum*, a green leafy native of the Amazon region and Central America, is known as “chicory” in the Amazonian States of Brazil, has been included among the main non-conventional cultivated vegetables^[4] and it has attracting the attention of researchers for its versatility as both phytotherapeutic plant and spice herb in Amazonian dishes.^[5,6]

The chemical evaluation of *E. foetidum* leaves indicated a high concentration of phenolic compounds (total tannins and total flavonoids, as determined by spectrophotometry), presence of saponins, carotenoids, ascorbic acid, various triterpenoids, as well as antioxidant and anti-inflammatory activities.^[5–7] However, as far as we are concerned, there is no data in the literature describing the composition of individual phenolic compounds and carotenoids from *E. foetidum* leaves.

The importance of describing the composition of bioactive compounds in vegetables has been widely reported, due to the association between their ingestion and the decrease of the risk of developing chronic degenerative diseases, such as arteriosclerosis, cataracts, macular degeneration, cancer and others.^[8,9]

Bioactive compounds, such as phenolic compounds and carotenoids, play important role in human health due to modulatory effects on physiological or cellular activities. As examples, these compounds were reported to inhibit the induction of several proinflammatory cytokines and the impairment of

CONTACT Renan Campos Chisté  rchiste@ufpa.br; Alessandra Santos Lopes  alessalopes@ufpa.br  Faculty of Food Engineering (FEA), Institute of Technology (ITEC), Federal University of Pará (UFPA), Belém, PA 66075-110, Brazil

© 2020 Deusa do Socorro Teixeira Costa Leitão, Francilia Campos Siqueira, Sérgio Henrique Brabode Sousa, Adriana Zerlotti Mercadante, Renan Campos Chisté and Alessandra Santos Lopes. Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

endogenous antioxidant enzymatic systems during inflammation,^[10] and they are frequently associated with changes in the expression of genes implicated in cancer development, transcription, apoptosis, xenobiotic metabolism, inflammation, redox process, among others.^[11] Furthermore, one of the main biological actions of these compounds is related to their antioxidant capacity to scavenge reactive species, such as reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species. ROS and RNS exert normal physiological functions in the human organism; however, the overproduction of these species can damage cellular components, such as proteins, lipids and DNA, inducing the increased development of chronic degenerative diseases and premature aging.^[9]

Considering that *E. foetidum* leaves are widely used in traditional dishes in the Amazonia, the knowledge concerning their bioactive compound profiles and the associated antioxidant capacity are of paramount importance to support any claimed potential health benefits. Therefore, this study was designed to carry out the identification and quantification of phenolic compounds and carotenoids, by HPLC-DAD-MS/MS, in *E. foetidum* leaves cultivated in the Amazonia, as well as to evaluate the *in vitro* antioxidant potential of their hydrophilic extract against singlet oxygen (¹O₂) and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] free radicals.

Material and methods

Chemicals

Quercetin, all-*trans*- β -carotene, gallic acid, chlorogenic acid, ethanol, methanol, methyl *tert*-butyl ether (MTBE), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), potassium persulfate, methylene blue (MB), L-tryptophan, acetonitrile, formic acid, and all other analytical grade salts and solvents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Ultrapure water was obtained from the Pro arium[®] system (Sartorius, Germany). For chromatographic analysis, samples and solvents were filtered using 0.22 and 0.45 μ m Millipore membranes, respectively (Billerica, MA, USA).

Samples

Fifty plants were collected in ten rows of a producing property in Santa Izabel, Pará State, Brazil (Latitude: -1.29938, Longitude: -48.161, 1°17'58"South, 48°9'40"West), in July 2017. The *E. foetidum* leaves (approximately 500 g) were washed with distilled water and dried at 25°C/2 h. After that, part of the material was used to the proximate composition characterization and another one was freeze-dried (Liotop, L101, São Paulo, Brazil) at -55°C, in a continuous vacuum for 24 h and used for the bioactive compound determination and the assessment of the *in vitro* antioxidant capacity. The freeze-dried leaves were grinded, vacuum packed in plastic bags and stored under free-light conditions at -18°C until analysis.

Proximate composition

Analysis of moisture, ashes, lipids and protein (conversion factor of 5.75 of total nitrogen to total protein for plants) were determined according to AOAC.^[12] Carbohydrate were calculated by difference [Total carbohydrates = 100-(%moisture+% ashes+% total proteins+% total lipids)]. Total energetic value was calculated according to the specific Atwater conversion factor for vegetables, as follows: total energetic value (kcal/100 g) = (protein \times 2.44 kcal/g)+(lipid \times 8.37 kcal/g)+(total carbohydrate \times 3.57 kcal/g).^[13] The experiments were carried out in triplicate and expressed in g/100 g (%) (fresh weight, f.w.).

Bioactive compounds and antioxidant capacity

Equipment

The identification of carotenoids and phenolic compounds in the samples was carried out in a Shimadzu HPLC (Prominence UFLC model, Kyoto, Japan) equipped with a binary pump (LC-20AD), a degasser unit (DGU-20A3R), an automatic injector (SIL-20AHT), an oven (CTO-20A), a DAD detector (SPD-M20A) and connected in series to a MS from Bruker Daltonics (Amazon speed ETD, Bremen, Germany) with an ion-trap as the m/z analyzer and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and electrospray (ESI) and as the ionization sources for carotenoids and phenolic compounds, respectively. The quantification of phenolic compounds and carotenoids was carried out in an Agilent HPLC (Agilent 1260 Infinity model, Santa Clara, CA, USA) equipped with a quaternary pump (G1311C), an automatic injector (G7129), an oven (G1316A) and a DAD detector (G1328C).

Bioactive compounds. The carotenoids were extracted from 0.5 mg of freeze-dried leaves and the final extract was solubilized in MTBE and filtered immediately before injecting into the HPLC systems. The carotenoids were separated on a C30 YMC column (5 μm , 250 mm \times 4.6 mm) at 29°C, with a linear gradient of methanol (solvent A) and MTBE (solvent B) at 0.9 mL/min.^[14] The UV-Visible spectra were recorded between 200 and 600 nm and the chromatograms were processed at 450 nm. The column eluent was directed to the APCI interface, the MS spectra were obtained after ionization in the positive ion mode, with a scan interval at m/z 100 to 800, and the MS parameters were set as described by Chisté and Mercadante.^[14] The carotenoids were identified according to the following combined information: elution order and retention time at C₃₀ column, co-elution with authentic standards, UV-visible [λ_{max} , spectral thin structure (%III/II) and *cis* peak intensity (%AB/AII)] and MS spectra, in comparison to the analyzed standards and data available in the literature.^[2,3,14-18] The identification of *cis* isomers of carotenoids was carried out based on the observed decrease in %III/II values and increase in %A_B/A_{II} values ($\approx 7\text{--}11\% = 9\text{-cis}$, $\approx 45\% = 13\text{-cis}$ and $\approx 56\% = 15\text{-cis}$ carotenoid).^[17]

The carotenoids were quantified using β -carotene as the external standard at concentrations varying from 3.12 to 100 $\mu\text{g/mL}$ [$R^2 = 0.99$, limit of detection (LOD) = 0.97 $\mu\text{g/mL}$ and limit of quantification (LOQ) = 2.96 $\mu\text{g/mL}$ and lutein [$R^2 = 0.98$, LOD = 0.20 $\mu\text{g/mL}$ and LOQ = 0.62 $\mu\text{g/mL}$]. The LOD and LOQ were calculated using the parameters of the analytical curves (standard deviation and slope).^[19] For the calculation of the vitamin A content, the NAS-IOM conversion factor was used, considering 12 μg of all-*trans*- β -carotene in the extract corresponding to 1 μg of retinol activity equivalent (RAE), and the activity was of 100% for all-*trans*- β -carotene.^[20] The carotenoid contents were expressed in $\mu\text{g/g}$ (dry basis, d.b.), considering three independent extraction procedures ($n = 3$).

The phenolic compounds were extracted from the freeze-dried leaves (0.5 g) with a methanol/water solution (80:20 v/v), were separated on a C18 Synergi Hydro column (Phenomenex, 4 μm , 250 \times 4.6 mm), set at 29°C. The UV-visible spectra were obtained between 200 and 600 nm, and the chromatograms were processed at 270, 320 and 360 nm. The MS spectra were obtained at m/z from 100 to 1000 after ionization in an ESI source.^[14] The phenolic compounds were identified based on the following data: elution order and retention times, UV-visible and MS spectra features in comparison with authentic standards (data not shown) and analyzed under the same conditions and data available in the literature.^[1,8,14] Quantitation was carried out by external standards with six-point analytical curves (3.12–100 $\mu\text{g/mL}$, in duplicate): quercetin (360 nm, $R^2 = 0.99$, LOD = 0.15 $\mu\text{g/mL}$ and LOQ = 0.62 $\mu\text{g/mL}$), kaempferol (360 nm, $R^2 = 0.99$, LOD = 0.15 $\mu\text{g/mL}$ and LOQ = 0.62 $\mu\text{g/mL}$) and chlorogenic acid (320 nm, $R^2 = 0.99$, LOD = 0.15 $\mu\text{g/mL}$ and LOQ = 0.62 $\mu\text{g/mL}$). The contents were expressed in $\mu\text{g/g}$ of freeze-dried leaves (d.b.), considering three independent extraction procedures ($n = 3$).

In vitro antioxidant capacity. The extracts of *E. foetidum* leaves used for the antioxidant capacity assays were obtained according to the same procedure described for phenolic compounds identification.

Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay was determined according to a procedure proposed by Re et al.,^[21] with modifications. Aliquots of 30 μL of *E. foetidum* leaf extracts reacted with $\text{ABTS}^{\bullet+}$ and the absorbance was read at 734 nm after 6 min. The antioxidant capacity was calculated using analytical curves (duplicate) of trolox at concentrations varying from 102 to 2048 μM and the results were expressed in μM Trolox equivalent (TE)/g leaves (f.w.).

The DPPH assay was carried out according to the procedure described by Cheng et al.,^[22] by monitoring the reaction between the *E. foetidum* leaf extracts and DPPH radical at 515 nm after 27 min. The antioxidant capacity was calculated according to Eq. 1, and the results were expressed as % of inhibition of the DPPH^{\bullet} (d.b.).

$$\% \text{ of inhibition of the } \text{DPPH}^{\bullet} = \frac{(A1 - A0)}{(A0)} \times 100 \quad \text{Equation1}$$

where, A1: absorbance before reaction (DPPH^{\bullet} + methanol), A0: absorbance after reaction (DPPH^{\bullet} + extract).

The quenching ability of *E. foetidum* leaf extract against singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) was carried out according to the procedure described by Siqueira et al.,^[23] The extracts (125 to 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and quercetin standard (positive control) (0.78 to 4.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were tested at four concentrations. The kinetic data obtained from the decay intensity of TRP absorbance at 219 nm were fitted to a first order reaction (Eq. 2) using Origin Pro 8 software (OriginLab Corporation, Northampton, MA) and the rate constants were calculated (Eq. 3). The percentage of protection of TRP that the *E. foetidum* extracts (EXT) or quercetin exhibited against $^1\text{O}_2$ was calculated through Eq. 4.

$$Y = Y_{\infty} + A \cdot \exp(-k \cdot x) \quad \text{Equation2}$$

$$k = \frac{\ln 2}{t^{1/2}} \quad \text{Equation3}$$

$$\text{Protection}(\%) = \frac{k_{\text{obs}}^{\text{TRP}} - k_{\text{obs}}^{\text{TRP+EXT}}}{k_{\text{obs}}^{\text{TRP}}} \times 100 \quad \text{Equation4}$$

where Y is the absorbance of TRP; Y_{∞} is the absorbance of TRP in infinite time; A is a preexisting factor; k is a pseudo-first order rate constant; x is the reaction time; $t_{1/2}$ is the half-life time (min); $k_{\text{obs}}^{\text{TRP}}$ is the observed pseudo-first order rate constant fitted to the TRP decay curve (obtained in the blank experiment); and $k_{\text{obs}}^{\text{TRP+EXT}}$ is the observed pseudo-first order rate constant fitted to the TRP decay curve in the presence of the *E. foetidum* extract (EXT) or quercetin standard.

Results and discussion

Proximate composition of *Eryngium foetidum* leaves

The main chemical constituents of the *E. foetidum* leaves showed a moisture content of $\approx 87\%$, similar to those reported for *E. foetidum* leaves cultivated in Asia^[6] and Alta Verapaz, Guatemala^[24] with values varying from 86 to 89%. The lipid content (2.8%) and protein content (1.99%) were approximately 10 and 3 fold higher, respectively, than those reported for the leaves of *E. foetidum* from Andaman and Nicobar Islands.^[6] The values of carbohydrates were 1.5 times higher than those found for the leaves of *E. foetidum* from Alta Verapaz (Guatemala).^[24] Regarding the energetic value, the leaves of *E. foetidum* exhibited 52.23 (± 5.46) kcal/100 g.

Carotenoid profile of *Eryngium foetidum* leaves

The HPLC-DAD-APCI-MSⁿ analysis allowed the identification and quantification of nine carotenoids. The MS/MS experiment confirmed the assignment of the protonated molecule ($[M+H]^+$) of all carotenoids identified through the expected fragments from the polyene chain of carotenoids and functional groups, along with the UV-Vis spectra (Figure 1, Table 1). Peak 1 was tentatively identified as a mix of all-*trans*-violaxanthin + 9-*cis*-neoxanthin due to the presence of a protonated molecule ($[M+H]^+$) at m/z 601 and fragments at m/z 583, 565, and 547 corresponding to neutral losses of one, two and three OH groups (-18 u), respectively, along with a fragment at m/z 509, showing the neutral loss of a toluene moiety ($[M+H-92]^+$). In addition, other fragments were detected at m/z 393, resulting from the cleavage of the allylic double bond to the allenic carbon (9-*cis*-neoxanthin), as well as the fragment at m/z 221 corresponding to the presence of a β -ring epoxy substituent with a OH group.^[15,17,18] This same carotenoid mixture was previously reported in Brazilian loquat.^[16]

Peak 2 was identified as all-*trans*-luteoxanthin due to the λ_{\max} at 421 nm and the high %III/II value (100%), which are characteristic of this epoxy-carotenoid, and also due to the $[M+H]^+$ at m/z 601, and the fragment at m/z 583 $[M+H-18]^+$, as well as the m/z 221, similar to that reported for Amazonian fruits.^[18]

Peak 3 was identified as a mixture of *cis*-lutein + epoxy-carotenoid because two protonated molecules were detected, one at m/z 585 and another at m/z 569. The m/z 585 showed fragments at m/z 567, 549 and 531, corresponding to consecutive losses of one, two and three hydroxyl groups, respectively, at m/z 493 $[M+H-92]^+$ corresponding to the neutral loss of toluene, at m/z 475 $[M+H-18-92]^+$ and at m/z 221. The $[M+H]^+$ at m/z 569 showed the following characteristic lutein fragments: m/z 551 and m/z 533 due to the removal of one and two water molecules, respectively, together with the fragment at m/z 477, corresponding to the loss of toluene ($[M+H-92]^+$), m/z 463 $[M+H-106]^+$ corresponding to loss of a xylene group, as well as fragment at m/z 459 $[M+H-92]^+$, resulting from the loss of toluene and one water molecule. These fragmentation patterns were also reported in *Couepia bracteosa* fruit^[2,3] and in *Dovyalis* and tamarillo fruits.^[17]

Peaks 4 and 5 were tentatively identified as all-*trans*-lutein and all-*trans*-zeaxanthin, respectively. Both the compounds are isomers and, therefore, present the same $[M+H]^+$ at m/z 569. Lutein has a β -ring and a ϵ -ring and zeaxanthin two β -rings. Thus, one of the OH groups of lutein are allylic to the double bond in the ϵ -ring and not conjugated to the polyene chain, resulting in ten conjugated double

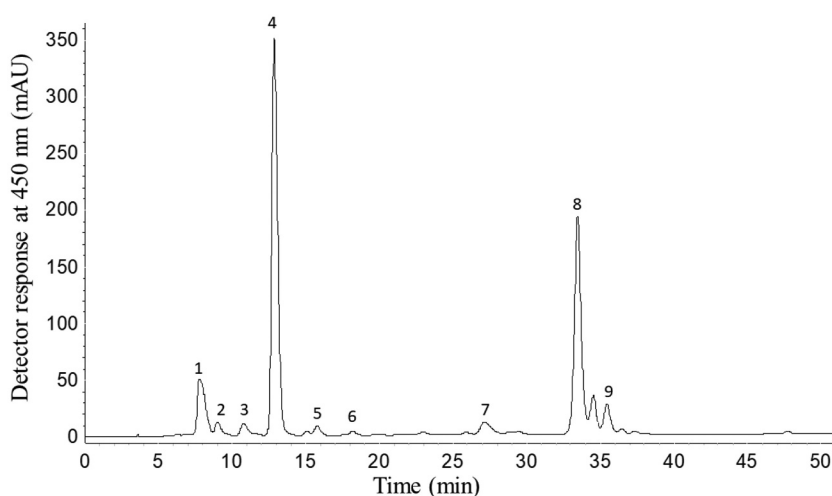


Figure 1. HPLC-DAD chromatogram of the carotenoids of Amazonian *Eryngium foetidum* L. leaves. Peak identification: **1** = Mix of all-*trans*-violaxanthin+9-*cis*-neoxanthin; **2** = all-*trans*-Luteoxanthin; **3** = Mix of *cis*-lutein + epoxy-carotenoid; **4** = all-*trans*-Lutein; **5** = all-*trans*-Zeaxanthin; **6** = 9-*cis*-Lutein; **7** = 13-*cis*- β -Carotene; **8** = all-*trans*- β -Carotene; **9** = 9-*cis*- β -Carotene.

Table 1. Chromatographic, UV-visible, mass spectroscopy characteristics and content of carotenoids from *Eryngium foetidum* leaves, obtained by HPLC-DAD-APCI-MS/MS.

Peak	Carotenoid ^a	Concentration ($\mu\text{g}/\text{g}$ leaves) ^b	t_R (min) ^c	λ_{max} (nm) ^d	%III/II	%A _B /A _H	[M + H] ⁺ (m/z)	MS/MS (+) (m/z)
1	Mix of all- <i>trans</i> -violaxanthin + 9- <i>cis</i> -Neoxanthin ^f	43.81 \pm 6.97	7.6	415, 438, 468, 326, 412, 435, 464	88	0	601	583[M + H-18] ⁺ , 565[M + H-18-18] ⁺ , 547[M + H-18-18-18] ⁺ , 509[M + H-92] ⁺ , 491[M + H-18-92] ⁺ , 393, 221
2	All- <i>trans</i> -luteoxanthin ^f	12.84 \pm 1.92	8.8	398, 421, 448	100	0	601	583 [M + H - 18] ⁺ , 565 [M + H - 18 - 18] ⁺ , 547[M + H - 18 - 18 - 18] ⁺ , 509 [M + H - 92] ⁺ , 491[M + H-18-92], 221
3	Mix of <i>cis</i> -lutein + epoxy-carotenoid ^f	37.85 \pm 1.21	10.5	330, 420, 442, 470	50	24	585 ^e 569	567[M + H-18] ⁺ , 549[M + H-18-18] ⁺ , 531[M + H-18-18-18] ⁺ , 493[M + H-92] ⁺ , 475[M + H-18-92] ⁺ , 221 551[M + H-18] ⁺ , 533[M + H-18-18] ⁺ , 477[M + H-92] ⁺ , 463[M + H-106] ⁺ , 459 [M + H-18-92] ⁺
4	All- <i>trans</i> -lutein ^f	204.86 \pm 3.15	12.8	420, 444, 472	64	0	569	551[M + H-18] ⁺ , 533[M + H-18-18] ⁺ , 477[M + H-92] ⁺ , 463[M + H-106] ⁺ , 459 [M + H-18-92] ⁺
5	All- <i>trans</i> -zeaxanthin ^f	9.37 \pm 0.42	15.3	420, 450, 477	33	0	569	551[M + H - 18] ⁺ , 533[M + H - 18 - 18] ⁺ , 477[M + H - 92] ⁺
6	9- <i>cis</i> -Lutein ^f	33.42 \pm 0.21	18.4	332, 420, 444, 472	60	nc	569 ^e	551[M + H - 18] ⁺ , 533[M + H - 18 - 18] ⁺ , 477[M + H - 92] ⁺ , 459[M + H-18-92], 431
7	13- <i>cis</i> - β -carotene ^f	20.55 \pm 5.11	28.9	337, 420, 444, 469	11	46	537	444[M-92] ⁺
8	All- <i>trans</i> - β -carotene ^f	160.73 \pm 17.62	32.9	420, 451, 478	29	0	537	444[M-92] ⁺
9	9- <i>cis</i> - β -carotene ^f	29.70 \pm 7.54	34.8	336, 420, 446, 472	25	9	537	444[M-92] ⁺
Total sum of carotenoids ($\mu\text{g}/\text{g}$ leaves)		552.57 \pm 25.53						
Vitamin A value (μg RAE/g leaves) ^g		16.76 \pm 0.29						

^aTentative identification based on UV-Visible and mass spectra as well as relative HPLC retention times and published data. ^bMean \pm standard deviation (n = 3, dry weight) and the peaks were quantified as equivalent of β -carotene. ^cRetention time on C₃₀ column. ^dLinear gradient of methanol/MTBE. ^eIn-source detected fragment. ^fThe peaks were quantified as equivalent of β -carotene and lutein. ^gRAE = retinol activity equivalent.

bonds (c.d.w.). On the other hand, zeaxanthin the two β -rings double bonds are conjugated to the polyene chain and, consequently, the chromophore shows 11 c.d.w. Based on these characteristics, it is possible to identify these two compounds by the UV-visible and MS spectra features. As expected, λ_{\max} values of lutein were lower than those of zeaxanthin, the MS spectrum of all-*trans*-zeaxanthin showed a more intense $[M + H]^+$ at m/z 569 compared to the m/z 551 $[M + H - 18]^+$ fragment, while the opposite was observed for lutein, as previously reported.^[14,17,18]

Peak 6 presented the same MS spectra features observed to all-*trans*-lutein and was identified as 9-*cis*-lutein, as its UV-visible spectra was similar to the all-*trans*-carotenoid, but taking into account the presence of the *cis* peak at 332 nm. Peaks 7, 8 and 9 showed the same $[M + H]^+$ at m/z 537 with a characteristic neutral loss of toluene at m/z 444 $[M - 92]^+$. These peaks were identified as 13-*cis*- β -carotene, all-*trans*- β -carotene and 9-*cis*- β -carotene, respectively, based on their UV-visible characteristic differentiation as the increased $\%A_B/A_{II}$ values ($\approx 7\text{--}11\% = 9\text{-cis}$; $\approx 45\% = 13\text{-cis}$ -carotenoid). Peaks 7 and 9 were characterized as *cis*-isomers considering the presence of the *cis* peak at the 336–337 nm. The assignment of *cis*-isomers also considered that the fine spectral structure ($\%III/II$) decreased and the intensity of the *cis* peak ($\%AB/A_{II}$) increased as the *cis*-double bond is approaching the center of the molecule.^[21] The identification of all-*trans*- β -carotene was positively confirmed by co-elution and comparison of the UV-Visible and MS spectra with an authentic standard.

The major carotenoids were all-*trans*-lutein (37%), and all-*trans*- β -carotene (29%), the other seven carotenoids represented approximately 25% of the total sum. The total sum of the carotenoids identified from the leaves of *E. foetidum* (Table 1) was which was high when compared to other plants, such as *Brassica oleracea*, broccoli (*B. oleracea* L. var. *Italica*) (222.8–367.6 $\mu\text{g/g}$ d.b.) and cauliflower (*B. oleracea* L. var. *Botrytis*) (36.5–146.8 $\mu\text{g/g}$ d.b.).^[25] The vitamin A value found in *E. foetidum* leaves was 16.76 μg RAE/g (d.b.). For vitamin A activity, it should be remembered that a carotenoid must have at least one unsubstituted β -ionone ring attached to the polyene chain with at least eleven carbons. According to these structural requirements, among the nine identified carotenoids, only β -carotene (100% conversion) and its isomers (50% conversion) showed vitamin A activity. Therefore, the main contribution to the total vitamin A value was from β -carotene (86.5%).

Scientific studies have shown a positive correlation between high fruit and vegetable intake, especially rich in lutein and zeaxanthin, with a reduced risk of macular degeneration.^[26,27] Other benefits are also associated with the ingestion of these pigments, such as reduction of the risk of cataract, protective effect against atherosclerosis, prevention of the onset and progression of some types of cancer and other chronic degenerative diseases.^[28] Lutein and zeaxanthin contents reported here were higher than those reported previously for India mustard (lutein; 53.8 ± 4.2 ; zeaxanthin; 0.8 ± 0.1), broccoli (lutein; 1.4 ± 0.2 ; zeaxanthin; not detected), spinach (lutein; 43.7 ± 3.8 ; zeaxanthin; 0.7 ± 0.1), watercress (lutein; 42.8 ± 4.1 ; zeaxanthin; 0.4 ± 0.1), endive (lutein; 34.2 ± 4.0 ; zeaxanthin; 0.4 ± 0.1), lettuce (lutein; 2.0 ± 0.1 ; zeaxanthin; 0.1 ± 0.1) and cabbage (lutein; 2.5 ± 0.1 ; zeaxanthin; 0.1 ± 0.1).^[29] Importantly, the values indicated by Britton and Khachik,^[30] to classify individual carotenoid levels as high (500–2000 $\mu\text{g}/100$ g or 5–20 $\mu\text{g/g}$) and very high (> 2000 $\mu\text{g}/100$ g or > 20 $\mu\text{g/g}$) suggested that *E. foetidum* leaves can be considered as a very high source of lutein and β -carotene and a high source of zeaxanthin. Furthermore, based on the daily intake ranges of carotenoids reported by Meléndez-Martínez,^[31] the intake of 30 g of *E. foetidum* fresh leaves correspond to dietary intake of 7% and 156% of β -carotene and lutein, respectively.

Phenolic compounds profile of *Eryngium foetidum* leaves

Regarding the profile of phenolic compounds, the HPLC-DAD-ESI-MSⁿ allowed the identification and quantification of six phenolic compounds (Table 2, Figure 2). Peak 1 was identified as chlorogenic acid since it exhibited a deprotonated molecule ($[M - H]^-$) at m/z 353 and an intense fragment at m/z 191 ($[M - H - 162]^-$) corresponding to the loss of a caffeoyl moiety releasing quinic acid. Chlorogenic acid was the main phenolic compound found in leaf extract of *E. foetidum* accounting for 43.28% of the total sum, and was positively confirmed based on the same UV-visible features and MS

Table 2. Chromatographic, spectroscopic characteristics and content of phenolic compounds from *Eryngium foetidum* leaves, obtained by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ.

Peak	Phenolic compound ^a	Concentration ($\mu\text{g}/\text{g}$ leaves) ^b	t_{R} (min) ^c	λ_{max} (nm) ^d	$[\text{M} - \text{H}]^{-}$ (m/z)	MS^2 (-) (m/z) ^e	MS^3 (m/z) ^f
1	Chlorogenic acid ^f	4327.62 ± 752.97	19.2	300(sh), 326	353	191 , 179, 173	[353 \rightarrow 191]: 127
2	Feruloylquinic acid ^f	147.66 ± 19.64	23.3	265, 326	367	193	[367 \rightarrow 193]: 173
3	Quercetin glucuronide ^g	334.34 ± 24.78	27.5	354	477	301	[477 \rightarrow 301]: 273, 257, 229, 179, 151, 107
4	Luteolin hexoside ^h	226.72 ± 44.99	28.8	265,300 (s), 347	447	327, 285 , 257	[447 \rightarrow 285]: 268, 257, 243, 229
5	Luteolin glucuronide ^h	1071.47 ± 248.78	30.0	265, 347	461	285	[461 \rightarrow 285]: 268, 258, 243
6	Ferulic acid derivative ^f	3891.94 ± 402.28	31.3	285(sh), 330	359	341, 225, 200, 182, 165 , 137	[359 \rightarrow 165]: nd
Total sum of phenolic ($\mu\text{g}/\text{g}$ leaves)		9999.76 ± 172.82					

^aTentative identification based on UV-Visible and mass spectra as well as relative HPLC retention times and published data. ^bn = 3 (dry weight). ^cRetention time on the C₁₈ Synergi Hydro (4 μm) column. ^dSolvent: gradient of 0.5% formic acid in water and acetonitrile with 0.5% formic acid. ^eIn the MS/MS, the most abundant ion is shown in boldface. Peaks were quantified as equivalent to ^fchlorogenic acid, ^gquercetin and ^hapigenin. ^fThe MS³ fragments were obtained from the most abundant ion in the MS/MS experiment.

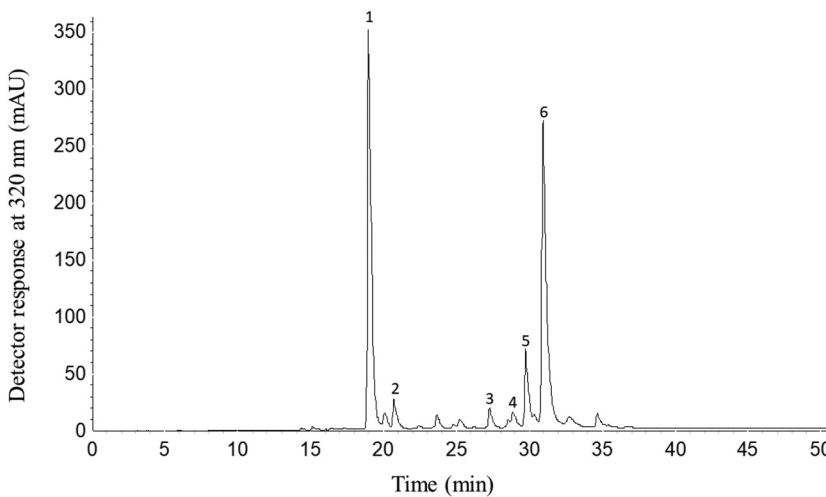


Figure 2. HPLC-DAD chromatogram of phenolic compounds of *Eryngium foetidum* L. leaves. Chromatographic conditions: see text. Peak characterization is given in Table 2. Peak identification: 1: Chlorogenic acid; 2: Feruloylquinic acid; 3: Quercetin glucuronide; 4: Luteolin hexoside; 5: Luteolin glucuronide; 6: Ferulic acid derivative.

fragmentation pattern observed for the authentic standard. The content of the chlorogenic acid found in this study (Table 2) was 9 times higher than that found in artichoke leaves (*Cynara cardunculus* var. Scolymus Hayek L.) (481 $\mu\text{g}/\text{g}$, d.b.).^[32]

Peak 2 was tentatively identified as feruloylquinic acid, with $[\text{M} - \text{H}]^{-}$ at m/z 367 and a MS^2 fragment at m/z 193 $[\text{M} - \text{H} - 174]^{-}$, corresponding to ferulic acid after losing the quinic acid attached to the molecule. This fragmentation pattern corresponds to those previously described for feruloylquinic acid found in artichoke extracts.^[33]

Peak 3 was identified as quercetin-glucuronide with $[\text{M} - \text{H}]^{-}$ at m/z 477 and MS^2 fragment at m/z 301 $[\text{M} - \text{H} - 176]^{-}$ showing the quercetin molecule after the removal of a glucuronic acid unit. The fragments of quercetin (m/z 301) in the MS^3 experiment was the same as reported in studies where quercetin-glucuronide was identified.^[1,8]

Peaks 4 and 5 showed $[M-H]^-$ at m/z 447 and 461, respectively, and were identified as luteolin derivatives according to their UV-Visible and MS spectra and data available in the literature.^[8,33] Peak 4 presented an intense fragment at m/z 285 ($[M-H-162]^-$) in the MS² spectrum, corresponding to the loss of an hexose unit and was identified as a luteolin hexoside. Peak 5 was identified as luteolin glucuronide due to the same fragment at m/z 285 ($[M-H-176]^-$) in the MS² spectrum, which corresponds to the loss of one glucuronic acid unit. Both the peaks showed the same fragmentation pattern for luteolin (m/z 285) in the MS³ spectra, as compared to previous data.^[8,33] The intake of luteolin and apigenin (flavones) in the diet is usually lower than that of flavonols, such as quercetin and kaempferol, since they occur in significant concentrations in few foods. A luteolin was identified in artichoke leaves with a concentration ranging from 53 (\pm 1) a 69 (\pm 2) $\mu\text{g/g}$ d.b.,^[32] whose values are lower than those reported in this study for leaves of *E. foetidum*.

Peak 6 exhibited the $[M-H]^-$ at m/z 359 with an MS² fragment at m/z 165 ($[M-H-194]^-$) corresponding to the loss of ferulic acid, being tentatively identified as a ferulic acid derivative. The MS characteristics of this compound were similar to those previously reported for ferulic acid derivatives in strawberry (*Fragaria ananassa*).^[34]

The content of phenolic compounds found in this study was higher than previously reported for leaves of *E. foetidum* from the Andaman and Nicobar Islands (India) whose value of 283.10 $\mu\text{g/g}$ (d.b.) (35 times less) was determined by spectrophotometry.^[6] When compared to other plants, such as artichoke leaves (*Cynara cardunculus* var. *Scolymus* Hayek L.), the phenolic content of *E. foetidum* leaves was approximately 7 times higher (1387 $\mu\text{g/g}$, d.b.).^[32] The average consumption of total phenolic compounds and, more specifically phenolic acids, by the Brazilian population was reported to be 460.15 and 314 mg/day, respectively.^[35] Based on this information, the ingestion of 30 g of *E. foetidum* leaves can contribute with \approx 10.4% and 8.5% of the total phenolic compounds and phenolic acids, respectively.

Antioxidant capacity of *Eryngium foetidum* leaf extract

The methanolic extract of *E. foetidum* were able to scavenge both ABST and DPPH radicals. However, the leaf extract of *E. foetidum* showed low efficiency in removing ABTS^{•+} (15.77 \pm 0.92 μM Trolox/g, FW) when compared to *Arrabidaea chica* leaves (86.81 TE/g, FW).^[23] This is the first time that the scavenging capacity of *E. foetidum* leaf extract against ABTS^{•+} was reported. The methanolic extract of *E. foetidum* leaves may also be able to capture DPPH[•] with inhibition percentage of 91.60 \pm 0.45% at the tested concentration of 0.06 $\mu\text{g/g}$, a value similar to that found for the extracts of *E. foetidum* leaves previously reported by Singh et al.,^[7] (92.7%), but superior to the authors of a previous study (73.93%).^[6]

ABTS^{•+} and DPPH[•] are stable, synthetic and non-biological free radicals; however, due to their chemical stability, sensitivity and operational ease in antioxidant capacity protocols, they are widely used in determining the in vitro antioxidant potential of isolated compounds or plant extracts from food samples.^[36]

Regarding the ¹O₂-quenching capacity, the extract of *E. foetidum* leaves, at the studied concentrations, was efficient to inhibit tryptophan degradation, as induced by the photosensitization reaction in the presence of methylene blue, showing excellent fitting to first order reaction, with a high determination coefficient ($R^2 = 0.99$) (Figure 3a). According to Figure 3b, ¹O₂ was inhibited in a concentration-dependent manner and the extract of *E. foetidum* leaves presented an IC₅₀ at 343.32 $\mu\text{g/mL}$ with high percentage of protection (77.50%) at the highest tested concentration (625 $\mu\text{g/mL}$). Quercetin (positive control) showed higher ¹O₂-quenching ability (IC₅₀ of 1.9 $\mu\text{g/mL}$) than the extracts of *E. foetidum* leaves. The extract of *E. foetidum* leaves was more effective against ¹O₂ than fruit extracts of *Terminalia chebula* (IC₅₀ = 424.50 $\mu\text{g/ml}$) and *Emblica officinalis* (IC₅₀ of 490.42 $\mu\text{g/ml}$).^[37] However, it was less efficient than the artichoke extracts (IC₅₀ = 20.5–30.1 $\mu\text{g/ml}$)^[33] and for *Caryocar villosum* fruit extracts (IC₅₀ = 156 $\mu\text{g/ml}$).^[38]

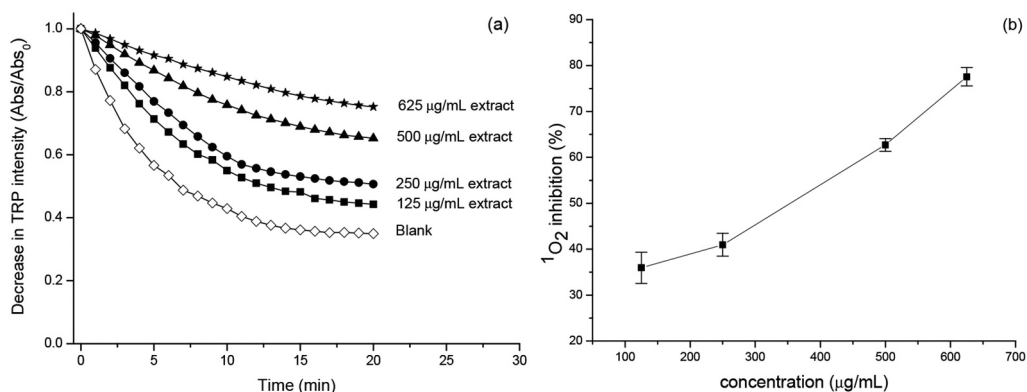


Figure 3. (a) Decay of the intensity of the absorbance of tryptophan in the presence of the methylene blue and extract of the *Eryngium foetidum* L. leaves and (b) percentage of inhibition of the ¹O₂ as a function of the concentration of the extract of the *Eryngium foetidum* L. leaves. The experiments were carried out in four concentrations and n = 3 (Mean ± standard deviation).

¹O₂ is an important ROS with high reactivity that can be found both in human body and in food systems. The formation of ¹O₂ can generate other physiological reactive species, such as alkyl (R[•]), alkoxy (RO[•]), organic hydroperoxides (ROOH), superoxide anion (O₂^{•-}), hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radical ([•]OH) and peroxynitrite (ONOO⁻), and these ROS are often responsible for several biological deleterious effects.^[39,40] Therefore, the investigation of plant extracts, such as *E. foetidum*, with high contents of bioactive compounds and high ability to inhibit ¹O₂ is highly desirable to support and stimulate deeper studies aiming the inhibition of the oxidation of biomolecules present in both the human body and food systems.

The high antioxidant potential of the *E. foetidum* leaf extract may be mainly attributed to the high contents of phenolic compounds in the hydrophilic extract (Table 2), which corroborates to the fact that the antioxidant action of phenolic compounds from plants is associated to the inhibition of the oxidizing effect of reactive species by delaying chain reactions and/or scavenging free radicals.^[9,33] Chlorogenic acid was the major phenolic compound found in the extract of *E. foetidum* leaves, and epidemiological studies showed a positive association between the consumption of foods containing chlorogenic acid and health benefits.^[41–43] These combined information makes Amazonian *E. foetidum* leaves an interesting plant source for research of food supplementation aiming increasing human health.

Importantly, the biological properties of chlorogenic acid, or any bioactive compound, depend on its bioavailability in the gut, which can be affected by several factors, such as the bioaccessibility of each compound, bioactive compounds–gut microbiota interactions, different mechanisms of absorption of water-soluble and lipid-soluble molecules, interactions with other nutrients, among others.^[44] Pharmacokinetic studies involving chlorogenic acid and its metabolites suggest that they bound to human serum albumin and/or may be sequestered in tissues to exhibit its biological activity.^[43]

The relevance of researches on bioactive constituents from plants is fully justified by the association that fruits, vegetables, and food legumes are therapeutic agents useful for treating a wide range of human disorders.^[45] Regarding the application on food industries, the safety concerns regarding some synthetic antioxidants could be relieved with the use of natural plant extracts with high contents of bioactive compounds at lower concentrations. Thus, *E. foetidum* leaves can be seen as a dietary source of natural antioxidants with potential health benefits whose consumption should be stimulated.

Conclusion

All-*trans*-lutein and all-*trans*-β-carotene were the major carotenoids in *E. foetidum* leaves, while chlorogenic acid and a ferulic acid derivative were the major phenolic compounds. Amazonian *E. foetidum* leaves, besides its traditional use in cooking and folk medicine, may represent a valuable

source of bioactive compounds with antioxidant properties, with undeniable nutraceutical value and great potential to be explored and used in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. Furthermore, future systematic studies based on cellular antioxidant capacity assays should be applied to understand the protective effects of the bioactive compounds of this plant species on different oxidative/nitrosative stress pathways.

Acknowledgments

The authors acknowledge CNPq (*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*, Brazil, Project 428403/2016-6), FAPESPA (*Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas*, Belém, PA, Brazil, grant number ICAAF 103/2014) and Federal University of Pará (UFPA) through PROPESP/UFPA for the financial support. D. S. Leitão was supported by CAPES (*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*, - Brasília, DF, Brazil – Finance Code 001). Adriana Z. Mercadante thanks FAPESP (*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*, São Paulo, Brazil, Projects 2013/07914-8 and 2018/23752-1) for the financial support.

Funding

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [428403/2016-6]; Fundacao Amazonia de Amparo a Estudos e Pesquisas (FAPESPA) [ICAAF 103/2014]; Coordenacao de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES) [Finance Code 001]; Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo (FAPESP) [2013/07914-8,2018/23752-1].

ORCID

Adriana Zerlotti Mercadante  <http://orcid.org/0000-0003-4547-6064>

Renan Campos Chisté  <http://orcid.org/0000-0002-4549-3297>

Alessandra Santos Lopes  <http://orcid.org/0000-0002-8584-5859>

References

- [1] Ribeiro, A. B.; Chisté, R. C.; Freitas, M.; Da Silva, A. F.; Visentainer, J. V.; Fernandes, E. Psidium Cattleianum Fruit Extracts are Efficient in Vitro Scavengers of Physiologically Relevant Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 165, 140–148. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.05.079.
- [2] Berto, A.; Ribeiro, A. B.; de Souza, N. E.; Fernandes, E.; Chisté, R. C. Bioactive Compounds and Scavenging Capacity of Pulp, Peel and Seed Extracts of the Amazonian Fruit Quararibea Cordata against ROS and RNS. *Food Res. Int.* 2015a, 77, 236–243. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.06.018.
- [3] Berto, A.; Ribeiro, A. B.; Sentandreu, E.; de Souza, N. E.; Mercadante, A. Z.; Chisté, R. C.; Fernandes, E. The Seed of the Amazonian Fruit Couepia Bracteosa Exhibits Higher Scavenging Capacity against ROS and RNS than Its Shell and Pulp Extracts. *Food Funct.* 2015b, 6(9), 3081–3090. DOI: 10.1039/c5fo00722d.
- [4] MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2010. Manual de hortaliças não-convencionais. MAPA/ACS: Brasília, p. 92. http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/vegetal/Qualidade/Qualidade%20dos%20Alimentos/manual%20hortali%C3%A7as_WEB_F.pdf. (accessed Feb 10, 2018).
- [5] García, M. D.; Saenz, M. T.; Gomez, M. A.; Fernandez, M. A. Topical Antiinflammatory Activity of Phytosterols Isolated from *Eryngium Foetidum* on Chronic and Acute Inflammation Models. *Phytotherapy Research. Int. J. Devoted Pharmacol. Toxicol. Eval. Nat. Product Derivatives.* 1999, 13(1), 78–80.
- [6] Singh, S.; Singh, D. R.; Salim, K. M.; Srivastava, A.; Singh, L. B.; Srivastava, R. C. Estimation of Proximate Composition, Micronutrients and Phytochemical Compounds in Traditional Vegetables from Andaman and Nicobar Islands. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2011, 62(7), 765–773. DOI: 10.3109/09637486.2011.585961.
- [7] Singh, S.; Singh, D. R.; Banu, S.; Salim, K. M. Determination of Bioactives and Antioxidant Activity in *Eryngium Foetidum* L.: A Traditional Culinary and Medicinal Herb. *Proc. National Acad. Sci. India Sec. B - Biolog. Sci.* 2013, 83(3), 453–460. DOI: 10.1007/s40011-012-0141-y.
- [8] Pereira, C.; Barros, L.; Carvalho, A. M.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I. C. F. R. Infusions of Artichoke and Milk Thistle Represent a Good Source of Phenolic Acids and Flavonoids. *Food Funct.* 2014, 6(1), 56–62. DOI: 10.1039/c4fo00834k.
- [9] Rojas, J.; Buitrago, A. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Biosynthesized by Plants and Its Relationship with Prevention of Neurodegenerative Diseases. *Bio. Compounds.* 2019, 3–31. DOI: 10.1016/b978-0-12-814774-0.00001-3.

- [10] Ribeiro, D.; Freitas, M.; Lima, J. L. F. C.; Fernandes, E. Proinflammatory Pathways: The Modulation by Flavonoids. *Med. Res. Rev.* **2015**, *35*(5), 1–57. DOI: [10.1002/med.21347](https://doi.org/10.1002/med.21347).
- [11] Pokimica, B.; García-Conesa, M. T. Critical Evaluation of Gene Expression Changes in Human Tissues in Response to Supplementation with Dietary Bioactive Compounds: Moving Towards Better-quality Studies. *Nutrients*. **2018**, *10*, 807. DOI: [10.3390/nu10070807](https://doi.org/10.3390/nu10070807).
- [12] AOAC (Association of Analytical Chemists). *Official Methods of Analysis*, 17th ed.; AOAC International: Gaithersburg, MD, USA, 2000.
- [13] FAO/WHO. **2003**. Food Energy—*methods of Analysis and Conversion Factors. Report of a Technical Workshop*. FAO Food and Nutrition Paper No. 77 Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome <http://www.fao.org/3/Y5022E/y5022e00> (accessed Dec 20, 2018).
- [14] Chisté, R. C.; Mercadante, A. Z. Identification and Quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of Carotenoids and Phenolic Compounds from the Amazonian Fruit Caryocar Villosum. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*(23), 5884–5892. DOI: [10.1021/jf301904f](https://doi.org/10.1021/jf301904f).
- [15] Faria, A. F.; De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z. Carotenoid Composition of Jackfruit (*Artocarpus Heterophyllus*), Determined by HPLC-PDA-MS/MS. *Plant Foods Human Nutr.* **2009a**, *64*(2), 108–115. DOI: [10.1007/s11130-009-0111-6](https://doi.org/10.1007/s11130-009-0111-6).
- [16] Faria, A. F.; Hasegawa, P. N.; Chagas, E. A.; Pio, R.; Purgatto, E.; Mercadante, A. Z. Cultivar Influence on Carotenoid Composition of Loquats from Brazil. *J. Food Compos. Anal.* **2009b**, *22*(3), 196–203. DOI: [10.1016/j.jfca.2008.10.014](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.10.014).
- [17] De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z. HPLC-PDA-MS/MS of Anthocyanins and Carotenoids from Dovyalis and Tamarillo Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2007a**, *55*(22), 9135–9141. DOI: [10.1021/jf071316u](https://doi.org/10.1021/jf071316u).
- [18] De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z. Identification and Quantification of Carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2007b**, *55*(13), 5062–5072. DOI: [10.1021/jf0705421](https://doi.org/10.1021/jf0705421).
- [19] ICH, **2005**. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). *Guidance for industry, Q2B validation of analytical procedures: Methodology*. Geneva: ICH Secretariat c/o IFPMA7–10.
- [20] NAS-IOM. *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*; National Academy Press 92: WA, **2001**.
- [21] Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *26*(9–10), 1231–1237. DOI: [10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- [22] Cheng, Z.; Moore, J.; Yu, L. High-throughput Relative DPPH Radical Scavenging Capacity Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*(20), 7429–7436. DOI: [10.1021/jf0611668](https://doi.org/10.1021/jf0611668).
- [23] Siqueira, F. C.; Leitão, D. S. T. C.; Mercadante, A. Z.; Chisté, R. C.; Lopes, A. Profile of Phenolic Compounds and Carotenoids of Arrabidaea Chica Leaves and the in Vitro Singlet Oxygen Quenching Capacity of Their Hydrophilic Extract. *Food Res. Int.* **2019**, *126*, 108597. DOI: [10.1016/j.foodres.2019.108597](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108597).
- [24] Booth, S.; Bressani, R.; Johns, T. Nutrient Content of Selected Indigenous Leafy Vegetables Consumed by the Kekchi People of Alta Verapaz, Guatemala. *J. Food Compos. Anal.* **1992**, *5*(1), 25–34. DOI: [10.1016/0889-1575\(92\)90005-5](https://doi.org/10.1016/0889-1575(92)90005-5).
- [25] Guzman, I.; Yousef, G. G.; Brown, A. F. Simultaneous Extraction and Quantitation of Carotenoids, Chlorophylls, and Tocopherols in Brassica Vegetables. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*(29), 7238–7244. DOI: [10.1021/jf302475d](https://doi.org/10.1021/jf302475d).
- [26] Eisenhauer, B.; Natoli, S.; Liew, G.; Flood, V. M. Lutein and Zeaxanthin — Food Sources, Bioavailability and Dietary Variety in Age-related Macular Degeneration Protection. *Nutrients*. **2017**, *9*(2). DOI: [10.3390/nu9020120](https://doi.org/10.3390/nu9020120).
- [27] Liu, R.; Wang, T.; Zhang, B.; Qin, L.; Wu, C.; Li, Q.; Ma, L. Lutein and Zeaxanthin Supplementation and Association with Visual Function in Age-related Macular Degeneration. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **2015**, *56*(1), 252–258. DOI: [10.1167/iovs.14-15553](https://doi.org/10.1167/iovs.14-15553).
- [28] Calvo, M. M.; Lutein: A Valuable Ingredient of Fruit and Vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, *45*(7–8), 671–696. DOI: [10.1080/10408690590957034](https://doi.org/10.1080/10408690590957034).
- [29] Murillo, E.; Meléndez-Martínez, A. J.; Portugal, F. Screening of Vegetables and Fruits from Panama for Rich Sources of Lutein and Zeaxanthin. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *122*(1), 167–172. DOI: [10.1016/j.foodchem.2010.02.034](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.034).
- [30] Britton, G.; Khachik, F. Carotenoids in Food. In *Carotenoids: Nutrition and Health*; Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., Eds.; Birkhauser: Basel, **2009**; Vol. 5, pp 45–66.
- [31] Meléndez-Martínez, A. J.; An Overview of Carotenoids, Apocarotenoids and Vitamin A in Agro-Food, Nutrition, Health and Disease. *Mol. Nutr. Food Res.* **2019**, *63*(15), 1801045. DOI: [10.1002/mnfr.201801045](https://doi.org/10.1002/mnfr.201801045).
- [32] Nouraei, S.; Rahimmalek, M.; Saeidi, G. Variation in Polyphenolic Composition, Antioxidants and Physiological Characteristics of Globe Artichoke (*Cynara Cardunculus* Var. *Scolymus Hayek* L.) As Affected by Drought Stress. *Sci. Hortic.* **2018**, *233*(October 2017), 378–385. DOI: [10.1016/j.scienta.2017.12.060](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.060).
- [33] Pistón, M.; Machado, I.; Branco, C. S.; Cesio, V.; Heinzen, H.; Ribeiro, D.; Freitas, M. Infusion, Decoction and Hydroalcoholic Extracts of Leaves from Artichoke (*Cynara Cardunculus* L. Subsp. *Cardunculus*) are Effective

- Scavengers of Physiologically Relevant ROS and RNS. *Food Res. Int.* 2014, 64, 150–156. DOI: [10.1016/j.foodres.2014.05.078](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.078).
- [34] Aaby, K.; Ekeberg, D.; Skrede, G. Characterization of Phenolic Compounds in Strawberry (*Fragaria X Ananassa*) Fruits by Different HPLC Detectors and Contribution of Individual Compounds to Total Antioxidant Capacity. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55(11), 4395–4406. DOI: [10.1021/jf0702592](https://doi.org/10.1021/jf0702592).
- [35] Corrêa, V. G.; Tureck, C.; Locateli, G.; Peralta, R. M.; Koehnlein, E. A. Estimate of Consumption of Phenolic Compounds by Brazilian Population. *Revista De Nutrição.* 2015, 28(2), 185–196. DOI: [10.1590/1415-52732015000200007](https://doi.org/10.1590/1415-52732015000200007).
- [36] Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 1841–1856. DOI: [10.1021/jf030723c](https://doi.org/10.1021/jf030723c).
- [37] Hazra, B.; Sarkar, R.; Biswas, S.; Mandal, N. Comparative Study of the Antioxidant and Reactive Oxygen Species Scavenging Properties in the Extracts of the Fruits of Terminalia Chebula, Terminalia Belerica and Emblica Officinalis. *BCM Complementary Altern. Med.* 2010, 10, 20.
- [38] Chisté, R. C.; Freitas, M.; Mercadante, A. Z.; Fernandes, E. The Potential of Extracts of *Caryocar Villosum* Pulp to Scavenge Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 135(3), 1740–1749. DOI: [10.1016/j.foodchem.2012.06.027](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.027).
- [39] Blázquez-Castro, A.; Breitenbach, T.; Ogilby, P. R. Singlet Oxygen and ROS in a New Light: Low-dose Subcellular Photodynamic Treatment Enhances Proliferation at the Single Cell Level. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2014, 13(9), 1235–1240. DOI: [10.1039/c4pp00113c](https://doi.org/10.1039/c4pp00113c).
- [40] Carrasco, E.; Calvo, M. I.; Blázquez-Castro, A.; Vecchio, D.; Zamarrón, A.; de Almeida, I. J. D.; Espada, J. Photoactivation of ROS Production in Situ Transiently Activates Cell Proliferation in Mouse Skin and in the Hair Follicle Stem Cell Niche Promoting Hair Growth and Wound Healing. *J. Invest. Dermatol.* 2015, 135(11), 2611–2622. DOI: [10.1038/jid.2015.248](https://doi.org/10.1038/jid.2015.248).
- [41] Abu-Amsha, R.; Croft, K. D.; Puddey, I. B.; Proudfoot, J. M.; Beilin, L. J. Phenolic Content of Various Beverages Determines the Extent of Inhibition of Human Serum and Low-Density Lipoprotein Oxidation in Vitro: Identification and Mechanism of Action of Some Cinnamic Acid Derivatives from Red Wine. *Clinical Sci.* 1996, 91(4), 449–458. DOI: [10.1042/cs0910449](https://doi.org/10.1042/cs0910449).
- [42] Natella, F.; Nardini, M.; Belelli, F.; Pignatelli, P.; Di Santo, S.; Ghiselli, A.; . . . Scaccini, C. Effect of Coffee Drinking on Platelets: Inhibition of Aggregation and Phenols Incorporation. *Br. J. Nutr.* 2008, 100(6), 1276. DOI: [10.1017/S0007114508981459](https://doi.org/10.1017/S0007114508981459).
- [43] Clifford, M. N.; Kerimi, A.; Williamson, G. Bioavailability and Metabolism of Chlorogenic Acids (Acyl-quinic Acids) in Humans. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2020, 19, 1299–1352. DOI: [10.1111/1541-4337.12518](https://doi.org/10.1111/1541-4337.12518).
- [44] Rein, M. J.; Renouf, M.; Cruz-Hernandes, C.; Actis-Goretta, L.; Thakkar, S. K.; Pinto, M. S. Bioavailability of Bioactive Food Compounds: A Challenging Journey to Bioefficacy. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2012, 75(3), 588–602. DOI: [10.1111/j.1365-2125.2012.04425.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04425.x).
- [45] Zhu, F.; Du, B.; Xu, B. Anti-inflammatory Effects of Phytochemicals from Fruits, Vegetables, and Food Legumes: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2018, 58(8), 1260–1270. DOI: [10.1080/10408398.2016.1251390](https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1251390).