

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**PRODUTIVIDADE, COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE EM *Eryngium foetidum* L.**

**RENÊ ARNOUX DA SILVA CAMPOS**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Horticultura).

BOTUCATU-SP

ABRIL - 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIENCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**PRODUTIVIDADE, COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE EM *Eryngium foetidum* L.**

**RENÊ ARNOUX DA SILVA CAMPOS**

Orientadora: GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA

Co-Orientadores: SANTINO SEABRA JÚNIOR, LIN CHAU MING, FABIO VIANELLO

Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da UNESP - Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de Doutor  
em Agronomia (Horticultura).

BOTUCATU-SP

ABRIL - 2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS**  
**CAMPUS DE BOTUCATU**

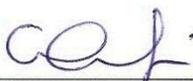
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO: “PRODUTIVIDADE, ÓLEO ESSENCIAL E ANTIOXIDANTES EM  
*Eryngium foetidum* L.”

ALUNO: RENÊ ARNOUX SILVA CAMPOS

ORIENTADOR: Profa. Dra. GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA

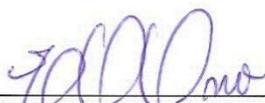
Aprovado pela Comissão Examinadora



\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. FABIO VIANELLO



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. ELIZABETH ORIKA ONO



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. LUÍZ CLAUDIO CORRÊA



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. LILIA GOMES WILLADINO

Data da Realização: 03 de abril de 2014.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

Renê Arnoux da Silva Campos, filho de João Meira de Campos e Neuza Maria da Silva, nasceu no dia 12 de maio de 1980, em Assis Chateaubriand, Paraná.

Em novembro de 2003, graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Mato Grosso. Em março de 2004, iniciou o curso de Mestrado em Agricultura Tropical pela Universidade Federal de Mato Grosso, defendendo tese em abril de 2006. Em março de 2010, iniciou o curso de Doutorado na Universidade Estadual Paulista. Entre setembro de 2012 e agosto de 2013, cumpriu estágio sanduíche na Università degli Studi di Padova, o qual foi concluído em agosto de 2013. Desde setembro de 2005, atua como biólogo na Universidade do Estado de Mato Grosso.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para a realização desse estudo. À minha família, minha mãe, Neuza; minha irmã, Juliana e em especial ao meu companheiro, Roberto. Agradeço aos colegas da pós-graduação e graduação, funcionários e professores da Universidade Estadual Paulista e Università degli Studi di Padova. Faço agradecimentos especiais à minha orientadora, prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Giuseppina Pace Pereira Lima e meus co-orientadores, Prof. Dr. Santino Seabra Júnior, Prof. Dr. Lin Chau Ming e Prof. Dr. Fabio Vianello. Agradeço à Universidade do Estado de Mato Grosso, pela concessão do afastamento das atividades laborais para qualificação.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
Lista de tabelas.....	VI
Resumo.....	1
Summary.....	3
Introdução Geral.....	5
I Caracterização química das folhas de <i>Eryngium foetidum</i> em diferentes fases de crescimento.....	10
Resumo.....	11
Abstract.....	12
1. Introdução.....	13
2. Material e Métodos.....	14
3. Resultados e Discussão.....	18
4. Conclusão.....	24
Referências.....	25
II Efeitos da intensidade luminosa e fertilização nitrogenada no crescimento e produção de compostos bioativos em <i>Eryngium foetidum</i> .....	30
Resumo.....	31
Abstract.....	31
1. Introdução.....	32
2. Material e Métodos.....	34
3. Resultados e Discussão.....	40
4. Referências.....	50
Conclusão Geral.....	56
Referências Bibliográficas.....	58

## LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO I

1. Resumo dos níveis de significância (Two-Way ANOVA) para os efeitos da poda da inflorescência e fases de crescimento na produção de biomassa, metabólitos primários e atividade de enzimas oxidativas nas folhas.....	19
2. Produção de biomassa, metabólitos primários e atividade de enzimas oxidativas nas folhas após o One-Way ANOVA.....	20
3. Resumo dos níveis de significância (Two-Way ANOVA) para os efeitos da poda da inflorescência e fases de crescimento na produção de substâncias antioxidantes e atividade antioxidante nas folhas.....	22
4. Concentração de substâncias antioxidantes e atividade antioxidante nas folhas após o Two-Way ANOVA.....	23

## CAPÍTULO II

1. Resumo dos níveis de significância (Two-way ANOVA) para os efeitos do sombreamento e fertilização nitrogenada na produção de biomassa e metabólitos secundários.....	44
2. Produção de biomassa e metabólitos secundários nas folhas após o Two-way ANOVA.....	44
3. Resumo dos níveis de significância (Two-way ANOVA) para os efeitos do sombreamento e fertilização nitrogenada na produção de flavonoides selecionados.....	45
4. Produção de ácidos fenólicos selecionados após o Two-way ANOVA.....	45
5. Resumo dos níveis de significância (Two-way ANOVA) para os efeitos do sombreamento e fertilização nitrogenada na concentração de macro e micronutrientes nas folhas.....	48
6. Concentração de macro e micronutrientes nas folhas após o Two-way ANOVA.....	48

PRODUTIVIDADE, COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM *Eryngium foetidum* L. Botucatu, 2013. 60 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura)

– Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista

Autor: RENÊ ARNOUX DA SILVA CAMPOS

Orientadora: GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA

## RESUMO

*Eryngium foetidum* (Apiaceae) é uma hortaliça utilizada como tempero e planta medicinal em regiões tropicais. O presente estudo teve com objetivo de avaliar a produção de biomassa e compostos bioativos em folhas de *E. foetidum* em relação à maturidade das folhas, poda da inflorescência, luminosidade e fertilização nitrogenada. Foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento foram avaliadas produtividade, concentração de metabólitos primários, compostos bioativos e atividade de enzimas oxidativas nas folhas em relação à poda da inflorescência em diferentes fases de crescimento. Foram observadas diferenças significativas na biomassa foliar e nas concentrações de compostos antioxidantes. As maiores concentrações de flavonoides, compostos fenólicos, clorofilas e carotenoides foram observadas durante as fases iniciais de crescimento, entre 60 e 90 dias após a germinação. As antocianinas concentraram-se com a maturidade das folhas, após 200 dias. Uma redução na concentração de compostos bioativos e atividade antioxidante foi observada com aumento na atividade da peroxidase e polifenoloxidase. No segundo experimento, foram avaliadas a produção de biomassa, óleo essencial, compostos fenólicos e nutrientes minerais nas folhas em relação ao sombreamento 50% e diferentes níveis de fertilização nitrogenada (0, 40, 80, 120 e 160 kg ha<sup>-1</sup>). Foram observadas diferenças significativas no crescimento e nas concentrações de óleo essencial, pigmentos, compostos fenólicos, nutrientes minerais e na atividade antioxidante frente ao radical DPPH entre os tratamentos. A maior produção de biomassa foi obtida em ambiente sem sombreamento. As biomassas total e foliar apresentaram aumentos lineares significativos em função dos níveis de fertilização nitrogenada. No geral, o sombreamento teve efeito negativo significativo na produção de óleo essencial, polifenóis totais, flavonoides, ácido clorogênico, ácido ferúlico e ácido p-cumárico. Entretanto, as maiores concentrações de clorofila *b*, carotenoides e nutrientes minerais nas folhas foram obtidas nos tratamentos sombreados. Concluindo, a poda da inflorescência é recomendada para aumentar a produtividade foliar. Para o melhor aproveitamento das substâncias bioativas nas folhas,

recomenda-se que a colheita das folhas seja realizada entre 60 e 90 dias após a germinação. O cultivo sombreado é recomendado para a produção de folhas para o consumo *in natura*, devido à produção de folhas mais tenras e expandidas, com maior teor de pigmentos. As folhas produzidas em ambiente sem sombreamento são mais adequadas para o uso industrial, devido ao maior teor de óleo essencial e compostos fenólicos, além da maior produção de biomassa.

Palavras-chave: fases de crescimento, sombreamento, fertilização nitrogenada, pigmentos, compostos fenólicos, óleo essencial, nutrientes minerais

YIELD, BIOACTIVE COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Eryngium foetidum* L. Botucatu, 2013. 60 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista

Author: RENÊ ARNOUX DA SILVA CAMPOS

Adviser: GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA

## SUMMARY

*Eryngium foetidum* L. (Apiaceae) is a vegetable used as spice and medicinal plant in tropical regions. The present study was aimed to evaluate the production of biomass and antioxidant compounds in leaves of *E. foetidum* in relation to maturity of leaves, pruning of inflorescence, luminosity and nitrogen fertilization. Two field studies were carried out. In the first experiment we evaluated yield, the concentration of primary metabolites, bioactive compounds and the activity of oxidative enzymes in leaves in relation to the pruning of floral stalks in different growth phases. Significant differences were observed in leaf biomass and in the levels of antioxidant compounds. The highest contents of flavonoid, phenolic compounds, chlorophylls and carotenoids were observed during the initial phases of growth, between 60 and 90 days after germination. Anthocyanins were concentrated with the maturity of leaves, after 200 days. A reduction in the concentrations of bioactive compounds and antioxidant activity was observed with increase in the activity of peroxidase and polyphenoloxidase. In the second experiment, the production of biomass, essential oil, phenolic compounds and mineral nutrients were evaluated in the leaves in relation to 50% shading and different levels of nitrogen fertilization (0, 40, 80, 120, 160 kg ha<sup>-1</sup>). Significant differences were observed in plant growth and in the concentrations of essential oil, pigments, phenolic compounds, mineral nutrients and antioxidant activity measured by DPPH radical. The highest biomass production was achieved in non-shaded environment. The total biomass and leaf biomass showed significantly linear increase as a function of the nitrogen fertilization levels. Overall, shading had significantly negative effect in the production of essential oil, total polyphenols, flavonoids, chlorogenic acid, ferulic acid and p-coumaric acid. However, the highest contents of chlorophyll *b*, carotenoids and mineral nutrients in the leaves were achieved in shade treatments. In conclusion, the pruning of floral stalks is recommended to increase leaf production. In order to obtain the greatest levels of bioactive compounds in leaves, we recommend harvesting the leaves among 60 and 90 days after the germination. Shading is

recommended to the production of leaves for *in natura* consumption, due the production of more expanded and tender leaves, with higher pigment content. The leaves produced in non-shaded environment are more recommended to the industrial use, due to the highest concentration of essential oil and phenolic compounds, besides the highest production of biomass.

Keywords: growth phases, shading, nitrogen fertilization, pigments, phenolic compounds, essential oil, mineral nutrients

## INTRODUÇÃO GERAL

Os antioxidantes são definidos como substâncias que, presentes em baixas concentrações, podem significativamente retardar ou prevenir a oxidação de um substrato (HALLIWELL, 2011). As defesas antioxidantes humanas são mantidas por um sistema de defesa antioxidante endógeno elaborado, que inclui enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, proteínas e sequestradores de baixo peso molecular, como o ácido úrico, vitamina E e a coenzima Q (LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009). Essas substâncias devem minimizar os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ao mesmo tempo permitir que ocorram funções úteis da ROS desempenhadas na sinalização celular e na regulação redox. Por outro lado, a ação aumentada ou prolongada dos radicais livres podem sobrecarregar os mecanismos de defesa das ROS, contribuindo para o desenvolvimento de doenças e envelhecimento (HALLIWELL, 2009).

Como o dano oxidativo aumenta com a idade, os antioxidantes provenientes do consumo de frutas e verduras pode contribuir com as defesas antioxidantes endógenas. Substâncias como a vitamina C, vitamina E, carotenoides e polifenóis são atualmente as principais fontes de antioxidantes exógenos. Estudos clínicos sugerem que a ingestão de uma dieta rica em alimentos vegetais como frutas, hortaliças e cereais integrais pode ajudar na prevenção de doenças (WILLETT, 2006). Os benefícios do consumo de frutas e verduras são do ponto de vista epidemiológico associados à baixa incidência de certos tipos de câncer e doenças degenerativas, como doenças cardiovasculares e cataratas (CROWE et al., 2011; BOEING et al., 2012). Um antioxidante ideal deve ser rapidamente absorvido pelo corpo e atenuar a formação de radicais livres, quelando metais redox em níveis fisiologicamente relevantes. Eles devem atuar nas células, nas regiões aquosas do citoplasma ou nas membranas, de modo positivo (POLJSK et al., 2013).

A Organização Mundial da Saúde estima que 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 ativos (CRAIG, 1999). As plantas são a base da medicina tradicional em todo o mundo há milhares de anos

e, ainda, continuam a fornecer novos remédios. Um grande esforço tem, portanto, focado na utilização de técnicas experimentais disponíveis para identificar antioxidantes naturais a partir de plantas.

*Eryngium foetidum* (Apiaceae) é uma planta herbácea, bianual, de 8-40 cm de altura (Figura 1, A-F). Nativa da América Central e atualmente cosmopolita, a espécie é encontrada em regiões tropicais e subtropicais (SHE & WATSON, 2005). Recentemente, *E. foetidum* L. foi incluída entre as principais hortaliças não convencionais cultivadas em nosso país (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.

No Brasil, a espécie é cultivada para alimentação em quintais urbanos e hortas (MORAIS et al., 2009). As folhas de *E. foetidum* são adicionadas em curries, molhos, ensopados e sopas como tempero (PRASAD et al., 2008). Os usos tradicionais para esta planta são inúmeros mas, principalmente, como medicinal. Na América tropical e Caribe, onde a espécie é nativa, prevalece o uso da planta para tratar febres, resfriados e gripes (DUKE, 2009). Comunidades tradicionais da América Central e Caribe utilizam várias preparações da planta, principalmente, contra dores de estômago (KALA, 2005), ou no tratamento de problemas reprodutivos da mulher, como infertilidade, complicações do parto, cólicas menstruais, dores pós-parto, infecções vaginárias e como emenagoga (COE, 2008; LANS, 2007). No Brasil, a decocção da planta inteira é usada para facilitar o parto, porém, é contra indicado na gravidez por que pode provocar contrações uterinas (RODRIGUES, 2007). Na Costa Rica, há o uso como afrodisíaco, porém, nenhuma menção é feita em relação ao sexo afetado (DUKE, 2009). Outras doenças notáveis para as quais essa planta é indicada incluem hipertensão, reumatismo, asma, distúrbios da visão, contra veneno, doenças venéreas, diabetes, como vermífugo, desmaios, malária e picada de serpentes. Os extratos de *E. foetidum* foram avaliados em relação à atividade anti-helmíntica, anticonvulsante, anti-inflamatória, analgésica, antimalárica e bactericida, observadas no uso tradicional. Entretanto, apenas as propriedades anti-helmíntica, anticonvulsante e anti-inflamatória dos extratos das folhas de *E. foetidum* foram confirmadas. (PAUL et al., 2011).

Além do seu amplo uso para fins medicinais e culinários, é um importante item para as indústrias de perfumaria e cosméticos (AROCKIASAMY &

IGNACIMUTHU, 1998). O óleo essencial possui alto valor no mercado internacional (IGNACIMUTHU et al., 1999). Os primeiros estudos sobre a composição química das folhas indicaram a presença de cálcio, ferro, riboflavina, carotenoides, vitaminas A, B e C e óleo essencial. Entretanto, as análises dos componentes químicos focaram-se, principalmente, no óleo essencial (RAMCHARAN, 1999).



Figura 1. A: *Eryngium foetidum* L.; B: cultivo em jirau, em quintal urbano, Cáceres, MT; C: Cultivo em Santa Isabel, PA; D e E: comercialização no mercado Ver-o-Peso, Belém, Pará; F: comercialização em supermercado, Belém, Pará.

Alguns estudos indicaram boa concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante nas folhas de *E. foetidum*, através de diferentes métodos (WONG et al., 2006). Entretanto, as informações sobre a composição química das folhas de *E. foetidum* são escassas, sendo necessário aprofundar o conhecimento sobre a produção de substâncias bioativas na espécie. Ainda não existem informações sobre o efeito das fases de crescimento na produção de substâncias bioativas nas folhas. A maturidade é um dos principais fatores que determinam a composição qualitativa em frutas e verduras (KORUS 2011). Assim, a descrição da distribuição das substâncias bioativas e da capacidade antioxidante em diferentes fases de crescimento é importante para o máximo aproveitamento da hortaliça como alimento funcional. Outro problema para a cultura é o florescimento precoce, que reduz a produção de folhas e, por esse motivo, a poda da inflorescência é recomendada para aumentar a produtividade. Entretanto, não se sabe se esta prática pode afetar a composição química das folhas.

No cultivo de *E. foetidum*, a luminosidade e a fertilização nitrogenada estão entre os fatores que mais afetam a produtividade e qualidade das folhas (MONIRUZZAMAN et al., 2009). Entretanto, o efeito desses fatores na composição química das folhas é desconhecido. Sabe-se que a produção de fitoquímicos nas plantas é afetada por fatores ambientais, como luminosidade e temperatura, fatores genéticos e práticas culturais durante o cultivo. A influência da intensidade luminosa e fertilização nitrogenada na composição de metabólitos bioativos em alimentos vegetais pode potencializar a produção de alimentos funcionais destinados a um segmento mais especializado do mercado (TREUTTER, 2010). Além disso, a caracterização das substâncias benéficas presentes nas folhas de *E. foetidum* poderia adicionar valor à produção e dar um impulso econômico para as regiões que cultivam para exportação. Dessa forma, o objetivo do presente estudo é avaliar a produção de biomassa, compostos bioativos e atividade antioxidante das folhas de *Eryngium foetidum* em relação às fases de crescimento, poda da inflorescência e fatores ambientais, mais precisamente em relação à intensidade luminosa e a fertilização nitrogenada. Para atingir estes objetivos, a tese foi dividida em dois capítulos, sendo o primeiro capítulo intitulado “CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FOLHAS DE *Eryngium foetidum* L. EM DIFERENTES FASES DE CRESCIMENTO”, redigido conforme as normas da revista INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS e o segundo capítulo intitulado “EFEITOS DA INTENSIDADE LUMINOSA E FERTILIZAÇÃO NITROGENADA NO CRESCIMENTO E

PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM *Eryngium foetidum*”, redigido conforme as normas da revista JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY.

Capítulo I

“CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FOLHAS DE *Eryngium foetidum*  
EM DIFERENTES FASES DE CRESCIMENTO”

## **Caracterização química das folhas de *Eryngium foetidum* em diferentes fases de crescimento**

**Resumo:** *Eryngium foetidum* L. (Apiaceae) é uma planta aromática utilizada como condimento e medicinal em regiões tropicais, no tratamento de várias doenças. O presente estudo investigou a composição química das folhas de *E. foetidum* em diferentes fases de crescimento e em relação à poda da inflorescência, relacionando as concentrações de substâncias bioativas e a atividade de enzimas oxidativas. As fases de crescimento influenciaram diferentemente os níveis das substâncias estudadas. As maiores concentrações de flavonoides e compostos fenólicos foram observadas durante a fase *lag*, enquanto as maiores concentrações de clorofilas e carotenoides foram observadas durante a fase exponencial. As antocianinas concentraram-se com a maturidade das folhas, na fase estacionária. A maior atividade antioxidante, segundo o ensaio FRAP, foi observada nas fases *lag*, exponencial e estacionária. Foi observada redução na concentração dos compostos bioativos e atividade antioxidante com aumento da atividade da polifenoloxidase e peroxidase, nas fases linear e estacionária, respectivamente. A poda da inflorescência não afetou as concentrações das substâncias estudadas. A descrição dos níveis de compostos bioativos nas folhas e da capacidade antioxidante dos extratos *E. foetidum* nas diferentes fases de crescimento é importante para a seleção de folhas com alto valor nutricional. Concluindo, a época ideal para a colheita das folhas é entre sessenta e noventa dias após a germinação, durante as fases *lag* e exponencial de crescimento, devido aos níveis superiores de substâncias benéficas e à maior atividade antioxidante dos extratos. A poda da inflorescência é recomendada para a cultura, devido ao aumento na produção de biomassa foliar sem alterar os níveis de compostos antioxidantes nas mesmas. Esses resultados indicam a possibilidade de aperfeiçoar a produção de *E. foetidum* para fins farmacológicos e industriais.

**Palavras-chave:** *Eryngium foetidum*, Apiaceae, Capacidade antioxidante, Fases de crescimento, Conteúdo de substâncias bioativas, FRAP.

**Abstract:** *Chemical characterization of leaves of Eryngim foetidum in different growth*

*phases.* *Eryngium foetidum* L. (Apiaceae) is an aromatic plant used as spice and medicinal in tropical regions, in the treatment of an array of ailments. The present study investigates the chemical composition of leaves of *E. foetidum* in different growth phases and in relation to the pruning of floral stalks, concerning the concentration of bioactive substances and the activity of oxidative enzymes. The growth phases had influence in the levels of the substances studied in a different way. The highest concentrations of flavonoids and phenolic compounds were observed during the lag phase, while the highest concentrations of chlorophylls and carotenoids were observed during the exponential phase. The anthocyanins were concentrated with the maturity of the leaves in the stationary phase. The highest antioxidant activity, according to the FRAP assay, was observed in the lag, exponential and stationary phases. A decrease in the concentration of bioactive compounds and antioxidant activity with increased activity of polyphenol oxidase and peroxidase during the linear and stationary phases, respectively, was observed. The pruning of inflorescences did not affect the concentrations of the substances studied. The description of the levels of bioactive compounds in the leaves and the antioxidant capacity of the extract of *E. foetidum* at different stages of growth is important for the selection of leaves with high nutritional value. In conclusion, the ideal time to harvest the leaves is between sixty and ninety days after germination, during the lag and exponential phases of growth, due to higher levels of beneficial substances and increased antioxidant capacity. Pruning of inflorescences is recommended for the crop, due to the increase in leaf biomass production,

without changing the levels of antioxidants. These results indicate the possibility of improving the production of *E. foetidum* for pharmacological and industrial purposes.

**Keywords:** *Eryngium foetidum*, Biomass production, Bioactive compounds, Antioxidant activity, Peroxidase, Polyphenoloxidase.

## 1. Introdução

*Eryngium foetidum* L. (Família: Apiaceae), conhecida como chicória-do-pará, coentro-castelo e *long coriander* em Inglês, é uma planta aromática, utilizada como condimento e medicinal em regiões tropicais. As folhas são empregadas no tratamento de diversas doenças, como febre, dores, hipertensão, etc. (Duke, 2009). Essa espécie também é um importante item para as indústrias de perfumaria e cosméticos e o óleo essencial possui alto valor no mercado internacional (Arockiasamy & Ignacimuthu, 1998; Ignacimuthu et al., 1999). Estudos farmacológicos indicaram propriedades anti-inflamatória, anticonvulsante e anti-helmíntica, confirmando algumas das indicações tradicionais (Paul et al., 2011). Os primeiros estudos sobre a composição química das folhas indicaram a presença de riboflavina, carotenos, vitaminas A, B, C e elementos traço, tais como Ca e Fe (Ramcharan, 1999). Outros estudos indicaram boas quantidades de compostos fenólicos e atividade antioxidante nas folhas de *E. foetidum*, através de diferentes métodos (Wong et al., 2006; Nanasombat & Teckchuen, 2009). A tecnologia para produção máxima está em uso em regiões onde o cultivo é voltado à exportação. Entretanto, as pesquisas dos constituintes químicos focaram-se, principalmente, nos óleos essenciais, havendo pouca informação disponível sobre a produção de outros fitoquímicos (Paul et al., 2011), como por exemplo, compostos antioxidantes.

A descrição da distribuição de substâncias bioativas nas folhas de *E. foetidum* nas diferentes fases de crescimento é importante para potencializar a produção de alimentos

funcionais, com altos conteúdos de fitonutrientes e atividade antioxidante. Além disso, não se sabe qual é o efeito da poda da inflorescência sobre a composição química das folhas. Assim, o presente estudo teve por objetivo caracterizar as concentrações de fitoquímicos nas folhas de *E. foetidum* e avaliar como elas estão distribuídas nas diferentes fases de crescimento da planta. Para alcançar este objetivo, foram avaliados os teores de carboidratos, proteínas, clorofilas, carotenoides, compostos fenólicos e atividade antioxidante em diferentes fases de crescimento. A atividade das enzimas oxidativas também foi medida com o objetivo de relacionar a concentração de fitoquímicos com sinais de senescência.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Cultivo e coleta de amostras

O experimento foi realizado na Faculdade de Ciências Agrônomicas, (22°52'20"S 48°26'37"O) da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil. As plantas foram cultivadas em ambiente protegido telado, coberto com malha de sombreamento 50%. As médias das temperaturas mínimas e máximas foram 16,8 °C e 29,5 °C, respectivamente, durante o período experimental. Um delineamento fatorial em blocos casualizados foi usado para estabelecer dois tratamentos de poda da inflorescência e cinco amostragens de folhas, realizadas em diferentes fases de crescimento. Com quatro repetições, o experimento teve um total de 40 parcelas, constituída de oito plantas cada.

Mudas de 60 dias obtidas de sementes foram utilizadas no experimento. Os tratamentos de poda da inflorescência consistiram do acompanhamento de dois grupos de plantas: plantas sem poda da inflorescência (A1) e plantas podadas semanalmente (A2). As amostragens de folhas foram realizadas nas fases de crescimento *lag* (B1) aos 90 dias,

exponencial (B2) aos 120 dias, linear (B3) aos 150 dias, desaceleração (B4) aos 180 dias e estacionária (B5) aos 210 dias (Figura 1).

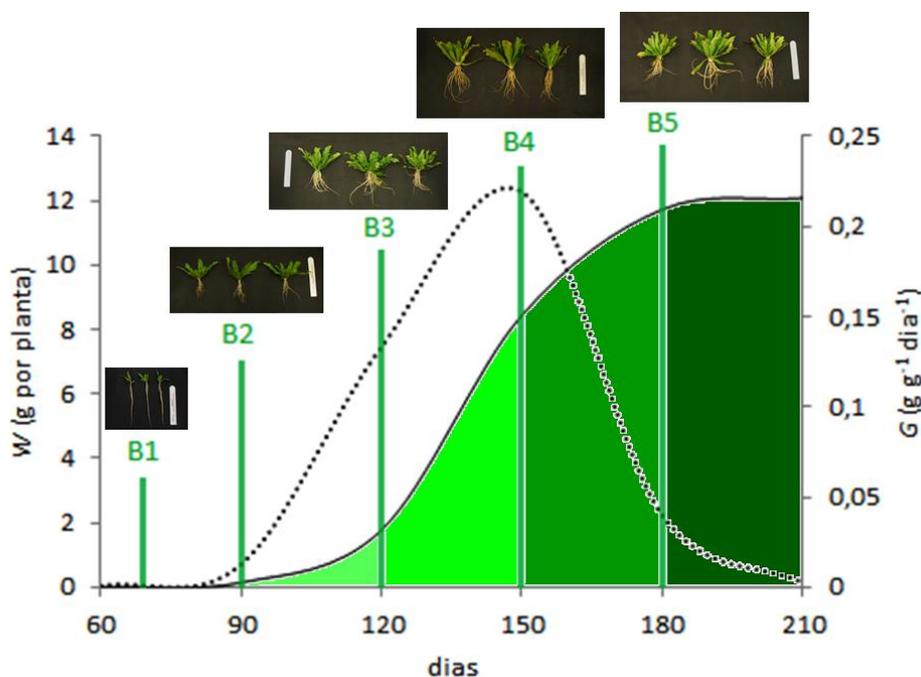


Figura 1. Fases de crescimento de *Eryngium foetidum* L. em relação ao tempo transcorrido após a germinação. W: massa seca total, G: taxa de crescimento da cultura, B1: fase lag, B2: fase exponencial, B3: fase linear, B4: fase de desaceleração, B5: fase estacionária.

As práticas agronômicas comuns foram realizadas em todos os tratamentos durante o período experimental. O voucher do espécimen (BOTU027055) foi preparado e depositado no herbário Botu da UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

### 2.2 Preparação das amostras para as análises químicas

As plantas colhidas foram lavadas em água corrente. Parte do material foi pulverizada em nitrogênio líquido e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Os órgãos foram separados, secos a  $40^{\circ}\text{C}$  e pesados em balança de precisão. A massa seca total de cada planta foi calculada pela soma das massas secas das folhas, inflorescências e raízes.

### 2.3 Carboidratos totais, sacarose e açúcares redutores totais

Os carboidratos totais foram quantificados de acordo com os procedimentos descritos por Dubois et al. (1956). Os açúcares redutores e sacarose foram determinados de acordo com os procedimentos descritos por Nelson (1944). As concentrações das diferentes classes de carboidratos foram calculadas usando curvas de glicose e expressas em miligramas de glicose equivalente por grama de massa ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

### 2.4 Proteínas solúveis, atividade da peroxidase e polifenol oxidase

As proteínas solúveis foram quantificadas de acordo com os procedimentos descritos por Bradford (1976). As concentrações de proteínas solúveis foram calculadas com base em uma curva de soro albumina bovina (BSA) e expressas em miligramas de BSA equivalente por grama de massa ( $\text{mg g}^{-1}$ ). A atividade das enzimas peroxidase (EC 1.11.1.7) e polifenoloxidase (EC 1.14.18.1) foram quantificadas de acordo com os procedimentos descritos por Cano et al. (1995). A atividade da peroxidase foi expressa em micromol de peróxido de hidrogênio decomposto por minuto por grama de massa ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ). A atividade da polifenoloxidase foi expressa em micromol de catecol decomposto por minuto por grama de massa ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ).

### 2.5 Clorofila a, clorofila b, carotenoides e antocianinas

As concentrações de clorofilas *a* e *b*, carotenoides e antocianinas foram analisadas conforme o método descrito por Sims e Gamon (2002), com modificações. Em resumo, amostras frescas foram trituradas em nitrogênio líquido e ressuspensas em solução fria de acetona TRIS 200 mM pH 7,8. A extração foi realizada em banho de gelo e protegida da luz. Após centrifugação por 5 minutos a 2000 x g (Mikro 220R, Hettich, Alemanha), foram realizadas as leituras de absorbância em 470, 537, 647 e 663 nm (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Inglaterra) e os resultados obtidos através das equações:

$$\text{Antocianina} = 0,08173A_{537} - 0,00697A_{647} - 0,002228A_{663}$$

$$\text{Clorofila } a = 0,01373A_{663} - 0,000897A_{537} - 0,003046A_{647}$$

$$\text{Clorofila } b = 0,02405A_{647} - 0,004305A_{537} - 0,005507A_{663}$$

$$\text{Carotenoides} = \frac{(A_{470} - (17,1 \times (Cl_a + Cl_b) - 9,479 \times \text{Antocianinas}))}{119,26}$$

As concentrações de clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides e antocianinas foram expressas em miligramas por grama de massa (mg g<sup>-1</sup>).

### 2.6 Compostos fenólicos

A concentração de fenólicos totais foi determinada pelo método colorimétrico com algumas modificações (Singleton et al., 1999). O extrato foi preparado com acetona aquosa 50% (v/v) em banho ultrassônico por 20 minutos. Após centrifugação a 6000 x g (MR1812, Jouan, França) por 10 minutos, o precipitado foi novamente ressuspensão e centrifugado e os sobrenadantes coletados foram combinados. Aos extratos foi adicionado o reagente Folin-Ciocalteu, seguido da adição da solução de 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (p/v). A mistura foi incubada por 2 h em temperatura ambiente para desenvolvimento da cor e a absorbância foi medida a 725 nm (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Inglaterra). A concentração de fenólicos totais foi calculada usando uma curva de ácido gálico e expressos em miligramas de ácido gálico equivalente por grama de massa (mg g<sup>-1</sup>).

### 2.7 Flavonoides

A análise de flavonoides foi feita de acordo com o método descrito por Popova et al. (2004), com pequenos ajustes. Em resumo, amostras foram misturadas com metanol acidificado 10% (v/v) em banho ultrassônico por 30 minutos. Uma solução de AlCl<sub>3</sub> 5% (p/v) foi adicionada. A mistura foi então centrifugada (Mikro 220R, Hettich, Alemanha) e a absorbância foi medida a 425 nm (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Inglaterra). A concentração de flavonoides foi calculada usando uma curva de rutina e expressa em miligramas de rutina equivalente por grama de massa (mg g<sup>-1</sup>).

### 2.8 Atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante frente ao radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH<sup>•</sup>) foi realizada de acordo com o método descrito por Brand-Williams et al. (1995), com modificações. Os extratos foram preparados em etanol absoluto. A reação foi iniciada com a adição da solução de 0,3 mM DPPH<sup>•</sup> em etanol. A incubação ocorreu à temperatura ambiente por 1 h no escuro. O controle negativo foi preparado pela substituição da amostra por etanol absoluto. A leitura da absorbância a 515 nm foi usada para calcular a atividade antioxidante (AA), de acordo com a equação:

$$AA(\%) = 100 - \frac{abs_{controle} - abs_{amostra}}{abs_{controle}} \times 100$$

Os resultados foram calculados com base em uma curva de trolox. A atividade antioxidante foi expressa em micromolar de trolox equivalente por grama de massa ( $\mu\text{M TE g}^{-1}$ ).

A atividade antioxidante pelo método FRAP foi realizada de acordo com o método descrito por Benzie e Strain (1996), com ajustes. Em resumo, os extratos foram preparados com metanol. A leitura da absorbância foi feita a 596 nm, após 10 min. O controle negativo foi preparado pela substituição do extrato por metanol. Os resultados foram calculados com base em uma curva de calibração obtida com FeSO<sub>4</sub>. A atividade antioxidante foi expressa em milimolar de ferro reduzido por grama de massa ( $\text{mM Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ ).

### *2.9 Análises estatísticas*

Os resultados foram expressos como valor médio (média  $\pm$  EP). Os dados foram analisados utilizando o procedimento de modelo geral linear (GLM) do pacote estatístico SAS seguido pelo teste Scott-Knott para agrupamento de médias.

## 3. Resultados e discussão

### 3.1 Variação no crescimento, metabólitos primários e enzimas oxidativas

Houve diferenças significativas na biomassa foliar, biomassa total e nas concentrações médias de metabólitos primários de *E. foetidum* entre os diferentes tratamentos ( $p < 0,05$ ). A produção de biomassa total não foi afetada pela poda da inflorescência (Tabela 1). Entretanto, as maiores médias de biomassa foliar foram observadas entre as plantas podadas, a partir da fase exponencial de crescimento, com aumento de 74,8% em relação às plantas intactas (Tabela 2). As maiores concentrações de açúcares redutores foram observadas entre as plantas podadas, nas fases exponencial, linear, desaceleração e estacionária de crescimento, enquanto a maior concentração de sacarose foi observada nessas plantas, na fase estacionária. Foi observado aumento na atividade da peroxidase (POD) a partir da fase estacionária de crescimento em ambos os tratamentos, enquanto a atividade da polifenoloxidase (PPO) aumentou a partir da fase linear (Tabela 2). Em folhas, o aumento na atividade da PPO ocorre na maturidade, enquanto a POD tem maior atividade na senescência (Abarca et al., 2001; Pascual et al., 2013).

Tabela 1. Resumo dos níveis de significância (Two-Way ANOVA) para os efeitos da poda da inflorescência e fases de crescimento na produção de biomassa, metabólitos primários e atividade de enzimas oxidativas nas folhas								
fonte	significância ( $p$ value) <sup>a</sup>							
	biomassa		metabólitos primários				enzimas	
	folha	total	cbt	sac	acr	pts	pod	ppo
poda (A)	<,001	<b>0,563</b>	<b>0,264</b>	<,001	<,001	0,039	<b>0,901</b>	<b>0,983</b>
fases (B)	<,001	<,001	<,001	<,001	<,001	<,001	<,001	<,001
interação de A x B	<,001	<,001	0,004	0,012	<b>0,345</b>	<b>0,280</b>	<b>0,698</b>	<b>0,713</b>

<sup>a</sup>Os valores em negrito não são considerados significativamente diferentes ao nível de 95% de confiança. cbt: carboidratos totais, sac: sacarose, acr: açúcares redutores, pts: proteínas totais, pod: peroxidase, ppo: polifenoloxidase.

Tabela 2. Produção de biomassa, metabólitos primários e atividade de enzimas oxidativas nas folhas após o One-Way ANOVA

trat	biomassa <sup>a</sup> (g)		metabólitos primários <sup>a</sup> (mg g <sup>-1</sup> )				enzimas <sup>a</sup>	
	folha	total	cbt	sac	acr	pts	pod	ppo
A1B1	0,82f	2,93f	98,3c	30,9d	6,19d	0,41c	7,89b	0,091b
A1B2	3,02e	15,8e	109,5c	48,1c	7,36c	0,39c	7,39b	0,083b
A1B3	5,88d	40,1d	143,1b	72,1b	8,54b	1,13b	9,05b	0,106a
A1B4	6,24d	65,4b	138,2b	72,5b	8,21b	1,90a	11,3a	0,135a
A1B5	8,46c	65,2b	150,8a	50,6c	8,03b	2,28a	11,4a	0,163a
A2B1	1,19f	4,09f	128,6b	54,4c	8,39b	0,68c	9,12b	0,071b
A2B2	5,28d	16,2e	129,4b	61,6b	9,75a	0,52c	6,77b	0,068b
A2B3	16,8b	51,7c	108,5c	75,8b	9,41a	1,87a	8,53b	0,107a
A2B4	20,9a	63,4b	133,6b	71,0b	10,1a	2,20a	10,3a	0,109a
A2B5	23,1a	78,7a	170,5a	92,7a	10,0a	2,84a	11,8a	0,125a

<sup>a</sup>As médias na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes entre os tratamentos ( $p < 0,05$  pelo teste Scott-Knott). cbt: carboidratos totais, sac: sacarose, acr: açúcares redutores, pts: proteínas totais, pod: peroxidase ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ), ppo: polifenoloxidase ( $\mu\text{mol catecol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ).

As maiores concentrações de açúcares redutores, sacarose e proteínas solúveis, ponderadas para os dez tratamentos, foram obtidas nas plantas podadas. As concentrações de açúcares redutores foram  $7,67 \pm 0,40 \text{ mg g}^{-1}$  e  $9,53 \pm 0,35 \text{ mg g}^{-1}$  para A1 e A2, respectivamente, enquanto as concentrações de sacarose foram  $54,8 \pm 4,14 \text{ mg g}^{-1}$  para A1 e  $71,1 \pm 4,71 \text{ mg g}^{-1}$  para A2 e as concentrações de proteínas solúveis foram  $1,42 \pm 0,21 \text{ mg g}^{-1}$  e  $1,73 \pm 0,21 \text{ mg g}^{-1}$ , respectivamente. Entretanto, as concentrações de carboidratos totais, atividade das enzimas oxidativas e biomassa total não foram afetadas pela poda (Tabela 1).

No presente estudo, foram obtidos 16,8 g por planta de biomassa foliar e 51,7 g por planta de biomassa total, na fase linear de crescimento entre as plantas podadas. Em outros estudos sobre cultivo de *E. foetidum* a biomassa foliar chegou a atingir 11,2 g por planta (Mozumder et al., 2008). Em outra pesquisa sobre sombreamento e fertilização nitrogenada foram obtidos 16,5 g por planta de biomassa foliar (Moniruzzaman et al., 2009). Já em um estudo sobre espaçamento e semeadura foi observada produção foliar máxima de 9,14 g por planta (Mozumder et al., 2010). Dessa forma, a produção de biomassa foliar obtida nessa pesquisa pode ser considerada semelhante aos resultados obtidos nos outros estudos,

apesar dos tempos transcorridos para a colheita entre os estudos citados serem diferentes, dificultando uma comparação precisa. No presente estudo, a poda da inflorescência causou aumento de 74,8% na massa foliar de *E. foetidum*. Essa resposta à poda da inflorescência foi semelhante ao observado em um estudo realizado por Gomes et al. (2013) onde foi observado aumento de 34% no número de folhas. A poda da inflorescência é considerada uma prática importante para manejar a porção vegetativa da cultura e aumentar a produção de biomassa foliar.

A peroxidase (POD) e a polifenoloxidase (PPO) são enzimas que catalisam a oxidação de polifenóis em muitos materiais vegetais (Korus, 2011), sendo relacionado com processos de lignificação, suberização, catabolismo da auxina, reparo de ferimentos e defesa contra infecções de patógenos (Hiraga et al., 2001). As respostas das enzimas oxidativas observadas em *E. foetidum* em relação as fases de crescimento foram semelhantes a outras espécies. Em *Arabidopsis thaliana* foi observado aumento na atividade da POD das folhas com a maturidade, especialmente ao final da expansão foliar. Os tecidos senescentes apresentaram atividade mais elevada que os tecidos jovens (Abarca et al., 2001). Em folhas de *Brassica oleracea*, a atividade da PPO aumentou com a idade da planta, não sendo observada relação entre a fase de crescimento e a atividade de outras enzimas (Korus, 2011). Em frutos de *Prunus persica*, a alta atividade da PPO no momento da colheita causa diminuição da durabilidade do produto, levando a perdas eventuais na comercialização e inabilidade para a exportação (Pascual et al., 2013). Desse modo, a baixa atividade dessas enzimas favorece a manutenção da qualidade das hortaliças, após a colheita. As folhas de *Amaranthus cruentus* podem ser armazenadas em locais frescos por pelo menos três dias após a colheita sem apresentar sinais de perda de coloração ou qualidade, devido a hortaliça não apresentar atividade aparente na POD (Adebooye et al., 2008). Assim, a POD e a PPO oxidase podem ser utilizadas como marcadores bioquímicos

da qualidade das folhas de *E. foetidum*. Em razão dos resultados observados no presente estudo, recomenda-se que a colheita seja feita na fase exponencial de crescimento, aos cento e vinte dias.

### 3.2 Variação na concentração de substâncias antioxidantes e atividade antioxidante

Houve diferença significativa na concentração média de substâncias antioxidantes nas folhas de *E. foetidum* entre as diferentes fases de crescimento. Entretanto, o efeito da poda da inflorescência sobre as concentrações das substâncias antioxidantes e a atividade antioxidante não foi significativo entre os tratamentos (Tabela 3). As maiores concentrações de polifenóis totais e flavonoides, ponderadas para os dez tratamentos, foram obtidas durante a fase *lag* de crescimento (B1), enquanto as maiores concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides foram observadas durante a fase exponencial (B2). As antocianinas, por outro lado, concentraram-se na fase estacionária (B5). A maior atividade antioxidante avaliada pelo método FRAP foi observada durante as fases B1, B2 e B5, enquanto a atividade antioxidante frente ao DPPH<sup>•</sup> foi superior na fase B5 (Tabela 4).

Tabela 3. Resumo dos níveis de significância (Two-Way ANOVA) para os efeitos da poda da inflorescência e fases de crescimento na produção de substâncias antioxidantes e atividade antioxidante nas folhas

fonte	significância ( <i>p</i> value) <sup>a</sup>						atividade antioxidante	
	compostos antioxidantes						dpph <sup>•</sup>	frap
poda (A)	<b>0,571</b>	<b>0,205</b>	<b>0,283</b>	<b>0,488</b>	<b>0,471</b>	<b>0,949</b>	<b>0,657</b>	<b>0,068</b>
fases (B)	<,001	<,001	<,001	<,001	<,001	<,001	<,001	<,001
interação de AxB	<b>0,157</b>	<b>0,124</b>	<b>0,338</b>	<b>0,601</b>	<b>0,100</b>	0,028	<b>0,171</b>	<b>0,713</b>

<sup>a</sup>Os valores em negrito não são considerados significativamente diferentes ao nível de 95% de confiança. *cla*: clorofila *a*, *clb*: clorofila *b*, *crt*: carotenoides, *ant*: antocianinas, *flav*: flavonoides, *cfen*: fenólicos totais.

A atividade da PPO está associada à oxidação de compostos fenólicos (Meyier, 2006), enquanto a atividade da POD está associada à degradação das clorofilas (Yamauchi et al., 2004). Em *Lactuca sativa*, a maior concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante ocorreram nas folhas mais maduras. Entretanto, a presença de fenólicos nestas folhas contribui para o escurecimento enzimático, havendo redução gradual das clorofilas e carotenoides (Viacava et al., 2014). Durante o desenvolvimento de *E. foetidum*, a atividade da POD correlacionou-se negativamente ( $p < 0,05$ ) com as concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides.

Tabela 4. Concentração de substâncias antioxidantes e atividade antioxidante nas folhas após o Two-Way ANOVA

nível	substâncias antioxidantes <sup>a</sup> (mg g <sup>-1</sup> )						atividade antioxidante <sup>a</sup>	
	cla	clb	crt	ant	flav	cfe	dpph <sup>•</sup>	frap
B1	213,4b	104,2b	80,9b	39,5b	2,52a	45,5a	221b	0,106a
B2	249,2a	138,9a	103,9a	36,9b	1,60b	36,4c	242b	0,097a
B3	185,4b	89,2c	80,3b	35,1b	1,83b	38,6c	209b	0,064b
B4	172,2b	80,5c	70,6b	36,7b	1,64b	40,4b	198b	0,076b
B5	156,6b	74,4c	71,7b	47,7a	1,63b	40,8b	381a	0,090a

<sup>a</sup>As médias na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes entre os tratamentos ( $p < 0,05$  pelo teste Scott-Knott). cla: clorofila *a*, clb: clorofila *b*, crt: carotenoides, ant: antocianinas, flav: flavonoides, cfe: fenólicos totais, dpph<sup>•</sup>: 2,2-difenil-1-picril- hidrazila ( $\mu\text{M TE g}^{-1}$ ), frap: habilidade de reduzir ferro ( $\text{mM Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ ).

Uma dieta rica em clorofilas, especialmente de hortaliças folhosas é uma maneira de prevenir o desenvolvimento de câncer no fígado e outros tipos de câncer induzidos pelo ambiente (Egner et al., 2001). Do mesmo modo, alguns carotenoides são precursores da vitamina A, componente essencial da dieta humana. Estudos epidemiológicos demonstram que as dietas ricas em carotenoides são correlacionadas com uma redução significativa no risco de câncer de pulmão e outras formas de câncer, doenças cardíacas coronárias e algumas doenças degenerativas, devido à atividade antioxidante dos carotenoides (Bartley e Scolnik, 1995). Os flavonoides e compostos fenólicos também possuem atividade antioxidante, podendo agir como agentes redutores, doadores de hidrogênio, varredores de

oxigênio singlete, sequestradores de radicais superóxido e, também, capazes de quelar metais. Esses compostos também ativam enzimas oxidativas, reduzem radicais  $\alpha$ -tocoferóis, inibem oxidases entre outras funções (Carocho e Ferreira, 2013).

Atualmente, a disponibilidade de informações sobre as propriedades antioxidantes de muitas espécies tropicais são limitadas ou inexistentes. Este é o primeiro relato da concentração de compostos bioativos e atividade antioxidante em relação às fases de crescimento de *E. foetidum*. Evidentemente, as folhas maduras foram mais expostas aos estresses ambientais, com menor concentração de clorofilas e um metabolismo mais próximo à senescência que requer maior atividade das enzimas oxidativas para controlar os diferentes estresses físicos e biológicos. A descrição apresentada no presente estudo permite aos consumidores e indústria de alimentos a seleção de folhas mais adequadas para o consumo *in natura* com alto valor nutricional. Além disso, o presente estudo revelou que em relação aos níveis de fitoquímicos avaliados, não houve perdas com a poda da inflorescência. Desse modo, a caracterização bioquímica das folhas de *E. foetidum* em relação às fases de crescimento é um passo importante para a obtenção da produção máxima de substâncias benéficas à saúde na cultura.

#### 4. Conclusão

As fases de crescimento tiveram influência nas concentrações de compostos bioativos das folhas de *E. foetidum*. O tempo ideal para a colheita das folhas é entre sessenta e noventa dias após a germinação, durante as fases de crescimento *lag* e exponencial, devido às concentrações mais altas de flavonoides, compostos fenólicos, clorofilas e carotenoides. As folhas maduras, com duzentos e dez dias, apresentaram mais antocianinas. Essas substâncias contribuem para uma alta capacidade antioxidante. A poda da inflorescência não afetou os níveis de compostos bioativos nas folhas.

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa – Processo 6844-12-0.

### Referências

- Adebooye, O. C., Vijayalakshmi, R., Singh, V., 2008. Peroxidase activity, chlorophylls and antioxidant profile of two leaf vegetables (*Solanum nigrum* L. and *Amaranthus cruentus* L.) under six pretreatment methods before cooking. *International Journal of Food Science & Technology* 43, 173-178.
- Abarca, D., Martin, M., Sabater, B., 2001. Differential leaf stress responses in young and senescent plants. *Physiologia Plantarum* 113, 409-415.
- Arockiasamy, S., Ignacimuthu, S., 1998. Plant regeneration from mature leaves and roots of *Eryngium foetidum* L., a food flavouring agent. *Current Science* 75, 664-666.
- Baraldi, R., Isacchi, B., Predieri, S., Marconi, G., Vincieri, F. F., Bilia, A. R., 2008. Distribution of artemisinin and bioactive flavonoids from *Artemisia annua* L. during plant growth. *Biochemical Systematics and Ecology* 36, 340-348.
- Bartley, G. E., Scolnik, P. A., 1995. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell* 7, 1027-1038.
- Benzie, I. F., Strain, J. J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239, 70-76.

- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 28, 25-30.
- Cano, M. P., Ancos, B., Lobo, G., 1995. Peroxidase and polyphenoloxidase activities in papaya during postharvest ripening and after freezing/thawing. *Journal of Food Science* 60, 815-817.
- Carocho, M., Ferreira, I. C., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 51, 15-25.
- del Baño, M. J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-García, O., del Río, J. A., Ortuño, A., Quirin, K-W., Gerard, D., 2003. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4247-4253.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
- Duke, J.A., 2009. *Duke's handbook of medicinal plants of Latin America*. Taylor and Francis, CRC Press: USA, p. 298-300.
- Egner, P. A., Wang, J. B., Zhu, Y. R., Zhang, B. C., Wu, Y., Zhang, Q. N., Quian, G. S., Kuang, S. Y., Gange, S. J., Jacobson, L. P., Helzlsouer, K. J., Bailey, G. S., Groopman, J. D., Kensler, T. W., 2001. Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin

- DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98, 14601-14606.

- Fernando, I. D. N. S., Abeysinghe, D. C., Dharmadasa, R. M., 2013. Determination of phenolic contents and antioxidant capacity of different parts of *Withania somnifera* (L.) Dunal. from three different growth stages. Industrial Crops and Products 50, 537-539.
- Gomes, R. F., da Silva, J. P., de Gusmão, S. A. L., de Souza, G. T., 2013. Produção de chicória da amazônia cultivada sob densidades de cultivo e poda do pendão floral. Revista Caatinga 26, 9-14.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H., 2001. A large family of class III plant peroxidases. Plant and Cell Physiology 42, 462-468.
- Ignacimuthu, S., Arockiasamy, S., Antonysamy, M., Ravichandran, P., 1999. Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature leaf explants of *Eryngium foetidum*, a condiment. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 56, 131-137.
- Korus, A., 2011. Level of vitamin C, polyphenols, and antioxidant and enzymatic activity in three varieties of kale (*Brassica oleracea* L. var. *Acephala*) at different stages of maturity. International Journal of Food Properties 14, 1069-1080.
- Lee, J. E., Kim, G. S., Park, S., Kim, Y. H., Kim, M. B., Lee, W. S., Jeong, S. W., Lee, S. J., Jin, J. S., Shin, S. C., 2014. Determination of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenol components using liquid chromatography – tandem mass spectrometry: Overall contribution to antioxidant activity. Food Chemistry 146, 1-5.
- Mayer, A. M., 2006. Polyphenoloxidases in plants and fungi: Going places? A review. Phytochemistry 67, 2318-2331.

- Moniruzzaman, M., Islam, M. S., Hossain, M. M., Hossain, T., Miah, M. G., 2009. Effects of shade and nitrogen levels on quality Bangladhonia production. *Bangladesh Journal of Agricultural Research* 34, 205-213.
- Mozumder, S. N., Moniruzzaman, M., Sarker, P. C., 2008. Effect of nitrogen rate and application interval on yield and profitability of Bilatidhonia. *Journal of Agriculture & Rural Development* 6, 63-68.
- Mozumder, S. N., Moniruzzaman, M., Rahman, S. M. M., Sarker, P. C., Faisal, S. M., 2010. Influence of seed rate and method of sowing on the performance of Bilatidhonia (*Eryngium foetidum* L.). *Bangladesh Journal of Agricultural Research* 35, 227-234.
- Nantitanon, W., Yotsawimonwat, S., Okonogi, S., 2010. Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. *LWT-Food Science and Technology* 43, 1095-1103.
- Nelson, N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* 153, 375-379.
- Pascual, M., Villar, J. M., Lordan, J., Fonseca, F., Falguera, V., Rufat, J., 2013. Relationship between polyphenol oxidase activity and nutrition, maturity and quality parameters in flat peach. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93, 3384-3389.
- Paul, J. H. A., Seaforth, C. E. and Tikasingh, T., 2011. *Eryngium foetidum* L.: a review. *Fitoterapia* 82, 302-308.
- Podsędek, A., 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica vegetables*: A review. *LWT-Food Science and Technology* 40, 1-11.

- Ramcharan, C., 1999. Culantro: A much utilized, little understood herb. In "Perspectives on new crops and new uses" (J. Janick, Ed), ASHS Press, Alexandria, USA. pp. 506-509.
- Sims, D. A., Gamon, J. A., 2002. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment* 81, 337-354.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152-178.
- Nanasombat, S., & Teckchuen, N., 2009. Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. *Journal of Medicinal Plants Research* 3, 443-449.
- Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., Bogdanov, S., 2004. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemical Analysis* 15, 235-240.
- Viacava, G. E., Gonzalez-Aguilar, G., Roura, S. I., 2014. Determination of phytochemicals and antioxidant activity in butterhead lettuce related to leaf age and position. *Journal of Food Biochemistry*, *In press*. doi: 10.1111/jfbc.12060
- Witzell, J., Gref, R., Näsholm, T., 2003. Plant-part specific and temporal variation in phenolic compounds of boreal bilberry (*Vaccinium myrtillus*) plants. *Biochemical Systematics and Ecology* 31, 115-127.
- Wong, S. P., Leong, L. P., William Koh, J. H., 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food chemistry* 99, 775-783.
- Yamauchi, N., Funamoto, Y., Shigyo, M., 2004. Peroxidase-mediated chlorophyll degradation in horticultural crops. *Phytochemistry Reviews* 3, 221-228.

## Capítulo II

“EFEITOS DA INTENSIDADE LUMINOSA E FERTILIZAÇÃO NITROGENADA NO  
CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM *Eryngium*  
*foetidum*”

## **Efeitos da intensidade luminosa e fertilização nitrogenada no crescimento e produção de compostos bioativos em *Eryngium foetidum***

**Resumo:** *Eryngium foetidum* é usada como tempero e planta medicinal em regiões tropicais. Um estudo de campo foi conduzido para examinar as relações entre fatores ambientais e produção de compostos bioativos. O delineamento em parcelas subdivididas aleatorizadas foi utilizado para estabelecer dois tratamentos de luminosidade e cinco níveis de fertilização nitrogenada. A maior produção de biomassa foi obtida em ambiente sem sombreamento. No geral, o sombreamento teve efeito negativo significativo na produção de óleo essencial, polifenóis totais, flavonoides e ácidos fenólicos nas folhas. Entretanto, as maiores concentrações de clorofila *b*, carotenoides e alguns nutrientes minerais foram observadas nos tratamentos sombreados. Recomenda-se o cultivo sombreado para a produção de folhas para o consumo *in natura*, devido à produção de folhas mais expandidas, com maior teor de pigmentos. As folhas produzidas sem sombreamento são mais adequadas para o uso industrial, devido ao maior teor de óleo essencial e compostos fenólicos.

**Palavras-chave:** *Eryngium foetidum* L. sombreamento, produção de biomassa, óleo essencial, pigmentos, compostos fenólicos

**Abstract:** **Effects of light intensity and nitrogen fertilization on growth and production of bioactive compounds in *Eryngium foetidum*.** *Eryngium foetidum* is used as spice and medicinal plant in tropical regions. A field study was carried out to examine the relationships among environmental factors and production of bioactive compounds. A split-plot randomized design was used to establish two luminosity treatments and five fertilization levels. The greatest biomass production was achieved in non-shaded environment. Overall, shading had a significantly negative effect on the production of

essential oil, total polyphenols, flavonoids and phenolic acids in leaves. However, the highest accumulation of chlorophyll *b*, carotenoids and some mineral nutrients was observed in shaded treatments. We suggest to crop *E. foetidum* in shaded environment for the production of leaves for *in natura* consumption, due to the production of more expanded leaves, with higher concentration of pigments. Leaves produced in non shaded environment are more suitable to industrial use, due to highest content of essential oil and phenolic contents.

**Keywords:** *Eryngium foetidum* L. shading, biomass production, essential oil, pigments, phenolic compounds

## 1. Introdução

*Eryngium foetidum* (L.) é uma espécie nativa das regiões tropicais das Américas, utilizada como planta medicinal e condimento. A planta tornou-se cosmopolita, sendo cultivada em vários locais do mundo.<sup>1</sup> A concentração de fitoquímicos nas plantas cultivadas é afetada por fatores ambientais, como luminosidade e temperatura, fatores genéticos e práticas culturais durante o cultivo.<sup>2</sup> Dentre as principais classes de fitoquímicos vegetais, os terpenoides e metabólitos fenólicos apresentam benefícios específicos para a saúde humana, atuando como substâncias antioxidantes. Antioxidantes são compostos produzidos por organismos aeróbicos para neutralizar o estresse oxidativo causado por um desequilíbrio nas espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS incluem radicais do ânion superóxido e radicais hidroxilas produzidas como subprodutos das reações redox, como uma consequência do metabolismo aeróbico.<sup>3</sup> A homeostase da ROS nas células é alcançada pelo balanço entre a produção e a neutralização de ROS pelas enzimas e compostos antioxidantes. Nas plantas, as defesas não enzimáticas incluem compostos com propriedades antioxidantes intrínsecas, como os compostos fenólicos,

flavonoides e carotenoides. Os antioxidantes são doadores de elétrons, reduzindo as ROS a moléculas menos nocivas. Para reduzir os efeitos danosos das ROS, as plantas regulam tanto as defesas não enzimáticas como as defesas enzimáticas antioxidantes.<sup>4</sup>

Entre as várias moléculas antioxidantes, os flavonoides e carotenoides são particularmente interessantes por serem comuns em hortaliças folhosas e importantes para a saúde humana. Os compostos fenólicos representam uma importante classe de antioxidantes hidrossolúveis. Eles estão presentes, geralmente, em altos níveis, em quase todos os alimentos vegetais como flavonoides, taninos e ligninas. Dentre estes, os compostos mais estudados são os flavonoides, uma grande classe de mais de 9000 compostos estruturalmente diferentes, sintetizados pelas plantas via rota dos fenilpropanoides. Elas incluem as chalconas, flavonas, flavonols, flavononas, antocianinas e isoflavonoides.<sup>5</sup> Os flavonoides estão envolvidos na resistência aos patógenos, atração de polinizadores e dispersores, na defesa contra insetos e predadores e, também, como neutralizadores das ROS produzidas pelo transporte de elétrons nas células vegetais.<sup>6</sup> Vários flavonoides quelam eficientemente metais traço que desempenham um papel no metabolismo do oxigênio. Muitos genes da biossíntese de flavonoides são induzidos sob condições de estresse, como seca, congelamento, fermento, toxicidade de metais e deficiência nutricional aumentando os níveis de flavonoides.<sup>7</sup> Além disso, os flavonoides possuem a capacidade de absorver UV, assim, além de neutralizar as ROS geradas por UV, também protegem as plantas contra a radiação UV através da absorção desta radiação nociva.<sup>8</sup> Os carotenoides, que representam os principais antioxidantes lipofílicos, são moléculas derivadas de isoprenoides. Existem centenas de carotenoides e a maioria deles exibe atividade antioxidante. Os carotenoides são capazes de neutralizar o oxigênio singlete e capturar radicais peróxidos.<sup>9</sup> Aproximadamente 50 carotenoides são chamados compostos provitamina A, capazes de converterem-se em retinol, uma forma ativa da

vitamina A. Estes, particularmente o  $\beta$ -caroteno, representa a principal fonte de vitamina A da dieta. Estes pigmentos possuem várias funções, como fotoprotetor contra dano oxidativo durante a fotossíntese.<sup>10</sup> Os vegetais verdes, especialmente as folhas, contem  $\beta$ -caroteno e são boas fontes de luteína.<sup>11</sup>

Os estresses ambientais, incluindo a radiação solar intensa, UV, temperatura e deficiência de minerais podem induzir o aumento na produção de ROS.<sup>12,13</sup> A influência da intensidade luminosa e fertilização nitrogenada na composição de metabólitos bioativos em alimentos vegetais pode potencializar a produção de alimentos funcionais destinados a um segmento mais especializado do mercado.<sup>2</sup> Assim, os objetivos do presente estudo foram investigar os efeitos integrados do ambiente e fertilização nitrogenada no acúmulo de óleo essencial, pigmentos, compostos fenólicos, nutrientes minerais e ácidos fenólicos (ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido p-cumárico e ácido ferúlico) em folhas de *E. foetidum* sob condições de viveiro. A informação fornecida por este estudo deverá ser de grande importância para identificar e aumentar os efeitos benéficos das folhas de *E. foetidum* à saúde e estabelecer estratégias de produção otimizada para a cultura.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Material Vegetal e Condições Experimentais

Plantas de *E. foetidum* foram cultivadas na Fazenda Lageado (22°52'20"S 48°26'37"O) da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil. Mudanças obtidas de sementes foram cultivadas em vasos de quatro litros, em ambiente protegido, numa estrutura tipo arco, coberta com filme de polietileno transparente de 100  $\mu\text{m}$  de espessura. O substrato utilizado no experimento apresentou as seguintes características: pH = 6,3, M.O. = 23g  $\text{dm}^{-3}$ , P = 60 mg  $\text{dm}^{-3}$ , B = 0,31 mg  $\text{dm}^{-3}$ , Cu = 2,2 mg  $\text{dm}^{-3}$ , Fe = 26 mg  $\text{dm}^{-3}$ , Mn = 2,4 mg  $\text{dm}^{-3}$ , Zn = 5,3 mg  $\text{dm}^{-3}$ , H+Al = 19

$\text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ,  $\text{K} = 7 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ,  $\text{Ca} = 44 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ,  $\text{Mg} = 25 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ,  $\text{SB} = \text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ,  $\text{CTC} = 95$ ,  $\text{V}\% = 80$ . O experimento foi realizado em vasos de 4 L com mudas de 60 dias de idade. O transplântio foi realizado em setembro de 2011 e a colheita das plantas em janeiro de 2012. As médias das temperaturas mínimas e máximas foram  $16,4 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $28,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente, durante o período experimental. O delineamento de parcelas subdividas em blocos casualizados foi usado para estabelecer dois tratamentos de intensidade luminosa nas parcelas e cinco níveis de fertilização nitrogenada nas subparcelas. Com quatro repetições, o experimento teve um total de 40 subparcelas e cada subparcela foi constituída de cinco plantas.

Os tratamentos de sombreamento consistiram de dois regimes de intensidade luminosa: 100% de luz do sol (A1, sem malha de sombreamento) e cerca de 50% da radiação solar (A2, coberta com uma camada de malha de sombreamento). Os cinco níveis de fertilização nitrogenada foram  $0,0 \text{ kg ha}^{-1}$  (B1),  $40 \text{ kg ha}^{-1}$  (B2),  $80 \text{ kg ha}^{-1}$  (B3),  $120 \text{ kg ha}^{-1}$  (B4) e  $160 \text{ kg ha}^{-1}$  (B5), na forma de ureia comercial. A fertilização nitrogenada foi parcelada, sendo aplicados 10 % aos 15, 30 dias e 20% aos 45, 60, 75 e 90 dias de cultivo. As práticas agrônômicas comuns foram realizadas em todos os tratamentos durante o período experimental.

Aos sessenta dias foram avaliadas a radiação fotossinteticamente ativa (PAR,  $\text{W m}^{-2}$ ), temperatura do ar (T,  $^\circ\text{C}$ ), taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  (A,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e transpiração da folha (E,  $\text{mmol vapor H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) nos tratamentos de sombreamento com equipamento de sistema aberto de fotossíntese com analisador de  $\text{CO}_2$  e vapor d'água por radiação infravermelha - IRGA (LI-6400, LiCor, Lincoln, Nebraska, EUA).

## 2.2. Avaliação do Crescimento e Biomassa

A avaliação do crescimento das plantas foi realizada em janeiro de 2012. As plantas foram colhidas e lavadas com água corrente e as folhas foram destacadas para mensuração

da área foliar em integralizador de área (LI-3100, LiCor, Lincoln, Nebraska, EUA). Amostras frescas de folhas foram pulverizadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80 °C. Então os componentes da planta foram pesados e secos à 40 °C. A massa seca total de cada planta foi calculada pela soma das massas secas das folhas e raízes. A razão de área foliar (RAF,  $\text{dm}^2 \text{g}^{-1}$ ), razão de massa foliar (RMF,  $\text{g g}^{-1}$ ), área foliar específica (AFE,  $\text{dm}^2 \text{g}^{-1}$ ) e massa foliar específica (MFE,  $\text{g g}^{-1}$ ) foram calculados a partir dos dados de massa seca e área foliar.

### 2.3. Produção de Óleo Essencial

A extração de óleo essencial foi feita por hidrodestilação em Clevenger graduado utilizando amostras secas a 40°C e rasuradas. A destilação ocorreu 2 h após a mistura atingir ponto de fervura. O óleo essencial foi coletado e pesado em balança analítica e o teor de óleo (%) foi calculado com base na relação das massas foliar e massa do óleo. A produção de óleo essencial foi expressa em gramas por cem plantas (g por 100 plantas).

### 2.4. Fenólicos Totais

A concentração de fenólicos totais foi determinada pelo método colorimétrico, conforme Singleton et al.<sup>14</sup> O extrato foi preparado com acetona aquosa 50% (v/v) em banho ultrassônico por 20 minutos. Após centrifugação a 6000 x g (MR1812, Jouan, França) por 10 minutos, o precipitado foi novamente ressuspenso e centrifugado e os sobrenadantes coletados foram combinados. Aos extratos foi adicionado o reagente Folin-Ciocalteu, seguido da adição da solução de 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (p/v). A mistura foi incubada por 2 h em temperatura ambiente para desenvolvimento da cor e a absorbância foi medida a 725 nm (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Inglaterra). A concentração de fenólicos totais foi calculada usando uma curva de ácido gálico e expressos em miligramas de ácido gálico equivalente por grama de massa ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

### 2.5. Flavonoides

A análise de flavonoides foi feita de acordo com o método descrito por Popova et al.<sup>15</sup> Brevemente, amostras foram misturadas com metanol acidificado 10% (v/v) em banho ultrassônico por 30 minutos. Uma solução de cloreto de alumínio 5% (p/v) foi adicionada. A mistura foi então centrifugada (Mikro 220R, Hettich, Alemanha) e a absorbância foi medida a 425 nm (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Inglaterra). A concentração de flavonoides foi calculada usando uma curva de rutina e expressa em miligramas de rutina equivalente por grama de massa ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

## 2.6. Ácidos fenólicos

O extrato foi preparado com amostras liofilizadas em 20 mL de metanol e 0.1% ácido fórmico (v/v) sob agitação durante 1 h em ambiente controlado a 5 °C. O extrato foi centrifugado e filtrado com membrana filtrante de 0,45  $\mu\text{m}$ . A análise de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) foi usada para a identificação de ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido ferúlico (X-LC, Jasco, França), utilizando um detector de diodos (DAD). A separação dos ácidos fenólicos foi obtida em um traçador 25 x 0,6 cm, id 45  $\mu\text{m}$  (Extrasil, Teknokroma, Espanha) operando a 35,8 °C. A taxa de fluxo foi definida a 1 mL  $\text{min}^{-1}$ . A fase móvel consistiu de ácido fórmico 0,1% (A) e metanol (B). O gradiente de eluição foi conduzido em 50 min e a taxa de fluxo foi 0,8 mL  $\text{min}^{-1}$ . Todos os padrões foram dissolvidos em etanol 50% e as curvas de calibração foram geradas com concentrações entre 0.06-60  $\text{mg L}^{-1}$ . Dois comprimentos de onda (325 e 310 nm) foram usados para detectar a composição dos ácidos fenólicos. A identificação de ácido p-cumárico foi realizada a 310 nm. Os ácidos fenólicos foram quantificados segundo uma curva de calibração gerada com concentrações entre 0.3-30  $\text{mg L}^{-1}$ .

## 2.7. Antocianinas, Carotenoides, Clorofila *a* e Clorofila *b*

As concentrações de antocianinas, carotenoides, clorofilas *a* e *b* foram determinadas conforme o método descrito por Sims e Gamon.<sup>16</sup> Em resumo, amostras frescas foram

trituras em nitrogênio líquido e ressuspensas em solução fria de acetona TRIS 200 mM pH 7,8. A extração foi feita em banho de gelo e protegida da luz. Após centrifugação por 5 minutos a 2000 x g (Mikro 220R, Hettich, Alemanha), foram realizadas as leituras de absorvância em 470 nm, 537 nm, 647 nm e 663 nm (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Inglaterra) e os resultados obtidos através das equações:

$$\text{Antocianina} = 0,08173A_{537} - 0,00697A_{647} - 0,002228A_{663}$$

$$\text{Clorofila } a = 0,01373A_{663} - 0,000897A_{537} - 0,003046A_{647}$$

$$\text{Clorofila } b = 0,02405A_{647} - 0,004305A_{537} - 0,005507A_{663}$$

$$\text{Carotenoides} = \frac{(A_{470} - (17,1 \times (Cl_a + Cl_b) - 9,479 \times \text{Antocianinas}))}{119,26}$$

As concentrações de antocianinas, carotenoides, clorofila *a* e clorofila *b* foram expressos em mg g<sup>-1</sup> massa.

## 2.8. Atividade sequestradora de radicais DPPH<sup>•</sup>

A avaliação da atividade antioxidante frente ao radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH<sup>•</sup>) foi realizada de acordo com o método descrito por Brand-Williams et al.<sup>17</sup> Os extratos foram preparados em etanol absoluto. A reação foi iniciada com a adição da solução de 0,3 mM DPPH<sup>•</sup> em etanol. A incubação ocorreu à temperatura ambiente por 1 h no escuro. O controle negativo foi preparado pela substituição da amostra por etanol absoluto. A leitura de absorvância a 515 nm foi usada para calcular a atividade antioxidante (*AA*), de acordo com a equação:

$$AA(\%) = 100 - \frac{abs_{controle} - abs_{amostra}}{abs_{controle}} \times 100$$

Os resultados foram calculados com base em uma curva de trolox. A atividade antioxidante foi expressa em trolox equivalente por grama de massa (μM TE g<sup>-1</sup>).

## 2.9. Habilidade de redução do ferro

A atividade antioxidante pelo método FRAP foi realizada de acordo com o método descrito por Benzie e Strain.<sup>18</sup> Os extratos foram preparados com metanol. O reagente FRAP foi obtido pela combinação de tampão acetato 0,3 M, 10 mM 2,4,6-tri (2-piridil)-1-3-5-triazina (TPTZ), 40 mM HCl e 20 mM FeCl<sub>3</sub>. O reagente foi aquecido a 37 °C. A absorbância foi medida a 596 nm, dez minutos após o início da reação. O controle negativo foi preparado pela substituição do extrato por metanol. Os resultados foram calculados utilizando uma curva de FeSO<sub>4</sub> e expressos em milimolar de ferro reduzido por grama de massa (mM Fe<sup>2+</sup> g<sup>-1</sup>).

#### 2.10. Avaliação dos nutrientes minerais

A análise dos nutrientes minerais das folhas foi realizada de acordo com o método descrito por Malavolta et al.<sup>19</sup> A análise de N-total foi realizada por digestão sulfúrica pelo método semi-microKjeldahl. Os níveis de P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn e Zn foram analisados por digestão nitro-perclórica; o P foi determinado pelo método do metavalonato de amônio e o S, pelo método de turbidimetria de sulfato de bário, ambos em espectrofotômetro VIS (Femto 600 Plus, Brasil); os nutrientes K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn foram determinados pelo método de absorção atômica (Perkin Elmer 2380, Norwalk, Connecticut, EUA). O B foi determinado por digestão de via seca seguido do método de colorimetria com azometina em espectrofotômetro VIS (Femto 600 plus, Brasil). Os teores de N, P, K, Ca, Mg e S foram expressos em g kg<sup>-1</sup> massa seca e os teores de B, Cu, Fe, Mn e Zn foram expressos em mg kg<sup>-1</sup>.

#### 2.11. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como valor médio (média ± EP). Os dados foram analisados utilizando o procedimento do modelo geral linear do pacote estatístico SAS. Foi utilizada regressão polinomial para analisar os dados de biomassa foliar e biomassa total

em relação à fertilização nitrogenada e o teste Scott-Knott para agrupamento de médias dos dados de óleo essencial, compostos antioxidantes e nutrientes minerais.

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Variação nos fatores ambientais e no crescimento

A radiação fotossinteticamente ativa (PAR) e taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (A) foram diferentes nas condições de luminosidade. Os valores de PAR nos dois tratamentos de luminosidade foram  $591,9 \pm 180,4$  para A1 e  $250,1 \pm 45,7$  W m<sup>-2</sup> para A2, enquanto os valores de A foram  $16,1 \pm 3,3$  e  $12,7 \pm 3,6$  μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> para A1 e A2, respectivamente. Os valores de temperatura do ar (T) e a taxa de transpiração (E) foram similares entre os tratamentos. Os valores de T foram  $29,6 \pm 0,99$  para A1 e  $28,9 \pm 1,78$  °C para A2, enquanto os valores de E foram  $4,80 \pm 1,40$  e  $5,20 \pm 1,63$  mmol vapor H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> para A1 e A2, respectivamente. Esses resultados indicam que o sombreamento alterou significativamente a assimilação de CO<sub>2</sub>, devido à menor quantidade de luz disponível no ambiente, sem que houvesse alteração na temperatura do ambiente ou na taxa de transpiração das plantas.

Um efeito integrado significativo dos tratamentos de luminosidade e fertilização nitrogenada na produção de biomassa total de *E. foetidum* foi observado ( $p < 0,05$ ). A biomassa foliar (Figura 1A) e a biomassa total (Figura 1B) apresentaram aumentos lineares significativos em função dos níveis de fertilização nitrogenada. Comparado ao tratamento A1B1, a média de produção foliar por planta nos tratamentos A2B4 e A2B5 aumentou 362% e 313%, respectivamente (Figura 1A).

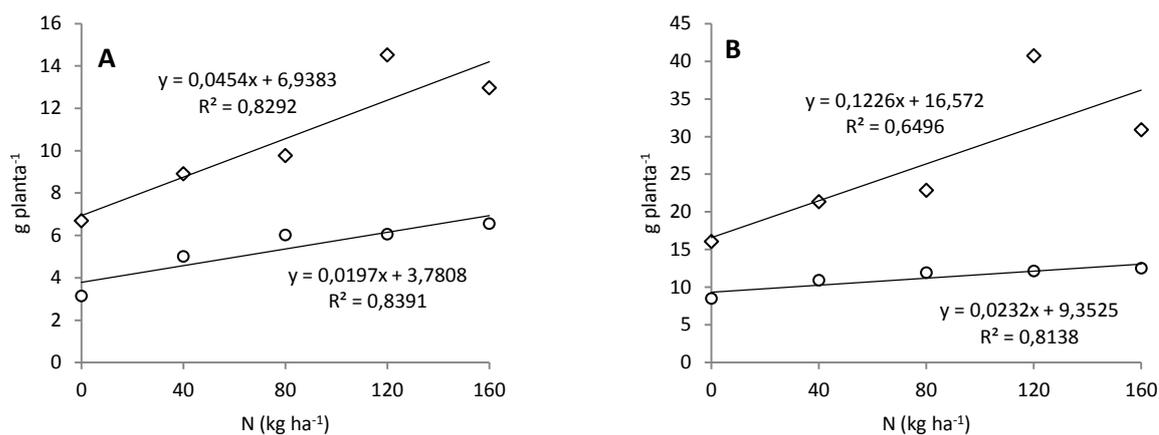


Figura 1. Variação na produção de biomassa foliar (A) e biomassa total (B) em *Eryngium foetidum* em diferentes tratamentos de sombreamento e fertilização nitrogenada.  $\diamond$  e  $\circ$  representam os tratamentos sem sombreamento e sombreamento 50%, respectivamente.

Entretanto, o efeito dos tratamentos na morfologia das plantas pode ser melhor observado através dos índices de crescimento. A razão de área foliar (RAF) e a razão de massa foliar (RMF) foram superiores nos tratamentos A2B3, A2B4 e A2B5, indicando que as plantas cultivadas em ambiente sombreado fertilizadas com as maiores doses de ureia apresentavam maior área apta à fotossíntese e maior proporção de biomassa foliar. As plantas sombreadas também apresentaram maior área foliar específica (AFE), indicando plantas com folhas mais expandidas, uma característica desejável para o consumo *in natura* (Figura 2). Entretanto, a maior produtividade foi observada em ambiente não sombreado; essas plantas apresentaram médias superiores de massa foliar específica (MFE), indicando folhas mais espessas, mais apropriadas para uso industrial (Figura 2).

A PAR se correlacionou positivamente com A ( $r = 0,425$ ), biomassa foliar ( $r = 0,637$ ) e MFE ( $r = 0,618$ ). Esses resultados tomados em conjunto com o aumento da RAF e AFE nos tratamentos com sombreamento 50% sugerem que a radiação solar teve papel importante para o crescimento de *E. foetidum*. A radiação solar é um dos fatores

ambientais mais importantes para o crescimento das plantas e produtividade, apesar do ponto de compensação de luz e do ponto de saturação de luz serem diferentes para várias espécies.<sup>20</sup> O presente estudo também indicou que a interação sombreamento x fertilização nitrogenada teve efeito significativo na produção total (Tabela 1).

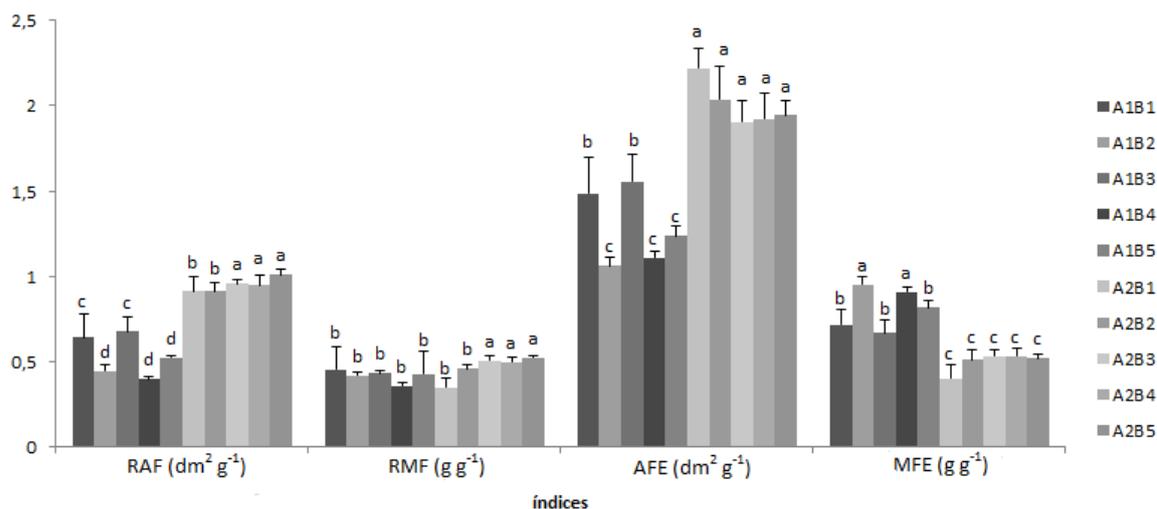


Figura 2. Variação nos índices de crescimento de *Eryngium foetidum* entre vários tratamentos (média  $\pm$  EP). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre vários tratamentos dentro do mesmo índice ( $p < 0,05$  pelo teste Scott-Knott). A1 e A2 representam sem sombreamento e sombreamento 50% respectivamente, enquanto B1, B2, B3, B4 e B5 indicam a adição de nitrogênio na quantidade de 0, 40, 80, 120 e 160 kg ha<sup>-1</sup>, respectivamente.

A resposta das plantas de *E. foetidum* à luz observada no presente estudo foi semelhante a outras espécies cultivadas sob diferentes regimes de luminosidade, nas quais a redução na produção ocorreu devido a limitação no processo fotossintético.<sup>21</sup> Os resultados observados no presente estudo também confirmam as conclusões de um estudo com *Ciclocara paliurus*, em que a produção de biomassa diminuiu com a redução da

luminosidade, mas poderia ser compensada pela fertilização.<sup>22</sup> As plantas de *E. foetidum* aumentaram a área foliar frente à menor intensidade de luz, semelhante aos resultados observados em *Sinarundinaria nitida*,<sup>23</sup> indicando que a radiação disponível no ambiente sombreado não era suficiente para suprir a demanda fotossintética das plantas. Entretanto, os resultados do presente estudo são diferentes dos obtidos em *E. foetidum* por Moniruzzaman et al.<sup>24</sup> que observaram em estudo realizado em Bangladesh maior produção de biomassa em tratamentos de sombreamento. Realmente, as plantas de mecanismo fotossintético C<sub>3</sub>, como *E. foetidum*, são pouco tolerantes a climas quentes<sup>25</sup> e nessas condições, o sombreamento pode ter favorecido a produção de biomassa.

A aplicação de fertilizantes tem mostrado melhorar o crescimento vegetal e aumentar a produção primária líquida em várias culturas.<sup>26</sup> Os resultados do presente estudo indicaram a mesma tendência, com diferença significativa na produção de biomassa foliar e biomassa total independente do tratamento de sombreamento aplicado. Esse aumento está de acordo com estudos com *E. foetidum* realizados anteriormente, que demonstraram aumento na produção de biomassa em resposta ao aumento da fertilização de nitrogênio.<sup>24</sup>

### 3.2. Variação na Concentração de Metabólitos Secundários

Houve diferenças significativas nas concentrações médias de metabólitos secundários de *E. foetidum* entre os diferentes tratamentos ( $p < 0,05$ ). Com exceção da clorofila *a*, todas as outras substâncias bioativas estudadas foram afetadas pelo sombreamento (Tabela 1). As maiores concentrações de óleo essencial, fenólicos totais e flavonoides (médias ponderadas) foram obtidas nos tratamentos não sombreados, além da maior capacidade de sequestrar DPPH<sup>•</sup>. Entretanto, as concentrações de antocianinas, carotenoides e clorofila *b* foram superiores nos tratamentos com sombreamento (Tabela 2). Isso pode ter ocorrido devido à redução do estresse causado pela radiação solar.

Tabela 1. Resumo dos Níveis de Significância (Two-Way ANOVA) para os Efeitos do Sombreamento e Fertilização Nitrogenada na Produção de Biomassa e Metabólitos Secundários

fonte	significância ( <i>p</i> value) <sup>a</sup>										
	biomassa			metabólitos secundários							
	folha	total	ole	fnt	flv	ant	crt	cla	clb	dpph <sup>•</sup>	frap
sombreamento (A)	<,001	0,006	0,020	0,024	0,030	0,022	0,008	<b>0,182</b>	0,015	0,002	<b>0,098</b>
fertilização (B)	<,001	<,001	<b>0,943</b>	<b>0,252</b>	<b>0,552</b>	<b>0,387</b>	<b>0,320</b>	<b>0,125</b>	<b>0,403</b>	<,001	<b>0,566</b>
interação de AxB	<b>0,081</b>	<,001	<b>0,202</b>	<b>0,793</b>	<b>0,954</b>	<b>0,380</b>	<b>0,394</b>	<b>0,683</b>	<b>0,394</b>	0,001	<b>0,880</b>

<sup>a</sup>Os valores em negrito não são considerados significativamente diferentes ao nível de 95% de confiança. ole: óleo essencial, fnt: fenois totais, flv: flavonoides, ant: antocianinas, crt: carotenoides totais, cla: clorofila *a*, clb: clorofila *b*, DPPH<sup>•</sup>: radical 2,2-difenil-1-picril- hidrazila, FRAP: habilidade de reduzir ferro.

Tabela 2. Produção de Biomassa e Metabólitos Secundários nas Folhas após o Two-Way ANOVA

nível	biomassa <sup>a</sup>			compostos antioxidantes <sup>a</sup>						atividade antioxidante	
	folha	total	ole	fnt	flv	ant	crt	cla	clb	dpph <sup>•</sup>	frap
	-- (g por planta) --			----- (mg g <sup>-1</sup> ) -----							
A1	10.0a	26.3a	5.62a	36.8a	3.66a	59,9b	72,9b	26,5a	144.9b	830a	63,5a
A2	5.53b	11.2b	3.03b	32,4b	2.02b	73,6a	103,7a	22,7a	205.3a	600b	48,4a

<sup>a</sup>As médias na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes entre os tratamentos ( $p < 0,05$  pelo teste Scott-Knott). ole: óleo essencial (mg), fnt: fenois totais, flv: flavonoides, ant: antocianinas, crt: carotenoides totais, cla: clorofila *a*, clb: clorofila *b*, dpph<sup>•</sup>:  $\mu\text{M}$  trolox g<sup>-1</sup>, frap:  $\mu\text{M}$  Fe<sup>2+</sup> g<sup>-1</sup>.

O efeito da intensidade luminosa sobre as concentrações dos ácidos fenólicos selecionados também foi significativo entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Entretanto, as concentrações dessas substâncias não foram afetadas pela fertilização nitrogenada (Tabela 3). As maiores concentrações de ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido *p*-cumárico foram obtidas nos tratamentos não sombreados (Tabela 4). Uma forte correlação entre o ácido clorogênico ( $p = 0,92$ ) e ácido cafeico ( $p = 0,91$ ) e a capacidade antioxidante do FRAP foi observada. A produção de óleo essencial, fenólicos totais, flavonoides, DPPH<sup>•</sup> e FRAP foram positivamente correlacionadas com a PAR ( $p < 0,01$ ).

Os metabólitos secundários não apenas desempenham papel importante nas defesas contra os estresses bióticos e abióticos, como também são utilizados em alimentos funcionais como ingrediente ou na medicina como agente terapêutico.<sup>27</sup> Sabe-se que as plantas podem ajustar a produção de metabólitos secundários em resposta a modificações

nas condições ambientais. O acúmulo de óleo essencial, por exemplo, pode ser induzido por diversos fatores ambientais.<sup>28</sup> As plantas de *Origanum vulgare* não sombreadas apresentam maior teor de óleo essencial.<sup>29</sup> Em *Thymus vulgaris* há correlação significativa positiva entre a assimilação líquida de CO<sub>2</sub> e o acúmulo de óleo essencial.<sup>30</sup> Em *Origanum vulgare*, a fertilização nitrogenada não afetou o teor de óleo essencial, mas alterou a composição química<sup>31</sup> e em *Rosmarinus officinalis* a fertilização nitrogenada aumentou a produção de óleo essencial em 24,2%.<sup>32</sup> No presente estudo não houve efeito da fertilização nitrogenada na produção de óleo essencial. Entretanto, o sombreamento teve efeito significativamente negativo no acúmulo desse produto, confirmando que a fotossíntese tem relação direta com a produção de óleo essencial, sendo o processo que fornece gliceraldeído-3-fosfato e piruvato para a biossíntese de terpenoides, juntamente com a rota do mevalonato.<sup>28</sup>

Tabela 3. Resumo dos Níveis de Significância (Two-Way ANOVA) para os Efeitos do Sombreamento e Fertilização Nitrogenada na Produção de Flavonoides Seleccionados

fonte	ácidos fenólicos <sup>a</sup>			
	ácido clorogênico	ácido cafeico	ácido p-cumárico	ácido ferúlico
sombreamento (A)	0,027	0,026	0,032	<b>0,482</b>
fertilização (B)	<b>0,516</b>	<b>0,377</b>	<b>0,607</b>	<b>0,971</b>
interação de A x B	<b>0,988</b>	<b>0,978</b>	<b>0,361</b>	<b>0,962</b>

<sup>a</sup>Os valores em negrito não são considerados significativamente diferentes ao nível de 95% de confiança.

Tabela 4. Produção de Ácidos Fenólicos Seleccionados após o Two-Way ANOVA

nível	ácidos fenólicos <sup>a</sup> (mg g <sup>-1</sup> )			
	ácido clorogênico	ácido cafeico	ácido p-cumárico	ácido ferúlico
A1	11,6a	0,522a	0,557a	0,071a
A2	7,25b	0,443b	0,364b	0,099a

<sup>a</sup>As médias na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes entre os tratamentos ( $p < 0,05$  pelo teste Scott-Knott).

No presente estudo, foi observado que o sombreamento teve efeito significativamente negativo no acúmulo de polifenóis totais, flavonoides totais, ácido clorogênico e ácido p-cumárico de *E. foetidum*. O impacto da radiação solar na concentração de fenólicos já foi observado em diversas espécies. Em *Brassica oleracea*, os flavonoides das inflorescências são mais concentrados em plantas não sombreadas.<sup>33</sup> Em *Lactuca sativa*, quando as folhas internas se abrem e são iluminadas, ocorre aumento nos níveis de flavonoides até estes se igualarem aos níveis das folhas externas, coincidindo com o aumento em clorofila e na atividade fotossintética.<sup>34</sup> Os efeitos da luz no acúmulo de compostos fenólicos podem ser explicados não apenas pelo fornecimento de energia e esqueletos de carbono para a biossíntese, mas também pelo efeito das frações de radiação UV, que estimulam o acúmulo de alguns compostos fenólicos em plantas, tendo os flavonoides papel de filtro solar.<sup>2</sup> Dessa forma, a radiação solar excessiva regula a biossíntese de flavonoides como uma consequência da geração de espécies reativas de oxigênio e os polifenóis, especialmente flavonoides, acumulam-se em tecidos vegetais para prevenir os danos oxidativos.<sup>35</sup>

O efeito negativo da fertilização nitrogenada nos compostos fenólicos já foi observado em diversas espécies.<sup>2</sup> Em *Lactuca sativa* os compostos fenólicos concentraram-se mais em plantas cultivadas sob baixa fertilização.<sup>36</sup> Em *Achillea collina*, a fertilização não induziu modificações qualitativas detectáveis, por outro lado, a deficiência em nitrogênio alterou significativamente os níveis de ácido clorogênico.<sup>37</sup> O ácido clorogênico é reconhecido como um importante composto bioativo da dieta, devido às suas propriedades antioxidantes, sendo associado à prevenção de câncer e arteriosclerose.<sup>38</sup> No presente estudo, essa substância foi a mais representativa entre os ácidos fenólicos selecionados, sendo seu acúmulo reduzido apenas pela luminosidade.

Os níveis de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides não foram afetados pela fertilização nitrogenada no presente estudo (Tabela 1), indicando que o nível mais baixo de fertilização

foi suficiente para manter a fotossíntese, apesar da baixa produção de biomassa. Por outro lado, foi demonstrada que a aplicação de nitrogênio no cultivo de *E. foetidum* poderia ser reduzida, sem alterar os níveis de compostos antioxidantes e nutrientes minerais, permitindo uma produção mais ambientalmente sustentável. O uso excessivo de N na agricultura pode levar a problemas ambientais causados pela lixiviação e acúmulo de nitratos nos tecidos comestíveis. O acúmulo de N nas folhas, especialmente na forma de nitratos, é uma característica negativa importante para hortaliças folhosas.<sup>36</sup> Além disso, o nitrato atua na regulação de genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo dos fenilpropanoides.<sup>39</sup> Em alguns casos, essa redução vem acompanhada de aumento na susceptibilidade das culturas à herbivoria.<sup>40</sup>

Visto que diferentes tipos de estresses são relacionados à formação de ROS, as mudanças induzidas por estresse na homeostase REDOX tem sido relacionadas à ativação da biossíntese de compostos fenólicos.<sup>41</sup> Nas plantas, o aumento nas concentrações de ácidos fenólicos está associado às modificações na atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), o ponto de entrada na rota do metabolismo dos fenilpropanoides.<sup>35</sup> O aumento na atividade da enzima PAL é considerado um importante mecanismo de defesa das plantas contra os estresses bióticos e abióticos. A inativação de enzimas antioxidantes, como a SOD e APX também pode induzir a biossíntese de flavonoides, sugerindo que os flavonoides constituem um sistema secundário de defesa contra as ROS.<sup>42</sup> Deng et al. (2012) observaram que o sombreamento e a fertilização nitrogenada tiveram efeito integrado não apenas na quantidade dos flavonoides, mas principalmente sob o aspecto qualitativo. No presente estudo, a análise estatística dos dados mostrou que a luminosidade afetou diferentemente a concentração dos diferentes flavonoides, entretanto, a interação sombreamento x fertilização não foi significativa (Tabela 1).

### 3.3. Variação na Concentração de Nutrientes Minerais

Houve diferença significativa na concentração média de nutrientes minerais das folhas em *E. foetidum* entre os diferentes tratamentos ( $p < 0,05$ ). Foi observado efeito significativo da luminosidade nas concentrações de N, P, K, S, B e Cu. A fertilização nitrogenada afetou significativamente os níveis de N, K, S, B e Mn. Houve efeito integrado entre os fatores em estudo nas concentrações de S. Dos onze elementos avaliados, Ca, Mg, Mn, Fe e Zn não foram significativamente afetados pelo sombreamento e P, Ca, Mg, Cu, Fe e Zn não foram afetados pela fertilização nitrogenada (Tabela 5).

Tabela 5. Resumo dos Níveis de Significância (Two-Way ANOVA) para os Efeitos do Sombreamento e Fertilização Nitrogenada na Concentração de Macro e Micronutrientes nas folhas

nível	significância ( $p$ value) <sup>a</sup>										
	nutrientes minerais <sup>a</sup>										
	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Mn	Fe	Zn
sombreamento (A)	<,001	<,001	<,001	<b>0,251</b>	<b>0,056</b>	<,001	<,001	0,026	<b>0,454</b>	<b>0,557</b>	<b>0,077</b>
fertilização (B)	<,001	<,526	0,001	<b>0,879</b>	<b>0,218</b>	0,038	0,022	<b>0,089</b>	<,001	<b>0,349</b>	<b>0,988</b>
interação de A x B	<b>0,124</b>	<,379	<b>0,544</b>	<b>0,435</b>	<b>0,173</b>	0,001	<b>0,241</b>	<b>0,020</b>	<b>0,977</b>	<b>0,522</b>	<b>0,643</b>

<sup>a</sup>Os valores em negrito não são considerados significativamente diferentes ao nível de 95% de confiança.

Tabela 6. Concentração de Macro e Micronutrientes nas Folhas após o Two-Way ANOVA

nível	nutrientes minerais <sup>a</sup>										
	g kg <sup>-1</sup>						mg kg <sup>-1</sup>				
	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Mn	Fe	Zn
A1	12,1b	2,15b	18,7b	16,8a	4,65a	1,98a	80,0b	10,4b	24,5a	300,6a	25,2a
A2	15,1a	2,85a	29,6a	17,7a	5,17a	2,46a	95,0a	13,2a	25,8a	294,0a	30,8a
B1	12,3b	2,42a	27,5a	17,6a	4,68a	2,27a	90,1a	10,7b	34,2a	319,7a	27,3a
B2	12,2b	2,56a	24,0b	17,5a	4,61a	2,13b	92,6a	10,6b	21,1b	282,7a	27,7a
B3	14,0a	2,41a	24,3b	17,5a	5,03a	2,13b	89,8a	12,2a	24,0b	277,6a	28,1a
B4	14,3a	2,52a	22,3b	16,8a	5,05a	2,37a	82,1b	12,7a	23,1b	302,1a	28,3a
B5	15,0a	2,58a	22,6b	16,7a	5,16a	2,20b	82,8b	12,8a	23,3b	304,3a	28,5a

<sup>a</sup>As médias na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes entre os tratamentos ( $p < 0,05$  pelo teste Scott-Knott).

As maiores concentrações de nutrientes minerais (médias ponderadas) foram observadas nos tratamentos sombreados, com aumento nas concentrações de N (25%), P (32,5%) K (58,2%), B (18,7%) e Cu (26,9%) comparado aos tratamentos não sombreados. Como o esperado, a fertilização nitrogenada aumentou as concentrações de N nas folhas, entretanto,

causou redução nas concentrações de K, B e Mn de 23,3%, 12,7% e 62,1%, respectivamente. Entretanto, a fertilização nitrogenada não afetou significativamente as concentrações de P e Cu (Tabela 6).

O aumento na concentração de nutrientes foliares em razão do sombreamento foi similar ao observado em outras espécies. Em *Capsicum annum*, o sombreamento teve efeito significativo nos minerais das folhas, aumentando as concentrações de macro e micronutrientes devido à redução do estresse causado pelo calor e radiação solar.<sup>43</sup> O nível de fenólicos em tecidos vegetais pode estar relacionado com a disponibilidade de nutrientes nas folhas. Em *Eugenia uniflora*, os níveis de fenólicos foram correlacionados com os micronutrientes: Z, Cu e Mn, sendo observada correlação negativa altamente significativa entre as concentrações de fenóis e Cu e Mn.<sup>44</sup> No presente estudo, os flavonoides foram negativamente correlacionados com as concentrações foliares de N, P, K, Mg, S, B, Cu e Zn. Os polifenóis totais correlacionaram-se negativamente com o K. Foram observadas correlações negativas entre a atividade antioxidante dos extratos frente ao radical DPPH• e N, P, K, S, Cu e Zn e além desses minerais, Ca e Mg também se correlacionaram negativamente com o FRAP ( $p < 0,05$ ). Esses resultados estão de acordo com a hipótese de que a manutenção de minerais é um pré-requisito para fornecer cofatores para muitas enzimas da rota dos fenilpropanoides e flavonoides. Os íons  $Mg^{2+}$  e  $Mn^{2+}$  asseguram o funcionamento da PAL, das CoA-ligases e das metiltransferases.<sup>2</sup>

Concluindo, foram observadas diferenças significativas no crescimento e na concentração de óleo essencial, compostos fenólicos e nutrientes minerais em folhas de *E. foetidum* entre as condições de luminosidade e fertilização nitrogenada. Os parâmetros microclimáticos foram modificados nas diferentes condições de sombreamento e a produção de biomassa, óleo essencial, compostos fenólicos e minerais foram significativamente afetados pelas condições ambientais. A maior produção de biomassa foi

observados em ambiente não sombreado, com aumento linear em relação à fertilização nitrogenada. No geral, o sombreamento e a fertilização tiveram efeito significativamente negativo nas concentrações de óleo essencial e compostos fenólicos, entretanto, as plantas sombreadas apresentaram maiores teores de pigmentos e nutrientes minerais. É importante destacar a predominância da intensidade da luz sobre o efeito da fertilização nitrogenada para explicar as variações no crescimento e concentração de metabólitos. Os resultados sugerem que o manejo cuidadoso das condições de cultivo e otimização do sistema de produção pode ser importante para a obtenção de produtividade máxima e direcionada de substâncias benéficas à saúde. Recomenda-se o cultivo sombreado para a produção de folhas para o consumo *in natura*, devido à produção de folhas mais tenras e expandidas, com maior teor de pigmentos. As folhas produzidas a pleno sol são mais adequadas para o uso industrial, devido ao maior teor de óleo essencial e compostos fenólicos, além da maior produção de biomassa.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa – Processo 6844-12-0.

#### 4. Referências

- (1) Duke, J. *Duke's handbook of medicinal plants of Latin America*. Taylor and Francis, CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2009; 832 pp.
- (2) Treutter, D. Managing phenol contents in crop plants by phytochemical farming and breeding – visions and constraints. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 807-857.

- (3) Halliwell, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* **2006**, *141*, 312-322.
- (4) Apel, K.; Hirt, H. Reactive oxygen species: metabolism oxidative stress and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2004**, *55*, 373-399.
- (5) Harbone, J. Nature distribution of plant flavonoids. In *Plant flavonoids in biology and medicine*; 1st ed. Cody, V., Middleton, E., Harborne, J., Eds; A. R. Liss: New York, NY, USA, 1986; pp. 15-24.
- (6) Pietta, P. G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1035-1042.
- (7) Pourcel, L.; Routaboul, J.; Cheynier, V.; Lepiniec, L.; Debeaujon, I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trend Plant Sci.* **2007**, *12*, 29-36.
- (8) Solovchenko, A. Buildup of screening pigments and resistance of plants to photodamage. In *Photoprotection in plants: Optical screening-based mechanisms*. Solovchenko, A. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, Germany, 2010; pp. 143-158.
- (9) Stahl, W.; Sies, H. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Asp. Med.* **2003**, *24*, 345-351.
- (10) Paiva, S.; Russel, R. Beta-carotene and other carotenoids and antioxidants. *J. Am. Nutr.* **1999**, *18*, 426-433.
- (11) Bramley, P. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J. Exp. Bot.* **2002**, *53*, 2107-2113.
- (12) Suzuki, N.; Koussevitzky, S.; Mittler, R.; ROS and redox signaling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ.* **2012**, *35*, 259-270.
- (13) Miller, G.; Suzuki, N.; Ciftci-Yilmaz, S.; Mittler, R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ.* **2009**, *33*, 453-467.

- (14) Singleton, V.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **1999**, *299*, 152-178.
- (15) Popova, M.; Bankova, V.; Butovska, D.; Petkov, V.; Nikolova-Damyanova, B.; Sabatini, A.; Bogdanov, S. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochem. Anal.* **2004**, *15*, 235-240.
- (16) Sims, D.; Gamon, J. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sens. Environ.* **2002**, *81*, 337-354.
- (17) Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25-30.
- (18) Benzie, I.; Strain, J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70-75.
- (19) Malavolta, E.; Vitti, G.; de Oliveira, S. *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. 2nd. ed. Potafos: Piracicaba, SP, Brasil, 1997; 319 pp.
- (20) Zhang, S.; Hu, H.; Xu, K.; Li, Z.; Yang, Y. Flexible and reversible responses to different irradiance levels during photosynthetic acclimation of *Cypripedium guttatum*. *J. Plant Physiol.* **2007**, *164*, 611-620.
- (21) Marchiori, P.; Machado, E.; Ribeiro, R. Photosynthetic limitations imposed by self-shading in field-grown sugarcane varieties. *Field Crops Res.* **2014**, *155*, 30-37.
- (22) Deng, B.; Shang, X.; Fang, S.; Li, Q.; Fu, X.; Su, J. Integrated effects of light intensity and fertilization on growth and flavonoid accumulation in *Cyclocarya paliurus*. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 6286-6292.

- (23) Yang, S. J.; Sun, M.; Zhang, Y. J.; Cochard, H.; Cao, K. F. Strong leaf morphological, anatomical, and physiological responses of a subtropical woody bamboo (*Sinarundinaria nitida*) to contrasting light environments. *Plant Ecol.* **2014**, *215*, 97-109.
- (24) Moniruzzaman, M.; Islam, M.; Hossain, M.; Hossain, T. Miah, M. Effects of shade and nitrogen levels on quality bngladhonia production. *Bangladesh J. Agril. Res.* **2009**, *34*, 205-213.
- (25) Marchese, J.; Ming, L.; Ducatti, C.; Broetto, F.; Da Silva, E.; Leonardo, M. Carbon isotope composition as a tool to control the quality of herbs and medicinal plants. *Photosynthetica* **2006**, *44*, 155-159.
- (26) Min, J.; Shi, W.; Xing, G.; Zhang, H.; Zhu, Z. Effects of a catch crop and reduced nitrogen fertilization on nitrogen leaching in greenhouse vegetable production systems. *Nutr. Cycling Agroecosyst.* **2011**, *91*, 31-39.
- (27) Racchi, M. Antioxidant defenses in plants with attention to *Prunus* and *Citrus* spp. *Antioxidants* **2013**, *2*, 340-369.
- (28) Sangwan, N.; Farooqi, A.; Shabih, F.; Sangwan, R. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regul.* **2001**, *34*, 3-21.
- (29) Tibaldi, G.; Fontana, E.; Nicola, S. Growing conditions and postharvest management can affect the essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart. *Ind. Crops Prod.* **2011**, *34*, 1516-1522.
- (30) Letchamo, W.; Gosselin, A. Transpiration, essential oil glands, epicuticular wax and morphology of *Thymus vulgaris* are influenced by light intensity and water supply. *J. Hortic. Sci.* **1996**, *71*, 1-10.
- (31) Karamanos, A.; Sotiropoulou, D. Field studies of nitrogen application on Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart) essential oil during two cultivation seasons. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *46*, 246-252.

- (32) Singh, M. Influence of organic mulching and nitrogen application on essential oil yield and nitrogen use efficiency of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Arch. Agron. Soil Sci.* **2013**, *59*, 273-279.
- (33) Gliszczyńska-Świgło, A.; Kałużewicz, A.; Lemańska, K.; Knaflewski, M.; Tyrakowska, B. The effect of solar radiation on the flavonol content in broccoli inflorescence. *Food Chem.* **2007**, *100*, 241-245.
- (34) Oh, M.; Carey, E.; Rajashekar, C. Environmental stresses induce health-promoting phytochemicals in lettuce. *Plant Physiol. Biochem.* **2009**, *47*, 578-583.
- (35) Kováčik, J.; Klejdus, B.; Bačkor, M.; Repčák, M. Phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic compounds accumulation in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* leaf rosettes. *Plant Sci.* **2007**, *172*, 393-399.
- (36) Stefanelli, D.; Winkler, S.; Jones, R. Reduced nitrogen availability during growth improves quality in red oak lettuce leaves by minimizing nitrate content, and increasing antioxidant capacity and leaf mineral content. *Agric. Sci.* **2011**, *2*, 477-486.
- (37) Giorgi, A.; Mingozi, M.; Madeo, M.; Speranza, G.; Cocucci, M. Effect of nitrogen starvation on the phenolic metabolism and antioxidant properties of yarrow (*Achillea collina* Becker ex Rchb.). *Food Chem.* **2009**, *114*, 204-211.
- (38) Jin, U.; Lee, J.; Kang, S.; Kim, J.; Park, W.; Kim, J.; Moon, K.; Kim, C. A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: Isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sci.* **2005**, *77*, 2760-2769.
- (39) Fritz, C.; Palacios-Rojas, N.; Feil, R.; Stitt, M. Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *Plant J.* **2006**, *46*, 533-548.

- (40) Leser, C.; Treutter, D. Effects of nitrogen supply on growth, contents of phenolic compounds and pathogen (scab) resistance of apple trees. *Physiol. Plant.* **2005**, *123*, 49-56.
- (41) Agati, G.; Tattini, M. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytol.* **2010**, *186*, 786-793.
- (42) Fini, A.; Brunetti, C.; Di Ferdinando, M.; Ferrini, F.; Tattini, M. Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants. *Plant Signaling & Behav.* **2011**, *6*, 709-711.
- (43) Díaz-Pérez, J. Bell pepper (*Capsicum annum* L.) crop as affected by shade level: microenvironment, plant growth, leaf gas exchange, and leaf mineral nutrient concentration. *HortScience* **2013**, *48*, 175-182.
- (44) Santos, R.; Fortes, G.; Ferri, P.; Santos, S. Influence of foliar nutrients on phenol levels in leaves of *Eugenia uniflora*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2011**, *21*, 581-586.

## CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo apresenta pela primeira vez a quantificação de substâncias bioativas em folhas de *E. foetidum* em relação às fases de crescimento em conjunto com a poda da inflorescência, visando a descrição da distribuição dos fitoquímicos e atividade antioxidante. As fases de crescimento influenciaram a concentração de compostos bioativos das folhas de *E. foetidum*, sendo recomendada a colheita das folhas nas fases iniciais de crescimento, devido à maior concentração de flavonoides, compostos fenólicos, clorofilas e carotenoides. Essas substâncias contribuem para uma alta capacidade antioxidante dos extratos. As concentrações da maioria das substâncias bioativas estudadas diminuíram com o avanço do ciclo; essa diminuição foi relacionada com o aumento da atividade da peroxidase e polifenoloxidase. A poda da inflorescência é indicada para a cultura, por aumentar significativamente a produção foliar sem afetar os níveis de compostos bioativos.

A luminosidade afetou não apenas o crescimento, mas também as concentrações de óleo essencial, compostos fenólicos e nutrientes minerais em folhas de *E. foetidum*. Os parâmetros microclimáticos foram modificados nas diferentes condições de sombreamento e a produção de biomassa, óleo essencial, polifenóis totais, flavonóides e ácidos fenólicos foi reduzida com o sombreamento 50%. Entretanto, os teores de clorofila *b*, carotenoides e nutrientes minerais nas folhas foi superior nas plantas cultivadas em ambiente sombreado. É importante destacar a predominância da intensidade da luz sobre o efeito a fertilização nitrogenada para explicar as variações no crescimento e concentração de metabólitos.

A caracterização bioquímica das folhas de *E. foetidum* em relação às fases de crescimento da planta e fatores pré-colheita é importante para a obtenção da produção máxima de substâncias bioativas. Os resultados do presente estudo indicam que o acúmulo de metabólitos secundários em *E. foetidum* depende do equilíbrio entre a produção de biomassa e a síntese de metabolitos. Os resultados apresentados no presente estudo sugerem que o manejo cuidadoso das condições de cultivo e a otimização do sistema de produção de *E. foetidum* são importantes para a obtenção de produtividade máxima e direcionada de substâncias benéficas à saúde.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AROCKIASAMY, S.; IGNACIMUTHU, S. Plant regeneration from mature leaves and roots of *Eryngium foetidum* L., a food flavouring agent. **Current Science**, v. 75, n. 7, p. 664-666, 1998.

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.

BRASIL. **Manual das hortaliças não-convencionais**. Brasília: MAPA/ACS, 2010. 92 p.  
COE, F. G. Rama midwifery in eastern Nicaragua. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, n. 1, p. 136-157, 2008.

CRAIG, W. J. Health-promoting properties of common herbs. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 3, p. 491s-499s, 1999.

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.

DUKE, J.A. **Duke's handbook of medicinal plants of Latin America**. Taylor and Francis, CRC Press: USA, 2009; p. 298-300.

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

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – *Quo vadis?*. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011.

IGNACIMUTHU, S. et al. Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature leaf explants of *Eryngium foetidum*, a condiment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 56, n. 2, p. 131-137, 1999.

KALA, C. P. Ethnomedicinal botany of the Apatani in the Eastern Himalayan region of India. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 1, p. 11-19, 2005.

KORUS, A. Level of vitamin C, polyphenols, and antioxidant and enzymatic activity in three varieties of kale (*Brassica oleracea* l. var. *Acephala*) at different stages of maturity. **International Journal of Food Properties**, v. 14, n. 5, p. 1069-1080, 2011.

LANS, C. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.3, n. 13, p. 1-12, 2007.

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

MONIRUZZAMAN, M.; ISLAM, M. S.; HOSSAIN, M. M.; et al. Effects of shade and nitrogen levels on quality bangladhonia production. **Bangladesh Journal of Agricultural Research**, v. 34, n. 2, p. 205-213, 2009.

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.

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

POLJSAK, B.; ŠUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 11 pages, 2013.

PRASAD, P. et al. Folklore medicinal plants of north Andaman Islands, India. **Fitoterapia**, v. 79, n. 6, p. 458-464, 2008.

RAMCHARAN, C. Culantro: a much utilized, little understood herb. In: JANICK, J. **Perspectives on New Crops and New Uses**. Alexandria: ASHS, 1999, p. 506-509.

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.

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

TREUTTER, D. Managing phenol contents in crop plants by phytochemical farming and breeding – visions and constraints. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 3, p. 807-857, 2010.

WILLETT, W. C. The Mediterranean diet: science and practice. **Public Health Nutrition**, v. 9, n. 1a, p. 105-110, 2006.

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