

Caracterização fitoquímica e actividade antioxidante de couve tronchuda, *Brassica oleracea* var. *costata*

Carla Sousa^a, Patrícia Valentão^a, José A. Pereira^b, M. Ângelo Rodrigues^b, Albino Bento^b, Rosa M. Seabra^a, Paula Baptista^b, Anabela Martins^b, Judith Offermann^b, Graciliana Lopes^a, David M. Pereira^a, Marcos Taveira^a, Paula B. Andrade^a

^a REQUIMTE/ Serviço de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto

^b CIMO/Escola Superior Agrária de Bragança

SEMINÁRIOS
20 ANOS
de Ensino e Investigação
em Ciências Agrárias



Projecto de investigação financiado pela FCT (POCI/AGR/57399/2004)

Caracterização fitoquímica

➔ Material analisado

Sementes

Rebentos

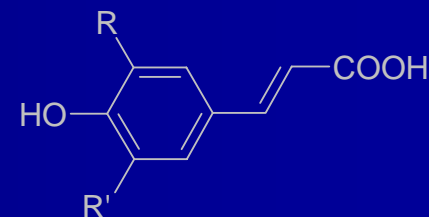
Folha interna

Folha externa



➔ Determinação do perfil fenólico

HPLC-DAD-MS/MS-ESI



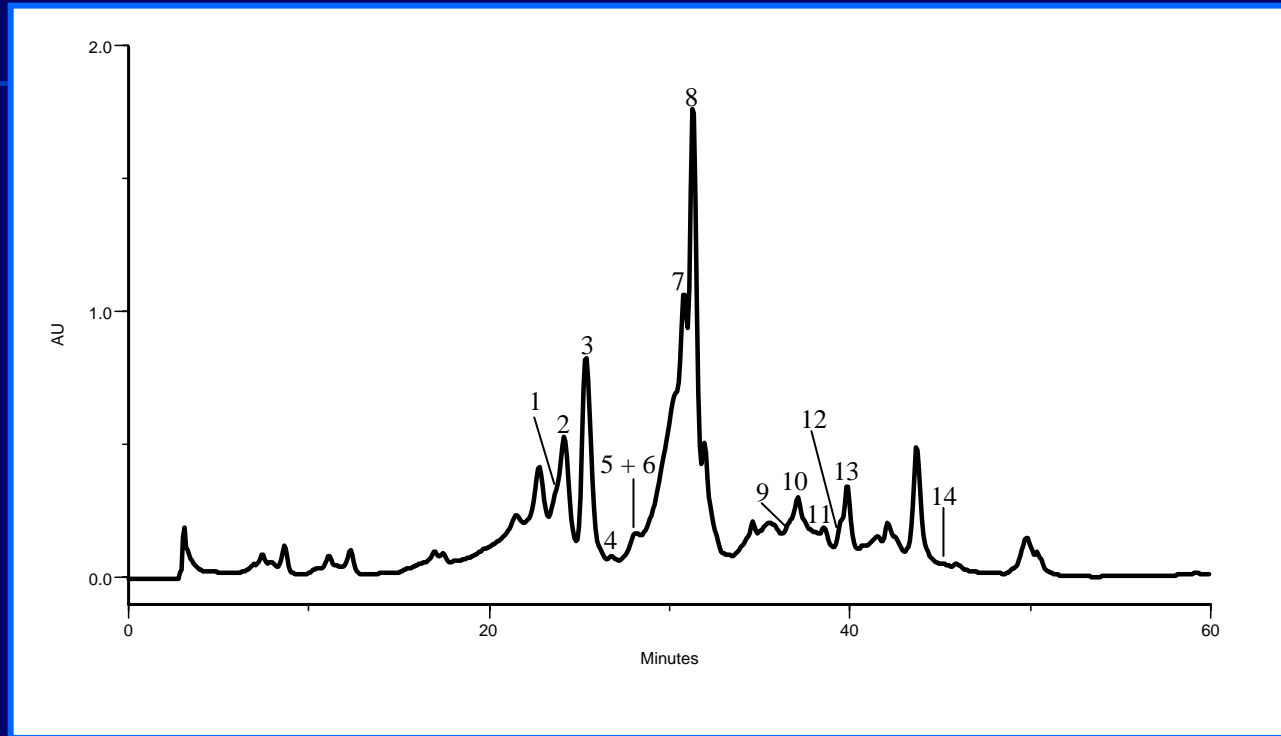
R = R' = H; ácido *p*-cumárico
R = OH, R' = H; ácido cafeico
R = OCH₃, R' = H; ácido ferúlico
R = R' = OCH₃; ácido sinápico

➔ Determinação do perfil de ácidos orgânicos

HPLC-UV

Caracterização fitoquímica – compostos fenólicos

→ Folha externa



Cromatograma dos compostos fenólicos das folhas externas de couve tronchuda. Detecção a 330 nm. (1) campferol 3-*O*-soforotriósido-7-*O*-glucósido; (2) campferol 3-*O*-(metoxicafeoil/cafeoil)-soforósido-7-*O*-glucósido; (3) campferol 3-*O*-soforósido-7-*O*-glucósido; (4) campferol 3-*O*-soforotriósido-7-*O*-soforósido; (5) campferol 3-*O*-soforósido-7-*O*-soforósido; (6) campferol 3-*O*-tetraglucósido-7-*O*-soforósido; (7) campferol 3-*O*-(sinapoil/cafeoil)-soforósido-7-*O*-glucósido; (8) campferol 3-*O*-(feruloil/cafeoil)-soforósido-7-*O*-glucósido; (9) campferol 3-*O*-soforotriósido; (10) campferol 3-*O*-(sinapoil)-soforósido; (11) campferol 3-*O*-(feruloil)-soforotriósido; (12) campferol 3-*O*-(feruloil)-soforósido; (13) campferol 3-*O*-soforósido; (14) campferol 3-*O*-glucósido.

Caracterização fitoquímica – compostos fenólicos

→ Folha externa

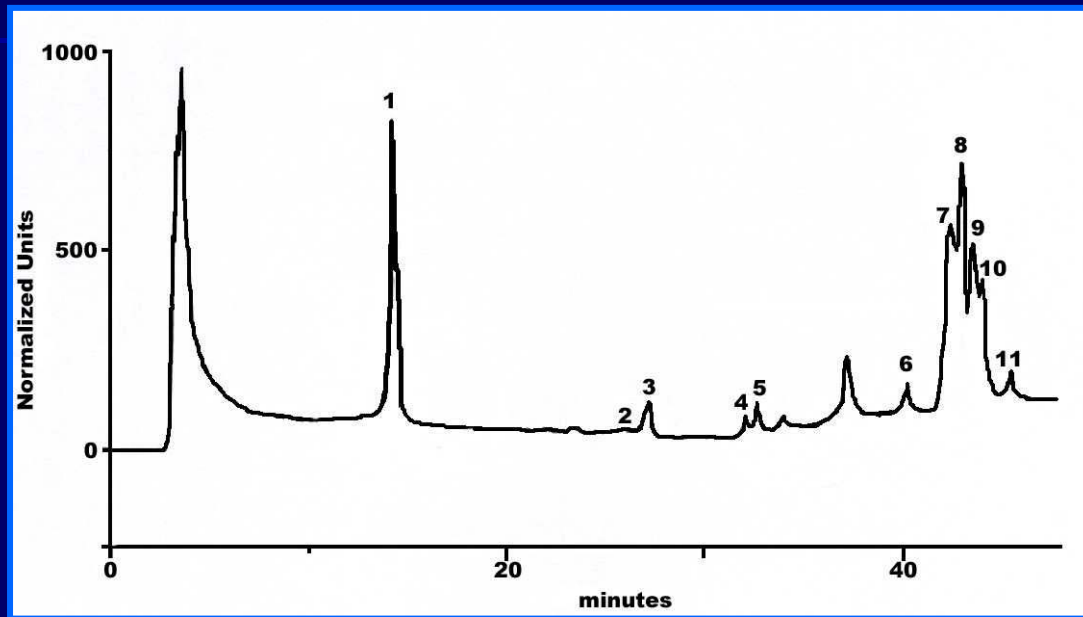
Quantificação dos compostos fenólicos nas folhas externas de couve tronchuda (mg/kg, peso sêco)^a.

Amostra	Colheita	Cultura ^c	Composto ^b										Total
			1 + 2	3	4	5 + 6	7	8	9 + 10	11	12 + 13	14	
1	Outubro 2002	B	556,9 (36,8)	2,4 (0,1)	5,8 (0,1)	4,2 (0,0)	91,6 (5,9)	45,5 (2,6)	157,6 (10,2)	15,4 (0,4)	87,8 (1,8)	nq	912,3
2	Outubro 2002	C	274,4 (11,2)	112,6 (2,8)	12,6 (0,5)	10,5 (0,8)	22,3 (1,6)	95,4 (2,4)	59,2 (1,9)	6,7 (0,8)	45,8 (1,8)	nq	555,8
3	Novembro 2002	B	547,6 (46,0)	730,2 (84,0)	21,3 (2,5)	59,1 (15,4)	186,5 (10,7)	429,7 (42,2)	173,1 (6,7)	16,2 (1,9)	240,1 (29,6)	nq	1952,0
4	Novembro 2002	C	191,0 (16,3)	16,0 (9,3)	8,1 (0,1)	18,2 (0,3)	1,3 (0,1)	96,7 (14,3)	97,1 (8,9)	100,1 (1,5)	38,7 (3,0)	nq	561,4
5	Dezembro 2002	B	9,2 (0,7)	8,6 (0,1)	-	3,3 (0,1)	1,3 (0,0)	1,6 (0,2)	2,0 (0,2)	1,1 (0,1)	7,5 (0,2)	nq	27,4
6	Dezembro 2002	C	18,4 (0,7)	41,9 (0,6)	3,3 (0,1)	3,8 (0,2)	7,3 (0,1)	9,3 (3,4)	60,5 (2,7)	94,7 (4,6)	23,0 (0,0)	nq	252,5
7	Janeiro 2003	B	245,7 (22,1)	53,9 (2,9)	2,5 (0,0)	80,4 (1,9)	5,9 (0,1)	32,3 (2,5)	115,7 (2,6)	185,7 (3,4)	3,2 (0,1)	nq	712,6
8	Janeiro 2003	C	62,5 (1,3)	8,0 (0,6)	1,4 (0,1)	3,5 (0,5)	34,2 (0,2)	2,1 (0,0)	34,5 (1,1)	-	33,6 (2,7)	nq	254,1

^a Os resultados são apresentados sob a forma de média (desvio-padrão) de duas determinações. ^b (1) **campferol 3-O-soforotriósido-7-O-glucósido**; (2) **campferol 3-O-(metoxicafeoil/cafeoil)-soforósido-7-O-glucósido**; (3) **campferol 3-O-soforósido-7-O-glucósido**; (4) **campferol 3-O-soforotriósido-7-O-soforósido**; (5) **campferol 3-O-soforósido-7-O-soforósido**; (6) **campferol 3-O-tetraglucósido-7-O-soforósido**; (7) **campferol 3-O-(sinapoil/cafeoil)-soforósido-7-O-glucósido**; (8) **campferol 3-O-(feruloil/cafeoil)-soforósido-7-O-glucósido**; (9) **campferol 3-O-soforotriósido**; (10) **campferol 3-O-(sinapoil)-soforósido**; (11) **campferol 3-O-(feruloil)-soforotriósido**; (12) **campferol 3-O-(feruloil)-soforósido**; (13) **campferol 3-O-soforósido**; (14) **campferol 3-O-glucósido**. ^c B: Biológica; C: Convencional. nq – não quantificado.

Caracterização fitoquímica – compostos fenólicos

→ Folha interna



Cromatograma dos compostos fenólicos das folhas internas de couve tronchuda. Detecção a 330 nm. (1) ácido 3-*p*-cumaroilquinico; (2) campferol 3-*O*-soforósido-7-*O*-glucósido; (3) campferol 3-*O*-(cafeoil)-soforósido-7-*O*-glucósido; (4) campferol 3-*O*-(sinapoil)-soforósido-7-*O*-glucósido; (5) campferol 3-*O*-(feruloil)-soforósido-7-*O*-glucósido; (6) campferol 3-*O*-soforósido; (7) 1,2-disinapoilgentiobiose; (8) 1-sinapoil-2-feruloilgentiobiose; (9) isómero de 1,2-disinapoilgentiobiose; (10) 1,2,2'-trisinapoilgentiobiose; (11) 1,2'-disinapoyl-2-feruloilgentiobiose.

Caracterização fitoquímica – compostos fenólicos

→ Folha interna

Quantificação dos compostos fenólicos nas folhas internas de couve tronchuda (mg/kg, peso *sêco*)^a.

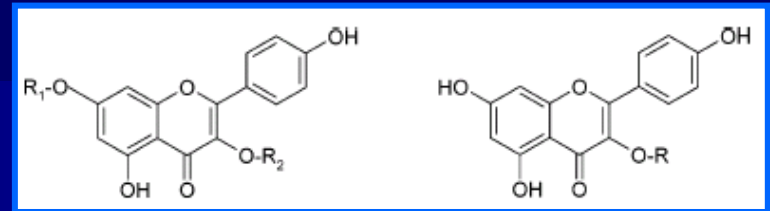
Amostra	Colheita	Cultura ^c	Composto ^b								Total
			1	2	3	4	5	6	7 + 8 + 9 + 10	11	
9	Outubro 2002	B	69,7 (3,8)	-	7,4 (0,2)	3,5 (0,7)	0,9 (0,8)	2,9 (0,1)	85,0 (2,5)	3,1 (0,1)	172,5
10	Outubro 2002	C	61,0 (0,1)	-	14,1 (0,6)	1,5 (0,0)	14,5 (0,2)	1,4 (0,0)	54,1 (4,3)	-	146,6
11	Novembro 2002	B	23,2 (1,0)	-	2,7 (0,4)	nq	nq	-	42,1 (0,3)	2,5 (0,2)	70,5
12	Novembro 2002	C	57,4 (8,7)	-	6,3 (1,1)	-	-	0,9 (0,0)	33,1 (6,1)	1,4 (0,2)	99,1
13	Dezembro 2002	B	34,3 (0,6)	-	3,7 (0,1)	-	-	1,0 (0,0)	32,0 (0,1)	0,0 (0,0)	71,2
14	Dezembro 2002	C	17,7 (2,2)	-	1,5 (0,0)	-	-	2,7 (0,1)	14,6 (2,7)	0,3 (0,1)	36,8
15	Janeiro 2003	B	33,3 (2,2)	nq	5,2 (0,1)	2,0 (0,1)	3,8 (0,1)	4,0 (0,7)	73,3 (0,2)	0,7 (0,9)	122,3
16	Janeiro 2003	C	16,7 (2,8)	12,2 (0,6)	-	28,0 (5,4)	17,9 (1,3)	13,8 (0,9)	9,0 (0,9)	-	97,6

^a Os resultados são apresentados sob a forma de média (desvio-padrão) de duas determinações. ^b (1) ácido 3-*p*-cumaroilquinico; (2) campferol 3-*O*-soforósido-7-*O*-glucósido; (3) campferol 3-*O*-(cafeoil)-soforósido-7-*O*-glucósido; (4) campferol 3-*O*-(sinapoil)-soforósido-7-*O*-glucósido; (5) campferol 3-*O*-(feruloil)-soforósido-7-*O*-glucósido; (6) campferol 3-*O*-soforósido; (7) 1,2-disinapoilgentiobiose; (8) 1-sinapoil-2-feruloilgentiobiose; (9) isômero de 1,2-disinapoilgentiobiose; (10) 1,2,2'-trisinapoilgentiobiose; (11) 1,2'-disinapoyl-2-feruloilgentiobiose. ^c B: Biológica; C: Convencional. nq: não quantificado.

Caracterização fitoquímica – compostos fenólicos

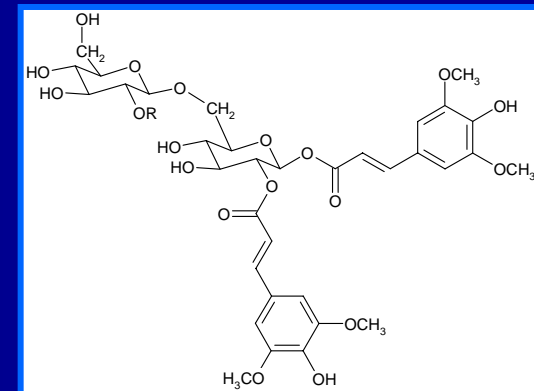
➔ Folha externa vs folha interna

Folha externa: flavonóis glicosilados



Folha interna: maioritariamente ácidos fenólicos
Perfil fenólico mais homogêneo

Campferol 3-*O*-soforósido-7-*O*-glucósido
Campferol 3-*O*-soforósido



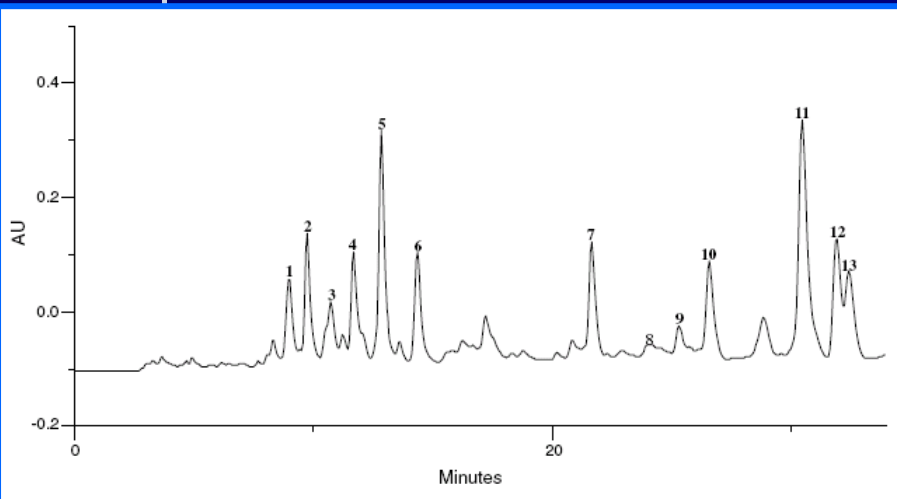
➔ Cultura biológica > Cultura convencional

➔ Evolução durante o Inverno

↓ até Dezembro, ↑ Janeiro (flavonóides)

Caracterização fitoquímica – compostos fenólicos

→ Sementes



Cromatograma dos compostos fenólicos das sementes de couve tronchuda. Detecção a 330 nm.

Quantificação dos compostos fenólicos nas sementes de couve tronchuda (mg/kg, peso seco)^a

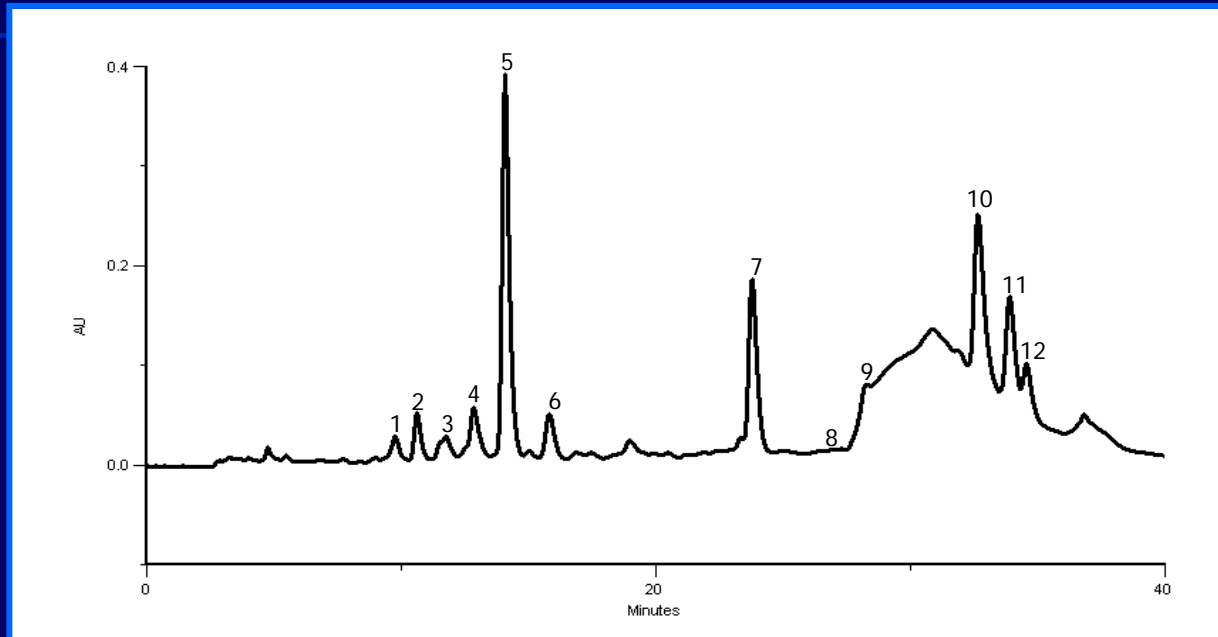
	<i>Composto fenólico</i>	Média	DP
1	Sinapoilgentiobiose	308,5	0,3
2	Isómero de 1-sinapoilglucose	368,4	11,7
3	Isómero de sinapoilgentiobiose	269,5	1,7
4	Isómero de 1-sinapoilglucose	416,9	9,8
5	1-Sinapoilglucose	702,6	11,5
6	Campferol-3-(sinapoil)soforotriósido-7-glucósido	910,9	17,7
7	Sinapoilcolina	376,0	7,1
8	Campferol-3,7-diglucósido-4'-(sinapoil)glucósido	267,1	17,6
9	Isómero de 1,2-di-sinapoilgentiobiose	151,6	3,2
10	Isómero de 1,2-di-sinapoilgentiobiose	345,0	2,0
11	1,2-Di-sinapoilgentiobiose	1023,4	37,1
12	1,2,2'-Tri-sinapoilgentiobiose	448,3	2,2
13	1,2-Di-sinapoilglucose	368,2	2,4
	Σ	5974,4	

^a Resultados expressos sob a forma de media de três determinações, DP, desvio-padrão, Σ , total de compostos determinados.

80% de derivados hidroxicinâmicos

Caracterização fitoquímica – compostos fenólicos

➔ Rebentos

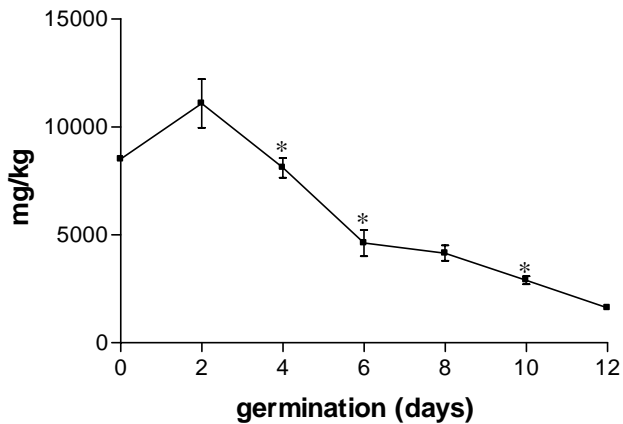


Cromatograma dos compostos fenólicos dos rebentos de couve tronchuda (2 dias de germinação). Detecção a 320 nm. (1) sinapoilgentiobiose; (2) isómero de 1-sinapoilglucose; (3) isómero de sinapoilgentiobiose; (4) isómero de 1-sinapoilglucose; (5) 1-sinapoilglucose; (6) campferol 3-*O*-(sinapoil)-soforotriósido7-glucósido; (7) sinapoilcolina; (8) isómero de 1,2-disinapoilgentiobiose; (9) isómero de 1,2-disinapoilgentiobiose; (10) 1,2-disinapoilgentiobiose; (11) 1,2,2'-trisinapoilgentiobiose; (12) 1,2-disinapoilglucose.

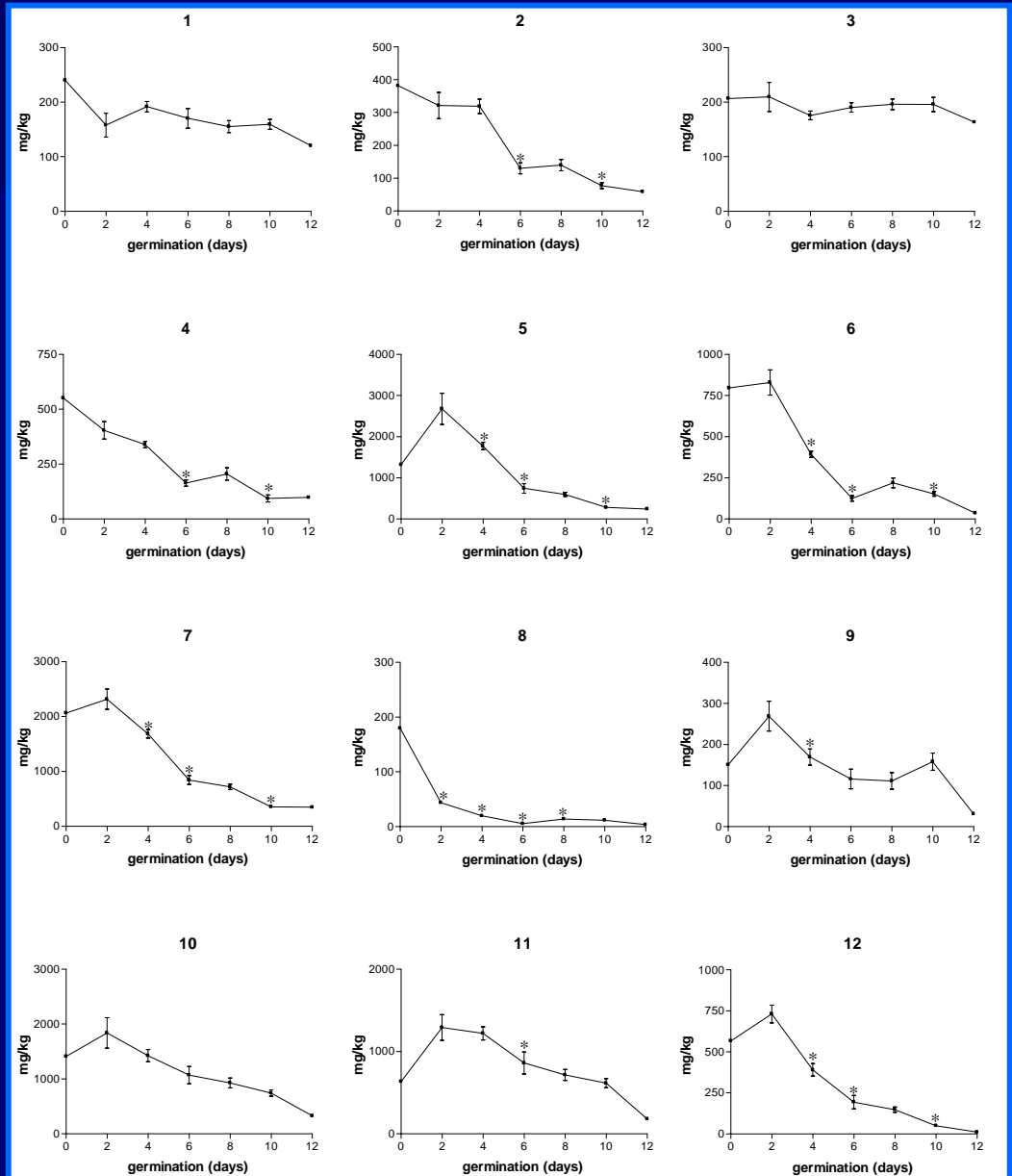
Caracterização fitoquímica – compostos fenólicos

➔ Rebentos

Total phenolics

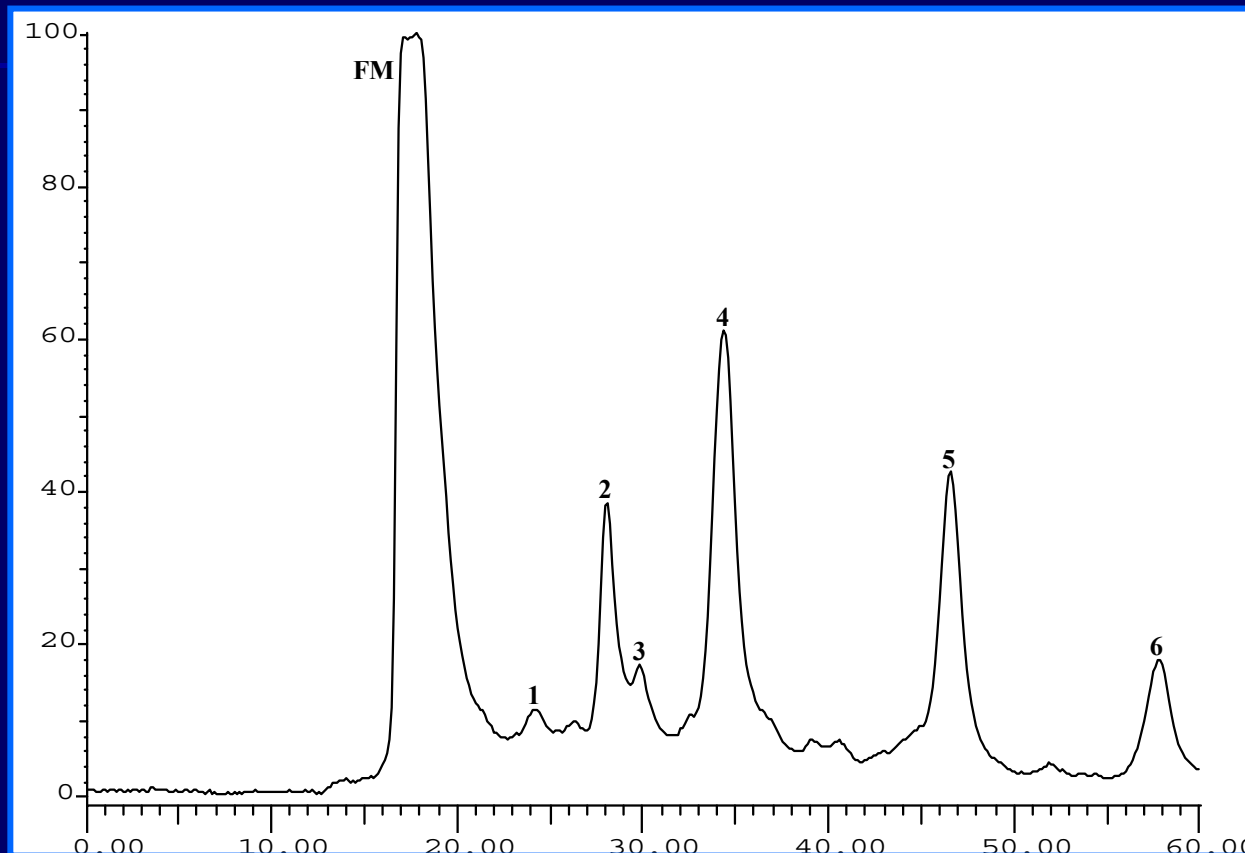


Evolução do teor de compostos fenólicos dos rebentos de couve tronchuda. (1) sinapoilgentiobiose; (2) isómero de 1-sinapoilglucose; (3) isómero de sinapoilgentiobiose; (4) isómero de 1-sinapoilglucose; (5) 1-sinapoilglucose; (6) campferol 3-O-(sinapoil)-soforotriósido7-glucósido; (7) sinapoilcolina; (8) isomero de 1,2-disinapoilgentiobiose; (9) isomero de 1,2-disinapoilgentiobiose; (10) 1,2-disinapoilgentiobiose; (11) 1,2,2'-trisinapoilgentiobiose; (12) 1,2-disinapoilglucose.



Caracterização fitoquímica – ácidos orgânicos

→ Folha externa e folha interna



Cromatograma dos ácidos orgânicos das folhas internas de couve tronchuda. Detecção a 214 nm. (FM) Fase móvel; (1) ácido *cis*-aconítico; (2) ácido cítrico; (3) ácido ascórbico; (4) ácido málico; (5) ácido chiquímico; (6) ácido fumárico.

Caracterização fitoquímica – ácidos orgânicos

➔ Folha externa e folha interna

Quantificação dos ácidos orgânicos nas folhas de couve tronchuda (mg/kg, peso sêco)^a.

Amostra	Colheita	Folha	Cultura ^b	Composto						Total
				Ácido cis-aconítico	Ácido cítrico	Ácido ascórbico	Ácido málico	Ácido chiquímico	Ácido fumárico	
1	Outubro 2002	Externa	B	-	7429,8 (1019,6)	9778,3 (358,0)	9133,5 (1087,1)	143,5 (7,5)	21,9 (0,7)	26307,0
2	Outubro 2002	Externa	C	61,0 (0,9)	18980,4 (1112,2)	28843,7 (1344,4)	25904,3 (307,6)	171,3 (1,7)	34,6 (0,6)	73995,2
3	Novembro 2002	Externa	B	-	9749,6 (576,2)	10978,7 (546,9)	11183,7 (164,8)	124,9 (5,7)	8,6 (1,2)	32045,6
4	Novembro 2002	Externa	C	78,0 (22,4)	9362,6 (458,9)	28441,8 (2914,0)	22184,6 (1073,3)	226,1 (1,5,3)	27,8 (0,3)	60321,0
5	Dezembro 2002	Externa	B	64,8 (6,1)	5041,3 (946,8)	31179,1 (4054,5)	39459,0 (2357,6)	118,3 (1,6,9)	1,3 (0,1)	75863,81
6	Dezembro 2002	Externa	C	76,3 (16,4)	9962,8 (2164,2)	30634,3 (3468,0)	28385,9 (1391,4)	172,7 (2,2)	2,5 (0,2)	69234,5
7	Janeiro 2003	Externa	B	-	3017,6 (182,5)	15516,5 (3519,2)	12030,4 (583,1)	138,0 (1,2,5)	25,8 (1,2)	30728,3
8	Janeiro 2003	Externa	C	93,0 (16,1)	8282,4 (392,8)	30906,2 (7289,2)	32207,5 (2452,6)	232,1 (2,9)	7,9 (3,8)	71729,0
9	Outubro 2002	Interna	B	114,2 (10,1)	9681,7 (12,8)	31069,4 (632,4)	33449,7 (149,9)	269,2 (2,3)	41,6 (1,1)	74625,9
10	Outubro 2002	Interna	C	20,2 (1,1)	4689,9 (29,8)	nq	32270,5 (193,6)	257,4 (3,4)	26,1 (16,3)	37264,1
11	Novembro 2002	Interna	B	176,4 (13,7)	6912,3 (21,0)	15852,7 (930,4)	17620,8 (688,8)	155,8 (1,6)	143,3 (2,8)	40861,4
12	Novembro 2002	Interna	C	59,7 (0,7)	5198,1 (305,0)	nq	32710,7 (924,3)	216,5 (0,8)	26,2 (1,9)	38211,2
13	Dezembro 2002	Interna	B	135,4 (2,7)	8525,4 (328,0)	25043,9 (181,6)	52869,6 (582,8)	200,9 (3,9)	53,9 (3,2)	86829,1
14	Dezembro 2002	Interna	C	83,7 (8,1)	4108,7 (76,7)	nq	6735,9 (657,0)	178,7 (4,6)	58,8 (1,0)	11165,8
15	Janeiro 2003	Interna	B	113,8 (18,2)	5560,4 (2,4)	36225,6 (3005,6)	10080,3 (1069,9)	248,9 (1,6,1)	91,3 (5,2)	52320,2
16	Janeiro 2003	Interna	C	101,8 (42,0)	9448,6 (1701,5)	21030,6 (5206,2)	5907,2 (625,5)	303,6 (3,7)	62,6 (0,1)	36854,4

^a Os resultados são apresentados sob a forma de média (desvio-padrão) de três determinações. ^b B: Biológica; C: Convencional. nq: não quantificado.

Caracterização fitoquímica – ácidos orgânicos

→ Folha externa vs folha interna

Folha externa: ácidos málico e ascórbico são maioritários

Folha interna: maior variação (ácidos málico e ascórbico)

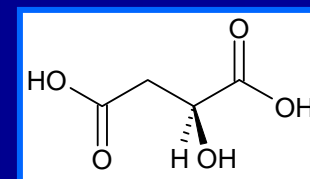
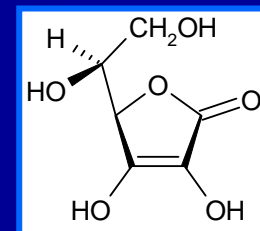
→ Cultura biológica vs Cultura convencional

Cultura biológica

Folha interna = folha externa

↑ % Ácido ascórbico em Janeiro

> Produção de ácidos em Dezembro

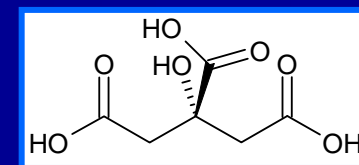


Cultura convencional

Folha interna ≠ folha externa

Folha interna: ácido ascórbico em quantidades vestigiais até Dezembro

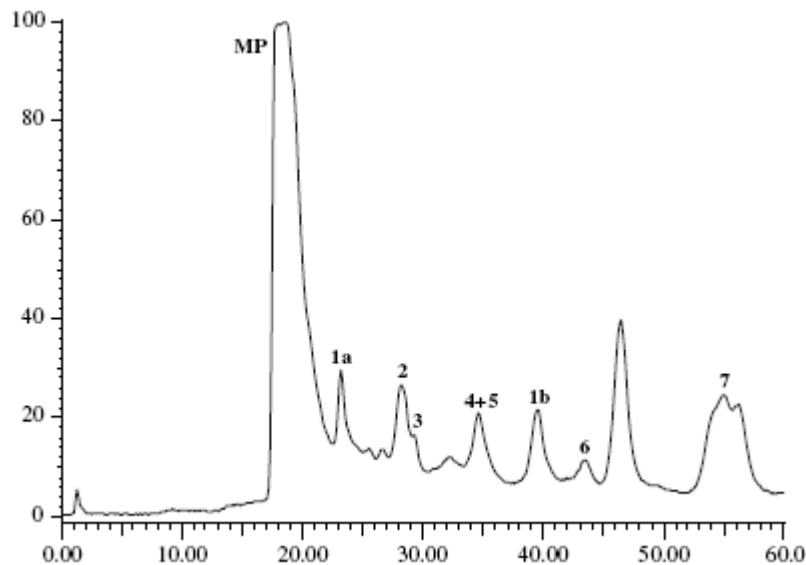
> % de ácidos cítrico e málico em Outubro



↑
Fertilização

Caracterização fitoquímica – ácidos orgânicos

→ Sementes



Cromatograma dos ácidos orgânicos das sementes de couve tronchuda. Detecção a 214 nm.

Quantificação dos ácidos orgânicos nas sementes de couve tronchuda (mg/kg, peso sêco)^a

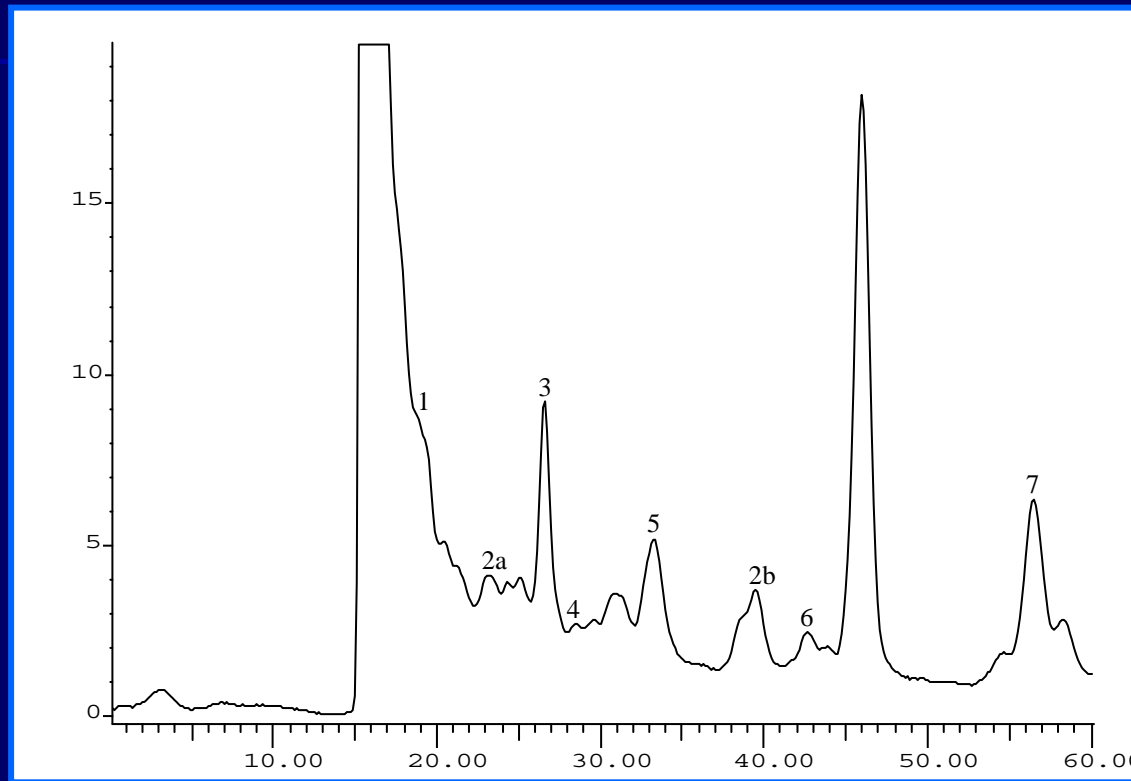
	Ácido orgânico	Média	DP
1a+1b	Aconítico	170,1	2,5
2	Cítrico	4684,8	196,9
3	Ascórbico	8545,6	438,4
4 + 5	Málico + Quínico	3049,1	221,6
6	Chiquímico	18,3	0,4
7	Fumárico	39,3	0,5
	Σ	16507,1	

^a Resultados expressos sob a forma de média de três determinações, DP, desvio-padrão, Σ, total de compostos determinados.

52% de ácido ascórbico

Caracterização fitoquímica – ácidos orgânicos

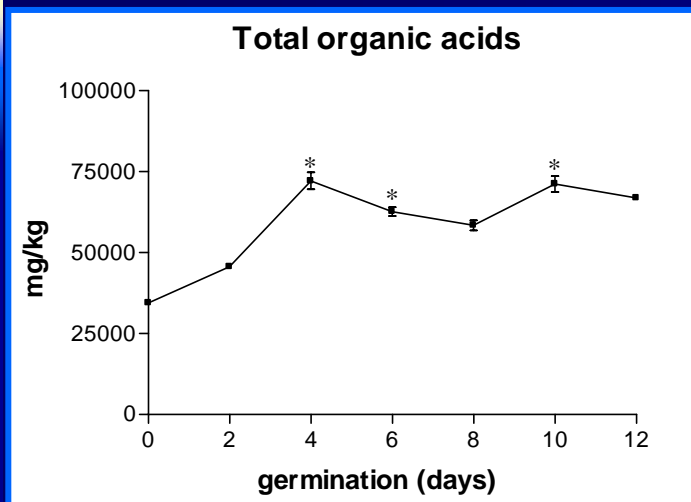
→ Rebentos



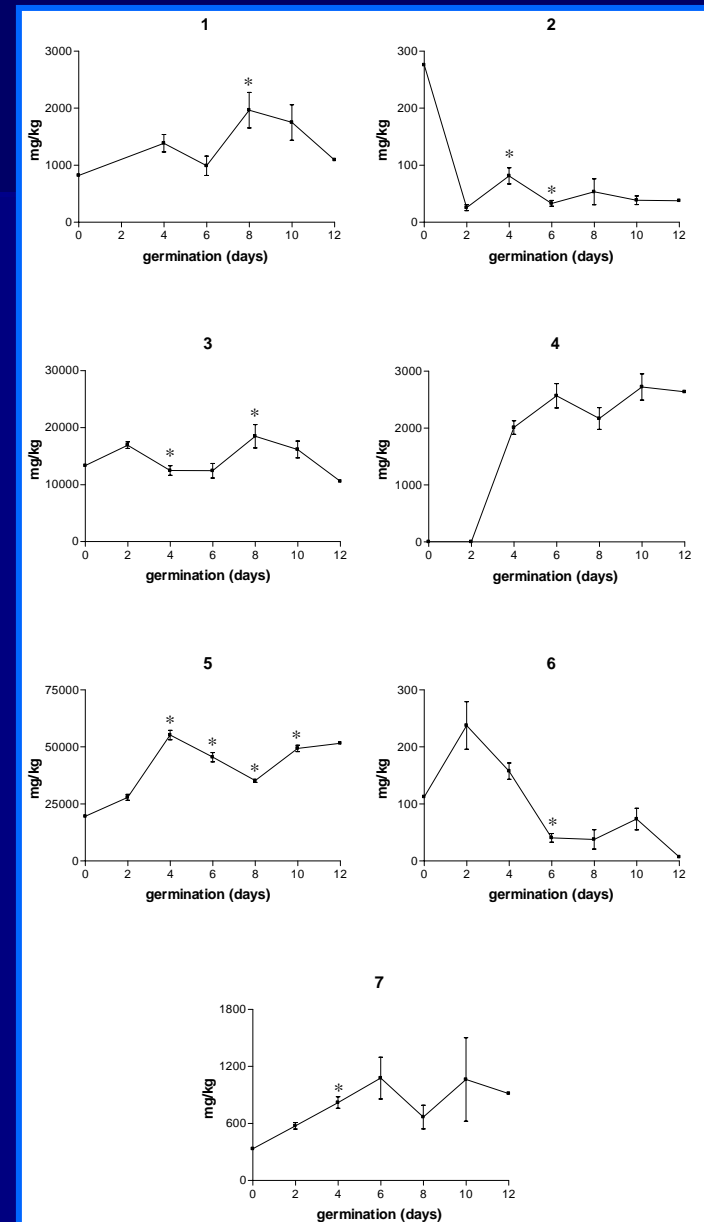
Cromatograma dos ácidos orgânicos dos rebentos de couve tronchuda (2 dias de germinação). Detecção a 214 nm. (1) ácido oxálico; (2a e 2b) isómeros de ácido acético; (3) ácido cítrico; (4) ácido pirúvico; (5) ácido málico; (6) ácido chiquímico; (7) ácido fumárico.

Caracterização fitoquímica – ácidos orgânicos

➔ Rebentos



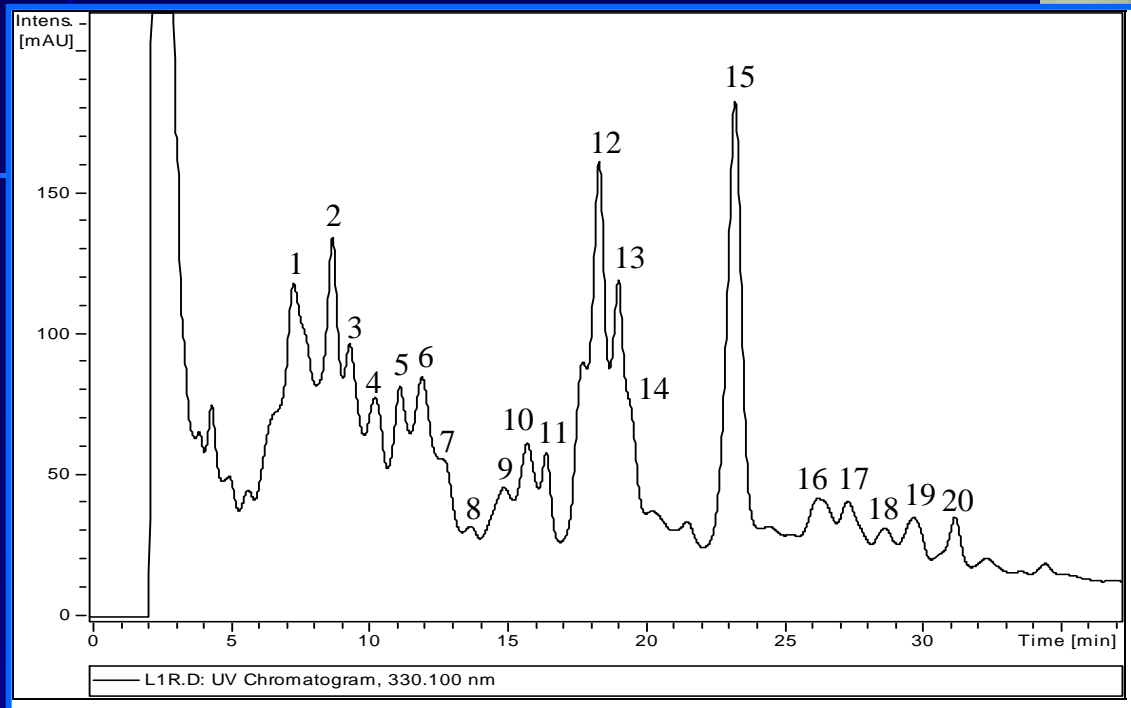
Evolução do teor de ácidos orgânicos dos rebentos de couve tronchuda. (1) ácido oxálico; (2a e 2b) isômeros de ácido aconítico; (3) ácido cítrico; (4) ácido pirúvico; (5) ácido málico; (6) ácido chiquímico; (7) ácido fumárico.



Pieris brassicae como laboratório de síntese de novos compostos com potencial biológico a partir de *Brassica oleracea* var. *costata*, *Brassica oleracea* var. *acephala* e *Brassica rapa* var. *rapa*.

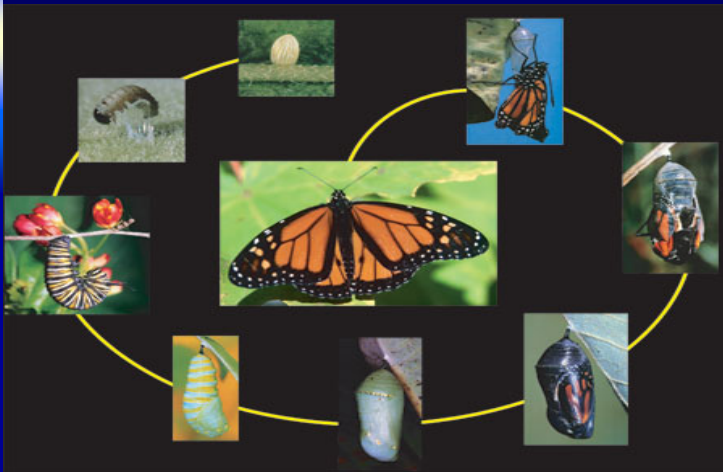


Pieris brassicae vs *Brassica oleracea* var. *costata*



Cromatograma dos compostos fenólicos de *Pieris brassicae*. Detecção a 330 nm. (1) quercetina 3-*O*-soforósido-7-*O*-glucósido; (2) campferol 3-*O*-soforósido-7-*O*-glucósido; (3) campferol 3-*O*-soforósido-7-*O*-soforósido; (4) quercetina-3-*O*-(feruloil)-triglucósido-7-*O*-glucósido; (5) campferol 3-*O*-(sinapoil)-triglucósido-7-*O*-glucósido; (6) campferol 3-*O*-(feruloil)-triglucósido-7-*O*-glucósido; (7) campferol 3-*O*-(*p*-cumaroil)-triglucósido-7-*O*-glucósido; (8) campferol 3-*O*-(metoxicafeoil)-soforósido-7-*O*-glucósido; (9) campferol 3-*O*-(cafeoil)-soforósido-7-*O*-glucósido; (10) quercetina 3-*O*-(*p*-cumaroil)-soforósido; (11) campferol 3-*O*-(*p*-cumaroil)-triglucósido; (12) campferol 3-*O*-(*p*-cumaroil)-soforósido; (13) campferol 3-*O*-(metoxicafeoil)-soforósido; (14) quercetina 3-*O*-soforósido; (15) campferol 3-*O*-soforósido; (16) isómero de campferol 3-*O*-(*p*-cumaroil)-soforósido; (17) campferol-3-*O*-(di-sinapoil)-triglucósido-7-*O*-glucoside; (18) campferol-3-*O*-(feruloil/sinapoil)-triglucósido-7-*O*-glucósido; (19) quercetin-3-*O*-(feruloil)-triglucósido; (20) campferol-3-*O*-glucósido.

Pieris brassicae



Ciclo de vida das borboletas (adaptado de <http://www.geocities.com>).

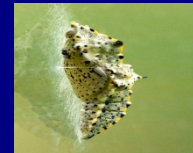
Sequestro
Metabolização
Excreção



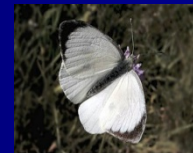
Ovo



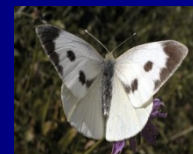
Larva



Crisálida cingulada



Adulto macho



Adulto fêmea

