

Maria de Fátima Gomes Fernandes

**DUO ECOLÓGICO *Pieris brassicae* / *Brassica oleracea*:
PERFIL METABOLÓMICO E ACTIVIDADE BIOLÓGICA**

**Tese de Doutoramento em Ciências Farmacêuticas
especialidade de Fitoquímica e Farmacognosia**

Trabalho realizado sob orientação da
Professora Doutora Paula Cristina Branquinho de Andrade
e co-orientação de
Professora Doutora Patrícia Carla Ribeiro Valentão e
Professor Doutor José Alberto Cardoso Pereira

Setembro de 2011

Aos meus irmãos Johnny, Franco e Nuno Fernandes

Trabalho apoiado financeiramente através da atribuição de uma bolsa de doutoramento (SFRH/BD/37963/2007) pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, no âmbito do POPH - QREN - Tipologia 4.1 - Formação Avançada, participado pelo Fundo Social Europeu e por fundos nacionais do MCTES.



É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO QUE A TAL SE COMPROMETE.

PUBLICAÇÕES

Fazem parte integrante desta dissertação os seguintes trabalhos já publicados:

Publicações em revistas referenciadas no Journal Citation Reports da ISI Web of Knowledge:

1. Ferreres F, **Fernandes F**, Oliveira JMA, Valentão P, Pereira JA, Andrade PB. Metabolic profiling and biological capacity of *Pieris brassicae* fed with kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). Food Chem Toxicol 2009 Jun; 47(6): 1209-20.
2. **Fernandes F**, Guedes de Pinho P, Valentão P, Pereira JA, Andrade PB. Volatile constituents throughout *Brassica oleracea* L. var. *acephala* germination. J Agric Food Chem 2009 Aug; 57(15): 6795-6802.
3. Ferreres F, **Fernandes F**, Sousa C, Guedes de Pinho P, Valentão P, Pereira JA, Andrade PB. Metabolic and bioactivity insights into *Brassica oleracea* var. *acephala*. J Agric Food Chem 2009 Sept; 57(19): 8884-92.
4. **Fernandes F**, Pereira DM, Guedes de Pinho P, Valentão P, Pereira JA, Andrade PB. Metabolic fate of dietary volatile compounds in *Pieris brassicae*. Microchem J 2009 Sept; 93(1): 99-109.
5. **Fernandes F**, Pereira DM, Guedes de Pinho P, Valentão P, Pereira JA, Bento A, Andrade PB. Headspace solid-phase microextraction and gas chromatography/ion trap-mass spectrometry applied to an alive system: *Pieris brassicae* fed with kale. Food Chem 2010 Apr; 119(4): 1681-1693.
6. Ferreres F, **Fernandes F**, Pereira DM, Pereira JA, Valentão P, Andrade PB. Phenolics metabolism in insects: *Pieris brassicae* - *Brassica oleracea* var. *costata* ecological duo. J Agric Food Chem 2009 Oct; 57(19): 9035-9043.
7. **Fernandes F**, Sousa C, Ferreres F, Valentão P, Remião F, Pereira JA, Andrade PB. Does kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) really protects against oxidative stress? Submetido para publicação.

8. Sousa C, **Fernandes F**, Rodrigues S, Coelho M, Ferreres F, Teixeira JP, Guedes P, Valentão P, Andrade PB. Natural antioxidants from aqueous extract of *Pieris brassicae* larvae: mutagenicity / antimutagenicity evaluation. Submetido para publicação.

Capítulos de livros

1. Guedes de Pinho P, Pereira DM, Gonçalves RF, Valentão P, **Fernandes F**, Taveira M, Gomes D, Andrade PB. Head-space-solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry applied to determination of volatiles in natural matrices. In Teixeira da Silva JA, editor. Functional Plant Science & Biotechnology. UK: Global Science Books; 2009. p. 1-15.
2. Taveira M, **Fernandes F**, Valentão P, Ferreres F, Andrade PB. Plant herbivores: bioactive metabolites besides the pest. In Sridhar KR, editor. Aquatic plants and plants diseases. USA: Nova Science Publishers; 2011. p. 117-45.

Comunicações em congressos ou cursos, que foram submetidas a revisão pelas suas Comissões Científicas e ficaram registadas nos respectivos livros de actas

Comunicações orais

1. **Fernandes F**, Ferreres F, Guedes de Pinho P, Pereira DM, Valentão P, Pereira JA, Andrade PB. *Brassicae oleracea* var. *acephala* vs *Pieris brassicae*: Autenticidade e bioactividade. Comunicação efectuada pela própria no **Curso de Autenticidade de Produtos Alimentares**, na sequência de convite. 12 e 13 de Março de 2010. Bragança (Portugal).

Comunicações sob a forma de painel

1. **Fernandes F**, Ferreres F, Oliveira J, Valentão P, Pereira JA, Seabra RM, Andrade PB. Metabolic profiling and biological capacity of *Pieris brassicae* fed with kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). **1º Encontro Nacional de Química Terapêutica – ENQT**. 13 a 15 de Novembro de 2008. Porto (Portugal).
2. **Fernandes F**, Gomes D, Guedes de Pinho P, Valentão P, Pereira JA, Andrade PB. Volatile constituents throughout *Brassica oleracea* L. var. *acephala* germination. **IJUP09 – Second Meeting of Young Researchers of U. Porto**. 25 a 27 de Fevereiro de 2009. Porto (Portugal).
3. **Fernandes F**, Fonseca C, Azevedo H, Carvalho H, Ascensão J, Costa J, Silva J. *Pieris brassicae* / *Brassica oleracea* var. *costata*: an ecological laboratory. **IJUP09 – Second Meeting of Young Researchers of U. Porto**. 25 a 27 de Fevereiro de 2009. Porto (Portugal).
4. **Fernandes F**, Pereira DM, Guedes de Pinho P, Valentão P, Oliveira I, Pereira JA, Andrade PB. Systemic release of volatiles by *Brassica oleracea* var. *acephala* induced by *Pieris brassicae* predation. **50th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy**. 27 de Junho a 1 de Julho de 2009. Honolulu (Havai).
5. **Fernandes F**, Pereira DM, Guedes de Pinho P, Pereira JA, Valentão P, Andrade PB. Metabolic fate of volatiles compounds from diet in *Pieris brassicae*. **42nd IUPAC Congress – Chemistry solutions**. 2 a 7 de Agosto de 2009. Glasgow (Reino Unido).
6. **Fernandes F**, Teixeira JP, Taveira M, Sousa C, Costa S, Coelho P, Valentão P, Remião F, Pereira JA, Andrade PB. *Pieris brassicae* excrements: cytological effects. **ECNIS Workshop on Biomarkers and Cancer**. 21 a 23 de Setembro de 2009. Porto (Portugal).
7. Sousa C, Sebastião Rodrigues A, Coelho M, **Fernandes F**, Pereira D, Ferreres F, Valentão P, Andrade PB. Natural antioxidants from aqueous extract of *Pieris brassicae* larvae: mutagenicity and cytotoxicity evaluation. **ECNIS Workshop on Biomarkers and Cancer**. 21 a 23 de Setembro de 2009. Porto (Portugal).

8. **Fernandes F**, Malheiro R, Andrade PB, Valentão P, Bento A, Pereira JA. A lagarta da couve, *Pieris brassicae* (L.) (Lepidoptera: *Pieridae*), como fonte de compostos com interesse farmacêutico. **VI Congresso Nacional de Entomología Aplicada**. 19 a 23 de Outubro de 2009. Palma de Maiorca (Espanha).
9. Pereira DM, Ferreres F, **Fernandes F**, Pereira JA, Gonçalves RF, Valentão P, Andrade PB. Phenolics metabolism in insects: *Pieris brassicae* - *Brassica oleracea* var. *costata* ecological duo. **6º Encontro Nacional de Cromatografia**. 14 a 16 de Dezembro de 2009. Funchal (Portugal).
10. **Fernandes F**; Ferreres F; Sousa C; Valentão P; Pereira JA; Andrade PB. Insights into *Brassica oleracea* var. *acephala* metabolites and bioactivity. **IJUP'10 – 3rd Meeting of Young Researchers of U. Porto**. 17 a 19 de Fevereiro de 2010. Porto (Portugal).
11. **Fernandes F**, Sousa C, Ferreres F, Valentão P, Pereira JA, Andrade PB. *Pieris brassicae* vs *Brassica oleracea* L. var. *acephala*: Metabolic profiling and biological activity. **1ª Workshop Anual Bioplant**. 29 e 30 de Março de 2010. Porto (Portugal).
12. **Fernandes F**, Sousa C, Ferreres F, Valentão P, Remião F, Pereira JA, Andrade PB. Cell effects of *Pieris brassicae* and host *Brassica oleracea* var. *acephala*. **XXVth International Conference on Polyphenols**. 23 a 27 de Agosto de 2010. Montpellier (França).
13. **Fernandes F**, Sousa C, Moita E, Rodrigues S, Coelho M, Teixeira JP, Silva S, Valentão P, Andrade PB. Aqueous extract of *Pieris brassicae* larvae and cabbage host plant: evaluation of mutagenicity and genotoxicity. **XX Porto Cancer Meeting – “Drug Resistance in Cancer: from biology to molecular targets and drugs”**. 28 e 29 de Abril de 2011. Porto (Portugal).

PRÉMIO

1º prémio do "**BioConcurso II - Fotografia Científica**", com a fotografia "Cometa", obtida no âmbito do trabalho desenvolvido para a tese de doutoramento.

Este concurso foi organizado pela Direcção do Núcleo de Estudantes em Biologia Aplicada, em parceria com o Departamento de Biologia da Universidade do Minho, o Centro de Biologia Molecular e Ambiental (CBMA), e a Sociedade Portuguesa de Vida Selvagem.

A autora declara que participou activamente na recolha e estudo do material incluído em todos os trabalhos, tendo redigido os textos com a activa colaboração dos outros autores.

AGRADECIMENTOS

Ao tornar pública esta dissertação, sinto o dever e a necessidade de aqui expressar o meu profundo agradecimento a todos os que contribuíram para a realização deste trabalho e que de alguma forma me ajudaram a ultrapassar as dificuldades sentidas durante este período da minha formação e da minha vida. É sensibilizada que agradeço reconhecidamente:

À Professora Doutora Paula Cristina Branquinho de Andrade dirijo o mais especial dos agradecimentos. É a si que devo este doutoramento. Antes de tudo, pela orientação desta dissertação. Pela sua enorme capacidade científica e de resolução de problemas. Pelo espírito crítico que muito enriqueceram este trabalho e pelo crescimento científico que me proporcionou. Porque acreditou que eu conseguiria cá chegar, por me ter feito acreditar nisso e, sobretudo, porque tornou isso possível. Por me ter ajudado a ultrapassar as dificuldades que fui encontrando. Pela sua pronta disponibilidade em todas as ocasiões. E por, muito além de minha orientadora, se ter revelado uma amiga. Não esquecerei os bons momentos que passamos nesta qualidade. O meu profundo agradecimento. Muito obrigada.

À Professora Doutora Patrícia Carla Ribeiro Valentão, co-orientadora desta dissertação, pela sua imensa capacidade de trabalho. Expresso o meu reconhecimento e admiração pelos valiosos ensinamentos científicos transmitidos. Por me ter levado e feito interiorizar o conceito do “cada vez melhor”. Pela paciência que teve para me fazer chegar sempre ao melhor “porto”, pelas palavras e atitudes de encorajamento quando as coisas me correram menos bem e a sua pronta colaboração face a todas as minhas dúvidas. O meu profundo agradecimento. Muito obrigada.

Ao Professor Doutor José Alberto Pereira, co-orientador desta dissertação, por ter sido fundamental em determinada altura do meu percurso académico. Pela sua amizade e pelos melhores conselhos que me transmitiu. Por ter sido a minha “estrelinha” e me ter feito chegar ao sítio certo. Muito obrigada.

Ao Professor Doutor Federico Ferreres, do Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), de Murcia, devo-lhe a base deste trabalho. Pela disponibilidade e pelo valioso contributo na identificação dos compostos fenólicos por LC-MS, ponto de partida desta tese de doutoramento. Muito obrigada.

Ao Professor Doutor Jorge Oliveira do Laboratório de Farmacologia pelos conhecimentos transmitidos na elaboração de ensaios farmacológicos desta dissertação e por todos os conselhos que me deu em alturas críticas do meu trabalho.

Ao Laboratório de Toxicologia, nomeadamente ao Professor Doutor Fernando Remião, por ter sempre disponibilizado todos os recursos materiais de que necessitei para a realização da experimentação celular que o meu trabalho exigiu, bem como pela sua ajuda fundamental na interpretação dos resultados que obtive. Agradeço ainda à Professora Doutora Helena Carmo por me ter facultado as células com que realizei todos os ensaios celulares desta dissertação e à Renata Silva pelos conhecimentos e conselhos aos quais frequentemente recorri quando comecei a fazer experimentação celular e, sobretudo pela boa disposição com que começámos os dias de trabalho. A todos, muito obrigada.

Aos vários elementos do Departamento de Saúde Ambiental do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA): ao Doutor João Paulo Teixeira por me ter recebido no seu departamento, pelo acompanhamento que me deu no desenvolvimento dos ensaios de genotoxicidade e pela boa disposição com que sempre me fez encarar o trabalho; à Dra. Susana Silva, à Patrícia Coelho e à Solange Costa, pelos seus ensinamentos que foram fundamentais para o sucesso do meu trabalho, pelos momentos de boa disposição que partilhámos e, sobretudo, pela vossa amizade. A todos, muito obrigada.

Ao Professor Doutor Sebastião Rodrigues, do Departamento de Genética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, pela colaboração na realização dos ensaios de mutagenicidade incluídos nesta dissertação. Muito obrigada.

À Doutora Carla Sousa, pelos conhecimentos transmitidos na elaboração de ensaios celulares desta dissertação. Muito obrigada.

À Doutora Paula Guedes de Pinho, pelos conhecimentos de GC-MS, pelas palavras de incentivo nos momentos menos bons e pela amizade que várias vezes me manifestou. Muito obrigada.

Ao Ivo Oliveira, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança pelo imenso trabalho e dedicação na produção dos diversos materiais de *P. brassicae* objecto de estudo nesta tese de doutoramento e pela colaboração na execução dos trabalhos *in vivo* que realizei com este insecto. Foi uma aventura que valeu a pena. Muito obrigada.

Ao David Pereira, meu colega de doutoramento no laboratório de Farmacognosia, a quem devo a colaboração em trabalhos desta tese de doutoramento. Muito obrigada.

À Andreia Oliveira, ao Marcos Taveira e à Graciliana Lopes meus colegas e amigos do laboratório de Farmacognosia a quem, muito mais do que o companheirismo, os bons momentos e a ajuda que obtive nas alturas mais difíceis que enfrentei nesta etapa da minha vida, devo a amizade, que sei que será para sempre. Não esquecerei cada momento. Muito obrigada.

Aos restantes elementos do laboratório de Farmacognosia Doutor Luís Silva, Rui Gonçalves, Doutora Bárbara Ribeiro, Doutora Clara Grosso, Daniela Gomes, Juliana Vinholes, Brígida Pinho, Maria João Vale-Pereira, Jessica Azevedo e Cristina Almeida pela empatia e o carinho que se estabeleceu e pela boa disposição com que me alegraram tantas vezes. Agradeço sobretudo pela vossa amizade que muito prezo. A todos, muito obrigada.

À Tânia Oliveira, à Carina Moura, à Lisete Soares, à Isabel Ribas e à Carla Pereira agradeço a amizade de longa data. Mesmo ausente, com sucessivas faltas e desencontros, souberam esperar pelo melhor momento, ajustar-se à minha disponibilidade e sobretudo receber-me carinhosamente quando precisei de vós. Muito obrigada.

Aos meus tios maternos António, Maria José, Manuel e Albertina, aos meus avós Margarida e António, à minha tia Alice, bem como à minha prima Manuela, porque tiveram parte activa nesta fase da minha vida que exigiu de mim um enorme esforço, tanto a nível profissional como familiar. Pelas constantes palavras e gestos de afecto e incentivo e pelos excelentes momentos que temos em família. A todos, muito obrigada.

Aos meus tios paternos Olinda e Pedro de quem recebi sempre os melhores conselhos, pelo carinho com que sempre me trataram. Por todas as vezes que me convidaram à vossa companhia e por entenderem de cada vez que, por motivos profissionais ouviram um não. Muito obrigada.

Aos meus primos, Catarina, Renata, Daniela e José António bem como à minha afilhada Luana, agradeço a confiança que em mim depositam e o gosto que sempre me transmitiram em ter-me como vossa prima. É recíproco. Muito obrigada.

Ao Jerónimo Ferreira por completar a minha realização. Pelo apoio e pelos conselhos que me deu, que embora numa etapa final deste percurso, foram fundamentais, mas sobretudo, pelo seu afecto. Muito obrigada.

Aos meus pais, a quem muito devo. Pelo sentido de trabalho e de luta que sempre me inculcaram. Por nunca me terem deixado desistir. Ao meu pai porque sei que na hora exacta faz tudo por mim e, muito especialmente à minha mãe, a quem devo grandes momentos de diversão e companheirismo, agradeço a tolerância por aqueles em que a falta de paciência me tornou amarga e todas as vezes que divertidamente tentou reverter o meu mau humor. Muito obrigada.

À memória do meu irmão Franco (que esteja onde estiver, estou certa de que está a olhar por mim) bem como ao Johnny e ao Nuno, a quem dedico esta tese de doutoramento. Ao Jonny por me ter ajudado a “passar as folhas” e por me fazer sorrir. Ao Nuno, por ter tolerado tantas vezes as minhas frustrações e faltas de paciência mas sobretudo, pelos imensos serões em que me fez companhia. Vocês alegraram cada um dos meus dias e foram a minha motivação quando a angustia se apoderava de mim. São o que de mais importante tenho. Muito obrigada.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia, pelo suporte financeiro através da atribuição da bolsa de doutoramento (SFRH/BD/37963/2007) no âmbito do POPH - QREN - Tipologia 4.1 - Formação Avançada, participado pelo Fundo Social Europeu e por fundos nacionais do MCTES.

RESUMO

RESUMO

As plantas e os insectos são organismos vivos que interagem continuamente de forma complexa. Este trabalho foca as interacções entre *Pieris brassicae* L. e duas plantas hospedeiras: *Brassica oleracea* L. var. *acephala* (couve-galega) e *Brassica oleracea* L. var. *costata* DC (couve tronchuda). A frequência dessa praga nestas culturas justificou a caracterização química e avaliação do potencial biológico tendo em vista a sua possível utilização como fonte de compostos bioactivos, tirando assim partido da infestação.

O perfil metabólico de diversos materiais de *P. brassicae* e das suas plantas hospedeiras foi caracterizado relativamente a compostos fenólicos, ácidos orgânicos e compostos voláteis. Os metabolitos foram determinados usando técnicas de HPLC, com detectores de MS, DAD e UV-vis, e de GC, com detector de MS.

Foram identificados 88 compostos fenólicos, dos quais se destacam derivados de flavonóides, que são glicosilados em C-3 e/ou C-7, havendo ainda compostos acilados nos açúcares da posição 3. A principal genina é o campferol, tendo sido também encontrados derivados de quercetina e de isoramnetina. Foram também identificados ácidos hidroxicinâmicos (*p*-cumárico, ferúlico, cafeico, sinápico e metoxicafeico) na forma livre e/ou de heterósidos. As folhas de couve tronchuda foram a única matriz na qual, além das classes referidas, foram encontrados ésteres de ácidos hidroxicinâmicos com o ácido quínico. Tanto as sementes como as folhas de ambas as plantas hospedeiras são ricas em compostos fenólicos. No perfil fenólico das sementes predominam os derivados dos ácidos hidroxicinâmicos e nas folhas encontram-se maioritariamente derivados de flavonóis. Os excrementos das larvas são o material de *P. brassicae* mais rico nestes metabolitos. As larvas de *P. brassicae* são pobres em compostos fenólicos, estando estes ausentes nas borboletas e exúvias.

As larvas apresentaram compostos fenólicos comuns às plantas hospedeiras, como resultado do seu sequestro e acumulação, e compostos que estão ausentes da planta da qual se alimentou, apontando para a metabolização dos compostos sequestrados, nomeadamente por desglicosilação, desacilação e sulfatação. O mesmo foi verificado com os excrementos. Desta forma observou-se que o perfil fenólico exibido pela *P. brassicae* é condicionado pela planta da qual se alimenta.

Relativamente ao perfil de ácidos orgânicos observou-se uma menor variabilidade de compostos quando comparado com o de compostos fenólicos. Dos 10 ácidos orgânicos identificados apenas os ácidos cítrico, pirúvico e málico são comuns a todas as matrizes estudadas. As sementes de couve-galega e couve tronchuda e as folhas de couve-galega apresentam um perfil semelhante, destacando-se os ácidos cítrico e málico

como maioritários. As larvas de *P. brassicae* alimentadas com couve-galega apresentam uma constituição muito semelhante às da planta hospedeira. Por outro lado, nas borboletas predominam os ácidos cítrico e pirúvico, enquanto nos excrementos os ácido acético e cítrico são os mais abundantes.

Foram identificados 66 compostos voláteis nas sementes, rebentos caulinares e folhas adultas de couve-galega, que incluem álcoois, aldeídos, ésteres, cetonas, norisoprenóides, terpenos, compostos com azoto e compostos com enxofre. Foi possível observar que durante o processo de germinação o perfil de compostos voláteis é alterado: as sementes e os rebentos caulinares apresentam os compostos de enxofre e os azotados como os maioritários, enquanto as folhas adultas são constituídas principalmente por terpenos, álcoois, aldeídos e norisoprenóides.

Atendendo a que a emissão de compostos voláteis constitui uma das primeiras respostas da planta ao ataque por herbívoros, a interacção no duo *P. brassicae* / *B. oleracea* var. *acephala* foi estudada *in vivo*, tendo sido caracterizados 103 metabolitos. A couve-galega mostrou capacidade para se defender quando se sente ameaçada, com uma resposta constitutiva: libertação de compostos que tem armazenados, como o acetato de heptilo, acetato de 2-etilhexilo, *m*-cimeno, *o*-cimeno, *p*-cimeno, *l*-cânfora e longifoleno, na sequência quer do dano mecânico, quer do ataque pela *P. brassicae*. Adicionalmente, é capaz de responder de forma induzida, direccionada ao combate específico da *P. brassicae*, libertando compostos como o hexanal, (*E*)-2-hexenal, acetato de butilo, acetato de pentilo, α,α -di-hidroxiacetofenona, α -tujeno, sabineno e β -pineno. Os terpenos parecem ser os principais compostos envolvidos na defesa da planta, sendo esta a classe de metabolitos que sofreu mais alterações após a predação do insecto.

Por sua vez, a *P. brassicae* revelou-se capaz de sequestrar compostos da couve-galega e de acumular preferencialmente metabolitos que ela própria usa como defesa contra os seus predadores. Adicionalmente, revelou-se capaz de metabolizar compostos sequestrados, levando ao aparecimento de metabolitos como o cumaldeído, linalol, 3-carvomentenona, *p*-etilguaiacol e *p*-vinilguaiacol, que não estavam presentes na planta hospedeira. Tal como se verificou para a couve-galega, os terpenos são a classe maioritária nas larvas e excrementos de *P. brassicae*.

Foi também estudado o perfil em compostos voláteis de extractos aquosos de larvas de *P. brassicae* alimentadas com couve tronchuda, bem como da planta hospedeira. Nestes extractos foram identificados apenas 6 metabolitos, sendo o eugenol aquele para o qual se verificou a maior diferença entre as duas matrizes (um conteúdo 6 vezes superior na planta hospedeira).

Relativamente à avaliação do potencial biológico destas matrizes, foi estudada a sua capacidade antioxidante face a várias espécies reactivas em ensaios químicos,

nomeadamente contra os radicais DPPH, superóxido e óxido nítrico. De uma forma geral os seus extractos demonstram ter uma actividade dependente da concentração. Embora as sementes tenham revelado maior potencial antioxidante do que as folhas, ambos os materiais de couve-galega demonstraram capacidade para interceptar estas espécies. Esta actividade foi mais evidente para o radical superóxido. Dos materiais de *P. brassicae*, as larvas e as borboletas foram aqueles que demonstraram ter um maior potencial antioxidante.

Genericamente, a actividade antioxidante dos materiais de *P. brassicae* foi melhor do que a da couve que lhe serviu de alimento, pelo que se procedeu a um estudo mais aprofundado destas matrizes usando fibroblastos de pulmão de rato (células V79) sujeitos a stress oxidativo provocado pelo peróxido de hidrogénio. Porém, os resultados observados nos sistemas químicos não foram confirmados nos ensaios celulares. De uma maneira geral, os extractos revelaram não só não proteger as células V79, mas também agravar o dano oxidativo para as concentrações mais altas. Assim, o conteúdo em compostos fenólicos destas matrizes parece não lhes oferecer efeito protector.

Atendendo, ainda, a que as larvas de *P. brassicae* alimentadas com couve tronchuda tinham demonstrado anteriormente uma capacidade antioxidante promissora, foi estudada a mutagenicidade e a genotoxicidade de extractos aquosos destas matrizes, através do teste de Ames, do ensaio da hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HPRT) e ensaio do cometa. Estes extractos não revelaram qualquer efeito por si só. Pelo contrário, o extracto de larva de *P. brassicae* revelou capacidade para proteger significativamente as células V79 contra os efeitos genotóxicos do agente mutagénico utilizado (metanossulfonato de metilo) e o de couve tronchuda uma tendência para diminuir a genotoxicidade provocada pelo mesmo.

A capacidade para inibir a acetilcolinesterase foi também avaliada. As sementes de couve tronchuda e de couve-galega revelaram um elevado potencial, superior ao das folhas de couve-galega. Os materiais de *P. brassicae* mostraram ter uma actividade fraca, sendo os excrementos os mais interessantes. Esta diferença de actividade está sobretudo relacionada com a presença de sinapoilcolina nas sementes.

Os vários materiais de *P. brassicae* bem como a couve-galega hospedeira exibiram ainda efeito no músculo liso do intestino, sendo a larva de *P. brassicae* a matriz com maior capacidade de relaxamento. Os excrementos apenas exerceram efeito de contracção.

Assim, a *P. brassicae* constitui uma fonte interessante de compostos bioactivos, alguns deles ausentes das plantas das quais se alimenta e únicos na natureza, de isolamento ou síntese laboratorial difíceis devido à complexidade das suas estruturas, e é

dotada de um potencial biológico que pode ser superior ou distinto do da planta hospedeira.

ABSTRACT

ABSTRACT

Plants and insects are living organisms that continuously interact in a complex way. This work focuses the interactions between *Pieris brassicae* L. and two host plants: *Brassica oleracea* L. var. *acephala* (kale) and *Brassica oleracea* L. var. *costata* DC (tranchuda cabbage). The frequency of that plague in these cultures justified the chemical characterization and the evaluation of the biological potential, having in mind its possible use as source of bioactive compounds, taking profit from the infestation.

The metabolic profile of several *P. brassicae* materials and of the host plants was characterized in terms of phenolics, organic acids and volatile compounds. The metabolites were determined using HPLC techniques, with MS, DAD and UV-vis detectors, and GC with MS detector.

Eighty-eight phenolic compounds were identified. Flavonoids derivatives are highlighted, which comprise compounds glycosylated at C-3 and/or C-7, and compounds acylated in the sugars at 3 position. The main aglycone is kaempferol, being also found quercetin and isorhamnetin derivatives. Hydroxycinnamic acids (*p*-coumaric, ferulic, caffeic, sinapic and methoxy caffeic acids) were detected, in the free form and/or as heterosides. The leaves of tranchuda cabbage were the only material presenting also esters of hydroxycinnamic acids with quinic acid. The seeds and the leaves of both host plants are rich in phenolic compounds. Hydroxycinnamic acids derivatives dominate the phenolic profile of the seeds, while the leaves mainly present flavonoids. In terms of these metabolites, the excrements from the larvae constitute the richest *P. brassicae* material. *P. brassicae* larvae are poor in phenolic compounds, which are absent in the butterflies and exuviae.

The larvae showed phenolic compounds common to the host plants, as result of their sequestration and accumulation, and others that are absent in the feeding plant, pointing to the metabolization of the sequestered compounds, namely by deglycosylation, deacylation and sulfation. The same was observed with the excrements. Thus, the phenolic profile of *P. brassicae* depends on the host plant.

Regarding the organic acids profile, a lower variability was noticed compared to the phenolics one. From the 10 identified compounds, only citric, pyruvic and malic acids are common to all matrices. Kale seeds and leaves and tranchuda cabbage seeds exhibit a similar profile, showing citric and malic acids as major compounds. The larvae of *P. brassicae* fed with kale have a composition close to the host plant. On the other hand, citric and pyruvic acids predominate in the butterflies, while in the excrements acetic and citric acids are the most abundant.

Sixty-six volatile compounds were identified in the seeds, sprouts and adult leaves of kale, which include alcohols, aldehydes, esters, ketones, norisoprenoids, terpenes, and sulfur and nitrogen containing compounds. It was noticed that the volatiles profile changes during the germination process: in seeds and sprouts sulfur and nitrogen containing compounds dominate, while adult leaves mainly present terpenes, alcohols, aldehydes and norisoprenoids.

Considering that volatile compounds emission constitutes one of the first responses of a plant to herbivore attack, the interaction in *P. brassicae* / *B. oleracea* var. *acephala* duo was studied *in vivo*, being characterized 103 metabolites. Kale revealed to defend itself by giving a constitutive response: release of stored compounds, such as heptyl acetate, 2-ethylhexyl acetate, *m*-cymene, *o*-cymene, *p*-cymene, *l*-camphor and longifolene, following either mechanical damage or *P. brassicae* attack. Additionally, it is also able to give an induced response, specifically directed to *P. brassicae*, by releasing compounds like hexanal, (*E*)-2-hexenal, butyl acetate, pentyl acetate, α,α -dihydroxyacetophenone, α -thujene, sabinene and β -pinene. Terpenes seem to be the main compounds involved in plant's defense, exhibiting more variations after insect's predation.

On the other hand, *P. brassicae* revealed to be able to sequester the compounds from kale and to rather accumulate metabolites that it uses as defense against its predators. In addition, it can metabolize the sequestered compounds, originating metabolites like cumaldehyde, linalool, 3-carvomenthenone, *p*-ethylguaiaicol and *p*-vinylguaiaicol, which were not present in kale. As observed with the host plant, terpenes are also the major compounds in *P. brassicae* larvae and excrements.

The volatiles composition of aqueous extracts of *P. brassicae* larvae and tronchuda cabbage host was also studied. Only six compounds were identified in these extracts, which revealed major differences in their eugenol content (six fold higher in the host plant).

Concerning the evaluation of the biological potential of these matrices, their antioxidant capacity was checked in chemical assays against several reactive species, namely DPPH, superoxide and nitric oxide radicals. In a general way, their extracts showed a concentration-dependent activity. Although kale seeds were more effective than its leaves, both vegetal materials scavenged these reactive species, particularly superoxide radical. Among *P. brassicae* materials, the larvae and the butterflies gave the best results.

In a general way, *P. brassicae* materials were more effective than the feeding plant, which prompted us to a deeper study using hamster lung fibroblast (V79 cells) subjected to hydrogen peroxide-induced oxidative stress. However, the results obtained in

the cell-free systems were not confirmed in the cellular model. Generally, the extracts failed to protect V79 cells and aggravated the oxidative damage for the highest concentrations. Thus, the phenolic content of these matrices does not seem to confer a protective effect.

As the larvae of *P. brassicae* fed with tronchuda cabbage had previously shown a promising antioxidant capacity, the mutagenicity and genotoxicity of aqueous extracts of these matrices was checked, by Ames test, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) assay and by comet assay. The extracts did not reveal any effect. Furthermore, the larvae extract significantly protected V79 cells against the genotoxicity induced by the alkylating agent (methyl methane sulfonate), while the one of tronchuda cabbage revealed a tendency for reducing its genotoxicity.

The acetylcholinesterase inhibitory capacity was also evaluated. Kale and tronchuda cabbage seeds displayed a high potential, which was superior to that of kale leaves. *P. brassicae* materials exhibited a weak activity, being the excrements the most interesting ones. The different capacity is mainly related with the presence of sinapoylcholine in the seeds.

P. brassicae materials, as well as kale host, also showed activity on intestinal smooth muscle, with the larvae presenting the stronger relaxation capacity. The excrements evoked only contractions.

Thus, *P. brassicae* constitutes an interesting source of bioactive compounds, some of them absent from its host plants and unique in the nature, hard to be isolated or laboratory-synthesized due to the complexity of their structures, and is endowed with a biological potential that can be superior or distinct from that of the host plant.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL

PUBLICAÇÕES.....	VII
AGRADECIMENTOS	XIII
RESUMO	XIX
ABSTRACT	XXV
ÍNDICE GERAL.....	XXXI
ÍNDICE DE FIGURAS	XXXVII
ÍNDICE DE TABELAS.....	XLIII
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XLVII

1. ESTRUTURA GERAL DA TESE.....	1

PARTE I

2. INTRODUÇÃO.....	5
2.1. Introdução geral	5
2.2. Lepidoptera.....	6
2.2.1. Ciclo de vida	7
2.2.2. <i>Pieris brassicae</i>	7
2.3. Espécies hospedeiras	9
2.3.1. <i>Brassica oleracea</i>	9
2.3.1.1. <i>Brassica oleracea</i> var. <i>costata</i>	10
2.3.1.2. <i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>	11
2.4. Interação insecto-planta	13
2.4.1. Compostos envolvidos.....	15
2.4.1.1. Glucosinolatos	15
2.4.1.1.1. Biossíntese	16
2.4.1.1.2. Relação com insectos	16
2.4.1.2. Carotenóides	17
2.4.1.2.1. Biossíntese	17
2.4.1.2.2. Relação com insectos	19
2.4.1.3. Compostos fenólicos	19
2.4.1.3.1. Ácidos cinâmicos	20
2.4.1.3.1.1. Biossíntese	20

2.4.1.3.1.2. Sinapoilcolina	25
2.4.1.3.2. Flavonóides	25
2.4.1.3.2.1. Biossíntese	28
2.4.1.3.3. Relação com insectos	28
2.4.1.4. Compostos voláteis	34
2.4.1.4.1. Derivados de ácidos gordos – Via lipoxigenase	38
2.4.1.4.2. Compostos de azoto e de enxofre	40
2.4.1.4.3. Terpenos	42
2.4.1.4.4. Norisoprenóides	44
2.4.1.5. Ácidos orgânicos	45
2.4.1.5.1. Relação com insectos	46
2.4.2. Sistema <i>Pieris brassicae/Brassica</i> spp	46
2.5. Caracterização do perfil metabólico	47
2.5.1. Compostos fenólicos	48
2.5.1.1. Separação de compostos por HPLC	48
2.5.1.2. Detecção	49
2.5.1.2.1. Espectros de UV de ácidos cinâmicos	50
2.5.1.2.2. Espectros de UV de flavonóides	51
2.5.1.2.3. Espectrometria de massa	52
2.5.1.2.4. Métodos auxiliares	53
2.5.2. Compostos voláteis	54
2.5.2.1. Extracção	54
2.5.2.2. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa	55
2.5.3. Ácidos orgânicos	56
2.6. Actividades biológicas	56
2.6.1. Actividade antioxidante	57
2.6.1.1. Stress oxidativo	57
2.6.1.2. Avaliação do potencial antioxidante	60
2.6.2. Inibição da acetilcolinesterase	61
2.6.3. Genotoxicidade e mutagenicidade	62
3. OBJECTIVOS DA DISSERTAÇÃO	65

PARTE II

4.	SECÇÃO EXPERIMENTAL	69
4.1.	Metabolic profiling and biological capacity of <i>Pieris brassicae</i> fed with kale (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i>)	69
4.2.	Phenolics metabolism in insects: <i>Pieris brassicae</i> - <i>Brassica oleracea</i> var. <i>costata</i> ecological duo.....	83
4.3.	Metabolic and bioactivity insights into <i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i> ..	95
4.4.	Headspace solid-phase microextraction and gas chromatography/ion trap-mass spectrometry applied to an living system: <i>Pieris brassicae</i> fed with kale.....	107
4.5.	Metabolic fate of dietary volatile compounds in <i>Pieris brassicae</i>	123
4.6.	Volatile constituents throughout <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i> germination.....	139
4.7.	Does kale (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>) really protects against oxidative stress?.....	149
4.8.	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>costata</i> and <i>Pieris brassicae</i> aqueous extracts reduce methyl methane sulfonate-induced DNA damage in V79 hamster lung fibroblasts	193

PARTE III

5.	DISCUSSÃO INTEGRADA	221
5.1.	Perfil metabólico do sistema <i>Pieris brassicae</i> / <i>Brassica oleracea</i>	221
5.1.1.	Compostos fenólicos.....	222
5.1.1.1.	Flavonóis	231
5.1.1.2.	Derivados de ácidos hidroxicinâmicos	238
5.1.1.3.	Metabolização de compostos fenólicos pela <i>P. brassicae</i>	239
5.1.1.4.	Algumas considerações sobre os cromatogramas obtidos	244
5.1.1.5.	Quantificação.....	245
5.1.2.	Compostos voláteis.....	255
5.1.2.1.	Reacção da planta hospedeira	256
5.1.2.2.	Metabolismo da <i>P. brassicae</i>	258
5.1.2.3.	Evolução do perfil de compostos voláteis no processo germinativo.....	263

5.1.3. Ácidos orgânicos	265
5.2. Actividade biológica do sistema <i>Pieris brassicae/Brassica oleracea</i>	270
5.2.1. Actividade Antioxidante	270
5.2.1.1. Sistemas químicos	271
5.2.1.1.1. DPPH	272
5.2.1.1.2. Radical anião superóxido.....	274
5.2.1.1.3. Óxido nítrico	276
5.2.1.2. Sistema celular.....	278
5.2.1.2.1. Protecção contra o stress oxidativo	282
5.2.2. Genotoxicidade e mutagenicidade	285
5.2.3. Inibição da acetilcolinesterase	289
5.2.4. Efeito no músculo liso	291
6. CONCLUSÕES	294
PARTE IV	
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	299

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida da <i>P. brassicae</i> desde o ovo (a) ao estado adulto (e), passando pelas fases de larva (b), produtoras de excrementos (c), e de pupa (d), e estado da folha hospedeira no momento do ataque pelo herbívoro (f) e após predação (g)	8
Figura 2. Estrutura química dos glucosinolatos mais importantes da couve tronchuda... ..	10
Figura 3. Estrutura química do campferol com substituintes nos hidroxilos dos carbonos 3 e 7	11
Figura 4. Estrutura química dos ácidos (A) linoleico e (B) α -linolénico.....	12
Figura 5. Estrutura geral dos glucosinolatos. R: cadeia lateral variável - substituintes alifáticos, aromáticos ou heterocíclicos	15
Figura 6. Via biossintética dos carotenóides e terpenos. Abreviaturas: HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA; IPP, isopentenilo pirofosfato; DMAPP, dimetilalilo pirofosfato; GPP, geranilo pirofosfato; FPP, farnesilo pirofosfato; GGPP, geranilgeranilo pirofosfato; HPL, hidroperóxido liase [adaptada de (1)]	18
Figura 7. Estrutura química dos carotenóides característicos das borboletas de lepidópteros.....	19
Figura 8. Representação esquemática da biossíntese de compostos fenólicos [adaptada de (1)].....	22
Figura 9. Representação esquemática da via biossintética dos fenilpropanóides nas plantas. Abreviaturas: PAL, fenilalanina amónia liase; C4H, cinamato 4-hidroxilase; 4CL, 4-cumarato:coenzima A ligase; C3H, <i>p</i> -cumarato 3-hidroxilase; CCOMT, cafeoil coenzima A O-metil-transferase; CCR, cinamoil CoA redutase; CAD, cinamoil álcool desidrogenase; EOMT, eugenol O-metil-transferase [adaptada de (2)]	24
Figura 10. Estrutura química da sinapoilcolina	25

Figura 11. Estrutura química geral e esquema de numeração de flavonóides.....	25
Figura 12. Estrutura dos principais grupos de flavonóides	26
Figura 13. Representação esquemática da via biossintética dos flavonóides. Abreviaturas: 4CL, 4-Cumarato:coenzima A liase; CHS, chalcona sintetase; CHI, chalcona isomerase	28
Figura 14. Estrutura química da isoramnetina, campferol e quercetina	32
Figura 15. Interações entre as plantas e os insectos	36
Figura 16. Larva de <i>P. brassicae</i> parasitada com <i>C. glomerata</i> (a); <i>C. glomerata</i> (b).....	38
Figura 17. Via Lipoxigenase. Abreviaturas: AAT, álcool aciltransferase; ADH, álcool desidrogenase; AER, alceno óxido redutase; AOC, alceno óxido ciclase; AOS, alceno óxido sintetase; LOX, lipoxigenase; 3Z,2E-EI, 3Z,2E-enal isomerase; HPL, hidroperoxidase liase [adaptada de (1)]	39
Figura 18. Representação esquemática da quebra dos glucosinolatos. R dependente do aminoácido precursor [adaptada de (1)].....	41
Figura 19. Representação esquemática da biossíntese dos vários isoprenóides. Abreviaturas: IPP, isopentenilo pirofosfato; DMAPP, dimetilalilo pirofosfato; GPP, Geranilo pirofosfato; FPP, Farnesilo pirofosfato; GGPP, geranilgeranilo pirofosfato [(adaptada de (2)	43
Figura 20. Produtos da quebra oxidativa do β -caroteno [adaptada de (2)]	45
Figura 21. Representação esquemática da formação das várias espécies reactivas. Abreviaturas: PHS, prostaglandina H sintetase; LPO, lipoxigenase; G-6-P, glucose-6- fosfato; SOD, superóxido dismutase; GSH, glutathiona reduzida; GSSG, glutathiona oxidada.....	58
Figura 22. Ensaio <i>in vitro</i> que podem ser usados para aferição da citotoxicidade e parâmetros biológicos avaliados. GLU: glucose; MTT, brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]- 2,5-difeniltetrazólio; CVDE, eluição de corante cristal violeta; SRB, sulforrodamina B;	

LDHe, lactato desidrogenase extracelular; NR, vermelho neutro; PAC, actividade lisossómica	61
Figura 23. Hidrólise da acetilcolina por acção da acetilcolinesterase (AChE)	62
Figura 24. Padrão de substituição dos compostos fenólicos nos extractos dos materiais de <i>P. brassicae</i> (larva e seus excrementos) e das suas plantas hospedeiras	230
Figura 25. Possíveis transformações metabólicas dos flavonóides pela <i>P. brassicae</i> [adaptada de (1)]	243
Figura 26. Derivados de ácidos hidroxicinâmicos e de flavonóis nas matrizes estudadas (mg/kg)	247
Figura 27. Derivados de campferol, quercetina e isoramnetina nas folhas de couve-galega e de couve tronchuda (mg/kg)	248
Figura 28. Heterósidos flavonólicos acilados nas folhas de couve-galega e de couve tronchuda (mg/kg)	248
Figura 29. Derivados de campferol, quercetina e isoramnetina nos excrementos de larva de <i>P. brassicae</i> alimentada com couve-galega (A) e com couve tronchuda (B) (mg/kg) .	250
Figura 30. Heterósidos flavonólicos acilados e não acilados em folhas de couve-galega e de couve tronchuda e nos excrementos de <i>P. brassicae</i> alimentada por estas (mg/Kg)	251
Figura 31. Comparação da composição fenólica dos extractos aquoso e metanólico de (A) folhas de couve-galega hospedeira, (B) larva e (C) excrementos de <i>P. brassicae</i>	252
Figura 32. Heterósidos flavonólicos acilados e não acilados em extractos metanólicos de folhas de couve-galega hospedeira e de excrementos de <i>P. brassicae</i>	253
Figura 33. Representação esquemática da determinação de compostos voláteis de larvas de <i>P. brassicae</i> e da sua planta hospedeira <i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> <i>in vivo</i> , por HS-SPME/GC-MS	255

Figura 34. Possíveis mecanismos de metabolização de compostos voláteis da couve-galega pela <i>P. brassicae</i>	261
Figura 35. Evolução do perfil de compostos voláteis da couve-galega no início do processo de germinação. A linha pontuada corresponde à composição da planta adulta.....	264
Figura 36. Ácidos orgânicos nas sementes de couve-galega (A) e de couve tronchuda (B)..	266
Figura 37. Ácidos orgânicos nos diversos materiais de <i>P. brassicae</i> e na planta hospedeira.....	266
Figura 38. Reacção de intercepção do radical DPPH. AH: antioxidante.....	272
Figura 39. Produção e detecção da sequestração de $O_2^{\cdot -}$	275
Figura 40. Determinação de nitrito pela reacção de Griess.....	277
Figura 41. Representação esquemática do ensaio de redução do MTT.....	279
Figura 42. Representação esquemática do ensaio de determinação de LDHe.....	280
Figura 43. Representação esquemática do ensaio de determinação da glutathiona. DTNB: ácido 5,5'-ditiois-2-nitrobenzóico; GSH: glutathiona reduzida; GSSG: glutathiona oxidada; TNB: ácido 5-tio-2-nitrobenzóico; NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina.....	281
Figura 44. Representação esquemática do teste de Ames com activação Metabólica.....	286
Figura 45. Representação esquemática do ensaio do cometa.....	288
Figura 46. Representação esquemática do ensaio de inibição da acetilcolinesterase.....	290
Figura 47. Montagem dos segmentos de intestino de rato para avaliação das alterações longitudinais no comprimento do músculo intestinal.....	292

ÍNDICE DE TABELAS

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Compostos fenólicos identificados nas várias matrizes estudadas.....	223
Tabela 2. Heterósidos fenólicos encontrados nas matrizes estudadas.	232
Tabela 3. Conteúdo em compostos fenólicos (mg/Kg, peso seco) de todos os extractos estudados	245
Tabela 4. Ácidos orgânicos nos extractos aquosos de borboleta, larva e excrementos de <i>P. brassicae</i> e de folhas da couve-galega hospedeira.....	267
Tabela 5. Ácidos orgânicos nos extractos aquosos das sementes de couve-galega e de couve tronchuda.....	267
Tabela 6. Actividade antioxidante de <i>P. brassicae</i> e da planta hospedeira (µg/mL)	271
Tabela 7. Inibição da AChE pelos materiais de <i>P. brassicae</i> , folhas e sementes da couve-galega hospedeira.....	290
Tabela 8. Actividade dos vários materiais de <i>P. brassicae</i> e das folhas da couve-galega hospedeira no músculo liso de intestino de rato	292

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\cdot\text{NO}_2$	Radical dióxido de azoto
$\cdot\text{NO}$	Radical óxido nítrico
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxilo
$^1\text{O}_2$	Oxigénio singleto
2-VP	2-Vinilpiridina
4CL	4-Cumarato:coA ligase
4CL	4-Cumarato:coenzima A liase
6-TG	6-Tioguanina
AAT	Álcool aciltransferase
AChE	Acetilcolinesterase
ADH	Álcool desidrogenase
AOC	Aleno óxido ciclase
AOS	Aleno óxido sintase
C3H	<i>p</i> -Cumarato 3-hidroxilase
CAD	Cinamoil álcool desidrogenase
CAT	Catalase
CCD	Carotenóide dioxigenase
CCO	Carotenóide oxigenase
CCOMT	Cafeoil coenzima A <i>O</i> -metil-transferase
CCR	Cinamoil CoA redutase
CH4	Cinamato 4-hidroxilase
CHI	Chalcona isomerase
CHS	Chalcona sintetase
CoA	Coenzima A
CVDE	Eluição de corante cristal violeta
DA	Doença de Alzheimer

DAD	Detector de matriz de díodos
DAHP	3-Desoxi-arabino-heptulosonato-7-fosfato
DMAPP	Dimetilalilo pirofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1- difenil-2-picrilhidrazilo
DTNB	ácido 5,5'-Ditiobis-2-nitrobenzóico
EOMT	Eugenol O-metil-transferase
ERA	Alceno óxido redutase
FPP	Farnesilo pirofosfato
G-6-P	Glucose-6-fosfato
GC	Cromatografia gasosa
GGPP	Geranilgeranilo pirofosfato
GLU	Glucose
GPP	Geranilo pirofosfato
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione redutase
GS [•]	Radical glutathionil
GSH	Glutathione reduzida
GSH _t	Glutathione total
GSSG	Glutathione oxidada
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HCT	Hidroxicinamoiltransferase
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
HOCl	Ácido hipocloroso
HPL	Hidroperóxido liase
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase

HS	Espaço de cabeça
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50% da reacção
IPP	Isopentenilo pirofosfato
JA	Ácido jasmónico
LC	Cromatografia líquida
LC-DAD	Cromatografia líquida acoplada a detector de matriz de díodos
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
LDH	Lactato desidrogenase
LDHe	LDH extracelular
LOX	Lipoxigenase
<i>m/z</i>	Relação massa/carga dos fragmentos iónicos formados
MeJA	Metil jasmonato
MeSA	Salicilato de metilo
MMS	Metanossulfonato de metilo
MS	Espectrometria de massa
MS ²	Espectro de massa da fragmentação do ião molecular desprotonado
MS ³	Espectro de massa da quebra dos fragmentos mais significativos derivados de [M-H] ⁻
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
nm	Nanómetros
NO ⁺	Ião nitrosónio
NO ₂ ⁺	Ião nitrónio
NOS	Sintetases do óxido nítrico
NR	Vermelho neutro
NSP	Proteína específica de nitrilos
O ₂ ^{•-}	Radical anião superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito

ONOOH	Ácido peroxinitroso
PAC	Actividade lisossómica
PAL	Fenilalanina amónia liase
PAPS	3'-Fosfofadenosina-5'-fosfossulfato
PHS	Prostaglandina H sintetase
RNS	Espécies reactivas de azoto
RO [•]	Radical alcoxilo
ROO [•]	Radical peroxilo
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
SOD	Superóxido dismutase
SPME	Microextracção em fase sólida
SRB	Sulforrodamina B
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzónico
UDP-glucose	Uridinadifosfoglucose
UV	Ultra-violeta
Vis	Visível
XO	Xantina oxidase

ESTRUTURA GERAL

1. ESTRUTURA GERAL DA TESE

A presente dissertação encontra-se dividida em quatro partes principais.

PARTE I – Introdução e objectivos da dissertação

Neste capítulo faz-se uma introdução aos temas que foram objecto de estudo desta dissertação. O desenvolvimento de cada tema é feito de uma forma geral, sendo aprofundados os aspectos mais importantes para a interpretação dos resultados obtidos que se encontram na secção experimental. No final do capítulo são enumerados os principais objectivos da dissertação.

PARTE II- Secção experimental

Esta secção encontra-se dividida em oito capítulos, correspondendo aos artigos, publicados ou submetidos, que contêm os resultados obtidos no âmbito desta dissertação.

PARTE III – Discussão integrada e conclusões

Esta secção integra os resultados dos diferentes trabalhos e tenta relacioná-los com os trabalhos existentes que abordam assuntos semelhantes.

As conclusões a que os trabalhos realizados permitiram chegar encontram-se sumariadas neste capítulo.

PARTE IV – Referências bibliográficas

A bibliografia necessária à elaboração desta dissertação encontra-se nesta última secção.

PARTE I

INTRODUÇÃO

OBJECTIVOS

2. INTRODUÇÃO

2.1. Introdução geral

As plantas e os insectos constituem aproximadamente metade do total de espécies conhecidas de organismos multicelulares. Estes organismos têm evoluído juntos há mais de cem milhões de anos, com diversos níveis de interacção que conduziram à selecção de indivíduos que são hoje estudados em todos os ramos da biologia, da bioquímica, genética e da ecologia (1, 3).

Os herbívoros, especialmente os insectos na sua forma larvar, representam o maior desafio para as plantas no seu ambiente natural e o estudo das relações que se estabelecem entre eles assume uma importância ecológica fundamental. Os insectos não podem existir na ausência de plantas verdes que constituem a sua fonte primária de compostos ricos em energia. Esta estreita relação com as plantas, e a consequente co-evolução tem sido, supostamente, a principal causa do desenvolvimento de uma grande diversidade no reino vegetal (4). Contudo, esta relação nem sempre é benéfica para ambas as partes. O ataque dos insectos pode ser de tal forma prejudicial para as plantas que as pode conduzir à morte (5, 6). Desta forma as plantas desenvolveram vários mecanismos de defesa de modo a evitar ou diminuir o ataque por parte dos herbívoros. Por outro lado, como consequência da co-evolução, os insectos desenvolveram várias estratégias para ultrapassar as barreiras de defesa impostas pelas plantas, permitindo-lhes a alimentação, o crescimento e a sua reprodução nas plantas hospedeiras (3). Assim, os insectos fitófagos criaram vários mecanismos de protecção, como selecção das partes da planta que contêm quantidades mínimas de compostos de defesa para sua alimentação (7), o desenvolvimento de lúmens intestinais que são impermeáveis aos compostos aleloquímicos, permitindo uma rápida excreção (8), destoxificação de metabolitos de plantas que lhes são tóxicos (9), acumulação, modificação ou até concentração de compostos de defesa para seu benefício (10). No caso da acumulação, os compostos das plantas são sequestrados pelos herbívoros e armazenados em partes específicas do tecido do seu corpo ou no tegumento (11). Todos estes mecanismos de adaptação e interacção serão abordados mais pormenorizadamente nas secções seguintes.

A interacção entre os insectos e as suas plantas hospedeiras tem sido um dos temas mais estudados no campo da ecologia, facto justificável pelo seu interesse em todos os ecossistemas e a sua importância económica. Além disso, os insectos podem também constituir uma fonte de compostos químicos naturais interessantes, muitos deles diferentes dos encontrados nas suas plantas hospedeiras. Deste modo, esta tese irá

focar o potencial dos insectos como fonte de compostos bioactivos e as suas relações com as suas plantas hospedeiras.

2.2. Lepidoptera

Nos estudos que envolvem a interacção insecto-planta é fundamental a caracterização de todos os elementos envolvidos no sistema biológico. Nesta tese é estudada a interacção entre a *Pieris brassicae* L. e duas variedades de *Brassica oleracea* L..

Os lepidópteros, designados vulgarmente por borboletas, pertencem ao grande grupo taxonómico dos artrópodes. O nome provém do grego e alude à presença de escamas sobrepostas nas asas, uma das características mais notáveis destes insectos, conferindo-lhes múltiplos padrões de coloração (12). Este é um dos grupos mais evoluídos e diversificados em todo o mundo.

Estes insectos têm o corpo dividido em cabeça, tórax e abdómen. Na cabeça têm um par de antenas, um par de olhos formados por várias lentes e a boca, com uma forma específica usada para sugar o néctar das flores. No tórax têm seis patas e em geral dois pares de asas. No abdómen encontram-se os órgãos vegetativos e reprodutivos (12).

Os lepidópteros são vulgar e empiricamente divididos em dois grupos: ropalóceros (as borboletas diurnas) e os heteróceros (as traças ou borboletas nocturnas). De um modo geral são incluídas no primeiro grupo as borboletas coloridas que voam durante o dia e no segundo as borboletas com tons menos apelativos que voam durante a noite, as chamadas traças. Os indivíduos das famílias com origem mais primitiva são diurnos. Muitos destes lepidópteros terão posteriormente adquirido hábitos nocturnos, em consequência da intensa predação. As borboletas têm servido como organismos modelo para um grande número de estudos ecológicos e biológicos, muito maior do que os estudos com traças. O facto de se tratar de borboletas diurnas, que estão activas durante o dia, torna o seu estudo mais fácil do que com traças nocturnas (3).

2.2.1. Ciclo de Vida

Os lepidópteros distinguem-se dos outros insectos pela sua metamorfose completa. Esta engloba quatro estádios de desenvolvimento: ovo, larva, crisálida ou pupa e insecto adulto. Contrariamente à maioria dos animais, os estados imaturos apresentam uma morfologia e um comportamento muito diferentes do insecto adulto (12).

No caso das borboletas, o ovo dá origem a uma larva, um animal fusiforme, sem qualquer apêndice alar nem escamas. Neste estágio o único objectivo do insecto é o de obter do meio a energia necessária para alcançar o estágio seguinte. O estado de pupa caracteriza-se por uma morfologia extremamente simples, pois o animal não possui nenhum membro destinado à locomoção, nem órgãos de visão ou quaisquer apêndices funcionais (12).

O desenvolvimento da larva começa imediatamente após a fecundação e a sua duração varia segundo a espécie e o clima. Em geral, oscila entre dez e vinte dias. O tegumento quitinoso da larva não é extensível, de forma que a larva ao crescer tem de mudar de pele. Esta mudança de pele tem o nome de ecdise. Sob a pele “velha” cresce uma nova, maior e mais flexível. A ecdise é desencadeada a nível hormonal e a larva extrai a cabeça, rasga ao meio a pele velha e deixa-a para trás. Com cada ecdise modifica-se também o aspecto da larva. A pele velha acaba por ser devorada pela larva. O período entre mudas designa-se por “instar”. Assim que atingem a maturidade as larvas suspendem a alimentação e procuram um local adequado para continuarem o seu processo de metamorfose, transformando-se em crisálida e posteriormente em insecto adulto (12).

2.2.2. *Pieris brassicae*

A *P. brassicae* (Lepidoptera:Pieridae) é conhecida vulgarmente por borboleta branca da couve. É um insecto cujas larvas, especialistas em crucíferas, constituem uma peste frequente de algumas espécies da família Brassicaceae, tais como *Brassica oleracea* L. var. *botrytis*, *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC, *Brassica oleracea* L. var. *costata* DC, *Brassica rapa* L. var. *rapa* e, mais raramente, *Brassica oleracea* L. convar. *capitata* e *Raphanus sativus* L. var. *sativus*, enquanto o adulto se alimenta do néctar de várias plantas (13). A distribuição geográfica deste lepidóptero estende-se desde a Europa de Leste até à Ásia. Nas regiões mediterrânicas a espécie tem quatro a cinco gerações por ano (12).

O seu ciclo de vida dura cerca de 45 dias, desde o ovo ao insecto adulto (Figura 1) (13). A fêmea deposita ovos alongados, estriados e amarelos, em grupos de 20 a 50, na parte inferior das folhas. Entre seis a dez dias após a oviposição eclodem as larvas verde-amareladas, com riscas negras. Inicialmente vivem em colónias, agrupadas de forma muito próxima enquanto consomem a epiderme da folha. Após a segunda muda, apesar de confinadas à mesma planta, as larvas espalham-se pelas folhas em grupos de quatro ou cinco indivíduos e tornam-se extraordinariamente vorazes. Após a fase de pupa o adulto emerge, possuindo asas brancas com cerca de 40 a 60 mm. A fêmea distingue-se pela presença de duas manchas negras isoladas nas asas anteriores, enquanto o macho não possui manchas (12, 13).

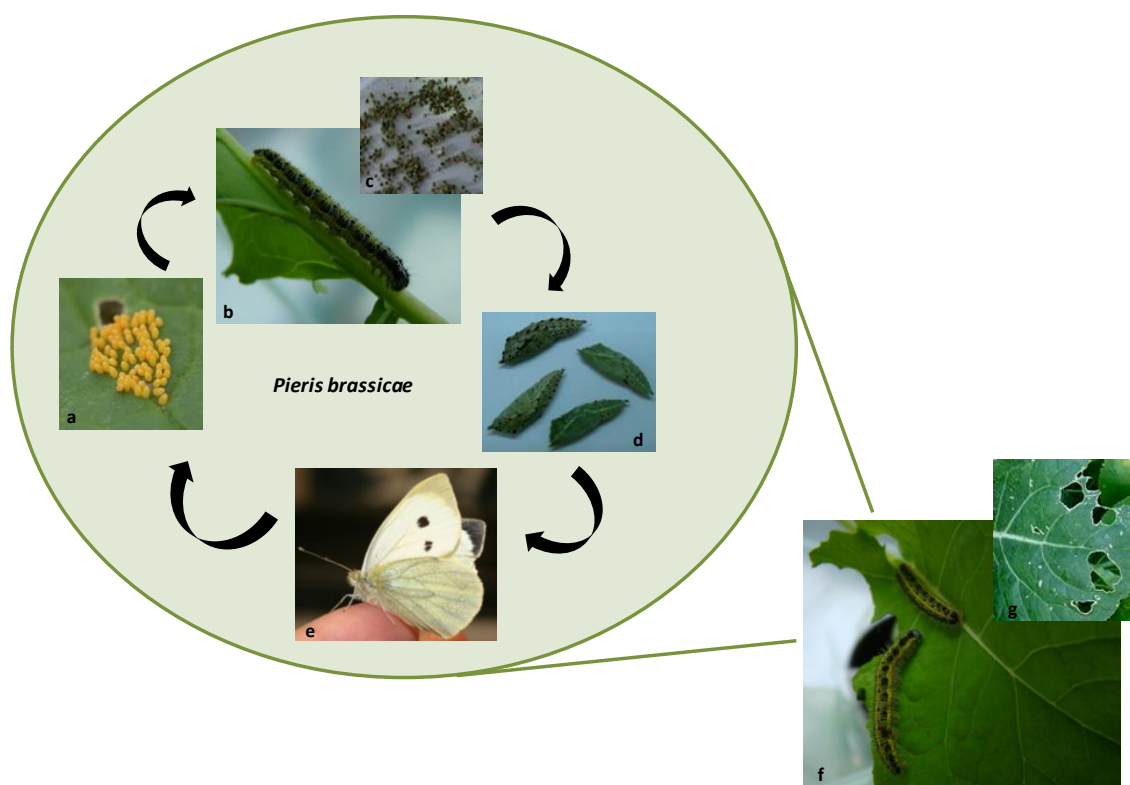


Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida da *P. brassicae* desde o ovo (a) ao estado adulto (e), passando pelas fases de larva (b), produtoras de excrementos (c), e de pupa (d), e estado da folha hospedeira no momento do ataque pelo herbívoro (f) e após predação (g).

2.3. Espécies hospedeiras

Tal como referido anteriormente, no estudo de interacção insecto-planta é também fundamental o conhecimento da sua planta hospedeira. A escolha da planta que irá servir de alimento aos lepidópteros depende de múltiplos factores, como a disponibilidade de plantas na área geográfica e ecológica em causa. A selecção incorrecta do local de oviposição pelo imago (designação da forma definitiva dos lepidópteros) pode levar à morte da larva por falta de alimento. Adicionalmente, as características estruturais das plantas também influenciam essa relação, limitando muitas vezes a aceitabilidade dos herbívoros (14).

Em relação ao seu regime alimentar os insectos podem ser definidos como:

- Polípagos ou generalistas, quando possuem padrões alimentares não selectivos;
- Oligófagos, com padrões alimentares específicos de uma certa família;
- Monófagos, quando se alimentam de uma ou duas espécies relacionadas.

Estes dois últimos casos também se designam como insectos especialistas (6).

A *P. brassicae*, objecto de estudo desta tese, é um herbívoro especialista das crucíferas, sendo uma das principais causas de perda destas culturas (13).

2.3.1. *Brassica oleracea*

A família Brassicaceae inclui uma ampla variedade de produtos hortícolas, alguns dos quais com elevada importância económica, muito utilizados na dieta alimentar (15). As variedades da espécie *B. oleracea* fornecem um elevado teor de minerais, vitaminas (principalmente A, C, E e K), ácido fólico, cálcio, potássio magnésio, fósforo e fibras (16, 17). Do ponto de vista nutricional, apresentam um baixo teor de gordura e de calorias. Sabe-se que as crucíferas são também uma fonte de compostos bioactivos, tais como os compostos fenólicos, carotenóides e glucosinolatos (16, 17), estando amplamente descritos os efeitos benéficos associados ao seu consumo (16, 18-21).

Para os estudos desenvolvidos no âmbito desta tese, a *P. brassicae* foi alimentada com duas variedades de *B. oleracea*, a *B. oleracea* var. *acephala* e *B. oleracea* var. *costata*, as quais serão descritas mais detalhadamente nas secções seguintes.

2.3.1.1. *Brassica oleracea* var. *costata*

A couve tronchuda (*B. oleracea* var. *costata*) é nativa do Mediterrâneo e do sudoeste da Europa, sendo considerada uma cultivar primitiva. É caracterizada pelos caules curtos e grossos, com folhas e nervuras largas. Em termos agrícolas, esta couve proporciona produções elevadas de biomassa, é pouco susceptível a pragas e doenças, adapta-se facilmente a uma grande variedade de condições climáticas e tem um ciclo de crescimento curto (18, 22).

A sua composição em açúcares é variada, sendo a frutose e a glucose os açúcares maioritários (23). Esta couve é caracterizada também por um elevado teor em proteínas e sais minerais (Ca, Mg, P, K, S, Fe, Mn e Zn) (24).

É também uma espécie rica em ácidos orgânicos, nomeadamente em ácidos oxálico, aconítico, cítrico, málico, ascórbico, quínico, pirúvico, chiquímico e fumárico (18, 25-30). O seu perfil de aminoácidos livres é muito característico. Os aminoácidos descritos como maioritários são a prolina e a arginina, uma composição bem diferente da usualmente verificada nas plantas, geralmente ricas em ácidos aspártico e glutâmico, asparagina e glutamina, que são compostos minoritários na couve tronchuda.

Estão descritos vários glucosinolatos na couve tronchuda, sendo a sinigrina, a glucoiberina, a glucobrassicina e a metoxiglucobrassicina (Figura 2) os de maior importância (17, 22, 24).

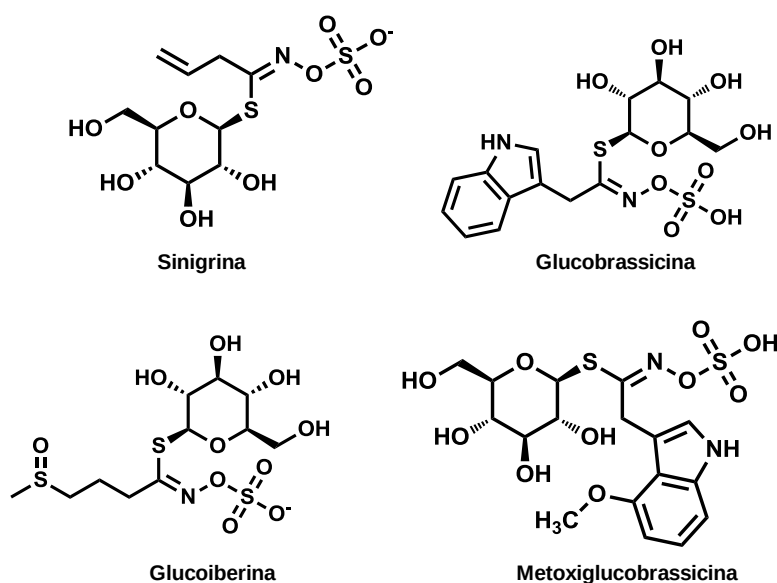
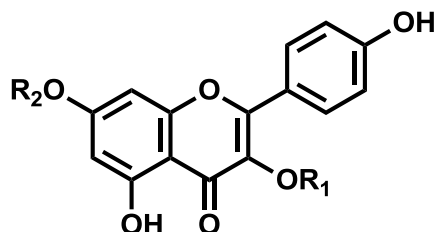


Figura 2. Estrutura química dos glucosinolatos mais importantes da couve tronchuda.

A couve tronchuda é igualmente muito rica em compostos fenólicos. Relativamente a estes compostos, a principal genina presente nos extractos aquosos de *B. oleracea* var. *costata* é o campferol, com substituintes glicosilados nos hidroxilos dos carbonos 3 e 7 (Figura 3).



R_1 = Grupo glicosil com acilação
 R_2 = H ou Grupo glicosil

Figura 3. Estrutura química do campferol com substituintes nos hidroxilos dos carbonos 3 e 7.

Em alguns compostos a cadeia glicosídica no carbono 3 é acilada com um ou dois ácidos hidroxycinâmicos. Também estão descritos vários heterósidos de ácidos hidroxycinâmicos e ácidos cafeoilquínicos.

Relativamente aos compostos voláteis e semi-voláteis da couve tronchuda, esta apresenta um perfil muito diversificado de compostos, desde acetais, ácidos gordos, aldeídos, alcoóis, ésteres metílicos e etílicos, cetonas, terpenos e norisoprenóides, benzenóides e fenilpropanóides. Vários compostos, como tiocianatos, isotiocianatos, sulfuretos e nitrilos, produtos da quebra dos glucosinolatos, também podem ser encontrados nesta planta, constituindo uma das classes de compostos mais característica da família. As sementes desta espécie apresentam também um elevado interesse, principalmente pela sua riqueza em derivados de ácidos hidroxycinâmicos (25).

2.3.1.2. *Brassica oleracea* var. *acephala*

A couve-galega (*B. oleracea* var. *acephala*) é uma couve dura, com folhas de cor verde-escuro e com aspecto enrolado. Tem um ciclo de crescimento curto, de duas a três semanas. A composição nutricional foi já anteriormente estudada por Ayaz e seus colaboradores (31). Nas folhas desta couve a frutose, a glucose e a sacarose são os açúcares presentes em maior quantidade e os ácidos málico e cítrico os ácidos orgânicos descritos anteriormente como maioritários (31).

Esta planta apresenta também uma variada e rica composição em ácidos gordos, quer a nível das suas folhas, quer a nível das suas sementes. As suas folhas apresentam elevadas percentagens de ácido linoleico e α -linolénico (Figura 4), essenciais para a dieta humana pois não podem ser sintetizados pelo organismo. Por outro lado, as suas sementes apresentam uma percentagem inferior, mas suficiente para colmatar algumas deficiências destes ácidos poliinsaturados durante o Inverno, sendo o ácido erúcido maioritário (31).

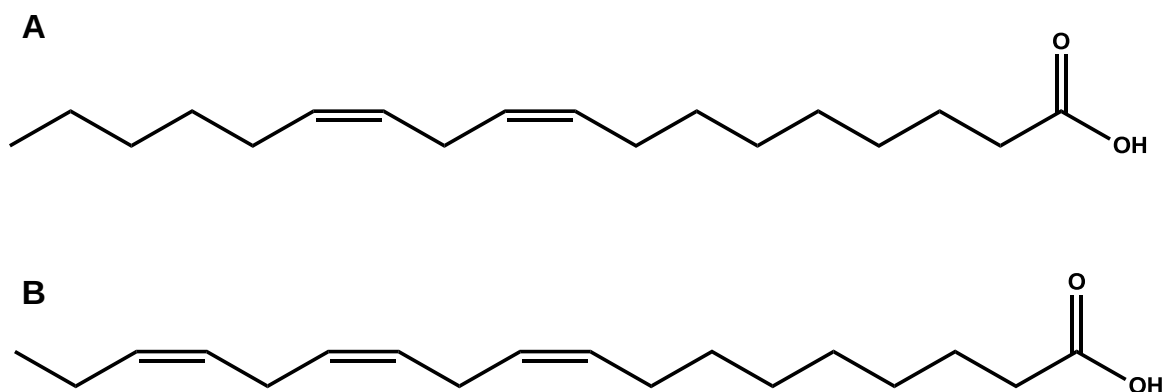


Figura 4. Estrutura química dos ácidos (A) linoleico e (B) α -linolénico.

Vários aminoácidos foram descritos na couve-galega, nomeadamente cisteína, histidina, metionina, triptofano, sendo o ácido glutâmico e o ácido aspártico os maioritários. Relativamente à sua composição em sais minerais, a folha da couve-galega tem quantidades consideráveis de cálcio e potássio (macronutrientes) e elevadas quantidades de ferro, zinco e manganésio (micronutrientes) (31). Adicionalmente, é rica em β -caroteno, luteína, selénio, vitamina K1, ácido fólico e ascorbato (32, 33). Tal como a maioria dos vegetais desta família, a couve-galega é uma interessante fonte de glucosinolatos, estando descritos a sinigrina, glucoiberina, glucobrassicina, progoitrina, gluconapina, glucobrassicinapina, gluconasturtina e a neoglucobrassicina (22), sendo os três primeiros (Figura 2) os presentes em maior quantidade.

Relativamente ao seu perfil fenólico, sabe-se que é semelhante ao da couve tronchuda, apresentando derivados da quercetina e do campferol, sendo o último a principal genina encontrada nesta matriz. Tal como para a couve tronchuda, estes apresentam, por vezes, substituintes glicosilados nos hidroxilos dos carbonos 3 e 7 e em alguns casos a cadeia glicosídica no carbono 3 é acilada com um ou dois ácidos hidroxicinâmicos (34).

2.4. Interação insecto-planta

Os padrões de interação entre grupos com uma relação ecológica tão evidente como as plantas e os herbívoros denotam a existência de uma evolução conjunta. Tanto as plantas como os insectos estão sujeitos a pressões ambientais que têm um impacto importante na sua interação e evolução. Os herbívoros e outros inimigos naturais desafiam a capacidade de resistência das plantas de múltiplas formas e estas reagem desenvolvendo o seu potencial de resposta a esta pressão selectiva (5). Devido à complexidade desta interação, o conceito de co-evolução foi desenvolvido para descrever os efeitos da relação entre determinada espécie vegetal e os insectos herbívoros que dela se alimentam (14). Esse conceito tem sido aplicado na descrição da evolução de uma grande variedade de relações ecológicas entre duas ou mais entidades biológicas (35).

Os mecanismos de defesa das plantas incluem respostas específicas que activam diferentes vias metabólicas, as quais alteram consideravelmente as suas características químicas e físicas (14). Muitos dos mecanismos propostos envolvem mudanças na fisiologia da planta, a distribuição de recursos ou a produção de compostos específicos (36, 37). A produção de compostos específicos envolve o estímulo de vias metabólicas específicas que levam à síntese e à acumulação de vários metabolitos relacionados com a defesa nos tecidos vegetais (38). Pode também ocorrer a indução de proteínas defensivas e de compostos voláteis que atraem os predadores dos insectos herbívoros (14). Essas alterações levam à diminuição da adaptação do insecto, incluindo a capacidade de sobrevivência, a taxa de desenvolvimento, a fecundidade, a massa das pupas ou o tamanho do insecto adulto (39, 40).

Assim, as respostas da planta poderão ser constitutivas, independentes do dano, ou indutíveis que são desencadeadas pelo ataque do herbívoro. Estas poderão ser também ser dirigidas aos insectos (defesas directas) ou podem promover a aproximação de antagonistas naturais dos insectos (defesas indirectas) (6, 41).

As substâncias defensivas constitutivas são dispendiosas para a planta devido aos recursos consumidos na sua biossíntese, à toxicidade para a própria planta e às consequências ecológicas da sua acumulação. Uma forma de a planta reduzir esses prejuízos é sintetizar esses compostos após o dano inicial provocado pelos herbívoros. Esta estratégia é arriscada porque o ataque inicial pode ser muito rápido ou muito severo para que as defesas indutíveis possam ser eficazes. Desta forma, as espécies atacadas de forma frequente ou severa investem mais nas defesas constitutivas e as espécies raramente atacadas confiam nas defesas indutíveis. Relativamente às diferentes partes da planta pode-se estabelecer um raciocínio semelhante: aquelas que estão sujeitas a

um risco de ataque superior podem ser protegidas constitutivamente, enquanto as restantes são melhor defendidas pelas respostas indutíveis (42).

Independentemente de serem defesas constitutivas ou indutíveis, os metabolitos secundários protegem a planta de diferentes modos, actuando como repelentes de insectos, inibidores de alimentação e/ou toxinas (5). Adicionalmente, o modo como a planta armazena os metabolitos secundários é muitas vezes crucial para a sua eficácia. Algumas plantas acumulam as toxinas em ductos resinosos, lactíferos ou tricomas glandulares. Quando estas estruturas rompem devido ao ataque de herbívoros, as toxinas são libertadas em grandes quantidades (42). Por outro lado, a capacidade para armazenar compostos como precursores inactivos separadamente das enzimas que os activam constitui uma estratégia de protecção, uma vez que muitos compostos defensivos são tóxicos para a própria planta (42).

Porém, tal como referido anteriormente, os insectos co-evoluíram no sentido de ultrapassar as defesas das plantas, de modo a conseguirem sobreviver, alimentar-se e evitar predadores. Assim, substâncias que repelem a maior parte dos insectos podem, nestes casos, ser usadas por insectos oligofagos para a localização da planta hospedeira. Desta forma, os metabolitos anteriormente dissuasores podem tornar-se estimulantes (14, 43). Além disso, os insectos especialistas sequestradores podem mesmo incorporá-los no seu organismo com relativa impunidade e sem danificar as moléculas-alvo. Nestes casos, os compostos sequestrados podem ser absorvidos através da membrana do sistema digestivo, transportados até à hemolinfa e depositados em locais específicos do organismo (10).

Algumas larvas sequestram os metabolitos secundários na fase larvar e eliminam uma grande parte dos metabolitos sequestrados quando se transformam em crisálida ou em adulto. Outras há que, tendo cores vistosas e sendo desagradáveis ao paladar no estado adulto, têm que reter essas substâncias durante as várias fases do ciclo de vida. Durante essas fases, a reorganização tecidular pode condicionar a obtenção dos metabolitos sequestrados nestas espécies. Os compostos sequestrados pelos progenitores podem ser essenciais para a sobrevivência dos ovos e das larvas recém-nascidas (10).

Os aleloquímicos sequestrados pelos lepidópteros podem sofrer alterações antes do armazenamento. Esta biotransformação selectiva pode surgir como consequência de um compromisso fisiológico ou físico-químico (permeabilidade tecidular, estabilidade química ou impedimento da autotoxicidade) e/ou como vantagem ecológica (propriedades eméticas ou desagradáveis ao paladar, selecção da fêmea durante o cortejamento) (10).

As interacções insecto-planta são sistemas dinâmicos muito interessantes, e a sua melhor compreensão permitirá encontrar métodos mais eficazes para o controlo

biológico das pragas com os seus inimigos naturais, poderá conduzir ao desenvolvimento de plantas com defesas químicas aumentadas e à descoberta de novos compostos com interesse biológico resultantes da referida interacção (5).

2.4.1. Compostos envolvidos

Tal como mencionado anteriormente, existem vários compostos envolvidos na interacção insecto-planta, os quais implicam a activação de diversas vias biossintéticas. Todos estes compostos desempenham funções distintas, tanto a nível da planta como do insecto. Assim, é essencial para este tipo de estudo conhecer as vias inerentes à sua biossíntese e a sua função a nível do duo ecológico.

2.4.1.1. Glucosinolatos

Os glucosinolatos constituem um importante grupo na família Brassicaceae (44). São considerados os compostos activos responsáveis por muitos dos efeitos fisiológicos propostos para estes vegetais (44, 45). O teor em glucosinolatos varia consoante a espécie, a cultivar, a parte da planta, as condições climáticas, as práticas agronómicas, o ataque de insectos e a intrusão de microorganismos (21, 45, 46).

A sua estrutura (Figura 5) consiste num resíduo de β -D-glucopiranosídeo ligado por um átomo de enxofre a um éster de (Z)-N-hidroximino-sulfato e um grupo R variável, derivado de um de oito aminoácidos (44-46).

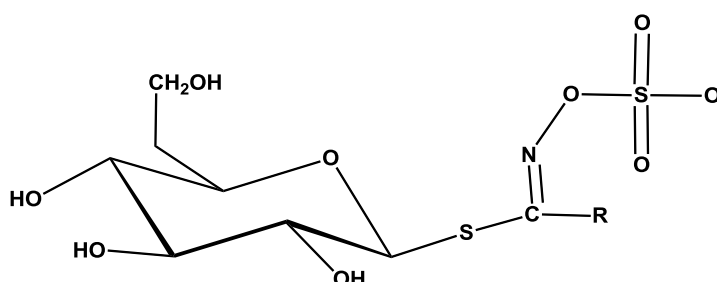


Figura 5. Estrutura geral dos glucosinolatos. R: cadeia lateral variável - substituintes alifáticos, aromáticos ou heterocíclicos.

Os glucosinolatos podem ser classificados em 3 categorias diferentes, de acordo com o aminoácido precursor: alifáticos, se derivarem da alanina, leucina, isoleucina, metionina ou valina, aromáticos, se o aminoácido precursor for a fenilalanina ou a tirosina, e indólicos se for o triptofano (47).

2.4.1.1.1. Biossíntese

Na biossíntese dos glucosinolatos o passo inicial é a N-hidroxilação dos aminoácidos precursores, seguido de descarboxilação para formar uma aldoxima. Posteriormente esta é convertida em ácido tio-hidroxiâmico através da introdução de um grupo SH proveniente da cisteína. O ácido tio-hidroxiâmico recebe um grupo glicosilo da uridinadifosfoglucoose (UDP-glucose) originando um dessulfoglucosinolato, que finalmente é sulfatado pela 3'-fosfofadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS) (44).

2.4.1.1.2. Relação com insectos

A presença de glucosinolatos nas Brassicaceae e outras famílias relacionadas leva a pensar que constituem a primeira linha de defesa contra uma grande variedade de organismos invasores (48). Os glucosinolatos são frequentemente apontados quer como defesas contra herbívoros generalistas, actuando como insecticidas, quer como factor de escolha de hospedeiro pelos herbívoros especialistas (49), sendo um estimulante da oviposição e um atractivo na alimentação por parte destes (20, 44).

Níveis elevados de produtos de hidrólise (especialmente nos rebentos) podem originar um sabor amargo desagradável (50). Além disso, os glucosinolatos em quantidades elevadas são tóxicos, inibem o crescimento e têm propriedades antinutricionais para uma grande variedade de potenciais inimigos das plantas, incluindo mamíferos, aves, insectos, moluscos, invertebrados aquáticos, nemátodes, bactérias e fungos (48). Não se conhece o mecanismo pelo qual os glucosinolatos exercem o seu efeito tóxico, mas sabe-se que os isotiocianatos (um dos possíveis produtos resultantes da hidrólise dos glucosinolatos) têm tendência para reagir com os grupos amina e sulfidrilos das proteínas, *in vitro* (47).

Os insectos especialistas têm mecanismos para ultrapassar a toxicidade destes compostos, como excreção rápida e hidrólise, ou mesmo inibição desta, por acção de enzimas protectoras ou uso dos glucosinolatos para sua própria defesa contra predadores, através do seu sequestro e acumulação (48, 51).

No caso específico das borboletas do género *Pieris*, a oviposição depende dos glucosinolatos presentes na superfície das folhas das Brassicaceae, os quais são reconhecidos pelo insecto adulto como locais adequados para a sua descendência se alimentar. As larvas recém-nascidas requerem glucosinolatos para iniciarem ou continuarem a alimentar-se (6, 48) e possuem quimiorreceptores que respondem especificamente a estes compostos (52). Os adultos detectam a glucobarbarina [(S)-2-hidroxi-2-feniletilglucosinolato], a glucobrassicina e outros glucosinolatos como

estimulantes de oviposição (51), enquanto a larva de *P. brassicae* somente reconhece sete glucosinolatos, sendo a sinigrina (Figura 2) um estimulante para a sua alimentação.

Adicionalmente sabe-se que a β -glucosidase presente no regurgitado da larva de *P. brassicae* provoca uma libertação de compostos voláteis resultantes da quebra dos glucosinolatos, pelo que se crê que esta enzima facilite esta mesma quebra (53). No organismo do insecto especialista *P. brassicae* os glucosinolatos são sequestrados e, tal como nas plantas hospedeiras, são armazenados em locais distintos das mirosinases, as enzimas responsáveis pela sua hidrólise. (46, 51). Estas enzimas quebram os glucosinolatos em isotiocianatos, nitrilos e tiocianatos (46).

2.4.1.2. Carotenóides

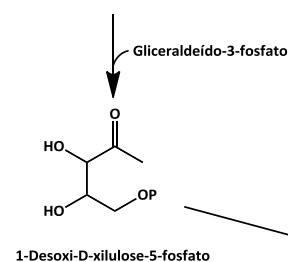
Os carotenóides são responsáveis pelas exuberantes cores amarela, vermelha, laranja, entre outras, das plantas e do tegumento dos animais. Além de serem pigmentos auxiliares na fotossíntese e corantes, os carotenóides são os precursores dos apocarotenóides, como, por exemplo, a fito-hormona ácido abscísico, moléculas de sinalização, retinal e ácido retinóico, bem como de compostos voláteis como a β -ionona (54).

Os insectos são incapazes de sintetizar carotenóides *de novo*, obtendo-os através da dieta (55), sendo, portanto, a sua presença no insecto dependente da disponibilidade no seu habitat.

2.4.1.2.1. Biossíntese

Nas plantas, a síntese de carotenóides começa a partir de unidades de isopentenilo pirofosfato (IPP) nos plastídeos (via 1-desoxi-D-xilulose), e é aí que os compostos se acumulam (Figura 6). Quatro unidades de IPP são condensadas para formar geranylgeranilo pirofosfato (GGPP). A junção de duas moléculas de GGPP leva à formação do primeiro carotenóide C_{40} , o fitoeno (56).

Fosfoenol piruvato



Fosfoenol piruvato

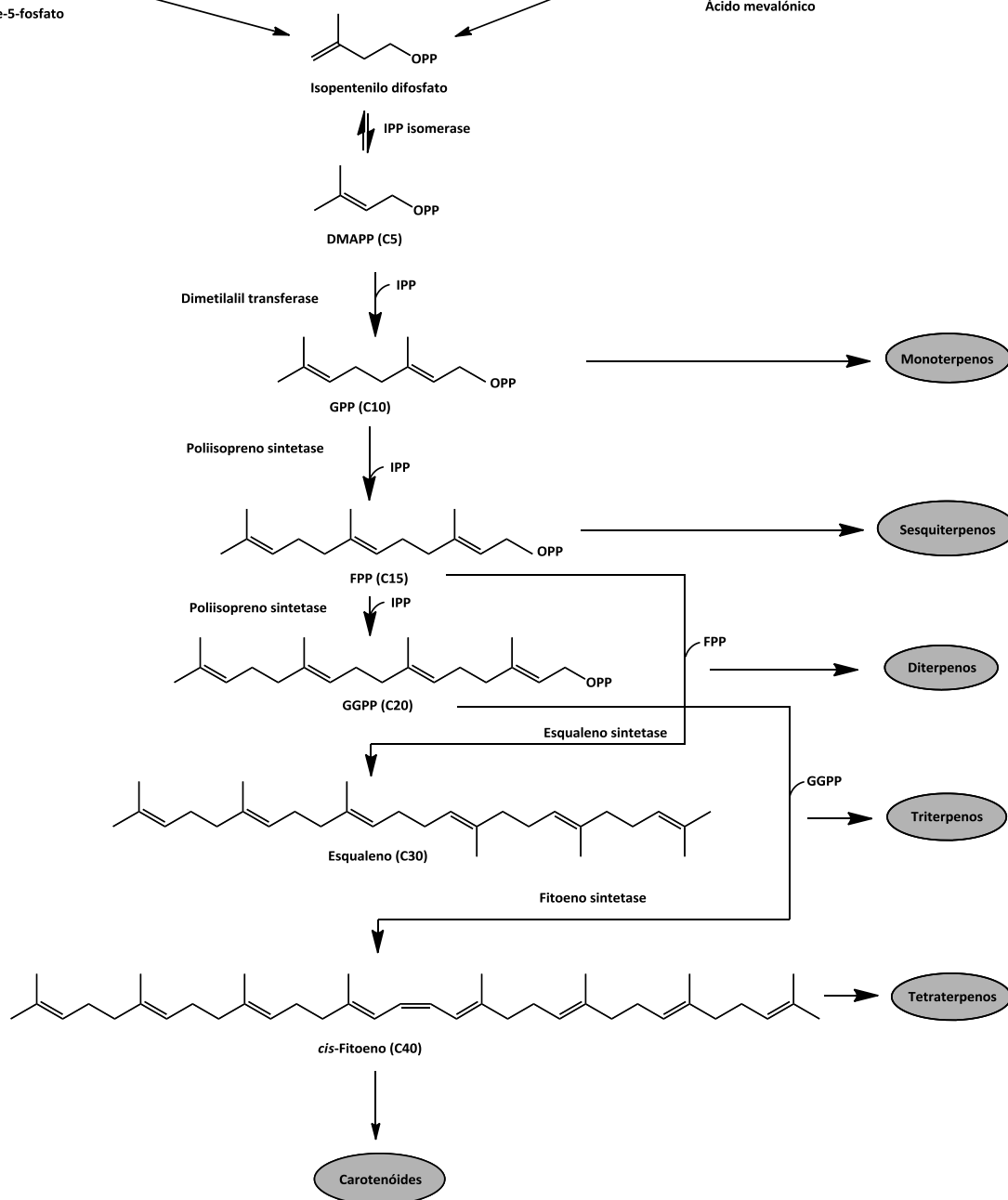
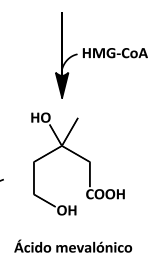


Figura 6. Via biossintética dos carotenóides e terpenos. Abreviaturas: HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA; IPP, isopentenilo pirofosfato; DMAPP, dimetilalilo pirofosfato; GPP, geranilo pirofosfato; FPP, farnesilo pirofosfato; GGPP, geranilgeranilo pirofosfato; HPL, hidroperóxido liase [adaptada de (1)].

2.4.1.2.2. Relação com insectos

Os carotenóides afectam o desenvolvimento e adaptação das plantas, sugerindo que sua síntese é coordenada com outros processos de desenvolvimento (57, 58). Muitas espécies de insectos captam selectivamente a luteína em detrimento de outros carotenóides (59). Estes são principalmente usados pelo insecto para melhorar as suas funções imunológicas, para os proteger da predação e de pequenos danos (60). Além disso, os carotenóides actuam como antioxidantes endógenos e exógenos contra o stress oxidativo (59, 61). A depleção de carotenóides pode atrasar a eclosão de larvas de insectos (62).

Os lepidópteros são conhecidos por serem capazes de acumular carotenóides, a partir dos alimentos (63). Os carotenóides característicos das borboletas são zeaxantina, β -criptoxantina, luteína, astaxantina, licopeno, toruleno e cantaxantina (Figura 7) (63, 64).

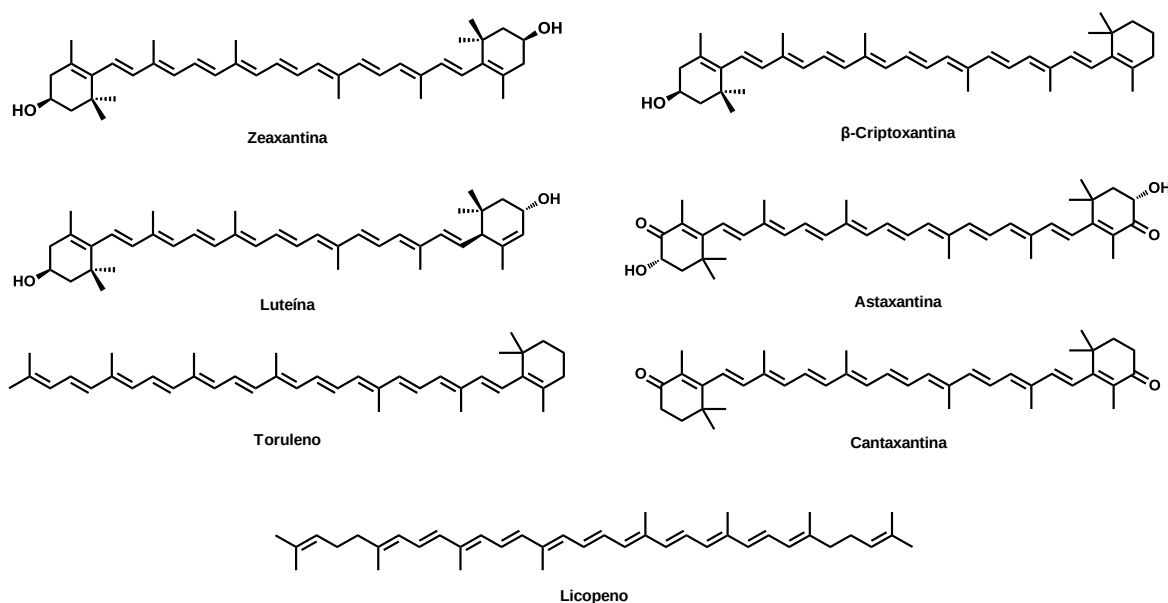


Figura 7. Estrutura química dos carotenóides característicos das borboletas de lepidópteros.

2.4.1.3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário, amplamente difundidos por toda a natureza. Estes constituem um vasto e diversificado grupo de compostos, presentes em maior quantidade na parte aérea da planta (65-67), com inúmeras funções na natureza e diversas actividades biológicas conhecidas. Na planta

são responsáveis pela coloração das flores, dos frutos e por vezes das folhas, asseguram ainda a protecção dos tecidos contra os efeitos nocivos dos raios ultra-violeta (UV), e são uma fonte de atracção para os insectos polinizadores (43, 46). Além disso, podem actuar como agentes antivirais e antibióticos (65) e exercem um papel importante como moléculas de sinalização, tanto no desenvolvimento das plantas como na defesa destas (68). Estes compostos não podem ser sintetizados pelos insectos, pelo que a sua presença nestes depende totalmente da sua alimentação.

Tal como os glucosinolatos, também os compostos fenólicos podem influenciar o comportamento alimentar das larvas e a oviposição dos insectos adultos (69), tendo um papel importante na dinâmica do sistema insecto-planta (69-71).

A biossíntese dos ácidos cinâmicos e dos flavonóides, duas classes de compostos polifenólicos muito importantes nas plantas do género *Brassica*, particularmente na espécie *B. oleracea*, encontra-se descrita nas secções seguintes. A biossíntese da sinapoilcolina, que pode ser considerada um biomarcador importante na assinatura metabólica do género *Brassica*, e que se encontra sobretudo nas sementes, que também foram objecto de estudo desta tese, também é descrita.

2.4.1.3.1. Ácidos cinâmicos

Os ácidos cinâmicos são fenilpropanóides (C_6-C_3), contendo, além do hidroxilo fenólico, uma função carboxilo e uma dupla ligação na cadeia lateral. A dupla ligação possibilita a existência de 2 isómeros, *cis* e *trans*, sendo que os isómeros *trans* são mais estáveis e predominam na natureza. Estes compostos variam no padrão de substituição do anel aromático.

Os ácidos cinâmicos são habitualmente encontrados nas plantas na sua forma conjugada, muitas vezes como grupos acilo de heterósidos flavonoídicos. A ligação aos açúcares é facilmente quebrada com uma hidrólise alcalina, o que permite a identificação dos ácidos por cromatografia líquida acoplada a detector de díodos (71).

2.4.1.3.1.1. Biossíntese

Os ácidos cinâmicos são biossintetizados nas plantas pela via xiquimato. O ácido xiquímico resulta da condensação de uma unidade de eritrose-4-fosfato com uma unidade de fosfoenolpiruvato para formar 3-desoxi-arabino-heptulose-7-fosfato (DAHP), numa reacção catalizada pela enzima DAHP sintetase (72). A redução da cetona leva à ciclização do anel, dando origem ao 3-desidroquinato (73). O 3-desidroquinato é depois transformado em 3-desidro-xiquimato pela enzima

desidroquinase desidratase (74), sendo este de seguida reduzido a ácido xiquímico. Esta última reacção é catalisada pela xiquimato desidrogenase.

O ácido xiquímico na planta é posteriormente transformada em corismato. Nestas reacções interveem as enzimas a 5-enolpiruvilxiquimato 3-fosfato sintetase e a corismato sintetase (75-77). A corismato mutase é responsável pela conversão do corismato em ácido prefénico (78). Este último leva à formação do aminoácido aromático L-fenilalanina (79). A fenilalanina é o precursor dos ácidos cinâmicos na via geral dos fenilpropanóides. Esta via liga o metabolismo primário com a biossíntese de compostos fenólicos nas plantas (Figura 8 e 9).

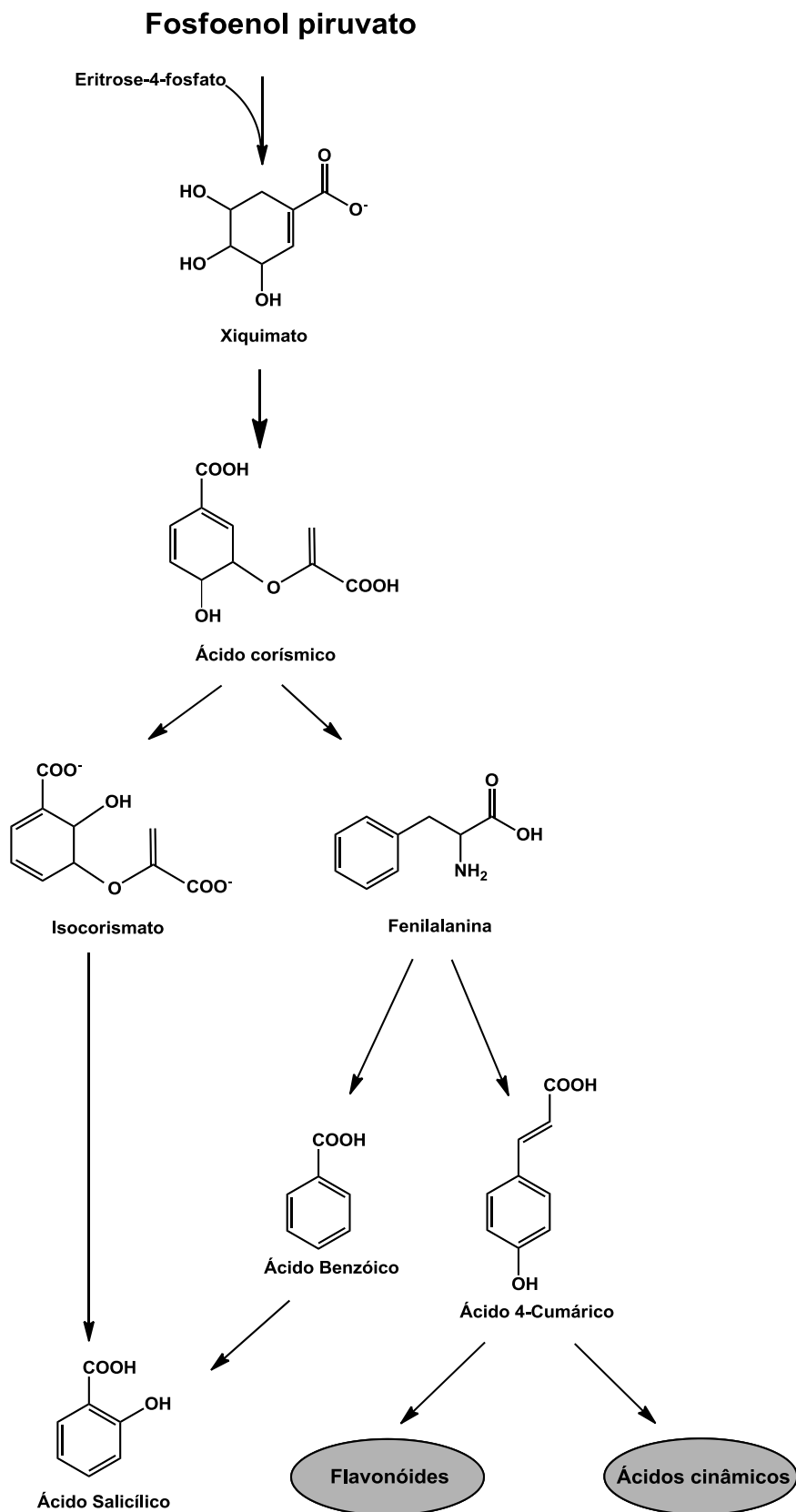


Figura 8. Representação esquemática da biossíntese de compostos fenólicos [adaptada de (1)].

A fenilalanina amônia liase (PAL) desempenha um papel chave na sequência biossintética dos fenilpropanóides, catalisando a biotransformação da L-fenilalanina em ácido cinâmico (80, 81). O ácido cinâmico é posteriormente modificado pela acção de hidroxilases e O-metiltransferases, levando à síntese dos vários ácidos hidroxicinâmicos.

Os ácidos cinâmicos também aparecem muitas vezes conjugados com o ácido quínico. Na sua biossíntese está envolvida a enzima hidroxicinamoiltransferase (HCT), responsável pela esterificação (82) (Figura 9).

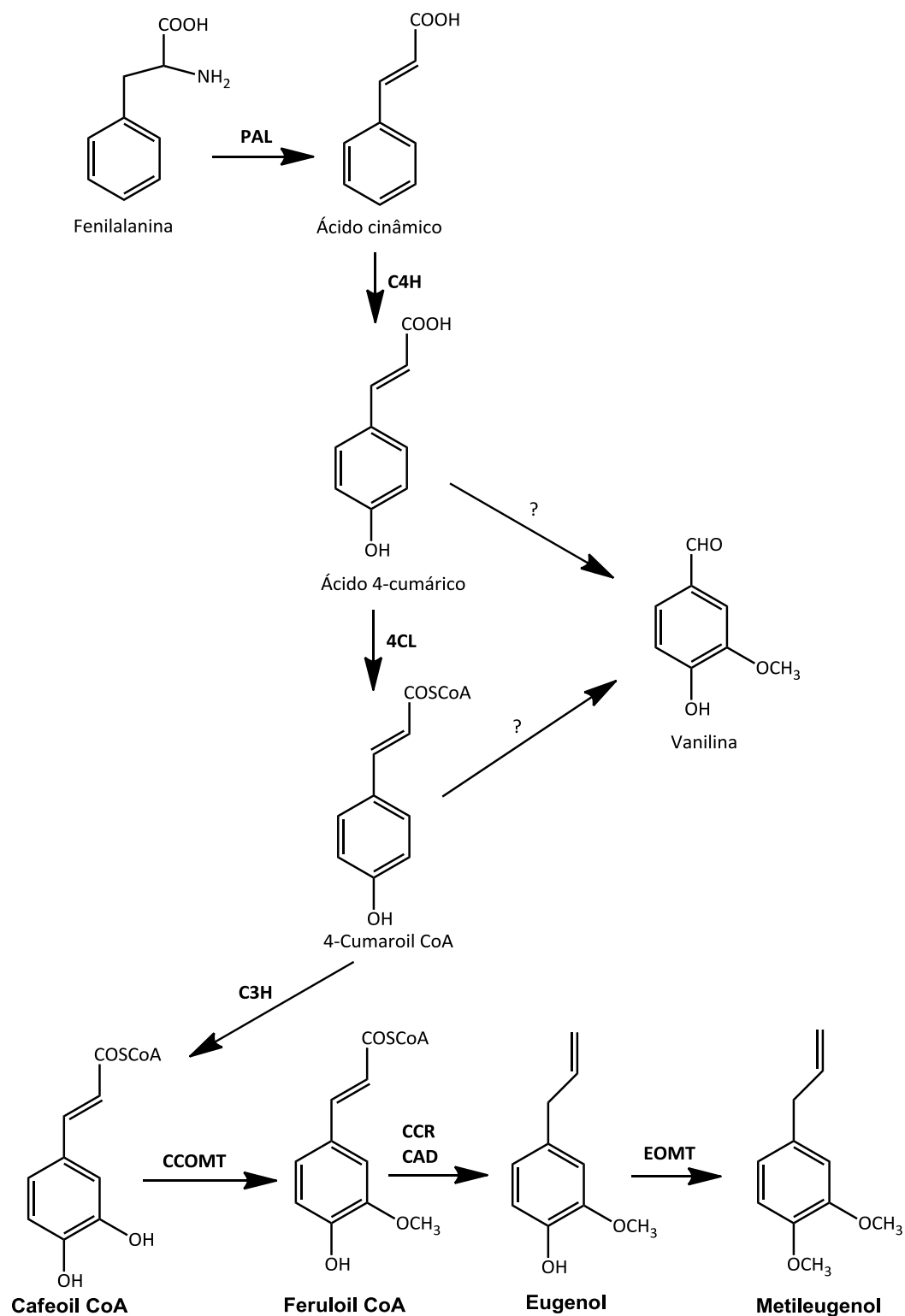


Figura 9. Representação esquemática da via biossintética dos fenilpropanóides nas plantas. Abreviaturas: PAL, fenilalanina amônia liase; C4H, cinamato 4-hidroxilase; 4CL, 4-cumarato:coenzima A ligase; C3H, *p*-cumarato 3-hidroxilase; CCOMT, cafeoil coenzima A O-metil-transferase; CCR, cinamoil CoA redutase; CAD, cinamoil álcool desidrogenase; EOMT, eugenol O-metil-transferase [adaptada de (2)].

2.4.1.3.1.2. Sinapoilcolina

A sinapoilcolina, um éster de ácido sinápico com a colina (Figura 10), acumula-se nas sementes da maior parte das plantas do gênero *Brassica*, sendo usada como marcador quimiotaxonômico deste gênero (83). O teor de ésteres de colina (sinapinas) e também de glucosinolatos pode inviabilizar a utilização destas plantas na alimentação humana e animal. O sinapato proveniente da via dos fenilpropanóides é conjugado com a colina durante o desenvolvimento da semente. Quando a semente germina dá-se a hidrólise da sinapoilcolina, libertando-se o sinapato que é novamente conjugado com malato no rebento (84).

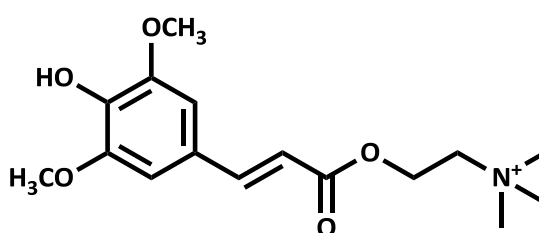


Figura 10. Estrutura química da sinapoilcolina.

Devido à sua semelhança estrutural com a acetilcolina a sinapoilcolina apresenta um elevado potencial biológico relativamente à inibição da acetilcolinesterase. Os inibidores da acetilcolinesterase têm várias aplicações terapêuticas, sendo utilizados sobretudo na doença de Alzheimer (DA) (85).

2.4.1.3.2. Flavonóides

Os flavonóides apresentam uma estrutura geral com quinze átomos de carbono, $C_6-C_3-C_6$, na qual dois anéis benzénicos se encontram ligados por uma cadeia de três átomos de carbono, podendo ou não formar-se um terceiro anel (Figura 11). Os anéis são designados por A, B e C e o sistema de numeração tem início no átomo de oxigénio do heterociclo, prosseguindo até aos carbonos envolvidos na junção dos anéis (Figura 11) (86).

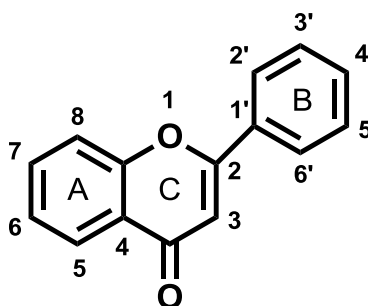


Figura 11. Estrutura química geral e esquema de numeração de flavonóides.

Os flavonóides podem ser sub-divididos em 9 grupos, com base na oxidação do anel heterocíclico C: chalconas, flavonas, flavonóis, flavanonas, di-hidroflavonóis, flavano-3,4-dióis, catequinas, antocianidinas e isoflavonas (Figura 12). Como existe uma grande tendência para que as plantas quimiotaxonomicamente relacionadas produzam tipos semelhantes de flavonóides, estes são habitualmente usados como marcadores taxonômicos (87).

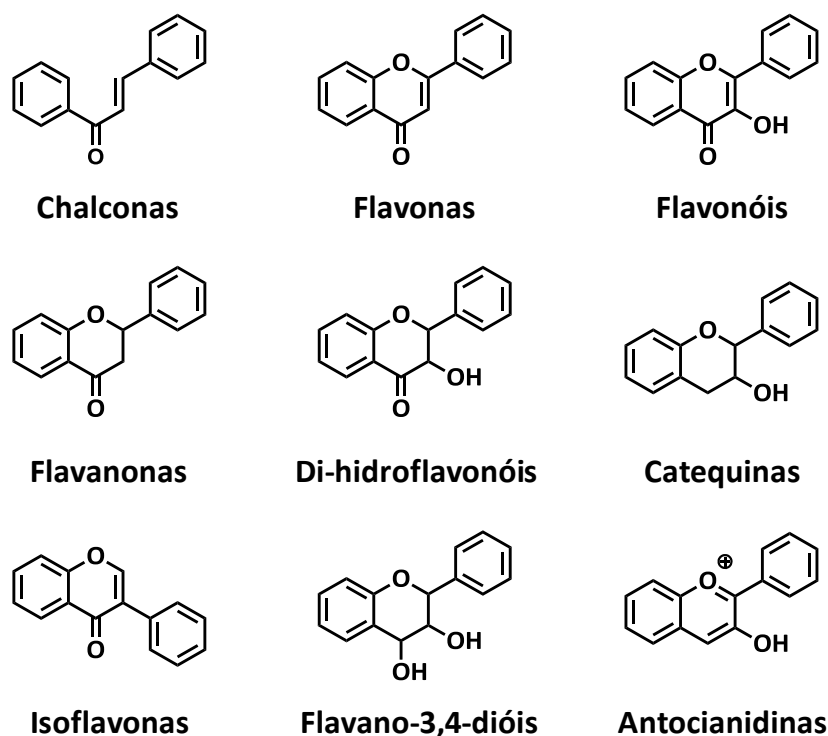


Figura 12. Estrutura dos principais grupos de flavonóides.

Estes compostos têm uma origem biossintética mista, sendo o anel A formado “via acetato” e os anéis B e C sintetizados “via xiquimato”. Como consequência, o esquema de substituição mais frequente é a hidroxilação alternada do anel A, nas posições 5 e 7, e a hidroxilação *para* no anel B, que pode ser do tipo 4'-OH, 3',4'-di-OH ou 3',4',5'-tri-OH. A variedade de estruturas encontrada nas diferentes classes resulta de modificações posteriores, sendo a glicosilação e a metilação dos hidroxilos as mais comuns. Outras modificações, como a metoxilação, a hidroxilação adicional, a formação de C-glicosilflavonóides, a prenilação, a acilação dos hidroxilos do núcleo flavonóide ou dos açúcares que lhe estão ligados, a metilação de grupos *orto*-di-hidroxilo e a dimerização surgem na natureza com menor frequência (46, 86). Dependendo da sua estrutura química e do seu perfil de substituição, os diversos flavonóides têm diferentes actividades farmacológicas.

Os flavonóides podem existir na natureza na forma livre, mas a forma glicosilada é mais comum. A glicosilação torna os flavonóides menos reactivos e mais solúveis em água, podendo ser considerada uma forma de protecção nas plantas, pois evita danos citoplasmáticos e permite o armazenamento nos vacúolos. A conjugação de açúcares com moléculas nucleofílicas reduz a possibilidade de transferência de electrões da genina para outros componentes celulares, diminuindo desta forma a sua reactividade, aumentando consequentemente a estabilidade da molécula. Uma vez que os locais nucleofílicos são em muitos casos a parte da molécula que interage de forma prejudicial com outros componentes celulares, a adição de açúcares bloqueia o local activo, reduzindo a toxicidade (88). Adicionalmente, os compostos glicosilados têm uma solubilidade e mobilidade nos sucos celulares superiores à da genina (89, 90).

A glicosilação dos compostos pode ocorrer em átomos de oxigénio (grupos OH e COOH), azoto, enxofre e carbono. A componente glicosídica pode variar quer no número, quer no tipo de açúcar (91). Tendo assim em conta o tipo de ligação do grupo glicosídico à genina classificam-se em C- e O- glicósidos. Os O-glicósidos de flavonas e flavonóis constituem as maiores classes, com mais de 2000 estruturas conhecidas, as quais demonstram um certo padrão de glicosilação (89). Assim, existe sempre um açúcar na posição 3. Quando uma segunda posição está glicosilada, é habitualmente a 7. Como tal, os 3,7-diglicósidos são comuns, enquanto os 3,4'-diglicósidos são raros.

Os heterósidos flavonoídicos encontram-se muitas vezes acilados com ácidos alifáticos e aromáticos, sobretudo os ácidos acético, malónico, *p*-cumárico e ferúlico. A formação destes ésteres é o último passo da via biossintética, sendo catalisada por aciltransferases. Estas enzimas são geralmente pouco selectivas relativamente ao grupo acilo, mas têm uma grande selectividade para o substrato a ser esterificado. As aciltransferases requerem como dador do grupo acilo a correspondente acilo-coenzima A (92).

Existem igualmente flavonóides sulfatados, os quais estão aparentemente restritos a algumas espécies vegetais, especialmente da família Asteraceae (93). Os ésteres sulfatados de flavonóides representam um grupo interessante, uma vez que mostraram ter propriedades anticoagulantes. No entanto, os flavonóides sulfatados podem ser inactivados após metabolização hepática (93, 94).

2.4.1.3.2.1. Biossíntese

Tal como referido anteriormente, os flavonóides apresentam uma via biossintética mista. Os flavonóides são sintetizados a partir de uma unidade iniciadora fenilpropanóide activada com coenzima A (CoA) e 3 unidades malonil-CoA. A enzima iniciadora da biossíntese dos flavonóides, chalcona sintetase (CHS), cataliza a condensação de uma molécula de *p*-cumaroil-CoA com as 3 unidades malonil-CoA para produzir chalcona. A ciclização intramolecular da chalcona é mediada pela chalcona isomerase (CHI). A naringenina, resultante desta reacção, é um precursor essencial para a biossíntese de todas as outras classes de flavonóides (95, 96) (Figura 13).

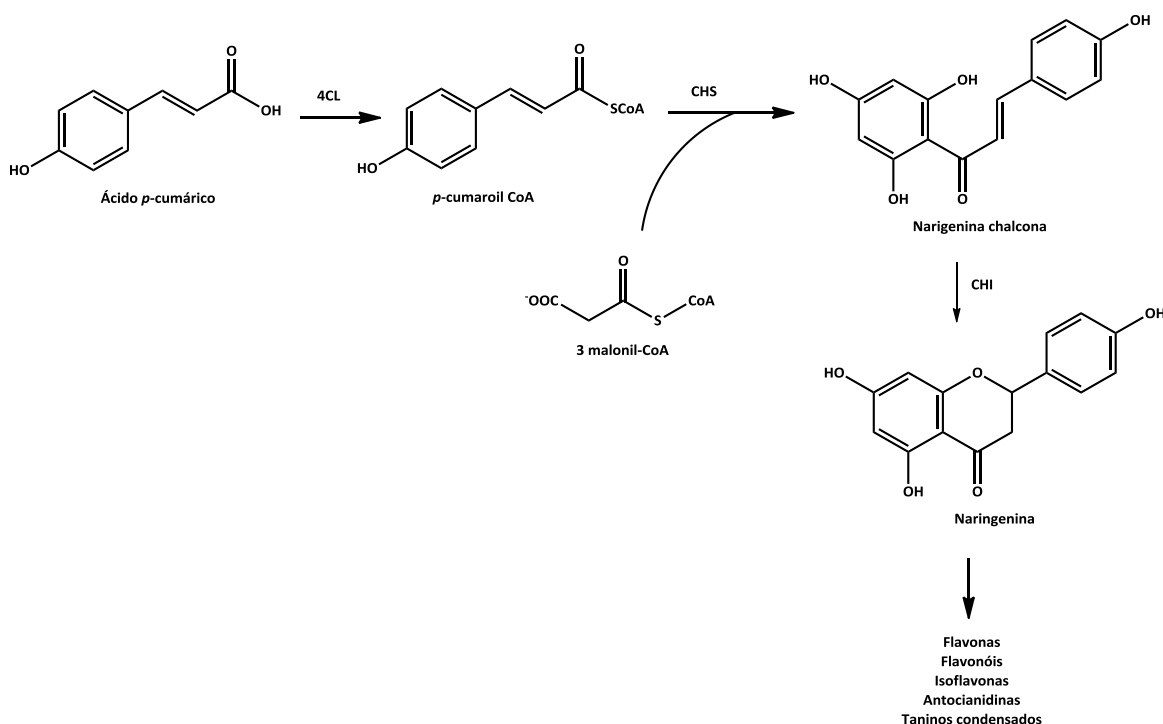


Figura 13. Representação esquemática da via biossintética dos flavonóides. Abreviaturas: 4CL, 4-Cumarato:coenzima A liase; CHS, chalcona sintetase; CHI, chalcona isomerase.

2.4.1.3.3. Relação com insectos

Os compostos fenólicos têm desempenhado um papel central nas teorias da interacção insecto-planta (1). Apesar do interesse do estudo da relação flavonóides-insecto e da informação disponível sobre a distribuição e diversidade destes compostos nas plantas, a investigação sobre a influência dos flavonóides na selecção do hospedeiro é reduzida (70), assim como sobre o seu metabolismo após ingestão pelos insectos herbívoros (65).

Há evidências de que os lepidópteros possuem receptores gustativos que respondem aos compostos fenólicos. No entanto, pouco se sabe acerca da especificidade desses receptores e se permitem a diferenciação entre os vários grupos de flavonóides. Inicialmente foi proposto que estes compostos tinham uma função importante apenas na defesa das plantas contra agentes patogénicos e herbívoros (97, 98). No entanto, percebeu-se que os seus efeitos eram muito mais diversificados. No duo ecológico natural os efeitos desta classe de compostos podem ser positivos ou negativos.

Em insectos não adaptados estes compostos podem ter um impacto negativo, reduzindo o valor nutritivo dos alimentos, inibindo a alimentação e a digestão, actuando como agentes tóxicos, inibidores de crescimento, e pró-oxidantes (99-103). Por exemplo, a quercetina-3-O-rutinósido e o ácido 5-O-cafeoilquínico são bem conhecidos pelos seus efeitos inibitórios do crescimento de diferentes insectos (103).

No sistema natural insecto-planta também deve ser considerada a presença de enzimas oxidativas foliares, que desenvolvem um papel importante nos mecanismos de defesa das plantas. As polifenoloxidasas e peroxidases são compartimentadas separadamente dos seus substratos fenólicos, mas têm a capacidade de oxidar rapidamente compostos com grupos hidroxilo em *orto* à correspondente o-quinona quando o tecido foliar é danificado (101). Por exemplo, o 5-O-cafeoilquínico é um substrato para estas enzimas, sendo rapidamente convertido na sua o-quinona, uma molécula altamente reactiva que é conhecida por se ligar covalentemente a grupos nucleofílicos (NH_2 e SH) de moléculas como aminoácidos e proteínas, presentes no intestino de diversas larvas, tais como *Helicoverpa zea* e *Spodoptera exigua*. Além disso, as quinonas também podem levar à produção de radicais superóxido, os quais são tóxicos para larvas de diversas espécies de lepidópteros (104-106).

Os flavonóides apresentam também actividade dissuasora sobre vários lepidópteros, podendo conferir resistência às culturas contra os ataques de insectos. Estudos comparativos sobre o efeito de diferentes compostos fenólicos demonstraram que as flavanonas foram mais activas do que as respectivas chalconas (107). As conclusões gerais acerca da relação entre a estrutura e a actividade retiradas do trabalho de (107) sobre a acção dissuasora de flavonóides em larvas de *Spodoptera littoralis* e *Spodoptera exempta* (dois lepidópteros que são considerados pragas) foram que a introdução de grupos metilo ou dimetilo torna os flavonóides mais dissuasores, talvez porque os torna menos polares. Por outro lado, a introdução de grupos hidroxilo diminui a sua capacidade dissuasora. Outro facto observado foi a diferença considerável no efeito que os flavonóides têm nas espécies de insectos, mesmo as relacionadas intimamente. Além disso, determinado composto pode apenas ter esse efeito contra um insecto em determinada fase do seu ciclo, não exercendo a mesma função quando este se encontra

noutro estado de desenvolvimento. Por exemplo, o aliarinósido, um nitrilo-glucósido não cianogénico presente na crucífera *Alliaria petiolata*, inibe a alimentação das larvas recém-eclodidas do lepidóptero *Pieris napi oleracea*, enquanto as larvas de instares mais tardios são dissuadidas de se alimentarem pela isovitexina-6''-O-β-D-glucopiranosídeo (108). Apesar da oviposição não estar inibida, a presença de aliarinósido e de isovitexina-6''-O-β-D-glucopiranosídeo impede a sobrevivência das larvas (108). Porém, estes compostos podem também ter efeitos positivos sobre os insectos.

Alguns compostos fenólicos, como por exemplo a vicenina-2 (apigenina-6,8-di-C-glucósido), naringenina-7-O-rutinósido, hesperetina-7-O-rutinósido, quercetina-3-O-rutinósido, quercetina-3-O-β-D-glucopiranosil(1-6)-β-galactopiranosídeo, quercetina-3-O-(2'',6''-α-L-di-ramnosilpiranosil)-β-D-galactopiranosídeo, naringenina-7-O-neohesperidósido, hesperetina-7-O-rutinósido luteolina-7-O-(6-O-malonil)-β-D-glucósido e o ácido 5-O-cafeoilquínico, podem actuar como estimulantes para a oviposição dos insectos. No entanto, a actividade estimulante na maioria das vezes envolve a sinergia entre vários compostos e não pode ser atribuída somente a um. Verificou-se que nas espécies do género *Papilio* a mistura de flavonóides glicosilados, bases orgânicas e ácido 5-O-cafeoilquínico age como estimulante da oviposição.

Compostos pertencentes a diferentes classes de flavonóides têm sido também considerados como estimulantes da alimentação para insectos, incluindo flavonóis, flavonas, flavanonas, di-hidroflavonóis, di-hidrochalconas e flavanóis. Os constituintes mais activos são habitualmente os O-glicósidos em detrimento das geninas (43, 70, 109). No entanto, a resposta comportamental dos insectos a estes compostos pode variar, dependendo da concentração na planta e da idade do insecto. Por exemplo, são conhecidos os efeitos inibitórios de crescimento que a quercetina-3-O-rutinósido e o ácido 5-O-cafeoilquínico exercem em diversos insectos (103). Porém, a quercetina-3-O-rutinósido, um flavonol amplamente distribuído, também foi já descrita como um forte estimulante da alimentação para um elevado número de insectos polípagos, como é o caso da larva de *Heliothis virescens* (43, 70) e de larvas dos últimos instares das traças *Spodoptera litura* e *Lymantria dispar*, inibindo consideravelmente o crescimento das larvas de 1º e 2º instar, mesmo em baixas concentrações (43, 110). Outro exemplo é o que acontece com as larvas do último instar de *Heliothis zea* e *Heliocoverpa armigera*, para as quais a presença da quercetina-3-O-rutinósido em concentrações superiores a 10⁻³ M funciona como dissuasor da alimentação, mas em concentrações inferiores a 10⁻⁴ M exerce o efeito contrário (70, 110). Quando esse flavonóide é ingerido, a ligação glicosídica é hidrolisada libertando a quercetina. Esta pode inibir as ATPases mitocondriais e as oxidases de função mista dependentes do citocromo P450. Este mecanismo explica os exemplos anteriormente referidos, pois as larvas dos últimos

instares têm maiores quantidades de oxidases mistas e podem destoxificar a quercetina (70, 110). Assim, o papel dos derivados da quercetina na interacção insecto-planta parece ser complexo (110), uma vez que, como a fronteira entre a atracção e a repelência é muito ténue, o mesmo flavonóide pode ser estimulante para um insecto e dissuasor para outro (43).

No entanto, os lepidópteros desenvolveram vários mecanismos para ultrapassar esses efeitos tóxicos dissuasores. O pH alcalino do intestino médio de algumas espécies de *Spodoptera* constitui um mecanismo de defesa de insectos contra a toxicidade de compostos fenólicos (111). Na verdade, para *S. littoralis* essas condições podem favorecer o estabelecimento de ligações covalentes e ligações cruzadas entre as quinonas e aminoácidos / proteínas, tornando-os inutilizáveis pelos sistemas digestivo e de absorção (111, 112). Poderá parecer uma inadaptação manter o intestino com um ambiente oxidativo e alcalino, mas as vantagens de tais condições incluem o aumento da extracção de nutrientes, a inactivação de enzimas foliares e protecção contra agentes microbianos, resultando em maior sobrevivência à custa de um crescimento lento (111).

Adicionalmente, o lúmen intestinal de larvas de lepidópteros como a *Orgyia leucostigma*, que se alimentam de plantas ricas em compostos fenólicos, têm níveis elevados de ascorbato e glutathione (113). Estas moléculas antioxidantes endógenas podem ter a função de destoxificação de compostos fenólicos oxidados ou das espécies reactivas geradas em ciclos redox em que estes compostos participam. Verificou-se também que o fluido mesenterial de larvas de *Eliothis virescens* (larva do tabaco) alimentada com folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) tinha actividade antioxidante superior à das folhas maceradas. Além disso, observou-se que a hemolinfa de larvas alimentadas com folhas geneticamente modificadas, para produzirem maiores quantidades de compostos fenólicos, tinha maior capacidade antioxidante do que a hemolinfa de larvas alimentadas com folhas normais, o que pode indicar que o aumento da actividade antioxidante se deve aos compostos fenólicos (114).

Além de desenvolverem mecanismos para ultrapassar a toxicidade dos compostos fenólicos das plantas, várias espécies de larvas adaptadas desenvolveram a capacidade de sequestrar flavonóides da sua dieta. Thomson e colaboradores foram os primeiros a demonstrar a capacidade de sequestração por parte de algumas larvas ao encontrar nas asas de borboletas de *Melanargia galathea* compostos fenólicos da sua planta hospedeira, a *Dactylis glomerata* (115).

O sequestro de flavonóides é relativamente comum nos lepidópteros, em especial nas famílias Papilionidae, Nymphalidae e Lycaenidae, fazendo parte da pigmentação das asas das borboletas (65, 116, 117). Um estudo sobre a distribuição dos flavonóides em *M. galathea* mostrou que estes compostos estavam presentes em todas as fases do seu

ciclo de vida, desde o ovo até ao estado adulto, passando pelas larvas nos diferentes instares. No adulto, macho ou fêmea, os flavonóides estão também presentes no corpo, mas a sua maior incidência é nas asas (43, 65, 116, 117). Estes compostos têm sido identificados nas asas de várias espécies de borboletas (cerca de 80% dos flavonóides sequestrados das plantas) e nas fêmeas adultas a concentração de flavonóides é superior à dos machos (10, 118).

Embora a maioria dos pigmentos sejam sintetizados *de novo* durante o desenvolvimento, na fase de pupa, alguns, como é o caso dos flavonóides, são obtidos da dieta das larvas, já que os insectos não são capazes de sintetizá-los bem como aos seus precursores *de novo* (119). Vários estudos comprovaram a origem alimentar dos flavonóides (43, 65, 117, 119). Assim sendo, o sequestro e o metabolismo de flavonóides pelos insectos são fortemente dependentes do perfil flavonóico específico das suas plantas hospedeiras (65, 116-118, 120, 121).

Além disso, alguns estudos revelaram que os insectos podem acumular selectivamente compostos fenólicos específicos. Por exemplo, os derivados de quercetina e campferol são preferencialmente acumulados por *Icarus polyommatus* e *P. brassicae* e os derivados da isoramnetina são normalmente excretados (116, 122). As larvas de *P. brassicae* alimentadas com couve tronchuda, anteriormente estudadas, também revelaram uma predominância em derivados de quercetina, o que pode dever-se à sua bioacumulação preferencial ou à biotransformação do campferol (cujos derivados são maioritários na planta hospedeira) em quercetina por oxidases presentes na larva (121).

A excreção preferencial de derivados de isoramnetina pode estar relacionada com a estrutura química da genina, que é um composto metoxilado, enquanto a quercetina e o campferol não o são (Figura 14).

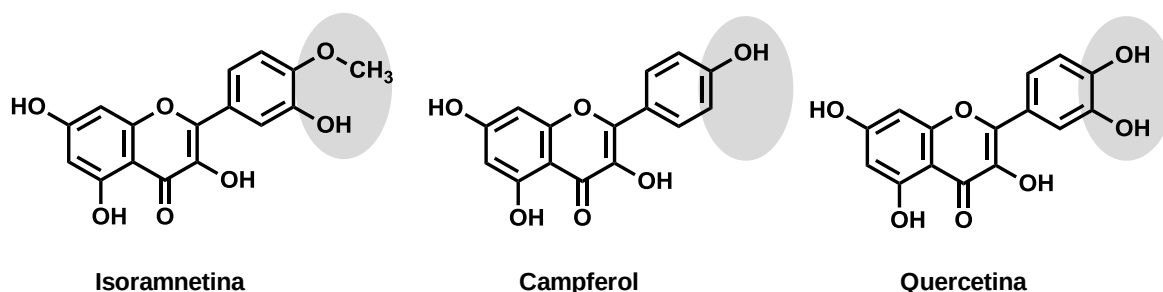


Figura 14. Estrutura química da isoramnetina, campferol e quercetina.

Além da genina, a molécula de açúcar também parece desempenhar um papel importante no perfil dos compostos sequestrados pelo insecto. Comparando-se a

presença de flavonóis 3-O-glicósidos, 3,7-di-O-glicósidos, e 3-O-soforósidos na planta hospedeira, verificou-se que os derivados com sofrorose foram principalmente sequestrados e acumulados no corpo da *P. brassicae*, enquanto os restantes foram preferencialmente excretados (122). Deste modo, a eficiência do sequestro dos flavonóides aparentemente depende dos açúcares ligados à genina. Por exemplo, os ramnosilflavonóides são sequestrados de forma menos eficaz do que os respectivos glucósidos ou galactósidos. O mesmo acontece com os derivados multiglicosilados, que são muito polares e, por isso, menos sequestrados do que os 3-O-glucosilflavonóides e os 3-O-galactosilflavonóides simples.

A relação *P. brassicae* / *Brassica* spp. será aprofundada mais adiante (item 2.4.2.).

Assim, as diferenças apresentadas entre as plantas e os insectos e as alterações nos perfis de flavonóides durante o seu desenvolvimento podem ser devidas a mecanismos selectivos (excreção e sequestro), assim como à biotransformação pelos próprios insectos (117).

Do atrás exposto é então possível verificar que:

- As larvas podem seleccionar apenas determinadas fracções entre a panóplia de flavonóides presentes na planta hospedeira, sequestrando apenas uma parte específica;
- Os flavonóides sequestrados pela larva são sujeitos a processos metabólicos (65, 70), podendo ser acumulados e transferidos para as asas durante a fase final do estado de pupa (118);
- O conteúdo em flavonóides, de borboletas da mesma espécie, pode variar drasticamente de acordo com a planta hospedeira na fase de larva (65, 116-118);
- As borboletas fêmeas têm tendência a ser mais ricas em flavonóides que os machos (65, 116, 117).

De uma forma geral, a captação de flavonóides pelos insectos aumenta a sua capacidade de sobrevivência (110). Diferentemente de outros metabolitos secundários acumulados pelos herbívoros para a sua defesa ou para síntese de feromonas, os compostos fenólicos estão implicados na protecção dos insectos contra as radiações nocivas e estão envolvidos na comunicação visual intra ou interespecífica, devido à sua capacidade de absorção no UV (65, 123). Diversos estudos sugerem que a acumulação destes compostos nas asas pode desempenhar um papel importante num contexto comportamental, tal como o reconhecimento de espécies ou de parceiros sexuais (10, 118). Outras vantagens incluem a protecção dos ovos e das larvas recém-eclodidas da radiação UV e a defesa química contra predadores e patogéneos (65, 116, 118, 120).

Tem sido sugerido que os flavonóides sequestrados têm também uma função de protecção dos insectos contra o stress foto-oxidativo, particularmente quando estes ingerem e interagem com compostos fototóxicos ou fotolábeis que são sequestrados nos tecidos corporais (10, 118). Tal como nos mamíferos, os compostos fenólicos das plantas podem ainda ter propriedades antioxidantes benéficas para os insectos que os ingerem (114).

Além dos flavonóides, outras classes de compostos fenólicos são importantes na interacção insecto-planta, como os fenilpropanóides (por exemplo, ácidos cafeico e ferúlico e eugenol) (124). Alternativamente, certos compostos, tais como salicilato de metilo (MeSA) e benzoato de metilo, podem surgir directamente do isocorismato na via do xiquimato (Figura 8) (124). Ambos os compostos têm um papel importante na interacção insecto-planta, pois a sua libertação é muitas vezes induzida após ataque dos herbívoros ou agentes patogénicos (125-127). Além disso, o MeSA actua como um composto de sinalização dentro da planta, conduzindo a resistência sistémica (126).

2.4.1.4. Compostos voláteis

Os compostos voláteis correspondem a uma vasta gama de compostos com características muito diferentes entre si. São geralmente compostos de baixo peso molecular, com baixo ponto de ebulição e pressão de vapor elevada à temperatura ambiente (2).

Acredita-se que os compostos voláteis exercem efeitos protectores nas plantas, principalmente devido à sua actividade antimicrobiana e anti-herbívoro, na qualidade de repelentes para herbívoros e agentes patogénicos. Alguns destes compostos têm também a capacidade de atrair artrópodes que devoram ou parasitam os herbívoros, minimizando assim danos adicionais aos tecidos da planta. Além disso, estudos recentes têm demonstrado que estes compostos desempenham um papel importante na comunicação planta-planta: plantas não danificadas podem responder de forma adaptativa com as informações químicas que lhes são emitidas por vizinhos danificados (128) (Figura 15). Adicionalmente, algumas destas moléculas têm a capacidade de sequestrar espécies reactivas de oxigénio, protegendo o organismo contra danos oxidativos internos (124, 129).

De modo geral, as plantas produzem e libertam pequenas quantidades de compostos voláteis. As reservas constitutivas de compostos voláteis incluem normalmente monoterpenos, sesquiterpenos e compostos fenólicos de baixo peso molecular que são acumulados em glândulas especializadas ou em pêlos glandulares. No entanto, quando atacado por um insecto herbívoro, uma maior diversidade e uma

quantidade superior de compostos voláteis é libertada, constituindo o primeiro mecanismo de defesa das plantas. A indução da produção destes compostos por parte de uma planta atacada por um herbívoro acredita-se ser desencadeada por indutores presentes nas secreções orais deste (130-132). Dois tipos de indutores foram isolados das secreções orais de herbívoros de lepidópteros, que intensificam a resposta de defesa por parte da planta: a β -glicosidase, isolada de larvas de *P. brassicae* (133) e a N-(17-hidroxinolenoil)-L glutamina, ou volicitina, de larvas de *S. exigua* (132, 134).

O perfil de compostos voláteis libertados varia de acordo com a espécie da planta e do insecto envolvidos. No entanto, a estrutura dos compostos voláteis que são emitidos a partir de diferentes plantas resultantes de um ataque de insectos são muito semelhantes (124), o que sugere não só que há activação de um conjunto de vias biossintéticas compartilhadas por uma grande variedade de plantas, mas também que os compostos resultantes podem ser reconhecidos por um número igualmente elevado de insectos parasitas e predadores (Figura 15).

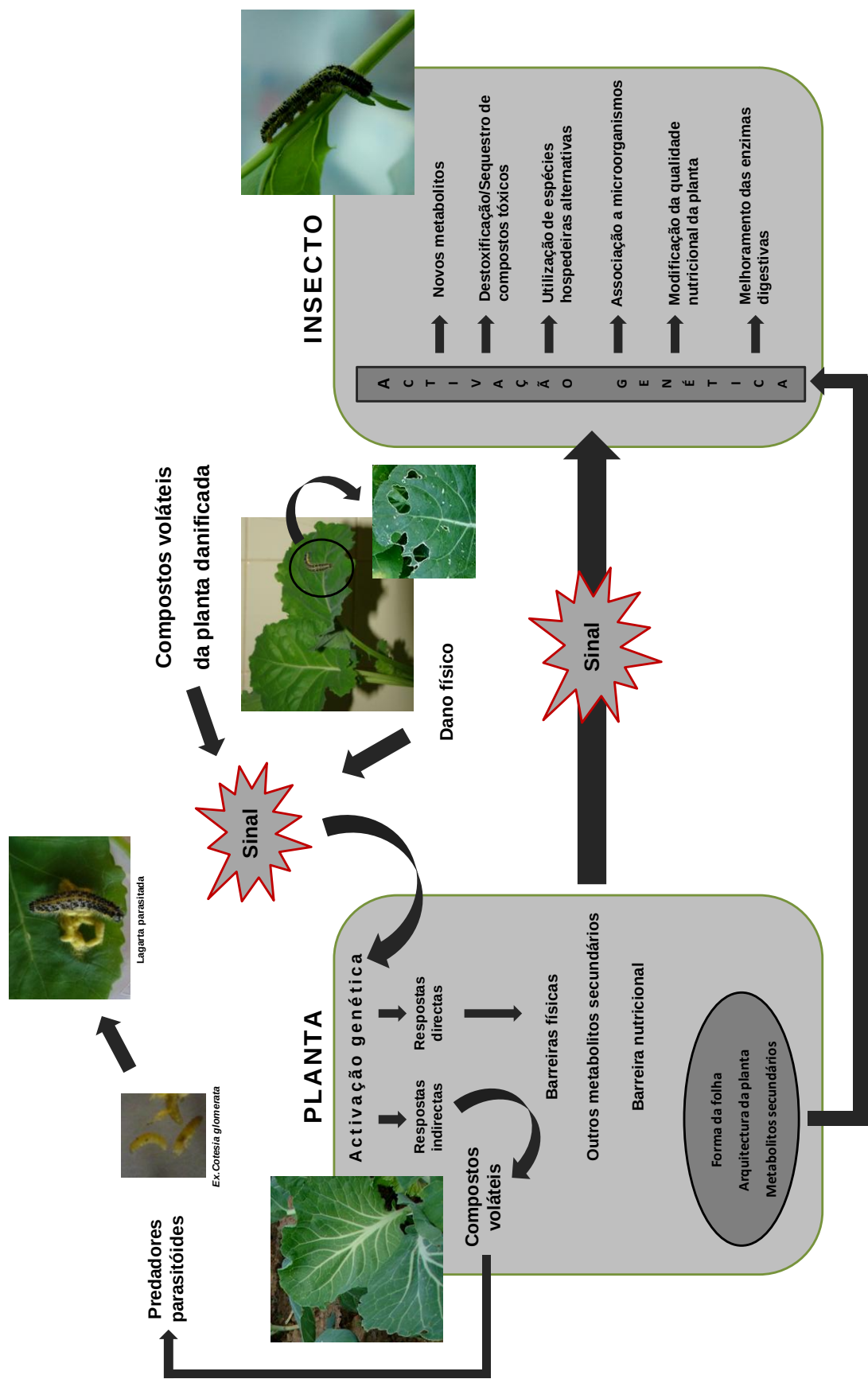


Figura 15. Interações entre as plantas e os insectos.

A variedade de compostos voláteis libertados por uma planta danificada por um insecto é muito diferente da libertada pela planta intacta ou da lesada de forma mecânica. Quando as folhas são danificadas mecanicamente são também produzidos e libertados compostos voláteis, normalmente uma mistura de álcoois saturados e insaturados, aldeídos e ésteres produzidos pela quebra oxidativa autolítica dos lípidos da membrana (135).

Independentemente de serem libertados por acção mecânica ou por ataque de insectos, os compostos voláteis podem exercer a sua função de protecção de duas formas: pela repulsão de uma série de potenciais herbívoros devido à sua natureza tóxica e/ou pela atracção de outros insectos que capturam ou parasitam os herbívoros atacantes (Figura 15) (5, 6, 135).

Em oposição aos insectos polinizadores, que têm como alvo flores de espécies bem definidas e usam habitualmente a visão para encontrar a flor que lhes é comum (para o qual contribui muitas vezes o perfil de absorção no UV dos flavonóides), os parasitas e predadores dos insectos herbívoros não o podem fazer, devido ao pequeno tamanho e camuflagem das presas que habitam a parte inferior das folhas. Assim, a sinalização química decorrente de uma planta danificada por um herbívoro assume uma posição preponderante no chamamento destes predadores ao local, funcionando como uma defesa indirecta da planta atacada (135, 136). A diferente resposta das plantas a distintos herbívoros pode estar relacionada com alguns compostos voláteis minoritários (53).

Como exemplo destes factos temos o caso da *P. brassicae*, cujas larvas, ao se alimentarem, induzem uma resposta sistémica por parte da planta que vai afectar o herbívoro atacante atraindo um dos seus parasitas, a *Cotesia glomerata*. A β -glucosidase presente no regurgitado da larva do lepidóptero provoca a libertação de compostos orgânicos voláteis que atraem o parasita (53, 135).

A *C. glomerata* parasita várias espécies de lepidópteros, nomeadamente as larvas da *P. brassicae* (Figura 16) (137). Connor et al. (138) relataram que, após ser atacada pela *P. brassicae*, a *Brassica oleracea* var. *gemmifera* é significativamente mais atractiva para fêmeas de *C. glomerata* do que as plantas intactas que serviram de controlo. As fêmeas de *C. glomerata* têm a capacidade de detectar terpenos e outros compostos das plantas através das suas antenas e de aprender a preferir cheiros diferentes quando recompensadas (139). Vários outros estudos, envolvendo *P. brassicae* e variedades de *B. oleracea*, mostraram que plantas com níveis aumentados de monoterpenos e sesquiterpenos são mais atraentes para as fêmeas de *C. glomerata* (139, 140). Os compostos voláteis responsáveis pelo odor a folhas verdes ou frescas ("green-leaf volatiles"), nomeadamente álcoois (C_6), aldeídos, ésteres, salicilato de metilo, entre

outros, também desempenham um papel importante na atracção da *C. glomerata* (141-143).

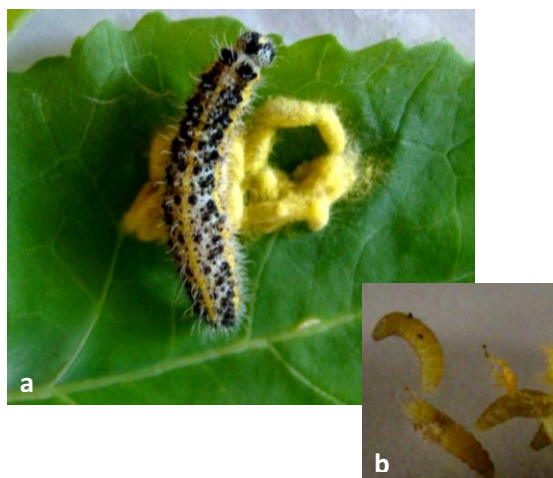


Figura 16. Larva de *P. brassicae* parasitada com *C. glomerata* (a); *C. glomerata* (b).

Em paralelo, os insectos desenvolveram também estratégias para ultrapassar as barreiras que as plantas lhes impõem, criando diferentes padrões de associação às plantas hospedeiras, acoplados a diferentes estratégias de alimentação adequadas à exploração do hospedeiro (3). Deste modo, alguns insectos sequestram compostos da planta hospedeira e usam-nos como feromonas sexuais ou seus precursores. Outros insectos produzem ou libertam feromonas sexuais em resposta a plantas específicas e utilizam sinergicamente alguns compostos libertados pela própria planta para aumentar a resposta dos outros insectos às suas feromonas sexuais (144).

A origem, as funções e algumas das propriedades dos compostos voláteis com importância para a interacção insecto-planta encontram-se descritas nas secções seguintes.

2.4.1.4.1. Derivados de ácidos gordos – Via lipoxigenase

Os compostos voláteis derivados dos ácidos gordos constituem uma vasta classe. Estes resultam dos ácidos gordos insaturados C_{18} , como por exemplo o ácido linoleico e/ou α -linolénico, que são libertados, por exemplo, da membrana danificada, quando a planta é atacada (145). Os ácidos gordos são depois dioxigenados por lipoxigenases (LOX). Os compostos daí resultantes são metabolizados pelo um conjunto de enzimas, incluindo a aleno óxido sintase (AOS) e a hidroperóxido liase (HPL), que representam dois ramos da via das lipoxigenases produzindo compostos voláteis (Figura 17) (145).

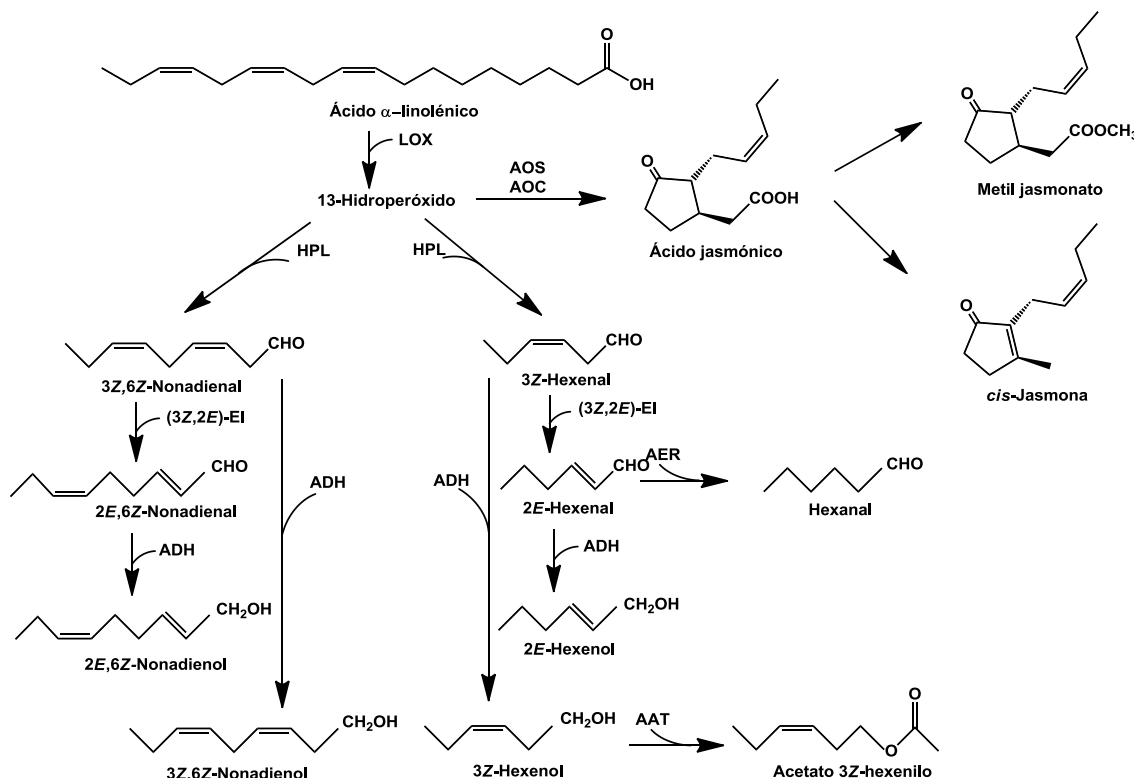


Figura 17. Via Lipoxigenase. Abreviaturas: AAT, álcool aciltransferase; ADH, álcool desidrogenase; AER, alceno óxido redutase; AOC, alceno óxido ciclase; AOS, alceno óxido sintetase; LOX, lipoxigenase; 3Z,2E-EI, 3Z,2E-enal isomerase; HPL, hidropoxidase liase [adaptada de (1)].

No ramo da AOS uma série de reações enzimáticas leva à formação do ácido jasmônico (JA), que por sua vez pode ser convertido num derivado volátil, o metil jasmonato (MeJA) (124, 146). Tem sido sugerido que o ácido jasmônico é um componente chave na regulação da sequência de transdução, desencadeando a síntese e liberação de vários compostos voláteis pelas plantas (147). Os compostos derivados do ácido jasmônico também podem estimular outros processos fisiológicos e de defesa nas plantas (148), incluindo a produção de toxinas (nicotina e flavonóides), proteínas antidigestivas (inibidores de proteases) e enzimas antinutritivas (polifenoloxidas) (144).

No ramo da HPL, a clivagem dos ácidos gordos mediada por esta enzima resulta na formação de aldeídos de cadeia curta (C_6 e C_9) e álcoois voláteis (149). Estes aldeídos C_6 , como o (Z)-3-hexenal, e álcoois, por exemplo, (Z)-3-hexen-1-ol, são emitidos principalmente quando a folha é danificada mecanicamente. No entanto, estes compostos também podem ser libertados, mesmo quando os tecidos da planta não são danificados, especialmente após exposição a condições de stress extremo (150).

Os compostos voláteis possuem uma infinidade de funções fisiológicas e ecológicas. Além das suas propriedades antimicrobianas, estes compostos também podem influenciar o comportamento e o desempenho dos insectos herbívoros (149).

2.4.1.4.2. Compostos de azoto e de enxofre

Os compostos contendo azoto e enxofre podem ser específicos de determinados grupos taxonómicos de plantas por resultarem da degradação dos glucosinolatos. Tal como referido anteriormente, os glucosinolatos são encontrados principalmente na família Brassicaceae, que inclui várias culturas importantes, e representam exemplos clássicos de compostos de plantas que afectam a interação com insectos (151).

Apesar dos glucosinolatos intactos conferirem resistência a insectos herbívoros (152), as propriedades defensivas deste tipo de compostos são reforçadas pela sua hidrólise através da enzima mirosinase, que é uma tioglucosidase armazenada em células especiais que se encontram em todos os órgãos vegetais (153).

As plantas que acumulam glucosinolatos contêm sempre mirosinase, que hidrolisa a glucose do esqueleto principal (Figura 18). As mirosinases são o único grupo de tioglucosidases conhecido na natureza e usam apenas os glucosinolatos como substrato, não tendo qualquer actividade para outros O-glucósidos ou S-glucósidos *in vitro* (47).

Após o dano tecidular, a enzima e o substrato entram em contacto, levando à hidrólise da ligação tioglicosídica e à libertação de uma glucose e de uma genina instável, o tio-hidroxamato-O-sulfonato. Esta sofre um rearranjo espontâneo levando à formação de vários produtos: isotiocianatos, nitrilos e enxofre elementar, tiocianatos, epitionitrilos, oxazolidina-2-tionas ou compostos indólicos (Figura 18) (46).

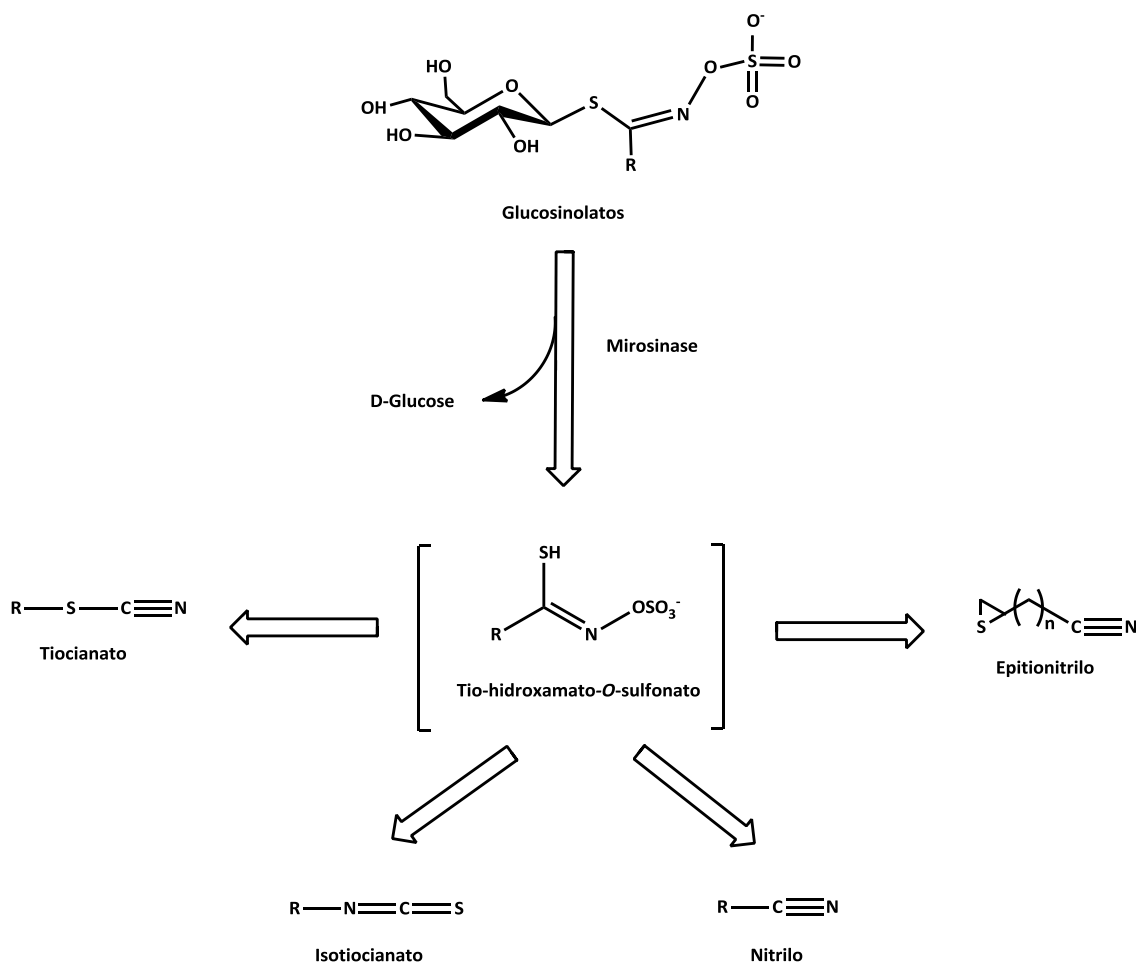


Figura 18. Representação esquemática da quebra dos glucosinolatos. R dependente do aminoácido precursor [adaptada de (1)].

A estrutura química do composto resultante depende da estrutura do glucosinolato, da isoenzima de mirosinase, das condições do meio em que ocorre a reacção (por exemplo, o pH) e da presença de cofactores (como é o caso de certos iões, como o Fe^{2+} , ou da proteína epitio-específica) (9, 21, 22, 45, 51, 154).

Em meio neutro, o rearranjo da genina origina geralmente um isotiocianato, mas se o meio for ligeiramente ácido, e na presença de iões ferrosos, forma-se enxofre e nitrilos. Podem também formar-se tiocianatos, particularmente se a genina for um derivado do triptofano (46). Assim, a pH entre 6 e 7, os produtos resultantes são isotiocianatos estáveis, excepto se os glucosinolatos possuírem uma cadeia lateral β -hidroxilada ou indólica; os isotiocianatos β -hidroxilados são instáveis e espontaneamente ciclizam em oxazolidina-2-tonas, enquanto os isotiocianatos indólicos sofrem lise (21, 45). Como resultado forma-se o álcool correspondente, que condensa em dímeros, trímeros e tetrameros. Na presença de ácido ascórbico os maiores produtos são o

ascorbigénio e o tiocianato (Figura 18) (45). Os isotiocianatos são os produtos dos glucosinolatos aos quais é atribuída a maior parte da actividade biológica dos glucosinolatos (47).

Após o dano tecidular a própria planta pode ter necessidade de destoxificar os compostos residuais activos. No entanto, não se conhece a forma como a planta destoxifica isotiocianatos e outros produtos resultantes da hidrólise dos glucosinolatos. Enzimas como nitrilases e metiltransferases têm sido sugeridas como catalizadoras da destoxificação de nitrilos e tiocianatos, respectivamente (42).

Algumas larvas especialistas, como é o caso da *P. brassicae*, têm a capacidade de redireccionar o curso normal da reacção de hidrólise catalisada pela mirosinase (155): em vez de produzirem os isotiocianatos tóxicos, a hidrólise é redireccionada para a formação de nitrilos, que são então excretados pelas larvas. Este processo deve-se a uma proteína intestinal (proteína específica de nitrilos - NSP) (156). No entanto, os nitrilos derivados dos glucosinolatos também podem exercer efeitos tóxicos se não forem eliminados (9).

2.4.1.4.3. Terpenos

Os isoprenóides, terpenos ou terpenóides são os compostos mais abundantes e estruturalmente mais diversos que existem na natureza (157). Os terpenos podem ser sintetizados por duas vias: mevalonato e 1-desoxi-D-xilulose, localizada no citosol e nos plastídeos, respectivamente (Figura 19). A via da 1-desoxi-D-xilulose parece ser importante na libertação de monoterpenos após indução pelo ácido jasmónico que, em termos de resposta da planta, tem um efeito similar à infestação por herbívoros. Por outro lado, compostos constitutivos da planta são sintetizados através da via do mevalonato (158).

Os isoprenóides são classificados de acordo com o número (n) de unidades básicas de isopreno ($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$) em hemiterpenos (n=5), monoterpenos (n=10), sesquiterpenos (n=15), diterpenos (n=20), triterpenos (n=30), tetraterpenos (n=40, carotenóides) e politerpenos (n>40) (159) (Figura 19).

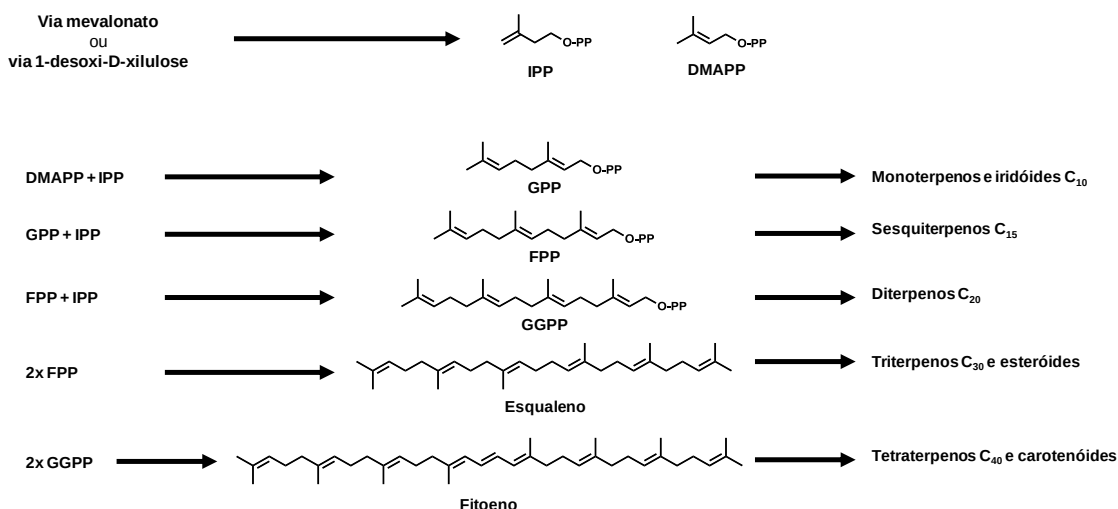


Figura 19. Representação esquemática da biossíntese dos vários isoprenóides. Abreviaturas: IPP, isopentenilo pirofosfato; DMAPP, dimetilalilo pirofosfato; GPP, Geranilo pirofosfato; FPP, Farnesilo pirofosfato; GGPP, geranilgeranilo pirofosfato [(adaptada de (2))].

Os terpenos desempenham um papel importante na interação entre plantas e insectos herbívoros, actuando quer nas defesas directas quer nas indirectas (160). As funções dos terpenos na defesa da planta são inúmeras, como o estímulo para os insectos envolvidos na polinização, repelentes para predadores, inibidores do crescimento, dissuasores da alimentação, agentes antimicrobianos, especialmente contra fungos, e factores de crescimento (157). Estes compostos são os libertados preferencialmente pela planta na resposta sistémica que desenvolve aquando um ataque por insectos.

Por exemplo, nas larvas de lepidópteros, os terpenos bloqueiam os efeitos estimulantes da sacarose, glucose e inositol sobre os quimiorreceptores localizados no aparelho bucal, tornando assim o alimento menos apelativo para o insecto (160).

Na planta a emissão de terpenos pode também ser uma pista interna para indicar a presença de herbívoros, permitindo a indução de defesas nos tecidos vizinhos. A maioria dos monoterpenos e sesquiterpenos são bons elementos de comunicação a longas distâncias, pois apresentam um baixo peso molecular e são moléculas lipofílicas, com elevadas pressões de vapor à temperatura normal. Além disso, a grande variedade estrutural dos terpenos presentes permite que as mensagens sejam muito específicas (130). Estes compostos atraem predadores e parasitóides que atacam os herbívoros (130), sendo os monoterpenos e sesquiterpenos os principais grupos envolvidos nesta atração (161). A comunicação através dos terpenos voláteis não se restringe à parte

aérea das plantas. Foi relatado que o ataque de insectos em raízes de milho provoca a libertação de um sesquiterpeno, (*E*)- β -cariofileno, que atrai nemátodes que atacam as larvas de insecto (162). Aparentemente este sesquiterpeno difunde-se rapidamente através do solo, podendo assim funcionar como um sinal de defesa.

Os insectos adaptados podem também acumular estes compostos e utilizá-los em proveito próprio. Por exemplo, o limoneno e o terpineol foram descritos como feromonas sexuais na *Megacyllene caryae* (163). Outro exemplo é o mentol, um composto com conhecidas propriedades antimicrobianas (164).

2.4.1.4.4. Norisoprenóides

Os norisoprenóides são normalmente produzidos através da clivagem oxidativa e posterior modificação dos carotenóides. Tal como os seus precursores, estes são isoprenóides não polares que possuem um sistema de duplas ligações conjugadas, o que justifica as suas propriedades antioxidantes (54). Dependendo do carotenóide precursor e da posição de clivagem podemos obter uma grande variedade de norisoprenóides. Esta quebra pode ocorrer por via enzimática ou não-enzimática. A via não-enzimática compreende a foto-oxigenação, a auto-oxidação e a degradação térmica. A quebra enzimática pode ser realizada por diversas enzimas, como, por exemplo, as carotenóide oxigenases (CCO), carotenóide dioxigenases (CCD), lipoxigenases (LOX), xantina oxidase (XO), fenoloxidasas e peroxidases. Os carotenóides podem ser clivados nas posições C9 a C13, sendo os produtos resultantes da última os mais comuns na Natureza (159) (Figura 20).

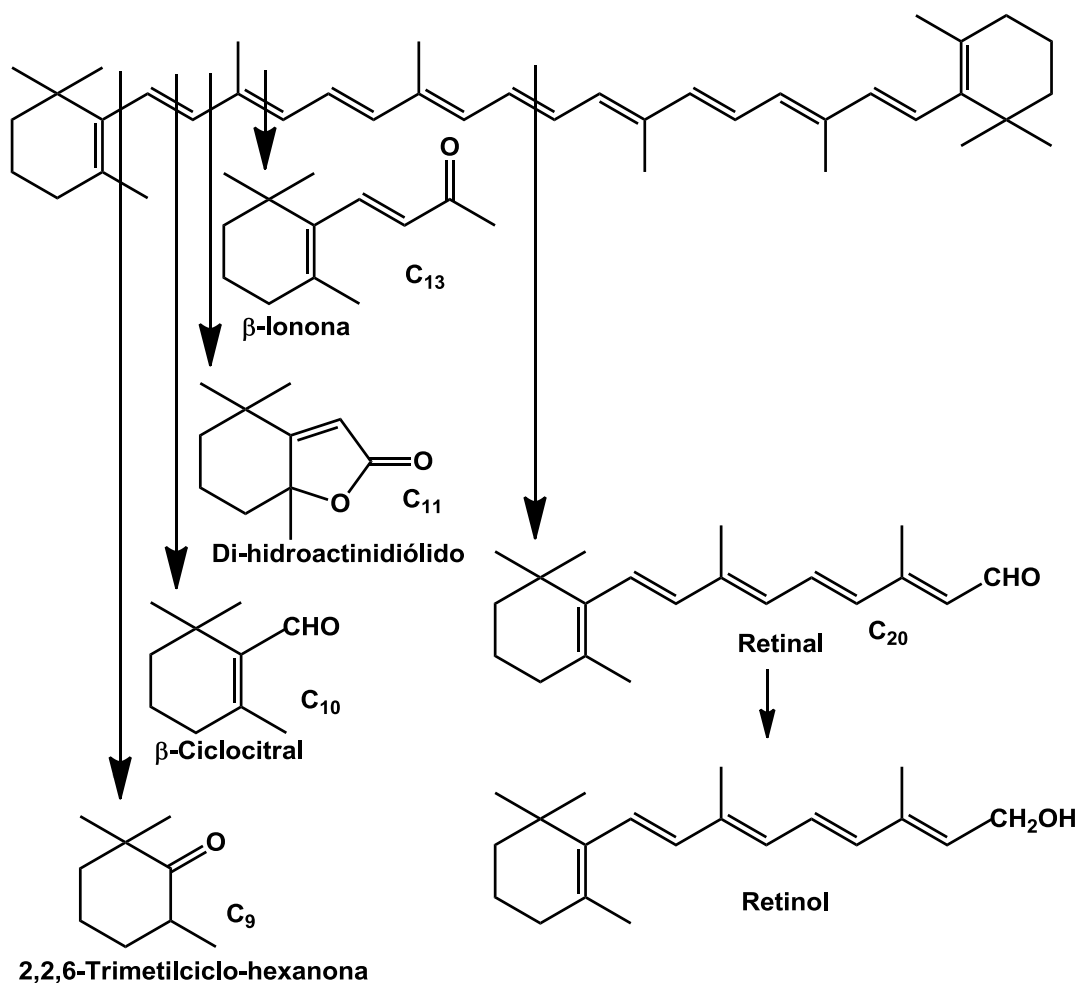


Figura 20. Produtos da quebra oxidativa do β -caroteno [adaptada de (2)].

Os norisoprenóides estão envolvidos na defesa da planta, actuando como repelentes para os insectos e certos animais, como agentes antimicrobianos especialmente contra fungos e podem também funcionar como factores de crescimento (159).

2.4.1.5. Ácidos Orgânicos

Contrariamente aos animais e aos microorganismos, as plantas têm a capacidade de acumular estes metabolitos primários. O tipo de fixação de carbono, as actividades catabólicas ou o estado nutricional da planta são alguns dos factores que afectam a quantidade em que estes compostos são acumulados nos vacúolos celulares (89). Para além destes, outros factores, como a idade da planta e o tipo de tecido, condicionam o perfil em ácidos orgânicos, resultando na predominância de alguns ácidos sobre outros

(165, 166). A natureza dos ácidos orgânicos e a acumulação de ácidos orgânicos nas plantas deve-se provavelmente ao seu papel na fotossíntese, sendo também factores importantes nas características organolépticas dos frutos e vegetais, nomeadamente o sabor.

2.4.1.5.1. Relação com insectos

Levenbook e colaboradores (167) estudaram os níveis de ácido cítrico na hemolinfa de insectos de seis Ordens diferentes alimentados com diversas plantas. Os valores deste ácido orgânico encontrado na fase larvar foram superiores aos observados nos adultos correspondentes; no entanto, em todos os casos, superaram o teor encontrado no sangue de outros organismos. O valor de ácido cítrico na hemolinfa de *Prodemia eridania* não foi afectado pela mudança da dieta. Durante a parte inicial da metamorfose verificou-se uma acentuada diminuição do ácido cítrico total nas pupas de *P. eridania* e *Phormia regina* e estes baixos níveis foram mantidos durante o desenvolvimento do adulto (168).

A mesma equipa detectou vários ácidos tricarboxílicos intermediários do ciclo de Krebs na larva de *P. eridania*, provando a ocorrência de uma elevada taxa de respiração endógena na larva. Todas as enzimas que participam no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, dando origem aos vários ácidos foram encontradas no extracto desta larva (168).

Assim, embora possa haver alguma acumulação deste tipo de compostos, não é da dieta que o herbívoro os adquire, sendo ele próprio capaz de os sintetizar para realizar as suas próprias funções metabólicas (167, 168).

2.4.2. Sistema *Pieris brassicae* / *Brassica* spp.

Os estudos relativos ao relacionamento entre a *P. brassicae* e o género *Brassica* são poucos e os existentes foram desenvolvidos pelo nosso grupo de trabalho. Assim, foram estudados os perfis fenólicos de materiais de *P. brassicae* correspondentes aos seus diferentes estados de desenvolvimento (larvas, borboletas e exúvias), bem como os excrementos produzidos durante a sua fase larvar, tendo como plantas hospedeiras a *B. oleracea* var. *costata* (couve tronchuda) e *B. rapa* var. *rapa* (nabiça) (121, 122, 169, 170).

As folhas de *B. rapa* var. *rapa* e de *B. oleracea* var. *costata* são caracterizadas pela presença de vários flavonóides glicosilados, acilados e não acilados, e derivados de ácidos hidroxicinâmicos (121, 122, 169-171). Estes tipos de compostos foram

encontrados na larva e nos excrementos de *P. brassicae*, estando ausentes nas borboletas e nas exúvias.

O flavonóide mais abundante nos excrementos de *P. brassicae* alimentada com *B. rapa* var. *rapa* (122, 169) foi o campferol-3-O-sofórosido, resultante de desglicosilação na posição 7 e de desacilação (dos açúcares na posição 3) de outros derivados de flavonóides também presentes na planta hospedeira. No entanto, num estudo anterior (172), envolvendo o mesmo herbívoro mas alimentado com *B. oleracea* var. *costata*, o campferol-3-O-soforósido foi encontrado nas larvas mas não nos excrementos, mostrando que, neste caso, essa transformação metabólica não foi tão acentuada. Os autores sugeriram que a ausência deste composto possa ser devida à menor quantidade de campferol-3-O-soforósido na planta hospedeira, ou dos compostos acilados que possam originá-lo, apoiando a hipótese da ocorrência de acumulação total deste composto por parte do insecto (121).

Além disso, foram encontrados flavonóides sulfatados nos excrementos, que não estavam presentes na planta a partir da qual a larva se alimentou (119, 169), apontando para um processo de metabolização que envolve a sulfatação.

Em suma, os processos metabólicos que ocorrem na *P. brassicae* envolvem a desglicosilação em C7, a desacilação e sulfatação dos compostos fenólicos obtidos da sua dieta (121, 122, 169, 170). Os resultados obtidos reforçam a importância da composição do material vegetal para o perfil metabólico que surge após a alimentação, sendo altamente dependente da planta hospedeira (1).

Deste modo, podemos verificar o elevado potencial químico e biológico deste sistema ecológico, justificando assim o aprofundamento deste tema.

2.5. Caracterização do perfil metabólico

A preparação de amostras biológicas deve seguir procedimentos que garantam que não ocorrem alterações entre a colheita e os ensaios de caracterização química e de actividade biológica. Para isso, a actividade enzimática tem que ser rapidamente interrompida. A ultra-congelação em azoto líquido é muito eficaz, mas é necessário ter o cuidado de não descongelar parcialmente as amostras antes de extrair os metabolitos. A liofilização permite uma manipulação mais fácil das amostras e evita a actividade enzimática (173).

As condições de extracção, nomeadamente a temperatura, o tempo, e o solvente de extracção, têm uma grande influência no tipo e quantidade de metabolitos extraídos (87). O processo de extracção deve ser um compromisso entre a recuperação de

algumas classes de compostos e a minimização da decomposição de metabolitos mais sensíveis (173). Adicionalmente, quando se pretende estudar a actividade biológica de plantas utilizadas na alimentação humana, é de todo o interesse que as condições de extracção mimetizem o seu modo de preparação habitual.

2.5.1. Compostos fenólicos

Apesar de amplamente distribuídos na natureza, os compostos fenólicos podem funcionar como marcadores taxonómicos e geográficos de várias plantas e produtos delas derivadas. Por esta razão desenvolveram-se métodos de análise cada vez mais sensíveis, fiáveis e que permitem obter uma maior quantidade de informação (174).

Um dos métodos mais utilizados na separação destes compostos é a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

2.5.1.1. Separação de compostos por HPLC

A separação por HPLC é feita em colunas com micropartículas empacotadas de diâmetro reduzido, normalmente de 3 a 10 μm . Estas pequenas partículas conferem uma elevada superfície de contacto, sendo que o solvente tem de ser bombeado pela coluna sobre elevada pressão (174).

A fase estacionária pode ser de dois tipos: normal ou reversa. Em fase normal a polaridade da fase estacionária é superior à da fase móvel, utilizando-se normalmente colunas de gel de sílica. Em fase reversa a polaridade da fase estacionária é inferior à da fase móvel, utilizando-se sílica modificada. A sílica é modificada através da ligação química de vários grupos funcionais. Nas colunas de fase reversa, contrariamente às de fase normal, os compostos polares eluem mais rapidamente do que os compostos não-polares. Desta forma, a cromatografia de fase reversa é particularmente útil para a análise de compostos polares ou moderadamente polares e termolábeis como os polifenóis (175). A separação baseia-se na diferença de afinidade dos compostos entre a fase estacionária e a fase móvel (176). Actualmente quase todos os estudos envolvendo compostos fenólicos e a sua separação por HPLC são realizados em colunas de fase reversa.

Para a análise de heterósidos flavonoídicos a coluna deve ser “end-capped”, isto é, com uma segunda funcionalização da sílica para reduzir os grupos silanol residuais, uma vez que estes grupos interagem com os açúcares, diminuindo a qualidade da separação (177).

A presença de compostos muito semelhantes nas amostras obriga à utilização de gradientes de eluentes mais complexos e maiores tempos de separação (175, 178). Habitualmente utiliza-se um gradiente com um sistema de eluentes binário, isto é, água acidificada e metanol ou acetonitrilo como modificador orgânico (178).

Na análise de compostos fenólicos o solvente mais utilizado é o metanol. Geralmente são incluídas nas fases móveis pequenas concentrações de ácidos que impedem a ionização de grupos acídicos presentes na amostra, permitindo obter melhores resoluções porque favorecem a simetria dos picos. Com a acidificação, os grupos hidroxilo fenólicos são mantidos na sua forma acídica, aumentando assim o tempo de permanência dos compostos na coluna e diminuindo o alargamento dos picos que é causado pela desprotonação. Os ácidos mais usados são o fórmico, o acético, e mais raramente o trifluoroacético que, por serem voláteis são compatíveis com os sistemas de HPLC acoplado com espectrometria de massa (MS) (87). Destes, o ácido fórmico normalmente origina melhores resultados que o acético. Enquanto a adição do ácido fórmico só afecta a resolução, a adição de ácido acético também diminui consideravelmente o tempo de retenção, o que pode ser explicado pela sua menor capacidade de formar pares iónicos. Como consequência, utilizam-se muitas vezes menores concentrações de ácido acético na fase móvel para obter melhores resoluções. Além disso, em HPLC-MS a acidificação suprime a desprotonação e consequentemente diminui a eficiência de ionização no modo negativo, conseguindo-se melhores resultados se a acidificação for limitada. Um eluente adequado deve permitir a formação de iões em solução e uma nebulização e dessolvatação fáceis. Em termos de sensibilidade, o ácido acético dá melhores resultados do que o ácido fórmico (177, 179).

2.5.1.2. Detecção

Os compostos fenólicos absorvem na zona do ultra-violeta devido à existência de ligações duplas conjugadas e anéis aromáticos. Face a estas características, o detector universal para este tipo de compostos é o de UV. Este tipo de detecção não é destrutivo, o que representa uma vantagem quando se pretende utilizar subsequentemente um outro sistema de detecção para aquisição de mais informação, ou quando se pretende proceder ao isolamento dos compostos. A disponibilidade de detectores de matriz de díodos (DAD) aumenta a possibilidade de identificação dos compostos e permite o registo dos cromatogramas a diferentes comprimentos de onda com uma só injeção: este detector faculta o espectro de UV de cada composto eluído (que é característico de cada classe de flavonóides e de ácidos fenólicos) que, juntamente com o tempo de retenção, constituem dois parâmetros importantes no processo de identificação dos compostos

(180, 181). Os espectros de UV/vis são muito úteis na identificação das geninas, mas para a identificação dos seus derivados presentes nas amostras é muitas vezes necessário recorrer aos detectores de massa.

A combinação da cromatografia líquida como método de separação e dos detectores de matriz de diodos e de MS na identificação dos compostos é actualmente a técnica mais usada para obter o perfil fenólico de extractos de plantas. Os dois detectores podem fornecer informação “*on-line*” para cada pico individual do cromatograma, tornando possível a sua identificação por comparação com espectros de UV-vis e de massa de bibliotecas e por comparação com padrões (182).

Em termos de quantificação individual de cada composto fenólico, o método mais indicado é aquele que relaciona a concentração do composto com a área do pico cromatográfico obtido. Contudo a inexistência de substâncias de referência, que permitiriam definir as características de absorção do composto, são um factor limitante (183, 184).

2.5.1.2.1. Espectros de UV de ácidos cinâmicos

Os ácidos cinâmicos absorvem em duas zonas do espectro de UV, observando-se um primeiro máximo entre 225 e 235 nm e dois outros, muito próximos, entre 290 e 330 nm. A dupla absorção nesta segunda região deve-se à presença de isómeros *cis* e *trans*, e a importância de cada máximo (a sua absorvência relativa) depende da quantidade de cada um dos isómeros (86). Por exemplo, quando o padrão de substituição nos ácidos cinâmicos é simétrico (no caso dos ácidos sinápico e *p*-cumárico) só se verifica absorção na segunda região do espectro (185).

Os diferentes ésteres de um mesmo ácido apresentam espectros de absorção semelhantes, independentemente da molécula com função álcool (por exemplo, ácido quínico, açúcar, ácido tartárico) interveniente na sua estrutura. No caso dos heterósidos, os espectros de absorção são modificados em função da natureza da ligação, exibindo espectros diferentes do ácido cinâmico correspondente (86, 183).

No que diz respeito aos ácidos benzóicos, estes apresentam uma única região de absorção máxima, entre 235 e 325 nm; apenas as moléculas di-hidroxiladas possuem dois máximos de absorção (86, 181, 183).

2.5.1.2.2. Espectros de UV de flavonóides

O espectro de UV dos flavonóides apresenta geralmente duas zonas de absorção máxima: a banda I, entre 300 e 550 nm, relacionada com o padrão de substituição do anel B e a conjugação do anel C, e a banda II entre 240 e 285 nm, associada ao anel A. A posição e a intensidade relativa de cada um dos máximos fornecem dados importantes para esclarecer o tipo de flavonóide e o seu esquema de oxigenação. De facto, o espectro de UV é influenciado principalmente pela oxigenação, sabendo-se que, na generalidade, um aumento desta provoca desvio das bandas de absorção para maiores comprimentos de onda (185-187).

A ocorrência de modificações relacionadas com a oxigenação podem ser resumidas do seguinte modo (185):

- Desvio batocrómico, associado ao aumento da oxigenação, especialmente a hidroxilação;

- Desvio hipsocrómico, associado a metilação e a glicosilação, particularmente dos hidroxilos em 3, 5, 7 e 4'. Por exemplo, o campferol com substituição no carbono 3 (Figura 3) apresenta dois máximos a 267 e 349 nm e uma inflexão a 300 nm (18); após hidrólise ácida, no espectro de UV-vis da genina observa-se a banda I a 367-371 nm. Nos glicósidos, a natureza do açúcar não tem qualquer influência. Assim, como os espectros de UV-vis dos heterósidos praticamente não apresentam diferenças, a diferenciação entre os diferentes heterósidos é feita com base no tempo de retenção (por exemplo, os tetraglicósidos podem distinguir-se dos triglicósidos por tempos de retenção mais baixos) (188).

- Presença de um máximo de absorção a 330 nm num flavonóide pode ser devida à ocorrência de ácidos cinâmicos como funções acilo. A maior parte dos resíduos glicosilo e acilo são cromóforos fracos, não permitindo a identificação dos flavonóis seus derivados por HPLC-DAD (178). Contudo, os flavonóides acilados com ácidos hidroxicinâmicos têm um espectro de UV característico, que se assemelha à sobreposição dos espectros do flavonol com o ácido hidroxicinâmico, com um amplo máximo na zona dos 330 nm. A informação estrutural obtida destes espectros é menor do que a obtida dos espectros de UV de flavonóides não acilados ou dos derivados de ácidos hidroxicinâmicos. Pode confirmar-se a presença de um flavonóide acilado fazendo uma hidrólise alcalina e verificando a presença no cromatograma da genina do flavonóide e do ácido hidroxicinâmico (17).

- Presença de um segundo pico (por vezes uma inflexão) na banda II de flavonas e flavonóis deve-se geralmente à existência de um sistema 3',4'-di-hidroxilo.

2.5.1.2.3. Espectrometria de massa

Muitas vezes as matrizes estudadas são tão complexas que não é possível observar o seu espectro de UV ou correspondem a compostos minoritários, que são difíceis de serem caracterizados por meios convencionais. Nestas situações os compostos podem ser detectados por espectrometria de massa.

A espectrometria de massa é uma plataforma analítica com um papel muito importante na evolução da metabolómica e, quando combinada com sistemas cromatográficos de elevada resolução, permite a detecção múltipla de analitos, com elevada sensibilidade e especificidade (189-191).

A associação entre o HPLC e a espectrometria de massa é considerada uma das técnicas mais avançadas para a elucidação estrutural de compostos com estruturas complexas, mesmo quando estas se encontram em quantidades vestigiais (87, 192, 193). Os detectores de massa são detectores universais com grande sensibilidade, que podem fornecer informação sobre a massa molecular do composto.

Porém, muitas vezes os espectros não fornecem toda a informação necessária para estabelecer, sem ambiguidade, a estrutura de um composto desconhecido, sendo necessário recorrer a espectros de massa em série (Tandem MS/MS ou MSⁿ) para obter informação precisa da massa dos iões formados (87, 91).

A espectrometria de massa em série compreende a selecção e isolamento de iões num intervalo estreito de massa/carga (ião precursor), a dissociação por colisão dos iões seleccionados ou isolados, e a análise dos iões obtidos (194).

A principal aplicação da espectrometria de massa é na determinação da massa molecular de um composto. A massa exacta do ião molecular permite calcular a composição elementar da substância em análise. Da análise dos sinais resultantes da fragmentação do composto obtêm-se importantes informações para o esclarecimento da sua estrutura. Apesar de ser um método destrutivo, a reduzida quantidade de composto necessária para análise constitui uma grande vantagem deste método (195).

Usualmente o ião molecular representa o pico de maior intensidade. Além deste, é frequente a observação dos sinais $M^+ -1$, correspondente à perda de hidrogénio, $M^+ -17$, devido à perda de hidroxilo, $M^+ -18$, originado pela perda de água, e $M^+ -28$ e $M^+ -29$, indicando a perda de CO e CHO a partir da função carbonílica, respectivamente. A existência de outros radicais na molécula também pode ser detectada pela presença dos sinais correspondentes à massa molecular subtraída da massa desses radicais (187, 196).

Desta forma, a junção de espectros de UV-vis com os espectros de massa de primeira ordem obtidos fornece muita informação estrutural e permite a caracterização rápida de flavonóides, mesmo quando não existem ou não há disponibilidade de compostos de referência (177).

2.5.1.2.4. Métodos auxiliares

Como auxiliares da determinação estrutural de compostos podem-se usar métodos degradativos. As hidrólises químicas facilitam a identificação de compostos complexos, particularmente ao permitir a separação das geninas de açúcares e de grupos acilo. Para estudar os heterósidos flavonoídicos acilados pode proceder-se a 3 tipos de hidrólise diferentes: hidrólise ácida, hidrólise alcalina e hidrólise enzimática (186).

A hidrólise ácida destina-se à ruptura de ligações hemiacetálicas. É um processo que permite distinguir *O*- de *C*-heterósidos pela resistência destes últimos à hidrólise. Neste processo obtêm-se as geninas e os açúcares. As geninas podem ser posteriormente identificadas por HPLC-DAD ou HPLC-MS. O tempo necessário para a separação da parte glicosídica de um *O*-glicosilflavonóide é determinado pela concentração do ácido, pela natureza do açúcar e pela posição deste no flavonóide. Assim, relativamente à natureza do açúcar, o tempo necessário para a separação dos exemplos seguintes é: ácido glucurónico > glucose = galactose > rarnose; de acordo com a posição do açúcar será: 7-*O*-glicósidos > 4'-*O*-glicósidos > 3-*O*-glicósidos (86, 185).

A hidrólise alcalina é tipicamente usada em compostos acilados. Neste processo corre a quebra de ligações éster, estabelecidas entre um ácido alifático ou aromático e um hidroxilo fenólico de uma genina ou um hidroxilo de um açúcar. Após a hidrólise alcalina de heterósidos flavonoídicos acilados com ácidos hidroxicinâmicos verifica-se o aparecimento dos ácidos hidroxicinâmicos e heterósidos flavonoídicos e o desaparecimento dos derivados acilados. Por vezes o extracto saponificado é usado em HPLC-MS para identificar os heterósidos desacilados. Esta operação permite, por exemplo, distinguir os grupos substituintes glicosilo e cafeoilo que apresentam a mesma perda de massa (-162 u) (11).

A hidrólise enzimática é um método útil para estabelecer a natureza da ligação do açúcar à genina (α ou β). Contudo, açúcares acilados e *C*-glicósidos são resistentes à hidrólise enzimática (86, 185).

2.5.2. Compostos voláteis

Tal como referido anteriormente os compostos voláteis constituem uma das primeiras defesas das plantas aquando do ataque dos insectos. O perfil volátil de uma planta abrange um largo espectro de compostos com diferentes características, normalmente com um baixo peso molecular, podendo ter origens biossintéticas bastantes distintas. Face à grande variedade de compostos é necessário recorrer a técnicas de separação e de identificação bastante sensíveis.

A cromatografia gasosa (GC) acoplada a espectrometria de massa combina duas poderosas técnicas: a primeira permite a separação dos compostos e a segunda a sua detecção e quantificação. Esta combinação tornou-se rapidamente a metodologia mais usada e efectiva no estudo destes compostos (2).

Vários processos extractivos podem ser usados. Na sua escolha deve-se ter em conta aquele que permite obter um perfil mais fidedigno e representativo da matriz em estudo. Nos estudos da interacção insecto-planta deve-se atender a factores adicionais que visam tentar mimetizar as condições que ocorrem na Natureza e evitar ao máximo provocar stress ao insecto.

Estes aspectos serão abordados mais aprofundadamente nas secções que se seguem.

2.5.2.1. Extracção

Várias técnicas de extracção têm sido desenvolvidas para a análise do perfil de compostos voláteis de matrizes naturais. As metodologias tradicionais (destilação, extracção com solventes e Soxhlet e extracção em fase sólida) geralmente implicam vários passos, incluindo a purificação e concentração do extracto (com consequente perda de analito), longos tempos de preparação e utilização de grandes quantidades de solventes orgânicos (197).

Pawlisyn (198) desenvolveu uma técnica de adsorção denominada de microextracção em fase sólida (SPME), considerada como melhoria e substituto dos métodos clássicos de preparação da amostra (199). A SPME é uma técnica de preparação da amostra bem estabelecida para a análise de compostos voláteis e semi-voláteis, apresentando muitas vantagens, entre elas a alta sensibilidade e reprodutibilidade, o facto de ser uma técnica simples, de não envolver solventes, o reduzido custo que apresenta e a combinação de extração e pré-concentração numa única etapa (200).

Esta técnica, baseada em mecanismos de absorção e/ou adsorção, pode ser realizada em três modos diferentes: injeção directa (imersão), extracção no espaço de cabeça (Headspace - HS) e extracção com protecção de membrana (197).

O HS-SPME é o modo mais utilizado por várias razões, sendo a principal a falta de contacto com a amostra, o que reduz a influência da matriz e impede a decomposição ou contaminação do revestimento da fibra (201). Além disso, o tempo necessário para atingir o equilíbrio entre o analito na fase gasosa da amostra e a fase estacionária é menor do que para amostras aquosas, sendo por estas razões recomendado para compostos com alta volatilidade (197). Vários revestimentos estão disponíveis, sendo que a sua escolha deve ter em conta a estrutura química dos compostos alvo.

A selecção cuidadosa da polaridade e da espessura do revestimento permite a extracção de compostos diferentes; no entanto, há outras variáveis igualmente importantes a ter em conta, nomeadamente a agitação, a temperatura, o pH que muitas vezes se faz para ajudar a libertação de alguns compostos (199).

No estudo de sistemas biológicos, como, por exemplo, o sistema insecto-planta, a SPME constitui uma das técnicas de eleição. O HS-SPME é a técnica mais usada pelo facto de não existir contacto entre a amostra e a fibra, tornando possível a análise de amostras *in vivo*, como aconteceu nos trabalhos desenvolvidos nesta tese. Para a detecção destes compostos em sistemas vivos, as questões técnicas devem ser cuidadosamente controladas, tendo sempre como objectivo primordial minimizar os níveis de stress dos organismos, reduzindo assim a interferência desse factor nos resultados (202), como foi já dito.

2.5.2.2. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

A cromatografia gasosa é uma técnica poderosa de análise de compostos voláteis. As misturas são injectadas numa corrente de gás inerte e arrastadas pela coluna.

A detecção é baseada na produção de iões a partir do analito. Este é ionizado em alto vácuo e os seus iões e produtos de fragmentação são impelidos e focados através de um analisador de massa magnética, para serem depois colhidos. A quantidade de cada ião seleccionado é medida num detector. A combinação do GC e da MS permite separar misturas complexas, identificar e elucidar a estrutura dos compostos, bem como realizar a sua análise quantitativa (2).

2.5.3. Ácidos orgânicos

Devido às suas características químicas, os ácidos orgânicos são solúveis em soluções aquosas e a acidificação do meio contribui para uma melhor extracção destes compostos.

A análise e quantificação dos ácidos orgânicos por cromatografia líquida, usando colunas de exclusão iónica, acoplada a um detector de UV regulado para 214 nm constituem a técnica mais usada no estudo destes metabolitos. Este apresenta-se como um método simples, rápido e fácil de utilizar (203).

Na cromatografia de exclusão iónica as espécies sem carga são separadas como resultado de três mecanismos: exclusão de Donnan, adsorção e processos de exclusão estérica. As espécies carregadas passam através da coluna não ficando retidas. Assim, esta técnica é adequada para a separação de compostos com carga fraca, tais como os ácidos orgânicos (203).

A membrana de Donnan pode ser encarada como um escudo invisível em torno das partículas de resina que permite a passagem das espécies neutras, mas impede a passagem das espécies carregadas negativamente. Usando este mecanismo de separação, os ácidos fracamente ionizados são separados com base no seu pKa. Os ácidos fortes não são retidos pela fase estacionária, eluindo rapidamente pela coluna. As espécies não carregadas atravessam a resina e são separadas por adsorção e processos de exclusão estérica (203).

2.6. Actividades biológicas

Conforme referido anteriormente, as plantas produzem uma grande variedade de metabolitos secundários, os quais desempenham importantes funções no seu metabolismo e defesa. Estes compostos, especialmente os compostos fenólicos, têm uma ampla gama de propriedades biológicas, como antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatória, antimicrobiana, cardioprotectora, vasodilatadora, entre outras (204). Além disso, tendo em conta que os herbívoros entram em contacto com estes compostos quando se alimentam, e que alguns deles são capazes de os acumular e biotransformar (25, 30, 122, 169, 171, 179) os insectos podem ser explorados como fonte de compostos bioactivos.

2.6.1. Actividade antioxidante

A actividade antioxidante tem sido profundamente estudada nos últimos anos, recebendo grande atenção por parte dos meios de comunicação. De acordo com Abdalla e Roozen (205), as publicações científicas relativas a compostos antioxidantes e stress oxidativo quadruplicaram na última década (1684 em 1993 e 6510 em 2003).

2.6.1.1. Stress oxidativo

O aumento do interesse pela acção antioxidante dos alimentos deve-se à sua capacidade para evitar ou diminuir os efeitos nefastos provocados por espécies reactivas, como os radicais livres. Actualmente existem provas suficientes de que os antioxidantes presentes nas frutas, vegetais e outros alimentos desempenham um papel relevante na manutenção da saúde e prevenção da doença. Acredita-se que estes antioxidantes sejam importantes no sistema de defesa do organismo contra várias espécies oxidantes, que são geradas durante vários processos fisiológicos e patológicos (206). São igualmente utilizados na indústria alimentar para evitar a deterioração de gorduras (que dá origem ao ranço), atrasar a formação de produtos tóxicos decorrentes da oxidação, mantendo a qualidade nutricional e aumentando o prazo de validade dos alimentos, sendo que, em ambos os casos, os de origem sintética são preteridos em relação aos de origem natural (205).

A definição mais abrangente considera que um antioxidante é qualquer substância que, quando presente em pequena concentração comparativamente à do substrato oxidável, retarda ou previne a oxidação deste. Substrato oxidável é quase tudo o que se encontra nos alimentos ou tecidos vivos, incluindo proteínas, lípidos, hidratos de carbono e DNA (207, 208). Um composto pode exercer a acção antioxidante *in vivo* ou nos alimentos de duas formas: inibindo a geração de espécies reactivas, ou por sequestro directo dessas espécies. Além disso, *in vivo*, um antioxidante pode actuar indirectamente ao aumentar as defesas antioxidantes endógenas, por exemplo, ao aumentar a expressão de genes que codifiquem a superóxido dismutase, catalase ou glutathione peroxidase (207).

A ocorrência de espécies oxidantes no organismo resulta de: produção ao nível intracelular, na sequência de processos biológicos normais; libertação pelas células envolvidas em processos inflamatórios; xenobióticos, tanto pelo facto de o próprio xenobiótico ter actividade pró-oxidante, mas também porque induz a formação de agentes oxidantes nas células (Figura 21) (209, 210).

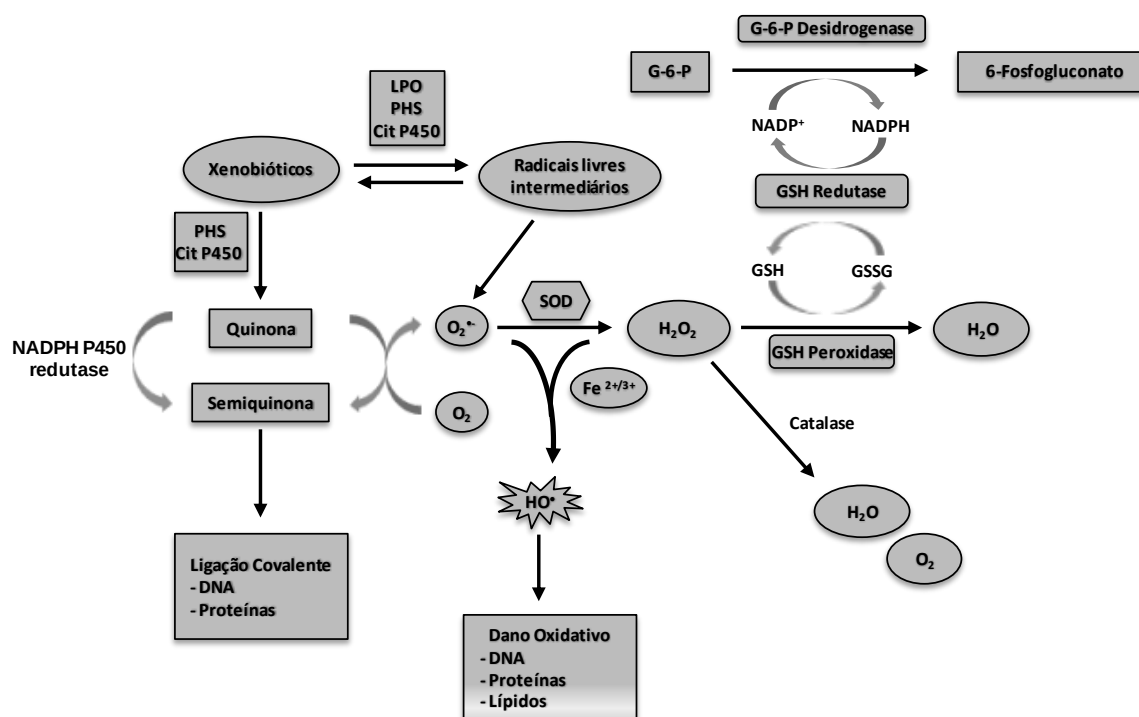


Figura 21. Representação esquemática da formação das várias espécies reativas. Abreviaturas: PHS, prostaglandina H sintetase; LPO, lipoxigenase; G-6-P, glucose-6-fosfato; SOD, superóxido dismutase; GSH, glutatona reduzida; GSSG, glutatona oxidada.

As principais espécies reativas oxidantes podem ser divididas em:

- Espécies reativas de oxigénio (ROS), que incluem, entre outras, os radicais livres anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido ($ROO^{\bullet}$), alcóxido ($RO^{\bullet}$) e hidróxido ($^{\bullet}OH$), bem como as espécies não radicalares oxigénio singlete ($^1O_2$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$) e hidroperóxidos lipídicos;
- Espécies reativas de azoto (RNS), sendo as mais relevantes o óxido nítrico ($^{\bullet}NO$), o ácido peroxinitroso ($ONOOH$), e o peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$), sendo este último um produto da reacção entre $O_2^{\bullet-}$ e $^{\bullet}NO$. Outras RNS potencialmente importantes incluem o radical dióxido de azoto ($^{\bullet}NO_2$) e os iões nitrosónio (NO^+) e nitrónio (NO_2^+) (211).

Do metabolismo aeróbio resultam diversas espécies reativas, o que implica a necessidade permanente da sua inactivação para manutenção da homeostasia. Quando a sua produção é excessiva ou o organismo não as consegue inactivar há perturbação do balanço oxidantes/antioxidantes. Quando este equilíbrio redox é deslocado a favor dos oxidantes celulares surge um quadro de stress oxidativo.

Os factores indutores do stress oxidativo podem ser agrupados em:

- Endógenos, quando se trata de processos de inflamação, reacções auto-imunes, desregulação do metabolismo e isquémia; e
- Exógenos, provocados por microrganismos, radiação electromagnética e stress induzido por xenobióticos ou factores mecânicos. As fontes de espécies reactivas mais importantes são a fosforilação oxidativa, o metabolismo pelo citocromo P450 e a activação de células inflamatórias (212, 213).

O stress oxidativo está implicado no desencadeamento de vários processos, como mutagénese, carcinogénese, processos inflamatórios, envelhecimento, arteriosclerose, peroxidação lipídica, oxidação e fragmentação de proteínas, alterações dos hidratos de carbono, asma e diabetes (214-218).

Apesar de serem produzidos em processos biológicos, a capacidade que os agentes apresentam para alterar as moléculas de forma deletéria é controlada pela presença de antioxidantes endógenos e exógenos. Os sistemas biológicos possuem uma panóplia de mecanismos de defesa contra radicais livres, que incluem um grande número de moléculas antioxidantes de baixo peso molecular (que previnem a iniciação dos danos oxidativos ou limitam a sua propagação), sistemas enzimáticos (que convertem e detoxificam as espécies reactivas ou que reparam o dano oxidativo quando ele ocorre) e mecanismos para reencaminhar as moléculas danificadas para destruição e substituição (215, 219). As defesas antioxidantes endógenas são sobretudo enzimáticas, como a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (CAT), e constituem uma importante linha de defesa por diminuir a concentração da maioria dos oxidantes nocivos. Numa segunda linha de defesa estão os sistemas não enzimáticos, que englobam moléculas que actuam como antioxidantes, reagindo com os compostos oxidantes, diminuindo a sua capacidade para causar um efeito deletério. Algumas dessas moléculas são provenientes do metabolismo normal, como a glutathione, ubiquinol, ácido úrico e a transferrina. Outras são exógenas, encontradas na dieta, sendo as mais conhecidas as vitaminas C e E, os carotenóides e os compostos fenólicos (207, 212, 213, 215).

As várias defesas complementam-se, actuando sobre diferentes agentes oxidantes, ou então em diferentes compartimentos celulares. Além disso, em adição aos seus efeitos individuais, os antioxidantes actuam em consonância uns com os outros, numa série de reacções de oxidação-redução que interceptam a espécie reactiva oxidante (213).

2.6.1.2. Avaliação do potencial antioxidante

Os ensaios realizados em sistemas químicos constituem uma primeira abordagem à actividade antioxidante de extractos ou moléculas. Estes ensaios são geralmente rápidos e fáceis de realizar, tratando-se normalmente de ensaios espectrofotométricos. No entanto, estes não reflectem as condições fisiológicas celulares e não atendem à biodisponibilidade e metabolismo dos compostos. Além disso, ao contrário do que avalia a maioria dos ensaios químicos, a acção dos antioxidantes nas células não se limita à interceptação de espécies reactivas (220, 221). A capacidade antioxidante observada em ensaios químicos deve então ser confirmada em modelos celulares.

A cultura de células V79 (fibroblastos de pulmão de hamster) constitui um modelo relevante para a avaliação do potencial antioxidante de extractos. São fáceis de crescer e trabalhar e, como são células do pulmão, estão naturalmente expostas a agentes oxidantes, tendo já revelado capacidade de resposta ao stress oxidativo (222). Deste modo, este modelo celular tem sido usado por muitos autores para avaliar a protecção de extractos de plantas em células sujeitas a stress oxidativo induzido, por exemplo, pelo sistema xantina/xantina oxidase, menadiona, *terc*-butil-hidroperóxido ou H_2O_2 . O H_2O_2 pode facilmente penetrar nas membranas celulares, produzindo efeitos deletérios nas células originais e nas vizinhas, sendo considerado um dos principais mediadores da citotoxicidade induzida por stress oxidativo (223).

Tem-se verificado que os extractos vegetais ou alguns dos seus componentes podem ser protectores ou tóxicos, dependendo das concentrações de extracto utilizadas, das células estarem ou não sujeitas a stress e do tipo de stress induzido. É comum os extractos ricos em compostos fenólicos demonstrarem efeitos celulares protectores (224-228).

No entanto, nem sempre os extractos têm o efeito protector esperado relativamente a um agente indutor de stress oxidativo, podendo mesmo agravar os seus efeitos citotóxicos (229). Por exemplo, foi avaliado o efeito do extracto hidrolisado de couve tronchuda (uma das plantas hospedeiras usadas nesta dissertação) em hepatócitos primários expostos a stress oxidativo. Verificou-se que, embora em concentrações mais baixas o extracto tivesse uma ligeira acção protectora, os efeitos do agente oxidante eram agravados para concentrações mais elevadas (229).

Deste modo, os extractos podem apresentar um elevado potencial nos ensaios realizados em sistemas não celulares e quando testados em sistemas celulares revelarem por si só toxicidade, podendo ainda potenciar a toxicidade provocada por um agente agressor.

Os ensaios de citotoxicidade estão entre os primeiros usados *in vitro* para prever a toxicidade de extractos sobre diferentes tecidos. Estes são amplamente utilizados para aferir o seu efeito na proliferação, viabilidade e activação celular. Existem vários parâmetros biológicos que podem ser avaliados, como a integridade da membrana, actividade metabólica, actividade da cadeia respiratória, taxa de síntese proteica total, número de células baseado no DNA nuclear total e actividade lisossómica (Figura 22).

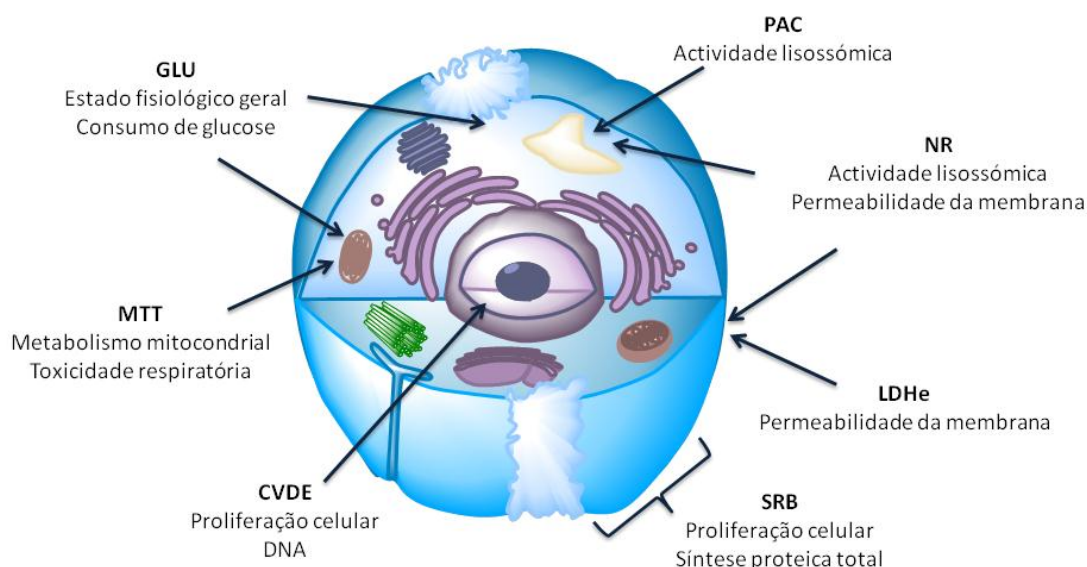


Figura 22. Ensaios *in vitro* que podem ser usados para aferição da citotoxicidade e parâmetros biológicos avaliados. GLU: glucose; MTT, brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio; CVDE, eluição de corante cristal violeta; SRB, sulforrodamina B; LDHe, lactato desidrogenase extracelular; NR, vermelho neutro; PAC, actividade lisossómica.

2.6.2. Inibição da acetilcolinesterase

A acetilcolina é um neurotransmissor envolvido na transmissão de informação a nível do sistema colinérgico, estando presente no sistema nervoso central e no sistema nervoso periférico (61, 85). Esta molécula é um éster do ácido acético e da colina, cuja acção é mediada pelos receptores nicotínicos e muscarínicos. Depois de libertada na fenda sináptica é rapidamente hidrolisada, sendo esta reacção catalisada pela acetilcolinesterase (AChE) (Figura 23) (230).

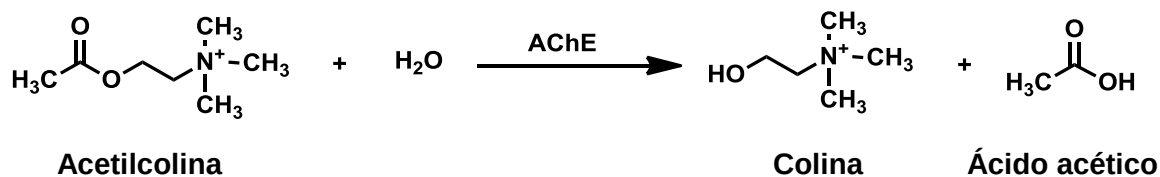


Figura 23. Hidrólise da acetilcolina por acção da acetilcolinesterase (AChE).

Os inibidores da AChE têm várias aplicações terapêuticas, sendo utilizados no tratamento da doença senil, demência, ataxia, miastenia gravis, Parkinson e principalmente na DA, como referido anteriormente (231). A DA é uma desordem neurodegenerativa progressiva, caracterizada sobretudo por défice de memória e distúrbios do comportamento. Apesar da sua etiologia continuar desconhecida, é aceite que factores genéticos e ambientais estão envolvidos (231, 232). Com a evolução da doença, o processo degenerativo começa a comprometer toda a neurotransmissão colinérgica a nível cerebral. Associado a todos estes processos somam-se as reacções gliais inflamatórias e oxidativas que potenciam o dano a nível cerebral (231).

Desta forma, o principal mecanismo de acção dos fármacos usados actualmente no tratamento sintomático da DA consiste na inibição enzimática das colinesterases, aumentando assim os níveis de acetilcolina na fenda sináptica (231, 233). Sabe-se também que a acetilcolinesterase está envolvida no aumento da deposição das proteínas β -amilóide, promovendo assim a formação de placas neuríticas (234-236).

2.6.3. Genotoxicidade e mutagenicidade

Os organismos estão constantemente expostos a múltiplos compostos capazes de lhes causar danos no DNA, quer de forma directa quer após a sua biotransformação. O dano no DNA pode levar ao desenvolvimento de carcinomas ou à ocorrência de mutações (237).

A genotoxicidade corresponde a efeitos potencialmente nocivos no material genético das células ou organismos, que não são necessariamente associados a mutagenicidade. A mutagenicidade alude à indução de alterações permanentes e transmissíveis na quantidade ou na estrutura do material genético. Estas alterações podem envolver um único gene ou um segmento deste, um bloco de genes ou até cromossomas inteiros (238).

Apesar dos frutos e vegetais usados na alimentação humana serem reconhecidos por exercerem efeitos antimutagénicos, em alguns casos eles podem ser mutagénicos por si só, possuindo um papel importante na etiologia de várias doenças crónicas (239). Estas misturas complexas de compostos podem ser uma fonte mais importante de mutação humana do que a própria exposição ambiental ou ocupacional (238). Contudo, no caso específico de espécies de *Brassica*, vários estudos epidemiológicos demonstram que protegem o ser humano contra o cancro (240).

Os compostos fenólicos presentes nos vegetais são exemplos de compostos antimutagénicos, os quais actuam por vários mecanismos, incluindo a inibição da activação metabólica de vários pró-carcinogénicos. Porém, a estes compostos são também associadas muitas vezes propriedades mutagénicas (239).

Para além destes, os compostos voláteis resultantes de várias vias biossintéticas podem também ter importantes acções (241). Como são moléculas de baixo peso molecular, estes metabolitos podem ser facilmente absorvidos pelas células e exercer efeitos tanto de protecção, como deletérios.

Assim, a utilização de extractos naturais na terapêutica depende em primeira instância da sua toxicidade e de todos os efeitos sinérgicos e antagónicos entre os vários compostos neles existentes. Apesar de apresentarem actividades biológicas benéficas e bastante promissoras, muitos extractos deixam de ser estudados por causa da sua elevada toxicidade. Por outro lado, extractos que por si só não se revelam à partida citotóxicos, manifestam muitas vezes efeitos deletérios a nível do DNA (242). Assim, além dos ensaios de citotoxicidade, deverão igualmente ser realizados ensaios de avaliação do efeito de determinado extracto a nível do DNA celular.

3. OBJECTIVOS DA DISSERTAÇÃO

1. Caracterização do perfil metabólico (compostos fenólicos, compostos voláteis e ácidos orgânicos) dos vários materiais de *P. brassicae* (exúvias, borboletas, larvas e seus excrementos) e das plantas que lhes serviram de alimento: *B. oleracea* var. *acephala* (couve-galega) e *B. oleracea* var. *costata* (couve tronchuda).
2. Estudo da relação entre o perfil metabólico revelado pelo insecto e o das suas plantas hospedeiras, bem como conhecimento dos fenómenos de metabolização, acumulação e excreção que ocorrem na larva a partir dos compostos que estaingere/sequestra da sua planta hospedeira.
3. Estudo do perfil de compostos fenólicos e de ácidos orgânicos de sementes de *B. oleracea* var. *acephala* e de *B. oleracea* var. *costata* e da sua relação com a actividade antioxidante e inibidora da acetilcolinesterase.
4. Estudo da evolução do perfil de compostos voláteis ao longo do crescimento de *B. oleracea* var. *acephala*.
5. Avaliação da citotoxicidade e da capacidade antioxidante dos diversos materiais de *P. brassicae* e de *B. oleracea* var. *acephala* em sistemas químicos e celulares.
6. Avaliação dos efeitos mutagénicos e genotóxicos e da capacidade antimutagénica e antigenotóxica das larvas de *P. brassicae* e de *B. oleracea* var. *costata*.

PARTE II

SECÇÃO EXPERIMENTAL

4. SECÇÃO EXPERIMENTAL

4.1. Metabolic profiling and biological capacity of *Pieris brassicae* fed with kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)

Food Chem. Toxicol. 2009, 47, 1209–1220



Metabolic profiling and biological capacity of *Pieris brassicae* fed with kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)

Federico Ferreres^a, Fátima Fernandes^b, Jorge M.A. Oliveira^c, Patrícia Valentão^b, José A. Pereira^d, Paula B. Andrade^{b,*}

^aResearch Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Department of Food Science and Technology, CEBAS (CSIC), P.O. Box 164, 30100 Campus University Espinardo, Murcia, Spain

^bREQUIMTE/Serviço de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, R. Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal

^cREQUIMTE/FARMA, Serviço de Farmacologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, R. Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal

^dCIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 November 2008

Accepted 10 February 2009

Keywords:

Pieris brassicae L.

Brassica oleracea L. var. *acephala*

Phenolic compounds

Organic acids

Biological activity

ABSTRACT

Phenolic and organic acid profiles of aqueous extracts from *Pieris brassicae* material and the host kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) leaves were determined by HPLC/UV–DAD/MSⁿ–ESI and HPLC–UV, respectively. The identified phenolics included acylated and nonacylated flavonoid glycosides, hydroxycinnamic acyl gentiobiosides, and sulphate phenolics. Kale exhibited the highest content (11 g/kg lyophilized extract), while no phenolics were identified in the butterflies or exuviae. Nine different organic acids were characterized in the materials, with kale showing the highest amount (112 g/kg lyophilized extract). With the exception of the exuviae extract, the rest were screened for bioactivity. Using spectrophotometric microassays, all exhibited antiradical capacity against DPPH and NO in a concentration-dependent way, whereas only kale and excrement extracts were active against superoxide. All displayed activity on intestinal smooth muscle, albeit with distinct relaxation–contraction profiles. Larvae and butterfly extracts were more efficacious for intestinal relaxation than was kale extract, whereas excrement extract evoked only contractions, thus evidencing their different compositions. Collectively, these results show that *P. brassicae* sequesters and metabolizes kale's phenolic compounds. Moreover, the extract's bioactivities suggest that they may constitute an interesting source of bioactive compounds whose complex chemical structures preclude either synthesis or isolation.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Food plants with apparent cancer and cardiovascular disease-preventing properties include several varieties of *Brassica oleracea*, for which glucosinolates, phenolics and related analogs appear to contribute (Ayaz et al., 2008). Among the constituents of the kale (*B. oleracea* L. var. *acephala* DC) metabolome, some phenolic compounds (Ayaz et al., 2008; Sousa et al., 2008; Romani et al., 2003; Heimler et al., 2006) and organic acids (Ayaz et al., 2006; Sousa et al., 2008) have been reported, and were demonstrated to contribute to its antioxidant capacity (Sousa et al., 2008; Heimler et al., 2006).

Pieris insects (Lepidoptera:Pieridae) are specialist herbivores of cruciferous plants (van Loon and Schoonhoven, 1999). Phenolics, especially flavonoids, are important for modulating larvae feeding behaviour and adult oviposition (van Loon et al., 2002; Burghardt et al., 1997). *P. brassicae* larvae are a common pest of *Brassica* cul-

tures, and information concerning their interactions with phenolics from the host plant is scarce. Studies with larvae reared on *Brassica* species (Ferreres et al., 2007, 2008b) have revealed their ability to sequester, metabolize, and excrete phenolics from the feeding material. Considering the properties associated to these compounds (Sousa et al., 2008; Ferreres et al., 2006; Vrchovská et al., 2006) it may be expected that the insect materials exhibit biological activity. No data have been reported for the sequestration by *P. brassicae* of phenolics from kale, or of its biological potential.

Classical phytochemical approaches have relied on an often tedious and time consuming process of isolation, dereplication of known substances and structure elucidation. Metabolic profiling is developing into an essential tool in natural sciences. For this purpose, HPLC/UV–DAD/MSⁿ–ESI is considered to be an advanced technique which already proved to be useful in the elucidation of polar metabolites with complex structures. This technique has gained importance due to its high sensitivity and identifying capacity (Heinrich, 2008; Dunn, 2008; Hagel and Facchini, 2008; Allwood et al., 2008).

* Corresponding author. Tel.: +351 222078935; fax: +351 222003977.

E-mail address: pandrade@ff.up.pt (P.B. Andrade).

This work intended to characterize the phenolics and organic acids of *P. brassicae* at different stages of its life cycle (larvae, exuviae, and butterfly) and of its excrement, and to establish possible relations with the *B. oleracea* var. *acephala* host plant. For these purposes phenolics and organic acids were determined by HPLC/UV–DAD/MSⁿ–ESI and HPLC–UV, respectively. Additionally, their effects on intestinal smooth muscle and free radical scavenging abilities, against DPPH a reactive oxygen (superoxide radical) and a reactive nitrogen (nitric oxide) species, were also evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Standards and reagents

Oxalic, citric, malic, shikimic, fumaric, succinic, sinapic and ferulic acids and carbachol were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Aconitic and pyruvic acids, isorhamnetin-3-O-glucoside, quercetin-3-O-glucoside and kaempferol-3-O-rutinoside were from Extrasynthèse (Genay, France), and acetic acid from Fisher Scientific (Leicestershire, UK). Methanol, sodium hydroxide, acetone, and hydrochloric and acetic acids were from Merck (Darmstadt, Germany), and sulphuric acid was from Pronalab (Lisboa, Portugal). Water was treated in a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, Massachusetts, USA).

2.2. Samples

Wild *P. brassicae* larvae were collected in Bragança (Portugal) and taken to the laboratory to complete their life cycle, including oviposition in kale leaves. Identification was performed by José A. Pereira, Ph.D. (CIMO). New larvae fed with kale *ad libitum* were allowed to develop. Larvae at the fifth instar and their excrement were collected for analysis. Some larvae were collected and kept without food for 12 h before freezing. Other larvae were allowed to reach the butterfly stage, being collected less than 24 h after eclosion, together with the exuviae. *P. brassicae* and plant materials were freeze-dried. Voucher specimens are deposited at Serviço de Farmacognosia from Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto.

2.3. Extract preparation

For the identification of phenolics by HPLC/UV–DAD/MSⁿ–ESI in kale leaves and *P. brassicae* material, ca. 0.1 g of dried sample was thoroughly mixed with 1 mL of water, ultra-sonicated for 1 h, followed by 18 h of maceration, and then ultra-sonicated again (1 h). The resulting extracts were then centrifuged (12,000 rpm, 5 min), and supernatants were collected and filtered (0.45 µm).

For the other assays, ca. 0.5 g of *P. brassicae* butterflies, larvae and excrement, and ca. 0.117 g of *P. brassicae* exuviae were boiled for 30 min in 400 mL of water. Kale extract was prepared by boiling ca. 1.0 g of leaves in 800 mL of water. Aqueous extracts were filtered using a Büchner funnel and lyophilized. For phenolics or organic acid determination, the lyophilized extracts were redissolved in water or sulphuric acid (0.01 N), respectively.

2.4. Alkaline hydrolysis

For acyl flavonoid derivatives, a saponification was performed, since MS losses of 146 (*p*-coumaroyl residues) and 162 amu (caffeoyl moieties) coincide with rhamnosyl and hexosyl residues, respectively, which could lead to a mis-assignment. Aqueous extract (1 mL) was alkalized with 2 M NaOH (pH 9–10) and kept for 12 h at room temperature in a stoppered test tube under an N₂ atmosphere. Hydrolysed products were acidified with HCl (pH 1–2) and directly analysed via HPLC/UV–DAD/MSⁿ–ESI.

2.5. HPLC/UV–DAD/MSⁿ–ESI qualitative analysis

Analyses were developed with the system used before (Ferreres et al., 2008b), using a 250 × 4 mm, 5 µm, RP-18 LiChroCART column (Merck, Darmstadt, Germany) protected with a 4 × 4 mm LiChroCART guard column, with 1% acetic acid (A) and methanol (B) and applying the following gradient (1 mL/min): 10% B at 0 min, 40% B at 30 min, 60% B at 35 min and 80% B at 37 min. The HPLC system was equipped with an Agilent 1100 Series diode array and a mass detector in series (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). It consisted of a G1312A binary pump, a G1313A autosampler, a G1322A degasser and a G1315B photo-diode array detector, controlled by ChemStation software (Agilent, v. 08.03). Spectroscopic data from all peaks were accumulated in the range 240–400 nm, and chromatograms were recorded at 330 nm. The mass detector was a G2445A Ion-Trap Mass Spectrometer equipped with an electrospray ionisation (ESI) system and controlled by LCMSD software (Agilent, v. 4.1.). Nitrogen was used as nebulising gas at a pressure of 65 psi and the flow was adjusted to 11 L/min. The heated capillary and voltage were maintained at 350 °C and 4 kV, respectively. The full scan mass covered the

range from *m/z* 100–2000. Collision-induced fragmentation experiments were performed in the ion trap using helium as collision gas, with voltage ramping cycles from 0.3 up to 2 V. MS data were acquired in the negative ionization mode.

The classical nomenclature for glycoconjugates was used (Domon and Costello, 1988). Ions resulting from a second oligosaccharide fragmentation were labelled as previously (Ferreres et al., 2004). Thus, ions obtained from the ion $Y_0^{7-}(-MS^3[(M-H) \rightarrow Y_0^{7-}])$ have been labelled starting with the ion (Y_0^{7-}) and followed by the resultant MS³ ion, e.g. the ion $[Y_0^7 Y_2^3]^-$ (MS³ of compounds **1** and **10**) denotes the loss of the terminal sugar of the triglycoside at C-3 (Y_2^{3-}) from the fragmentation of ion Y_0^{7-} (total glycosylation loss at C-7). Losses in the MS³ scan show that the fragment came from the trapped and fragmented ion (Y_0^{7-}), and not from the deprotonated molecular ion.

2.6. HPLC/UV–DAD quantitative analysis

Analyses were developed with a system described previously (Ferreres et al., 2007), using a HPLC/UV–DAD unit (Gilson) and a Spherisorb ODS2 (25.0 × 0.46 cm; 5 µm, particle size) column. Elution was performed with acetic acid 1% (A) and methanol (B), using the following gradient (1 mL/min): 0 min – 10% B, 30 min – 40% B, 35 min – 60% B, 37 min – 80% B, 47 min – 90% B, 55 min – 100% B, 57 min – 100% B, 60 min – 10% B, 62 min – 10% B. Detection was achieved with a Gilson diode array detector. Phenolics quantification was achieved by an external standard method. Sinapic and ferulic acid derivatives were quantified as sinapic and ferulic acids, respectively. Kaempferol, isorhamnetin and quercetin derivatives were quantified as kaempferol-3-O-rutinoside, isorhamnetin-3-O-glucoside and quercetin-3-O-glucoside, respectively.

2.7. HPLC–UV analysis of organic acids

The separation and quantification of organic acids was carried out as previously reported (Sousa et al., 2005) in a system consisting of an analytical HPLC–UV unit (Gilson) with an ion exclusion column, Nucleogel® Ion 300 OA (300 × 7.7 mm) in conjunction with a column heating device set at 30 °C. Elution was performed in isocratic mode with sulphuric acid 0.01 N, under a flow rate of 0.2 mL/min. The detection was achieved with an UV detector set at 214 nm. Organic acids quantification was achieved by the absorbance recorded in the chromatograms relative to external standards.

2.8. Antioxidant activity

Antiradical activity against DPPH (Vrchovská et al., 2006), superoxide (Vrchovská et al., 2006), and nitric oxide radicals (Vrchovská et al., 2007) was determined spectrophotometrically in a Multiskan Ascent plate reader (Thermo, Electron corporation).

2.8.1. DPPH scavenging assay

The antiradical activity of the extracts was determined by monitoring the disappearance of DPPH at 515 nm. The reaction mixture in the sample wells consisted of 25 µL aqueous extract and 200 µL of methanolic solution of DPPH 150 mM. The plate was incubated for 30 min at room temperature after addition of DPPH. Three experiments were performed in triplicate.

2.8.2. Superoxide radical scavenging assay

Antiradical activity was determined spectrophotometrically at 562 nm, in kinetic function, by monitoring the effect on reduction of NBT induced by superoxide radical. Superoxide radicals were generated in NADH/PMS system. All components were dissolved in phosphate buffer (19 mM, pH 7.4). Three experiments were performed in triplicate.

2.8.3. Nitric oxide scavenging assay

The reaction mixtures in the sample wells consisted of extract and SNP and plates were incubated at 25 °C for 60 min under light exposure. Griess reagent was then added and the absorbance was determined at 540 nm. Three experiments were performed in triplicate.

2.9. Activity on intestinal smooth muscle

Small intestine (ileum) fragments of adult male Wistar rats (300–350 g; Charles River, Barcelona, Spain) were used. Animal handling and care followed the EU guidelines (86/609/EEC) and Portuguese law (1005/92 and 1131/97). Ileum segments (ca. 2 cm) were mounted under a resting tension of 1 g in 20 mL organ baths containing Krebs solution (NaCl 120.0 mM, KCl 5.0 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgSO₄ 1.0 mM, NaHCO₃ 25.0 mM, and glucose 10 mM, pH 7.4). Experiments were performed at 37 °C with continuous aeration with carbonation (95% O₂ and 5% CO₂), with regular renovation of the Krebs solution. Changes in length (contractions and relaxations) of the longitudinal muscle were measured with isotonic transducers and recorded in chart polygraphs (Ugo Basile, Italy). Prior to the assay of the lyophilized extracts, ileum segments were stabilized by intermittent exposure to

1 μ M carbachol followed by washout, until the evoked contractions were stable and of identical magnitude (typically three exposures). Carbachol was titrated to determine the concentration inducing ca. 50% maximal contraction. This concentration (typically 100–200 nM) was used to induce a submaximal contraction plateau. Samples of 10 mg of extracts were dissolved in Krebs solution and added cumulatively to the organ bath after stabilization of the carbachol-evoked submaximal contraction. Kaempferol-3-O-rutinoside and organic acid mixtures were also dissolved in Krebs solution. The results were analyzed qualitatively as relaxations and/or contractions and quantitatively by expressing the effects as a percentage of the carbachol-evoked contraction.

3. Results and discussion

3.1. Kale leaves' phenolic compounds

The HPLC/UV–DAD/MSⁿ-ESI study allowed the differentiation of three groups of molecules: free flavonoid glycosides (not acylated, compounds **1–3**, **5–7**, **10–12**, **15**, **22–24**, **27**, and **30**), flavonoid glycosides acylated with hydroxycinnamic acids (**4**, **8**, **9**, **13**, **14**, **16–21**, **25**, **26**, **28**, **29**, and **31**) and hydroxycinnamic acyl gentiobiosides (**32–35**) (Fig. 1). These compounds are similar to those detected in the leaves of other Brassicaceae (Ferreres et al., 2005, 2008b; Llorach et al., 2003; Vallejo et al., 2004).

3.1.1. Flavonoid glycosides

These compounds show a UV spectrum with maxima at 345–355 nm (Band I) and at 255–265 nm (Band II) (Mabry et al., 1970). Their UV spectra were obtained from the saponified extract chromatogram, due to their coelution with acylated derivatives in the native one (Table 1). MS fragmentation identified the compounds as kaempferol, quercetin, or isorhamnetin derivatives ([aglycone-H][−] at *m/z* 285, 301, and 315, respectively). The degree of glycosylation ranges from dihexosides (**27** and **30**) to trihexosides (**2**, **7**, **12**, **22**, and **24**), tetrahexosides (**1**, **6**, **5**, **11**, **15**, and **23**), and pentahexosides (**3** and **10**) (Table 1). Tentatively, and considering other Brassicaceae studies, the hexoses involved are likely to be glucoses. With the exception of **27** and **30**, the MS²[M-H][−] fragmentation of all the compounds essentially originates the ion corresponding to the loss of glycosylation at C-7 (Y₀[−]) (Ferreres et al., 2004): [(M-H)-162][−] for the 7-O-glucosyl derivatives (**1**, **2**, **6**, **7**, **12**, **22**, and **24**) and [(M-H)-324][−] for the 7-O-diglucosyl derivatives (**3**, **5**, **10**, **11**, **15**, and **23**) (Table 1). According to the UV data (Mabry et al., 1970), the remaining glycosylation must be located at C-3 of the aglycone. The possibility of glycosylation at an alternative phenolic hydroxy group may be ignored since the MS³[(M-H) → Y₀[−]] fragmentation would only give the ion resulting from the loss of that glycosidic moiety (Martínez-Sánchez et al., 2007). In the MS³ spectra, we observed the ion from the deprotonated aglycone, which is the base peak in most cases (Ferreres et al., 2004) (Table 1). MS³[(M-H) → Y₀[−]] fragmentation differentiates the interglycosidic bond of the diglucoside at C-3 [sophoroside (1 → 2) or gentiobioside (1 → 6)] of flavonoid-3-O-diglucosides-7-O-glycosides (**2**, **5**, **7**, **11**, **12**, **15**, **22**, **23**, and **24**). Sophorosides present abundant ions originating from interglycosidic fragmentation, yielding [Y₀[−]Y₁[−]][−] (Y₀[−]-162) and/or [Y₀[−]Z₁[−]][−] (Y₀[−]-162-18) (**2**, **5**, **7**, **11**, **12**, and **15**), while in gentiobiosides these ions are absent or of low abundance (**22–24**) (Ferreres et al., 2004) (Table 1). The sophorosides/gentiobiosides isomer pairs **7/22**, **12/24**, and **11/23** also display differences concerning their reversed-phase (RP) HPLC chromatographic mobility, with the sophorosides eluting before the corresponding gentiobiosides. Regarding the interglycosidic bond of the diglucoside moiety at C-7, differentiation is not possible due to the ready loss of the diglucoside in this position to give the ion Y₀[−][(M-H)-324][−]. For flavonoid-3-O-triglucosides-7-O-glycosides (**1**, **6**, **3**, and **10**), the indication of the interglycosidic bond is more complex: in their MS³, peaks corresponding to a loss of 342 amu (162 × 2 + 18) from

Y₀[−] ([Y₀[−]Z₁[−]][−]) and [Y₀[−]Y₂[−]][−] (Y₀[−]-162)[−] were observed. Another observed peak was [Y₀[−]Z₂[−]][−] (Y₀[−]-120)[−], resulting from the fragmentation of some or all of the three glucose rings, which involves C-6 of the sugar. Thus, it can be deduced that this position is not substituted. The possibility of a flavonol-3-O-(2,6-di-O-glucosylglucoside)-7-O-glycoside structure is discarded by the absence of [Y₀[−]-120-162][−], which would correspond to [Y₀[−]Z₂[−]][−] (Y₀[−]-120)[−] having one glucose moiety substituted at C-6. An ion equivalent to this was observed in several flavonol-3-O-(2,6-di-O-rhamnosylhexosides) [(M-H)-120-146][−] and in kaempferol-3-O-(2,6-di-O-rhamnosylgalactoside)-7-O-hexoside, (Y₀[−]-120-146)[−] (Ferreres et al., 2008a). Thus, they were characterized as quercetin (**1–3**, and **5**), kaempferol (**6**, **7**, **10**, **11**, **22**, and **23**), and isorhamnetin (**12**, **15**, and **24**) derivatives (Fig. 1). The flavonol-3-O-diglucosides characterized were quercetin-3-O-sophoroside (**27**) and kaempferol-3-O-sophoroside (**30**). The majority of these compounds were present in both the native and saponified extracts. However, compounds **3**, **6**, **10**, and **15** were detected only in the latter, probably because they were masked in the native extract, where they occurred in trivial amounts. Compound **27** was not observed in the saponified extract. Due to its low concentration, it could have been lost during the saponification procedure. The RP-HPLC chromatographic behavior of these compounds does not follow the general rule, i.e. an increase of the level of glycosylation leads to a decrease of retention time (*R_t*). As referred to in other studies (Llorach et al., 2003; Vallejo et al., 2004), the introduction of a second glucose residue on the glucose at C-7 causes an *R_t* increase. Thus, flavonol-3-O-glycoside-7-O-glucosides elute before their corresponding 7-O-diglucosides (**1/3**, **6/10**, **2/5**, **7/11**, and **12/15**) (Table 1).

3.1.2. Flavonoid glycosides acylated derivatives

The UV spectrum of flavonoid glycosides acylated with hydroxycinnamic acids consists on the superimposition of that of the flavonoid with the one of the acid, the last predominating (Vallejo et al., 2004), with a large absorption band at 310–330 nm and a small maximum or shoulder at 250–270 nm. The majority of compounds coeluted with others, so their UV spectra were not properly observed. Their MSⁿ fragmentations are characteristic of flavonol-3-O-(acyl)glycoside-7-O-glycosides (**4**, **8**, **9**, **13**, **14**, **16–21**, and **28**) and flavonol-3-O-(acyl)diglucosides (**25**, **26**, **29**, and **31**) (Ferreres et al., 2005, 2006; Vallejo et al., 2004). In the MS² fragmentation of the former of these it is noticed the ion proceeding from the loss of glycosylation at C-7 to originate (Y₀[−]), which is the base peak in most of the cases: (M-H-162) for -7-O-glucosides (**4**, **8**, **9**, **13**, **16**, **18**, **20**, and **28**) and (M-H-324) for -7-O-diglucosides (**14**, **17**, **19**, and **21**) (Table 2). Another of the observed ions results from the simultaneous loss of glycosylation in 7 and of an acyl radical, giving the aglycone fragment linked to the glycosidic fraction at C-3. This ion is more abundant in the quercetin derivatives (**9**, **13**, and **14**) than in the kaempferol derivatives (**4**, **8**, **16–21**, and **28**). The ion corresponding to the loss of the acyl radical [(M-H)-Acyl][−] was abundant in the quercetin derivatives, forming the base peak for **14**. In the MS³[(M-H) → Y₀[−]] fragmentation is observed the loss of the acyl radical, coincident with [Y₀[−]-Acyl][−] detected in MS², that in most cases is the base peak. In sinapoyl and feruloyl derivatives, it was seen an abundant ion at *m/z* 14 amu, higher than the loss of acyl radical [(M-H)-Acyl+14][−]. Other observed peaks, usually in low abundance, correspond to the deprotonated aglycone and to the fragmentation of the interglycosidic bond of the diglucoside in C-3, along with loss of water, to yield [Y₀[−]-Acyl-180][−] (Table 2). The MS² fragmentation of flavonol-3-O-(acyl)diglucosides is similar to the MS³[(M-H) → Y₀[−]] of the

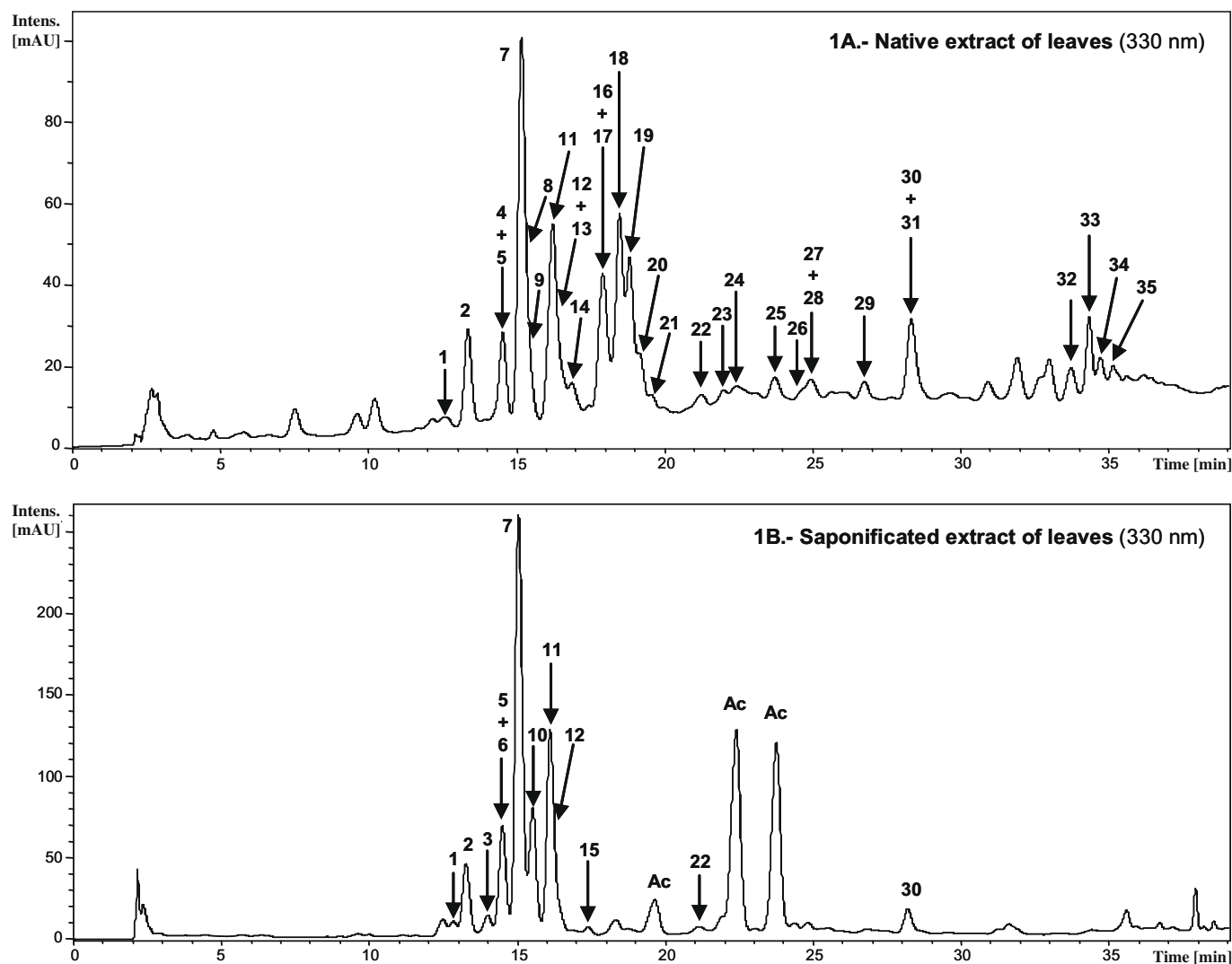


Fig. 1. HPLC/UV-DAD phenolic profile of: (1A) native aqueous extract of kale leaves. (1B) Saponified aqueous extract. Detection at 330 nm. Peaks: (Ac) acylated derivatives, (1) quercetin-3-O-sophorotrioside-7-O-glucoside, (2) quercetin-3-O-sophoroside-7-O-glucoside, (3) quercetin-3-O-sophorotrioside-7-O-diglucoside, (4) kaempferol-3-O-(methoxycaffeoyl)sophoroside-7-O-glucoside, (5) quercetin-3-O-sophoroside-7-O-diglucoside, (6) kaempferol-3-O-sophorotrioside-7-O-glucoside, (7) kaempferol-3-O-sophoroside-7-O-glucoside, (8) kaempferol-3-O-(caffeoyl)sophoroside-7-O-glucoside, (9) quercetin-3-O-(sinapoyl)sophoroside-7-O-glucoside, (10) kaempferol-3-O-sophorotrioside-7-O-diglucoside, (11) kaempferol-3-O-sophoroside-7-O-diglucoside, (12) isorhamnetin-3-O-sophoroside-7-O-glucoside, (13) quercetin-3-O-(feruloyl)sophoroside-7-O-glucoside, (14) quercetin-3-O-(feruloyl)sophoroside-7-O-diglucoside, (15) isorhamnetin-3-O-sophoroside-7-O-diglucoside, (16) kaempferol-3-O-(sinapoyl)sophoroside-7-O-glucoside, (17) kaempferol-3-O-(sinapoyl)sophoroside-7-O-diglucoside, (18) kaempferol-3-O-(feruloyl)sophoroside-7-O-glucoside, (19) kaempferol-3-O-(feruloyl)sophoroside-7-O-diglucoside, (20) kaempferol-3-O-(*p*-coumaroyl)sophoroside-7-O-glucoside, (21) kaempferol-3-O-(*p*-coumaroyl)sophoroside-7-O-diglucoside, (22) kaempferol-3-O-gentiobioside-7-O-glucoside, (23) kaempferol-3-O-gentiobioside-7-O-diglucoside, (24) isorhamnetin-3-O-gentiobioside-7-O-glucoside, (25) quercetin-3-O-(sinapoyl)sophoroside, (26) quercetin-3-O-(feruloyl)sophoroside, (27) quercetin-3-O-sophoroside, (28) kaempferol-3-O-(*p*-coumaroyl)gentiobioside-7-O-glucoside, (29) kaempferol-3-O-(sinapoyl)sophoroside, (30) kaempferol-3-O-sophoroside, (31) kaempferol-3-O-(feruloyl)sophoroside, (32) disinapoyl-gentiobioside, (33) sinapoyl,feruloyl-gentiobioside, (34) diferuloyl-gentiobioside, and (35) disinapoyl, feruloyl-gentiobioside.

previous compounds, that is, to the ion resulting from the loss of glycosylation at C-7. Thus, they were characterized as both kaempferol (4, 8, 16–21, 28, 29, and 31) and quercetin (9, 13, 14, 25, and 26) glycoside acylated derivatives (Fig. 1). The chromatographic behaviour of these acylated derivatives follows the principle indicated above, as the introduction of a second glucose on a glucoside in seven leads to an increase of R_f . Thus, in flavonol-3-O-(acyl)diglucoside-7-O-glucoside/flavonol-3-O-(acyl)diglucoside-7-O-diglucoside pairs (13/14, 16/17, 18/19, and 20/21), the -7-O-diglucoside derivatives elute at a higher R_f than the corresponding -7-O-glucosides. Fig. 2 displays the chromatogram fraction corresponding to the elution of these compounds (Fig. 2A) and the extracted ion chromatogram (EIC) of the respective deprotonated molecular ion (Fig. 2B). On the other hand, acylated derivatives of flavonol-3-O-glycosides (25, 26, 29, and 31) show a R_f

similar to or lower than that of the corresponding deacylated compound (Ferreres et al., 2007, 2008b; Llorach et al., 2003) (Table 2). As before (Ferreres et al., 2008b; Vallejo et al., 2004), the order of elution of these hydroxycinnamic derivatives (caffeoyl < sinapoyl < feruloyl < *p*-coumaroyl) is not coincident with that of the free acids (caffeic < *p*-coumaric < ferulic < sinapic). The flavonoids characterized in kale are similar to those found in other *B. oleracea* varieties (Ferreres et al., 2005, 2006; Llorach et al., 2003; Vallejo et al., 2004), and to those from *Brassica rapa* var. *rapa* (Ferreres et al., 2008b). In general, the predominant glycoside, in free or acylated form, is kaempferol-3-O-sophoroside-7-O-glucoside. In kale, a higher diversity of compounds was found, with quercetin and isorhamnetin derivatives in addition to those of kaempferol. The degree of acylation is lower than that of other *Brassica*, with a great number of non-acylated glycosides being noted and the

Table 1

R_t , UV, $-MS[M-H]^-$, $-MS^2[M-H]^-$ and $-MS^3[(M-H) \rightarrow Y_0^7]^-$ data of non-acylated glycosyl flavonoids from native aqueous extract and from saponified extract of *Brassica oleracea* var. *acephala* leaves^a.

Compounds ^b		R _t (min)	UV (nm)	[M-H] [−] (m/z)	−MS ² [M-H] [−] (m/z) (%)		−MS ³ [(M-H) → Y ₀ ⁷] [−] (m/z) (%)				
					Y ₀ ⁷ (−162)	AgIc-H/2H	(−120)	(−162)	(−180)	(−342)	AgIc-H/2H
1	Q-3tG-7G	12.6	255,266sh,300sh,355	949	Flavonol-3-O-triglucoside-7-O-glucoside						
	6	K-3tG-7G ^c	14.6	–	933	787(100)		625(70)		445(20)	301(100)
						771(100)	651(50)		429(90)	285(100)	
Flavonol-3-O-diglucoside-7-O-glucoside											
2	Q-3dG-7G	13.2	255,266sh,300sh,353	787	625(100)	300(5)	463(25)		445(20)	300(100)	
7	K-3dG-7G	15.0	265,320sh,347	771	609(100)				429(50)	285(100)	
12	I-3dG-7G ^c	16.3	–	801	639(100)				459(25)	315(100)	
22	K-3dG-7G	21.2	265,318sh,349	771	609(100)	285(10)				285(100)	
24	I-3dG-7G ^c	22.4	–	801	639(100)	315(15)				315(100)	
(Y ₀ ⁷ −) (−324)											
Flavonol-3-O-triglucoside-7-O-diglucoside											
3	Q-3tG-7dG	13.6	255,267sh,295sh,350	1111	787(100)	667(40)			445(100)	301(95)	
10	K-3tG-7dG	15.4	265,317sh,348	1095	771(100)		609(100)		429(20)	285(50)	
Flavonol-3-O-diglucoside-7-O-diglucoside											
5	Q-3dG-7dG ^c	14.5	–	949	625(100)	300(7)			445(30)	300(100)	
11	K-3dG-7dG	16.0	265,320sh,347	933	609(100)	285(5)	447(30)		429(50)	285(100)	
15	I-3dG-7dG	17.4	255,265sh,298sh,352	963	639(100)	315(5)			459(30)	315(100)	
23	K-3dG-7dG ^c	21.7	–	933	609(100)	285(25)				285(100)	
Flavonol-3-O-diglucoside											
−MS ² [M-H] [−] (m/z) (%)											
27	Q-3dG ^c	25.0	–	625		463(12)			445(20)	300(100)	
30	K-3dG	28.2	266,297sh,347	609		447(15)			429(30)	284(100)	

^a Main observed fragments. Other ions were found but they have not been included.

^b Q: quercetin, K: kaempferol, I: isorhamnetin, G: glucose, and Q-3-tG-7-dG: quercetin-3-O-triglucoside-7-O-diglucoside.

^c Compounds hidden by others or in traces. Their UV spectra have not been properly observed.

Table 2

R_t , UV, $-MS$: $[M-H]^-$, $-MS^2[M-H]^-$ and $-MS^3[(M-H) \rightarrow Y_0^7]^-$ data of acylated glycosyl flavonoids from native aqueous extract of *Brassica oleracea* var. *acephala* leaves^a.

Compounds ^b		R _t (min)	[M-H] [−] (m/z)	-MS ² [M-H] [−] (m/z) (%)		-MS ³ [(M-H) → Y ₀ ⁷] [−] (m/z) (%)				
Flavonol-3-O-(acyl)diglucoside-7-O-glucoside										
9	2-S	15.7	993	-162 (Y ₀ ⁷ −)	-Acyl	-162-Acyl	-Acyl+14	-Acyl	-Acyl-180	Aglyc-2H/H
13	2-F	16.3	963	831(100)	787(69)	625(50)	639(15)	625(100)		300(13)
4	7-MC	14.3	963	801(100)	787(25)	625(27)		625(100)	445(15)	301(5)
8	7-C	15.2	933	801(100)		609(5)		609(100)	429(5)	285(9)
16	7-S	17.7	977	771(100)		609(6)		609(100)	429(4)	285(4)
18	7-F	18.3	947	815(100)		609(5)	623(50)	609(100)	429(4)	285(5)
20	7-pC	19.0	917	785(100)		609(5)	623(100)	609(50)	429(30)	285(8)
28	22-pC	25.0	917	755(100)		609(13)		609(100)	429(10)	284(25)
				755(100)		609(5)		609(100)	429(4)	284(10)
Flavonol-3-O-(acyl)diglucoside-7-O-diglucoside										
14	5-F	16.8	1125	-162	-Acyl	-324 (Y ₀ ⁷ −)	-324-Acyl	-Acyl+14	-Acyl	-Acyl-180
17	11-S	17.9	1139	963(40)	949(100)	801(85)	625(25)	639(75)	625(100)	Aglyc-2H/H
19	11-F	18.7	1109	977(7)		815(100)	609(13)	623(95)	609(100)	300(55)
21	11-pC	19.4	1079	947(5)		785(100)	609(16)	623(100)	609(40)	429(25)
						755(100)	609(15)		609(100)	285(6)
										285(14)
										284(8)
				-MS ² [M-H] [−] (m/z) (%)			-MS ³ [(M-H) → (M-H-Acyl)] [−] (m/z) (%)			
Flavonol-3-O-(acyl)diglucoside										
25	27-S	23.4	831	-Acyl + 14	-Acyl	Aglyc-2H/H		-162	-180	Aglyc-2H/H
26	27-F	24.5	801	639(10)	625(100)	300(9)		463(15)	445(22)	300(100)
29	30-S	26.7	815	639(5)	625(100)	300(6)			445(18)	300(100)
31	30-F	28.3	785	623(70)	609(100)	284(10)		447(17)	429(70)	284(100)
				623(90)	609(100)	284(12)		447(10)	429(100)	285(62)

^a Main observed fragments. Other ions were found but they have not been included.

^b Acyl, S: Sinapoyl, F: Feruloyl, MC: MethoxyCaffeoyl, pC (p.Coum): p-Coumaroyl, Caf: Caffeoyl, Aglyc: aglycone, **2**: Quercetin-3-O-Sophoroside-7-O-Glucoside, **5**: Quercetin-3-O-sophroside-7-O-diglucoside, **7**: Kaempferol-3-O-sophroside-7-O-glucoside, **11**: Kaempferol-3-O-sophroside-7-O-diglucoside, **22**: Kaempferol-3-O-gentiobioside-7-O-glucoside, **27**: Quercetin-3-O-sophroside, and **30**: Kaempferol-3-O-sophroside.

absence of diacylated derivatives in native extract: in cauliflower (Llorach et al., 2003) and in tronchuda cabbage (Ferreres et al., 2005, 2006) only one quercetin free glycoside was found. Additionally, both tronchuda cabbage (Ferreres et al., 2005, 2006) and broccoli (Vallejo et al., 2004) present diacylated derivatives.

3.1.3. Hydroxycinnamic acyl gentiobiosides

These compounds, also observed in other *Brassica* (Ferreres et al., 2006; Vallejo et al., 2004), show a UV spectrum similar to their derived hydroxycinnamic acids. In their MS^2 was seen the ion produced by loss of acid or of the deprotonated acid, and the MS^3 shows the ions of the deprotonated and dehydrated acids

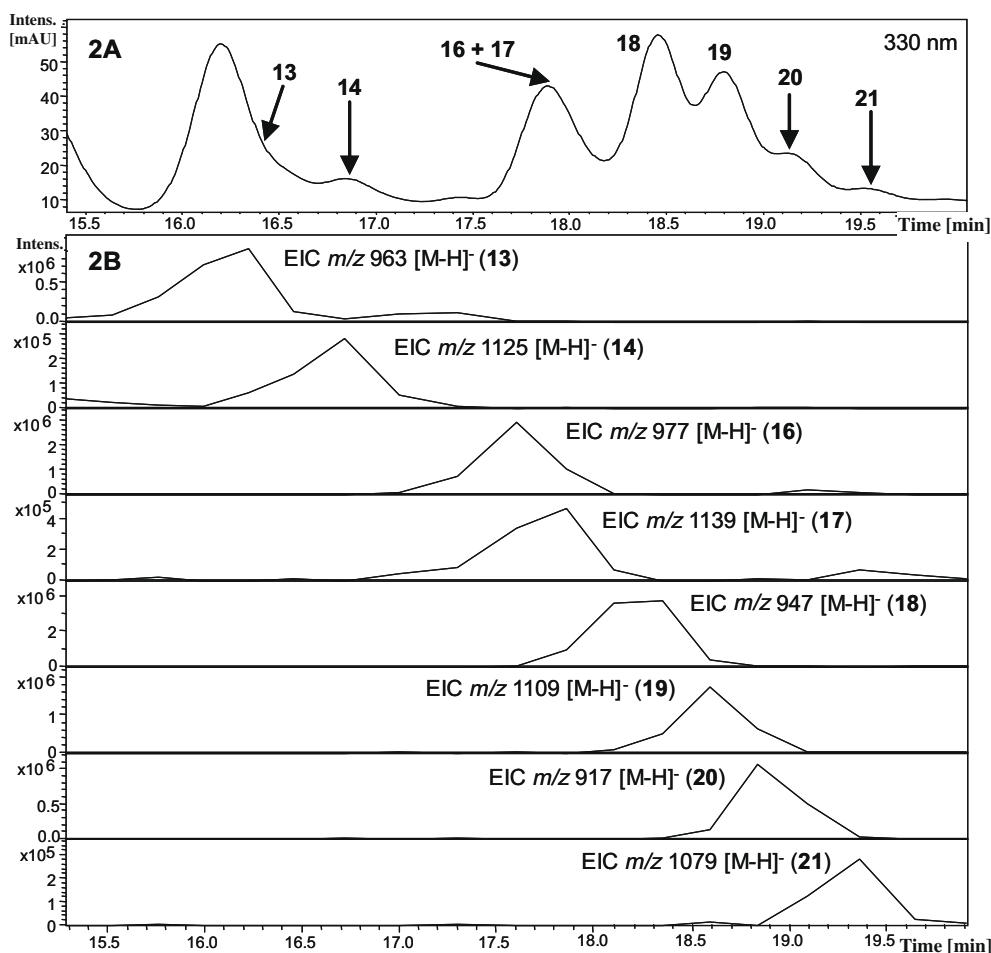


Fig. 2. (A) HPLC/UV-DAD zoom (R_t 15.5–20.0 min) corresponding to the elution of compounds **13**, **14**, and **16–21**. (B) extracted ion chromatogram (EIC) of their deprotonated molecular ions.

Table 3

R_t , UV, and -MS: [M-H]⁻, -MS² [M-H]⁻ and -MS³ [(M-H) → base peak]⁻ data of acyl gentiobiosides from native aqueous extract of *Brassica oleracea* var. *acephala* leaves^a.

Compounds ^b	R_t (min)	UV (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	-MS ² [M-H] ⁻ (m/z) (%)	-MS ³ [(M-H) → base peak] ⁻ (m/z) (%)
<i>DiAcyl-Gentiobioside</i>					
32 diSinp-Gentb	33.7	333	753	-194	-224 [224-H] ⁻ [194-H] ⁻ [224-H] ⁻ [224-18] ⁻ [194-H] ⁻ [193-18] ⁻
33 Sinp,Fer-Gentb	34.3	297sh,330	723	529(9)	529(100) 223 (11) 223(100) 206(50) 193(100) 175(32)
34 diFer-Gentb	34.7	301sh,329	693	499(100)	499(100) 193(7) 193(44) 175(100)
<i>TriAcyl-Gentiobioside</i>					
35 diSinp,Fer-Gentb	35.1	299sh,331	929	-224 -224 × 2	-206 705(100) 481(10) 499(100)

^a Main observed fragments. Other ions were found but they have not been included.

^b Sinp: sinapoyl, Fer: feruloyl, and Gentb: gentiobioside.

(Table 3). Thus, the following were detected: disinapoyl-gentiobioside (**32**), sinapoyl,feruloyl-gentiobioside (**33**), diferuloyl-gentiobioside (**34**) and disinapoyl,feruloyl-gentiobioside (**35**).

The knowledge of the phenolic composition of kale leaves has been improved: of the thirty-five characterized phenolics, only compounds **7**, **8**, **16–20**, **32**, and **33** were previously reported in this species (Ayaz et al., 2008; Romani et al., 2003; Heimler et al., 2006).

3.2. Characterization of *P. brassicae* excrement phenolic compounds

The principal phenolics in *P. brassicae* excrement were coincident with the main ones in kale leaves (Fig. 3). The non-acylated

glycosyl flavonols **2**, **6**, **7**, **10**, **11**, **23**, **27**, and **30** were detected (Fig. 3). Notably, the last of these was the most abundant, while in kale leaves it was found in small amounts. Its higher concentration may be due to deglycosylation at C-7 of **7** and of other kaempferol-3-*O*-sophoroside-7-*O*-glycosides, like **10** and **11**, as well as from deacylation and deglycosylation of acyl derivatives of the previous two compounds (**4**, **8**, and **16–21**). Other non-acylated glycosides present in excrement, and not detected in kale leaves, are kaempferol (**38** and **44**) and isorhamnetin (**40** and **46**) derivatives (Table 4), which should also arise from deglycosylation at C-7 of **6/10**, **12/15**, **22/23**, and **24**, respectively. Kaempferol-3-*O*-glucoside (**45**) was also detected. Regarding glycosylflavonol acylated deriv-

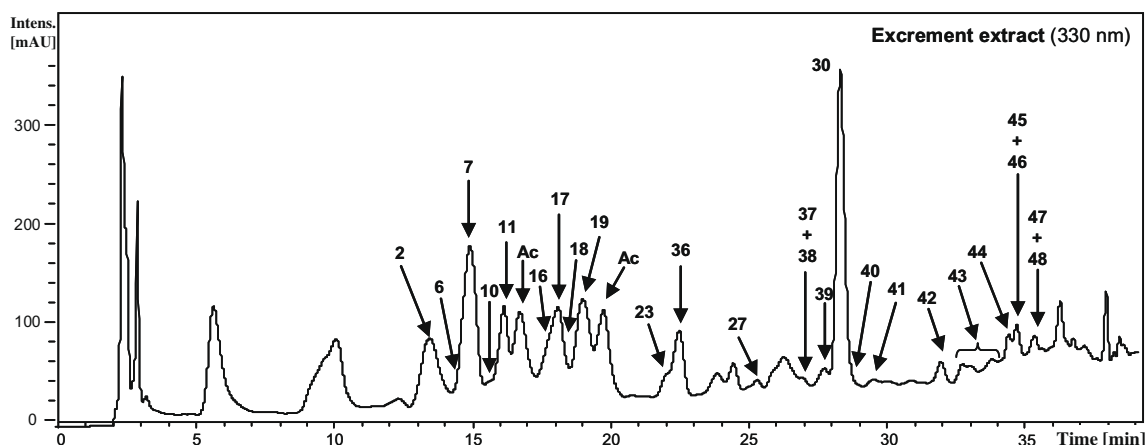


Fig. 3. HPLC/UV-DAD phenolic profile of *P. brassicae* excrement aqueous extract. Detection at 330 nm. Peaks: (Ac) acylated derivatives; **2**, **6**, **7**, **10**, **11**, **16**–**19**, **23**, **27**, and **30** see Fig. 1, (**36**) kaempferol-3-*O*-sophoroside sulphate, (**37**) kaempferol-3-*O*-(sinapoyl)sophorotrioside, (**38**) kaempferol-3-*O*-sophorotrioside, (**39**) kaempferol-3-*O*-(feruloyl)sophorotrioside, (**40**) isorhamnetin-3-*O*-sophoroside, (**41**) kaempferol-3-*O*-(*p*-coumaroyl)sophorotrioside, (**42**) quercetin-3-*O*-glucoside sulphate, (**43**) kaempferol-3-*O*-glucoside sulphate, (**44**) kaempferol-3-*O*-gentiobioside, (**45**) kaempferol-3-*O*-glucoside, (**46**) isorhamnetin-3-*O*-gentiobioside, (**47**) kaempferol-3-*O*-(feruloyl)sophoroside (isomer), and (**48**) kaempferol-3-*O*-(*p*-coumaroyl)sophoroside.

atives common to kale leaves, compounds **16**–**19** were detected, the most abundant in the native extract of the leaves. Other glycosylflavonol acylated derivatives not found in kale were kaempferol-3-*O*-(acyl)sophorotrioside with sinapic (**37**), ferulic (**39**) and *p*-coumaric acid (**41**), and acylated derivatives of kaempferol-3-*O*-sophoroside with ferulic and *p*-coumaric acid (**47** and **48**, respec-

tively, Table 5). These compounds should also result from deglycosylation at C-7 of kaempferol-3-*O*-(acyl)sophorotrioside/sophoroside-7-*O*-glycosides. Sulphate derivatives were also noted: kaempferol-3-*O*-sophoroside sulphate (**36**), quercetin-3-*O*-glucoside sulphate (**42**) and several kaempferol-3-*O*-glucoside sulphate derivative isomers (R_t 32.5–33.5 min), which were assigned

Table 4

R_t and -MS: $[M-H]^-$, -MS² $[M-H]^-$ data of non-acylated glycosyl flavonoids from excrement not observed in the native extract of *Brassica oleracea* var. *acephala* leaves^a.

Compounds ^b		R_t (min)	$[M-H]^-$ (m/z)	-MS ² $[M-H]^-$ (m/z) (%)					
				–120	–162	–180	–324	–342	Aglc-H/2H
38	K-3tG	27.0	771	651(22)	609(70)	591(10)	447(5)	429(80)	284(100)
40	I-3dG	28.4	639		477(10)	459(15)			315(100)
44	K-3dG	34.2	609						285(100)
45	K-3G	34.6	447						285(100)
46	I-3dG	34.8	639						315(100)

^a Main observed fragments. Other ions were found but they have not been included.

^b K: kaempferol, I: isorhamnetin, and G: glucose.

Table 5

R_t and -MS: $[M-H]^-$, -MS² $[M-H]^-$ data of acylated glycosyl flavonoids from excrement not observed in the native extract of *Brassica oleracea* var. *acephala* leaves^a.

Compounds ^b		R_t (min)	$[M-H]^-$ (m/z)	-MS ² $[M-H]^-$ (m/z) (%)		-MS ³ $[(M-H) \rightarrow (M-H-Acyl)]^-$ (m/z) (%)			
				-Acyl+14	-Acyl	Aglc-H/2H	–162	–180	–342
37	38-S	26.7	977	785(20)	771(100)		609(50)		429(70)
39	38-F	27.9	947	785(20)	771(100)		609(18)	591 (17)	429(25)
41	38-pC	29.5	917		771(100)		609(20)		429(40)
47	30-F	35.0	785	623(100)	609(70)	284(30)		429(10)	285(100)
48	30-pC	35.2	755		609(100)	284(10)		429(20)	285(100)

^a Main observed fragments. Other ions were found but they have not been included.

^b S: Sinapoyl, F: Feruloyl, pC (*p*-Coom): *p*-Coumaroyl, Aglc: aglycone, **38**: Kaempferol-3-*O*-sophorotrioside, and **30**: Kaempferol-3-*O*-sophoroside.

Table 6

R_t and -MS: $[M-H]^-$, -MS² $[M-H]^-$ and -MS³ $[(M-H) \rightarrow (M-H-80)]^-$ data of glycosyl flavonoid sulphates from excrement^a.

Compounds ^b		R_t (min)	$[M-H]^-$ (m/z)	-MS ² $[M-H]^-$ (m/z) (%)		-MS ³ $[(M-H) \rightarrow (M-H-80)]^-$ (m/z) (%)		
				–80	–80-162	Aglc-H	–162	Aglc-H
36	K-3dG sulphate	22.6	689	609(100)	447(70)	285(90)	447(90)	285(100)
42	Q-3G sulphate	32.1	543	463(100)		301(25)		301(100)
43	K-3G sulphate	33.0 ^c	527	447(100)		285(50)		285(100)

^a Main observed fragments. Other ions were found but they have not been included.

^b K: kaempferol, Q: quercetin, and G: glucose.

^c R_t of the group of kaempferol-3-*O*-glucoside sulphate derivatives (undetermined number) (R_t 32.5–33.5).

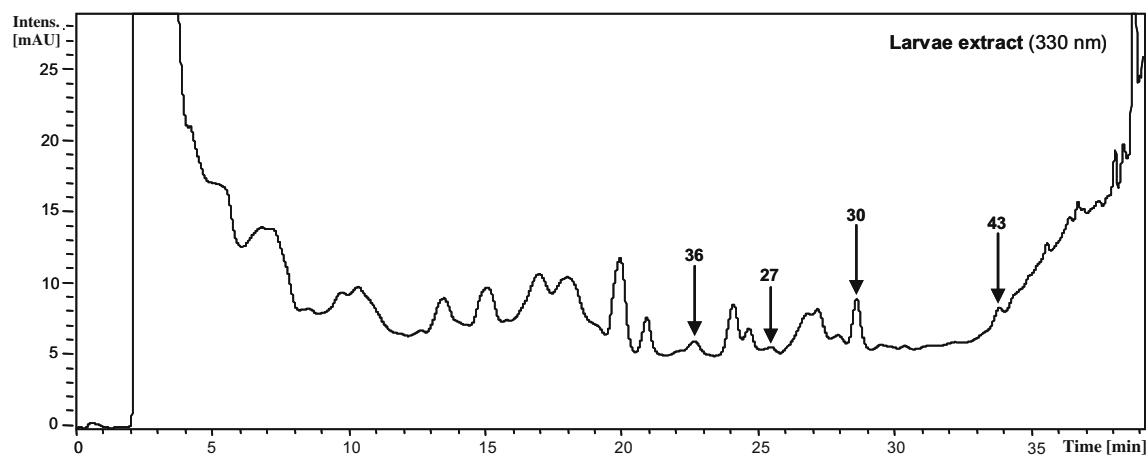


Fig. 4. HPLC/UV-DAD phenolic profile of *P. brassicae* larvae aqueous extract. Detection at 330 nm. Peaks: 27 and 30 see Fig. 1, 36 and 43 see Fig. 3.

Table 7

Quantification of phenolic compounds in kale and *P. brassicae* material and its excrement.

	Compound	mg/kg (dry basis) ^a		
		Kale	Larvae	Excrement
1	Quercetin-3-O-sophtr-7-O-gluc	226.2 ± 1.4	–	–
2	Quercetin-3-O-soph-7-O-gluc	314.1 ± 16.4	–	133.6 ± 13.6
4	Kaempferol-3-O-(methoxycaffeoyl)soph-7-O-gluc+	759.9 ± 60.2	–	–
5	Quercetin-3-O-soph-7-O-digluc	–	–	–
6	Kaempferol-3-O-sophtr-7-O-gluc+	–	–	803.3 ± 40.2
7	Kaempferol-3-O-soph-7-O-gluc+	2900.3 ± 4.2	–	–
8	Kaempferol-3-O-(caffeoyl)soph-7-O-gluc+	–	–	–
9	Quercetin-3-O-(sinapoyl)soph-7-O-gluc	–	–	–
10	Kaempferol-3-O-sophtr-7-O-digluc	–	–	nq
11	Kaempferol-3-O-soph-7-O-digluc	559.2 ± 36.9	–	483.8 ± 28.5
12	Isorhamnetin-3-O-soph-7-O-gluc+	215.4 ± 14.1	–	–
13	Quercetin-3-O-(feruloyl)soph-7-O-gluc	–	–	–
14	Quercetin-3-O-(feruloyl)soph-7-O-digluc	64.6 ± 1.7	–	–
16	Kaempferol-3-O-(sinapoyl)soph-7-O-gluc+	957.9 ± 20.5	–	566.7 ± 9.6
17	Kaempferol-3-O-(sinapoyl)soph-7-O-digluc+	–	–	–
18	Kaempferol-3-O-(feruloyl)soph-7-O-gluc	2537.6 ± 58.5	–	–
19	Kaempferol-3-O-(feruloyl)soph-7-O-digluc	351.1 ± 1.8	–	807.8 ± 5.6
20	Kaempferol-3-O-(p-coumaroyl)soph-7-O-gluc	112.6 ± 19.5	–	–
21	Kaempferol-3-O-(p-coumaroyl)soph-7-O-digluc	128.9 ± 6.3	–	–
22	Kaempferol-3-O-gent-7-O-gluc	305.0 ± 4.5	–	–
23	Kaempferol-3-O-gent-7-O-digluc+	119.5 ± 8.3	–	155.2 ± 8.5
36	Kaempferol-3-O-soph sulfate	–	nq	–
24	Isorhamnetin-3-O-gent-7-O-gluc	nq	–	–
25	Quercetin-3-O-(sinapoyl)soph	22.3 ± 0.5	–	–
26	Quercetin-3-O-(feruloyl)soph	91.2 ± 2.7	–	–
27	Quercetin-3-O-soph+	105.0 ± 30.4	10.1 ± 0.8	163.5 ± 36.6
28	Kaempferol-3-O-(p-coumaroyl)gent-7-O-gluc	–	–	–
29	Kaempferol-3-O-(sinapoyl)soph	268.3 ± 16.4	–	–
30	Kaempferol-3-O-soph+	958.3 ± 14.3	12.9 ± 0.1	1765.6 ± 87.7
31	Kaempferol-3-O-(feruloyl)soph	–	–	–
32	Disinapoyl-gent	21.7 ± 7.7	–	–
33	Sinapoyl,feruloyl-gent	11.3 ± 0.1	–	–
34	Diferuloyl-gent	19.5 ± 3.3	–	–
35	Disinapoyl,feruloyl-gent	31.0 ± 1.0	–	–
37	Kaempferol-3-O-(sinapoyl)sophtr+	–	–	121.3 ± 12.3
38	Kaempferol-3-O-sophtr	–	–	–
39	Kaempferol-3-O-(feruloyl)sophtr	–	–	87.9 ± 3.0
40	Isorhamnetin-3-O-soph	–	–	179.2 ± 11.9
41	Kaempferol-3-O-(p-coumaroyl)sophtr	–	–	4.2 ± 0.2
42	Quercetin-3-O-gluc sulfate	–	–	125.3 ± 7.5
43	Kaempferol-3-O-gluc sulfate	–	5.5 ± 2.6	147.8 ± 12.6
44	Kaempferol-3-O-gent	–	–	nq
45	Kaempferol-3-O-gluc+	–	–	165.8 ± 13.4
46	Isorhamnetin-3-O-gent	–	–	–
47	Kaempferol-3-O-(feruloyl)soph+	–	–	327.1 ± 35.5
48	Kaempferol-3-O-(p-coumaroyl)soph	–	–	–
	Σ	11080.7	28.5	6043.1

^a Results are expressed as mean ± standard deviation of three determinations. Σ, sum of the determined phenolic compounds, nd: not detected, sophtr: sophorotriose, soph: sophorose, gluc: glucose, digluc: diglucose, gent: gentiobiose.

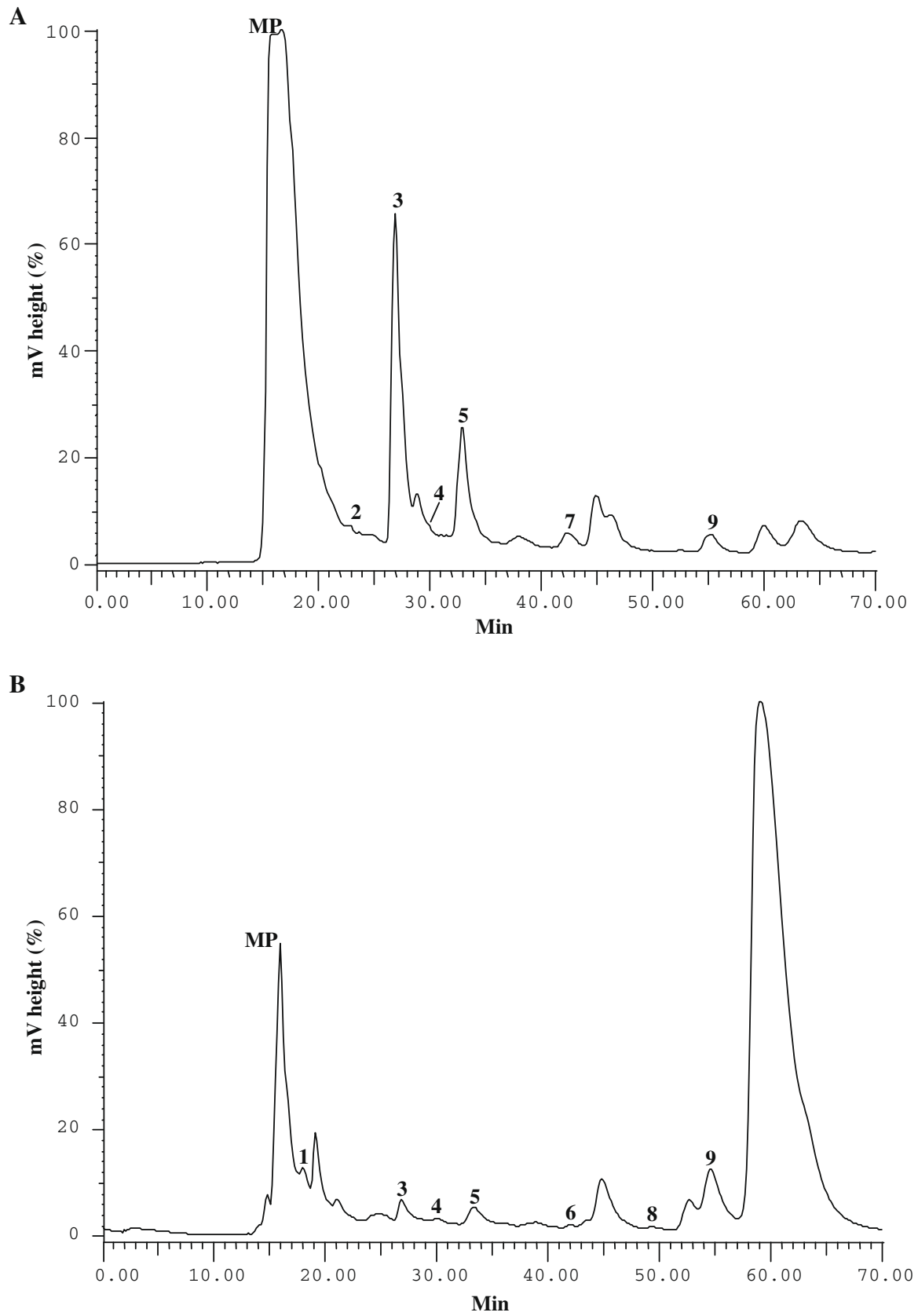


Fig. 5. HPLC-UV organic acid chromatogram of: (A) kale and (B) *P. brassicae* larvae aqueous lyophilized extract. Detection at 214 nm. Peaks: (MP) mobile phase; (1) oxalic acid; (2) aconitic acid; (3) citric acid; (4) pyruvic acid; (5) malic acid; (6) succinic acid; (7) shikimic acid; (8) acetic acid; (9) fumaric acid.

Table 8Quantification of organic acids in kale and *P. brassicae* material and its excrement (mg/kg, dry basis)^a.

	Compound	Kale	Larvae	Butterfly	Excrement
1	Oxalic acid	–	373.6 ± 14.3	1634.0 ± 2.7	–
2	Aconitic acid	194.7 ± 3.9	–	–	313.7 ± 2.8
3	Citric acid	65553.5 ± 2214.9	6462.7 ± 229.1	8090.3 ± 233.7	4979.2 ± 805.6
4	Pyruvic acid	2401.4 ± 41.9	223.1 ± 8.6	5071.5 ± 61.3	1515.1 ± 0.7
5	Malic acid	44010.4 ± 855.2	11193.2 ± 321.1	1811.8 ± 145.9	3944.1 ± 31.9
6	Succinic acid	–	2033.9 ± 177.8	2345.9 ± 4.6	–
7	Shikimic acid	59.5 ± 3.3	–	–	53.1 ± 0.2
8	Acetic acid	–	3712.3 ± 273.3	–	7806.6 ± 4.8
9	Fumaric acid	74.8 ± 0.1	330.0 ± 0.4	236.4 ± 0.8	248.8 ± 4.3
	Σ	112294.4	24328.8	19189.9	18860.5

Σ, sum of the determined organic acids.

^a Results are expressed as mean ± standard deviation of three determinations.

together as **43** (Fig. 3, Table 6). The MS of these sulphated derivatives shows a loss of 80 amu to yield the base peak. In general, and as before (Ferreres et al., 2008b), *P. brassicae* metabolic processes involve deglycosylation at C-7, deacylation and sulphating. Assuming that the majority of sulphated derivatives are monoglucosides, a second deglycosylation step also occurs (Ferreres et al., 2008b).

3.3. Characterization of *P. brassicae* larvae and butterfly phenolic compounds

The HPLC/UV–DAD/MSⁿ–ESI analysis of both *P. brassicae* larvae and butterflies revealed phenolics in very low amounts. To check for the occurrence of flavonoid derivatives, HPLC–MSⁿ was used by extracting the MSⁿ ions at *m/z* 284–285, 300–301 and 314–315 (extracted ion chromatogram, EIC), whose presence would lead to kaempferol, quercetin and isorhamnetin glycosides, respectively. The ions presenting a loss of 80 amu during their fragmentation were also extracted, since this may indicate the presence of sulphate derivatives (Constant Neutral Loss Chromatogram). Compounds **27**, **30**, **36**, and **43** were detected in the larvae (Fig. 4), while in the butterfly, no flavonoid derivatives were found.

3.4. Phenolic compounds quantification

High phenolics amounts were found in the lyophilized extracts of kale (ca. 11081 mg/kg) and *P. brassicae* excrement (ca. 6043 mg/kg) (Table 7). Compounds **7–9** were the main phenolics in kale, representing ca. 26% of total compounds (Table 7). In *P. brassicae* excrement, compound **30** was the main one (ca. 29% of total of phenolics) (Table 7). This seems to confirm the metabolism of kale compounds by deglycosylation at C-7 of kaempferol-3-O-sophorohexide-7-O-glycosides, as well as by deacylation and deglycosylation of their 3-acyl derivatives. In *P. brassicae* larvae, compound **30** was also the major phenolics corresponding to ca. 45% of total phenolic compounds (Table 7), as observed before with the larvae fed with *B. oleracea* var. *costata*, but with one hour of food privation (Ferreres et al., 2007), which suggests this compound to be a final product of larvae metabolism.

3.5. Organic acids

Nine compounds were identified, but only citric, pyruvic, malic and fumaric acids were common to kale and *P. brassicae* material extracts (Fig. 5, Table 8). In *P. brassicae* exuvia, only oxalic, pyruvic and fumaric acids were found, although in trace amounts. All of these compounds are described here for the first time in *P. brassicae* material and its excrement. Regarding kale, all of the compounds found have been reported previously in its inflorescences (Sousa et al., 2008) and leaves (Ayaz et al., 2006). Kale exhibited the highest organic acid content (ca. 112294 mg/kg) (Table 8). Con-

cerning *P. brassicae*, the larvae were the richest material in organic acids, showing ca. 24329 mg/kg (Table 8). Citric acid was the major compound in kale and in *P. brassicae* butterflies, corresponding to ca. 58% and 42% of total acids content, respectively. Malic acid was the most abundant in larvae (ca. 46% of total compounds), while the excrement contained acetic acid as its main compound, representing ca. 41% of total acids amount. The absence of acetic acid in kale and its presence in *P. brassicae* larvae and excrement

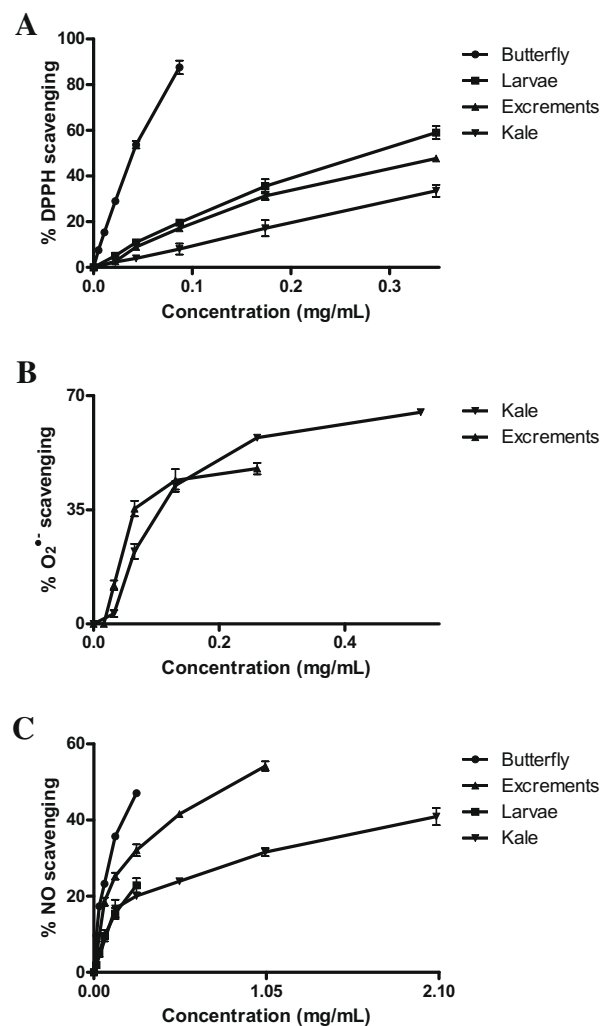


Fig. 6. Effect of kale, *P. brassicae* material and its excrement aqueous lyophilized extracts against: (A) DPPH, (B) superoxide radical, and (C) nitric oxide. Values show mean ± SE from three experiments performed in triplicate.

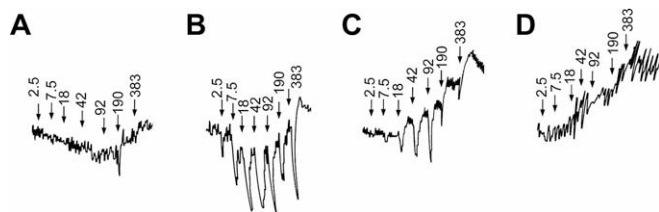


Fig. 7. Effect of: (A) kale, (B) *P. brassicae* larvae, (C) *P. brassicae* butterflies, and (D) *P. brassicae* excrement on isolated smooth muscle preparation. Values are accumulated concentrations in $\mu\text{g/mL}$.

(at considerable amounts) suggest that this compound results from an intestinal microflora fermentation process, as happens in other organisms (Zhao et al., 2006; Garcia et al., 2008).

3.6. Antioxidant capacity

In the DPPH assay, all extracts displayed a concentration-dependent antioxidant potential: *P. brassicae* butterflies exhibited the strongest capacity (IC_{25} at 19 $\mu\text{g/mL}$), while kale was less active (IC_{25} at 257 $\mu\text{g/mL}$) (Fig. 6A). Kale and *P. brassicae* excrement also exhibited a concentration-dependent superoxide radical-scavenging capacity, with the excrement being the most effective (IC_{25} at 51 $\mu\text{g/mL}$) (Fig. 6B). *P. brassicae* larvae and butterflies showed antioxidant ability for concentrations lower than 130 and 260 $\mu\text{g/mL}$, respectively, above which a decrease in superoxide radical-scavenging activity was noticed (data not shown). These results suggest the existence of both antioxidant and pro-oxidant effects for concentrations higher than the above referred ones. All extracts revealed nitric oxide scavenging capacity (Fig. 6C). *P. brassicae* butterflies showed the strongest activity (IC_{20} at 47 $\mu\text{g/mL}$), followed by excrement (IC_{20} at 81 $\mu\text{g/mL}$). Kale was the least effective (IC_{20} at 261 $\mu\text{g/mL}$).

To access the contribution of the identified compounds to the overall antioxidant activity of the extracts, kaempferol-3-*O*-rutinoside was tested at the concentrations corresponding to the sum of kaempferol derivatives (the main phenolics), since none of those was commercially available. We tested a chemically related compound with a similar chemical structure and UV spectrum. The same was done with mixtures of organic acids. Kaempferol derivatives did not reveal DPPH scavenging capacity, but contributed to some extent to the superoxide radical-scavenging ability of kale (at the highest tested concentration of kaempferol-3-*O*-rutinoside,

ca. 30% activity was observed). The same was found for the *P. brassicae* excrement extract, for which ca. 23% activity was noted. The contribution of these compounds to the effect of *P. brassicae* larvae against superoxide radical followed the behavior of the extract, showing both pro-oxidant and antioxidant activity. Only for kale extract did the kaempferol derivatives appear to contribute to the activity registered in the nitric oxide radical-scavenging assay (ca. 13% at the highest concentration). Organic acids did not contribute to the antioxidant activity. Thus, other compounds, belonging to other chemical classes, may also contribute to the observed effects.

3.7. Biological activity on intestinal smooth muscle

Phenolics have been previously described as having an effect on intestinal smooth muscle (Harborne and Williams, 2000). Therefore, we screened for the biological activity of kale and *P. brassicae* materials using an isolated rat ileum preparation. All extracts exerted effects within the tested concentrations (2.5 and 383 $\mu\text{g/mL}$). Kale extract was the least active, exerting only minor relaxations up to 190 $\mu\text{g/mL}$, after which contractions predominated (Fig. 7A). *P. brassicae* larvae were the most potent concerning smooth muscle relaxation (EC_{50} = 6.5 $\mu\text{g/mL}$), exerting fast concentration-dependent relaxations of short-duration (Fig. 7B). The butterflies exerted a peculiar biphasic response, with fast relaxations (EC_{50} = 36.1 $\mu\text{g/mL}$) followed by rebound contractions in a concentration-dependent manner, without reaching a maximum (Fig. 7C). *P. brassicae* excrement exhibited only contractions (EC_{50} = 47.7 $\mu\text{g/mL}$) (Fig. 7D). No effect on intestinal smooth muscle was detected for kaempferol-3-*O*-rutinoside or the organic acid mixtures tested, suggesting that compounds from other chemical classes are responsible for the observed activities.

4. Conclusion

This study is the first report on the metabolic profiling of *P. brassicae* fed with kale, as well as on the activity of extracts from materials of the insect's life cycle. We provide evidence that the larvae sequesters and metabolizes kale's phenolic compounds, namely through deacylation, deglycosylation and sulphating reactions. All extracts revealed antioxidant properties and displayed activity on intestinal smooth muscle, albeit with distinct profiles, evidencing their different composition of bioactive molecules. Phenolic compounds may have a role in the antioxidant capacity, which was not noticed for organic acids (Fig. 8). Additionally none

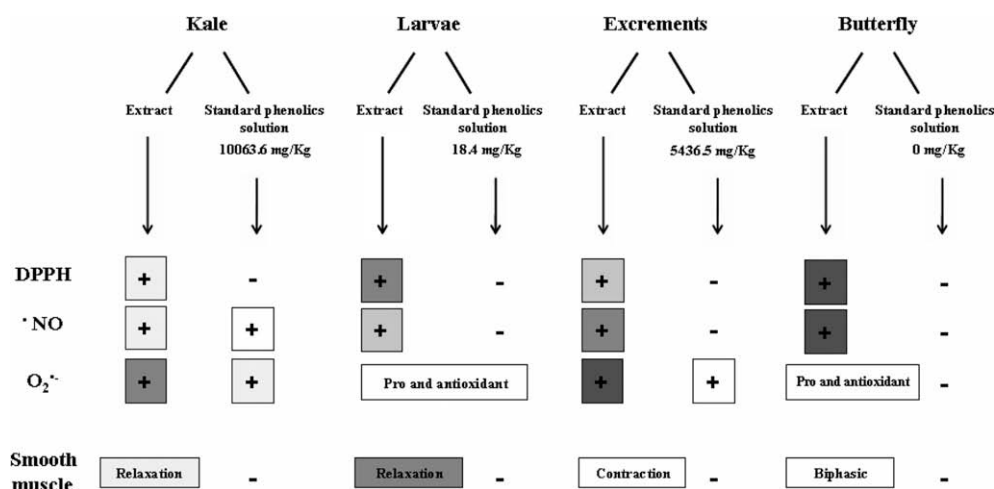


Fig. 8. Schematic representation of the contribution of phenolic compounds to the observed activity in kale and *Pieris brassicae* materials extracts. Color gradation corresponds to the effectiveness of the response (increasing activity, starting in white).

of these classes seemed to contribute to the effect on intestinal smooth muscle. Nevertheless, these results suggest that *P. brassicae* may constitute a source of bioactive compounds whose complex chemical structure precludes either synthesis or isolation.

Conflicts of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors (PTDC/AGR-AAM/64150/2006) and F. Fernandes (SFRH/BD/37963/2007) are grateful to Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT).

References

- Allwood, J.W., Ellis, D.I., Goodacre, R., 2008. Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant-host interactions. *Physiol. Plant.* 132, 117–135.
- Ayaz, F.A., Glew, R.H., Millson, M., Huang, H.S., Chaung, L.T., Sanz, C., Hayirhoglu-Ayaz, S., 2006. Nutrient contents of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.). *Food Chem.* 99, 572–579.
- Ayaz, F.A., Hayirhoglu-Ayaz, S., Alpay-Karaoglu, S., Grúz, J., Valentová, K., Ulrichová, J., Strnad, M., 2008. Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Food Chem.* 107, 19–25.
- Burghardt, F., Fiedler, K., Proksch, P., 1997. Uptake of flavonoids from *Vicia villosa* (Fabaceae) by the lycaenid butterfly, *Polyommatus icarus* (Lepidoptera:Lycaenidae). *Biochem. Syst. Ecol.* 25, 527–536.
- Domon, B., Costello, A., 1988. Systematic nomenclature for carbohydrate fragmentation in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconj. J.* 5, 397–409.
- Dunn, W.B., 2008. Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. *Phys. Biol.* 5, 1–24.
- Ferreres, F., Llorach, R., Gil-Izquierdo, A., 2004. Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and penta-glycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 39, 312–321.
- Ferreres, F., Pereira, D.M., Valentão, P., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Sottomayor, M., 2008a. New phenolic compounds and antioxidant potential of *Catharanthus roseus*. *J. Agric. Food Chem.* 56, 9967–9974.
- Ferreres, F., Sousa, C., Valentão, P., Pereira, J.A., Seabra, R.M., Andrade, P.B., 2007. Tronchuda cabbage flavonoids uptake by *Pieris brassicae*. *Phytochemistry* 68, 361–367.
- Ferreres, F., Sousa, C., Vrchovská, V., Valentão, P., Pereira, J.A., Seabra, R.M., Andrade, P.B., 2006. Chemical composition and antioxidant activity of tronchuda cabbage internal leaves. *Eur. Food Res. Technol.* 222, 88–98.
- Ferreres, F., Valentão, P., Llorach, R., Pinheiro, C., Cardoso, L., Pereira, J.A., Sousa, C., Seabra, R.M., Andrade, P.B., 2005. Phenolic Compounds in external leaves of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC). *J. Agric. Food Chem.* 53, 2901–2907.
- Ferreres, F., Valentão, P., Pereira, J.A., Bento, A., Noites, A., Seabra, R.M., Andrade, P.B., 2008b. HPLC-DAD-MS/MS-ESI screening of phenolic compounds in *Pieris brassicae* L. reared on *Brassica rapa* var. *rapa* L. *J. Agric. Food Chem.* 56, 844–853.
- Garcia, A., Olmo, A., Lopez-Gonzalez, A., Cornejo, L., Rupérez, F.J., Barbas, C., 2008. Capillary electrophoresis for short chain organic acids in faeces. Reference values in a Mediterranean elderly population. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46, 356–361.
- Hagel, J.M., Facchini, P.J., 2008. Plant metabolomics: analytical platforms and integration with functional genomics. *Phytochem. Rev.* 7, 479–497.
- Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481–504.
- Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M.G., Vincieri, F.F., Romani, A., 2006. Antiradical activity and polyphenol composition of local *Brassicaceae* edible varieties. *Food Chem.* 99, 464–469.
- Heinrich, M., 2008. Ethnopharmacy and natural product research – multidisciplinary opportunities for research in the metabolomic age. *Phytochem. Lett.* 1, 1–5.
- Llorach, R., Gil-Izquierdo, A., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A., 2003. HPLC-DAD-MS/MS ESI characterization of unusual highly glycosylated acylated flavonoids from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) agroindustrial byproducts. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3895–3899.
- Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag, New York.
- Martínez-Sánchez, A., Llorach, R., Gil, M.I., Ferreres, F., 2007. Identification of new flavonoid glycosides and flavonoid profiles to characterize rocket leafy salads (*Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*). *J. Agric. Food Chem.* 55, 1356–1363.
- Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Corti, G., Agnelli, A., Heimler, D., 2003. Analysis of flavonoids in leaves of black cabbage (*Brassica oleracea* var. *acephala* DC subvar. *viridis* forma *serotina*) grown on different soils and heights. *Ital. J. Food Sci.* 15, 197–205.
- Sousa, C., Taveira, M., Valentão, P., Fernandes, F., Pereira, J.A., Estevinho, L., Bento, A., Ferreres, F., Seabra, R.M., Andrade, P.B., 2008. Inflorescences of *Brassicaceae* species as source of bioactive compounds: a comparative study. *Food Chem.* 110, 953–961.
- Sousa, C., Valentão, P., Rangel, J., Lopes, G., Pereira, J.A., Ferreres, F., Seabra, R.M., Andrade, P.B., 2005. Influence of two fertilization regimens on the amounts of organic acids and phenolic compounds of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC). *J. Agric. Food Chem.* 53, 9128–9132.
- Vallejo, F., Tomás-Barberán, F.A., Ferreres, F., 2004. Characterization of flavonols in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) by liquid chromatography-UV diode-array detection-electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1054, 181–193.
- van Loon, J.J.A., Schoonhoven, L.M., 1999. Specialist deterrent chemoreceptors enable *Pieris* caterpillars to discriminate between chemically different deterrents. *Entomol. Exp. Appl.* 91, 29–35.
- van Loon, J.J.A., Wang, C.Z., Nielsen, J.K., Gols, R., Qiu, Y.T., 2002. Flavonoids from cabbage are feeding stimulants for diamondback moth larvae additional to glucosinolates: chemoreception and behaviour. *Entomol. Exp. Appl.* 104, 27–34.
- Vrchovská, V., Sousa, C., Valentão, P., Ferreres, F., Pereira, J.A., Seabra, R.M., Andrade, P.B., 2006. Antioxidative properties of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) external leaves against DPPH, superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Food Chem.* 98, 416–425.
- Vrchovská, V., Spilková, J., Valentão, P., Sousa, C., Andrade, P.B., Seabra, R.M., 2007. Antioxidative properties and phytochemical composition of *Ballota nigra* infusion. *Food Chem.* 105, 1396–1403.
- Zhao, G., Nyman, M., Jönsson, Å., 2006. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 20, 674–682.

4.2. Phenolics metabolism in insects: *Pieris brassicae* - *Brassica oleracea* var. *costata* ecological duo

J. Agric. Food Chem. 2009, 57, 9035–9043

Phenolics Metabolism in Insects: *Pieris brassicae*–*Brassica oleracea* var. *costata* Ecological Duo

FEDERICO FERRERES,[†] FÁTIMA FERNANDES,[‡] DAVID M. PEREIRA,[‡] JOSÉ A. PEREIRA,[§]
 PATRÍCIA VALENTÃO,[‡] AND PAULA B. ANDRADE^{*‡}

[†]Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Department of Food Science and Technology, CEBAS (CSIC), P.O. Box 164, 30100 Campus University Espinardo, Murcia, Spain,

[‡]REQUIMTE/Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Porto University, R. Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal, and [§]CIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal

Changes in the phenolics composition of *Pieris brassicae* larvae fasted for distinct periods (1, 2, 4, 6, and 8 h) and their excrements and of *Brassica oleracea* L. var. *costata* DC leaves were determined by high-pressure liquid chromatography/UV-photo diode array detector/mass spectrometry–electrospray ionization. This is the first report following phenolics' metabolism by *P. brassicae* through time. The results evidence that *P. brassicae* sequesters and metabolizes the phenolic compounds from the host plant. In a general way, deacylation was the main metabolic reaction that took place, but deglycosylation and sulfate conjugation reactions also occur. Additionally, several kaempferol derivatives containing rhamnose, which is not common in *Brassica*, were found in the host plant. Attending to the bioactivities recognized for the type of identified compounds, the different materials may constitute an interesting source of bioactive compounds, namely, of highly glycosylated and acylated kaempferol and quercetin derivatives, constituting an economic advantage for producers who have great losses caused by this pest. In addition, a deeper understanding of phenolics metabolism in insects was pursued.

KEYWORDS: *Pieris brassicae* L. larva; *Brassica oleracea* L. var. *costata* DC; phenolics; metabolism

INTRODUCTION

Plants produce a great variety of secondary metabolites that almost all herbivores will encounter when feeding. Some plants contain compounds, like phenolics, that insects can sequester into their body cuticle for protection against pathogens and predators or into their wings to attract mates (1). The majority of phytophagous insects are monophagous or oligophagous, feeding on a limited range of plant species or families (2). The association between *Pieris* (Lepidoptera: Pieridae) and their Brassicaceae host plants was initially attributed to glucosinolates, but phenolic compounds, like quercetin and kaempferol derivatives, have also exhibited a role in the dynamic of the plant–insect biological system (2, 3). Differently from other secondary metabolites accumulated by herbivores for defense or pheromone synthesis, phenolics are suggested to protect the insects against harmful radiation and to be involved in intra- or interspecific visual communication due to their UV-absorbing capacity (4, 5).

The phenolic profiles of large white butterfly *Pieris brassicae* L. larvae reared on the leaves of three *Brassica* of which it is a frequent pest, namely, *Brassica oleracea* L. var. *costata* DC (6), *B. oleracea* L. var. *acephala* (7), and *Brassica rapa* var. *rapa* L. (8), have been determined before by our group. Several complex

molecules, mainly flavonoid derivatives, were found before in extracts of the larvae kept without food for 1 and 12 h. Those studies provided evidence of the sequestration, metabolism, and excretion of the phenolic compounds from the host plant by *P. brassicae*. Also, the importance of the phenolic profile of the feeding materials in shaping the uptake and metabolic processes was demonstrated.

Furthermore, the distinct phenolic composition of the host plant was decisive for the bioactivity exhibited by several *P. brassicae* analyzed materials (7, 9, 10). However, the evolution of the metabolic process of *P. brassicae* was not assessed in any of those works. This information would contribute to the knowledge of the sequence of reactions occurring after phenolics uptake by the insect and could also allow the finding of interesting intermediary products.

As far as we are aware, there are no reported studies analyzing the evolution of phenolic compounds metabolism by this insect. Thus, the aim of the present work was to evaluate the overall phenolics profile evolution of *P. brassicae* reared on *B. oleracea* var. *costata* (tranchuda cabbage). On the other hand, attending to the bioactivities recognized for this type of compounds, their occurrence in insect materials may constitute an economic advantage for producers who have great losses due to the destruction of their cultures by this pest. For this purpose, extracts obtained from the larvae at different starvation periods,

*To whom correspondence should be addressed. Tel: + 351 222078934. Fax: + 351 222003977. E-mail: pandrade@ff.up.pt.

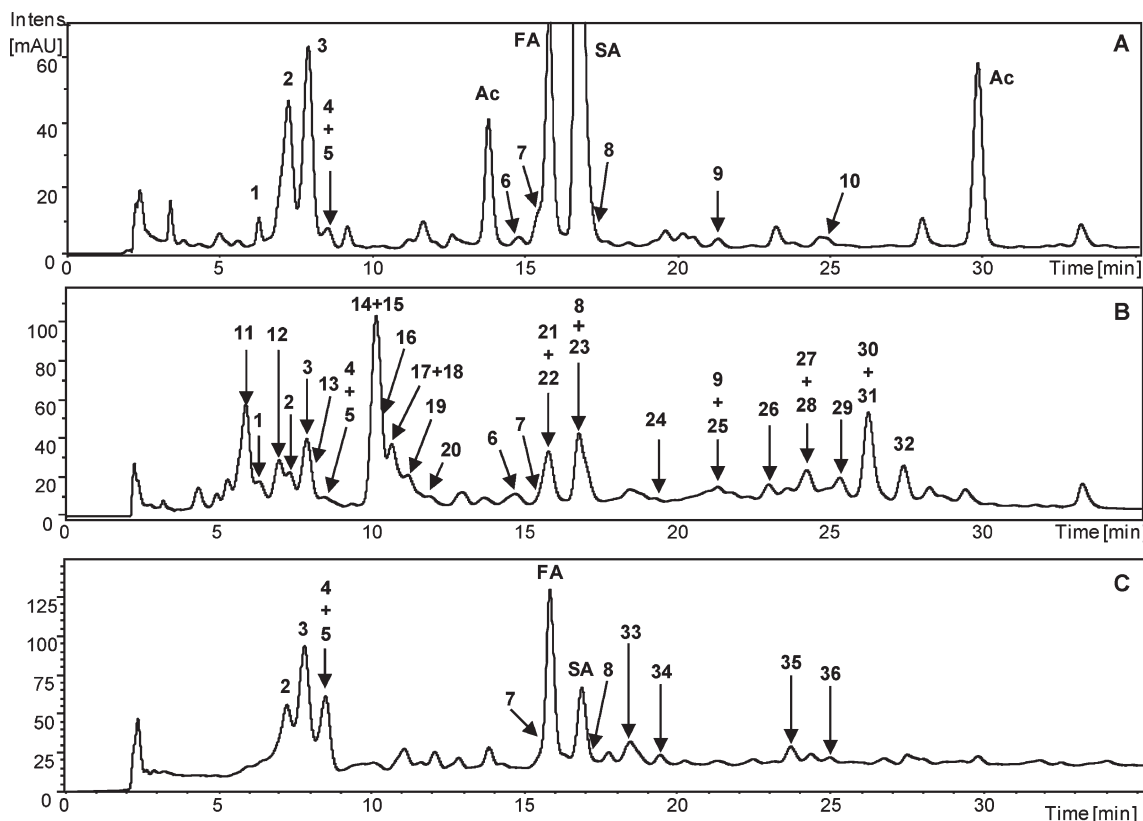


Figure 1. HPLC-PAD phenolic profile of (A) *B. oleracea* var. *costata* saponified extract, (B) *B. oleracea* var. *costata* native extract, and (C) *P. brassicae* excrement extract. Detection at 330 nm. Peaks: Ac, acylated derivatives not characterized; FA, ferulic acid; SA, sinapic acid; 1, quercetin-3-*O*-sophoroside-7-*O*-glucoside; 2, kaempferol-3-*O*-triglucoside-7-*O*-glucoside; 3, kaempferol-3-*O*-sophoroside-7-*O*-glucoside; 4, kaempferol-3-*O*-triglucoside-7-*O*-diglucoside; 5, kaempferol-3-*O*-sophoroside-7-*O*-diglucoside; 6, kaempferol-3-*O*-triglucoside-7-*O*-rhamnoglucoside; 7, kaempferol-3-*O*-triglucoside-7-*O*-rhamnoside; 8, kaempferol-3-*O*-sophoroside-7-*O*-rhamnoside; 9, kaempferol-3-*O*-sophoroside; 10, kaempferol-3-*O*-glucoside; 11, 3-*p*-coumaroylquinic acid; 12, 3-feruloylquinic acid; 13, kaempferol-3-*O*-(caffeoyl)sophoroside-7-*O*-glucoside; 14, kaempferol-3-*O*-(sinapoyl)triglucoside-7-*O*-glucoside; 15, kaempferol-3-*O*-(sinapoyl)sophoroside-7-*O*-glucoside; 16, 4-*p*-coumaroylquinic acid; 17, kaempferol-3-*O*-(feruloyl)triglucoside-7-*O*-glucoside; 18, kaempferol-3-*O*-(feruloyl)sophoroside-7-*O*-glucoside; 19, 5-*p*-coumaroylquinic acid; 20, 4-feruloylquinic acid; 21, kaempferol-3-*O*-(sinapoyl)triglucoside-7-*O*-rhamnoside; 22, kaempferol-3-*O*-(sinapoyl)sophoroside-7-*O*-rhamnoside; 23, kaempferol-3-*O*-(feruloyl)sophoroside-7-*O*-rhamnoside; 24, kaempferol-3-*O*-(sinapoyl)sophoroside; 25, kaempferol-3-*O*-(feruloyl)sophoroside; 26, feruloylsinapoylgentiobioside; 27, disinapoylgentiobioside; 28, feruloylsinapoylgentiobioside isomers; 29, disinapoylgentiobioside isomers; 30, feruloylsinapoylgentiobioside isomers; 31, kaempferol-3-*O*-(disinapoyl)triglucoside-7-*O*-glucoside; 32, disinapoylgentiobioside isomer; 33, kaempferol-3-*O*-(feruloyl)sophoroside-7-*O*-diglucoside; 34, kaempferol-3-*O*-(feruloyl)sophoroside-7-*O*-glucoside isomer; 35, kaempferol-3-*O*-(feruloyl)triglucoside-7-*O*-diglucoside; and 36, kaempferol-3-*O*-(feruloyl)triglucoside-7-*O*-glucoside.

as well as of the excrements produced by the insect, were analyzed by high-pressure liquid chromatography/UV-photo diode array detector/mass spectrometry–electrospray ionization (HPLC/UV-PAD/MSn-ESI), an advanced and valuable tool in the elucidation of complex phenolic molecules.

MATERIALS AND METHODS

Standards and Reagents. Methanol, sodium hydroxide, and hydrochloric and acetic acids were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). The water was treated in a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA).

Samples. Wild *P. brassicae* larvae were captured in Bragança (northeastern Portugal) and taken to the laboratory to complete their life cycle and for oviposition in *B. oleracea* L. var. *costata* DC leaves. *B. oleracea* var. *costata* samples used to feed *P. brassicae* were specially produced for this work, in greenhouses of Escola Superior Agrária de Bragança. Samples were collected in November, 2008, which corresponds to higher insect activity, following the vegetative cycle of the plant (more developed vegetable).

New larvae were developed having only this plant as host, which was supplied every day *ad libitum*. New larvae at the fourth instar were collected for analysis. *P. brassicae* larvae were isolated and deprived of food for 8 h. After this starving time, individuals were placed in *B. oleracea*

var. *costata* leaves for feeding. Afterward, they were divided in distinct groups, which were subjected to several starvation periods before being sacrificed (1, 2, 4, 6, and 8 h), together with their excrements. *P. brassicae* larvae at the distinct starvation periods, their excrements, and host *B. oleracea* var. *costata* leaves were freeze-dried. The dried material was powdered and kept in a desiccator in the dark until analysis. Voucher specimens (corresponding to aliquots of the samples that were subjected to extraction and phenolic compounds analysis) are deposited at the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Porto University.

Phenolic Compounds Extraction. For the characterization of the phenolic compounds in *P. brassicae* larvae and excrements and in the host plant, ca. 1 g of dried material was boiled for 30 min in 800 mL of water. The resultant aqueous extracts were filtered over a Büchner funnel, frozen, and lyophilized. The lyophilized extracts were kept in a desiccator in the dark until analysis. For the identification of phenolic compounds, each lyophilized extract (0.05 g) was thoroughly mixed with 1 mL of methanol/water (1:1), ultrasonicated (60 min), centrifuged (12000 rpm, 5 min), and filtered through a 0.45 μ m pore size membrane.

Alkaline Hydrolysis. For the study of the acyl flavonoids, alkaline hydrolysis was performed followed by mass spectrometric analysis of the deacylated derivatives. This hydrolysis procedure was necessary since losses of 146 mass units for *p*-coumaroyl moieties and of 162 mass units for caffeoyl residues coincide with the loss of rhamnosyl and hexosyl residues, respectively. Otherwise, a misassignment of the mass spectrometric data

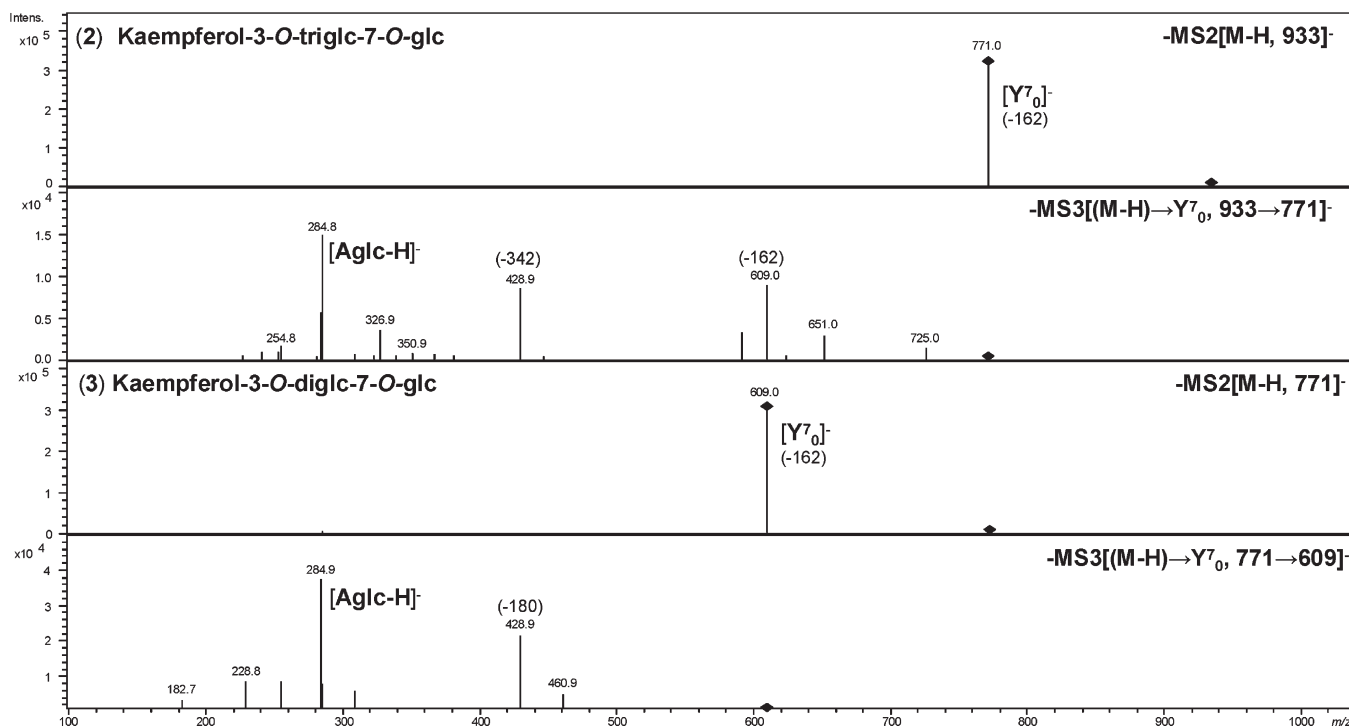


Figure 2. MS2 and MS3 spectra of the main flavonoids (**2** and **3**) in *B. oleracea* var. *costata* native extract. The identities of the compounds are as in **Figure 1**.

Table 1. R_t , UV, $-\text{MS}[\text{M} - \text{H}]^-$, $-\text{MS}2[\text{M} - \text{H}]^-$, and $-\text{MS}3[(\text{M} - \text{H}) \rightarrow \text{Y}_0^7]^-$ Data of Nonacylated Glycosyl Flavonoids from Native Extract and from Saponified Extract of *B. oleracea* var. *costata* Leaves (**1–10**) and from *P. brassicae* Larvae (**39**)^a

compounds ^b		<i>R</i> _t (min)	UV (nm)	[M – H] [–] (<i>m/z</i>) (%)	–MS2[M – H] [–] (<i>m/z</i>) (%)	–MS3[(M – H)→Y ₀ ^{7–}] (<i>m/z</i>) (%)			
						flavonol-3- <i>O</i> -tri/diglucoside-7- <i>O</i> -glucoside			
					Y ₀ ^{7–} (–162) 625 (100)	(–162) 463 (21)	(–180) 445 (63)	(–342) 300 (100)	
1	Q-3dG-7G	6.3	255, 266sh, 295sh, 352	787				Aglic-H/2H	
2	K-3tG-7G	7.1	266, 320sh, 347	933	771 (100)	609 (60)	429 (57)	285 (100)	
3	K-3dG-7G	7.9	266, 320sh, 347	771	609 (100)		429 (57)	285 (100)	
						kaempferol-3- <i>O</i> -triglucoside-7- <i>O</i> -rhamnoglucoside			
					Y ₀ ^{7–} (–308) 771 (100)	609 (100)	429 (25)	285 (65)	
6	K-3tG-7RG	14.8	266, 320sh, 348	1079					
						kaempferol-3- <i>O</i> -tri/diglucoside-7- <i>O</i> -rhamnoside			
					Y ₀ ^{7–} (–146) 771 (100)	609 (90)	429 (40)	284 (100)	
7	K-3tG-7R ^c	15.4		917					
8	K-3dG-7R ^c	17.1		755	609 (100)		429 (68)	284 (100)	
						kaempferol-3- <i>O</i> -tri/diglucoside-7- <i>O</i> -diglucoside			
					Y ₀ ^{7–} (–324) 771 (100)	609 (90)	429 (58);	285 (100)	
4	K-3tG-7dG ^c	8.5		1095					
5	K-3dG-7dG ^c	8.7		933	609 (100)		429 (40)	285 (100)	
						flavonol-3- <i>O</i> -tri/diglucoside			
						–MS2[M – H] [–] (<i>m/z</i>) (%)			
39	Q-3dG	17.4	256, 266sh, 302sh, 353			445 (40)		300 (100)	
9	K-3dG	21.3	266, 295sh, 348	609		429 (60)		285 (100)	
10	K-3G ^c	24.7		447				285 (100)	

^a Main observed fragments. Other ions were found, but they have not been included. ^b Q, quercetin; K, kaempferol; G, glucose; R, rhamnose; and Q-3-tG-7-dG, quercetin-3-O-trigluconide-7-O-diglucoside. ^c Compounds hidden by others or in traces. Their UV spectra have not been properly observed.

might occur, due to the inability to distinguish between the presence of *p*-coumaroyl or rhamnosyl moieties or the existence of caffeoyl or hexosyl groups

Sodium hydroxide (2 N; 0.5 mL) was added to 0.5 mL of the native methanol/water (1:1) solution from *B. oleracea* var. *costata* external leaves,

obtained as described above, and the mixture was kept for 16 h at room temperature in a stoppered test tube, under N_2 atmosphere. After this step, the alkaline hydrolysis products were acidified with concentrated hydrochloric acid (up to pH 1–2) and directly analyzed by HPLC/UV-PAD/ESI-MSn.

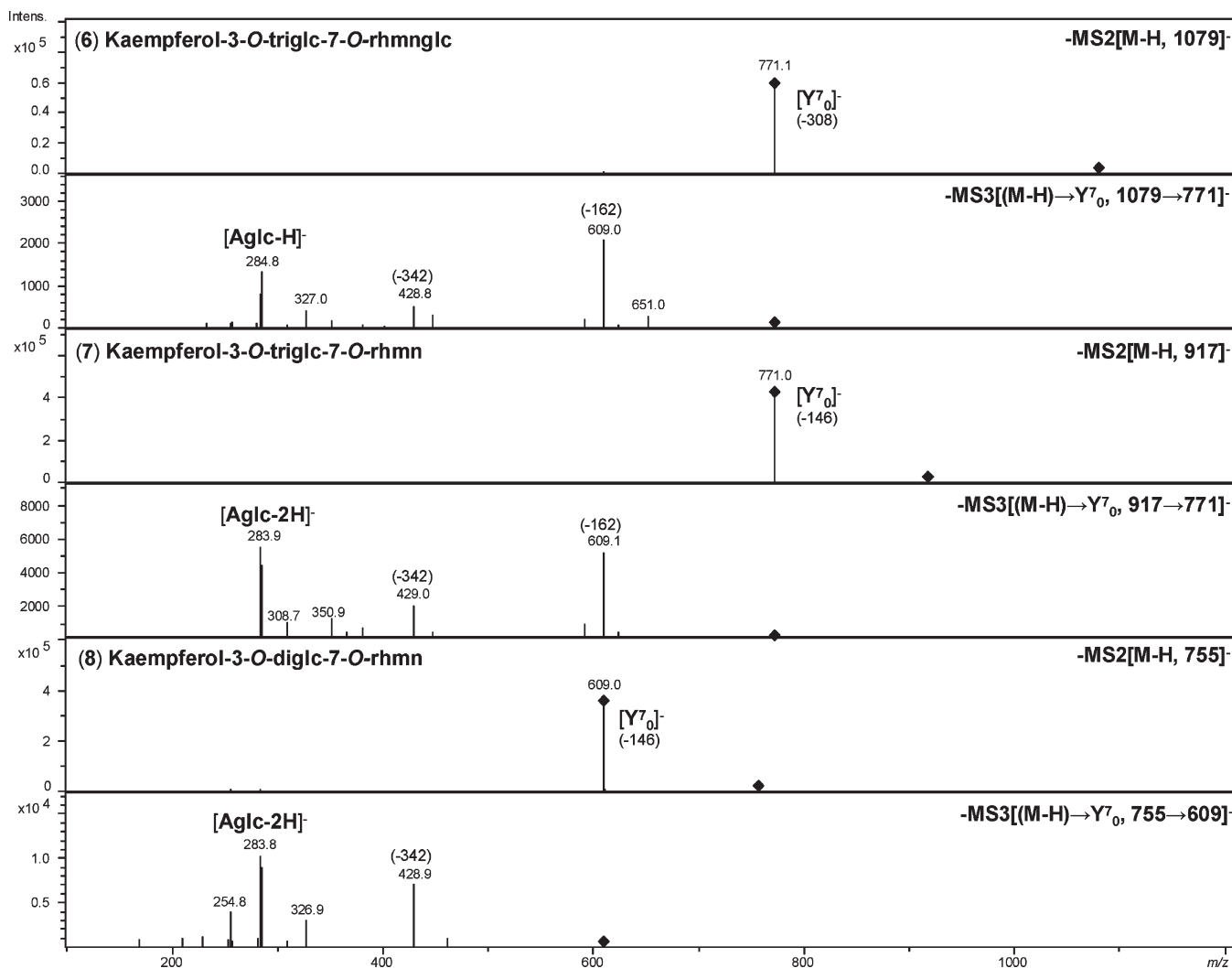


Figure 3. MS2 and MS3 spectra of some flavonoid derivatives with rhamnose, not common in *Brassica* (6–8). The identities of compounds are as in Figure 1.

HPLC/UV-PAD/ESI-MSⁿ Analysis. Chromatographic analyses were carried out on a LiChroCART column (250 mm × 4 mm, RP-18, 5 μm particle size, LiChrospher100 stationary phase, Merck) protected with a LiChroCART guard column (4 mm × 4 mm, RP-18, 5 μm particle size, Merck). The mobile phase consisted of a mixture of two solvents: water–acetic acid (1%) (A) and methanol (B). For studying both free flavonol glycosides and the corresponding acylated derivatives, a linear gradient, starting with 20% B, was performed to reach 50% B at 35 min, 80% B at 37 min, and 80% B at 40 min. The flow rate was 1 mL min⁻¹, and the injection volume was 20 μL. Spectral data from all peaks were accumulated in the range 240–400 nm, and chromatograms were recorded at 330 nm for the glycosides and their acylated derivatives. The HPLC/UV-PAD/ESI-MSⁿ analyses were carried out in an Agilent HPLC 1100 series equipped with a diode array detector and mass detector in series (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The HPLC consisted of a binary pump (model G1312A), an autosampler (model G1313A), a degasser (model G1322A), and a photodiode array detector (model G1315B). The system was controlled by a ChemStation software (Agilent, v. 08.03). The mass detector was a linear ion trap spectrometer (model G2445A) equipped with an electrospray ionization interface and was controlled by LCMSD software (Agilent, v. 4.1). The ionization conditions were adjusted to 350 °C and 4 kV for capillary temperature and voltage, respectively. The nebulizer pressure and flow rate of nitrogen were 65.0 psi and 11 L min⁻¹, respectively. The full scan mass covered the range from *m/z* 100 up to *m/z* 2000. Collision-induced fragmentation experiments were performed in the ion trap using helium as the collision gas, with voltage ramping cycles from 0.3 up to 2 V. Mass spectrometry data were

acquired in the negative ionization mode. MSⁿ was carried out in the automatic mode on the more abundant fragment ion in MS(*n*-1).

RESULTS AND DISCUSSION

Host Plant Analysis. When studying the metabolism of host plant's compounds by *P. brassicae*, a good knowledge of the phytochemistry of external leaves is required. The composition of *B. oleracea* var. *costata* has been previously reported (11), but as a living organism, variation in chemical composition may occur. So, the leaves of the host plant used to feed *P. brassicae* were analyzed.

In the present study and under the conditions described in the Materials and Methods, the HPLC-PAD-MSⁿ screening of the deacylated glycosides resulting from the saponification of the native extract (Figures 1A and 2 and Table 1) shows as main compounds kaempferol-3-*O*-sophoroside-7-*O*-glucoside (3) and kaempferol-3-*O*-triglucoside-7-*O*-glucoside (2) (12, 13), which was in line with the observations previously reported in external leaves (11). Other glycosides found before and equally present in this study were kaempferol derivatives (4, 5, 9, and 10), although in very low or trace amounts. Quercetin-3-*O*-sophoroside-7-*O*-glucoside (1) has been described before, in both internal (14) and external (6) leaves of tronchuda cabbage. Apart from this, we now found three kaempferol derivatives, in low amounts, which contained rhamnose, which is not common in *Brassica*: 6

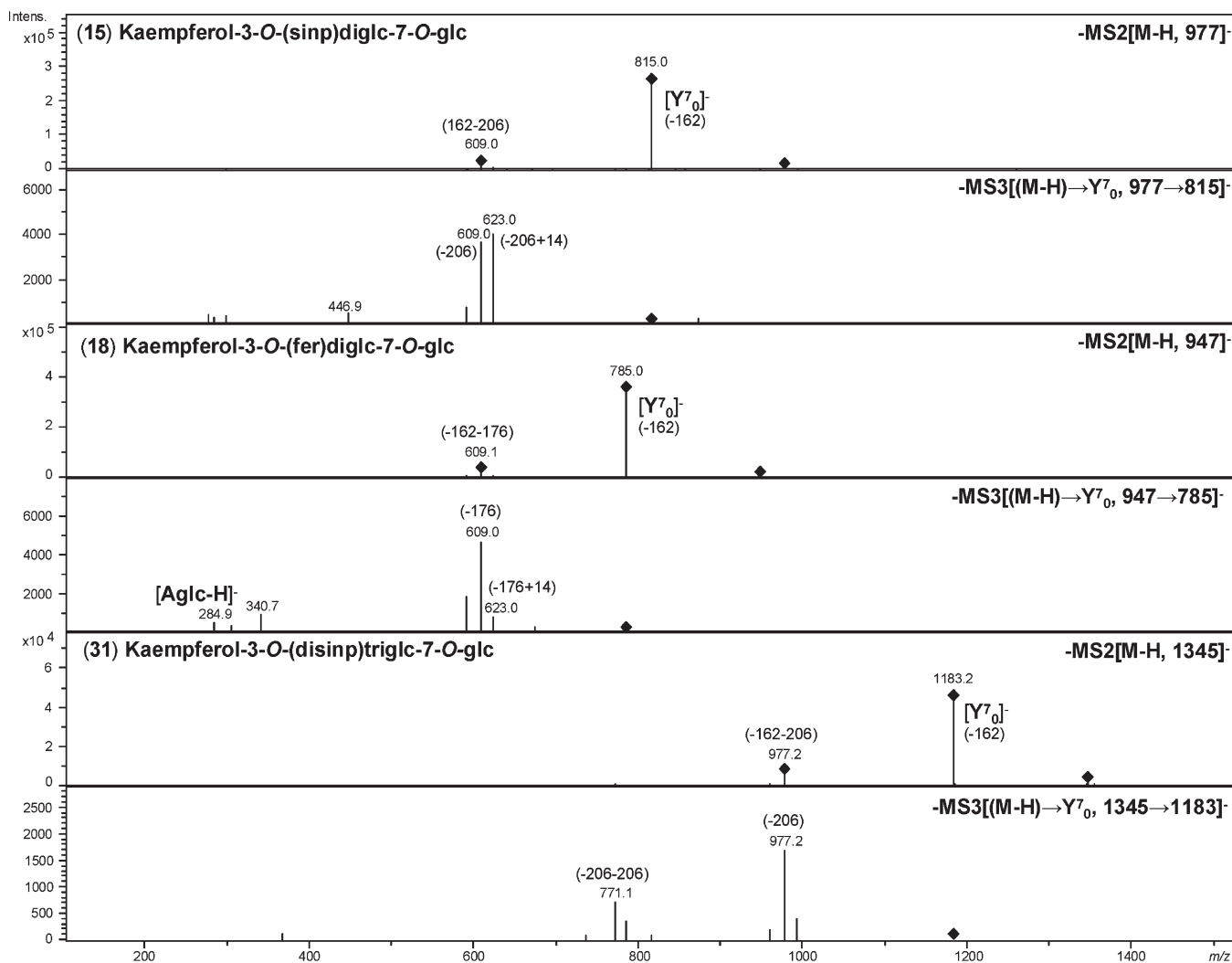


Figure 4. MS2 and MS3 spectra of some flavonoids acylated derivatives (**15**, **18**, and **31**). The identities of compounds are as in **Figure 1**.

(kaempferol-3-*O*-triglucoside-7-*O*-rhamnoglucoside), **7** (kaempferol-3-*O*-triglucoside-7-*O*-rhamnoside), and **8** (kaempferol-3-*O*-diglucoside-7-*O*-rhamnoside) (**Figure 3**). These kinds of compounds had been found before in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) (**15**). In what concerns acylated flavonoid glycosides (**Figures 1B** and **4** and **Table 2**), the main compounds are related to the most abundant glycosides and are kaempferol-3-*O*-(sinapoyl)sophoroside-7-*O*-glucoside (**15**) and kaempferol-3-*O*-(feruloyl)sophoroside-7-*O*-glucoside (**18**). These compounds, which are important products observed in tronchuda cabbage internal leaves, coelute with kaempferol-3-*O*-(sinapoyl)triglucoside-7-*O*-glucoside (**14**) and kaempferol-3-*O*-(feruloyl)triglucoside-7-*O*-glucoside (**17**), respectively. These results, together with the presence of a diacylated derivative that elutes much later [$R_t = 26.2$, kaempferol-3-*O*-(disinapoyl)triglucoside-7-*O*-glucoside (**31**)] suggest that the structures indicated for diacylated derivatives in external leaves were previously (**11**) wrongly attributed. In addition, these results allow us to establish that the composition of internal and external leaves is more similar among them than previously believed. Kaempferol-3-*O*-(caffeoyl)sophoroside-7-*O*-glucoside (**13**), kaempferol-3-*O*-(sinapoyl)sophoroside (**24**), and kaempferol-3-*O*-(feruloyl)sophoroside (**25**) were detected and were reported before (**6**, **14**). Acylated glycoside derivatives with rhamnose in its structures were now identified for the first time in *B. oleracea* var. *costata*: kaempferol-3-*O*-(sinapoyl)triglucoside-7-*O*-rhamnoside (**21**), kaempferol-3-*O*-(sinapoyl)diglucoside-7-*O*-rhamnoside (**22**), and

kaempferol-3-*O*-(feruloyl)diglucoside-7-*O*-rhamnoside (**23**). Other phenolics detected were hydroxycinnamic acids derivatives: 3-*p*-coumaroylquinic acid (**11**), 3-feruloylquinic acid (**12**), 4-*p*-coumaroylquinic acid (**16**), 5-*p*-coumaroylquinic acid (**19**), and 4-feruloylquinic acid (**20**) (**16**). Equally, three feruloylsinapoylgentiobioside isomer (**26**, **28**, and **30**) and three disinapoylgentiobioside isomers (**27**, **29**, and **32**) (**14**) were found.

Thus, as far as we know, from the 31 compounds noticed in *B. oleracea* var. *costata*, 12 compounds (**6–8**, **12**, **14**, **17**, **19–23**, and **31**) are reported for the first time in this matrix. The remaining ones have already been described (**6**, **8**, **11**, **14**).

***P. brassicae* Larvae and Excrements.** The HPLC-PAD chromatogram of the excrements' extract (**Figure 1C**) shows a set of peaks that are in line with the main deacylated glycosides observed in tronchuda cabbage saponified extract (**2–5**, **7**, and **8**), as well as ferulic and sinapic acids (**FA** and **SA**). On the other hand, it should be highlighted that the acyl derivatives of flavonols observed in the native extract were absent in excrements, whereas other acyl derivatives, which probably arose as a consequence of metabolism, were present (**33–36**) (**Figure 1C** and **Table 2**).

We previously established that sulfation is a metabolic process found in *P. brassicae* when fed with *B. rapa* var. *rapa* and *B. oleracea* var. *costata* (**6**, **8**). To confirm the presence of this kind of compounds in the excrements of the work herein, we extracted the ions that presented losses of 80 mass units

Table 2. R_t , $-MS$: $[M - H]^-$, $-MS2[M - H]^-$, and $-MS3[(M - H) \rightarrow Y_0^7]^-$ Data of Acylated Glycosyl Flavonoids from Native Extract of *B. oleracea* var. *costata* Leaves (13–15, 17, 18, 21–25, and 31) from Excrements (33–36) and from *P. brassicae* Larvae (37)^a

compounds ^b		R _t (min)	[M – H] [–] (m/z)	–MS2[M – H] [–] (m/z) (%)		–MS3[(M – H)→Y ₀ ⁷] [–] (m/z) (%)					
kaempferol-3-O-(Acyl/diAcyl)-tri/diglucoside-7-O-glucoside											
				Y ₀ ^{7–} (–162)	–162-Acyl+14	–162-Acyl	–Acyl+14	–Acyl	–diAcyl+14	–diAcyl	Aglyc-2H/H
13	3-C	8.1	933	771 (100)		609 (55)		609 (100);			
14	2-S	10.2	1139	977 (100)		771 (6)		771 (100)			
15	3-S	10.2	977	815 (100)		609 (3)	623 (100)	609 (90)			
17	2-F	10.7	1109	947 (100)	785 (35)	771 (10)	785 (20)	771 (100)			
18	3-F	10.7	947	785 (100)		609 (5)	623 (16)	609 (100)			285 (10)
37	3-C isomer	13.7	933	771 (100)		609 (10)		609 (100)			285 (5)
34	3-F isomer	19.4	947	785 (100)		609 (3)	623 (90)	609 (100)			284 (7)
36	2-F isomer	24.9	1109	947 (100)			785 (100)	771 (30)			284 (17)
31	2-diS	26.3	1345	1183 (100)		977 (13)	991 (23)	977 (100)	785 (20)	771 (40)	
kaempferol-3-O-(Acyl)-tri/diglucoside-7-O-diglucoside											
				Y ₀ ^{7–} (–324)		–324-Acyl					
33	5-F	18.4	1109	785 (100)		609 (14)	623 (93)	609 (100)			285 (8)
35	4-F	23.7	1271	947 (100)			785 (100)	771 (23)			284 (8)
kaempferol-3-O-(Acyl)-tri/diglucoside-7-O-rhamnoside											
				Y ₀ ^{7–} (–146)		–146-Acyl	–Acyl+14	–Acyl			
21	7-S	15.6	1123	977 (100)		771 (11)	785 (20)	771 (100)			
22	8-S	16.0	961	815 (100)		609 (8)	623 (90)	609 (100)			285 (10)
23	8-F	17.1	931	785 (100)		609 (6)	623 (100)	609 (30)			285 (5)
kaempferol-3-O-(Acyl)-tri/diglucoside											
						–MS2[M – H] [–] (m/z) (%)					
24	9-S	19.3	815			623 (95)	609 (100)				285 (10)
25	9-F	21.3	785			623 (100)	609 (85)				285 (6)

^a Main observed fragments. Other ions were found, but they have not been included. ^b C, caffeoyl; S, sinapoyl; F, feruloyl; Aglc, aglycone; 2, kaempferol-3-O-triglucoside-7-O-glucoside; 3, kaempferol-3-O-sophoroside-7-O-glucoside; 4, kaempferol-3-O-triglucoside-7-O-diglucoside; 5, kaempferol-3-O-diglucoside-7-O-diglucoside; 7, kaempferol-3-O-triglucoside-7-O-rhamnoside; 8, kaempferol-3-O-sophoroside-7-O-rhamnoside; and 9, kaempferol-3-O-sophoroside.

(“constant neutral loss chromatogram”), but no sulfated compounds were found. The interest in sulfated conjugates arises from the biological activities observed before for this kind of compounds, like antioxidants or anticoagulants (17, 18). Thus, their presence in excrements would contribute to increase the biological potential of this matrix.

In other works in which *P. brassicae* was fed with other *Brassica* species, such as *B. rapa* var. *rapa* (8, 10) and *B. oleracea* var. *acephala* (7), the most abundant flavonoid in excrements was kaempferol-3-O-sophoroside, as a result of deglycosylation in the 7-position and deacylations (of sugars in the 3-position). However, in the study herein, this metabolic transformation was not as marked as in previous studies, as this compound was found in larvae but not in excrements, which indicates that it was converted into other compounds or accumulated in the insect's body. One possible explanation for the absence of this compound may be related to amounts of kaempferol-3-O-sophoroside or its derivatives in the leaves of the host plant. In the leaves of turnip (10) and kale (7), this compound and its acylated derivatives were found. Maybe in the amounts present in those plants, the mechanisms by which the insect accumulates these compounds were saturated and the compound “leaked” to the excrements. In *B. oleracea* var. *costata* leaves, however, perhaps a lower quantity of kaempferol-3-O-sophoroside, or of the acylated compounds that could originate it, were present; under those conditions, full accumulation takes place, and the compound cannot be found in excrements. Overall, in this study, it was observed that the flavonoids present in excrements are deacylation products and originate a chromatographic profile quite similar to the saponified extract of tronchuda cabbage external leaves (Figure 1).

The HPLC-PAD-MSn study of the phenolics present in larvae extracts at different time points (1, 2, 4, 6, and 8 h, Figure 5) revealed that at 1 h starvation, the major compounds were kaempferol-3-O-sophoroside-7-O-glucoside (3), FA and SA, and kaempferol-3-O-sophoroside (9), which results from deacylation and deglycosylation in position 7. Compound 3 was present in the native extract, in both free and acylated forms, and 9 was found in trace amounts. Other flavonoids that were also present in low or trace amounts, being equally found in the native extract, are the deacylated 1, 2, 5, and 10, and the acylated 14, 15, 17, and 18.

Compound 39 (quercetin-3-O-sophoroside) is the product of deglycosylation of 1 at position 7 (Figure 6). Other products of metabolism are 37, kaempferol-3-O-(caffeoyl)sophoroside-7-O-glucoside (isomer of 13), and 38, quercetin-3-O-sophoroside sulfate (R_t = 13.8 min; $-MS$: 689 $[M - H]^-$, $-MS2[M - H]^-$: 609).

Phenolics Metabolism in *P. brassicae* Larva: Overview. In a general way, deacylation was the main metabolic reaction that took place. Seven compounds were present in the insect and absent in the leaves of *B. oleracea* var. *costata*: FA, SA, kaempferol-3-O-glucoside (10), kaempferol-3-O-(feruloyl)sophoroside-7-O-glucoside isomer (34), kaempferol-3-O-(caffeoyl)sophoroside-7-O-glucoside (37), kaempferol-3-O-sophoroside sulfate (38), and quercetin-3-O-sophoroside (39). Five of these compounds are flavonoid derivatives, and because of the incapability of insects to synthesize this class of compounds (19), they must arise from the metabolism of compounds that do exist in the plant. Figure 6 shows some reactions that could occur for these compounds. For instance, quercetin-3-O-sophoroside (39) is a compound that could be found in most of the analyzed starvation

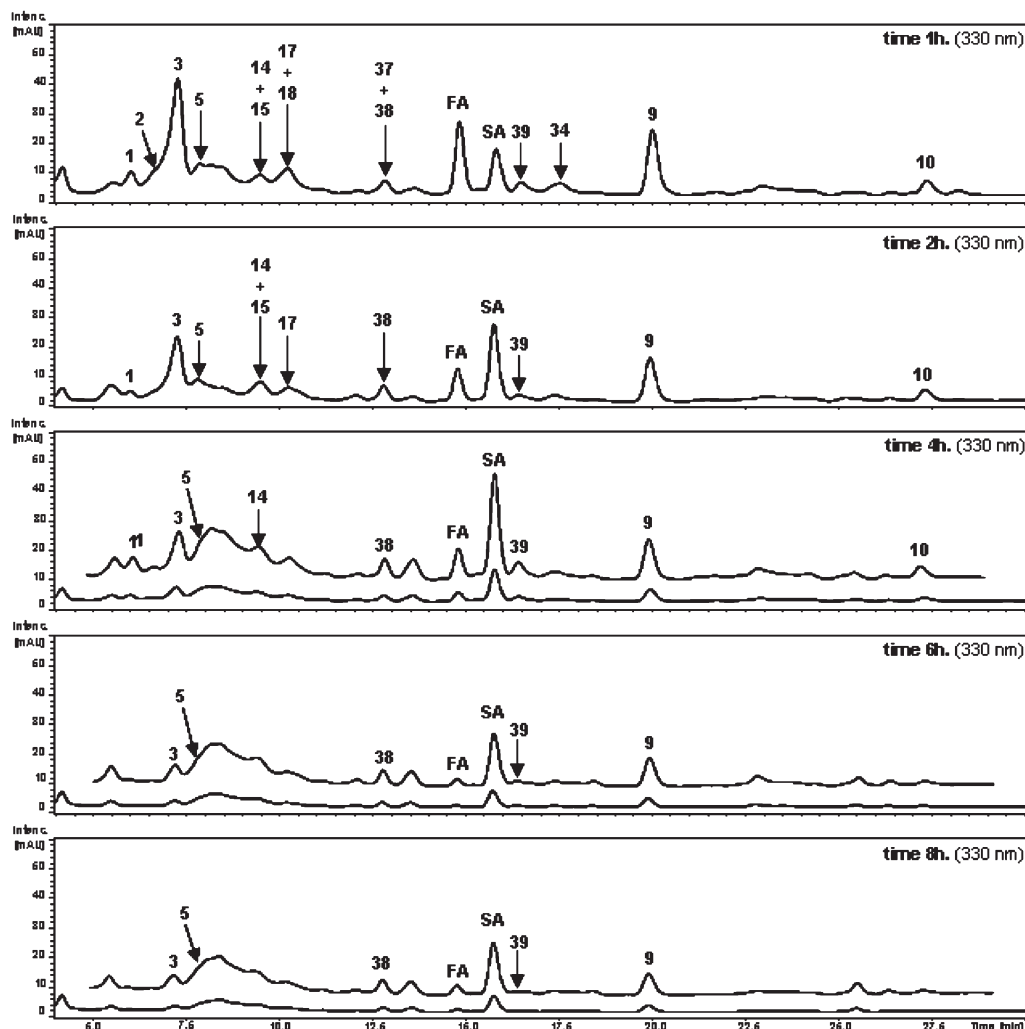


Figure 5. HPLC-PAD phenolic profile of *P. brassicae* larva. Detection at 330 nm. Peaks: 37, kaempferol-3-*O*-(caffeoyl)sophorose-7-*O*-glucoside; 38, kaempferol-3-*O*-sophorose sulfate; and 39, quercetin-3-*O*-sophorose. For other peaks, see **Figure 1**.

periods, although absent in tronchuda cabbage. However, if we consider that quercetin-3-*O*-sophorose-7-*O*-glucoside (**1**) was detected in the leaves, it is highly probable that a deglycosylation process occurred, which may also happen with kaempferol-3-*O*-sophorose-7-*O*-glucoside (**3**), contributing to the presence of kaempferol-3-*O*-sophorose (**9**) in the larvae. Likewise, ferulic and sinapic acids were among the major compounds in *P. brassicae*, although they were not found in the host plant. These compounds could have originated by deacylation of the acylated flavonols present in *B. oleracea* var. *costata*, as it is supported by the increasing amount of SA between 1 and 8 h after feeding, when digestion was taking place.

An interesting case is that of kaempferol-3-*O*-sophorose-sulfate (**38**), which was found in the insect at all times after feeding. As this compound was not found in tronchuda cabbage, the possibility of it coming from the diet is rejected. In this situation, kaempferol-3-*O*-sophorose (**9**) present in the leaves of the plant or accumulated in the insect's body is the probable precursor (**Figure 6**). We have previously reported that sulfation is one of the metabolic processes that take place in *P. brassicae*. In a previous work by our group where *P. brassicae* was fed with *B. oleracea* var. *acephala* (kale) (**7**), of which *B. oleracea* var. *costata* is taxonomically related, three sulfated compounds had been found, kaempferol-3-*O*-sophorose-sulfate, quercetin-3-*O*-glucoside-sulfate, and kaempferol-3-*O*-glucoside-sulfate. Thus, when insects fed upon these two *B. oleracea* varieties, at least

one common sulfated metabolite was found. However, when *P. brassicae* was fed with *B. rapa* var. *rapa* (turnip) (**8**), the sulfated metabolite was isorhamnetin-3,7-di-*O*-glucoside. *B. oleracea* var. *costata* and *B. oleracea* var. *acephala* are, from a phytochemical point of view, much more similar between them than when compared with turnip. The results obtained reinforce the importance of the composition of the plant material in shaping the metabolic profile that arises upon feeding, being highly dependent on host plant.

From the 31 compounds identified in the host plant, 15 could not be detected in the insect at any time. Given the fact that they were, nevertheless, ingested, degradation or transformation during their metabolism is the only explanation for their absence in larvae. For instance, feruloylsinapoylgentiobioside (**26**), disinapoylgentiobiosides (**27**), and their isomers (**28–30**) were considerable peaks in the native extract of leaves but could not be found in the insect. As so, they had to be metabolized into other compounds. In addition, the feruloyl and sinapoyl moieties that are produced as a consequence of deacylation would contribute to the appearance of FA and SA, detected in the insect but not in the plant. A remarkable exception for the deacylation of acylated derivatives seems to be the case of *p*-coumaroyl derivatives. 3-*p*-Coumaroylquinc, 4-*p*-coumaroylquinc, and 5-*p*-coumaroylquinc acids were also present in the leaves of the host plant but were not detected in the insect or its excrements at any time. The hydrolysis of these compounds would originate *p*-coumaric acid

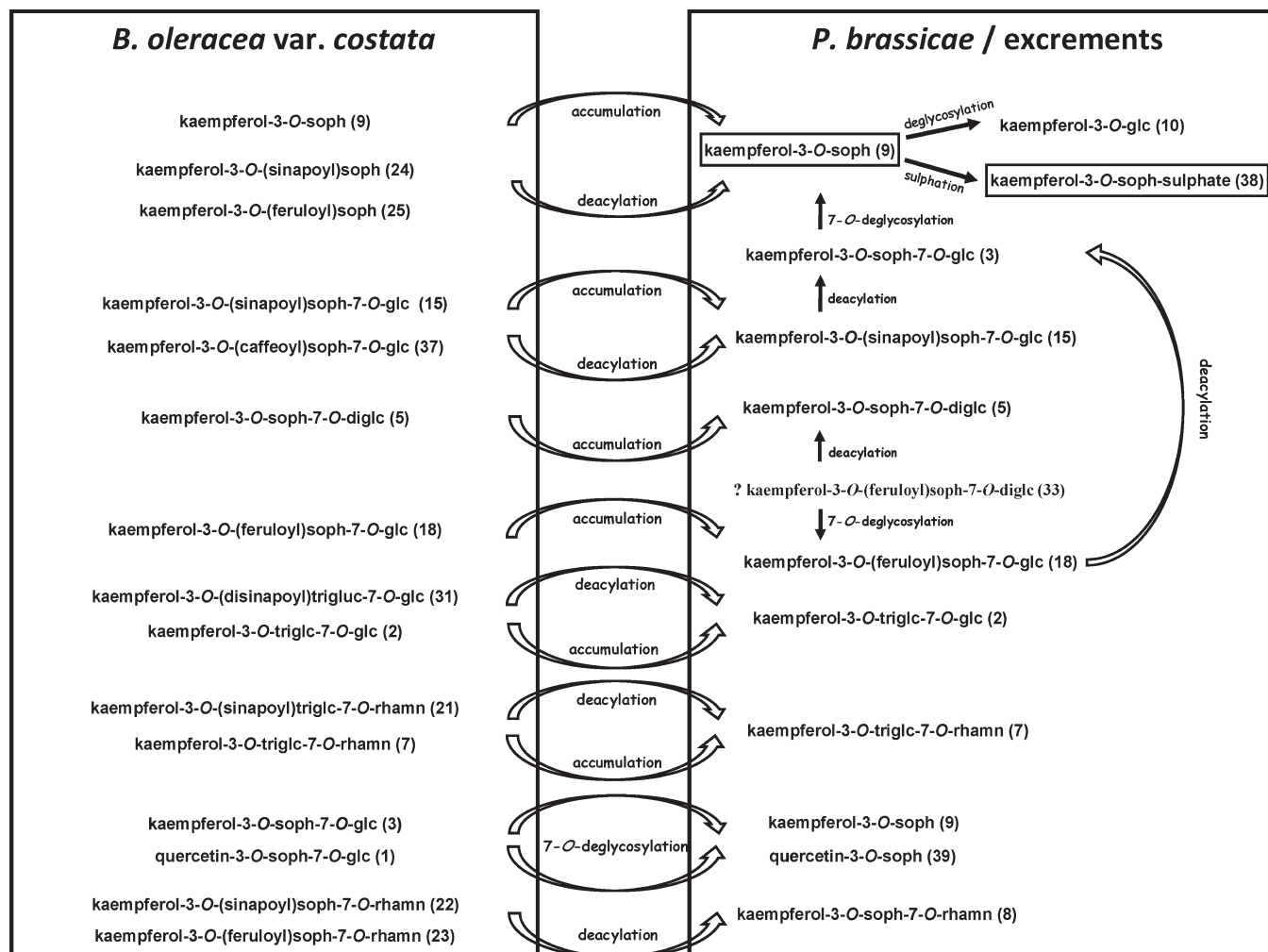


Figure 6. Possible metabolic reactions taking place in *P. brassicae*. “?” means that the origin of the compound is not known.

and quinic acid, in the same way that sinapoyl/feruloyl-gentiobiosides or sinapoyl/feruloyl acylated flavonoids originate free SA/FA and gentiobiosides/deacylated flavonoids; however, no *p*-coumaric acid was detected. This apparent dislike, by the insect, of *p*-coumaric acid was already described; when *P. brassicae* was fed with *B. rapa* var. *rapa*, which contained high *p*-coumaric acid levels (10), this compound was not found in either the insect's body or the excrements. Thus, *p*-coumaric acid metabolism must occur to a longer extension, being completely modified or destroyed. Another possibility was that *p*-coumaric acid was completely used to form quinones, as was described before in the autumnal moth *Epirrita autumnata* (20). We looked for the fragmentation patterns of quinones, and their absence was confirmed. With these results, the fate of *p*-coumaric acid in *P. brassicae* remains unknown, and further studies are required.

Among the 16 compounds found in the insect body (FA, SA, 1–3, 5, 9, 10, 14, 15, 17, 18, 34, and 37–39), six were equally found in the excrements: FA, SA, kaempferol-3-*O*-triglucoside-7-*O*-glucoside (2), kaempferol-3-*O*-sophoroside-7-*O*-glucoside (3), kaempferol-3-*O*-sophoroside-7-*O*-diglucoside (5), and kaempferol-3-*O*-(feruloyl)sophoroside-7-*O*-glucoside isomer (34). The 10 remaining compounds, absent in the excrements, were either accumulated or transformed into different molecules. In fact, the analysis of an insect starved for 8 h after feeding (Figure 5) revealed that the compounds are accumulated as follows: kaempferol-3-*O*-sophoroside-7-*O*-glucoside (3), kaempferol-3-*O*-sophoroside-7-*O*-diglucoside (5), FA, SA, kaempferol-3-*O*-sophoroside

(9), kaempferol-3-*O*-sophoroside-sulfate (38), and quercetin-3-*O*-sophoroside (39).

If we take into account the changes registered through time, some patterns may be recognized. Kaempferol-3-*O*-sophoroside-7-*O*-glucoside (3) decreased between 1 and 8 h of starvation. Most probably, this compound underwent a deglycosylation at the 7-position, a process that is characteristic of *P. brassicae*, thus originating kaempferol-3-*O*-sophoroside (9). Contrary to what would be expected, the amounts of kaempferol-3-*O*-sophoroside did not increase accordingly. This may be explained, at least partially, by the fact that this compound was being consumed in the sulfation process that yields kaempferol-3-*O*-sophoroside-sulfate (38), which seems to slightly increase during this time range. Another compound that suffered an increase was FA. FA, which did not exist in *B. oleracea* var. *costata*, probably originated by the deacylation of the several acylated compounds that exist in the host plant. This compound was also present in larvae starved for 8 h, indicating that it is accumulated.

As this work constitutes the first insight on the time changes in phenolic contents in *P. brassicae* after feeding, no comparisons can be made regarding the qualitative and quantitative changes through time. However, some studies have analyzed the composition of *P. brassicae* after a 12 h starvation. In the insects fed with *B. rapa* var. *rapa* (10), the major compounds were ferulic and sinapic acids and the flavonoid in higher amounts was kaempferol-3-*O*-sophoroside. As for the excrements, ferulic and sinapic acids were, again, the main compounds, and the most expressive

flavonoid was isorhamnetin-3,7-di-*O*-sulfate. A major difference is that in the excrements of *P. brassicae* fed with turnip, only six compounds could be identified and quantified. On the other hand, in the study herein, 12 compounds were successfully identified in excrements. This difference can reflect the different composition of the host plants, as the analysis of *B. rapa* var. *rapa* led to the identification of 19 compounds, while in *B. oleracea* var. *costata*, 31 compounds were identified. A higher number of phytochemicals is thought to originate a higher number of metabolites. This is supported by the results obtained by feeding *P. brassicae* with kale (7). In kale, where 31 compounds were identified, the number of compounds in excrements, 25, was also higher than in the study with *B. rapa* var. *rapa*. In the study with kale, kaempferol-3-*O*-sophoroside was the major flavonoid in excrements, while in the work presented here, it was absent, although one of its derivatives, kaempferol-3-*O*-sophoroside-7-*O*-glucoside (3), was a major peak.

In conclusion, we proved a selective uptake of flavonoids from *P. brassicae* food source, as well as their bioconversion by the larvae. Additionally, as *P. brassicae* larvae act like a chemistry laboratory, it may provide compounds with different bioactivities from their host plant. The findings described herein may constitute an economic advantage for producers as the losses caused by this pest can be countered by the exploration of the insects' bioactive compounds.

LITERATURE CITED

- (1) Simmonds, M. S. J. Flavonoid-insect interactions: Recent advances in our knowledge. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 21–30.
- (2) Simmonds, M. S. J. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: Feeding and oviposition. *Phytochemistry* **2001**, *64*, 245–252.
- (3) van Loon, J. J. A.; Wang, C. Z.; Nielsen, J. K.; Gols, R.; Qiu, Y. T. Flavonoids from cabbage are feeding stimulants for diamondback moth larvae additional to glucosinolates: Chemoreception and behaviour. *Entomol. Exp. Appl.* **2002**, *104*, 27–34.
- (4) Burghardt, F.; Fiedler, K.; Proksch, P. Uptake of flavonoids from *Vicia villosa* (Fabaceae) by the lycaenid butterfly, *Polyommatus icarus* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Biochem. Syst. Ecol.* **1997**, *25*, 527–536.
- (5) Geuder, M.; Wray, V.; Fiedler, K.; Proksch, P. Sequestration and metabolism of host-plant flavonoids by the lycaenid butterfly *Polyommatus bellargus*. *J. Chem. Ecol.* **1997**, *23*, 1361–1372.
- (6) Ferreres, F.; Sousa, C.; Valentão, P.; Pereira, J. A.; Seabra, R. M.; Andrade, P. B. Tronchuda cabbage flavonoids uptake by *Pieris brassicae*. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 361–367.
- (7) Ferreres, F.; Fernandes, F.; Oliveira, J. M. A.; Valentão, P.; Pereira, J. A.; Andrade, P. B. Metabolic profiling and biological capacity of *Pieris brassicae* fed with kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 1209–1220.
- (8) Ferreres, F.; Valentão, P.; Pereira, J. A.; Bento, A.; Noites, A.; Seabra, R. M.; Andrade, P. B. HPLC-DAD-MS/MS-ESI screening of phenolic compounds in *Pieris brassicae* L. reared on *Brassica rapa* var. *rapa* L. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 844–853.
- (9) Sousa, C.; Pereira, D. M.; Valentão, P.; Ferreres, F.; Pereira, J. A.; Seabra, R. M.; Andrade, P. B. *Pieris brassicae* inhibits xanthine oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 2288–2294.
- (10) Pereira, D. M.; Noites, A.; Valentão, P.; Ferreres, F.; Pereira, J. A.; Vale-Silva, L.; Pinto, E.; Andrade, P. B. Targeted metabolite analysis and biological activity of *Pieris brassicae* fed with *Brassica rapa* var. *rapa*. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 483–489.
- (11) Ferreres, F.; Valentão, P.; Llorach, R.; Pinheiro, C.; Cardoso, L.; Pereira, J. A.; Sousa, C.; Seabra, R. M.; Andrade, P. B. Phenolic compounds in external leaves of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2901–2907.
- (12) Mabry, T. J.; Markham, K. R.; Thomas, M. B. The ultraviolet spectra of flavones and flavonols. *The Systematic Identification of Flavonoids*; Springer-Verlag: New York, 1970; pp 41–61.
- (13) Ferreres, F.; Llorach, R.; Gil-Izquierdo, A. Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 312–321.
- (14) Ferreres, F.; Sousa, C.; Vrchovská, V.; Valentão, P.; Pereira, J. A.; Seabra, R. M.; Andrade, P. B. Chemical composition and antioxidant activity of tronchuda cabbage internal leaves. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, *222*, 88–98.
- (15) Martínez-Sánchez, A.; Gil-Izquierdo, A.; Gil, M. I.; Ferreres, F. A comparative study of flavonoid compounds, vitamin C, and antioxidant properties of baby leaf *Brassicaceae* species. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 2330–2340.
- (16) Clifford, M. N.; Johnston, K. L.; Knight, S.; Kuhnert, N. Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2900–2911.
- (17) Op de Beck, P.; Cartier, G.; David, B.; Dijoux-Franca, M.-G.; Mariotte, A.-M. Antioxidant flavonoids and phenolic acids from leaves of *Leea guineense* G. Don (Leeaceae). *Phytother. Res.* **2003**, *17*, 345–347.
- (18) Guglielmone, H. A.; Agnese, A. M.; Núñez Montoya, S. C.; Cabrera, J. L. Inhibitory effects of sulphated flavonoids isolated from *Flaveria bidentis* on platelet aggregation. *Thromb. Res.* **2005**, *115*, 495–502.
- (19) Knüttel, H.; Fiedler, K. Host-plant-derived variation in ultraviolet wing patterns influences mate selection by male butterflies. *J. Exp. Biol.* **2001**, *204*, 2447–2459.
- (20) Salminen, J. P.; Lahtinen, M.; Lempa, K.; Kapari, L.; Haukioja, E.; Pihlaja, K. Metabolic modifications of birch leaf phenolics by an herbivorous insect: detoxification of flavonoid aglycones via glycosylation. *Z. Naturforsch. C* **2004**, 437–444.

Received May 7, 2009. Revised manuscript received August 31, 2009. Accepted September 03, 2009. We are grateful to Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) for financial support of this work (PTDC/AGR-AAM/64150/2006). F.F. (SFRH/BD/37963/2007) and D.M.P (BI) are indebted to FCT for the grants.

4.3. Metabolic and bioactivity insights into *Brassica oleracea* var. *acephala*

J. Agric. Food Chem. 2009, 57, 8884–8892

Metabolic and Bioactivity Insights into *Brassica oleracea* var. *acephala*

FEDERICO FERRERES,[†] FÁTIMA FERNANDES,[‡] CARLA SOUSA,[‡] PATRÍCIA VALENTÃO,[‡]
JOSÉ A. PEREIRA,[§] AND PAULA B. ANDRADE^{*,‡}

[†]Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Department of Food Science and Technology, CEBAS (CSIC), P.O. Box 164, 30100 Campus University Espinardo, Murcia, Spain,

[‡]REQUIMTE/Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Porto University, R. Aníbal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal, and [§]CIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal

Seeds of *Brassica oleracea* var. *acephala* (kale) were analyzed by HPLC/UV-PAD/MSn-ESI. Several phenolic acids and flavonol derivatives were identified. The seeds of this *B. oleracea* variety exhibited more flavonol derivatives than those of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* var. *costata*), also characterized in this paper. Quercetin and isorhamnetin derivatives were found only in kale seeds. Oxalic, aconitic, citric, pyruvic, malic, quinic, shikimic, and fumaric acids were the organic acids present in these matrices, malic acid being predominant in kale and citric acid in tronchuda cabbage seeds. Acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity was determined in aqueous extracts from both seeds. Kale leaves and butterflies, larvae, and excrements of *Pieris brassicae* reared on kale were also evaluated. Kale seeds were the most effective AChE inhibitor, followed by tronchuda cabbage seeds and kale leaves. With regard to *P. brassicae* material, excrements exhibited stronger inhibitory capacity. These results may be explained by the presence of sinapine, an analogue of acetylcholine, only in seed materials. A strong concentration-dependent antioxidant capacity against DPPH, nitric oxide, and superoxide radicals was observed for kale seeds.

KEYWORDS: *Brassica oleracea* L. var. *acephala*; *Brassica oleracea* L. var. *costata*; seeds; *Pieris brassicae*; phenolic compounds; organic acids; acetylcholinesterase inhibition; antioxidant activity

INTRODUCTION

It is well-known that Brassicaceae, namely *Brassica oleracea*, species are an important source of bioactive compounds, including phenolics (flavonoids and hydroxycinnamic acid derivatives) and glucosinolates (1, 2). Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) leaves have been studied for their content of phenolic compounds and organic acids (3), but kale seeds are yet to be characterized. Previously, seeds of another variety, *Brassica oleracea* var. *costata*, were revealed to have more hydroxycinnamic acid derivatives and fewer flavonols than its aerial parts (4, 5). Furthermore, seeds of Brassicaceae members are characterized by the presence of sinapoylcholine (or sinapine), which is thought to serve as a storage form of choline and sinapic acid for germinating seedlings (6).

Acetylcholine (ACh) is a neurotransmitter found in vertebrates and arthropods and one of the major compounds by which electrical impulses carried by nerve cells are transmitted to another nerve cell or to voluntary and involuntary muscles (7). Acetylcholinesterase (AChE) inhibitors have therapeutic applications in Alzheimer's disease (AD), senile dementia, ataxia, myasthenia gravis, and Parkinson's disease (8). The search for

plant-derived inhibitors of AChE has been focused on alkaloids, such as physostigmine obtained from *Physostigma venenosum* and galantamine extracted from *Galanthus woronowii* (Amaryllidaceae) and related genera. Other major classes of phytochemicals reported to have such activity are terpenoids, glycosides, and coumarins (9). Plant extracts containing phenolic compounds have been previously evaluated for their AChE inhibitory activity (10, 11).

The structural similarities between sinapoylcholine and ACh led us to investigate the effects of kale seed aqueous extract on AChE activity.

Because excess production of reactive oxygen species (ROS) in the brain has been implicated in a number of neurodegenerative diseases, the antioxidant properties of some extracts can also contribute to neuroprotection (12). For this reason, the antioxidant activities of kale seed aqueous extracts were also screened against DPPH and further evaluated against the radicals superoxide and nitric oxide, important in biological events, in a cell-free system.

The scavenging of these two radicals can be of major importance due to its role in the formation of other reactive species, which can be extremely deleterious to cells (13). Although kale seeds organic extracts have already been characterized in terms of phenolic acids, and antioxidant and antibacterial activities (14),

*Author to whom correspondence should be addressed (telephone + 351 222078935; fax + 351 222003977; e-mail pandrade@ff.up.pt).

the aqueous extract has never been characterized before. The aqueous extract analysis is important because it is representative of the way kale is consumed. In addition, by using the aqueous extract, organic solvents, which can interfere in bioactivity assays, are avoided.

Pieris brassicae, an insect whose larvae constitute a frequent pest of kale cultures, also has been reported for its phenolics and organic acids profile (3). *P. brassicae* larvae were revealed to be able to sequester, metabolize, and excrete phenolics from their feeding material. In addition, in previous works, *P. brassicae* fed with *B. oleracea* varieties (3, 15) and *Brassica rapa* (16) showed stronger antioxidant potential than its feeding material. On the basis of these facts, materials obtained from *P. brassicae* fed with kale were included in this work.

This work aimed to contribute to the knowledge of the metabolic profile of *B. oleracea* var. *acephala* seeds and to evaluate some of its biological capacities. The metabolic profile and bioactivity of kale seed aqueous extracts were compared with those of seeds of *B. oleracea* var. *costata*. Because it was expected that kale seeds and leaves have different chemical compositions, their activities were also compared. Additionally, *P. brassicae* at different stages of its life cycle (butterfly and larvae) and its excrements were analyzed to compare its biological potential with the vegetal materials.

MATERIALS AND METHODS

Standards. Reference compounds were purchased from various suppliers: Aconitic, pyruvic, citric, and sinapic acids, kaempferol-3-*O*-rutinoside, and isorhamnetin-3-*O*-glucoside were from Extrasynthèse (Genay, France). Oxalic, malic, quinic, shikimic, and fumaric acids, DPPH, β -nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), phenazine methosulfate (PMS), bovine serum albumin (BSA), nitroblue tetrazolium chloride (NBT), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), sulfanilamine, AChE (CAS 9000-81-1; EC 232-559-3) from electric eel (type VI-s, lyophilized powder), acetylthiocholine iodide (ATCI), and Tris-HCl were purchased from Sigma (St. Louis, MO). *N*-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride, sodium nitroprussiate dehydrate (SNP), methanol, and sulfuric and acetic acids were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). NaCl was purchased from José M. Vaz Pereira, S.A. (Sintra, Portugal) and $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ from Fluka (Buchs, Switzerland). Water was treated in a Milli-Q (Millipore, Bedford, MA) water purification system.

Samples. Wild *P. brassicae* larvae were collected in Bragança (northeastern Portugal) and taken to the laboratory to complete their life cycle, including oviposition in kale (*B. oleracea* var. *acephala*) leaves. Identification was performed by José A. Pereira, Ph.D. (CIMO). Larvae fed with kale *ad libitum* were allowed to develop. Larvae at the fifth instar were collected and kept without food for 12 h before freezing. The excrements were also collected and frozen. Other larvae were allowed to reach the butterfly stage, being collected < 24 h after eclosion. Tronchuda cabbage and kale seeds were obtained from local farmers in Bragança, northeastern Portugal, in July 2005 and August 2008, respectively.

P. brassicae (larvae, excrements, and butterflies), kale (leaves and seeds), and tronchuda cabbage seeds were freeze-dried. Then, the dried material was powdered, mixed, and kept in a desiccator in the dark until analysis.

Voucher specimens are deposited at Department of Pharmacognosy from Faculty of Pharmacy of Porto University.

Sample Preparation. Aqueous extracts of kale leaves and *P. brassicae* materials were prepared by boiling ca. 0.5 g for 30 min in 400 mL of water. For seed extracts ca. 4.0 g was extracted with 400 mL of boiling water for 30 min. Aqueous extracts were filtered using a Büchner funnel and lyophilized. Yields of ca. 94.0 mg (butterflies), 237.8 mg (larvae), 173.8 mg (excrements), 764.9 mg (tronchuda seeds), and 666.4 and 229.5 mg for seeds and leaves of host kale, respectively, were obtained. The lyophilized extracts were kept in a desiccator in the dark until analysis. For phenolics or organic acids determination, the seed extracts were redissolved in water or sulfuric acid (0.01 N),

respectively. The other assays were performed after the aqueous extract had been redissolved in water or buffer.

HPLC-PAD-MSⁿ-ESI Phenolic Compounds Qualitative Analysis. For the identification of phenolic compounds, lyophilized extract (100 mg/mL) was ultrasonicated (1 h), centrifuged (12000 rpm, 5 min), and filtered through 0.45 μ m size pore membrane. Chromatographic separations were carried out on a 250 $\times$ 4 mm, 5 μ m, RP-18 LiChroCART column (Merck) protected with a 4 $\times$ 4 mm LiChroCART guard column, with 1% acetic acid (A) and methanol (B) as solvents, starting with 15% B and using a gradient to obtain 40% B at 30 min, 60% B at 35 min, and 80% B at 37 min. The flow rate was 1 mL min⁻¹ and the injection volume 5 μ L. The HPLC system was equipped with an Agilent 1100 series diode array and a mass detector in series (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). It consisted of a G1312A binary pump, a G1313A autosampler, a G1322A degasser, and a G1315B photodiode array detector, controlled by ChemStation software (Agilent, v. 08.03). Spectroscopic data from all peaks were accumulated in the range of 240–400 nm, and chromatograms were recorded at 330 nm. The mass detector was a G2445A ion-trap mass spectrometer equipped with an electrospray ionization (ESI) system and controlled by LCMSD software (Agilent, v. 4.1). Nitrogen was used as nebulizing gas at a pressure of 65 psi, and the flow was adjusted to 11 L min⁻¹. The heated capillary and voltage were maintained at 350 °C and 4 kV, respectively. The full scan mass covered the range from *m/z* 100 to 2000. Collision-induced fragmentation experiments were performed in the ion trap using helium as collision gas, with voltage ramping cycles from 0.3 to 2 V. MS data were acquired in the negative ionization mode and in the positive ionization mode for the study of compound 8 (sinapine). MSⁿ was carried out in the automatic mode on the more abundant fragment ion in MS(*n* – 1).

HPLC-PAD Phenolic Compound Quantitative Analysis. For quantification of phenolic compounds, 20 μ L of redissolved seeds lyophilized extract (100 mg/mL) was analyzed using a HPLC/UV-PAD unit (Gilson) and a Spherisorb ODS2 (25.0 $\times$ 0.46 cm; 5 μ m, particle size) column. Elution was performed under the conditions described by Sousa et al. (4). Detection was achieved with a Gilson diode array detector. Spectral data from all peaks were accumulated in the range of 200–400 nm, and chromatograms were recorded at 330 nm. The data were processed on Unipoint system software (Gilson Medical Electronics, Villiers le Bel, France). Peak purity was checked by the software contrast facilities.

Phenolic compounds' quantification was achieved by the absorbance recorded in the chromatograms relative to external standards. Because standards of the identified compounds were not commercially available, sinapic acid derivatives were quantified as sinapic acid, kaempferol derivatives as kaempferol-3-*O*-rutinoside, and isorhamnetin derivatives as isorhamnetin-3-*O*-glucoside. Quercetin-3-*O*-diglucoside-7-*O*-glucoside was quantified together with 1-sinapoylgentiobioside and kaempferol-3-*O*-triglucoside-7-*O*-glucoside together with sinapoylglucoside isomer, both as sinapic acid.

HPLC-UV Analysis of Organic Acids. The separation of the organic acids in both seed varieties lyophilized extracts (100 mg/mL) was carried out as previously reported (3), in a system consisting of an analytical HPLC unit (Gilson) with an ion exclusion column, Nucleogel Ion 300 OA (300 $\times$ 7.7 mm) in conjunction with a column heating device set at 30 °C. Elution was carried out isocratically, at a solvent flow rate of 0.2 mL min⁻¹, with 0.01 N sulfuric acid. Detection was performed with a UV detector set at 214 nm.

Identification was performed by comparison of the retention times with those of authentic standards. Organic acids' quantification was achieved by the absorbance recorded in the chromatograms relative to external authentic standards. The peaks in the chromatograms were integrated using a default baseline construction technique.

AChE Inhibitory Activity. AChE inhibitory activity was determined spectrophotometrically in a Multiskan Ascent plate reader (Thermo; Electron Corp.) based on Ellman's method, according to a described procedure (10). In each well the mixture consisted of ACh in water, DTNB in buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 8, containing 0.1 M NaCl and 0.02 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$), buffer B (50 mM Tris-HCl, pH 8, containing 0.1% BSA), and sample dissolved in a solution of 10% methanol in buffer C (50 mM Tris-HCl, pH 8). The absorbance was read at 405 nm. After this step,

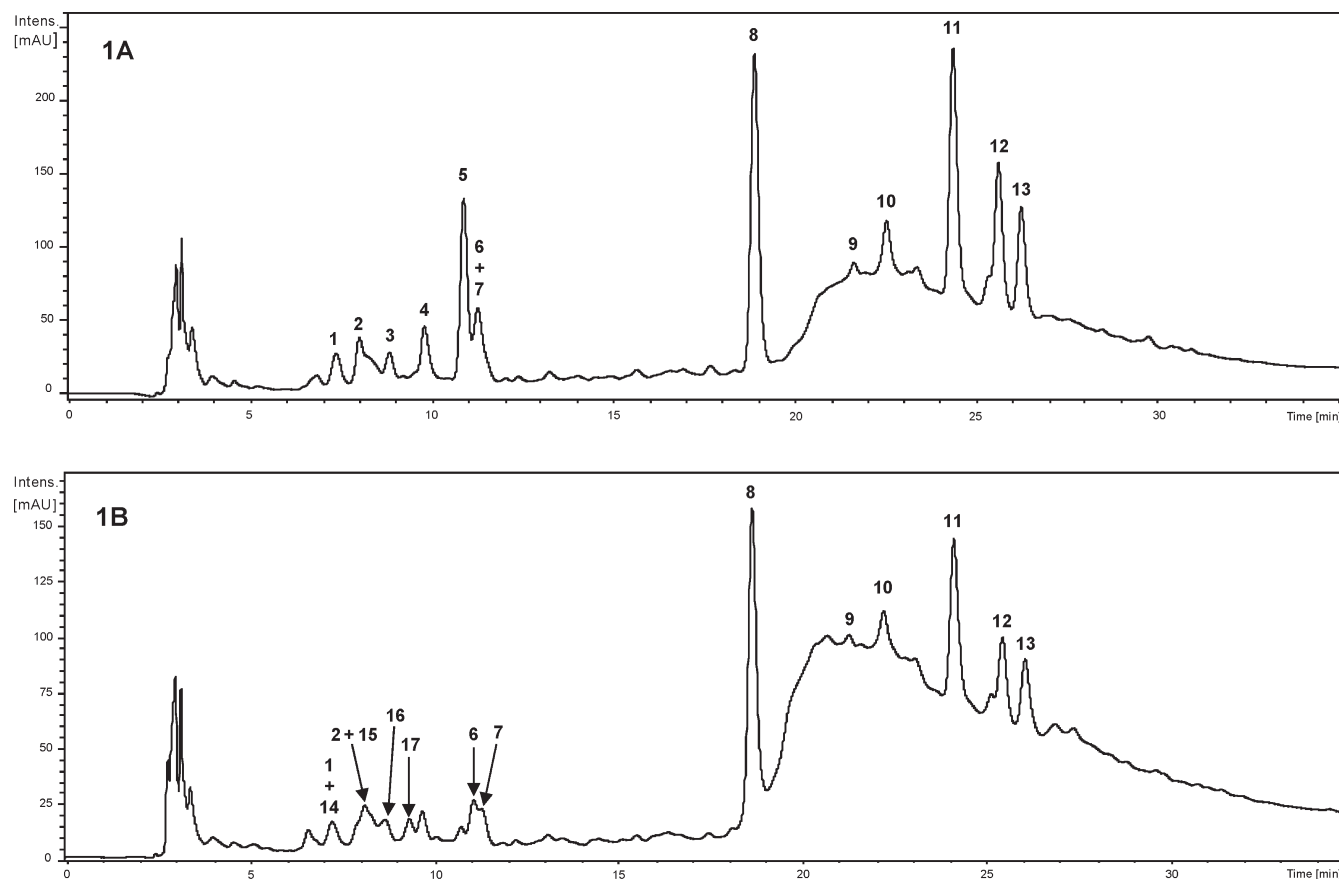


Figure 1. HPLC-UV phenolic profile of tronchuda cabbage seeds (**A**) and kale seeds (**B**). Detection was at 330 nm. Peaks: (1) sinapoylgentiobioside; (2) 1-sinapoylglucoside isomer; (3) sinapoylgentiobioside isomer; (4) 1-sinapoylglucoside isomer; (5) 1-sinapoylglucoside; (6) kaempferol-3-*O*-(sinapoyl)triglucoside-7-*O*-glucoside; (7) kaempferol-3-*O*-(sinapoyl)diglucoside-7-*O*-glucoside; (8) sinapoylcholine; (9) 1,2-disinapoylgentiobioside isomer; (10) 1,2-disinapoylgentiobioside isomer; (11) 1,2-disinapoylgentiobioside; (12) 1,2,2'-trisnapoylgentiobioside; (13) 1,2-disinapoylglucoside; (14) quercetin-3-*O*-diglucoside-7-*O*-glucoside; (15) kaempferol-3-*O*-triglucoside-7-*O*-glucoside; (16) kaempferol-3-*O*-diglucoside-7-*O*-glucoside; (17) isorhamnetin-3-*O*-diglucoside-7-*O*-glucoside.

AChE (0.44 U/mL) was added and the absorbance was read again. The rates of reactions were calculated by Ascent software version 2.6 (Thermo Labsystems Oy). The rate of the reaction before the addition of the enzyme was subtracted from that obtained after enzyme addition to correct eventual spontaneous hydrolysis of substrate. Percentage of inhibition was calculated by comparing the rates of the sample with the control (10% methanol in buffer C). Three experiments were performed in triplicate.

Antioxidant Activity. DPPH Scavenging Assay. The antiradical activity of the extracts was determined spectrophotometrically in a Multiskan Ascent plate reader (Thermo Electron Corp.), by monitoring the disappearance of DPPH at 515 nm, as before (3). The reaction mixture in the sample wells consisted of 25 μ L of aqueous extract and 200 μ L of methanolic solution of 150 mM DPPH. The plate was incubated for 30 min at room temperature after the addition of DPPH. Three experiments were performed in triplicate.

Superoxide Radical Scavenging Assay. Antiradical activity was determined spectrophotometrically at 562 nm, in a plate reader working in kinetic function, by monitoring the effect on reduction of NBT induced by superoxide radical.

Superoxide radicals were generated in a NADH/PMS system, according to a described procedure (3). All components were dissolved in phosphate buffer (19 mM, pH 7.4). Three experiments were performed in triplicate.

Nitric Oxide Scavenging Assay. Antiradical activity was determined spectrophotometrically in a 96-well plate reader according to the described procedure (3). The reaction mixtures in the sample wells consisted of extract and SNP, and plates were incubated at 25 $^{\circ}$ C for 60 min under light exposure. Griess reagent was then added, and the

absorbance was determined at 540 nm. Three experiments were performed in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

HPLC-PAD-MSn-ESI Phenolic Compounds Qualitative Analysis. The HPLC/UV-PAD/MSn-ESI analysis of both kale and tronchuda cabbage seeds revealed the presence of 17 phenolic compounds: (1) 1-sinapoylgentiobioside; (2) sinapoylglucoside isomer; (3) sinapoylgentiobioside isomer; (4) 1-sinapoylglucoside isomer; (5) 1-sinapoylglucoside; (6) kaempferol-3-*O*-(sinapoyl)triglucoside-7-*O*-glucoside; (7) kaempferol-3-*O*-(sinapoyl)diglucoside-7-*O*-glucoside; (8) sinapoylcholine; (9) 1,2-disinapoylgentiobioside isomer; (10) 1,2-disinapoylgentiobioside isomer; (11) 1,2-disinapoylgentiobioside; (12) 1,2,2'-trisnapoylgentiobioside; (13) 1,2-disinapoylglucoside; (14) quercetin-3-*O*-diglucoside-7-*O*-glucoside; (15) kaempferol-3-*O*-triglucoside-7-*O*-glucoside; (16) kaempferol-3-*O*-diglucoside-7-*O*-glucoside and (17) isorhamnetin-3-*O*-diglucoside-7-*O*-glucoside (**Figure 1**).

The tronchuda cabbage seed phenolics profile was quite similar to that previously reported (**Figure 1A**; **Table 1**) (4). The flavonoid metabolites were slightly different: kaempferol-3,7-*O*-diglucoside-4'-*O*-(sinapoyl)glucoside, which was previously identified in trace amounts (4), was not detected in this sample. However, kaempferol-3-*O*-(sinapoyl)diglucoside-7-*O*-glucoside (6) usually found in *Brassica* species already studied by our group (17) was now found in tronchuda seeds. This compound coelutes with kaempferol-3-*O*-(sinapoyl)triglucoside-7-*O*-glucoside (7), with a

Table 1. Rt and MSn Data of Sinapoylglycosides, Flavonoids (−MS), and Sinapine (+MS) from Tronchuda Cabbage Seeds and Kale Seeds^a

Compounds ¹	Rt (min)	MSn, m/z (%)					
		monosinapoyl derivatives					
		MS2[M-H] [−]					
		[M-H] [−]	[M-H-18] [−]	[^{0,2} X ₀ -18] [−]	[Sinp-H] [−]	[Sinp-H-18] [−]	
1 SinpGentb	7.3	547	529(100)	247(65)	223(10)		
3 SinpGentb	8.8	547	529(55)	247(60)	223(100)		
2 1-SinpGlc	8.0	385	367(25)	247(100)	223(8)		
4 1-SinpGlc	9.8	385	367(20)	247(100)	223(5)		
5 1-SinpGlc	10.8	385	247(45)		223(100)	205(60)	
		disinapoyl derivatives					
		MS2[M-H] [−]					MS3[(M-H)→(M-H-Sinp)] [−]
		[M-H] [−]	[M-H-Sinp] [−]	[Sinp-H] [−]	[Sinp-H-18] [−]	[Sinp-H] [−]	[Sinp-H-18] [−]
9 diSinpGentb	21.5	753	529(100)	223(3)		223(100)	205(20)
10 diSinpGentb	22.4	753	529(100)	223(4)		223(100)	205(55)
11 diSinpGentb	24.2	753	529(100)	223(5)		223(93)	205(100)
13 diSinpGlc	26.1	591	367(60)	223(100)	205(10)	223(60)	205(100)
		trisinapoyl derivatives					
		MS2[M-H] [−]					MS3[(M-H)→(M-H-Sinp)] [−]
		[M-H] [−]	[M-H-Sinp] [−]		[M-H-Sinp-206] [−]	[Sinp-H] [−]	
12 triSinpGentb	25.5	959	735(100)		529(100)	223(80)	
		sinapoyl derivatives from flavonoid glycosides					
		MS2[M-H] [−]					MS3[(M-H)→(M-H-162)] [−]
		[M-H] [−]	[(M-H)-162] [−]		[(M-H-162)-206] [−]		
6 K-3(Sinp)triGlc-7Glc	11.0	1139	977(100)		771(100)		
7 K-3(Sinp)Soph-7Glc	11.3	977	815(100)		609(100)		
		flavonoid glycosides					
		MS2[M-H] [−]					MS3[(M-H)→(M-H-162)] [−]
		[M-H] [−]	[(M-H)-162] [−]			[Aglic-H/2H] [−]	
14 Q-3Soph-7Glc	7.4	787	625(100)	463(17)	445(90)	300(100)	
15 K-3triGlc-7Glc	8.0	933	771(100)		429(30)	285(100)	
16 K-3Soph-7Glc	8.6	771	609(100)	447(20)	429(70)	284(100)	
17 I-3Soph-7Glc	9.4	801	639(100)	477(50)		315(100)	
		Sinapoylcholine					
		MS2[M] ⁺					MS3[M→(M-(CH ₃) ₃ N)] ⁺
		[M] ⁺	[M-(CH ₃) ₃ N] ⁺				
8 Sinapine	18.8	310	251(100)	207(55)	175(100)	147(25)	

^a Glc, glucoside; Gentb, gentiobioside; Soph, sophoroside; Sinp, sinapic acid; K, kaempferol; Q, quercetin; I, isorhamnetin.

0.3 min delay in the new gradient, confirming that there are two distinct compounds. In our previous work (4), this compound was considered to be an artifact resulting from the loss of glucose from compound 7 during the ionization process, but the different retention times proved the existence of both compounds in the extracts. The reanalysis of the previous chromatogram of tronchuda cabbage seeds confirmed the existence of both compounds (6 and 7) in important amounts.

As in tronchuda, the phenolic profile of kale seeds (Figure 1B; Table 1) is characterized by the presence of sinapine (8), as the major compound, the two heterosides of kaempferol acylated with sinapic acid (6 and 7), and the disinapoylglycosides derivatives (9–13). In the previous work by our group with tronchuda cabbage seeds (4), monosinapoylglycoside derivatives were identified (compounds 1–5). In kale seeds monosinapoylglycoside derivatives occur in trace amounts and coelute with other compounds, which makes the identification by their UV spectra difficult (Figure 1). Among these, quercetin-3-*O*-diglucoside-7-*O*-glucoside (14) coelutes with sinapoylgentiobioside (1) and kaempferol-3-*O*-triglucoside-7-*O*-glucoside (15) with sinapoylglycoside (2). Other flavonol derivatives such as kaempferol-3-*O*-diglucoside-7-*O*-glucoside (16) and isorhamnetin-3-*O*-diglucoside-7-*O*-glucoside (17) were identified (Figure 1B; Table 1).

Sinapoylglycoside (5), an abundant compound previously characterized in tronchuda cabbage seeds, was not detected in kale seeds (Figure 1; Table 1). Although Ayaz and collaborators (14) reported the presence of phenolic compounds, namely, phenolic acids, in hydromethanolic extract of kale seeds, all of the compounds described herein are presented for the first time in this matrix.

Phenolic Compound Quantification. To get a better characterization of the composition of the aqueous lyophilized extracts of tronchuda cabbage and kale seed, phenolic compounds were quantified by HPLC-PAD.

Kale seed total phenolics content, ca. 12.2 g/kg (Table 2), was similar to that previously reported for its leaves (ca. 11.1 g/kg) (3). However, kale seeds are richer in phenolic acids, whereas kale leaves were mainly characterized by the presence of flavonols (3). Both classes of compounds are formed in the phenylpropanoid pathway and fulfill important functions, being involved in the development and interaction of the plant with its environment. The higher amounts of hydroxycinnamic acids in seeds can be explained by the fact that these compounds are used as building blocks for lignin biosynthesis, important after seed germination for rigidifying cell walls and rendering them impermeable to water. Additionally, these compounds may be important for the resistance of both seed varieties to downy mildew (18) and insect pests (19), as they are known to exert a protective role against parasite attack (20). Leaves are richer in flavonoids because these metabolites protect plants against UV irradiation and act as signals in plant–symbiont interactions (21).

Kale seeds contain lower levels of phenolics (Table 2) than tronchuda cabbage seeds (ca. 24.0 g/kg). Sinapoylcholine (8) was the compound present in highest amounts in both seed varieties, representing ca. 28 and 42% of total compounds in tronchuda cabbage and kale, respectively (Table 2). 1,2-Disinapoylgentiobiose (11) was also a major compound, representing ca. 18 and 15% of total phenolics in tronchuda cabbage and kale seeds, respectively (Table 2).

Table 2. Quantification of Phenolic Compounds in Kale and Tronchuda Cabbage Seeds^a

phenolic compounds		mg/kg (dry basis) ^a	
		kale	tronchuda
1 + 14 ^b	sinapoylgentiobioside + quercetin-3-diglucoside-7-glucoside	396.1 ± 24.4	672.8 ± 22.6
2 + 15 ^b	1-sinapoylglucoside isomer + kaempferol-3-triglucoside-7-glucoside	243.0 ± 12.8	882.2 ± 23.1
3	sinapoylgentiobioside isomer		419.7 ± 29.3
4	1-sinapoylglucoside isomer		1058.6 ± 43.7
5	1-sinapoylglucoside		2716.8 ± 53.6
6 + 7	kaempferol-3-(sinapoyl)triglucoside-7-glucoside + kaempferol-3-(sinapoyl)diglucoside-7-glucoside	1526.9 ± 3.2	1892.9 ± 30.3
8	sinapoylcholine	5098.1 ± 7.1	6693.3 ± 67.0
9	1,2-disinapoylgentiobiose isomer	389.1 ± 8.8	752.9 ± 32.4
10	1,2-disinapoylgentiobiose isomer	482.3 ± 14.5	671.7 ± 25.8
11	1,2-disinapoylgentiobiose	1870.6 ± 8.3	4232.5 ± 43.7
12	1,2,2'-trisinapoylgentiobiose	690.6 ± 35.5	1943.8 ± 37.7
13	1,2-disinapoylglucose	1078.8 ± 3.0	2088.9 ± 28.9
16	kaempferol-3-diglucoside-7-glucoside	222.4 ± 18.3	
17	isorhamnetin-3-diglucoside-7-glucoside	229.1 ± 1.2	
Σ		12227.0	24026.3

^a Results are expressed as mean ± standard deviation of three determinations; Σ, sum of the determined phenolic compounds. ^b Found only in kale seeds.

Sinapoylgentiobioside isomer (**3**) was the minor compound in tronchuda cabbage seeds, accounting for 2% of total phenolics, whereas kaempferol-3-*O*-diglucoside-7-*O*-glucoside (**16**) and isorhamnetin-3-*O*-diglucoside-7-*O*-glucoside (**17**) were the compounds present in lower levels in kale seeds, representing each ca. 2% of total phenolics in this matrix (**Table 2**).

Furthermore, the most marked difference between the two seed varieties is in their flavonoid derivatives content. Quercetin and isorhamnetin derivatives were found only in kale seeds. Quercetin-3-*O*-diglucoside-7-*O*-glucoside (**14**), kaempferol-3-*O*-triglucoside-7-*O*-glucoside (**15**), kaempferol-3-*O*-diglucoside-7-*O*-glucoside (**16**), and isorhamnetin-3-*O*-diglucoside-7-*O*-glucoside (**17**) present in kale seeds were not detected in tronchuda cabbage seeds (**Figure 1**; **Table 2**). Kaempferol-3-*O*-(sinapoyl)-triglucoside-7-*O*-glucoside (**6**) and kaempferol-3-*O*-(sinapoyl)-diglucoside-7-*O*-glucoside (**7**) were the only flavonoids common to both seed varieties, representing ca. 8 and 12% of total compounds in tronchuda cabbage and kale, respectively (**Table 2**).

On the other hand, with regard to phenolic acids composition, tronchuda seeds were richer than kale ones (**Table 2**). In addition, tronchuda cabbage seeds contained sinapoylgentiobioside isomer (**3**), sinapoylglucoside isomer (**4**), and sinapoylglucoside (**5**), which represent 2, 4, and 11% of total compounds in this variety, respectively, not being found in kale seeds (**Table 2**).

The presence of isorhamnetin and quercetin derivatives in kale seeds is in accordance with the reported phenolic profile of kale leaves (**3**). In tronchuda cabbage, quercetin was found in only trace amounts in older leaves and isorhamnetin was absent (**4, 5**). Thus, the differences found between both seeds may be used to distinguish these varieties.

Identification and Quantification of Organic Acids by HPLC-UV. The screening of kale seeds revealed a chemical profile composed by six identified organic acids: oxalic, aconitic, citric, pyruvic, malic, and fumaric acids (**Figure 2**). Comparison of this profile with that of the leaves showed that only two acids, oxalic (found in kale seeds) and shikimic (observed in kale leaves), were not present in both materials (**Figure 2**). The qualitative organic acids profile of tronchuda cabbage seeds revealed a similar composition, but in this variety quinic and shikimic acids were additionally detected (**Figure 2**). By comparison of the organic acids profile obtained in our previous work (**4**), we observed a similar composition, except for the compound with a retention

time around 31 min. This compound was previously identified as ascorbic acid, but using other analysis conditions and according to the characteristic UV spectrum of ascorbic acid (maximum absorption at 245 nm), this identity was not confirmed. This compound was now identified as pyruvic acid, which was further confirmed by cochromatography with an external standard.

In quantitative terms, the total organic acids content of kale seeds (ca. 41.4 g/kg) was similar to that found in tronchuda cabbage ones (ca. 42.9 g/kg) (**Table 3**) and almost 3 times less than that previously found in kale leaves (ca. 112.3 g/kg) (**3**). This low quantity of organic acids found in kale seeds when compared with leaves can be justified by plant primary metabolism, much more active in leaves than in seeds due to their quiescent state (**22**).

As observed with kale leaves (**3**), malic and citric were the acids present in highest amounts in both seed varieties (**Table 3**): malic acid represented ca. 50.4 and 27.1% in kale and tronchuda cabbage seeds, respectively, and citric acid corresponded to 42.0 and 59.2%, respectively (**Table 3**). Oxalic, pyruvic, and fumaric acids were minor compounds, accounting for ca. 1.3, 0.8, and 0.4% of total acids, respectively, in kale seeds (**Table 3**). These acids represented ca. 1.2, 1.8, and 0.5%, respectively, in tronchuda cabbage seeds (**Table 3**). In tronchuda cabbage seeds, shikimic acid was present in the lowest amount (0.2%) (**Table 3**).

AChE Inhibitory Activity. AChE is the principal enzyme involved in the hydrolysis of ACh. As referred to above, given the structural similarities between sinapoylcholine and ACh, the effects of kale and tronchuda cabbage seed aqueous extracts on enzyme activity were assessed for the first time. Kale and tronchuda cabbage seeds exhibited a concentration-dependent AChE inhibitory capacity (**Figure 3**). Under the assay conditions the IC₅₀ found for kale seed extract was 3438 μg/mL of dried lyophilized extract, containing 17.5 μg/mL of sinapine. For tronchuda cabbage seeds extract the IC₅₀ obtained corresponded to 3399 μg/mL (**Figure 3**), containing 22.8 μg/mL sinapine. Sinapine had already been described for its potent AChE inhibitory activity (**23**). He and collaborators (**23**) demonstrated that sinapine significantly inhibited AChE present on rat cerebral homogenate and on rat blood serum. Thus, due to the closely related structure of sinapine with ACh, it may act as a competitive inhibitor for the enzyme (**24**). Sinapine has a quaternary nitrogen that probably binds reversibly to the site on the enzyme where the quaternary ammonium of AChE binds (**25**).

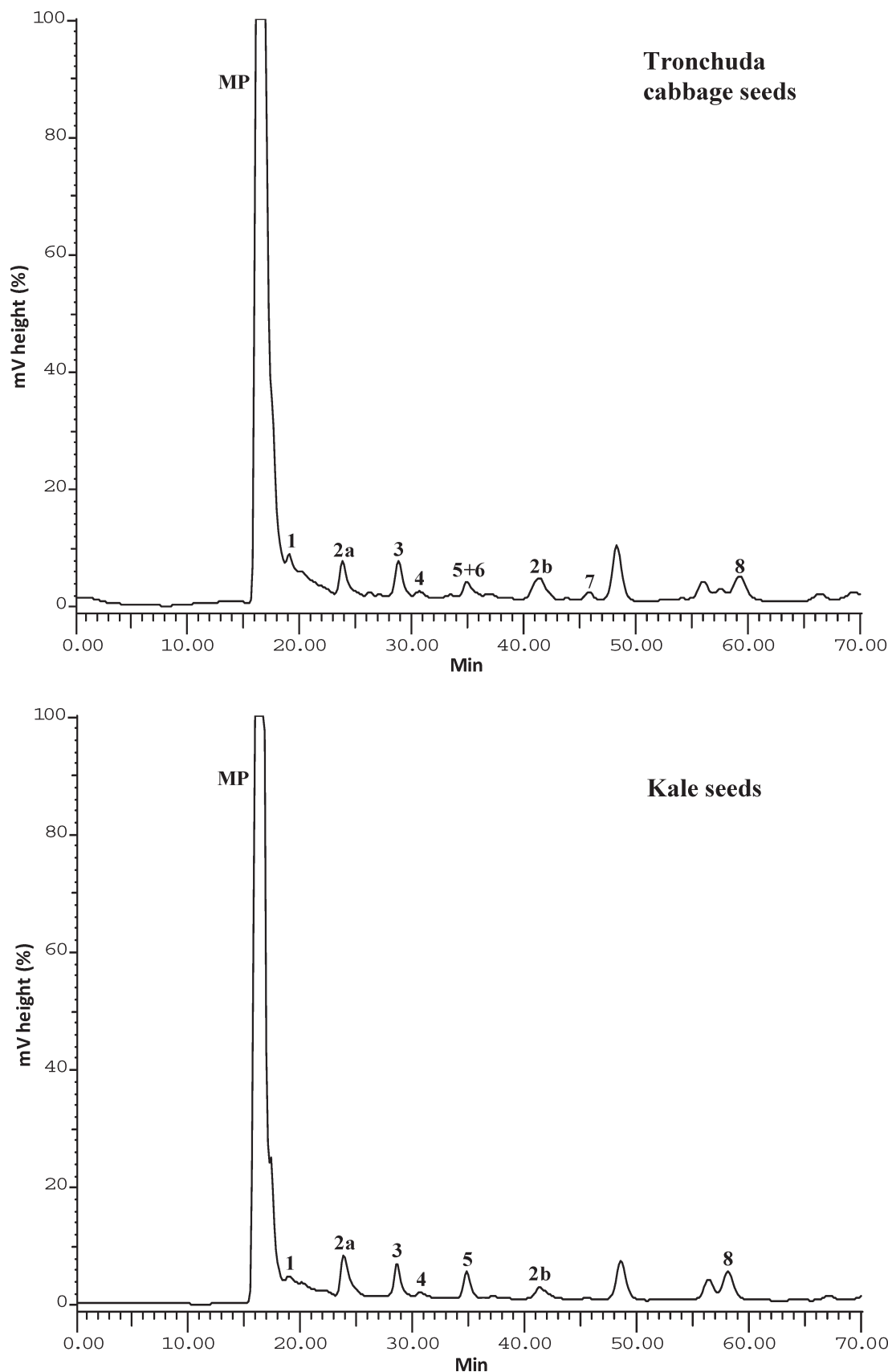


Figure 2. HPLC-UV organic acid profile of tronchuda cabbage and kale seeds. Detection was at 214 nm. Peaks: (MP) mobile phase; (1) oxalic acid; (2a and 2b) aconitic acid; (3) citric acid; (4) pyruvic acid; (5) malic acid; (6) quinic acid; (7) shikimic acid; (8) fumaric acid.

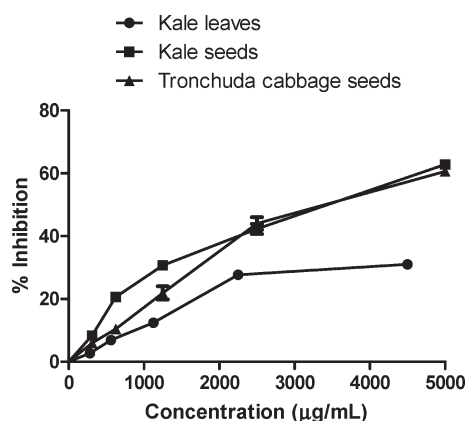
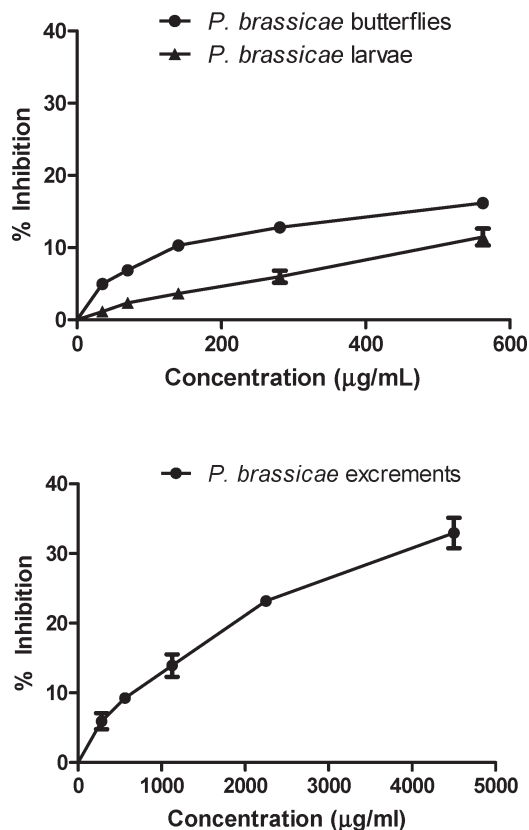
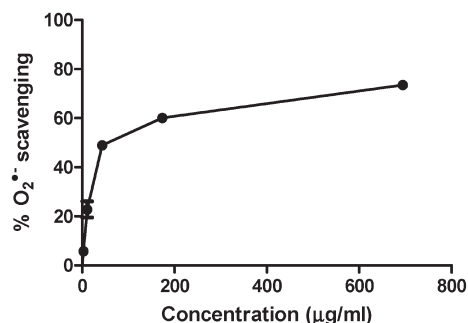
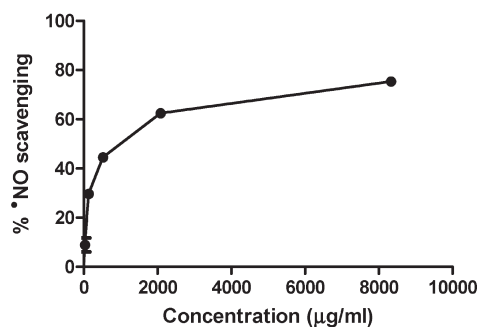
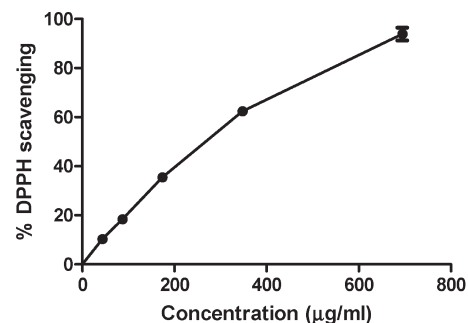
As in previous works involving *P. brassicae* reared on *B. oleracea* (3, 15) and *B. rapa* varieties (16), the insect was revealed to be able to selectively sequester, metabolize, and

excrete phenolic compounds from its feeding material and exhibited stronger antioxidant potential than its host plant; the AChE inhibitory capacity of the insect material, as well as that of

Table 3. Quantification of Organic Acids in Kale and Tronchuda Seeds^a

	organic acid	mg/kg (dry basis) ^a	
		kale	tronchuda
1	oxalic	542.2 ± 2.3	506.3 ± 5.7
2a + 2b	aconitic	2081.4 ± 307.3	4327.6 ± 20.1
3	citric	17418.3 ± 32.4	25372.8 ± 106.0
4	pyruvic	320.3 ± 28.4	754.4 ± 12.0
5 +	malic +	20886.2 ± 391.5 ^b	11615.9 ± 78.3
6	quinic		
7	shikimic		97.9 ± 0.3
8	fumaric	120.9 ± 2.3	195.0 ± 0.3
Σ		41369.3	42870.0

^a Results are expressed as mean ± standard deviation of three determinations; Σ, sum of the determined organic acids. ^b Only malic acid.

**Figure 3.** AChE inhibitory effect of kale leaves and seeds and tronchuda cabbage seed aqueous extract.**Figure 4.** AChE inhibitory effect of *P. brassicae* materials (butterflies, larvae, and their excrements) aqueous extract.**Figure 5.** Effect of kale seed aqueous lyophilized extracts against DPPH, nitric oxide, and superoxide radical. Values show mean ± SE from three experiments performed in triplicate.

host kale leaves, was also evaluated for the first time, to be compared with that of *B. oleracea* seeds.

These extracts displayed some concentration-dependent AChE inhibitory potential: excrements were the *P. brassicae* material that was revealed to have stronger capacity to inhibit this enzyme ($IC_{25} = 2666 \mu\text{g/mL}$) (Figure 4). For *P. brassicae* butterfly and larvae a very low activity was found (Figure 4). Kale leaves displayed a slightly better AChE inhibitory activity, with an IC_{25} of $2051 \mu\text{g/mL}$ (Figure 3).

Thus, the marked difference in the activity shown by the different analyzed extracts can be explained by the absence of sinapine in *P. brassicae* materials, as well as in host kale leaves, and its presence in high quantities in kale and tronchuda cabbage seeds. Therefore, this compound should make an important contribution to AChE inhibition.

Some flavonoids, such as quercetrin, quercetin, or 3-methoxyquercetin, have also been described in the literature as AChE inhibitors (26). However, despite the presence of flavonoids in these matrices, namely, quercetin derivatives, none of the above-described compounds was found. Although the phenolic profile of the distinct matrices reveals the presence of several quercetin derivatives, they exhibit a more complex substitution pattern, which can impair their activity as AChE inhibitors.

Despite the AChE inhibitory activity shown by some of the tested aqueous extracts, especially the seeds, physostigmine used

as reference compound was more potent ($IC_{50}=1.8\text{ }\mu\text{g/mL}$ under the same conditions).

Antioxidant Capacity. The antioxidant ability of the aqueous lyophilized extract of kale seeds was screened by the DPPH assay. In this assay, kale seeds exhibited a strong concentration-dependent antioxidant potential ($IC_{25}=120\text{ }\mu\text{g/mL}$) (Figure 5). The sequestration effect against DPPH had already been observed (14), but for different extracts and using different assay conditions.

Against nitric oxide, kale seeds also provided protection in a concentration-dependent way (Figure 5), with an $IC_{20}=151\text{ }\mu\text{g/mL}$.

With regard to superoxide anion, kale seeds displayed a potent protective effect, as shown in Figure 5, with an IC_{25} at $19\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$.

Kale seeds were revealed to have higher antioxidant potential than kale leaves (3) despite leaves being richer in phenolics than seeds. Although phenolic compounds and organic acids have already been reported to have antioxidant properties (4), other compounds present in the extracts may contribute to the overall antioxidant activity exhibited by seeds. The high antioxidant potential of the seed can be explained by the need to protect its storage lipids from oxidation and to ensure its viability, especially important during its germination when oxygen demand is high (27).

In a general way, comparison of the two seed varieties revealed that tronchuda cabbage seeds exhibited a higher protective effect than kale seeds (4, 28). The observed differences can be, at least partially, explained by higher amounts of phenolic compounds in tronchuda cabbage seeds than in kale seeds.

In summary, this study provides further knowledge on kale and tronchuda cabbage seeds. The potential of these matrices as inhibitors of AChE activity was demonstrated for the first time. Other materials, such as *P. brassicae* (butterflies, larvae, and their excrements) and kale leaves, were less active. Phenolic compounds (namely, phenolic acids, flavonols, and sinapine) and organic acids can, at least partly, explain these activities. This opens another perspective for the medicinal use of these natural matrices as a source of bioactive compounds to treat chronic diseases, such as Alzheimer's. Additionally, they can be used as a source of bioactive compounds.

LITERATURE CITED

- (1) Cartea, M. E.; Velasco, P.; Obregón, S.; Padilla, G.; de Haro, A. Seasonal variation in glucosinolate content in *Brassica oleracea* crops grown in northwestern Spain. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 403–410.
- (2) Vallejo, F.; Tomás-Barberán, F. A.; Ferreres, F. Characterisation of flavonols in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) by liquid chromatography–UV diode-array detection–electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1054*, 181–193.
- (3) Ferreres, F.; Fernandes, F.; Oliveira, J. M.; Valentão, P.; Pereira, J. A.; Andrade, P. B. Metabolic profiling and biological capacity of *Pieris brassicae* fed with kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 1209–1220.
- (4) Ferreres, F.; Sousa, C.; Valentão, P.; Seabra, R. M.; Pereira, J. A.; Andrade, P. B. Tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) seeds: phytochemical characterization and antioxidant potential. *Food Chem.* **2007**, *101*, 549–558.
- (5) Ferreres, F.; Valentão, P.; Llorach, R.; Pinheiro, C.; Cardoso, L.; Pereira, J. A.; Sousa, C.; Seabra, R. M.; Andrade, P. B. Phenolic compounds in external leaves of Tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2901–2907.
- (6) Hemm, M. R.; Ruegger, M. O.; Chapple, C. The *Arabidopsis* ref2 mutant is defective in the gene encoding CYP83A1 and shows both phenylpropanoid and glucosinolate phenotypes. *Plant Cell* **2003**, *15*, 179–194.
- (7) Houghton, P. J.; Ren, Y.; Howes, M. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 181–199.
- (8) Dohi, S.; Terasaki, M.; Makino, M. Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 4313–4318.
- (9) Mukherjee, P. K.; Kumar, V.; Mal, M.; Houghton, P. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* **2007**, *14*, 289–300.
- (10) Pereira, D. M.; Ferreres, F.; Oliveira, J.; Valentão, P.; Andrade, P. B.; Sottomayor, M. Targeted metabolite analysis of *Catharanthus roseus* and its biological potential. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 1349–1354.
- (11) Orhan, I.; Aslan, M. Appraisal of scopolamine-induced antiamnesic effect in mice and in vitro antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of some traditionally used Lamiaceae plants. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *122*, 327–332.
- (12) Sun, A. Y.; Wang, Q.; Simonyi, A.; Sun, G. Y. Botanical phenolics and brain health. *Neuromol. Med.* **2008**, *10*, 259–274.
- (13) Mikkelsen, R. B.; Wardman, P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* **2003**, *22*, 5734–5754.
- (14) Ayaz, F. A.; Hayrlıoğlu, S.; Alpaya-Karaoglu, S.; Grúz, J.; Valentová, K.; Ulrichová, J.; Strnad, M. Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Food Chem.* **2008**, *107*, 19–25.
- (15) Sousa, C.; Pereira, D. M.; Valentão, P.; Ferreres, F.; Pereira, J. A.; Seabra, R. M.; Andrade, P. B. *Pieris brassicae* inhibits xanthine oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 2288–2294.
- (16) Pereira, D. M.; Noites, A.; Valentão, P.; Ferreres, F.; Pereira, J. A.; Vale-Silva, L.; Pinto, E.; Andrade, P. B. Targeted metabolite analysis and biological activity of *Pieris brassicae* fed with *Brassica rapa* var. *rapa*. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 483–489.
- (17) Llorach, R.; Izquierdo, A. G.; Ferreres, F.; Tomás-Barberán, F. A. HPLC-DAD-MS/MS ESI characterization of unusual highly glycosylated acylated flavonoids from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) agroindustrial byproducts. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3895–3899.
- (18) Sousa, M. E.; Dias, J. S.; Monteiro, A. A. Screening Portuguese cole landraces for resistance to seven indigenous downy mildew isolates. *Sci. Hortic.* **1997**, *68*, 49–58.
- (19) Ester, A.; de Putter, H.; van Bilsen, J. G. P. M. Filmcoating the seed of cabbage (*Brassica oleracea* L. convar. *Capitata* L.) and cauliflower (*Brassica oleracea* L. convar. *Botrytis* L.) with imidacloprid and spinosad to control insect pests. *Crop Prot.* **2003**, *22*, 761–768.
- (20) Macheix, J. J.; Fleuriet, A.; Billot, J. *Fruit Phenolics*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1990; pp 246–255.
- (21) Besseau, S.; Hoffmann, L.; Geoffroy, P.; Lapierre, C.; Pollet, B.; Legrand, M. Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. *Plant Cell* **2007**, *19*, 148–162.
- (22) Eastmond, P. J.; Graham, I. A. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends Plant Sci.* **2001**, *6*, 72–77.
- (23) He, L.; Li, H. T.; Guo, S. W.; Liu, L. F.; Qiu, J. B.; Li, F.; Cai, B. C. Inhibitory effects of sinapine on activity of acetylcholinesterase in cerebral homogenate and blood serum of rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2008**, *33*, 813–815.
- (24) Hasan, F. B.; Elkind, J. L.; Cohen, S. G.; Cohen, J. B. Cationic and uncharged substrates and reversible inhibitors in hydrolysis by acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7). The trimethyl subsite. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 7781–7785.
- (25) Lee, B. H.; Stelly, T. C.; Colucci, W. J.; Garcia, J. G.; Gandour, R. D.; Quinn, D. M. Inhibition of acetylcholinesterase by hemicholiniums, conformationally constrained choline analogs. Evaluation of aryl and alkyl substituents. Comparisons with choline and (3-hydroxyphenyl)trimethylammonium. *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 411–418.

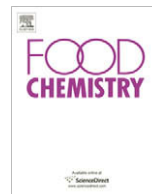
- (26) Jung, M.; Park, M. Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrimonia pilosa*. *Molecules* **2007**, *12*, 2130–2139.
- (27) Sousa, C.; Lopes, G.; Pereira, D. M.; Taveira, M.; Valentão, P.; Seabra, R. M.; Pereira, J. A.; Baptista, P.; Ferreres, F.; Andrade, P. B. Screening of antioxidant compounds during sprouting of *Brassica oleracea* L. var. *costata* DC. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2007**, *10*, 377–386.
- (28) Sousa, C.; Valentão, P.; Ferreres, F.; Seabra, R. M.; Andrade, P. B. Tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC):

scavenger of reactive nitrogen species. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 4205–4211.

Received July 30, 2009. Revised manuscript received August 24, 2009. Accepted August 25, 2009. We are grateful to Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) for financial support of this work (PTDC/AGR-AAM/64150/2006). F.F. is indebted to FCT for Grant SFRH/BD/37963/2007.

4.4. Headspace solid-phase microextraction and gas chromatography/ion trap-mass spectrometry applied to a living system: *Pieris brassicae* fed with kale

Food Chem. 2010, 119, 1681–1693



Analytical Methods

Headspace solid-phase microextraction and gas chromatography/ion trap-mass spectrometry applied to a living system: *Pieris brassicae* fed with kale

Fátima Fernandes^a, David M. Pereira^a, Paula Guedes de Pinho^{a,*}, Patrícia Valentão^a, José A. Pereira^b, Albino Bento^b, Paula B. Andrade^{a,*}

^aREQUIMTE/Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Porto University, R. Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal

^bCIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta. Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 February 2009

Received in revised form 21 July 2009

Accepted 14 September 2009

Keywords:

Brassica oleracea L. var. *acephala*

Kale

Pieris brassicae

Volatile compounds

HS-SPME

GC/IT-MS

ABSTRACT

The influence of *Pieris brassicae* feeding on kale was monitored, by evaluating its effect on the volatiles released by the plant through time. This is the first study applying headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography/ion trap-mass spectrometry to an isolated insect, as most studies analyse the insect–plant system as a whole, being unable to evaluate the contribution of the insect itself. Substantial differences were noticed between the volatiles composition of kale before and after the insect's attack. More than 60 compounds were found, including terpenes, lipooxygenase pathway by-products, ketones, norisoprenoids, etc. After insect attack, *l*-camphor, sabinene and α -thujene were found and limonene and eucalyptol suffered a noticeable increase. A considerable rise in (*Z*)-3-hexenyl acetate was also observed. *In vivo* accumulation of limonene and camphor by the insect was detected. The findings contribute to the knowledge of the ecological interactions between the two species.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The role of volatile compounds in shaping insect–plant relations is a relatively new area of research which has attracted increased interest over the last few years.

In plants, there is a constitutive emission of volatile compounds that are released from the surface of the leaf and/or accumulated in storage sites. Terpenoids constitute the most important group of volatiles that are emitted by plants, consisting predominantly of monoterpenes, sesquiterpenes and their derivatives, homoterpenes. These volatiles play different roles in herbivore elimination, either by attraction of parasitoids that increase herbivore mortality (indirect defence) or by directly reducing herbivores. However, some environment stimuli, such as feeding (Howe & Jander, 2008) or oviposition (Meiners & Hilker, 2000), can change both qualitatively and/or quantitatively the blend of volatile constituents (Bukovinszky, Gols, Posthumus, Vet, & Van Lenteren, 2005).

This induced response is, in fact, a part of the plant's defence mechanisms against predation and has been revealed to be very complex, involving gene expression as a consequence of triggering signals that include jasmonic acid, abscisic acid, and systemin

(a polypeptide first isolated from leaves of tomato plants), among others (Mello & Silva-Filho, 2002).

An additional set of compounds, which include C₆ alcohols, aldehydes, acetates, and methyl salicylate, are usually designated as “the green leaf volatiles” and their production is induced by herbivore attack (Mumm, Posthumus, & Dicke, 2008). These compounds are fatty acids derivatives that arise from the conversion of linolenic and linoleic acids via the lipooxygenase pathway (D'Auria, Pichersky, Schaub, Hansel, & Gershenzon, 2007).

The duration of volatiles emission is highly species-dependent, varying from a few hours in corn (Turlings & Tumlinson, 1992) to over 7 days in lima beans (Dicke, Sabeis, Takabayashi, Bruin, & Posthumus, 1990).

When working with living systems, some technical issues arise, as a consequence of the need to maintain the organisms' stress levels to a minimum, thus reducing interference in the results. A limited number of studies describe handmade systems designed to collect and analyse volatile compounds emitted by insects, which include glass-Teflon chambers with adsorption by means of Tenax traps (Mattiacci et al., 2001) or wind tunnels (Guerrieri, Poppy, Powell, Tremblay, & Pennacchio, 1999). However, in both cases the insect–plant complex is analysed as a whole and, therefore, the contribution of the insect itself cannot be assessed. A more complex and automated system, applied to a living insect (response of *Lycopersicon esculentum* Mill to *Spodoptera littoralis* attack) was described by Vercammen, Pham-Tuan, and Sandra

* Corresponding authors. Tel.: +351 222078935; fax: +351 222003977 (P.B. Andrade).

E-mail addresses: pguedes@ff.up.pt (P. Guedes de Pinho), pandrade@ff.up.pt (P.B. Andrade).

(2001), involving an apparatus composed of two programmable temperature vaporisation injectors in series, a glass tube filled with PDMS, rotary valves, and vacuum pumps, among other devices. Regardless of the versatility of these systems, their complexity turns them into an expensive option, and they consist of specific material that may not be available in all laboratories. Again, the insect is analysed together with the plant.

In this work, the changes during 24 h of the volatiles profile of *Brassica oleracea* L. var. *acephala* (kale) induced by the predation by *Pieris brassicae* were monitored for the first time. Kale is a well established crop worldwide, having an important impact in local economic systems, which makes the study of the interactions with one of its most common pests a pertinent subject.

Additionally, volatiles emitted by the insect itself were analysed, before and after the feeding event, also for the first time, and comparisons with compounds released by *B. oleracea* var. *acephala* were made. To the best of our knowledge, this is the first time that *P. brassicae* has been screened *in vivo* for these kind of compounds or others.

To accomplish these objectives, a volatile collection system (HS-SPME) involving regular laboratory material was used. This system is highly sensitive and has proved to be useful in the analysis of a wide range of volatile compounds, as well as being a cheap and reliable method. The characterisation of the compounds was achieved using gas chromatograph/ion trap-mass spectrometry (GC/IT-MS).

In the system presented herein, no conduction tubes were used, with the plant or insect being placed near the volatile collector, which was a PDMS fibre. Although the use of liquid extraction of compounds from adsorbent material is well documented (Du et al., 1998; Guerrieri et al., 1999; Smid, van Loon, Posthumus, & Vet, 2002), relatively long sampling times, in addition to high sampling flow rates, are necessary to achieve sufficient sensitivity. For this reason, we used thermal-desorption of the PDMS fibre, which allowed a high throughput delivery of compounds, even at ambient extraction temperatures.

The results obtained will contribute to the knowledge of insect-plant interactions and plant responses to biotic stress, being particularly relevant for areas such as chemical ecology or pest management.

2. Materials and methods

2.1. Standards

Reference compounds were purchased from various suppliers: octanal, (*E*)-2-octenal, hexadecanoic acid methyl ester, geranylacetone, β -cyclocitral, α -pinene, β -pinene, linalool, limonene, eugenol, (*E*)-2-decen-1-ol; (*Z*)-2-hexen-1-ol, (*Z*)-3-hexen-1-ol, 6-methyl-5-hepten-2-one and methyl dihydrojasmonate were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO); (*E*)-2-nonenal; hexanal, (*E*)-2-hexenal, phenylacetaldehyde, β -ionone, dimethyl disulphide; dimethyl trisulfide and (*Z*)-3-hexenyl acetate were obtained from SAFC (Steinheim, Germany); eucalyptol and *o*-cymene were from Extrasynthese (Genay, France); acetic acid, hexyl ester and menthol were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland) and allyl isothiocyanate was from Riedel de Haën (Seelze, Germany).

2.2. Samples

Wild *P. brassicae* individuals were obtained from Cimo/Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, north-east Portugal. The population was exclusively fed with *B. oleracea* var. *acephala* (kale). Twenty-five larvae at the fourth instar of development and with identical weight (~400 mg) and size (~2.5 cm)

were chosen for analysis, transported and maintained at the Department of Pharmacognosy of the Faculty of Pharmacy of Porto University.

Samples of *B. oleracea* L. var. *acephala* were obtained from Bragança, north-east Portugal, in November 2008. In each experiment, a different vessel was used, totalizing 15 vessels.

2.3. Samples analysis

2.3.1. *P. brassicae*

Fifteen larvae were isolated and deprived of food for 6 h. During this period, non-attacked kale leaves were analysed. After this starving time, larvae were placed in three distinct kale flower pots, in groups of five elements, and fed *ad libitum* for 1 h, after which one larva from each kale pot and respective leaves were analysed separately. Insect specimens were also analysed after a period of starvation of 6 h.

Besides the insect and kale alone, we also proceeded to the analysis of the insect in conjugation with its host plant, that is, the insect-plant system as a whole. For this purpose, *P. brassicae* was in contact with kale for 1 h and, after this time, all the material was simultaneously analysed.

All analyses were performed in triplicate.

2.3.2. *B. oleracea* L. var. *acephala*

Kale leaves were analysed after 1, 4, 8, 12 and 24 h of insect predation. Non-attacked leaves were also analysed. All analyses were performed in triplicate.

2.4. Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME)

2.4.1. SPME fibres

Several fibres with different characteristics and uses are commercially available. According to bibliography, recommendations of supplier (Supelco, Bellefonte, PA) and to our own knowledge (Guedes de Pinho et al., 2008, 2009) three of them are the most adaptable to the compounds and to the matrices under study. The fibre selected was coated with Divinylbenzene/PDMS (DVB/PDMS), 65 μ m. Fibres were conditioned by inserting them into the GC injector at 250 °C for 30 min.

2.4.2. Volatiles extraction

For the *in vivo* analysis of *P. brassicae*, several temperatures and adsorption times were tested in order to determine which one interfered the least with the insects' behaviour, in an effort to minimise insect's stress, which could influence the results. The conditions assayed were 60 °C for 1 h, 40 °C for 1 h and 40 °C for 40 min.

A 15-ml vial, which was a suitable size for *P. brassicae*, was sealed with a polypropylene hole cap and PTFE/silicone septum (Supelco) and subjected to extraction, with magnetic stirring. During this period the operator had to be present, as a swift change in the insects' behaviour could result in its death by accident with the magnet, or in the attack of the exposed fibre, damaging it.

Afterwards, the fibre was pulled into the needle sheath and the SPME device was removed from the vial and inserted into the injection port of the GC system for thermal desorption. After 1 min the fibre was removed and conditioned in another GC injection port for 20 min at 250 °C. The same procedure was used to test the leaves of *B. oleracea* var. *acephala*, with the exception of the operator supervision during adsorption phase.

2.5. Gas chromatography/ion trap-mass spectrometry analysis

GC/IT-MS analysis was performed using a Varian CP-3800 gas chromatograph (Varian, Palo Alto, CA) equipped with a Varian Saturn 4000 mass selective detector and Saturn GC/MS workstation

Table 1
Average content (standard deviation), in percentage, of alcohols identified in kale before and after herbivory attack, kale mechanically damaged and *Pieris brassicae* 1 h after feeding and after 6 h starvation and insect–plant complex.

Compound	R ^a	QI ^b (m/z)	RA ^c (% ±SD)	Kale after herbivory attack					Kale mechanically damage	Insect–plant complex	Insect 1 h after feeding	Insect after a 6 h starvation
				1 h	4 h	8 h	12 h	24 h				
1 3-Methylbutanol ^e	759	57/58/71/86	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	7.974 (0.711)	2.794 (0.243)
2 1-Penten-3-ol ^e	787	57/67	0.474 (0.016)	0.280 (0.011)	nd	0.300 (0.021)	0.210 (0.013)	0.565 (0.046)	0.065 (0.006)	nd	nd	nd
3 3-Pentanol ^e	807	41/59	0.188 (0.018)	0.041 (0.004)	0.247 (0.004)	0.057 (0.004)	0.040 (0.003)	0.183 (0.017)	nd	0.097 (0.007)	2.141 (0.187)	nd
4 (Z)-2-Penten-1-ol ^e	880	57/68	0.283 (0.026)	0.143 (0.003)	0.282 (0.013)	0.157 (0.018)	0.052 (0.002)	0.109 (0.008)	0.017 (0.001)	nd	nd	nd
5 2,4-Hexadien-1-ol ^e	907	55/79/83/98	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.304 (0.005)	nd	nd	nd
6 (Z)-3-Hexen-1-ol ^{d,e}	962	41/55/67/82	0.052 (0.001)	0.019 (0.002)	0.032 (0.003)	0.029 (0.001)	0.027 (0.002)	0.034 (0.002)	nd	0.068 (0.006)	3.834 (0.007)	nd
7 (Z)-2-Hexen-1-ol ^{d,e}	968	57/67/82	0.059 (0.005)	0.028 (0.002)	nd	nd	nd	nd	0.106 (0.009)	nd	nd	nd
8 2,6-Dimethyl-7-octen-2-ol ^e	1181	59	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4.103 (0.355)	nd
9 (E)-2-Nonen-1-ol ^e	1213	41/43/55/57	0.078 (0.002)	0.192 (0.035)	0.282 (0.011)	0.207 (0.020)	0.088 (0.008)	0.277 (0.015)	0.097 (0.007)	0.186 (0.016)	4.745 (0.276)	4.047 (0.541)
10 Undecanol ^e	1298	55/69/83/97	nd	nd	0.401 (0.040)	0.083 (0.002)	0.095 (0.009)	0.191 (0.009)	nd	0.288 (0.021)	nd	nd
11 (E)-2-Decen-1-ol ^{d,e}	1309	41/43/55/57	0.017 (0.001)	nd	0.072 (0.006)	0.054 (0.004)	0.019 (0.002)	0.063 (0.004)	nd	0.105 (0.009)	2.002 (0.133)	1.316 (0.101)

^a RI = retention indices as determined on HP-5 capillary column using the homologous series of *n*-alkanes.

^b QI = quantification ions.

^c RA = relative area in percentage ± standard deviation.

^d Identified by comparison with reference compound.

^e Tentatively identified by NIST05; nd = not detected.

software, Version 6.8. The column used for samples analysis was VF-5ms (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) from Varian. A Stabilwax-DA fused silica column (60 m × 0.25 mm, 0.25 μm; Restek, USA) was used in order to confirm the identity of some compounds found using the first column. The injection port was heated to 220 °C. Injections were performed in splitless mode. The carrier gas was helium C-60 (Gasin, Portugal), at a constant flow of 1 ml/min. The oven temperature was set at 40 °C for 1 min, then increasing at 2 °C/min to 220 °C and held for 30 min. All mass spectra were acquired in electron impact (EI) mode. Ionisation commenced 2 min after injection. The ion trap detector was set as follows: the transfer line, manifold and trap temperatures were, respectively, 280, 50 and 180 °C. The mass range scanned was m/z 40–350, with a scan rate of 6 scans/s. The emission current was 50 μA, and the electron multiplier was set in relative mode to auto tune procedure. The maximum ionisation time was 25,000 μs, with an ionisation storage level of 35 m/z . The analysis was performed in full scan mode.

Compounds were identified by comparing the retention times of the chromatographic peaks with those of authentic compounds analysed under the same conditions, and by comparison of retention indices (as Kovats indices) with literature data. The comparison of MS fragmentation pattern with those of pure compounds and mass spectrum database search was performed using the National Institute of Standards and Technology (NIST) MS 05 spectral data base. Confirmation was also conducted using a laboratory-

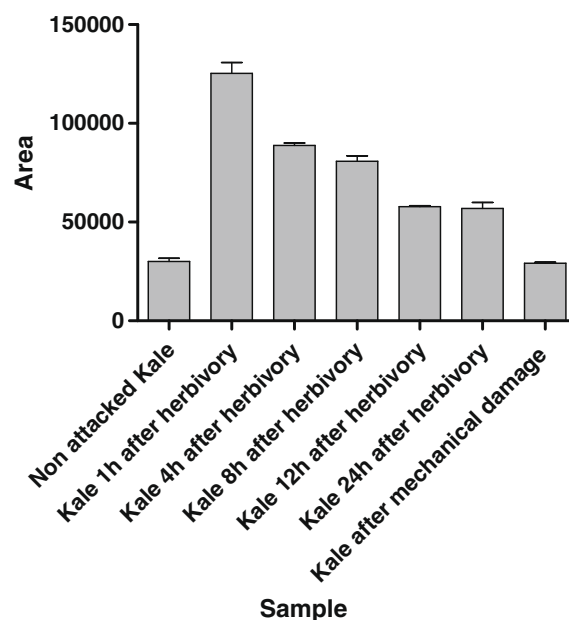


Fig. 2. Variation in total terpenes content in non-attacked kale, kale after insect's attack and after mechanical damage. Values show areas mean ± SE of three experiments.

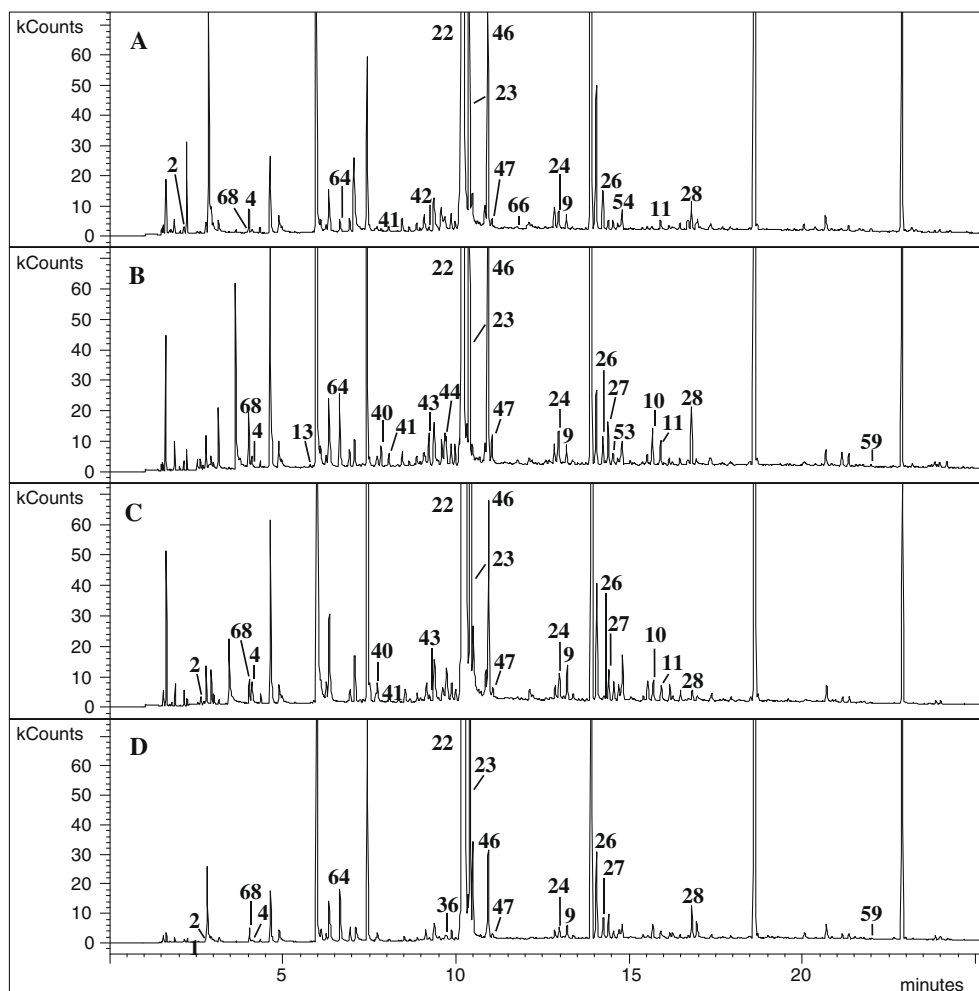


Fig. 1. Chromatographic profile of HS-SPME combined with GC/IT-MS using divinylbenzene/PDMS fibre. Non-attacked kale (A), kale after 4 h (B) and after 24 h of insect's attack (C) and kale after mechanical damage (D). Identity of compounds as in Table 1.

Table 2
Average content (standard deviation), in percentage, of aldehydes identified in kale before and after herbivory attack, kale mechanically damaged and *Pieris brassicae* 1 h after feeding and after 6 h starvation and insect–plant complex.

Compound	RI ^a (min)	QI ^b (m/z)	RA ^c (% ±SD)	Kale after herbivory attack					Kale mechanically damage	Insect–plant complex	Insect 1 h after feeding	Insect after a 6 h starvation
				Non-attacked Kale	1 h	4 h	8 h	12 h	24 h			
12 Hexanal ^{d,e}	914	56/57/67/72	nd	nd	0.110 (0.008)	0.348 (0.013)	0.061 (0.004)	0.083 (0.008)	0.168 (0.009)	nd	1.083 (0.036)	0.927 (0.008)
13 (E)-2-Hexenal ^{d,e}	958	41/55/69/83	nd	nd	0.011 (0.000)	0.043 (0.002)	nd	nd	nd	0.041 (0.002)	8.455 (0.525)	2.052 (0.044)
14 Heptanal ^e	1014	55/57/70	nd	nd	0.013 (0.001)	0.021 (0.000)	nd	nd	nd	nd	nd	0.310 (0.021)
15 Octanal ^{d,e}	1116	43/56/69/84	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.854 (0.007)
16 Phenylacetaldehyde ^{d,e}	1159	91/120	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.033 (0.003)	6.068 (0.608)	3.431 (0.142)
17 (E)-2-Octenal ^{d,e}	1172	41/55/70/83	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.266 (0.026)
18 (E)-2-Nonenal ^{d,e}	1272	43/55/70/83	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.233 (0.017)

^a RI = retention indices as determined on HP-5 capillary column using the homologous series of *n*-alkanes.^b QI = quantification ions.^c RA = relative area in percentage ± standard deviation.^d Identified by comparison with reference compound.^e Tentatively identified by NIST05; nd = not detected.

built MS spectral database, collected from chromatographic runs of pure compounds performed with the same equipment and under the same conditions. Peaks' areas were determined by re-constructed full scan chromatogram using some specific ions for each compound (quantification ions, see Table 1). By this way some peaks which were co-eluting in full scan mode (resolution value lower than 1) could be integrated with resolution value higher than 1.

The relative areas (RAs) of individual components are expressed as percentage of identified compounds.

3. Results and discussion

3.1. In vivo headspace solid-phase microextraction (HS-SPME)

For the optimisation of the sampling process, several conditions were tested. Initially, one larva was placed in a 15-ml vial at 60 °C for 1 h in contact with the fibre. However, these conditions resulted in the insect's death. The next experiment involved the same time of contact with the fibre, but was performed at 40 °C. Under these conditions the death of the insects also occurred.

The following analysis involved the contact of the insect with the fibre at 40 °C for 40 min, and the analysed specimen survived the complete procedure. All tests involved magnetic stirring at 40 rpm. This value was chosen as a way to minimise the insect's stress, which could interfere with subsequent results.

In all assays, permanent monitoring by the operator was required, as a way to control the integrity of the insect and of the fibre, as sometimes the insect would attack the fibre. When the physical integrity of the analysed specimen was at risk, stirring was turned off for a brief period.

3.2. Effect of *P. brassicae* predation on the volatile profile of kale

Several chemical classes of compounds could be found in kale, prior to and after the insect's attack. Herbivore attack changed the qualitative and quantitative profile of volatile compounds emitted (Tables 1–8, Fig. 1).

The compounds detected included alcohols (1–11), aldehydes (12–18), esters (19–32), ketones (33–35), norisoprenoids (36–39),

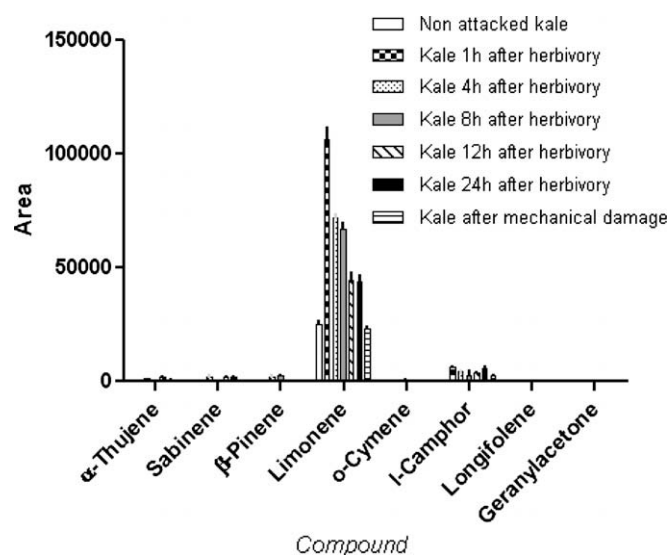


Fig. 3. Variation of terpenes content in non-attacked kale, kale after insect's attack and after mechanical damage. Values show areas mean ± SE of three experiments.

Table 3
Average content (standard deviation), in percentage, of esters identified in kale before and after herbivory attack, kale mechanically damaged and *Pieris brassicae* 1 h after feeding and insect–plant complex.

Compound	RI ^a (min)	QI ^b (m/z)	RA ^c (% ±SD)		Kale after herbivory attack					Kale mechanically damage	Insect–plant complex	Insect 1 h after feeding	Insect after a 6 h starvation
			Non-attacked Kale	Kale after herbivory attack									
					1 h	4 h	8 h	12 h	24 h				
19 Acetic acid, butyl ester ^e	925	43/56/73	nd	0.054 (0.004)	0.080 (0.000)	nd	nd	nd	nd	0.084 (0.007)	nd	0.672 (0.056)	
20 Acetic acid, pentyl ester ^e	1022	43/55/61/70	nd	nd	0.208 (0.020)	0.202 (0.013)	0.109 (0.004)	0.334 (0.008)	nd	nd	nd	nd	
21 4-Penten-1-yl acetate ^e	1029	43/67/68	0.325 (0.020)	0.827 (0.056)	0.469 (0.025)	0.197 (0.021)	0.378 (0.031)	0.408 (0.033)	0.266 (0.003)	0.854 (0.012)	nd	nd	
22 (Z)-3-Hexenyl acetate ^{d,e}	1119	43/55/67/82	92.708 (7.887)	90.156 (5.907)	70.943 (7.365)	82.890 (7.353)	87.612 (8.431)	78.259 (7.222)	88.359 (5.826)	82.483 (1.364)	nd	nd	
23 Acetic acid, hexyl ester ^{d,e}	1123	43/56/61/84	2.421 (0.172)	3.162 (0.231)	17.249 (0.127)	10.036 (0.140)	8.338 (0.710)	14.190 (1.336)	5.800 (0.356)	8.556 (0.591)	nd	nd	
24 Propanoic acid, 4-hexen-1-yl ester ^e	1206	57/67/82	0.266 (0.018)	0.251 (0.011)	0.882 (0.064)	0.244 (0.024)	0.130 (0.008)	0.572 (0.048)	0.194 (0.008)	nd	nd	nd	
25 Acetic acid, heptyl ester ^e	1220	43/56/61/70	nd	0.055 (0.004)	0.102 (0.005)	0.051 (0.005)	0.030 (0.001)	0.120 (0.003)	0.024 (0.002)	0.057 (0.003)	nd	nd	
26 Butanoic acid,4-hexen-1-yl ester ^e	1252	67/71/82	0.625 (0.046)	0.147 (0.005)	0.380 (0.032)	0.456 (0.038)	0.070 (0.005)	0.064 (0.005)	0.817 (0.079)	0.825 (0.069)	nd	nd	
27 Acetic acid, 2-ethylhexyl ester ^e	1257	43/55/57/70	nd	0.210 (0.018)	0.785 (0.074)	0.202 (0.019)	0.106 (0.001)	0.292 (0.025)	0.323 (0.025)	0.431 (0.040)	nd	0.747 (0.049)	
28 Pentanoic acid, 4-hexen-1-yl ester ^e	1322	57/67/82	0.328 (0.028)	0.224 (0.023)	0.571 (0.055)	0.478 (0.023)	0.112 (0.004)	0.206 (0.013)	1.346 (0.123)	2.064 (0.130)	nd	nd	
29 (Z)-Valeric acid, 3-hexenyl ester ^e	1377	57/67/82/85	0.090 (0.009)	0.117 (0.012)	nd	0.075 (0.002)	0.060 (0.001)	0.085 (0.005)	0.360 (0.036)	0.367 (0.011)	nd	nd	
30 (Z)-Hexanoic acid, 3-hexenyl ester ^e	1380	67/82/99	0.031 (0.002)	0.021 (0.002)	0.039 (0.001)	nd	0.035 (0.001)	0.018 (0.001)	0.019 (0.000)	0.032 (0.001)	nd	nd	
31 Methylidihydrojasmonate ^{d,e}	1663	83/153	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.196 (0.016)	
32 Hexadecanoic acid methyl ester ^{d,e}	1937	74/87/143/270	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.480 (0.031)	0.113 (0.006)	

^a RI = retention indices as determined on HP-5 capillary column using the homologous series of *n*-alkanes.

^b QI = quantification ions.

^c RA = relative area in percentage ± standard deviation.

^d Identified by comparison with reference compound.

^e Tentatively identified by NIST05; nd = not detected.

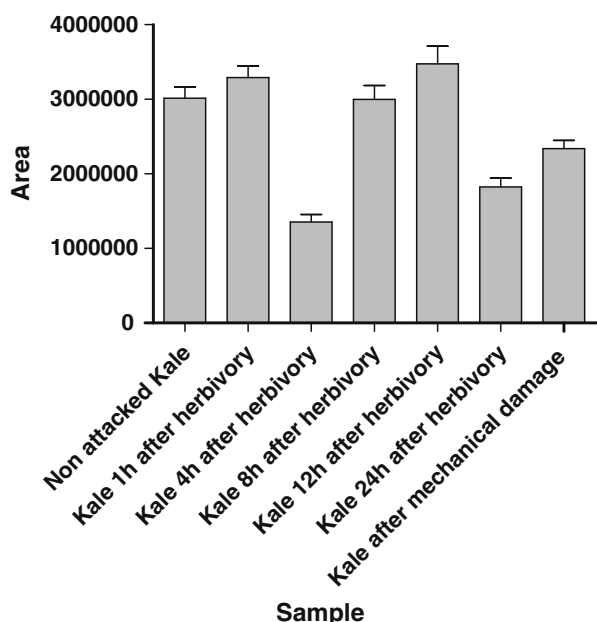


Fig. 4. Variation in (Z)-3-hexenyl acetate content in non-attacked kale, kale after insect's attack and after mechanical damage. Values show areas mean $\pm$ SE of three experiments.

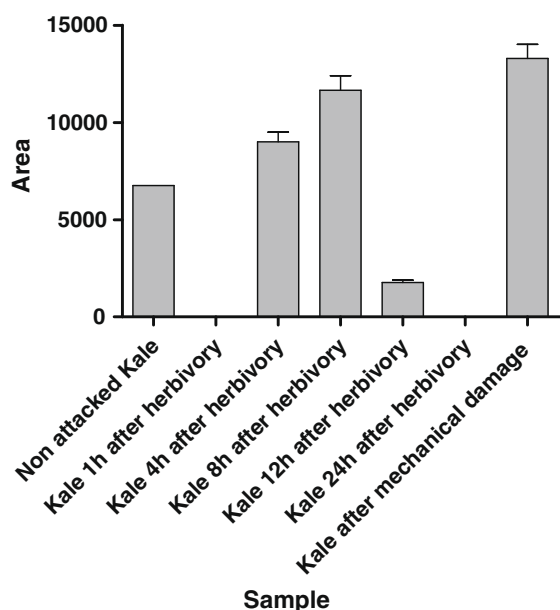


Fig. 5. Variation in allyl isothiocyanate in non-attacked kale, kale after insect's attack and after mechanical damage. Values show mean areas $\pm$ SE of three experiments.

terpenes (40–60) (monoterpenes and sesquiterpenes), sulphur-containing compounds (61–66), among others (Tables 1–7).

With the exception of aldehydes, all the referred classes of compounds were found before and after the insect's attack; however, some compounds of each class could be detected only after insect feeding, mainly terpenes. Compounds such as α -thujene (40), sabinene (43), β -pinene (44), *psi*-cumene (45), *m*-cymene (48), *o*-cymene (49), *p*-cymene (50), *l*-camphor (53), longifolene (58) and geranylacetone (60) are examples of such compounds (Fig. 1 and Table 6).

Terpenes were the class most affected by predation (Tables 6 and 8). After 1 h of insect attack, the amount of kale terpenes' amount had increased by over 315%. Although there was a ten-

dency for this quantity to decrease through time (Fig. 2), after 24 h their amounts were still ca. 90% higher than those prior to the attack. After 1 h, alcohols had decreased by about 30% and aldehydes, that were absent in non-attacked leaves, appeared, with hexanal (12), (*E*)-2-hexenal (13) and heptanal (14) being detected. Hexanal (12) was the only aldehyde that could be detected in kale after 24-h predation (Table 2).

A pattern in the time of appearance of the compounds could be noticed. Among the 10 terpenoids that could be found exclusively after insect predation, five were only detected 4 h after the attack, being absent 1 h after herbivory (Fig. 3 and Table 6). On the other hand, three ester compounds acetic acid, butyl ester (19); acetic acid, heptyl ester (25); acetic acid 2-ethylhexyl ester (27) were absent before the attack, but were found immediately 1 h after predation (Table 3). These results strongly suggest that the synthesis of terpenes occurs *de novo*, while the referred esters are probably accumulated in the leaves and released after predation. Further data support this hypothesis; if a compound is accumulated in leaves, it would be expected that its release would occur both by insect predation or mechanical damage. In fact, we conducted an experiment in which leaves of kale were mechanically damaged and the above referred esters were identified. However, terpenes, such as α - and β -thujene (40 and 42, respectively), sabinene (43) or β -pinene (44) were absent, which is in line with the hypothesis of their *de novo* synthesis.

In all experiments, esters were the main class of compounds, always accounting for more than 90% of the volatiles. In fact, this value results from the contribution of one single compound, (Z)-3-hexenyl acetate (22), which, alone, accounted for 70–92% of the identified compounds in the different experiments. Although high amounts of this compound have been reported (Geervliet, Posthumus, Vet, & Dicke, 1997), to the best of our knowledge this is the first time that such a high proportion of (Z)-3-hexenyl acetate (22) has been found. This compound has been extensively described in literature as being crucial in shaping insect–plant interactions (Mattiacci et al., 2001; Paré & Tumlinson, 1999). In this study, the amounts of (Z)-3-hexenyl acetate (22) suffered an increase of ca. 10% 1 h after insect's attack. Analysis 12 h after the attack revealed an increase by some 15% (Fig. 4). Interestingly, if the damage to the leaf was caused mechanically, instead of an increase in (Z)-3-hexenyl acetate its quantities compared with basal emissions would diminish by ca. 25% (Fig. 4). This result, as well as the absence of the alcohol (Z)-3-hexen-1-ol (6), had already been described in a similar study involving one plant from the same species, although from a different cultivar, *B. oleracea* var. *gemnifera* (Mattiacci et al., 2001). These authors describe the absence of β -caryophyllene (59) in mechanically damaged leaves, but in our study this compound was found in leaves that were mechanically damaged, albeit in much lower quantities than those registered after insect feeding (Table 6). Moreover, β -caryophyllene was not detected in the headspace of other *B. oleracea* varieties, such as white cabbage (*B. oleracea capitata* L. var. *alba* cv. Langedijker de Waar) and red cabbage (*B. oleracea capitata* L. var. *rubra* (DC) (Geervliet et al., 1997)).

Regardless of the differences between volatiles emitted after predation and those that result from mechanical damage, it can be said that in both situations the chemicals released are similar, albeit different from a quantitative point of view. Regarding the volatile blends emitted by plants when challenged by insect predation or mechanical damage, two kinds of plant groups exist: one, in which the compounds released in the two situations are completely different and a second, in which the volatiles released share chemical similarities. Examples of the first are corn (Turlings, Tumlinson, & Lewis, 1990) and lima beans (Dicke et al., 1990), in which terpenoids are found as a response to herbivory but not to mechanical damage. In the second case, cabbage is an example

(Geervliet et al., 1997) as only subtle qualitative differences were found. The results described herein are in line with those of other cabbages, from which kale is taxonomically very close.

The vegetable species used in these experiments, kale, contains glucosinolates (a group of amino acid-derived thioglucosides), which can be found through most cruciferous vegetables. These secondary metabolites are the precursors of volatile isothiocyanates and are involved in defence against predation, as isothiocyanates are toxic upon ingestion, contact, or when present in the gas phase (Agrawal & Kurashige, 2003).

This defence system consists of glucosinolates and myrosinases, which are thioglucoside glucosylhydrolases that hydrolyse the thioglucosidic bond of the glucosinolates, yielding glucose and an unstable aglycone. Spontaneous rearrangement of the aglycone then leads to the formation of an isothiocyanate (Mumm et al., 2008). In this study, allyl isothiocyanate (**64**) was detected in small amounts in plants that had not been attacked by insects or mechanically damaged (Table 7 and Fig. 5). Given the fact that, in intact plant tissue, glucosinolate hydrolysis is prevented by spatial separation of myrosinases and glucosinolates by storage in different cells (Andréasson & Jørgensen, 2003), the presence of allyl isothiocyanate (**64**) in non-attacked leaves must mean that some kind of damage has been delivered to the leaf. In fact, the volatile analysis was not performed in the plant as a whole, as leaves were gently removed from the plant and analysed. After 1-h predation, this compound was not noticed in kale, a fact that we cannot yet fully understand, with further studies being needed. As expected, the amounts of this compound rose in the sequence of insect predation, having increased by over 70%. As ex-

pected, the amounts of allyl isothiocyanate in the leaves of the mechanically damaged plant were far higher than the basal values, over 96% (Table 7). Overall, increase in allyl isothiocyanate was much higher in mechanically damaged leaves than those that suffered insect attack (Fig. 5). As the mechanism involved in this compound's release is strictly a consequence of tissue damage, it is understandable that our provoked damage occurs to a higher extent than that from insect's chewing.

Methylthiocyanate (**62**) was detected in the samples of herbivore-infested kale, while it was absent in infested red and white cabbages (Geervliet et al., 1997). However, this compound has already been found in infested leaves of nasturtium (*Tropaeolum majus* cv. Mahogany), another species containing glucosinolates (Geervliet et al., 1997).

One of the most interesting findings about volatiles emission after herbivory in kale is its distinct differences in the release mechanism when compared with a plant from the same species but different cultivar, *B. oleracea* var. *gemnifera* (Mattiacci et al., 2001). Although the compounds emitted are related, in *B. oleracea* var. *gemnifera* the compounds induced by insect feeding could be detected only after mechanical damage, as otherwise they would remain trapped inside leaves. In our study, however, such compounds could be detected simply by insect feeding, mechanical damage of leaves was not necessary. In fact, *B. oleracea* var. *gemnifera* seems to be an exception, as volatile emissions in other species such as lima bean (Dicke et al., 1990), cotton (Röse, Manukian, Heath, & Tumlinson, 1996) or corn (Turlings & Tumlinson, 1992) follow the same process as in *B. oleracea* var. *acephala*.

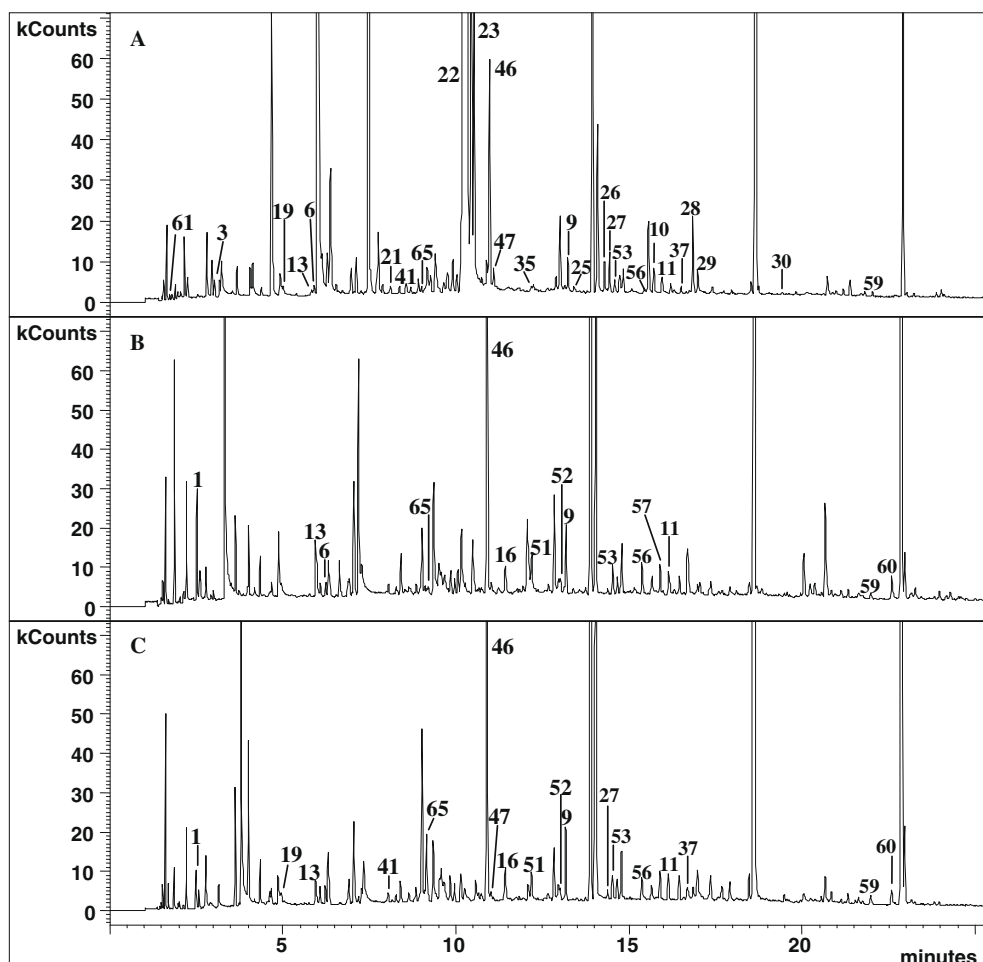


Table 4Average content (standard deviation), in percentage, of ketones identified in kale before and after herbivory attack, kale mechanically damaged and *Pieris brassicae* 1 h after feeding and after 6 h starvation and insect–plant complex.

Compound	R ^I (min)	Q ^I ^b (m/z)	RA ^c (% ±SD) Non-attacked Kale	Kale after herbivory attack					Kale mechanically damage	Insect–plant complex	Insect 1 h after feeding	Insect after a 6 h starvation
				Kale after herbivory attack								
				1 h	4 h	8 h	12 h	24 h				
33 3-Pentanone ^d	806	57/86	0.169 (0.015)	nd	0.280 (0.027)	0.264 (0.023)	0.175 (0.007)	0.387 (0.030)	nd	nd	nd	nd
34 3,5-Dimethyl-2-octanone ^d	861	43/57/72	0.020 (0.000)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
35 α,α-Dihydroxyacetophenone ^d	1179	77/105	nd	0.132 (0.006)	0.206 (0.014)	0.099 (0.009)	0.034 (0.002)	0.137 (0.010)	nd	0.184 (0.013)	nd	nd

^a RI = retention indices as determined on HP-5 capillary column using the homologous series of *n*-alkanes.^b QI = quantification ions.^c RA = relative area in percentage ± standard deviation.^d Tentatively identified by NIST05; nd = not detected.**Table 5**Average content (standard deviation), in percentage, of nonisoprenoids identified in kale before and after herbivory attack, kale mechanically damaged and *Pieris brassicae* 1 h after feeding and after 6 h starvation and insect–plant complex.

Compound	RI ^a (min)	QI ^b (m/z)	RA ^c (% ±SD)	Kale after herbivory attack					Kale mechanically damage	Insect–plant complex	Insect 1 h after feeding	Insect after a 6 h starvation
				Non-attacked Kale								
				1 h	4 h	8 h	12 h	24 h				
36	1096	43/55/69/108	nd	0.136 (0.013)	0.101 (0.008)	0.033 (0.003)	0.023 (0.001)	0.029 (0.001)	0.017 (0.001)	0.029 (0.003)	0.657 (0.051)	0.452 (0.042)
6-Methyl-5-heptene-2-one ^{d,e}												
37	1320	109137/152	0.004 (0.000)	nd	nd	nd	0.013 (0.000)	0.027 (0.002)	0.016 (0.001)	0.018 (0.000)	nd	0.206 (0.003)
β-Cyclocitral ^{d,e}												
38	1494	177	0.003 (0.000)	nd	nd	nd	nd	nd	0.003 (0.001)	0.010 (0.012)	nd	nd
β-Ionone ^{d,e}												
39	1676	57/149/191	0.008 (0.001)	0.018 (0.001)	0.024 (0.001)	0.010 (0.001)	nd	nd	0.025 (0.001)	0.004 (0.000)	0.198 (0.007)	nd
β-Methylionone ^e												

^a RI = retention indices as determined on HP-5 capillary column using the homologous series of *n*-alkanes.^b QI = quantification ions.^c RA = relative area in percentage ± standard deviation.^d Identified by comparison with reference compound.^e Tentatively identified by NIST05; nd = not detected.

Table 6
Average content (standard deviation), in percentage, of terpenes identified in kale before and after herbivory attack, kale mechanically damaged and *Pieris brassicae* 1 h after feeding and after 6 h starvation and insect–plant complex.

Compound	RI ^a (min)	QI ^b (m/z)	RA ^c (% ±SD)	Kale after herbivory attack					Kale mechanically damage	Insect–plant complex	Insect 1 h after feeding	Insect after a 6 h starvation
				1 h	4 h	8 h	12 h	24 h				
40 α -Thujene ^e	1036	77/91/93	nd	nd	0.053 (0.001)	0.013 (0.001)	0.051 (0.004)	0.022 (0.002)	nd	nd	nd	nd
41 α -Pinene ^{d,e}	1047	77/93	0.015 (0.001)	0.043 (0.001)	0.069 (0.005)	0.035 (0.003)	0.060 (0.008)	0.066 (0.005)	0.013 (0.001)	0.056 (0.003)	nd	0.716 (0.042)
42 β -Thujene ^e	1076	77/91/93	0.020 (0.001)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.165 (0.002)	nd	0.682 (0.068)
43 Sabinene ^e	1082	77/91/94	nd	nd	0.147 (0.008)	0.043 (0.003)	0.043 (0.003)	0.070 (0.005)	nd	nd	nd	nd
44 β -Pinene ^{d,e}	1099	69/93	nd	nd	0.148 (0.003)	0.068 (0.006)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
45 ψ -Cymene ^e	1102	105/120	nd	nd	nd	nd	0.086 (0.009)	nd	nd	nd	nd	nd
46 Limonene ^{d,e}	1137	68/93	0.769 (0.067)	2.904 (0.204)	3.764 (0.088)	1.851 (0.109)	1.125 (0.112)	1.878 (0.166)	0.877 (0.039)	2.321 (0.128)	3.638 (0.236)	38.904 (2.927)
47 Eucalyptol ^{d,e}	1145	81/93/108	0.045 (0.003)	0.212 (0.019)	0.109 (0.012)	0.079 (0.001)	0.073 (0.006)	0.077 (0.007)	0.025 (0.002)	0.185 (0.002)	0.858 (0.031)	0.524 (0.050)
48 <i>m</i> -Cymene ^e	1185	91/119/134	nd	nd	nd	nd	0.005 (0.000)	nd	0.005 (0.000)	0.011 (0.001)	nd	nd
49 <i>o</i> -Cymene ^{d,e}	1190	91/119/134	nd	nd	0.024 (0.002)	0.012 (0.001)	0.008 (0.000)	nd	0.009 (0.000)	0.019 (0.001)	nd	nd
50 <i>p</i> -Cymene ^e	1193	91/119/134	nd	nd	nd	nd	0.011 (0.001)	nd	0.012 (0.001)	0.028 (0.001)	nd	nd
51 <i>cis</i> -Linalool oxide ^e	1196	59/68/94/111	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.643 (0.029)	0.176 (0.002)
52 Linalool ^{d,e}	1208	55/71/93/121	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.002 (0.096)	0.704 (0.025)
53 <i>l</i> -Camphor ^e	1261	69/81/95/108	nd	0.173 (0.013)	0.216 (0.005)	0.116 (0.009)	0.096 (0.007)	0.252 (0.025)	0.097 (0.003)	0.204 (0.020)	5.996 (0.461)	3.355 (0.154)
54 <i>p</i> -Menthone ^e	1268	55/69/112	0.015 (0.001)	0.021 (0.001)	0.057 (0.003)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
55 Isomenthone ^e	1277	55/69/112	0.008 (0.000)	nd	nd	0.015 (0.001)	0.007 (0.000)	0.019 (0.001)	0.006 (0.001)	0.016 (0.001)	nd	nd
56 <i>l</i> -(-)-Menthol ^{d,e}	1289	55/71/85/138	0.030 (0.002)	0.034 (0.003)	0.030 (0.002)	0.025 (0.001)	0.007 (0.000)	0.040 (0.002)	0.043 (0.004)	0.054 (0.003)	4.991 (0.383)	1.188 (0.100)
57 Terpineol ^{d,e}	1303	59/93/121/136	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.730	nd
58 Longifolene ^e	1425	94/107/161/204	nd	nd	0.018 (0.001)	0.008 (0.001)	0.005 (0.000)	0.012 (0.001)	0.009 (0.001)	0.021 (0.001)	0.094 (0.006)	0.128 (0.008)
59 β -Caryophyllene ^e	1434	79/91/93/133	0.025 (0.002)	0.014 (0.001)	0.014 (0.000)	0.009 (0.009)	0.003 (0.000)	nd	0.007 (0.000)	0.023 (0.001)	0.885 (0.062)	0.357 (0.015)
60 Geranylacetone ^{d,e}	1459	43/69	nd	0.024 (0.001)	nd	0.005 (0.000)	0.004 (0.000)	nd	nd	nd	3.085 (0.147)	0.843 (0.017)

^a RI = retention indices as determined on HP-5 capillary column using the homologous series of *n*-alkanes.

^b QI = quantification ions.

^c RA = relative area in percentage ± standard deviation.

^d Identified by comparison with reference compound.

^e Tentatively identified by NIST05; nd = not detected.

Table 7
Average content (standard deviation), in percentage, of sulphur, nitrogen and miscellaneous compounds identified in kale before and after herbivory attack, kale mechanically damaged and *Pieris brassicae* 1 h after feeding and after 6 h starvation and insect–plant complex.

Compound	R ^a	Q ^b (m/z)	RA ^c (% ±SD) Non-attacked Kale	Kale after herbivory attack				Kale mechanically damage	Insect–plant complex	Insect 1 h after feeding	Insect after a 6 h starvation
				1 h	4 h	8 h	12 h	24 h			
Sulphur compounds											
61 Dimethyl sulfide ^e	337	47/62	0.007 (0.000)	nd	nd	nd	nd	nd	0.052 (0.005)	0.568 (0.036)	1.257 (0.062)
62 Methylthiocyanate ^e	818	45/72/73	0.200 (0.018)	nd	nd	0.169 (0.015)	0.130 (0.013)	0.083 (0.006)	nd	nd	nd
63 Dimethyl disulfide ^{d,e}	854	45/79/94	0.028 (0.000)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	12.622 (1.229)	9.935 (0.452)
64 Allyl isothiocyanate ^{d,e}	997	41/72/99	0.208 (0.000)	nd	0.472 (0.037)	0.322 (0.029)	0.045 (0.004)	nd	nd	nd	0.177 (0.002)
65 Dimethyl trisulfide ^{d,e}	1093	45/79/126	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.029 (0.003)	0.521 (0.048)	10.183 (0.716)
66 2-Methylbutyl isothiocyanate ^e	1169	57/72/129	0.005 (0.000)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Nitrogen compounds											
67 2-Butenenitrile ^e	762	41/67	0.215 (0.020)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Miscellaneous compounds											
68 Toluene ^e	881	91/92	0.149 (0.013)	nd	0.825 (0.067)	0.298 (0.029)	0.183 (0.014)	0.453 (0.029)	nd	20.655 (1.744)	11.483 (1.043)
69 Phenol ^c	1099	66/94	nd	0.231 (0.001)	nd	0.412 (0.038)	nd	0.061 (0.005)	nd	nd	nd
70 Eugenol ^{d,e}	1386	77/131/164	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.773 (0.040)

^a RI = retention indices as determined on HP-5 capillary column using the homologous series of *n*-alkanes.

^b QI = quantification ions.

^c RA = relative area in percentage ± standard deviation.

^d Identified by comparison with reference compound.

^e Tentatively identified by NIST05; nd = not detected.

Table 8
Total content (standard deviation), in percentage, of the several volatile compounds' classes identified in kale before and after herbivory attack, kale mechanically damaged and *Pieris brassicae* 1 h after feeding and after 6 h starvation and insect–plant complex.

Compounds	RA ^a (% ±SD)	Kale after herbivory attack					Kale mechanically damage	Insect–plant complex	Insect 1 h after feeding	Insect after a 6 h starvation
		Kale after herbivory attack								
		1 h	4 h	8 h	12 h	24 h				
Total compounds identified	35	32	38	38	41	35	32	36	26	33
Alcohols (%)	7 (1.151)	6 (0.703)	6 (1.316)	7 (0.887)	7 (0.531)	7 (1.422)	5 (0.589)	5 (0.744)	6 (24.800)	3 (8.157)
Aldehydes (%)	0	3	3	1	1	1	0	2	3	7
Esters (%)	8 (96.794)	11 (0.134)	11 (0.412)	10 (0.061)	11 (0.083)	11 (0.168)	10 (0.074)	10 (0.074)	1 (15.607)	4 (8.073)
Ketones (%)	2 (0.189)	1 (95.224)	2 (91.708)	2 (94.831)	2 (96.980)	2 (94.548)	0 (97.508)	1 (95.753)	0 (0.480)	0 (1.728)
Notisoprenoids derivatives (%)	3 (0.015)	2 (0.132)	2 (0.486)	2 (0.363)	2 (0.209)	2 (0.524)	4 (0.061)	4 (0.184)	2 (0.855)	2 (0.658)
Terpenes (%)	8 (0.927)	8 (3.425)	12 (4.649)	12 (2.236)	15 (1.584)	9 (2.436)	11 (1.103)	12 (3.103)	10 (23.891)	11 (47.307)
Sulphur compounds (%)	5 (0.448)	0	1 (0.472)	2 (0.491)	2 (0.175)	1 (0.083)	1 (0.503)	2 (0.081)	3 (13.712)	4 (21.552)
Nitrogen compounds (%)	1 (0.215)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Miscellaneous compounds (%)	1 (0.149)	1 (0.231)	1 (0.825)	2 (0.710)	1 (0.183)	2 (0.514)	1 (0.236)	0	1 (20.655)	2 (12.256)

^a RA = relative area in percentage ± standard deviation.

3.3. Volatiles profile of the insect–plant complex

Kale–insect complex was directly analysed by HS-SPME and GC–MS (Fig. 6). Generally, the compounds from all classes suffered a dramatic increase during insect predation when compared with the results obtained for kale 1, 4, 8, 12 and 24 h after attack (Tables 1–8). Few studies address the question of the analysis of the combined insect–plant complex; however, such increase in all compounds has been previously reported in a plant taxonomically close to kale, *B. oleracea* var. *gemnifera* (Mattiacci et al., 2001). The higher contents may be a consequence of the immediate response of kale to insect's attack.

Even so, the information provided by this kind of analysis is somewhat limited, as it is not possible to differentiate which compounds are released by kale's leaves or the insect. No compounds were detected that had not been also identified in attacked leaves.

3.4. Volatiles emitted by *P. brassicae*

To the best of our knowledge, this is the first study aiming to determine the profile of volatile compounds of a living isolated insect, *P. brassicae*.

Two kinds of assays were conducted in order to study the fate of volatiles in the insect through time, one in the insect 1 h after feeding and another after a 6-h starvation period subsequent to feeding. As expected, many of the volatiles found after 1 h had already been found in kale and probably resulted from the ongoing digestion process occurring in *P. brassicae* (Fig. 6).

Predictably, many of the compounds found in the insect after 1 h were absent in the analysis conducted after 6 h (Tables 1–8). However, some exceptions were noticed. Limonene (**46**) was a compound whose amount was extremely high after a 6 h starvation, over five times its amounts in leaves (Table 6). Given the fact that by this time digestion was already over, such contents can only be due to accumulation by the insect. The accumulation described herein must constitute a mechanism by which the insect takes benefit from bioactive constituents from the diet. In fact, the insecticidal activity of limonene has been described (Hebeish, Moustafa, Hamdy, EL-Sawy, & Abdel-Mohdy, 2008), and it is possible that *P. brassicae* accumulates this compound for its own defence, as the sequestration of terpenoids for defence purposes is known (Nishida, 2002). Moreover, this terpenoid has already been implicated as a sex pheromone in the cerambycid beetle *Megacyl-lene caryae*, and the same function in *P. brassicae* should be considered (Lacey, Moreira, Millar, & Hanks, 2008).

Even more surprising is the presence of eugenol (**70**) (Table 7), a phenylpropanoid that was not detected in kale. This result can have two explanations. This compound may exist in the plant in very low amounts, below the limit of detection of the instrumental techniques used. However, this is unlikely to happen, as GC/IT-MS is a very sensitive technique, and a bioconcentration process of several thousand folds would be necessary. The second hypothesis is that eugenol is formed from other compounds present in kale, by a process of metabolism by the insect. However, in kale, the only slightly related compounds would be phenol and toluene, which are also aromatic compounds. Even so, eugenol (**70**) synthesis from these compounds would involve many reaction steps, and therefore seems unlikely to happen *in vivo*.

Allyl isothiocyanate (**64**) was a compound also found in the insect after a 6-h starvation period, albeit in low amounts (Table 7). This was an expected result as these compounds are toxic to insects and, therefore, a detoxification process probably took place. This detoxification process is not common to all insects, as only some species have co-evolved together with its host plant, allowing them to feed on the very compounds that the plant synthesises to serve as herbivore deterrents (Mello & Silva-Filho, 2002), which

is the case of glucosinolates and *P. brassicae*, a specialist in crucifers. In some cases, high levels of adaptation by the insect can result in sequestering deterrent compounds from the plant for its own use against predators, turning the insect less attractive (Mello & Silva-Filho, 2002).

We also noticed that, from the wide range of esters detected in kale before and after insect predation, very few were found in *P. brassicae*. Concerning ketones, none were found in *P. brassicae*, although they existed in kale leaves. An opposite phenomenon was registered with aldehydes, as non-attacked kale displayed none of these compound and several were found in insect after 6 h starvation, but not 1 h after feeding. Therefore, it is possible that aldehydes constitute markers for starvation stress in *P. brassicae*. The same possibility could be stated for eugenol.

In conclusion, compounds emitted by insect-damaged leaves share remarkable chemical similarities, as was carefully described by Mattiacci et al. (2001).

Such structural resemblance displayed by a wide range of species could indicate that a common group of biosynthetic pathways are triggered (Paré & Tumlinson, 1999). According to Paré and Tumlinson (1996) volatiles released as a result of herbivory can be divided between lipoxygenase by-products, isoprenoid-derived terpenoids, and shikimic acid-derived aromatics.

The production of induced terpenoids is regulated by two pathways, one of which is mevalonate-dependent and the other is mevalonate-independent, also named as the deoxyxylulose pathway. The deoxyxylulose pathway appears to be important in the release of inducible monoterpenes after elicitation with jasmonic acid, which has a similar effect to herbivore infestation (Dicke, Gols, Ludeking, & Posthumus, 1998). Contrarily, constitutive compounds are synthesised through the mevalonate-dependent pathway.

Taking into account this division, in the current work no shikimic acid pathway derivatives were found. Even with *B. oleracea* var. *gemnifera*, only trace amounts of this class of compounds could be found (Mattiacci, Dicke, & Posthumus, 1994; Mattiacci et al., 2001).

This leads to the hypothesis that plants might use a defensive strategy that is more complex than a shared set of biosynthetic pathways within a plant family. In fact, specific pathways and/or limited biosynthetic capabilities within different species or different cultivars may explain the amazing variability of different plants when facing herbivory challenge.

Also, some biological processes in *P. brassicae* were described, such as limonene (46) accumulation, which was verified for other compounds, like *l*-camphor (53) or *L*-(–)-menthol (56). With this, terpenoids sequestering and accumulation was proved.

Some questions remain open, such as the origin of eugenol in the insect, as this compound was absent in kale and related compounds that could originate eugenol by a biotransformation process were not found.

With this work, further knowledge concerning the specialist *P. brassicae* and its interactions with one of its host plants was provided, which can be important in pest management, chemical ecology and entomology.

Acknowledgements

To Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) for financial support (PTDC/AGR-AAM/64150/2006). F. Fernandes (SFRH/BD/37963/2007) and D.M. Pereira (BI) are grateful to FCT for their grants.

References

- Agrawal, A. A., & Kurashige, N. S. (2003). A role for isothiocyanates in plant resistance against the specialist herbivore *Pieris rapae*. *Journal of Chemical Ecology*, 29, 1403–1415.
- Andréasson, E., & Jørgensen, L. B. (2003). Localization of plant myrosinases and glucosinolates. In J. T. Romeo (Ed.), *Integrative phytochemistry: From ethnobotany to molecular ecology* (pp. 79–99). Amsterdam, The Netherlands: Pergamon.
- Bukovinsky, T., Gols, R., Posthumus, M. A., Vet, L. E. M., & Van Lenteren, J. C. (2005). Variation in plant volatiles and attraction of the parasitoid *Diadegma semiclausum* (Hellen). *Journal of Chemical Ecology*, 31, 461–480.
- D'Auria, J. C., Pichersky, E., Schaub, A., Hansel, A., & Gershenzon, J. (2007). Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (Z)-3-hexen-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 49, 194–207.
- Dicke, M., Gols, R., Ludeking, D., & Posthumus, M. A. (1998). Jasmonic acid and herbivory differentially induce carnivore-attracting plant volatiles in lima bean plants. *Journal of Chemical Ecology*, 25, 1907–1922.
- Dicke, M., Sabeis, M. W., Takabayashi, J., Bruin, J., & Posthumus, M. A. (1990b). Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: Prospects for application in pest control. *Journal of Chemical Ecology*, 16, 3091–3118.
- Dicke, M. T. A., van Beek, M. A., Posthumus, N., Ben Dom, H., van Bokhoven, & de Groot, A. E. (1990a). Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Journal of Chemical Ecology*, 16, 381–396.
- Du, Y., Poppy, G. M., Powell, W., Pickett, J. A., Wadhams, L. J., & Woodcock, C. M. (1998). Identification of semiochemicals released during aphid feeding that attract parasitoid *Aphidius ervi*. *Journal of Chemical Ecology*, 24, 1355–1368.
- Geervliet, J. B. F., Posthumus, M. A., Vet, L. E. M., & Dicke, M. (1997). Comparative analysis of headspace volatiles from different caterpillar-infested or uninfested food plants of *Pieris* species. *Journal of Chemical Ecology*, 23, 2935–2954.
- Guedes de Pinho, P., Gonçalves, R. F., Valentão, P., Pereira, D. M., P., Seabra, R. M., & Andrade, P. B., et al. (2009). Volatile composition of *Catharantus roseus* (L.) G. Don using solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49, 674–685.
- Guedes de Pinho, P., Ribeiro, B., Gonçalves, R. F., Baptista, P., Valentão, P., Seabra, R. M., et al. (2008). Correlation between the pattern volatiles and the overall aroma of wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1704–1712.
- Guerrieri, E., Poppy, G. M., Powell, W., Tremblay, E., & Pennacchio, F. (1999). Induction and systemic release of herbivore-induced plant volatiles mediating in-flight orientation of *Aphidius ervi*. *Journal of Chemical Ecology*, 25, 1247–1261.
- Hebeish, A., Moustafa, M. G. F., Hamdy, I. A., EL-Sawy, S. M., & Abdel-Mohdy, F. A. (2008). Preparation of durable insect repellent cotton fabric: Limonene as insecticide. *Carbohydrate Polymers*, 74, 268–273.
- Howe, G. A., & Jander, G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 41–66.
- Lacey, E. S., Moreira, J. A., Millar, J. G., & Hanks, L. M. (2008). *Journal of Chemical Ecology*, 34, 408–417.
- Mattiacci, L., Dicke, M., & Posthumus, M. A. (1994). Induction of parasitoid attracting synomone in brussels sprouts plants by feeding of *Pieris brassicae* larvae: Role of mechanical damage and herbivore elicitor. *Journal of Chemical Ecology*, 20, 2229–2247.
- Mattiacci, L., Rocca, B. A., Scacighini, N., D'Alessandro, M., Hern, A., & Dorn, S. (2001). Systemically induced plant volatiles emitted at the time of danger. *Journal of Chemical Ecology*, 27, 2233–2252.
- Meiners, T., & Hilker, M. (2000). Induction of plant synomones by oviposition of a phytophagous insect. *Journal of Chemical Ecology*, 26, 221–232.
- Mello, M. O., & Silva-Filho, M. C. (2002). Plant-insect interactions: An evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14, 71–81.
- Mumm, R., Posthumus, M. A., & Dicke, M. (2008). Significance of terpenoids in induced indirect plant defence against herbivorous arthropods. *Plant, Cell and Environment*, 31, 575–585.
- Nishida, R. (2002). Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, 47, 57–92.
- Paré, P. W., & Tumlinson, J. H. (1996). Induced synthesis of plant volatiles. *The Florida Entomologist*, 79, 93–103.
- Paré, P. W., & Tumlinson, J. H. (1999). Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology*, 121, 325–331.
- Röse, U. S. R., Manukian, A., Heath, R. R., & Tumlinson, J. H. (1996). Volatile semiochemicals released from undamaged cotton leaves (a systemic response of living plants to caterpillar damage). *Plant Physiology*, 111, 487–495.
- Smid, H. M., van Loon, J. J. A., Posthumus, M. A., & Vet, E. M. (2002). GC-EAG-analysis of volatiles from Brussels sprouts plants damaged by two species of *Pieris* caterpillars: Olfactory receptive range of a specialist and a generalist parasitoid wasp species. *Chemoecology*, 12, 169–176.
- Turlings, T. C. J., & Tumlinson, J. H. (1992a). Systemic release of chemical signals by herbivore-injured corn. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 8399–8402.
- Turlings, T. C. J., & Tumlinson, J. H. (1992b). Systemic release of chemical signals by herbivore-injured corn. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 8399–8402.
- Turlings, T. C. J., Tumlinson, J. H., & Lewis, W. J. (1990). Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science*, 250, 1251–1253.
- Vercammen, J., Pham-Tuan, H., & Sandra, P. (2001). Automated dynamic sampling system for the on-line monitoring of biogenic emissions from living organisms. *Journal of Chromatography A*, 930, 39–51.

4.5. Metabolic fate of dietary volatile compounds in *Pieris brassicae*

Microchem. J. 2009, 93, 99–109



Metabolic fate of dietary volatile compounds in *Pieris brassicae*

Fátima Fernandes^a, David M. Pereira^a, Paula Guedes de Pinho^a, Patrícia Valentão^a, José A. Pereira^b, Albino Bento^b, Paula B. Andrade^{a,*}

^a REQUIMTE/Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Porto University, R. Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal

^b CIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta. Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 April 2009

Received in revised form 9 May 2009

Accepted 10 May 2009

Available online 18 May 2009

Keywords:

Pieris brassicae

Excrements

Metabolization

Volatile compounds

HS-SPME

GC/IT-MS

ABSTRACT

In this work, the evolution of the qualitative and quantitative profile of the volatile fraction of *Pieris brassicae* after feeding on *Brassica oleracea* var. *acephala* (kale) was monitored through time. HS-SPME/GC-MS was applied to both the host plant and the living insect and its excrements. A total of seventy seven compounds (lipoxygenase pathway by-products, nitrogen compounds, norisoprenoids, sulphur compounds, terpenes, among others) were identified. Thirty eight compounds were identified in insect after 2 h of starvation and forty eight compounds in excrements. Qualitative and quantitative changes were detected along time. Dimethyldisulfide, dimethyltrisulfide, limonene and eugenol were major compounds for all analysed times in both matrices, being limonene an important compound in insect after starvation. The accumulation by *P. brassicae* of some compounds, such as limonene, was verified, suggesting a mechanism by which the insect can take benefit from bioactive constituents from the diet. Along with accumulation, complete excretion of some compounds, including nitrogen bearing compounds, by-products of glucosinolates was detected. These results reflect one of the strategies used to overcome plant barriers, namely detoxification of toxic compounds. The findings contribute to the knowledge of the metabolization of the volatile compounds in insects and contribute to the body of knowledge of this ecologic system.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The evolution of plants transformed the terrestrial environment into a highly valuable resource for the herbivore community. In natural ecosystems, plants and insects are just some of the living organisms that are dynamic and continuously interacting in a complex way [1]. Insect–plant associations have long been a pivotal subject for many entomologists and biologists, among others, because of their economic importance in agriculture and in ecological systems [2]. On the other hand, depending on the intensity of insect attack, herbivores might be extremely harmful to plants leading them to death [1,3].

Plants developed different mechanisms to reduce insect attack, including specific responses from different metabolic pathways which considerably alter their physiological aspects. On the other hand, as consequence of the co-evolution, insects developed several strategies to overcome plant defense barriers, allowing them to feed, grow and reproduce on their host plants [1,4]. These strategies involve several mechanisms, like the modification of some compounds (such as alkaloids) by salivary glucose oxidase, detoxification of others (glucosinolates) by glutathione S-transferase (GST)s, cytochrome P450s or by glucosinolate sulfatase, formation of nitriles instead of isothiocyanates, glycosylation of flavonoids and phenolic acids by

UDP-glycosyl-transferase, as well as sequestration and full excretion of toxic compounds [5].

Volatiles exert an important role in shaping plant–insect interactions. As a response to the attack of insects, plants are able to release volatile compounds that can either warn the neighbour plants about the presence of a predator or attract insect parasitoids, thus reducing the efficiency of the attack [6–8]. One function that has been well documented is that specialized volatiles act as attractants to pollinators and seed dispersers [9–11], perhaps being even involved in driving co-evolution of both the pollinators and the pollinated [12]. For many species that are unable to self-pollinate, attraction of pollinators is absolutely required for reproduction. Many volatile metabolites, such as methyleugenol, are produced and emitted by flowers to attract pollinating moths.

Crucifers, such as *Brassica oleracea* var. *acephala* (kale), are characterized by the presence of glucosinolates and their volatile by-products (isothiocyanates, thiocyanates, nitriles, epithionitriles and oxazolidines) [13]. These compounds play an important role in host searching behaviour of parasitoid species that forage on host associated with plants of this family [6,14]. However, it was reported that herbivorous insect specialized on glucosinolate-containing plants typically avoid the formation of toxic isothiocyanates by employing specialized detoxifying mechanisms [15–17]. *Pieris brassicae* possesses a nitrile specifier protein (NSP) that enables it to avoid the formation of toxic mustard oils while feeding on host plants containing this

* Corresponding author. Tel.: +351 222078935; fax: +351 222003977.

E-mail address: pandrade@ff.up.pt (P.B. Andrade).

defense system. In the presence of NSP, the formation of toxic mustard oils is replaced by the formation of nitriles that are usually less toxic.

Terpenes, an important group of volatile compounds that are emitted by plants, consist mainly of monoterpenes, sesquiterpenes and their derivatives, homoterpenes. These compounds play an important role in the protection and reproduction of the plant, once they have been described as toxins, repellents (direct defense) or attractants to other organisms (indirect defense) [18]. *P. brassicae* is able to take benefit from bioactive constituents from the diet, sequestering and accumulating this class of compounds for its own defense [19]. Thus, the plant is most important in determining the composition of the insect. No work so far mentioned the metabolism of volatile compounds in *P. brassicae*. Although there are reports about volatiles' metabolism for other insects [20,21], they focus on only one compound. As far as we know, this is the first overview about the whole metabolic fate of volatile compounds obtained by insects from the diet.

Working with living organisms is always a challenge as several technical issues arise, mainly regarding the maintenance of the specimen's physiological conditions.

Vercammen et al. [22] used a complex and automated system applied to an alive insect (response of *Lycopersicon esculentum* Mill to *Spodoptera littoralis* attack). This complex system involved an apparatus composed by two programmable temperature vaporization injectors in series, a glass tube filled with PDMS, rotary valves, vacuum pumps, among others devices. Regardless of the versatility of these systems, their complexity turns them an expensive option, constituted by very specific material that may not be available in all laboratories.

In this work, the volatiles emitted by the insect after 0, 2, 4 and 6 h starvation period subsequent to feeding, as well excrements resulting from different metabolization time points (2, 4 and 6 h) were analyzed.

For these purposes, headspace solid-phase microextraction (HS-SPME), combined with gas chromatography/ion trap–mass spectrometry (GC/IT–MS) were used. Minimal sample size and preparation, fast sample throughput and very high sensitivity for the simultaneous extraction of a broad range of compounds turn HS-SPME combined with GC–MS a very useful analytical approach.

2. Materials and methods

2.1. Standards and reagents

Reference compounds were purchased from various suppliers: octanal; (*E*)-2-octenal; hexadecanoic acid, methylester; geranylacetone; β -cyclocitral; α -pinene; β -pinene; linalool; limonene; eugenol; phenol; (*E*)-2-Decen-1-ol; (*Z*)-3-hexenol; (*Z*)-2-hexenol; 6-methyl-5-hepten-2-one; 2,6,6-trimethylcyclohexanone; benzonitrile and methylidihydrojasmonate were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); (*E*)-2-nonenal; hexanal; (*E*)-2-hexenal; phenylacetaldehyde; β -ionone; dimethyl disulfide; dimethyl trisulfide; *cis*-3-hexenyl acetate and phytol were obtained from SAFC (Steinheim, Germany); acetic acid, hexyl ester; eucalyptol; terpineol and *o*-cymene were from Extrasynthese (Genay, France); menthol was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland) and allylisothiocyanate was from Riedel de Haën (Seelze, Germany).

2.2. *P. brassicae* larvae and excrements material

Wild *P. brassicae* individuals were obtained from CIMO/Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, northeast Portugal. The population was exclusively fed with *B. oleracea* var. *acephala* (kale). Twenty five larvae at the fourth instar of development and with identical weight (~400 mg) and size (~2.5 cm) were chosen for analysis. Voucher specimens are deposited at Pharmacognosy Laboratory from Faculty of Pharmacy of Porto University.

Twenty larvae were isolated and deprived from food for 6 h. After this starving time, larvae were placed in kale flower-pots and they fed *ad libitum* for 1 h, after which three larvae were analyzed separately. Insect specimens were equally analyzed after a period of starvation of 2 and 4 h. Approximately 0.2 g of *P. brassicae* larvae excrements resulting from 2, 4, and 6 h of metabolization were also analyzed. All analyses were performed in triplicate.

2.3. Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME)

2.3.1. SPME fibres

Several fibres, with different characteristics and uses are commercially available, depending on the target compounds. According to bibliography and recommendations of supplier (Supelco, Bellefonte, PA, USA) three of them are the most suitable to the compounds and to the matrices under study. The fibre selected was coated with Divinylbenzene/PDMS (DVB/PDMS), 50/30 μm . It was conditioned by inserting it into the GC injector; temperature and time were used according to the procedure recommendation of Supelco: 250 °C for 30 min.

2.3.2. Volatiles extraction

For the *in vivo* analysis of *P. brassicae*, several temperatures and adsorption times were tested in order to determine which one interfered the less with the insects' behaviour, as an effort to minimize insect's stress that could influence the results. The conditions assayed were 40 °C for 1 h, 60 °C for 1 h and 40 °C for 40 min.

A 15 mL vial was sealed with a polypropylene hole cap and PTFE/silicone septa (Supelco, Bellefonte, PA, USA) and subjected to adsorption, with magnetic stirring.

Afterwards, the fibre was pulled into the needle sheath and the SPME device was removed from the vial and inserted into the injection port of the GC system for thermal desorption. After 1 min the fibre was removed and conditioned in another GC injection port for 20 min at 250 °C. The same procedure was used to test the leaves of *B. oleracea* var. *acephala*.

2.4. Gas chromatography/ion trap–mass spectrometry analysis

GC/IT–MS analysis was performed using a Varian CP-3800 gas chromatograph (USA) equipped with a VARIAN Saturn 4000 mass selective detector (USA) and a Saturn GC/MS workstation software version 6.8. The column used for samples analysis was VF-5 ms (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm) from VARIAN. Stabilwax-DA fused silica column (60 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μm) (Restek, USA) was used in order to check the identity of some compounds found in the first column. The injector port was heated to 220 °C. The injections were performed in a splitless mode. The carrier gas was Helium C-60 (Gasin, Portugal), at a constant flow of 1 mL/min. The oven temperature was set at 40 °C for 1 min, then increasing 2 °C/min to 220 °C and held for 30 min. All mass spectra were acquired in the electron impact (EI) mode. Ionization was maintained off during the first 2 min. The Ion Trap detector was set as follows: the transfer line, manifold and trap temperatures were respectively 280, 50 and 180 °C. The mass ranged from 40 to 350 *m/z*, with a scan rate of 6 scan/s. The emission current was 50 μA , and the electron multiplier was set in relative mode to auto tune procedure. The maximum ionization time was 25,000 μs , with an ionization storage level of 35 *m/z*. The analysis was performed in Full Scan mode.

Compounds were identified by comparing the retention times of the chromatographic peaks with those of authentic compounds analyzed under the same conditions, and by comparison of the retention indices (as Kovats indices) with the literature data. The comparison of MS fragmentation pattern with those of pure compounds and mass spectrum database search was performed using National Institute of Standards and Technology (NIST) MS 05 spectral data base. Confirmation was also

Table 1Areas (standard deviation), in Arbitrary Units, of volatile compounds identified in kale, *P. brassicae* larva and in its excrements after a 0, 2, 4 and 6 h starvation/metabolization.

Compound	RT ^a (min)	QI ^b (m/z)	A ^c /1000 (± S.D.)							
			Kale	Insect after a starvation of				Excrements		
				0 h	2 h	4 h	6 h	2 h	4 h	6 h
Alcohols										
1	2.497	44/57/58/71	nd	11.2 (1.0)	0.9 (0.0)	1.4 (0.1)	9.2 (0.8)	nd	7.1 (0.3)	3.7 (0.3)
3-Methylbutanol ^e										
2	2.788	57/67	10.0 (0.2)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1-Penten-3-ol ^e										
3	3.006	41/59	6.1 (0.6)	3.0 (0.3)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3-Pentanol ^e										
4	4.108	57/68	9.2 (0.8)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
(Z)-2-Penten-1-ol ^e										
5	4.647	55/79/83/98	nd	nd	nd	nd	nd	6.3 (0.6)	7.6 (0.5)	9.2 (0.2)
2,4-Hexadien-1-ol ^e										
6	5.864	41/55/67/82	2.6 (0.3)	5.4 (0.0)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
(Z)-3-Hexen-1-ol ^{d,e}										
7	6.238	57/67/82	6.6 (0.6)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
(Z)-2-Hexen-1-ol ^{d,e}										
8	12.19	59	nd	5.7 (0.5)	2.7 (0.3)	2.8 (0.1)	nd	nd	nd	nd
2,6-Dimethyl-7-octen-2-ol ^e										
9	13.188	57/70/82/9	2.1 (0.1)	6.6 (0.4)	5.0 (0.2)	5.5 (0.0)	13.3 (1.8)	9.4 (0.7)	14.6 (0.3)	10.2 (0.9)
(E)-2-Nonenol ^e										
10	16.15	41/43/55/57	0.6 (0.0)	2.8 (0.2)	1.5 (0.0)	3.7 (0.3)	4.3 (0.3)	5.7 (0.5)	nd	nd
(E)-2-Decen-1-ol ^{d,e}										
Aldehydes										
11	4.685	56/57/67/72	nd	1.5 (0.1)	0.8 (0.0)	0.7 (0.1)	3.1 (0.0)	0.4 (0.0)	0.4 (0.0)	0.4 (0.0)
Hexanal ^{d,e}										
12	5.777	41/55/69/83	nd	11.8 (0.7)	0.4 (0.0)	0.2 (0.0)	6.8 (0.1)	nd	nd	nd
(E)-2-Hexenal ^{d,e}										
13	7.204	55/57/70	nd	nd	0.6 (0.5)	0.2 (0.0)	1.0 (0.1)	0.7 (0.0)	0.7 (0.1)	0.8 (0.0)
Heptanal ^e										
14	10.15	43/56/69/84	nd	nd	1.3 (0.1)	1.4 (0.1)	2.8 (0.0)	0.8 (0.1)	1.9 (0.1)	1.7 (0.1)
Octanal ^{d,e}										
15	11.48	91/120	nd	8.5 (0.9)	1.7 (0.0)	2.7 (0.2)	11.3 (0.5)	4.0 (0.0)	7.8 (0.8)	18.2 (0.8)
Phenylacetaldehyde ^{d,e}										
16	11.84	41/55/70/83	nd	nd	0.3 (0.0)	0.5 (0.0)	0.9 (0.1)	nd	nd	nd
(E)-2-Octenal ^{d,e}										
17	14.86	43/55/70/83	nd	nd	nd	nd	0.8 (0.1)	nd	nd	nd
(E)-2-Nonenal ^{d,e}										
18	18.27	77/91/105/119/148	nd	nd	nd	nd	nd	1.9 (0.2)	4.0 (0.3)	0.7 (0.1)
Cumaldehyde ^e										
Esters										
19	1.710	43/61/73	nd	nd	0.9 (0.0)	1.1 (0.1)	nd	nd	nd	nd
Acetic acid, propyl ester ^e										
20	4.964	43/56/73	nd	nd	1.1 (0.1)	1.2 (0.1)	2.2 (0.2)	nd	nd	nd
Acetic acid, butyl ester ^e										
21	7.671	43/67/68	10.0 (0.2)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4-Penten-1-ylacetate ^e										
22	10.33	43/55/67/82	2611.5 (119.5)	nd	nd	nd	nd	20.7 (2.0)	nd	nd
(Z)-3-Hexenyl acetate ^{d,e}										
23	10.42	43/56//61/84	78.0 (0.1)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acetic acid, hexyl ester ^{d,e}										
24	12.97	57/67/82	5.7 (0.2)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
Propanoic acid,4-hexen-1-yl ester ^e										
25	14.25	67/71/82	20.5 (1.5)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Butanoic acid,4-hexen-1-yl ester ^e										
26	14.40	43/56//61/84	nd	nd	1.4 (0.1)	1.7 (0.1)	2.5 (0.2)	nd	nd	1.5 (0.1)
2-Ethylhexyl acetate ^e										
27	16.80	57/67/82	25.5 (2.4)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Pentanoic acid,4-hexen-1-yl ester ^e										
28	19.77	67/82/99	1.4 (0.1)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
(Z)-Hexanoic acid, 3-hexenyl ester ^e										
29	19.94	57/67/82/85	4.8 (0.5)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
cis-3-Hexenyl valerate ^e										
30	27.42	83/153	nd	nd	nd	nd	0.6 (0.1)	nd	nd	nd
Methylidihydrojasmonate ^{d,e}										
31	33.11	74/87/143/270	nd	0.7 (0.0)	0.3 (0.0)	0.4 (0.0)	0.4 (0.0)	nd	nd	nd
Hexadecanoic acid, methylester ^{d,e}										
Ketones										
32	2.992	57/86	6.5 (0.4)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3-Pentanone ^e										

(continued on next page)

Compound	RT ^a	QI ^b	A ^c /1000 (± S.D.)							
	(min)	(m/z)	Kale	Insect after a starvation of				Excrements		
				0 h	2 h	4 h	6 h	2 h	4 h	6 h
<i>Ketones</i>										
33	3.770	43/57/72	0.6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3,5-Dimethyl-2-octanone ^e			(0.0)							
34	11.19	57/86	nd	nd	nd	nd	nd	4.3	2.2	0.7
2,2,6-Trimethylcyclohexanone ^{d,e}								(0.3)	(0.2)	(0.0)
35	12.10	77/105	nd	nd	7.4	8.6	nd	nd	nd	nd
α,α-Dihydroxyacetophenone ^e					(0.7)	(0.4)				
36	12.83	43/58/59/71	nd	nd	nd	nd	nd	10.7	nd	nd
2-Nonanone ^e								(0.6)		
<i>Norisoprenoids derivatives</i>										
37	9.596	43/55/69/108	nd	0.9	0.8	1.2	1.5	14.4	7.4	3.1
6-Methyl-5-heptene-2-one ^{d,e}				(0.1)	(0.0)	(0.1)	(0.1)	(1.3)	(0.4)	(0.1)
38	16.60	109137/152	0.4	nd	nd	nd	0.7	16.0	15.9	8.5
β-Cyclocitral ^{d,e}			(0.0)				(0.0)	(0.2)	(1.6)	(0.2)
39	23.44	177	0.1	nd	nd	nd	nd	16.3	9.1	7.5
β-Ionone ^{d,e}			(0.0)					(0.0)	(0.5)	(0.7)
40	23.58	43/123/135	nd	nd	nd	nd	nd	5.7	5.1	2.1
β-Ionone epoxide ^e								(0.2)	(0.2)	(0.2)
41	24.83	67/109/137/180	nd	nd	nd	nd	nd	1.6	0.7	1.1
Dihydroactinidiolide ^e								(0.1)	(0.1)	(0.1)
42	27.70	57/149/191	0.3	0.3	0.4	0.4	nd	nd	nd	nd
β-Methylionone ^e			(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)				
43	31.49	58/71/109/250	nd	nd	nd	nd	nd	0.5	0.2	0.1
Hexahydrofarnesyl acetone ^e								(0.0)	(0.0)	(0.0)
<i>Terpenes</i>										
44	8.057	77/93	0.5	nd	1.1	1.2	2.4	0.7	1.0	0.7
α-Pinene ^{d,e}			(0.0)		(0.1)	(0.0)	(0.1)	(0.0)	(0.0)	(0.1)
45	9.214	77/91/93	0.7	nd	nd	0.9	2.2	nd	nd	nd
β-Thujene ^e			(0.0)			(0.1)	(0.2)			
46	9.680	69/93	nd	nd	1.0	1.3	nd	nd	nd	nd
β-Pinene ^{d,e}					(0.0)	(0.0)				
47	9.875	105/120	nd	nd	nd	nd	nd	11.3	12.7	6.7
psi-Cumene ^e								(0.2)	(0.2)	(0.4)
48	10.29	91/93/121/136	nd	nd	0.5	0.7	nd	nd	nd	nd
3-Carene ^e					(0.0)	(0.0)				
49	10.81	68/93	35.5	5.1	46.8	60.3	128.2	53.3	55.9	62.7
Limonene ^{d,e}			(0.2)	(0.3)	(4.3)	(1.7)	(9.6)	(2.7)	(4.6)	(5.7)
50	11.06	81/93/108	1.8	1.2	0.5	0.7	1.7	1.4	(0.1)	0.5
Eucalyptol ^{d,e}			(0.1)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.2)	(0.1)		(0.0)
51	12.31	91/119/134	nd	nd	nd	0.2	nd	nd	nd	nd
m-Cymene ^e						(0.0)				
52	12.39	91/119/134	nd	nd	nd	0.2	nd	nd	nd	nd
o-Cymene ^{d,e}						(0.0)				
53	12.57	91/119/134	nd	nd	nd	0.4	nd	nd	nd	nd
ρ-Cymene ^e						(0.0)				
54	12.66	59/68/94/111	nd	0.9	0.5	nd	0.6	nd	nd	nd
cis-Linalool oxide ^e				(0.0)	(0.0)		(0.0)			
55	13.02	55/71/93/121	nd	1.4	1.6	0.7	2.3	6.4	7.4	2.2
Linalool ^{d,e}				(0.1)	(0.1)	(0.0)	(0.1)	(0.6)	(0.5)	(0.2)
56	14.34	55/70/92/134	nd	nd	0.1	nd				

Table 1 (continued)

Compound	RT ^a (min)	QI ^b (m/z)	A ^c /1000 (± S.D.)							
			Kale	Insect after a starvation of				Excrements		
				0 h	2 h	4 h	6 h	2 h	4 h	6 h
<i>Terpenes</i>										
67	21.72	91/105/161/204	nd	nd	nd	nd	nd	1.8 (0.1)	5.7 (0.5)	3.1 (0.3)
β-Guaiene ^e										
68	21.77	94/107/161/204	nd	0.1 (0.0)	0.4 (0.0)	0.1 (0.0)	0.4 (0.0)	nd	1.9 (0.0)	1.2 (0.0)
Longifolene ^e										
69	21.99	79/91/93/133	0.2 (0.0)	1.2 (0.1)	2.2 (0.2)	1.4 (0.1)	1.2 (0.1)	nd	2.6 (0.1)	1.3 (0.1)
β-Caryophyllene ^e										
70	22.61	43/69	nd	4.3 (0.2)	2.1 (0.2)	1.8 (0.2)	2.8 (0.1)	6.0 (0.4)	6.5 (0.4)	7.4 (0.3)
Geranylacetone ^{d,e}										
<i>Sulphur compounds</i>										
71	1.717	47/62	0.2 (0.0)	0.8 (0.1)	1.9 (0.2)	1.2 (0.1)	4.1 (0.2)	4.1 (0.4)	2.4 (0.1)	3.8 (0.4)
Dimethyl sulfide ^e										
72	3.147	45/72/73	8.4 (0.7)	nd	nd	nd	nd	1.9 (0.2)	0.9 (0.1)	2.1 (0.1)
Methylthiocyanate ^e										
73	3.705	45/79/94	0.8 (0.0)	17.7 (1.7)	44.3 (3.9)	1.5 (0.1)	32.7 (1.5)	1052.2 (76.1)	168.5 (12.4)	47.1 (1.7)
Dimethyl disulfide ^{d,e}										
74	6.636	41/72/99	6.8 (0.0)	nd	nd	nd	0.6 (0.0)	6.0 (0.5)	5.3 (0.5)	5.2 (0.0)
Allyl Isothiocyanate ^{d,e}										
75	9.209	45/79/126	nd	0.7 (0.1)	60.8 (6.1)	nd	33.6 (2.4)	172.2 (1.9)	83.7 (5.2)	61.3 (2.0)
Dimethyl trisulfide ^{d,e}										
76	11.775	57/72/129	0.2 (0.0)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-Methylbutyl isothiocyanate ^e										
77	16.63	57/72/129	nd	nd	1.8 (0.1)	nd	nd	37.9 (3.4)	15.1 (0.8)	22.4 (2.2)
Dimethyl tetrasulfide ^e										
<i>Nitrogen compounds</i>										
78	2.530	41/67	5.9 (0.6)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-Butanenitrile ^e										
79	8.998	51/78/105	nd	nd	nd	nd	nd	165.4 (10.7)	47.9 (3.5)	17.1 (1.6)
Pyrazinenitrile ^e										
80	9.72	50/76/103	nd	nd	nd	nd	nd	0.9 (0.1)	nd	nd
Benzonitrile ^{d,e}										
81	12.68	44/61/62/115	nd	nd	nd	nd	nd	27.2 (2.0)	nd	nd
4-(methylthio)-Butanenitrile ^e										
82	16.12	55/61/82/129	nd	nd	nd	nd	nd	12.8 (1.0)	62.2 (5.8)	42.6 (3.7)
5-(methylthio)-Pentanenitrile ^e										
83	16.93	69/108/135	nd	nd	nd	nd	nd	2.4 (0.1)	6.2 (0.4)	1.9 (0.1)
Benzothiazole ^e										
84	18.74	89/90/117	nd	nd	nd	nd	nd	34.8 (1.4)	nd	nd
Indole ^e										
<i>Miscellaneous compounds</i>										
85	3.770	43/57/72	3.5 (0.3)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3-Ethyl-1,5-octadiene ^e										
86	4.032	91/92	4.8 (0.1)	28.9 (2.4)	41.0 (3.9)	35.5 (3.0)	37.8 (3.4)	8.8 (0.9)	15.3 (0.1)	14.5 (1.0)
Toluene ^e										
87	9.792	66/94	nd	nd	36.6 (3.5)	51.9 (0.4)	nd	nd	nd	nd
Phenol ^{d,e}										
88	11.68	79/90/108	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.7 (0.2)
2-Methylphenol ^e										
89	13.28	77/107/122	nd	nd	nd	nd	nd	1.2 (0.1)	2.6 (0.3)	3.5 (0.2)
2,3-Dimethylphenol ^e										
90	18.15	77/91/122/137/152	nd	nd	nd	nd	nd	0.9 (0.0)	0.9 (0.0)	0.6 (0.0)
ρ-Ethylguaiaicol ^e										
91	19.13	77/107/135/150	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	13.5 (1.1)
ρ-Vinylguaiaicol ^e										
92	20.23	77/131/164	nd	nd	0.5 (0.0)	0.6 (0.1)	2.5 (0.1)	107.5 (4.9)	336.3 (3.8)	99.3 (5.4)
Eugenol ^{d,e}										
<i>Identified compounds</i>			36	26	38	38	33	48	42	47
Alcohols (%)			7 (37.2)	6 (34.7)	4 (10.2)	4 (13.5)	3 (26.9)	3 (21.4)	3 (29.3)	3 (23.1)
Aldehydes (%)			0	3 (21.9)	6 (5.2)	6 (5.7)	7 (26.6)	5 (7.8)	5 (14.9)	5 (21.8)
Esters (%)			8 (2757.4)	1 (0.7)	4 (3.7)	4 (4.5)	4 (5.7)	1 (20.7)	0	1 (1.5)
Ketones (%)			2 (7.1)	0	1 (7.4)	1 (8.6)	0	3 (15.1)	2 (2.2)	2 (0.7)
Norisoprenoids derivatives (%)			3 (0.8)	2 (1.2)	2 (1.2)	2 (1.7)	2 (2.2)	5 (54.4)	5 (38.4)	5 (22.4)
Terpenes (%)			8 (40.6)	10 (33.5)	14 (65.3)	16 (78.6)	11 (156.8)	15 (172.4)	14 (151.2)	16 (144.9)

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Compound	RT ^a	QI ^b	A ^c /1000 (± S.D.)							
	(min)	(m/z)		Insect after a starvation of				Excrements		
			Kale	0 h	2 h	4 h	6 h	2 h	4 h	6 h
<i>Miscellaneous compounds</i>										
Sulphur compounds (%)			5 (16.3)	3 (19.2)	4 (108.8)	2 (2.7)	4 (71.0)	6 (1274.2)	6 (276.0)	6 (141.9)
Nitrogen compounds (%)			1 (5.9)	0	0	0	0	6 (243.5)	3 (116.3)	3 (61.5)
Miscellaneous compounds (%)			2 (8.3)	1 (28.9)	3 (78.2)	3 (87.9)	2 (40.4)	4 (118.5)	4 (355.2)	6 (133.1)

nd = not detected.

^a RT = retention time.^b QI = quantification ions.^c A ($\pm$ S.D.) = area $\pm$ standard deviation.^d S = identified by comparison with reference compound.^e MS = tentatively identified by NIST05.

conducted using laboratory built MS spectral database, collected from chromatographic runs of pure compounds performed with the same equipment and conditions. Peak areas were determined by re-constructed FullScan chromatogram using for each compound some specific ions (quantification ions, see Table 1). By this way some peaks which were co-eluting in FullScan mode (Resolution value lower than 1) were integrated with resolution value higher than 1.

2.5. Statistical analysis

Statistical significance of differences between kale and *P. brassicae* materials, *P. brassicae* larvae starvation periods and between *P. brassicae* excrements along metabolization was determined using two-way analysis of variance (ANOVA), with the Bonferroni *post hoc* test. Results

represent the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of at least three experiments. *P* values lower than 0.05 were considered significant.

3. Results and discussion

3.1. In vivo headspace solid-phase microextraction (HS-SPME)

For the optimization of the sampling process, several conditions were tested. Initially, one larva was placed in a 15 mL vial at 60 °C for 1 h in contact with the fibre. However, these conditions resulted in insect's death. The next experiment involved the same time of contact with the fibre, but temperature was lowered to 40 °C. Under these conditions the death of the insects also occurred. The following analysis involved the contact of the insect with the fibre at 40 °C for 40 min, and the analyzed

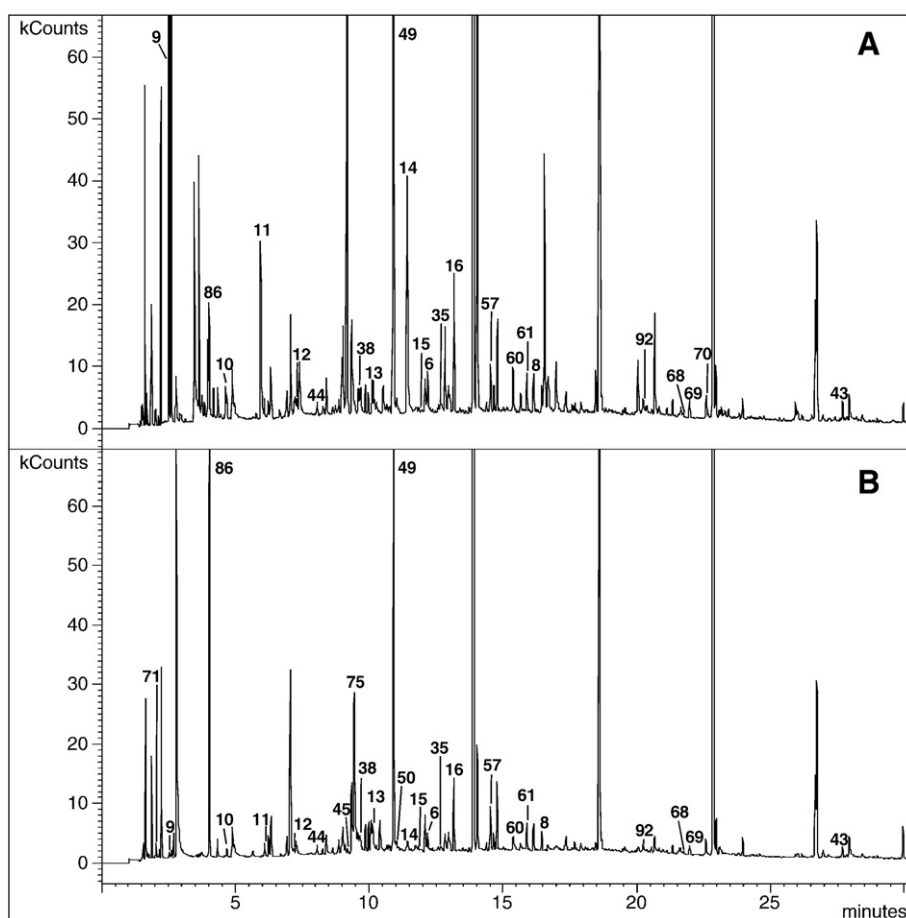


Fig. 1. Chromatographic profile of HS-SPME combined with GC/IT-MS using Divinylbenzene/PDMS fibre. *P. brassicae* larva after 2 h (A) and 4 h starvation (B). Identity of compounds as in Table 1.

3.2. Volatiles emitted by *P. brassicae* larva and in its excrements

Thus the volatile content in insect after a 0, 2, 4 and 6 h starvation period subsequent to feeding (Fig. 1) was analyzed.

In what concerns aldehydes, it could be seen that their amounts diminished drastically in the time following predation, as it is well demonstrated by their amounts after a starvation period of 0 and 4 h (Fig. 3). At the same time, their quantities in excrements significantly rose between 2 and 6 h, representing an increase of nearly 3 times fold

Linalool was a compound that could be found in *P. brassicae* in all starvation periods as well as in all time points of excrements analysis.

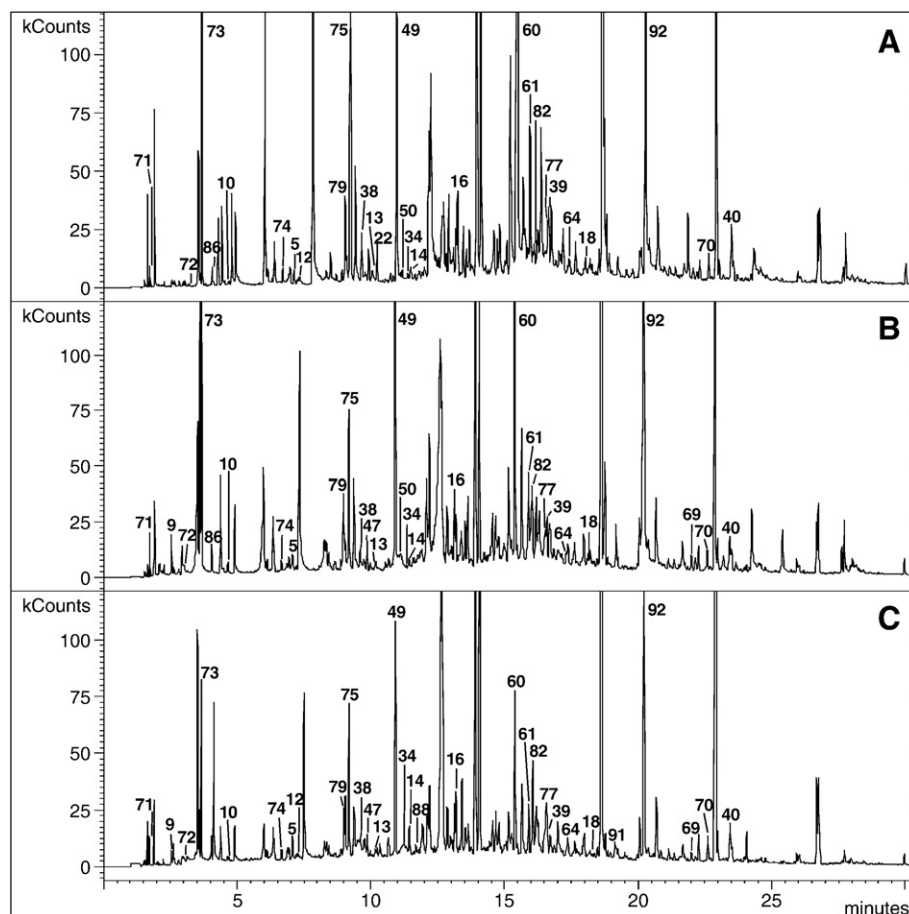


Fig. 2. Chromatographic profile of HS-SPME combined with GC/IT-MS using Divinylbenzene/PDMS fibre. Excrements resulting from 2 h (A), 4 h (B) and from 6 h (C) of *P. brassicae* larva metabolism. Identity of compounds as in Table 1.

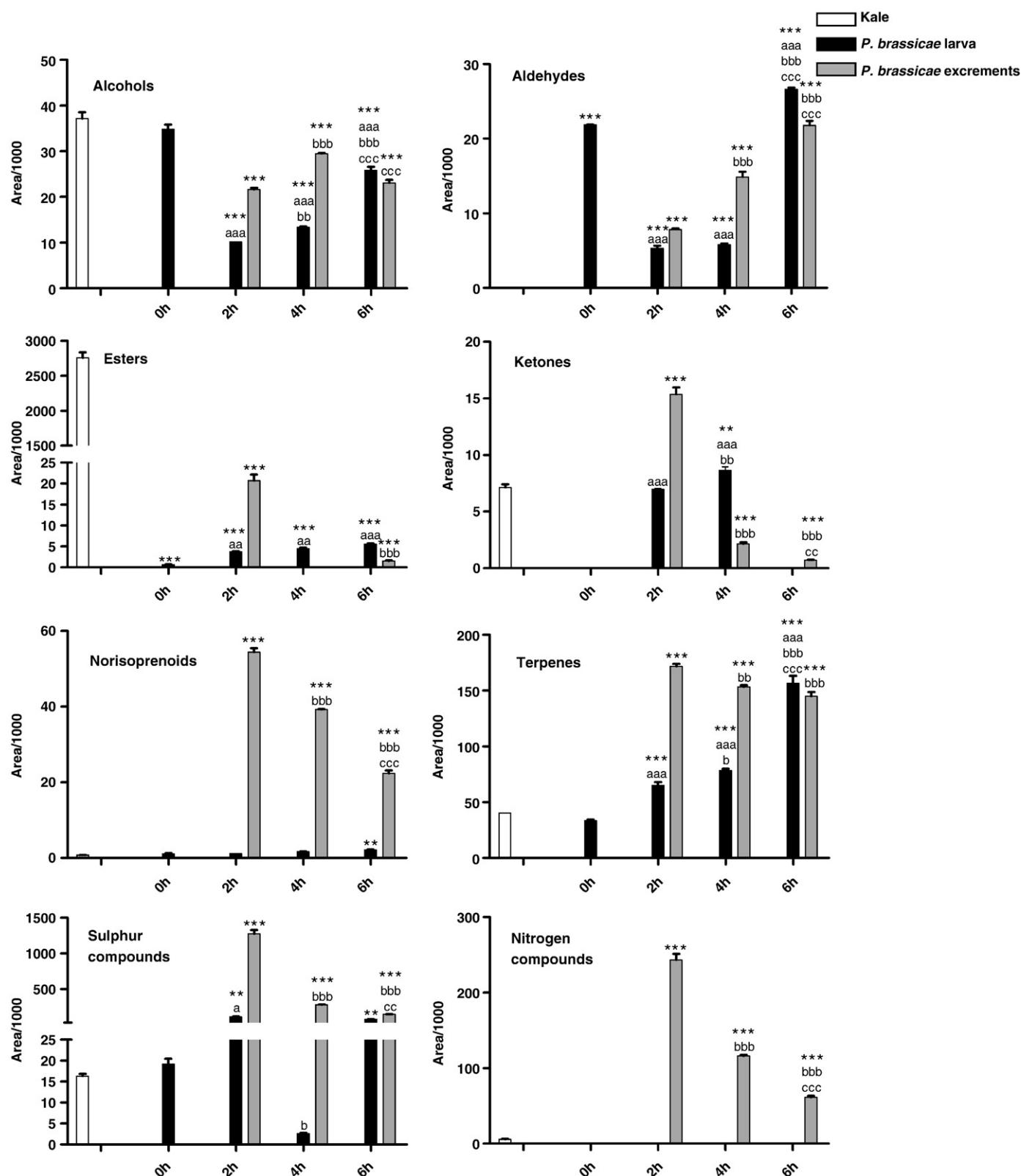


Fig. 3. Variation in alcohols, aldehydes, esters, ketones, norisoprenoids, terpenes, sulphur and nitrogen compounds content in kale, *P. brassicae* larva after 0, 2, 4 and 6 h starvation and its excrements resulting from 2, 4 and 6 h of metabolism. Values show areas mean $\pm$ SE of 3 experiments. ^a compared to 0 h starvation; ^b compared to 2 h starvation; ^c compared to 4 h starvation; ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$, and ^{aaa} $P < 0.001$; ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$ and ^{bbb} $P < 0.001$; ^c $P < 0.05$, ^{cc} $P < 0.01$ and ^{ccc} $P < 0.001$; * compared to kale; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$.

although absent in kale. However, if we take into account that the systematic name of this compound is 2,6-dimethyl-2,7-octadien-6-ol, it turns feasible that this compound appeared as a reduction product of 2,6-dimethyl-7-octen-2-ol, which does exist in *B. oleracea* var. *acephala*.

This clearly indicates that reduction reactions take place during *P. brassicae* metabolic processes. The laboratory synthesis of linalool from 2-methyl-2-hepten-6-one was also reported before and proceeds via base-catalyzed ethynylation with acetylene to dehydrolinalool,

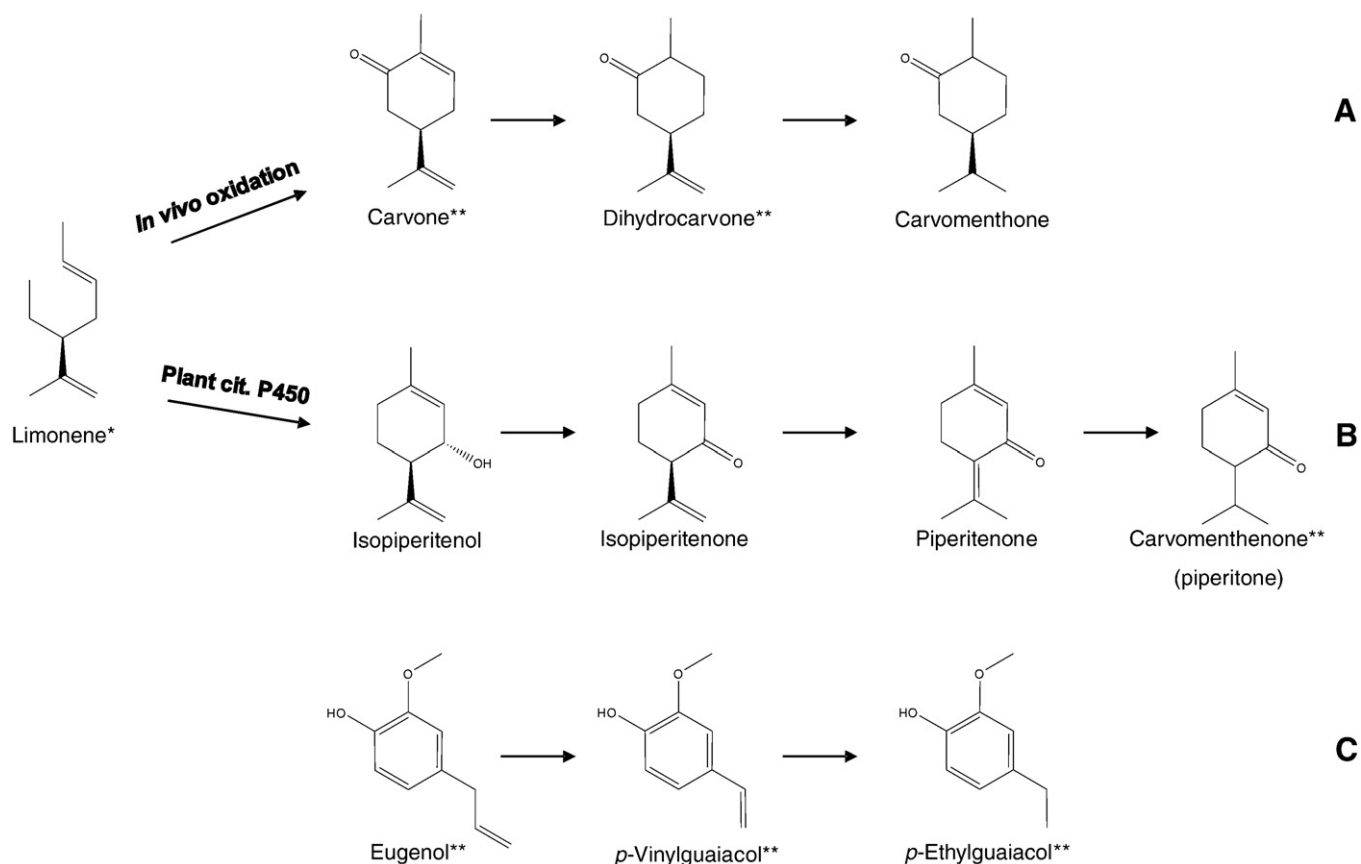


Fig. 4. Possible pathway to the obtainment of carvone, dihydrocarvone and carvomenthone from limonene (A). Biosynthesis of carvomenthenone in *Mentha piperita* (B). Obtainment of *p*-vinylguaiaicol and *p*-ethylguaiaicol from eugenol (C).

yielding linalool through hydrogenation of the triple bond in the presence of palladium-carbon catalyst. Alternative routes include a Grignard reaction between 2-methyl-2-hepten-6-one and vinyl halide and synthesis from prenyl phenyl sulfone through reaction with isoprene oxide and desulfurization with lithium in ethylamine [24]. Further studies are required in order to understand which steps are involved in this transformation in *P. brassicae*. In alternative, linalool may occur in plants as a result of the action of linalool synthases on geranyldiphosphate [12] but the same process is yet to be demonstrated in insects.

Without a doubt, terpenes constitute the class of compounds with the most pronounced changes and importance during the metabolic process of *P. brassicae* (Table 1 and Fig. 3).

Three related compounds, carvone, dihydrocarvone and 3-carvomenthone, found in the excrements, were absent from the host plant. Carvone is a terpenoid that can be obtained *in vivo* by the oxidation of limonene (Fig. 4A). Given the fact that limonene was the compound in second highest amounts among all compounds identified, its biotransformation is not improbable as it was widely available for transformation. Also, carvone has 2 double bonds that can be further reduced: one in the cyclic moiety and another in the isopropenyl one. Hydrogenation of the double bond in the cyclic moiety yields dihydrocarvone, while hydrogenation of both double bonds originates carvomenthone (tetrahydrocarvone) (Fig. 4A). Dihydrocarvone was found in *P. brassicae* and the reduction of carvone is likely to be its source. Concerning carvomenthenone, no information is available regarding the origin of this compound in insects. As so, an insight of plants' metabolic pathways, namely monoterpene biosynthesis could provide some leads. In Fig. 4B, a pathway that yields carvomenthenone starting with limonene is shown. This pathway occurs via cytochrome P450 and has been described in some plant species, such as *Mentha piperita* [25,26]. Given the universal

distribution of this superfamily of hemoproteins, a similar process could occur in *P. brassicae*.

Apart from the compounds that arose from metabolic transformation of previous compounds, direct uptake and accumulation by *P. brassicae* was also registered.

As it was stated before, limonene was a compound that existed in high amounts in kale, being the second most abundant one. This terpene was also detected in all samples from *P. brassicae*, both the insect and its excrements, with its quantities significantly rising through time (Table 1 and Fig. 5). The presence of limonene in the insect 6 h after feeding, a time by when digestion is already finished, indicates that an accumulation phenomenon takes place. The amount of limonene in the excrements after the 6 h period is also high, but still ca. half of the amounts in the insect (Fig. 5).

This terpenoid, as well as terpineol that was equally present, has already been implicated as a sex pheromone in the cerambycid beetle *Megacyllene caryae*, and the same function on *P. brassicae* should be considered [27]. Another example is menthol, a compound with well known antimicrobial properties [28]. Menthol's amounts were found to increase in the insect during its digestion, being present even after 6 h past the herbivory moment. The same accumulation trend could not be found for compounds related to menthol, such as isomenthone or *p*-menthone. These two compounds, although equally present in kale, were not found in the insect itself, but only in its excrements indicating complete excretion.

An interesting case is that of eugenol, a compound with marked anti-septical activity. Eugenol was found in larva samples after 2 h starvation, rising with time (Table 1 and Fig. 5). The amount of eugenol in excrements also rose between 2 and 4 h, representing a significant increase of nearly 3 times fold (Fig. 5). *p*-Ethylguaiaicol and vinylguaiaicol were also present in all insect samples, although they

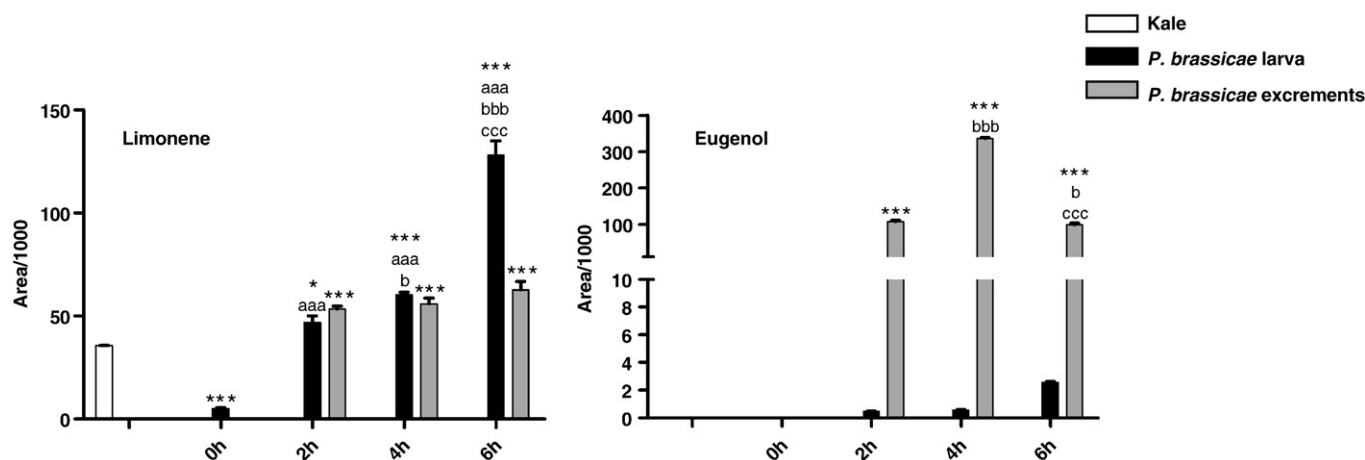


Fig. 5. Variation in limonene and eugenol content in kale, *P. brassicae* larva after 0, 2, 4 and 6 h starvation and its excrements resulting from 2, 4 and 6 h of metabolization. Values show areas mean $\pm$ SE of 3 experiments. ^b compared to 2 h starvation; ^a $P < 0.05$, and ^{aaa} $P < 0.001$; ^b $P < 0.05$, and ^{bbb} $P < 0.001$; ^{ccc} $P < 0.001$; * compared to kale; * $P < 0.05$, and *** $P < 0.01$.

were all absent in kale. As these compounds are structurally related to eugenol, they could have been obtained from it by the insect (Fig. 4C). However, the origin of eugenol itself is not clear, as it was not found in kale. One possibility was that eugenol was obtained via a pathway involving ferulic acid and vanillin. This kind of reaction was described in bacteria and is widely used in biotechnology processes [29]. To confirm this possibility, we searched for vanillin's ions in the GC–MS chromatogram but no vanillin nor related compounds could be found. In addition, ferulic acid was not present, contrarily to what was described in *P. brassicae* fed with *Brassica rapa* var. *rapa* [30]. Again, the chemistry of the host plant seems preponderant to the chemical profile of the insect. Further studies are required in order to elucidate the origin of eugenol in *P. brassicae*.

Norisoprenoids are a class of compounds that result from carotenoids breakdown [31]. The accumulation of carotenoids by insects is well known, mainly due to its antioxidant and pigmentation properties. However, when it comes to norisoprenoids, little information is available. Among the 7 norisoprenoids found in *P. brassicae*, only 3 were present in kale (β -cyclocitral, β -ionone and β -methylionone). Given the fact that organisms in trophic levels higher than plants are unable to synthesize carotenoids *de novo*, two possible explanations arise to explain the presence of carotenoids derivatives in the insect: for one, all the detected norisoprenoids could be present in kale in very small amounts, below the detection limit of the instrumentation used. By a process of bio-concentration these compounds could rise to detectable amounts. Another possibility is that the insect itself was able to break carotenoids present in kale into the detected norisoprenoids. In fact, this ability to break carotenoids has been described in insects before, namely *Drosophila melanogaster* [32]. In *P. brassicae* no information could be found on this matter.

β -ionone has a strong deterring action against some Arthropods [33]. The fact that this compound was fully excreted, not being found in the insect's body reveals that the defence mechanism of *P. brassicae* against this compound involves full excretion, thus avoiding its deleterious effects.

Concerning esters, the number of compounds found in kale was 8. However, in *P. brassicae* only 1, 0 and 1 compounds were found in the excrements of 0, 2 and 6 h, respectively (Table 1). Therefore, a marked decrease in the number of esters found took place. This result could be due to the existence of carboxylesterases, a class of enzymes has been reported to be responsible for the cleavage of esters in insects [34].

Dimethyl trisulfide was the major compound released by *P. brassicae* in the 2 h time point of food privation (Table 1). This compound, as well as dimethyl sulfide, dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide, is derived from (+)-S-methyl-L-cysteine sulfoxide, an α -amino acid found in

Brassica vegetables [35]. In addition, sulfides can also be formed by degradation of some volatiles from glucosinolate breakdown [36]. The ability to detoxify sulfur containing compounds can explain the significant decrease in their amounts in the insect after a 2 h starvation, the peak of digestion, to the 4 h starvation period. In accordance with this, sulfur compounds were the main class found in excrements with a maximum found after 2 h of metabolization decreasing drastically from this time on (Fig. 3).

According to Scott and Wen [4], as a consequence of the co-evolution with the host plant, some insects developed strategies to overcome plant barriers such as detoxification of toxic compounds. This adaptation allowed them to feed on the very compounds that the plant synthesizes to serve as herbivore deterrents [1]. Glucosinolates and its by-products and *P. brassicae*, a specialist in cruciferous [34], are examples of this situation. Herbivorous insects specialized on glucosinolate-containing plants typically avoid the formation of toxic isothiocyanates by employing specialized detoxifying mechanisms. In the case of *P. brassicae*, this is accomplished by a nitrile specifier protein (NSP) in the gut that changes the products of the myrosinase-catalysed hydrolysis of glucosinolates from isothiocyanates to relatively harmless nitriles [37], which may be further metabolized before excretion depending on side chain structure [15,16]. Glucosinolate-derived nitriles may also exert toxic effects if not excreted [16]. In accordance with this, compounds that were absent in kale, such as pyrazinonitrile, benzonitrile, 4-(methylthio) butanenitrile and 5-(methylthio) pentanenitrile were detected in the excrements (Table 1). This class of compounds was found only in excrements (Fig. 3). An efficient metabolism and/or excretion of glucosinolate-nitriles may, therefore, be critical for insect in order to escape plant defenses.

According to Mello and Silva-Filho [1], in some cases, high levels of adaptation by the insect results in sequestering deterrent compounds from the plant for its own use against predators, turning the insect less attractive, protecting it from its own predators. In addition, a study with *P. brassicae* demonstrated that feeding in tissues containing high concentrations of glucosinolates provides these insects a nutritional benefit in terms of higher growth rate [38]. This preference appears to be in contrast to published negative effects of volatile glucosinolate breakdown products on the closely related *P. rapae* [39].

In *P. brassicae*, the presence of allylisothiocyanate was verified only after a 6 h starvation period. In addition, excrements exhibited a decreasing amount of this compound during the time of metabolization (Table 1). The same was found for methylthiocyanate that, despite being absent in insect, appeared in its excrements in low content. A study with the specialist feeder *P. rapae* described allyl isothiocyanate, the volatile hydrolysis product of the sinigrin (the predominant glucosinolate in

kale), as very toxic for that insect and the results obtained herein confirm this tendency for *P. brassicae* as well [14].

In conclusion, insect herbivores are challenged by a large arsenal of plant defence metabolites. The levels of defence compounds may be increased by insect damage. These induced plant responses may also affect the metabolism and performance of successive insect herbivores.

The work herein presents for the first time an overview on the whole metabolic fate of volatile compounds obtained by insects from the diet. The obtained data contributes to the knowledge of the metabolism of volatile compounds by insects, namely by *P. brassicae* fed with *B. oleracea* var. acephala, expanding our understanding of this ecologic system.

Acknowledgements

To Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) for financial support (PTDC/AGR-AAM/64150/2006). F. Fernandes (SFRH/BD/37963/2007) and D.M. Pereira (BIC) are grateful to FCT for their grants.

References

- [1] M.O. Mello, M.C. Silva-Filho, Plant–insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms, *Braz. J. Plant Physiol.* 14 (2002) 71–81.
- [2] K. Honda, H. Ômura, N. Hayashi, Identification of floral volatiles from *Ligustrum japonicum* that stimulate flower-visiting by cabbage butterfly, *Pieris rapae*, *J. Chem. Ecol.* 24 (1998) 2167–2180.
- [3] L. Mattiacci, B.A. Rocca, N. Scacighini, M. D'Alessandro, A. Hern, S. Dorn, Systemically induced plant volatiles emitted at the time of “danger”, *J. Chem. Ecol.* 27 (2001) 2233–2252.
- [4] J.G. Scott, Z.M. Wen, Cytochrome P450 of insect: the tips of the iceberg, *Pest Manag. Sci.* 57 (2001) 958–967.
- [5] L. Després, J.P. David, C. Gallet, The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals, *Trends Ecol. Evol.* 22 (2007) 298–307.
- [6] T. Bukovinszky, R. Gols, M.A. Posthumus, L.E.M. Vet, J.C. Van Lenteren, Variation in plant volatiles and attraction of the parasitoid *Diadegma semiclausum* (Hellen), *J. Chem. Ecol.* 31 (2005) 461–480.
- [7] J.B.F. Geervliet, M.A. Posthumus, L.E.M. Vet, M. Dicke, Comparative analysis of headspace volatiles from different caterpillar-infested and uninfested food plants of *Pieris* species, *J. Chem. Ecol.* 23 (1997) 2935–2954.
- [8] G.A. Howe, G. Jander, Plant immunity to insect herbivores, *Annu. Rev. Plant Biol.* 59 (2008) 41–66.
- [9] P. Harrewijn, A.K. Minks, C. Mollema, Evolution of plant volatile production in insect–plant relationships, *Chemoecology* 5 (1995) 55–73.
- [10] B. Piechulla, M.B. Pott, Plant scents—mediator of inter- and intraorganismal communication, *Planta* 217 (2003) 687–689.
- [11] N. Theis, M. Lerdau, The evolution of function in plant secondary metabolites, *Int. J. Plant Sci.* 164 (2003) 93–102.
- [12] D.R. Gang, Evolution of flavors and scents, *Annu. Rev. Plant Biol.* 56 (2005) 301–325.
- [13] J.W. Fahey, A.T. Zalcman, P. Talalay, The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants, *Phytochemistry* 56 (2001) 5–51.
- [14] A.A. Agrawal, N.S.A. Kurashige, Role for isothiocyanates in plant resistance against the specialist herbivore *Pieris rapae*, *J. Chem. Ecol.* 29 (2003) 1403–1415.
- [15] N. Agerbirk, C. Müller, C.E. Olsen, F.S. Chew, A common pathway for metabolism of 4-hydroxybenzylglucosinolate in *Pieris* and *Anthracis* (Lepidoptera: *Pieridae*), *Biochem. Syst. Ecol.* 34 (2006) 189–198.
- [16] N. Agerbirk, C.E. Olsen, H.B. Topbjerg, J.C. Sørensen, Host plant dependent metabolism of 4-hydroxybenzylglucosinolate in *Pieris rapae*: substrate specificity and effects of genetic modification and plant nitrile hydratase, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37 (2007) 1119–1130.
- [17] R. Mumm, M. Burrow, G. Bukovinszky, E. Kazantzidou, U. Wittstock, M. Dicke, J. Gershenzon, Formation of simple nitriles upon glucosinolates hydrolysis affects direct and indirect defense against the specialist herbivore, *Pieris rapae*, *J. Chem. Ecol.* 34 (2008) 1311–1321.
- [18] J. Gershenzon, N. Dudareva, The function of terpene natural products in the natural world, *Nat. Chem. Biol.* 3 (2007) 408–414.
- [19] R. Nishida, Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera, *Annu. Rev. Entomol.* 47 (2002) 57–92.
- [20] J.A. Svoboda, S.R. Dutky, W.E. Robbins, J.N. Kaplanis, Sterol composition and phytosterol utilization and metabolism in the milkweed bug, *Lipids* 12 (1977) 318–321.
- [21] I.A. Southwell, M.F. Russell, C.D.A. Maddox, G.S. Wheeler, Differential metabolism of 1,8-cineole in insects, *J. Chem. Ecol.* 29 (2003) 83–94.
- [22] J. Vercammen, H. Pham-Tuan, P. Sandra, Automated dynamic sampling system for the on-line monitoring of biogenic emissions from living organisms, *J. Chromatogr. A* 930 (2001) 39–51.
- [23] F. Vaudano, Thesis no. 3082, University of Geneva, 1999.
- [24] R.A. Raguso, E. Pichersky, A day in the life of a linalool molecule: chemical communication in a plant–pollinator system, *Plant Species Biol.* 14 (1999) 95–120.
- [25] M.A. Schuler, The role of cytochrome P450 monooxygenases in plant–insect interactions, *Plant Physiol.* 112 (1996) 1411–1419.
- [26] S. Lupien, F. Karp, M. Wildung, R. Croteau, Regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha*) species: cDNA isolation, characterization, and functional expression of (–)-4S-limonene-3-hydroxylase and (–)-4S-limonene-6-hydroxylase, *Arch. Biochem. Biophys.* 368 (1999) 181–192.
- [27] A. Hebeish, M.G.F. Moustafa, I.A. Hamdy, S.M. EL-Sawy, F.A. Abdel-Mohdy, Preparation of durable insect repellent cotton fabric: limonene as insecticide, *Carbohydr. Polym.* 74 (2008) 268–273.
- [28] G. Iscan, N. Kinimer, M. Kurkuoglu, H.C. Baser, F. Demirci, Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3943–3946.
- [29] H. Priefert, J. Rabenhorst, A. Steinbüchel, Biotechnological production of vanillin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 (2001) 296–314.
- [30] D.M. Pereira, A. Noites, P. Valentão, F. Ferreres, J.A. Pereira, L. Vale-Silva, E. Pinto, P.B. Andrade, Targeted metabolite analysis and biological activity of *Pieris brassicae* fed with *Brassica rapa* var. *rapa*, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 483–489.
- [31] E. Rodríguez-Bustamante, S. Sánchez, Microbial production of C₁₃-Norisoprenoids and other aroma compounds via carotenoid cleavage, *Crit. Rev. Microbiol.* 33 (2007) 211–230.
- [32] C. Kiefer, S. Hessel, J.M. Lampert, K. Vogt, M.O. Lederer, D.E. Breithaupt, J. von Lintig, Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 14110–14116.
- [33] S. Wang, E.L. Ghisalberti, J. Ridsdill-Smith, Volatiles from tri-folium as feeding deterrents of reglegged earth mites, *Phytochemistry* 52 (1999) 601–605.
- [34] A.N. Clements, A study of soluble esterases in *Pieris brassicae*, *J. Insect Physiol.* 13 (1967) 1021–1030.
- [35] I. Blažević, J. Mastelić, Glucosinolate degradation products and other bound and free volatiles in the leaves and roots of radish (*Raphanus sativus* L.), *Food Chem.* 113 (2009) 96–102.
- [36] J.J.A. van Loon, L.M. Schoonhoven, Specialist deterrent chemoreceptors enable *Pieris*, *Entomol. Exp. Appl.* 91 (1999) 29–35.
- [37] U. Wittstock, N. Agerbirk, E.J. Stauber, C.E. Olsen, M. Hippler, T. Mitchell-Olds, J. Gershenzon, H. Vogel, Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 4859–4864.
- [38] J.J.A. van Loon, A. Blaakmeer, F.C. Griepink, T.A. van Beek, L.M. De Groot Schoonhoven, Leaf surface compound from *Brassica oleracea* (Cruciferae) induces oviposition by *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae), *Chemoecology* 3 (1992) 39–44.
- [39] R.C. Smallegange, J.J.A. van Loon, S.E. Blatt, J.A. Harvey, N. Agerbirk, M. Dicke, Flower vs. leaf feeding by *Pieris brassicae*: glucosinolate-rich flower tissues are preferred and sustain higher growth rate, *J. Chem. Ecol.* 33 (2007) 1831–1844.



Erratum

Erratum to “Metabolic fate of dietary volatile compounds in *Pieris brassicae*” [Microchemical Journal 93 (2009) 99–109]

Fátima Fernandes^a, David M. Pereira^a, Paula Guedes de Pinho^a, Patrícia Valentão^a, José A. Pereira^b, Albino Bento^b, Paula B. Andrade^{a,*}

^a REQUIMTE/Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Porto University, R. Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal

^b CIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta. Apolonia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal

The publisher regrets that in the above paper, Fig. 4 was printed incorrectly. The correct version is reprinted below:

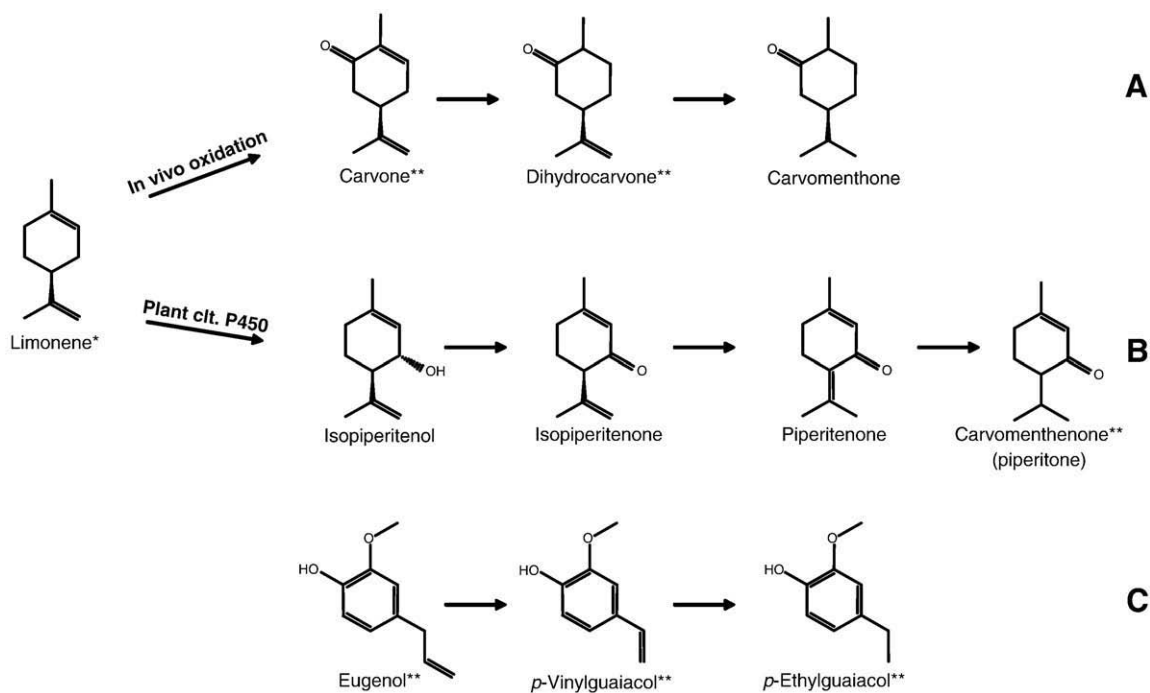


Fig. 4. Possible pathway to the obtainment of carvone, dihydrocarvone and carvomenthone from limonene (A). Biosynthesis of carvomenthenone in *Mentha piperita* (B). Obtainment of *p*-vinylguaiaicol and *p*-ethylguaiaicol from eugenol (C).

DOI of original article: [10.1016/j.microc.2009.05.006](https://doi.org/10.1016/j.microc.2009.05.006).

* Corresponding author. Tel.: +351 222078935; fax: +351 222003977.

E-mail address: pandrade@ff.up.pt (P.B. Andrade).

4.6. Volatile constituents throughout *Brassica oleracea* L. var. *acephala* germination

J. Agric. Food Chem. 2009, 57, 6795–6802

Volatile Constituents throughout *Brassica oleracea* L. Var. *acephala* GerminationFÁTIMA FERNANDES,[†] PAULA GUEDES DE PINHO,^{*,†} PATRÍCIA VALENTÃO,[†]
JOSÉ A. PEREIRA,[‡] AND PAULA B. ANDRADE^{*,†}[†]REQUIMTE/Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Porto University, R. Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal, and [‡]CIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal

In this work, the volatile composition of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) and its variation during germination were monitored during the first 9 days of seedling development by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) combined with gas chromatography/ion trap–mass spectrometry (GC/IT-MS). Differences were found among the materials in the distinct analyzed periods. A total of 66 volatile compounds, distributed in several chemical classes, were determined: alcohols, carbonyl compounds (ketones, aldehydes, and esters), norisoprenoids, and terpenes, among others, sulfur compounds being the most abundant group in seeds and sprouts that exhibited allyl isothiocyanate as the major compound. Leaves of fully developed ground plant had the highest content of norisoprenoids, alcohols, and carbonyl compounds; in opposition, they showed lower levels of sulfur compounds, suggesting that these are important molecules for the development of kale, whereas the others are produced mainly during its growth.

KEYWORDS: *Brassica oleracea* L. var. *acephala*; kale; leaves; sprouts; seeds; volatile compounds; HS-SPME; GC/IT-MS

INTRODUCTION

Leaves of the Brassicaceae family are commonly grown and consumed worldwide. Like leaves, seeds are used for human consumption as oil (canola seeds) or added to some food products (e.g., bread and cake). Sprouts, the germinating form of seeds, are nowadays also used as food and are favored for their nutritional value, becoming a familiar component in salads (1). Scientific attention on seeds and sprouts of these vegetables has increased because of their different kinds of bioactive constituents, which may act as dietary contributors for good health status (2). Among *Brassica* vegetables, kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) is important in traditional farming systems in the Iberian peninsula, and its leaves are consumed fresh or after cooking, as soup.

The benefits of *Brassica* vegetables' consumption arises from their high concentration of vitamins, minerals, and a special group of phytochemicals, glucosinolates, which co-occur with myrosinase isoenzymes and are associated with cancer protection (2, 3). *Brassica* species have also been extensively studied for their typical flavor and odor, attributed to volatile sulfur compounds (4–6).

Glucosinolates constitute a main group of sulfur-containing plant secondary metabolites, which are relatively unique to cruciferous vegetables. When they come into contact with myrosinases, in the presence of water (during processing, cutting, tissue chewing, or when injured), glucosinolates are transformed

into biologically active products (isothiocyanates, thiocyanates, nitriles, epithionitriles, and oxazolidines). Some of these hydrolysis products have a chemoprotective effect against certain cancers (3, 7–10); however, they are also involved in goitrogenicity, although only in situations of iodine deficiency (11). Isothiocyanates produce a pungent flavor and sulfurous aroma, playing a significant organoleptic role in *Brassica* products (12, 13). These compounds have been frequently mentioned, due to their health-promoting properties, as chemoprotective (8, 11).

Besides breakdown glucosinolate products, other volatile metabolites (often monoterpenes, sesquiterpenes, and other aromatic compounds) are released from the surface of the leaf and/or from accumulated storage sites in the leaf. In addition, the green-leaf odor is attributed to a blend of saturated and unsaturated six-carbon alcohols, aldehydes, and esters that are released when leaves are mechanically damaged (14).

Several sulfides, polysulfides, thiols, nitriles, alcohols, carbonyl compounds, furans, and terpene hydrocarbons have been reported in *Brassica* vegetables (15), including in the seeds (16, 17).

As far as we are aware, no previous work concerned the volatile composition of several stages of development of *B. oleracea* var. *acephala* (seeds, sprouts, and fully developed ground plant), and much of the existent literature focuses only on fully grown plants of other *B. oleracea* crops (4–6, 15, 17).

As both sprouts and fully developed plants are used in the human diet, in this study we determined the volatile profile of seeds, seedlings of up to 6 and 9 days of age, and mature plants of *B. oleracea* var. *acephala*. Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME), combined with gas chromatography/ion trap–mass

*Authors to whom correspondence should be addressed [telephone + 351 222078935; fax + 351 222003977; e-mail (P.B.A.) pandrade@ff.up.pt of (P.G.d.P.) pguedes@ff.up.pt].

spectrometry (GC/IT-MS) was the analytical tool of choice, due to its feasibility regarding minimal sample size and preparation, fast sample throughput, and very high sensitivity for the simultaneous extraction of a broad range of analytes (18).

MATERIALS AND METHODS

Standards. Reference compounds were purchased from various suppliers: pentanal, hexanal, (*E*)-2-hexenal, octanal, (*E*)-2-octenal, ethyl octanoate, ethyl decanoate, ethyl linoleate, ethyl hexadecanoate, *trans*-geranylacetone, 6-methyl-5-hepten-2-one, 2,2,6-trimethylcyclohexanone, (*E,E*)-3,5-octadien-2-one, benzenepropanenitrile, β -cyclocitral, β -homocyclocitral, limonene, safranal, and eugenol were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO); (*E*)-2-decenal, (*E,Z*)-2,6-nonadienal, phenylacetaldehyde, β -ionone, α -ionone, dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, *n*-butyl isothiocyanate, hexyl isothiocyanate, 3-methylthiopropyl isothiocyanate, and phenylethyl isothiocyanate were obtained from SAFC (Steinheim, Germany); α -pinene, β -pinene, eucalyptol, and *o*-cymene were from Extrasynthèse (Genay, France); menthol was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland); and allylisothiocyanate was from Riedel de Haën (Seelze, Germany).

Samples. *B. oleracea* L. var. *acephala* seeds and fully developed plants were obtained in 2008 in Bragança, northeastern Portugal. Two hundred seeds were placed in 15 cm diameter Petri dishes lined with fiberglass and watered with 200 mL of distilled water to maintain approximately 100% relative humidity throughout the germination period. The seeds were germinated at 20–23.5 °C, under a 16 h light/8 h dark regimen. At 6 and 9 days of germination four plates were withdrawn.

Both sprouts and leaves were frozen (–20 °C) and freeze-dried (Labconco 4.5 Freezone apparatus, Kansas City, MO). All of the samples were powdered and stored in a desiccator in the dark.

SPME Fibers. Several commercial fibers can be used to extract volatiles. According to the bibliography, recommendations of the supplier (Supelco, Bellefonte, PA), and our knowledge (19, 20), three of them are the most indicated for the intended compounds. The fibers used were coated with different stationary phases and various film thicknesses: carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS), 75 μ m; carbowax/divinylbenzene (CW/DVB), 65 μ m; divinylbenzene/PDMS (DVB/PDMS), 65 μ m. They were conditioned by inserting them into the GC injector; temperature and time were used according to Supelco's recommendation procedure: 300 °C for 1 h, 220 °C for 30 min, and 250 °C for 30 min, respectively.

HS-SPME. Approximately 0.1 g of each powdered sample was placed in a 15 mL vial, and 5 mL of 5% ethanol was added. The same procedure was tried with the same volume of water or without any solvent. The vial was then sealed with a polypropylene hole cap and PTFE/silicone septum (Supelco). The DVB/PDMS fiber was exposed to the headspace, and samples were stirred (150 rpm) at 45 °C for 20 min. Afterward, the fiber was pulled into the needle sheath, and the SPME device was removed from the vial and inserted into the injection port of the GC system for thermal desorption. After 1 min, the fiber was removed and conditioned in another GC injection port for 20 min, at 250 °C. The same procedure was used to test CAR/PDMS and CW/DVB fibers.

Gas Chromatography–Mass Spectrometry Analyses. HS-SPME analyses were performed using a Varian CP-3800 gas chromatograph equipped with a Varian Saturn 4000 mass selective detector and Saturn GC-MS workstation software version 6.8. A VF-5 ms (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m) column from Varian was used. To check the identity of some of the compounds found with this column, a Stabilwax-DA fused silica (60 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m) column (Restek) was also used. The injector port was

heated to 220 °C. The injections were performed in splitless mode. The carrier gas was helium C-60 (Gasin, Portugal), at a constant flow of 1 mL/min. The oven temperature was set at 40 °C for 1 min, then increased at 2 °C/min to 220 °C, and held for 30 min. All mass spectra were acquired in electron impact (EI) mode. Ionization was maintained off during the first minute. The ion trap detector was set as follows: the transfer line, manifold, and trap temperatures were 280, 50, and 180 °C, respectively. The mass ranged from *m/z* 40 to 350, with a scan rate of 6 scan/s. The emission current was 50 μ A, and the electron multiplier was set in relative mode to autotune procedure. The maximum ionization time was 25000 μ s, with an ionization storage level of *m/z* 35. Analyses were performed in full-scan mode.

Compounds were identified by comparing the retention times of the chromatographic peaks with those of authentic standards analyzed under the same conditions and by comparison of the retention indices (as Kovats indices) with literature data (4, 15, 17). MS fragmentation patterns were compared with those of pure compounds, and mass spectrum database search was performed using the National Institute of Standards and Technology (NIST) MS 05 spectral database. Confirmation was also conducted using a laboratory-built MS spectral database, collected from chromatographic runs of pure compounds performed with the same equipment and conditions. For quantification purposes, each sample was injected in triplicate, and the results are expressed in areas (as Kcount amounts). Chromatographic peak areas were determined by a reconstructed full-scan chromatogram using for each compound some specific quantification ions (see Table 1): these corresponded to base ion (*m/z* 100% intensity), molecular ion (M^+), and another characteristic ion for each molecule. Some peaks that are coeluted in full-scan mode (resolution value < 1) can be integrated with a value of resolution > 1.

Statistical Analyses. Principal component analysis (PCA) was carried out using XLSTAT 2007.5 software. The PCA method shows similarities between samples projected on a plane and makes it possible to identify which variables determine these similarities and in what way.

RESULTS AND DISCUSSION

Analytical Conditions. Several studies recommend the application of HS-SPME for volatile profiling purposes in *Brassica* species (15, 18) and other fields of plant science (21). HS-SPME analyses were performed using the odoriferous freeze-dried kale materials, once the high number of samples renders impractical the study of fresh samples in due time, because of their obvious alteration. In addition, samples were freeze-dried in the dark, which reduced the possibility of compound modification. The DVB/PDMS fiber was chosen as it was revealed to be the best and more selective one for the identification of sulfur compounds, glucosinolate breakdown products important in *Brassica* characterization (7).

It was previously demonstrated by our group that the better liquid/gas equilibrium for the majority of volatile compounds is obtained with 5% ethanol (19). Therefore, HS-SPME analyses were performed in the powdered materials mixed with this solution. In this way, less water-soluble compounds can also be released to the gas phase and a large range of compounds, with distinct polarities, is determined. We have also tried to analyze the headspace of the mixture with water only and the headspace of the dried material. However, with these last procedures lower amounts of compounds were detected; by superimposing the chromatograms it was possible to conclude that the use of 5% ethanol gave a most complete volatile profile. The presence of ethanol in the samples was excluded by GC/FID analyses; once,

Table 1. Volatile Compounds in Kale Seeds, Sprouts, and Fully Developed Plant

compound	RI ^a	ID ^b	QI ^c (m/z)	A/1000 ± SD ^d			
				seeds	6 days	9 days	leaves
alcohols							
1							
1-penten-3-ol	798	T	57	nd	nd	nd	7.0 ± 0.5
2							
(E)-2-nonenol	1216	T	57/70/96	1.7 ± 0.1	16.4 ± 1.3	26.6 ± 0.4	86.0 ± 4.0
aldehydes							
3							
pentanal	782	S	44/57/58	nd	12.7 ± 0.8	18.6 ± 1.1	14.3 ± 1.2
4							
(E)-2-pentenal	871	T	55/83	nd	nd	nd	9.4 ± 0.8
5							
hexanal	914	S	56/67/83	2.3 ± 0.1	5.5 ± 0.3	15.2 ± 0.7	32.9 ± 2.8
6							
(E)-2-hexenal	969	S	55/69/83	nd	nd	4.5 ± 0.3	152.8 ± 13.7
7							
heptanal	1014	T	55/70	nd	1.1 ± 0.1	2.8 ± 0.1	5.4 ± 0.3
8							
(Z)-4-heptenal	1071	T	57/70/83	nd	nd	2.7 ± 0.2	6.3 ± 0.0
9							
(E,E)-2,4-heptadienal	1109	T	53/81	nd	nd	nd	120.1 ± 7.3
10							
octanal	1116	S	67/81/95	nd	nd	3.4 ± 0.1	10.0 ± 0.9
11							
phenylacetaldehyde	1159	S	91	nd	36.8 ± 1.8	58.5 ± 2.3	40.0 ± 0.5
12							
(E)-2-cctenal	1172	S	70/93	nd	nd	nd	8.0 ± 0.7
13							
(E,Z)-2,6-nonadienal	1267	S	41/67/70	nd	nd	nd	4.4 ± 0.3
14							
(E)-2-decenal	1310	S	81/95	1.0 ± 0.0	5.8 ± 0.4	12.4 ± 0.9	11.1 ± 0.5
esters							
15							
butyl acetate	925	T	44/56/61	3.6 ± 0.1	6.7 ± 0.4	6.5 ± 0.1	13.7 ± 1.1
16							
ethyl benzoate	1284	T	77/105/122	nd	nd	19.0 ± 0.9	nd
17							
ethyl octanoate	1304		88/140	nd	nd	nd	15.3 ± 0.1
18							
ethyl decanoate	1405	S	88/157	nd	nd	nd	4.6 ± 0.0
19							
ethyl hexadecanoate	1907	S	88/157/284	nd	0.5 ± 0.0	1.6 ± 0.1	19.1 ± 1.8
20							
ethyl linoleate	1979	S	79	nd	nd	nd	23.8 ± 2.2
ketones							
21							
4-methyl-2-heptanone	1049	T	58/85	nd	2.4 ± 0.2	1.9 ± 0.1	nd
22							
3-octen-2-one	1152	S	55/97/111	nd	nd	nd	4.7 ± 0.2
23							
(E,E)-3,5-octadien-2-one	1205	S	71/105	nd	nd	nd	89.3 ± 8.1
norisoprenoid derivatives							
24							
6-methyl-5-hepten-2-one	1096	S	67/108	nd	nd	nd	12.6 ± 0.5
25							
2,2,6-trimethylcyclohexanone	1150	S	82/140	nd	nd	nd	12.0 ± 0.8
26							
isophorone	1174	T	82/110	nd	nd	nd	5.0 ± 0.4
27							
6-methyl-5-hepten-2-ol	1225	T	77/95/110	nd	nd	nd	66.6 ± 3.7
28							
safranal	1308	S	91/105	nd	4.8 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.6 ± 0.3
29							
β-cyclocitral	1320	S	109/137/152	nd	5.9 ± 0.2	10.6 ± 0.7	120.2 ± 11.4
30							
β-homocyclocitral	1340	S	107/151	nd	nd	nd	13.9 ± 0.8
31							

Table 1. Continued

compound	RI ^a	ID ^b	QI ^c (m/z)	A/1000 ± SD ^d			
				seeds	6 days	9 days	leaves
α-ionone 32	1438	S	93/121	nd	nd	nd	3.3 ± 0.2
trans-geranylacetone 33	1461	S	107	nd	nd	nd	12.4 ± 0.8
β-ionone 34	1494	S	177	nd	6.6 ± 0.4	17.4 ± 0.7	331.7 ± 17.2
5,6-epoxy-β-ionone 35	1497	T	177/123	nd	nd	nd	31.2 ± 1.2
dihydroactinidiolide terpenic compounds 36	1542	T	111/137/180	nd	nd	nd	20.0 ± 0.3
α-pinene 37	1047	S	53/93	1.9 ± 0.1	nd	nd	2.3 ± 0.1
β-pinene 38	1099	S	69/93	nd	nd	nd	8.8 ± 0.8
m-cymene 39	1126	T	91/119	nd	nd	nd	2.6 ± 0.1
limonene 40	1143	S	67/93	0.5 ± 0.0	nd	6.8 ± 0.5	18.0 ± 0.9
eucalyptol 41	1147	S	81/93/139	nd	nd	nd	9.2 ± 0.8
o-cymene 42	1190	S	91/119	nd	nd	nd	3.3 ± 0.2
menthol sulfur compounds 43	1292	S	81/95/123	1.8 ± 0.1	9.8 ± 0.6	10.3 ± 0.5	5.2 ± 0.2
dimethyl disulfide 44	854	S	45/79/94	nd	4.8 ± 0.4	6.3 ± 0.3	nd
isopropyl isothiocyanate 45	945	T	43/86/101	11.9 ± 0.5	10.5 ± 0.7	9.0 ± 0.5	nd
allyl thiocyanate 46	975	T	41/72/99	82.6 ± 2.5	24.6 ± 1.6	29.8 ± 1.7	nd
allyl isothiocyanate 47	997	S	41/72/99	64827.9 ± 2944.5	48642.1 ± 4131.6	53188.3 ± 2543.2	144.5 ± 7.7
2-butyl isothiocyanate 48	1043	T	56/86	87.8 ± 2.8	112.4 ± 10.8	86.2 ± 5.0	nd
isobutyl isothiocyanate 49	1066	T	57/72/115	937.3 ± 47.6	1083.5 ± 82.2	1052.3 ± 67.9	nd
dimethyl trisulfide 50	1083	S	45/79/126	nd	16.6 ± 1.0	31.1 ± 1.6	nd
3-butenyl isothiocyanate 51	1092	T	55/72/113	2907.0 ± 198.0	2042.1 ± 156.8	1901.2 ± 112.9	nd
n-butyl isothiocyanate 52	1107	S	72/100/115	2.8 ± 0.2	4.2 ± 0.3	4.0 ± 0.1	nd
3-methylbutyl isothiocyanate 53	1171	T	55/72/114	559.8 ± 37.1	802.0 ± 53.5	851.0 ± 36.0	nd
pentyl isothiocyanate 54	1207	T	72/101/129	19.9 ± 1.5	34.3 ± 2.4	44.3 ± 1.6	nd
4-methylpentyl isothiocyanate 55	1273	T	72/128/143	16.2 ± 0.6	30.8 ± 1.8	44.3 ± 2.3	nd
hexyl isothiocyanate 56	1305	S	72/115/128	4.8 ± 0.3	18.5 ± 1.5	21.3 ± 1.2	nd
3-methylthiopropyl isothiocyanate 57	1367	S	72/101/147	4010.5 ± 249.0	5108.6 ± 278.4	5661.7 ± 443.8	nd
benzyl thiocyanate 58	1391	T	65/91	168.6 ± 12.8	305.1 ± 17.7	316.1 ± 16.3	nd
phenylethyl isothiocyanate nitrogen compounds 59	1482	S	91/105/163	773.3 ± 52.1	1290.2 ± 67.2	1563.3 ± 40.9	1.4 ± 0.1
3-methylisothiazole 60	1119	T	59/72/99	41.5 ± 2.3	196.2 ± 15.4	582.0 ± 9.7	nd
4-(methylthio)butanenitrile 61	1195	T	61/115	25.1 ± 2.1	18.2 ± 1.2	75.4 ± 4.0	nd
benzyl nitrile 62	1254	T	51/90/117	nd	1.8 ± 0.1	5.3 ± 0.4	nd
benzothiazole	1324	T	69/108/135	nd	nd	nd	8.7 ± 0.7

Table 1. Continued

compound	RI ^a	ID ^b	QI ^c (m/z)	A/1000 ± SD ^d			
				seeds	6 days	9 days	leaves
63 benzenepropanenitrile	1330	S	65/91/131	5.5 ± 0.3	37.0 ± 2.2	76.0 ± 2.2	nd
64 2-methyl-3-(2 <i>H</i>)-isothiazolone	1447	T	61/87/115	53.5 ± 2.1	35.9 ± 1.0	69.9 ± 2.1	nd
miscellaneous compounds							
65 toluene	881	T	91/92	6.9 ± 0.4	17.6 ± 1.0	14.3 ± 0.9	26.4 ± 2.1
66 eugenol	1386	S	164	nd	nd	nd	0.9 ± 0.1
identified compounds				26	35	40	45
alcohols (Σ)				1 (1.7)	1 (16.4)	1 (26.6)	2 (93.0)
aldehydes (Σ)				2 (3.3)	5 (61.9)	8 (118.0)	12 (414.8)
esters (Σ)				1 (3.6)	2 (7.2)	3 (27.1)	5 (76.6)
ketones (Σ)				0	1 (2.4)	1 (1.9)	2 (94.1)
norisoprenoid derivatives (Σ)				0	3 (17.3)	3 (31.5)	12 (632.5)
terpenic compounds (Σ)				3 (4.1)	1 (9.8)	2 (17.1)	7 (49.3)
sulfur compounds (Σ)				14 (74410.4)	16 (59530.4)	16 (64810.2)	2 (146.0)
nitrogen compounds (Σ)				4 (125.6)	5 (289.0)	5 (808.6)	1 (8.7)
miscellaneous compounds (Σ)				1 (6.9)	1 (17.6)	1 (14.3)	2 (27.3)

^a Retention indices as determined on a HP-5 capillary column using the homologous series of *n*-alkanes. ^b Identification: T, tentatively identified by NIST05; S, identified by comparison with standard. ^c Quantification ions. ^d Mean area (in Kcounts) ± standard deviation of four replicates, analyzed in triplicate; nd, not detected.

when HS-SPME was applied to powdered samples and to an aqueous mixture, only vestigial amounts of ethanol were found (data not shown). Additionally, ionization was maintained off during the first minute of GC-MS analyses to avoid solvent overload. Ethanol eluted during this period, not influencing the elution of the samples' compounds.

Volatile Composition. The chromatographic profile of kale materials (Table 1) revealed the presence of 66 volatile compounds, distributed in several chemical classes: alcohols (1, 2), carbonyl compounds (aldehydes (3–14), esters (15–20), and ketones (21–23)), norisoprenoids (24–35), terpenes (36–42), sulfur compounds (43–58), nitrogen compounds (59–64), and other volatiles (65 and 66). As far as we know, all of these compounds are described for the first time in kale. From these, 26 compounds were found in seeds and 35 and 40 in sprouts at 6 and 9 days, respectively (Table 1). Kale leaves exhibited the highest diversity of volatiles, presenting 45 compounds (Table 1). Compounds such as 1-penten-3-ol (1), (*E*)-2-pentenal (4), (*E,E*)-2,4-heptadienal (9), (*E*)-2-octenal (12), (*E,Z*)-2,6-nonadienal (13), ethyl octanoate (17), ethyl decanoate (18), ethyl linoleate (20), 3-octen-2-one (22), (*E,E*)-3,5-octadien-2-one (23), 6-methyl-5-hepten-2-one (24), 2,2,6-trimethylcyclohexanone (25), isophorone (26), 6-methyl-5-hepten-2-ol (27), β -homocyclocitral (30), α -ionone (31), *trans*-geranylacetone (32), β -ionone (33), epoxy- β -ionone (34), dihydroactinidiolide (35), *m*-cymene (38), eucalyptol (40), *o*-cymene (41), benzothiazole (62), and eugenol (66) were detected only in this matrix (Table 1). Additional differences were found between materials in the distinct development stages.

Seeds and sprouts mainly contained sulfur compounds. With the exceptions of dimethyl disulfide (43) and dimethyl trisulfide (49), detected only in sprouts, all sulfur compounds were present in both materials. Plants that produce glucosinolates commonly accumulate them in all vegetative and reproductive parts (22). Seeds exhibited the highest contents, followed by sprouts. Assuming glucosinolates function in defense against herbivores and pathogens, the differences among the several stages of development are consistent with current theories on optimal distribution of defense substances (22–24). The reproductive organs, including seeds and their germinating form (sprouts), which contribute

most to plant fitness, are expected to have the highest concentrations of defense compounds (22).

Hexanal (5), (*E*)-2-hexenal (6), heptanal (7), (*E,E*)-2,4-heptadienal (9), octanal (10), phenylacetaldehyde (11), (*E,Z*)-2,6-nonadienal (13), (*E,E*)-3,5-octadien-2-one (23), 2,2,6-trimethylcyclohexanone (25), safranal (28), β -cyclocitral (29), β -homocyclocitral (30), α -pinene (36), β -pinene (37), limonene (39), allyl isothiocyanate (46), isobutyl isothiocyanate (48), dimethyl trisulfide (49), 3-butenyl isothiocyanate (50), 3-methylthiopropyl isothiocyanate (56), benzyl thiocyanate (57), phenylethyl isothiocyanate (58), benzothiazole (62), and eugenol (66) were previously reported in the leaves of other *B. oleracea* varieties (4, 12, 13, 15, 25). Additionally, hexanal (5), allyl thiocyanate (45), allyl isothiocyanate (46), 3-butenyl isothiocyanate (50), 3-methylbutyl isothiocyanate (52), 4-methylpentyl isothiocyanate (54), 3-methylthiopropyl isothiocyanate (56), and phenylethyl isothiocyanate (58) were also already described in *B. oleracea* var. *botrytis* seeds (15, 17).

Leaves were the material presenting the highest volatile content, β -ionone (33) being the major compound (Table 1). A number of biological activities have been described for this compound, namely, anticancer capacity (26), which may contribute to the known protective properties of kale. In addition, leaves exhibited the highest content of norisoprenoids (Table 1), which result from the oxidative cleavage of carotenoids (27). Carotenoids are tetraterpenoid pigments that are accumulated in the plastids of leaves, flowers, and fruits (27). This may explain the absence of norisoprenoids in the seeds and their reduced amounts in sprouts. In addition, norisoprenoid derivatives are important for the flavor of diverse food products (28).

Leaves also exhibited the highest content of aldehydes, alcohols, esters, and ketones (Table 1), which contribute to their green-leaf odor (14). With few exceptions, such as phenylacetaldehyde (11) and ethyl benzoate (16), which derive from amino acids (27), all of the identified aldehydes, alcohols, esters, and ketones are formed from fatty acids through a cascade of biochemical reactions (27). Only some of these compounds were detected in sprouts, and they were scarce in seeds. The rise in aldehydes, alcohols, ketones, and esters contents during kale development can be ascribed to the increased metabolic activity

Table 2. Glucosinolate Breakdown Products Identified in Kale and Their Precursors (8, 17)

glucosinolate precursor	glucosinolate derivative
glucoputranjivin	isopropyl isothiocyanate (44)
sinigrin	allyl thiocyanate (45)
	allyl isothiocyanate (46)
sec-butyl glucosinolate	2-butyl isothiocyanate (47)
isobutyl glucosinolate	isobutyl isothiocyanate (48)
gluconapin	3-butenyl isothiocyanate (50)
n-butyl glucosinolate	n-butyl isothiocyanate (51)
3-methylbutyl glucosinolate	3-methylbutyl isothiocyanate (52)
pentyl glucosinolate	pentyl isothiocyanate (53)
4-methylpentyl glucosinolate	4-methylpentyl isothiocyanate (54)
hexyl glucosinolate	hexyl isothiocyanate (55)
glucoiberberin	3-methylthiopropyl isothiocyanate (56)
glucotropaeolin	benzyl thiocyanate (57)
gluconasturtiin	phenylethyl isothiocyanate (58)

of seeds, which rapidly resume the biochemical pathway above-mentioned, after germination (27, 29).

Terpenes, an important group of compounds in leaves (Table 1), play an important role in the protection and reproduction of the plant; they have been described as toxins, repellents, or attractants to other organisms (30). In plants, terpenes are derived from the mevalonate (cytosol) or from the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (plastids) pathways (27, 31, 32). It is generally recognized that the cytosolic pathway provides the precursors for sesquiterpene and triterpene production, whereas the precursors of isoprene, monoterpenes, diterpenes, and tetraterpenes are supplied by plastids (27, 31, 32). From all terpenic compounds identified in leaves, only some were found in the other materials. The small amount of these secondary metabolites in seeds and sprouts can be explained by the fact that, during germination, these matrices direct all available nutrients to primary metabolism (33), whereas in leaves secondary metabolism allows terpene formation.

Sulfur compounds are the main class of compounds in seeds and sprouts. This results from the contribution of a single compound, allyl isothiocyanate (46) (Table 1), a hydrolysis product of sinigrin, already described as the predominant glucosinolate in kale (9). However, the richness of seeds and sprouts in sulfur compounds also arises from the contribution of other glucosinolate degradation products, such as 2-butyl isothiocyanate (47), isobutyl isothiocyanate (48), 3-butenyl isothiocyanate (50), 3-methylbutyl isothiocyanate (52), 3-methylthiopropyl isothiocyanate (56), and phenylethyl isothiocyanate (58). The identified isothiocyanates allowed us to infer the presence of 14 glucosinolate precursors in kale materials (Table 2). All of them were already reported in *Brassica* (2, 3, 8, 9, 11, 17). From those, gluconapin and gluconasturtiin were described in kale leaves (7), glucoiberberin was reported in its seeds (34), and sinigrin was reported in both materials (9). As far as we know, no studies revealed glucosinolates in kale sprouts.

Sulfur compounds (43–58) have important biological functions in plants and may also exert chemopreventive activity in humans (11). Nevertheless, numerous studies have demonstrated that glucosinolates exhibit outright toxicity and, consequently, isothiocyanates may contribute to the toxicity of their precursors (23). Due to their predominance, they most probably exert a relevant role in the characteristic aroma of seeds and sprouts. Dimethyl disulfide (43) and dimethyl trisulfide (49) derive from (+)-S-methyl-L-cysteine sulfoxide found in *Brassica* vegetables (3). However, sulfides can also be formed by subsequent degradation of some volatiles derived from glucosinolate breakdown (3).

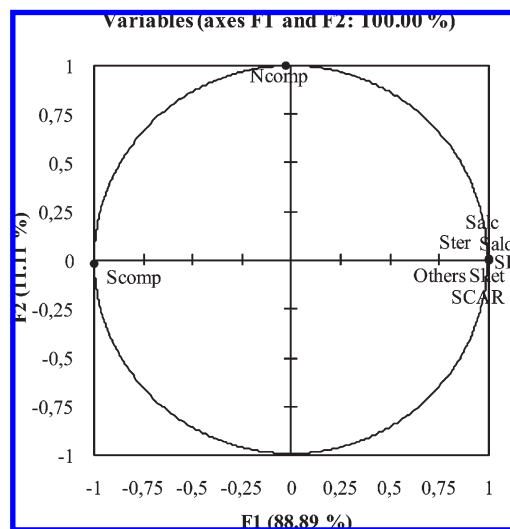


Figure 1. PCA of the volatile compounds in kale analyzed materials: projection of volatile compounds (variables: Salc, sum of alcohols; Sald, sum of aldehydes; SE, sum of ester compounds; Sket, sum of ketones; Ncomp, sum of nitrogen compounds; SCAR, sum of carotenoid molecules; Scomp, sulfur compounds; Ster, sum of terpenes; others, miscellaneous compounds) into the plane composed by the principal axes F1 and F2.

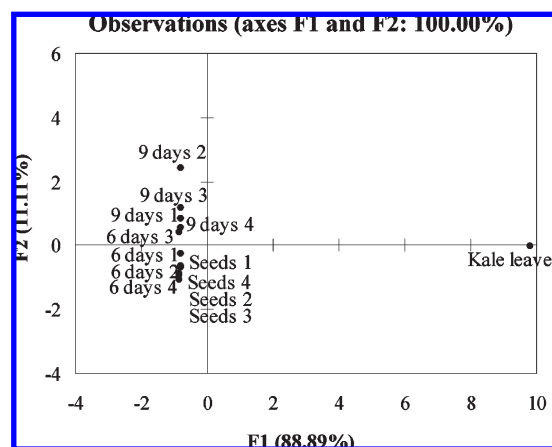


Figure 2. PCA of the volatile compounds in kale seeds, sprouts at 6 and 9 days, and leaves: projection of samples (seeds 1, seeds 2, seeds 3, seeds 4, 6 days 1, 6 days 2, 6 days 3, 6 days 4, 9 days 1, 9 days 2, 9 days 3 and 9 days 4) into the two principal components.

Statistical Analyses. To assess the variation of volatile composition during kale sprouting, PCA was performed on obtained data. Figures 1 and 2 show the projection of chemical variables, grouped by families (sum of compounds of each chemical class), in all materials (seeds, sprouts, and leaves) into the plane composed by the principal axes F1 and F2 containing 100.00% of the total variance.

Concisely, kale leaves have a high positive correlation with all volatiles, except sulfur compounds. In contrast, seeds and sprouts are in very high correlation with sulfur compounds, which may reflect the need to maximize the defensive potential of these reproductive stages of the growth cycle, whereas kale leaves mostly use terpenic compounds as defense (35).

To get more information about seeds and sprouts, a similar PCA was performed without leaf samples. Figures 3 and 4 show the projection of chemical variables, grouped by families (sum of compounds of each chemical class), in seeds and sprouts into the plane of F1 and F2 containing 88.15% of the total variance.

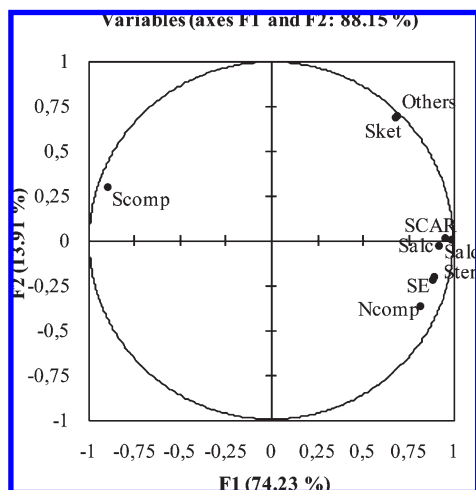


Figure 3. PCA of all the volatile compounds in kale seeds and sprouts: projection of volatile compounds (variables: Salc, sum of alcohols; Sald, sum of aldehydes; SE, sum of ester compounds; Sket, sum of ketones; Ncomp, sum of nitrogen compounds; SCAR, sum of carotenoid molecules; Scomp, sulfur compounds; Ster, sum of terpenes; others, miscellaneous compounds) into the plane composed by the principal axes F1 and F2.

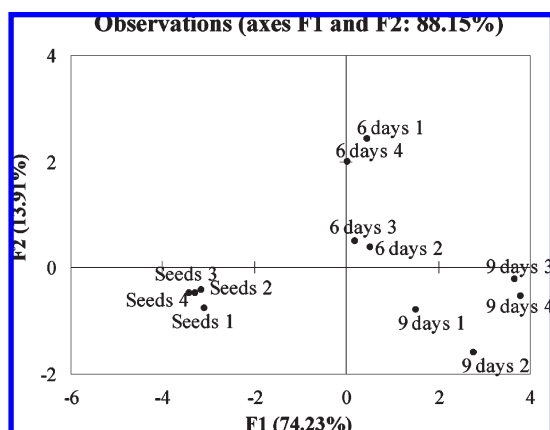


Figure 4. PCA of the volatile compounds in kale seeds and sprouts: projection of samples (seeds 1, seeds 2, seeds 3, seeds 4, 6 days 1, 6 days 2, 6 days 3, 6 days 4, 9 days 1, 9 days 2, 9 days 3, and 9 days 4) into the two principal components.

Sulfur compounds decrease during kale development, suggesting that these can be important constituents for the sprouting process. In addition, the transport of glucosinolates (precursors of (iso)thiocyanates and nitriles) from mature leaves to seeds, via phloem, was demonstrated (23). On the other hand, reproductive organs are also able to synthesize some of their own glucosinolates (23).

The divergent sulfur composition of seeds and the fact that the absolute amount of these compounds in this matrix is higher than that in the other stages of plant development also supports de novo synthesis of glucosinolates in these organs (22). With regard to volatile alcohols, aldehydes, esters, ketones, terpenes, and norisoprenoids formed during plant growth, reaching a maximum in fully developed leaves, it was shown that carbohydrates, fatty acids, and amino acids represent the natural carbon pools, which can also be liberated from their polymers (27, 36). The higher absolute amount of sulfur compounds in seeds and the rise of alcohols, aldehydes, esters,

ketones, terpenes, and norisoprenoids until the plant has fully matured have already been observed in other *Brassica* species (12, 13, 15, 25).

In summary, as far as we know, the present study is the first report on the evolution of volatiles from seeds to mature plant. According to the results obtained, it may be anticipated that the volatile profile varies in accordance with the plant's development stage. In addition, kale's vegetal material, namely, seeds and sprouts, may have a wide biological potential, which include both negative (outright toxicity) and positive (chemoprotective effect against certain cancers) nutritional attributes. The rapid changes in glucosinolate profile that occur during germination and early seedling growth make the duration of the sprouting period to be a particularly relevant factor in maximizing the concentration of the desirable bioactive compounds. Therefore, the importance of the production and commercialization of *Brassica* sprouts is incremented.

LITERATURE CITED

- (1) Sousa, C.; Lopes, G.; Pereira, D. M.; Taveira, M.; Valentão, P.; Seabra, R. M.; Pereira, J. A.; Baptista, P.; Ferreres, F.; Andrade, P. B. Screening of antioxidant compounds during sprouting of *Brassica oleracea* L. var. *costata* DC. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2007**, *10*, 377–386.
- (2) Bellostas, N.; Kachlicki, P.; Sørensen, J. C.; Sørensen, H. Glucosinolate profiling of seeds and sprouts of *B. oleracea* varieties used for food. *Sci. Hortic.* **2007** (in press).
- (3) Blažević, I.; Mastelić, J. Glucosinolate degradation products and other bound and free volatiles in the leaves and roots of radish (*Raphanus sativus* L.). *Food Chem.* **2009**, *113*, 96–102.
- (4) Buttery, R. G.; Guadagni, D. G.; Ling, L. C.; Seifert, R. M.; Lipton, W. Additional volatile components of cabbage, broccoli, and cauliflower. *J. Agric. Food Chem.* **1976**, *24*, 829–832.
- (5) Wallbank, B. E.; Wheatley, G. A. Volatile constituents from cauliflower and other crucifers. *Phytochemistry* **1976**, *15*, 763–766.
- (6) MacLeod, A. J.; Pikk, H. E. Volatile flavor components of fresh and preserved Brussels sprouts grown at different crop spacings. *J. Food Sci.* **1979**, *44*, 1183–1185.
- (7) Velasco, P.; Cartea, M. E.; González, C.; Vilar, M.; Ordás, A. Factors affecting the glucosinolate content of kale (*Brassica oleracea* acephala group). *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 955–962.
- (8) Fahey, J. W.; Zalcmann, A. T.; Talalay, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 5–51.
- (9) Kushad, M. M.; Cloyd, R.; Babadoost, M. Distribution of glucosinolates in ornamental cabbage and kale cultivars. *Sci. Hortic.* **2004**, *101*, 215–221.
- (10) Rosa, E. A. S.; Heaney, R. K.; Fenwick, G. R.; Portas, C. A. M. Glucosinolates in crop plants. *Hortic. Rev.* **1997**, *19*, 99–215.
- (11) Wim, B. Y.; Jongen, M. F. Glucosinolates in *Brassica*: occurrence and significance as cancer-modulating agents. *Proc. Nutr. Soc.* **1996**, *55*, 433–446.
- (12) Clapp, R. C.; Long, L. Jr.; Dateo, G. P.; Bisset, F. H.; Hasselstrom, T. The volatile isothiocyanates in fresh cabbage. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 6278–6281.
- (13) Bailey, S. D.; Bazinet, M. L.; Driscoll, J. L.; McCarthy, A. I. The volatile sulphur components of cabbage. *J. Food Sci.* **1961**, *26*, 163–170.
- (14) Paré, P. W.; Tumlinson, J. H. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiol.* **1999**, *121*, 325–331.
- (15) Valette, L.; Fernandez, X.; Poulain, S.; Loiseau, A.-M.; Lizzani-Cuvelier, L.; Leveil, R.; Restier, L. Volatile constituents from Romanesco cauliflower. *Food Chem.* **2003**, *80*, 353–358.
- (16) Kondo, H.; Nozaki, H.; Hawaguchi, T.; Naoshima, Y.; Hayashi, S. The effect of germination upon the volatile components of rape seeds (*Brassica napus* L.). *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48*, 1891–1893.
- (17) Valette, L.; Fernandez, X.; Poulain, S.; Lizzani-Cuvelier, L.; Loiseau, A.-M. Chemical composition of the volatile extracts from

- Brassica oleracea* L. var. *botrytis* 'Romanesco' cauliflower seeds. *Flavour Fragrance J.* **2006**, *21*, 107–110.
- (18) Zhao, D.; Tang, J.; Ding, X. Analysis of volatile components during potherb mustard (*Brassica juncea*, Coss.) pickle fermentation using SPME-GC-MS. *LWT—Food Sci. Technol.* **2007**, *40*, 439–447.
 - (19) Guedes de Pinho, P.; Ribeiro, B.; Gonçalves, R. F.; Baptista, P.; Valentão, P.; Seabra, R. M.; Andrade, P. B. Correlation between the pattern volatiles and the overall aroma of wild edible mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1704–1712.
 - (20) Guedes de Pinho, P.; Gonçalves, R. F.; Valentão, P.; Pereira, D. M.; Seabra, R. M.; Andrade, P. B.; Sottomayor, M. Volatile composition of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don using solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *49*, 674–685.
 - (21) Di, X.; Shellie, R. A.; Marriot, P. J.; Huie, C. W. Application of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC) for the chemical profiling of volatile oils in complex herbal mixtures. *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 451–458.
 - (22) Brown, P. D.; Tokuhisa, J. G.; Reichelt, M.; Gershenzon, J. Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 471–481.
 - (23) Halkier, B. A.; Gershenzon, J. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2006**, *57*, 303–333.
 - (24) Mithen, R. Glucosinolates—biochemistry, genetics and biological activity. *Plant Growth Regul.* **2001**, *34*, 91–103.
 - (25) MacLeod, A. J.; MacLeod, G. Volatiles of cooked cabbage. *J. Sci. Food Agric.* **1968**, *19*, 273–277.
 - (26) Liu, J.-R.; Sun, X.-R.; Dong, H.-W.; Sun, C.-H.; Sun, W.-G.; Chen, B.-Q.; Song, Y.-Q.; Yang, B.-F. β -ionone suppresses mammary carcinogenesis, proliferative activity and induces apoptosis in the mammary gland of the Sprague–Dawley rat. *Int. J. Cancer* **2008**, *122*, 2689–2698.
 - (27) Schwab, W.; Davidovich-Rikanati, R.; Lewinsohn, E. Biosynthesis of plant-derived flavour compounds. *Plant J.* **2008**, *54*, 712–732.
 - (28) Goff, S. A.; Klee, H. J. Plant volatile compounds: sensory cues for health and nutritional value?. *Science* **2006**, *311*, 815–819.
 - (29) Pracharoenwattana, I.; Cornah, J. E.; Smith, S. M. Arabidopsis peroxisomal citrate synthase is required for fatty acid respiration and seed germination. *Plant Cell* **2005**, *17*, 2037–2048.
 - (30) Gershenzon, J.; Dudareva, N. The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 408–414.
 - (31) Dudareva, N.; Pichersky, E.; Gershenzon, J. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol.* **2004**, *135*, 1893–1902.
 - (32) Aharoni, A.; Jongsma, M. A.; Bouwmeester, H. J. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends Plant Sci.* **2005**, *10*, 594–602.
 - (33) Bellani, L. M.; Guarnieri, M.; Scialabba, A. Differences in the activity and distribution of peroxidases from three different portions of germinating *Brassica oleracea* seeds. *Physiol. Plant.* **2002**, *114*, 102–108.
 - (34) West, L. G.; Meyer, K. A.; Balch, B. A.; Rossi, F. J.; Schultz, M. R.; Haas, G. W. Glucoraphanin and 4-hydroxyglucobrassicin contents in seeds of 59 cultivars of broccoli, raab, kohlrabi, radish, cauliflower, brussels sprouts, kale, and cabbage. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 916–926.
 - (35) Howe, G. A.; Jander, G. Plant immunity to insect herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59*, 41–66.
 - (36) Croteau, R.; Karp, F. Origin of natural odorants. In *Perfumes. Art, Science and Technology*; Muller, P. M., Lamparsky, D., Eds.; Elsevier Applied Science: London, U.K., 1991; pp 101–126.

Received March 9, 2009. Revised manuscript received June 29, 2009. Accepted July 4, 2009. We acknowledge Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) for financial support (PTDC/AGR-AAM/64150/2006). F.F. is grateful to FCT for a grant (SFRH/BD/37963/2007).

4.7. Does kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) really protects against oxidative stress?

Submetido para publicação

Does Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) Really Protects against Oxidative Stress?

Fátima Fernandes[†], Carla Sousa[†], Federico Ferreres[‡], Patrícia Valentão[†], Fernando Remião[§], José A. Pereira[¶], Paula B. Andrade^{†,*}

[†] *REQUIMTE/Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Química, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal.*

[‡] *Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Department of Food Science and Technology, CEBAS (CSIC), P.O. Box 164, 30100 Campus University Espinardo, Murcia, Spain.*

[§] *REQUIMTE/Laboratório de Toxicologia, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal.*

[¶] *CIMO/School of Agriculture, Polytechnic Institute of Bragança, Campus Sta Apolónia, Apt. 1171, 5301-854 Bragança Portugal*

ABSTRACT: In this study the biological activity of methanolic and aqueous extracts of *Brassica oleracea* var. *acephala* (kale) was evaluated, using hamster lung fibroblast (V79 cells) under quiescent conditions and subjected to H₂O₂-induced oxidative stress. Several materials of *Pieris brassicae*, a pest of *Brassica* cultures, which already revealed to generally have a stronger antioxidant potential than kale, were also evaluated. All extracts failed to protect V79 cells against H₂O₂-induced toxicity, as evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) and glutathione assays. To assess possible relations between composition and cell response, phenolic profiles of methanolic extracts were established by HPLC-DAD. These extracts present the same kind of compounds previously reported for the aqueous ones (acylated and nonacylated flavonoid glycosides, some of them sulphated, and hydroxycinnamic acyl gentiobiosides). These results emphasize that the claimed antioxidant potential of phenolic compounds rich extracts currently observed in cell free systems is not always confirmed in cellular models.

KEYWORDS: *Brassica oleracea* L. var. *acephala*; *Pieris brassicae* L.; phenolic compounds; V79 cells; oxidative stress; glutathione status

INTRODUCTION

Several epidemiological studies have indicated that regular consumption of fruits and vegetables is strongly associated with a reduced risk of developing chronic diseases, such as atherosclerosis, diabetes, certain cancers, cardiovascular diseases, ischemia and neurodegenerative disorders, like Alzheimer's and Parkinson's.¹⁻⁵

Extensive studies have suggested that reactive oxygen species (ROS) are major causes of these diseases.^{6,7} ROS include oxygen-centred free radicals, like superoxide anion, hydroxyl and peroxy, and non-radical species, such as hydrogen peroxide. They can be produced endogenously, namely by normal respiration, or result from exogenous sources.⁶

The chemopreventive properties of fruits and vegetables probably arise from their high content in protective phytochemicals, such as phenolic compounds.⁸ Dietary phytophenolics have been widely recognized as beneficial antioxidants that can scavenge harmful ROS.^{6,9} In fact, studies using cell cultures demonstrated that flavonoids, like kaempferol, quercetin and their glycosides, have antioxidant activity. They affect the redox status of cells, protecting them from oxidative stress induced by reactive species, particularly ROS.^{6,10-13} In contrast to their antioxidant activity, phenolics also have the potential to act as prooxidants under certain conditions. The prooxidant properties of flavonoids and other polyphenols could contribute to tumour cell apoptosis and cancer chemoprevention induced by oxidant species.¹⁴

Plants of Brassicaceae family are commonly grown and consumed worldwide. *Brassica oleracea* varieties have been intensively studied and are an important dietary source of bioactive compounds, including glucosinolates and phenolics, like flavonols and hydroxycinnamic acid derivatives.^{2,15,16} In fact, *Brassica* species are an

inexhaustible source of compounds, and new classes of secondary metabolites and bioactivities are still being discovered.¹⁷ Among *Brassica* vegetables, kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) is important in traditional farming systems in the Iberian Peninsula and their leaves are consumed fresh or after cooking, as soup.

The role of the several classes of compounds in shaping insect-plants relationships has known a great impulse over the last few years. As already reported by our group, phenolic compounds have a role in the modulation of the feeding of herbivore organisms, such as *Pieris brassicae*, a common pest of *Brassica* cultures. This insect revealed ability to sequester, metabolize (by deacylation, deglycosylation and sulphating reactions) and excrete phenolics obtained from distinct host plants.^{15,18-22} Furthermore, *P. brassicae* materials (butterfly, larvae and its excrements) reared on kale proved to have a better antioxidant potential than host plant, depending on the radical species studied in cell free systems.¹⁵ For instance, the butterflies scored first against DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and nitric oxide (NO), while having no effect against superoxide. The larvae also showed antioxidant potential against the first two radicals. On the other hand, kale and the larvae excreted materials exhibited activity against DPPH, NO and also superoxide. As so, *P. brassicae* may have interest as antioxidant, allowing taking profit from the destruction caused in *Brassica* cultures. For example, it may be a source of bioactive compounds and be used in the future in dietary supplements.

It is known that the antioxidant activity of matrices is dependent on the test system used.²³ Extracts that reveal high antioxidant potential in cell free systems can be either protective or toxic in cellular assays, depending on extract concentrations and cellular conditions.²⁴ The differences can be explained by the lack of interactions of the

extract components with endogenous macromolecules, absorption barriers and biotransformation reactions in cell free systems.⁷

So, cellular assays are frequently used to study the mechanism of action of extracts, once cells more closely reflect antioxidant activity within an organism.²⁴ It has already been reported that kale has a very high chemopreventive potential against several tumour cell lines (stomach, pancreas, breast, prostate, lung, kidney, medulloblastoma and glioblastoma).¹ The antiproliferative activity targets cancer cells at the promotion and progression stages, while antioxidant activity is involved in cancer prevention at the initiation stage. Although these authors confirmed the high antioxidant potential of kale in cell free systems, kale's effect on non-tumour cells was not reported.

Thus, this work intended to characterize the antioxidant capacity of kale and materials of *P. brassicae* reared on this plant in hamster lung fibroblast (V79 cells) subjected to an exogenous source of oxidative stress. Hydrogen peroxide (H₂O₂) was chosen because this oxidant species can easily cross the cellular membranes. In order to have a more comprehensive understanding of the potential benefits of these natural matrices, two different extracts were assayed: aqueous extracts, which simulate the usual way of kale consumption, and methanolic extracts that can be used to prepare food supplements enriched in bioactive compounds.

The effects of these extracts in V79 cells under quiescent conditions and exposed to oxidative stress were evaluated using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) as an indicator of cell viability. Because reduced glutathione (GSH) is involved in cellular defence against H₂O₂, the effect of the extracts in the homeostasis of this endogenous antioxidant was also evaluated. Additionally, phenolic composition of the extracts was determined by high performance liquid

chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD) in order to establish possible relations with the cellular effects.

MATERIALS AND METHODS

Standards and Reagents. Ferulic and sinapic acids, quercetin-3-*O*-glucoside, kaempferol-3-*O*-rutoside and isorhamnetin-3-*O*-glucoside were from Extrasynthèse (Genay, France). Methanol, acetic acid and hydrogen peroxide were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Dimethyl sulfoxide (DMSO), MTT, bovine serum albumin (BSA), β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form (NADPH), 5,5'-dithiobis(2-nitro-benzoic acid) (DTNB), potassium hydrogen carbonate (KHCO_3), perchloric acid (HClO_4), sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), sodium hydroxide (NaOH), potassium sodium tartrate ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), cupric sulphate (CuSO_4), Folin-Ciocalteu reagent, reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), glutathione reductase (GR) (EC 1.6.4.2) and 2-vinylpyridine were from Sigma, (St. Louis, MO, USA).

Reagents for cell culture were obtained from Invitrogen (Gibco, U.S.A): Dulbecco's modified Eagle's medium (4.5 g/L glucose, with l-glutamine and pyruvate; DMEM), phosphate-buffered saline (PBS), trypsin (2.5%), penicillin (5,000 U/mL)-streptomycin (5 $\mu\text{g/mL}$) and foetal bovine serum (FBS).

Water was treated in a Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) water purification system.

Samples. Wild *P. brassicae* larvae were collected in Bragança (Northeast Portugal) and taken to the laboratory to complete their life cycle, including oviposition in kale (*B. oleracea* var. *acephala*) leaves. Identification was performed by José A. Pereira, Ph.D. (CIMO). Larvae fed with kale *ad libitum* were allowed to develop until the fourth instar and kept without food for 12 h before freezing. The excrements were also collected and frozen. Other larvae were allowed to reach the adult stage, being collected less than 24 h after eclosion.

P. brassicae (larvae, excrements and butterflies) and kale leaves were freeze-dried. The dried material was powdered and kept in a desiccator in the dark until analysis. Voucher specimens were deposited at Laboratory of Pharmacognosy from the Faculty of Pharmacy of Porto University.

Extracts' Preparation. Aqueous extracts of kale leaves and *P. brassicae* materials were prepared by boiling ca. 1.0 g dried powdered sample for 30 min, in 800 mL water. Extracts were filtered by Büchner funnel and lyophilized. Yields of ca. 200.9 mg (butterflies), 685.9 mg (larvae), 396.7 mg (excrements), and 413.0 mg (kale) were obtained. The aqueous lyophilized extracts were kept in a desiccator in the dark until analysis.

For methanolic extracts preparation, each sample (ca. 2.7 g) was thoroughly mixed with methanol (3 × 100 mL, at 600 rpm, for 1 hour) and then filtered through a Büchner funnel. The methanolic extracts were concentrated to dryness under reduced pressure (40°C), and redissolved in ca. 50 mL acidic water (pH 2 with HCl). For phenolics purification, the obtained solution was passed through a C18 non-end-capped (NEC) column (50 µm particle size, 60 Å porosity, 10 g of sorbent mass/70 mL of reservoir volume; Chromabond, Macherey-Nagel, Germany). The column was previously conditioned with 30 mL of methanol and 70 mL of acidic water. The

phenolic fraction retained in the column was then eluted with methanol (ca. 50 mL). The methanolic extract was evaporated to dryness under reduced pressure (40°C), redissolved in methanol and filtrated through 0.22 µm size pore membrane.

HPLC-DAD Phenolic Compounds Analysis. Analyses were performed as previously described,¹⁵ using a HPLC-DAD unit (Gilson) and a Spherisorb ODS2 (25.0 x 0.46 cm; 5 µm particle size) column. Elution was developed with acetic acid 1% (A) and methanol (B), using the following gradient (1 mL/min): 0 min - 10% B, 30 min - 40% B, 35 min - 60% B, 37 min - 80% B, 50 min - 94% B. Detection was achieved with a Gilson diode array detector. Spectroscopic data from all peaks were accumulated in the range 240-400 nm, and chromatograms were recorded at 330 nm. The different phenolic compounds were identified by comparing their chromatographic behavior and UV-vis spectra with authentic standards and with data previously obtained by our group, using the same analytical conditions.¹⁵

Phenolic compounds quantification was achieved by the absorbance recorded in the chromatograms relative to external standards. Sinapic and ferulic acid derivatives were quantified as sinapic and ferulic acid, respectively. Since standards of several identified compounds were not commercially available, kaempferol, isorhamnetin and quercetin derivatives were quantified as kaempferol-3-*O*-rutinoside, isorhamnetin-3-*O*-glucoside and quercetin-3-*O*-glucoside, respectively.

Cell Culture and Treatments. V79 cells (hamster lung fibroblasts) are reported to respond to oxidative stress.¹¹ In order to study the antioxidant activity of methanolic and aqueous extracts of kale and *P. brassicae* materials V79 line was used, following the method described by Carmo and colleagues,²⁵ with modifications.

Cells were maintained and grown as a monolayer in culture plastic flasks (75 cm²). The culture medium was DMEM, containing 10% heat-inactivated foetal bovine

serum, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 1% non-essential amino acids. Cells were kept in an incubator at 37 °C with a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. When cell cultures were 90–100% confluent, they were washed with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), detached with 0.25% trypsin-EDTA, centrifuged and seeded at a density of 1.0×10^4 cells/cm². After confluence, medium was removed and cells were gently washed with warm PBS.

The aqueous and methanolic extracts of kale and *P. brassicae* materials were tested in concentrations ranging from 0.01 to 16.69 mg/mL and from 0.22 to 135 mg/mL, respectively. Aqueous extracts were redissolved in medium and methanolic extracts in medium containing 0.1 % (v/v) DMSO. The final concentration of DMSO did not affect cells viability.

To determine the effect of kale and *P. brassicae* materials, cellular viability and glutathione homeostasis were measured after 24 h extracts' exposure.

The potential protective effect against oxidative stress induced by H₂O₂ was also evaluated. For this purpose, in order to establish the H₂O₂ levels that resulted in 50% cell death, V79 cells were exposed to 37.5 to 150 µM (final concentration) H₂O₂, for different periods (from 0.5 to 1 hour). Attending to the results obtained (data not show), 30 min exposure to 37.5 µM H₂O₂ was selected. So, cells were pre-treated for 24 h with the extracts and then exposed to H₂O₂ according to the selected conditions, being further incubated for 0.5 hour before determination of cellular viability and glutathione parameters.

Cell Viability - MTT Reduction Assay. Mitochondrial function assessed by the reduction of MTT to formazan is a method widely accepted as a reliable means of measuring cell viability *in vitro*.²⁶ MTT was measured as described before by Sousa and collaborators.²⁴ Briefly, after cells exposure to extract, or extract plus H₂O₂, the medium

was removed and the cells were incubated for 30 minutes, at 37 °C, with culture medium containing 0.5 mg/mL MTT. Afterwards, the solution was removed and formazan crystals were solubilized with 250 µL DMSO. The resulting purple solution was measured spectrophotometrically at 570 nm. Data are presented as the percentage of MTT reduction of treated cells relative to control, either with or without H₂O₂. Four independent assays were conducted, each one of them in quadruplicate.

GSH_t and GSSG Determination. The cellular glutathione (GSH_t) levels were determined by the DTNB-GSSG reductase recycling assay after protein precipitation with perchloric acid, as described before.²⁴ Oxidized glutathione (GSSG) was determined after sample pre-treatment with 2-vinylpyridine.

Measurement of Protein Content. Protein content was measured using Lowry method with bovine serum albumin as a standard, as previously described.²⁷

Statistical Analysis. Comparisons were performed by two-way analysis of variance (ANOVA), with the Bonferroni *post hoc* test, using GraphPad Prism 5 software. Results represent the mean ± standard error of four experiments. P values lower than 0.05 were considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical Composition. *HPLC-DAD Phenolic Compounds Qualitative Analysis.* In order to get the chemical characterization of the methanolic extracts of kale and of *P. brassicae* butterflies, larvae and its excrements, phenolic compounds were identified and quantified by HPLC-DAD. In general, the qualitative composition of these extracts

revealed to be similar to that of the aqueous ones of the same materials previously studied.¹⁵

Methanolic extracts of kale (Figure 1), *P. brassicae* larvae (Figure 2A) and its excrements (Figure 2B) contained four groups of phenolic compounds: non acylated flavonoid glycosides (compounds **1**, **2**, **4**, **5**, **8**, **9**, **18-20**, **23**, **26**, **32-35**, **37**, **39**, **41-44**), flavonoid glycosides acylated with hydroxycinnamic acids (**3**, **6**, **7**, **10-17**, **21**, **22**, **24**, **25**, **27**, **36**, **38**, **40**, **45** and **46**), hydroxycinnamic acyl gentiobiosides (**28-31**) and free hydroxycinnamic acids (**FA**, **SA**).

The methanolic extract of kale leaves was characterized by the presence of sixteen kaempferol derivatives, nine quercetin derivatives, two isorhamnetin glycosides and four phenolic acids heterosides (Figure 1).

Compounds **23**, **26**, **32** and **33** detected in *P. brassicae* larvae methanolic extract (Figure 2A) were already described in the aqueous one.¹⁵ In addition to these compounds, sinapic and ferulic acids were also found (Figure 2A). These phenolic acids were already described by our group in *P. brassicae* larvae fed with *Brassica rapa* var. *rapa*^{19,21} or with *B. oleracea* var. *costata*.²⁰ The existence of these phenolic acids in the two referred *P. brassicae* larvae extracts is due to their occurrence in high content in the host plants, which does not happen in kale.¹⁵

The presence of these two free hydroxycinnamic acids in *P. brassicae* analyzed in this work can result from larvae metabolism, by deacylation of sugars in position 3 of acylated flavonoids (compounds **7**, **10-15**, **21**, **22**, **25** and **27**) or from the deglycosilation of hydroxycinnamic acyl gentiobiosides (compounds **28-31**) found in kale. These compounds were detected only in the methanolic extracts, which may be due to a more effective extraction by this solvent than by boiling water.

Concerning *P. brassicae* excrements, six non-acylated glycosyl flavonols (**2**, **5**, **8**, **19**, **23** and **26**) were detected (Figure 2B), as previously verified in the aqueous extract.¹⁵ Other non-acylated glycosides present in excrements, and not detected in kale leaves, were kaempferol (**32-35**, **37**, **42** and **43**), quercetin (**41**) and isorhamnetin (**39** and **44**) derivatives (Table 1). In addition, as in the aqueous extract,¹⁵ flavonol sulphated derivatives were also noted in the excrements methanolic extract (**32**, **33** and **41**) (Figure 2B, Table 1). Since these compounds are found only in small amounts in *P. brassicae* larvae, their occurrence at higher amounts in excrements seems to indicate that they are mainly excreted by the insect.

As described before for *P. brassicae* butterfly aqueous extract,¹⁵ no phenolic compound was characterized in the methanolic one.

Phenolic Compounds Quantitative Analysis. To better characterize the extracts used in cellular assays, the phenolic compounds were also quantified by HPLC-DAD (Table 1). The highest total phenolics content was found in kale leaves methanolic extract (ca. 3780 mg/Kg phenolic compounds), followed by *P. brassicae* larvae and its excrements, with 272 and 49 mg/Kg, respectively (Table 1).

The pairs **26** plus **27**, the group **11**, **12** plus **13** and compound **14** were the main phenolics in kale, representing ca. 25 %, 23 % and 15 % of total compounds, respectively (Table 1). This last compound and the group **5**, **6** plus **7** constituted the major phenolics in kale aqueous extract.¹⁵

Concerning *P. brassicae* larvae, the main compound was sinapic acid, corresponding to 70% of total identified compounds. Compound **26**, the compound in highest amounts in *P. brassicae* larvae aqueous extract,¹⁵ represented ca. 21 % of total phenolics in the methanolic one.

In *P. brassicae* excrements' methanolic extract, compound **14** and the pair **12** plus **13** were the major ones (ca. 21 % and 16 %, respectively) (Table 1). Compound **26**, which was predominant in the aqueous extract,¹⁵ corresponded to only ca. 5 % of total quantified phenolics in the methanolic extract.

In a general way, kale and *P. brassicae* excrements methanolic extracts revealed lower phenolic compounds content than the aqueous ones.¹⁵ A deeper comparison reveals that in both kale extracts there is a similar content of non acylated (ca. 32 % and 28 %, respectively) and acylated flavonols (ca. 68 % and 70 %, respectively) (Figure 3). However, kale methanolic extract revealed more hydroxycinnamic gentiobiosides (ca. 2.0 %) than the aqueous one (ca. 0.8 %)¹⁵ (Figure 3). Excrements' aqueous extract revealed higher content of non acylated flavonoids than the methanolic one (ca. 69 % and 37 %, respectively)¹⁵ (Figure 3). On the other hand, acylated flavonoids represented ca. 57% of total phenolic compounds in excrements methanolic extract (Figure 3), nearly twice the amount found in the aqueous one. *P. brassicae* larva was the matrix that showed bigger differences between aqueous and methanolic extracts (Figure 3). An increase of nearly 10 fold in phenolic compounds content of methanolic extract was verified when compared with the aqueous extract¹⁵ (Table 1). This higher amount mainly results from ferulic and sinapic acids contribution (ca. 73 % of total phenolic compounds) (Figure 3, Table 1).

Biological Activity. *H₂O₂ Induced Toxicity in V79 Cells.* Hydrogen peroxide can easily penetrate in cell membranes, producing deleterious effects within the original or neighbouring cells, being regarded as one of the principal intermediaries of cytotoxicity induced by oxidative stress.¹⁰

Cell viability was assessed by evaluating mitochondrial function (MTT assay). The mitochondrial dehydrogenases of viable cells, in contrast to dead cells, cleave the

tetrazolium ring of the yellow MTT to yield purple formazan, which can be measured to assess cellular viability.²⁶

In order to evaluate the potential protective effects of the extracts, V79 cells were exposed to 37.5 μM H_2O_2 for 30 min, because under these conditions cellular viability was reduced by ca. 50% (data not shown).

Effects of Kale and P. brassicae Extracts on V79 Cells Viability. The aqueous extracts of *P. brassicae* materials, as well as that of the host plant, did not exert any toxic effects on V79 cells by themselves over the tested concentrations range. MTT reduction was higher than 97 % of control for all extracts in all tested concentrations (Figure 4).

Additionally, it was observed a significant increase in MTT reduction of cells treated with kale and *P. brassicae* excrements with extracts concentrations of 12 mg/mL and 3 mg/mL dry weight, respectively (MTT reduction higher than 115 %) (Figure 4). As the experiments were carried out after cellular confluence, these results are hardly explained by an increase in cellular proliferation. It is possible that the cell stress caused by the extracts increased mitochondrial activity, and consequently MTT reduction.²⁸

Kale and *P. brassicae* materials methanolic extracts were also tested. With the exception of *P. brassicae* excrements extract (which showed MTT reduction higher than 96 % for all concentrations), the other extracts were cytotoxic to V79 cells for the highest concentration tested (Figure 5). For this concentration, cellular viability as ascertained by the results for MTT reduction was ca. 46% for kale; 7% for larvae and 29% for butterflies. *P. brassicae* larvae and butterfly methanolic extracts already showed a tendency to be toxic to V79 cells at 27 mg/mL (Figure 5).

Due to the chemical complexity of the extracts, it is not easy to point which compounds are responsible for the displayed activity. In order to assess the possible role

of glycosylated flavonoids, an important class of compounds in both methanolic and aqueous extracts, kaempferol-3-*O*-rutinoside was tested at concentrations representative of kaempferol derivatives in the extracts (0.001 – 0.595 mg/mL). On the other hand, the contribution of ferulic and sinapic acids, found only in *P. brassicae* larvae and excrements methanolic extracts, was also evaluated, at the concentrations corresponding to their content in those matrices (0.0415 – 3.36 µg/mL for ferulic acid and 0.318 – 25.8 µg/mL for sinapic acid). No toxic effects on V79 cells were observed with these compounds (Figure 6).

Effect of Kale and P. brassicae Extracts on Cellular Hydrogen Peroxide-Induced Toxicity. *P. brassicae* materials and host kale aqueous extracts have previously exhibited scavenging capacity against DPPH, superoxide and nitric oxide radicals in non-cellular systems.¹⁵ However, antioxidant capacity observed in cell-free systems should be confirmed by cellular models, as some activities of the compounds may not be evaluated in chemical systems, or the concentrations required to scavenge prooxidant species may be deleterious to the cells.²⁴

To evaluate the protective effect of kale and *P. brassicae* materials aqueous and methanolic extracts, V79 cells were pre-treated with different extract concentrations before exposition to H₂O₂. None of the studied extracts provided protection. Furthermore, in a general way, at the highest tested concentrations both types of extracts aggravated the toxicity induced by H₂O₂ (Figures 4 and 5).

The deleterious effect was significant for the highest tested concentrations of *P. brassicae* larvae and excrements aqueous extracts: cellular viability decreased 38 % and 50 % with 7.9 mg/mL of *P. brassicae* larvae extract and 16.7 mg/mL excrements extract, respectively, compared to cells exposed only to H₂O₂ (Figure 4). The observed potentiation of H₂O₂-induced toxicity was not related to the toxicity of the aqueous

extracts, as they did not exert any toxic effect on V79 cells by themselves (Figure 4). These results do not agree with the antioxidant potential exhibited before by these matrices in several non-cellular assays.¹⁵ A similar behavior was observed with *Brassica oleracea* var. *costata*, closely related to kale: although *B. oleracea* var. *costata* aqueous extract revealed antioxidant capacity in cell free systems^{4,5}, it potentiated paraquat induced oxidative stress in primary rat hepatocytes.²⁴

Pre-treatment with the methanolic extracts significantly enhanced the deleterious effect of H₂O₂ in cellular MTT reduction for the highest tested concentrations. Toxicity of *P. brassicae* larvae extract on H₂O₂ exposed cells was significant for concentrations above 5.4 mg /mL (60%) (Figure 5).

Phenolics are known for their protective activity against the deleterious effects of H₂O₂, due to their antioxidant capacity.^{12,29} Kaempferol-3-*O*-rutinoside, ferulic and sinapic acids, assayed at the concentrations corresponding to their content in the matrices, didn't prevent or aggravate the toxicity induced by H₂O₂ in V79 cells (Figure 6). So, the high content of phenolic compounds seems not to provide protective effect to these matrices.

As revealed by HPLC-DAD analysis, the extracts are characterized by the presence of complex molecules, highly glycosylated, with some of them being also acylated and sulphated. These molecules possess higher molecular weight and are more polar than aglycones. Thus, they may not manage to pass the cell membrane in sufficient amounts to act as antioxidants. Moreover, phenolic compounds appear to have both antioxidative and pro-oxidative effects.²³ In fact, phenolic compounds with strong radical scavenging activity are able to generate H₂O₂ and induce cells apoptosis.^{13,30}

The interpretation of results needs to be done with care, as the final effects of a complex extract results from the combinatory action of all its constituents. So, the

contribution of unidentified compounds to the observed cytotoxicity and potentiation of H₂O₂-induced toxicity cannot be ignored.

Effect of Kale and P. brassicae Extracts on Glutathione Homeostasis. Glutathione is the most abundant non-protein thiol in living organisms, playing a crucial role in intracellular protection against toxic compounds, such as ROS and other oxidative agents. V79 cells exposed to the aqueous and methanolic extracts, either in the presence or absence of H₂O₂, were evaluated for total glutathione (GSH_t) and GSSG contents (Figures 7-11).

Except for kale, all aqueous extracts revealed a tendency to increase the ratio total GSSG/GSH_t at the highest concentration tested (Figure 7). This tendency was more evident for *P. brassicae* larvae and butterfly extracts. Although the obtained results seem to show a pro-oxidative effect as evaluated by glutathione ratio, they do not affect cell viability (Figure 4).

H₂O₂ treated cells showed a high GSSG/GSH_t ratio compared to quiescent cells (Figure 7). None of the aqueous extracts provided protection against the deleterious effect of H₂O₂ in V79 cells. Additionally, the highest tested concentration of *P. brassicae* excrements extract seems to aggravate the toxicity induced by H₂O₂ (Figure 7), which is significantly reflected in cell viability (Figure 4). In fact, a tendency to increase the GSH_t levels was also verified for the highest concentration tested of *P. brassicae* excrements aqueous extract under quiescent conditions (Figure 9), which seems to suggest a cells' response to the oxidative insult.

In what concerns *P. brassicae* larvae extract, other toxicity mechanism besides glutathione oxidation appears to be responsible for the decreased viability observed when cells were pre-treated with the extract.

Kale and *P. brassicae* excrements methanolic extracts lead to a significant disturbance on GSH homeostasis, significantly increasing GSSG/GSH_t for the highest concentration tested (Figure 8). Considering both *P. brassicae* larvae and butterfly methanolic extracts, it was not possible to evaluate the glutathione levels using 135 mg/mL of extract, once the cellular viability was already too low for this concentration (Figure 5).

Considering kale methanolic extract, it should be highlighted the significant higher GSH_t levels (over three times) found for the highest concentration tested (Figure 10). This significant effect was also verified after exposition to H₂O₂ (Figure 10). An increase of GSH_t levels was also noticed with the highest tested concentration of kaempferol-3-O-rutinoside, while ferulic and sinapic acids had no effect (Figure 11). As so, kaempferol derivatives seem to contribute for these results, once kale was clearly the richest matrix in terms of this kind of compounds (Figure 3 and Table 1). Flavonoids have already proved to induce γ -glutamylcysteine synthetase, the rate limiting enzyme involved in glutathione biosynthesis.³¹

Furthermore, kale and *P. brassicae* excrements methanolic extracts aggravated the toxicity induced by H₂O₂ (Figure 8). These results may suggest an attempt of cells to increase their levels of antioxidants to overcome the aggression to which they were submitted.

In general, the results obtained for glutathione homeostasis with the methanolic extracts seem to corroborate the ones verified for the viability assays (Figure 5 and 8): for the highest tested concentration, the extracts by themselves seem to affect to some extent the GSH homeostasis, leading to a decrease of the cellular defenses and, consequently, to an increase of the toxic effect of H₂O₂.

Thus, none of the tested extracts, as well as standard compounds, provided protection against deleterious H₂O₂ effects in V79 cells. The cytotoxic effect of H₂O₂ has been found to be catalysed by metal ions, especially iron and copper, and it has been reported that metal chelators are effective in preventing such damage.³² Previous studies in V79 cells showed that polyphenols having *o*-hydroxyl groups are effective in protecting against H₂O₂ induced cytotoxicity.³³ The main phenolics in the analyzed extracts lack the catechol group, an important feature for metal chelation, which may, at least partially, explain our results.

In conclusion, the activity of kale was evaluated for the first time in V79 cells. Also, this study is the first report on the cell effects of *P. brassicae*. No protective activity was verified with aqueous and methanolic extracts, allowing noticing that polyphenol rich extracts are not always beneficial towards pro-oxidant damaging conditions. It was already demonstrated that the effect of phenolics on the redox balance in cells cannot be simply extrapolated from their activities in chemical assays.²¹ Indeed, the antioxidant properties of kale and *P. brassicae* materials previously observed in non-cellular assays¹⁵ and the results obtained in the present biological assay lack correlation. These results emphasize that the claimed antioxidant potential of extracts rich in phenolic compounds currently observed in cell free systems is not always confirmed in cellular models.

The results obtained also suggest that the potential application of kale as food or food supplements, or that of extracts of *P. brassicae* containing kale derived bioactive compounds, may constitute an additional insult to health debilitated individuals.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel.: +351 222078934; fax: +351 222003977. *Email address:* pandrade@ff.up.pt (P.B. Andrade).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Fundação para a Ciência e a Tecnologia (PTDC/AGR-AAM/64150/2006), to "Consolider Ingenio 2010 Project CSD2007-00063 FUN-C-FOOD" and to "Grupo de excelencia de la región de Murcia 04486/GERM/06". Fátima Fernandes is indebted to FCT for the grant (SFRH/BD/37963/2007).

REFERENCES

- (1) Boivin, D.; Lamy, S.; Lord-Dufour, S.; Jackson, J.; Beaulieu, E.; Côté, M.; Moghrabi, A.; Barrette, S.; Gingras, D.; Béliveau, R. Antiproliferative and antioxidant activities of common vegetables: a comparative study. *Food Chem.* **2009**, *112*, 374-380.
- (2) Cartea, M. E.; Velasco, P.; Obregón, S.; Padilla, G.; de Haro, A. Seasonal variation in glucosinolate content in *Brassica oleracea* crops grown in northwestern Spain. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 403-410.
- (3) Cesar, G. F. Plant polyphenols: how to translate their *in vitro* antioxidant actions to *in vivo* conditions. *Int. Union Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *59*, 308-315.
- (4) Ferreres, F.; Sousa, C.; Vrchovská, V.; Valentão, P.; Pereira, J. A.; Seabra, R. M.; Andrade, P. B. Chemical composition and antioxidant activity of tronchuda cabbage internal leaves. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, *222*, 88-98.
- (5) Vrchovská, V.; Sousa, C.; Valentão, P.; Ferreres, F.; Pereira, J. A.; Seabra, R. M.; Andrade, P. B. Antioxidative properties of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) external leaves against DPPH, superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Food Chem.* **2006**, *98*, 416-425.
- (6) Zou, Y. P.; Lu, Y. H.; Wei, D. Z. Protective effects of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. against hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *Phytother. Res.* **2010**, *24*, S6-S10.
- (7) Liu, R. H.; Finley, J. Potential cell culture models for antioxidant research. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4311-4314.
- (8) Kim, D. O.; Heo, H. J.; Kim, Y. J.; Yang, H. S.; Lee, C. Y. Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9921-9927.

(9) Sakihama, Y.; Cohen, M. F.; Grace, S. C.; Yamasaki, H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* **2002**, *177*, 67-80.

(10) Chen, T. J.; Jeng, J. Y.; Lin, C. W.; Wu, C. Y.; Chen, Y. C. Quercetin inhibition of ROS-dependent and independent apoptosis in rat glioma C6 cells. *Toxicology* **2006**, *223*, 113-126.

(11) Piao, M. J.; Kang, K. A.; Zhang, R.; Ko, D. O.; Wang, Z. H.; You, H. J.; Kim, H. S.; Kim, J. S.; Kang, S. S.; Hyun, J. W. Hyperoside prevents oxidative damage induced by hydrogen peroxide in lung fibroblast cells via an antioxidant effect. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1780*, 1448-1457.

(12) Qu, W.; Fan, L.; Kim, Y. C.; Ishikawa, S.; Iguchi-Ariga, S. M.; Pu, X. P.; Ariga, H. Kaempferol derivatives prevent oxidative stress-induced cell death in a DJ-1-dependent manner. *J. Pharmacol. Sci.* **2009**, *110*, 191-200.

(13) Yokomizo, A.; Moriwaki, M. Effects of uptake on oxidative stress induced by hydrogen peroxide in human intestinal Caco-2 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70*, 1317-1324.

(14) Galati, G.; Sabzevari, O.; Wilson, J. X.; O'Brien, P. J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* **2002**, *177*, 91-104.

(15) Ferreres, F.; Fernandes, F.; Oliveira, J.; Valentão, P.; Pereira, J. A.; Seabra, R. M.; Andrade, P. B. Metabolic profiling and biological capacity of *Pieris brassicae* fed with kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 1209-1220.

(16) Vallejo, F.; Tomás-Barberán, F. A.; Ferreres, F. Characterisation of flavonols in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) by liquid chromatography–UV diode-array

detection–electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1054*, 181-193.

(17) Itoh, T.; Ninomiya, M.; Nozawa, Y.; Koketsu, M. Chalcone glycosides isolated from aerial parts of *Brassica rapa* L. ‘hidabeni’ suppress antigen-stimulated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7052-7057.

(18) Ferreres, F.; Sousa, C.; Valentão, P.; Pereira, J. A.; Seabra, R. M.; Andrade, P. B. Tronchuda cabbage flavonoids uptake by *Pieris brassicae*. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 361-367.

(19) Ferreres, F.; Valentão, P.; Pereira, J. A.; Bento, A.; Noites, A.; Seabra, R. M.; Andrade, P. B. HPLC-DAD-MS/MS-ESI screening of phenolic compounds in *Pieris brassicae* L. reared on *Brassica rapa* var. *rapa* L. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 844-853.

(20) Ferreres, F.; Fernandes, F.; Pereira, D. M.; Pereira, J. A.; Valentão, P.; Andrade, P. B. Phenolics metabolism in insects: *Pieris brassicae* - *Brassica oleracea* var. *costata* ecological duo. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 9035-9043.

(21) Pereira, D. M.; Noites, A.; Valentão, P.; Ferreres, F.; Pereira, J. A.; Vale-Silva, L.; Pinto, E.; Andrade, P. B. Targeted metabolite analysis and biological activity of *Pieris brassicae* fed with *Brassica rapa* var. *rapa*. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 483-489.

(22) Sousa, C.; Pereira, D. M.; Valentão, P.; Ferreres, F.; Pereira, J. A.; Seabra, R. M.; Andrade, P. B. *Pieris brassicae* inhibits xanthine oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 2288-2294.

(23) Fernandez-Panchon, M. S.; Villano, D.; Troncoso, A. M.; Garcia-Parrilla, M. C. Antioxidant activity of phenolic compounds: from *in vitro* results to *in vivo* evidence. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2008**, *48*, 649-671.

(24) Sousa, C.; Pontes, H.; Carmo, H.; Dinis-Oliveira, R. J.; Valentão, P.; Andrade, P. B.; Remião, F.; Bastos, M. L.; Carvalho, F. Water extracts of *Brassica oleracea* var.

costata potentiate paraquat toxicity to rat hepatocytes *in vitro*. *Toxicol. Vitro* **2009**, *23*, 1131-1138.

(25) Carmo, H.; Brulport, M.; Hermes, M.; Oesch, F.; de Boer, D., Remião, F.; Carvalho, F.; Schön, M. R.; Krebsfaenger, N.; Doehmer, J.; Bastos, M. L.; Hengstler, J. G. CYP2D6 increases toxicity of the designer drug 4-methylthioamphetamine (4-MTA). *Toxicology* **2007**, *229*, 236-244.

(26) Talorete, T. P. N.; Bouaziz, M.; Sayadi, S.; Isoda, H. Influence of medium type and serum on MTT reduction by flavonoids in the absence of cells. *Cytotechnology* **2006**, *52*, 189-198.

(27) Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.; Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275.

(28) Costa, V. M.; Silva, R.; Tavares, L. C.; Vitorino, R.; Amado, F.; Carvalho, F.; Bastos, M. L.; Carvalho, M.; Carvalho, R. A.; Remião, F. Adrenaline and reactive oxygen species elicit proteome and energetic metabolism modifications in freshly isolated rat cardiomyocytes. *Toxicology* **2009**, *260*, 84-96.

(29) Aherne, S. A.; O'Brien, N. M. Lack of effect of the flavonoids, myricetin, quercetin, and rutin, on repair of H₂O₂-induced DNA single-strand breaks in Caco-2, Hep G2, and V79 cells. *Nutr. Cancer* **2000**, *38*, 106-115.

(30) Bellion, P.; Olk, M.; Will, F.; Dietrich, H.; Baum, M.; Eisenbrand, G.; Janzowski, C. Formation of hydrogen peroxide in cell culture media by apple polyphenols and its effect on antioxidant biomarkers in the colon cell line HT-29. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 1226-1236.

(31) Myhrstad, M. C.; Carlsen, H.; Nordström, O.; Blomhoff, R.; Moskaug, J. Ø. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-

glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Rad. Biol. Med.* **2002**, 32, 386-393.

(32) Jornot, L.; Petersen, H.; Junod, A. F. Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions. *Biochem. J.* **1998**, 335, 85-94.

(33) Nakayama, T. Suppression of hydroperoxide-induced cytotoxicity by polyphenols. *Cancer Res.* **1994**, 54, 1991s-1993s.

Figure 1. HPLC-DAD phenolic profile of the methanolic extract of kale leaves. Detection at 330 nm. Peaks: (1) quercetin-3-*O*-sophorotrioside-7-*O*-glucoside, (2) quercetin-3-*O*-sophoroside-7-*O*-glucoside, (3) kaempferol-3-*O*-(methoxycaffeoyl)sophoroside-7-*O*-glucoside, (4) quercetin-3-*O*-sophoroside-7-*O*-diglucoside, (5) kaempferol-3-*O*-sophoroside-7-*O*-glucoside, (6) kaempferol-3-*O*-(caffeoyl)sophoroside-7-*O*-glucoside, (7) quercetin-3-*O*-(sinapoyl)sophoroside-7-*O*-glucoside, (8) kaempferol-3-*O*-sophoroside-7-*O*-diglucoside, (9) isorhamnetin-3-*O*-sophoroside-7-*O*-glucoside, (10) quercetin-3-*O*-(feruloyl)sophoroside-7-*O*-glucoside, (11) quercetin-3-*O*-(feruloyl)sophoroside-7-*O*-diglucoside, (12) kaempferol-3-*O*-(sinapoyl)sophoroside-7-*O*-glucoside, (13) kaempferol-3-*O*-(sinapoyl)sophoroside-7-*O*-diglucoside, (14) kaempferol-3-*O*-(feruloyl)sophoroside-7-*O*-glucoside, (15) kaempferol-3-*O*-(feruloyl)sophoroside-7-*O*-diglucoside, (16) kaempferol-3-*O*-(*p*-coumaroyl)sophoroside-7-*O*-glucoside, (17) kaempferol-3-*O*-(*p*-coumaroyl)sophoroside-7-*O*-diglucoside, (18) kaempferol-3-*O*-gentiobioside-7-*O*-glucoside, (19) kaempferol-3-*O*-gentiobioside-7-*O*-diglucoside, (20) isorhamnetin-3-*O*-gentiobioside-7-*O*-glucoside, (21) quercetin-3-*O*-(sinapoyl)sophoroside, (22) quercetin-3-*O*-(feruloyl)sophoroside, (23) quercetin-3-*O*-sophoroside, (24) kaempferol-3-*O*-(*p*-coumaroyl)gentiobioside-7-*O*-glucoside, (25) kaempferol-3-*O*-(sinapoyl)sophoroside, (26) kaempferol-3-*O*-sophoroside, (27) kaempferol-3-*O*-(feruloyl)sophoroside, (28) disinapoyl-gentiobioside, (29) sinapoyl,feruloyl-gentiobioside, (30) diferuloyl-gentiobioside, (31) disinapoyl,feruloyl-gentiobioside.

Figure 2. HPLC-DAD phenolic profiles of *P. brassicae* larvae (A) and excrement (B) methanolic extracts. Detection at 330 nm. Peaks: 2, 5, 8, 12-15, 19, 23 and 26 see Fig. 1. (FA) Ferulic acid and (SA) sinapic acid, (32) kaempferol-3-*O*-sophoroside sulphate,

(33) kaempferol-3-*O*-glucoside sulphate, (34) kaempferol-3-*O*-sophorotrioside-7-*O*-glucoside, (35) kaempferol-3-*O*-sophorotrioside-7-*O*-diglucoside; (36) kaempferol-3-*O*-(sinapoyl)sophorotrioside, (37) kaempferol-3-*O*-sophorotrioside, (38) kaempferol-3-*O*-(feruloyl)sophorotrioside, (39) isorhamnetin-3-*O*-sophoroside, (40) kaempferol-3-*O*-(*p*-coumaroyl)sophorotrioside, (41) quercetin-3-*O*-glucoside sulphate, (42) kaempferol-3-*O*-gentiobioside, (43) kaempferol-3-*O*-glucoside, (44) isorhamnetin-3-*O*-gentiobioside, (45) kaempferol-3-*O*-(feruloyl)sophoroside, (46) kaempferol-3-*O*-(*p*-coumaroyl)sophoroside.

Figure 3. Relative content of the different classes of phenolic compounds in aqueous and methanolic extracts of kale and *P. brassicae* materials.

Figure 4. Effect of kale and *P. brassicae* materials aqueous extracts on V79 cells viability, with and without H₂O₂-induced oxidative stress. Values show mean $\pm$ SE of 4 independent experiments, each one of them in quadruplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Figure 5. Effect of kale and *P. brassicae* materials methanolic extracts on V79 cells viability with and without H₂O₂-induced oxidative stress. Values show mean $\pm$ SE of 4 independent experiments, each one of them in quadruplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Figure 6. Effect of kaempferol-3-*O*-rutinoside, ferulic acid and sinapic acid on V79 cells viability with and without H₂O₂-induced oxidative stress. Values show mean $\pm$ SE of 4 independent experiments, each one of them in quadruplicate.

Figure 7. Effect of kale and *P. brassicae* materials aqueous extracts on GSSG/GSH_t ratio, on V79 cells, after 24 h treatment, with and without H₂O₂-induced oxidative stress. Values show mean ± SE of 4 independent experiments.

Figure 8. Effect of kale and *P. brassicae* materials methanolic extracts on GSSG/GSH_t ratio, on V79 cells, after 24 h treatment, with and without H₂O₂-induced oxidative stress. Values show mean ± SE of 4 independent experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01 and *** P < 0.001.

Figure 9. Effect of kale and *P. brassicae* materials aqueous extracts on glutathione total content, on V79 cells, after 24 h treatment, with and without H₂O₂-induced oxidative stress. Values show mean ± SE of 4 independent experiments.

Figure 10. Effect of kale and *P. brassicae* materials methanolic extracts on glutathione total content, on V79 cells, after 24 h treatment, with and without H₂O₂-induced oxidative stress. Values show mean ± SE of 4 independent experiments. * P < 0.05 and *** P < 0.001

Figure 11. Effect of kaempferol-3-O-rutinoside, ferulic acid and sinapic acid on GSSG/GSH_t ratio as well as on total glutathione content, on V79 cells, after 24 h treatment, with and without H₂O₂-induced oxidative stress. Values show mean ± SE of 4 independent experiments. * P < 0.05.

Table 1. Quantification of Phenolic Compounds in Methanolic Extracts of Kale and *P. brassicae* Materials (mg/kg, dry basis)^a.

	Compound	Kale	Larvae	Excrements
1	Quercetin-3- <i>O</i> -sophtr-7- <i>O</i> -gluc	12.0 (0.1)	-	-
2	Quercetin-3- <i>O</i> -soph-7- <i>O</i> -gluc	24.3 (1.0)	-	nq
3	Kaempferol-3- <i>O</i> -(methoxycaffeoyl)soph-7- <i>O</i> -gluc +	244.1 (15.5)	-	-
4	Quercetin-3- <i>O</i> -soph-7- <i>O</i> -digluc		-	-
34	Kaempferol-3- <i>O</i> -sophtr-7- <i>O</i> -gluc +	-	-	1.4 (0.0)
5	Kaempferol-3- <i>O</i> -soph-7- <i>O</i> -gluc +	310.9 (0.1)	-	
6	Kaempferol-3- <i>O</i> -(caffeoyl)soph-7- <i>O</i> -gluc +		-	-
7	Quercetin-3- <i>O</i> -(sinapoyl)soph-7- <i>O</i> -gluc		-	-
35	Kaempferol-3- <i>O</i> -sophtr-7- <i>O</i> -digluc +	-	-	5.4 (0.1)
8	Kaempferol-3- <i>O</i> -soph-7- <i>O</i> -digluc	75.1 (8.2)	-	
9	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -soph-7- <i>O</i> -gluc +	34.8 (2.6)	-	-
10	Quercetin-3- <i>O</i> -(feruloyl)soph-7- <i>O</i> -gluc		-	-
11	Quercetin-3- <i>O</i> -(feruloyl)soph-7- <i>O</i> -digluc +	883.0 (97.8)	-	-
12	Kaempferol-3- <i>O</i> -(sinapoyl)soph-7- <i>O</i> -gluc +		-	7.9 (0.1)
13	Kaempferol-3- <i>O</i> -(sinapoyl)soph-7- <i>O</i> -digluc		-	
14	Kaempferol-3- <i>O</i> -(feruloyl)soph-7- <i>O</i> -gluc	581.6 (0.7)	-	10.5 (0.1)
15	Kaempferol-3- <i>O</i> -(feruloyl)soph-7- <i>O</i> -digluc	70.4 (8.8)	-	1.1 (0.1)
16	Kaempferol-3- <i>O</i> -(<i>p</i> -coumaroyl)soph-7- <i>O</i> -gluc	nq	-	-
17	Kaempferol-3- <i>O</i> -(<i>p</i> -coumaroyl)soph-7- <i>O</i> -digluc +	159.5 (12.3)	-	-
18	Kaempferol-3- <i>O</i> -gent-7- <i>O</i> -gluc		-	-
19	Kaempferol-3- <i>O</i> -gent-7- <i>O</i> -digluc +	29.7 (4.7)	-	3.8 (0.7)
32	Kaempferol-3- <i>O</i> -soph sulphate	-	nq	
20	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -gent-7- <i>O</i> -gluc	101.6 (9.6)	-	-
21	Quercetin-3- <i>O</i> -(sinapoyl)soph	16.8 (0.1)	-	-
22	Quercetin-3- <i>O</i> -(feruloyl)soph	16.3 (3.6)	-	-

	Compound	Kale	Larvae	Excrements
FA	Ferulic acid	-	8.3 (0.9)	3.0 (0.0)
23	Quercetin-3- <i>O</i> -soph +	31.4 (0.9)	16.4 (0.8)	1.1 (0.0)
24	Kaempferol-3- <i>O</i> -(<i>p</i> -coumaroyl)gent-7- <i>O</i> -gluc		-	-
SA	Sinapic acid	-	191.0 (18.1)	-
25	Kaempferol-3- <i>O</i> -(sinapoyl)soph	133.5 (0.9)	-	-
26	Kaempferol-3- <i>O</i> -soph +	960.8 (35.4)	55.8 (1.9)	2.6 (0.2)
27	Kaempferol-3- <i>O</i> -(feruloyl)soph		-	-
28	Disinapoyl-gent +	92.2 (6.3)	-	-
29	Sinapoyl,feruloyl-gent		-	-
30	Diferuloyl-gent	1.6 (0.1)	-	-
31	Disinapoyl,feruloyl-gent	nq	-	-
33	Kaempferol-3- <i>O</i> -gluc sulphate	-	nq	3.0 (0.0)
36	Kaempferol-3- <i>O</i> -(sinapoyl)sophtr +	-	-	1.2 (0.3)
37	Kaempferol-3- <i>O</i> -sophtr	-	-	
38	Kaempferol-3- <i>O</i> -(feruloyl)sophtr	-	-	2.4 (0.1)
39	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -soph	-	-	0.3 (0.0)
40	Kaempferol-3- <i>O</i> -(<i>p</i> -coumaroyl)sophtr	-	-	0.1 (0.0)
41	Quercetin-3- <i>O</i> -gluc sulphate	-	-	nq
42	Kaempferol-3- <i>O</i> -gent	-	-	nq
43	Kaempferol-3- <i>O</i> -gluc	-	-	nq
44	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -gent	-	-	nq
45	Kaempferol-3- <i>O</i> -(feruloyl)soph +	-	-	5.5 (0.3)
46	Kaempferol-3- <i>O</i> -(<i>p</i> -coumaroyl)soph	-	-	
	Σ	3779.6	271.5	49.3

^a Results are expressed as mean (standard deviation) of three determinations. Σ, sum of the determined phenolic compounds. nq: not quantified. sophtr: sophorotriose; soph: sophorose; gluc: glucose; digluc: diglucose; gent: gentiobiose.

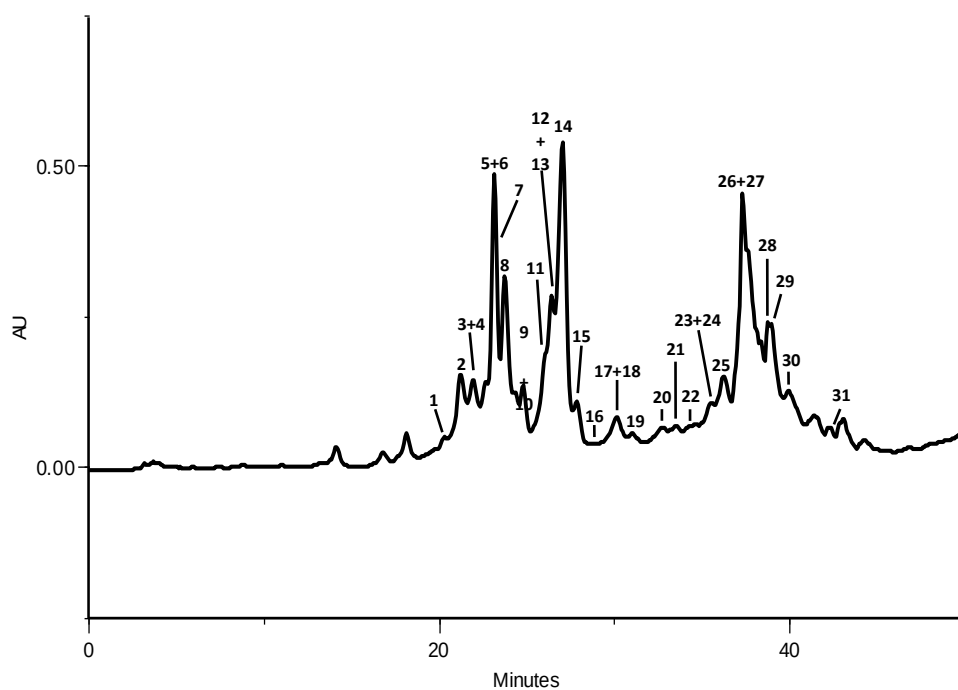


Figure 1.

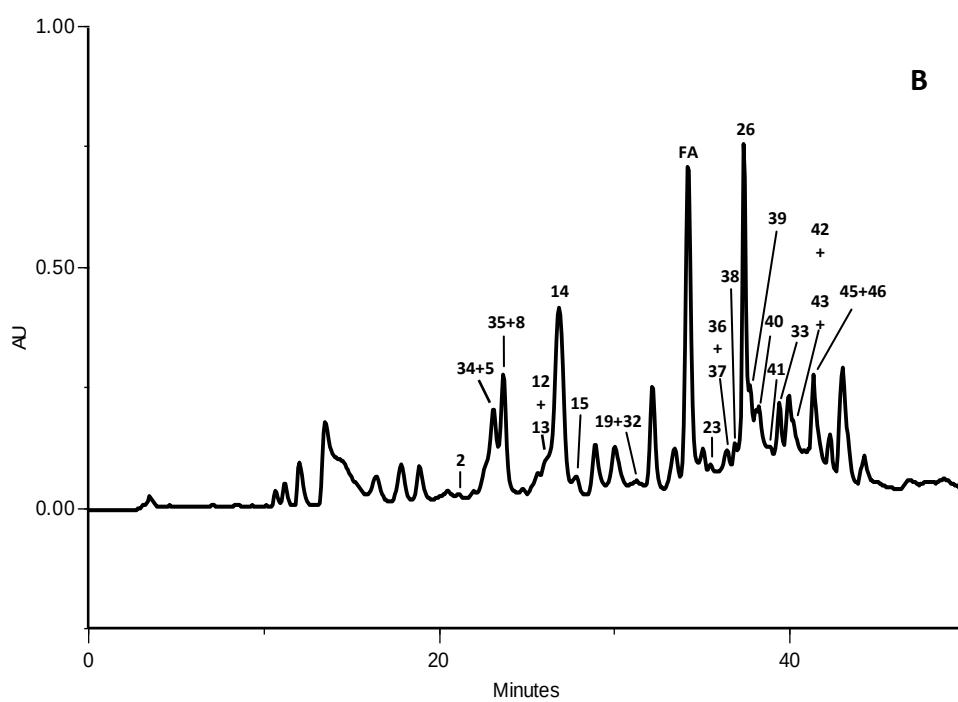
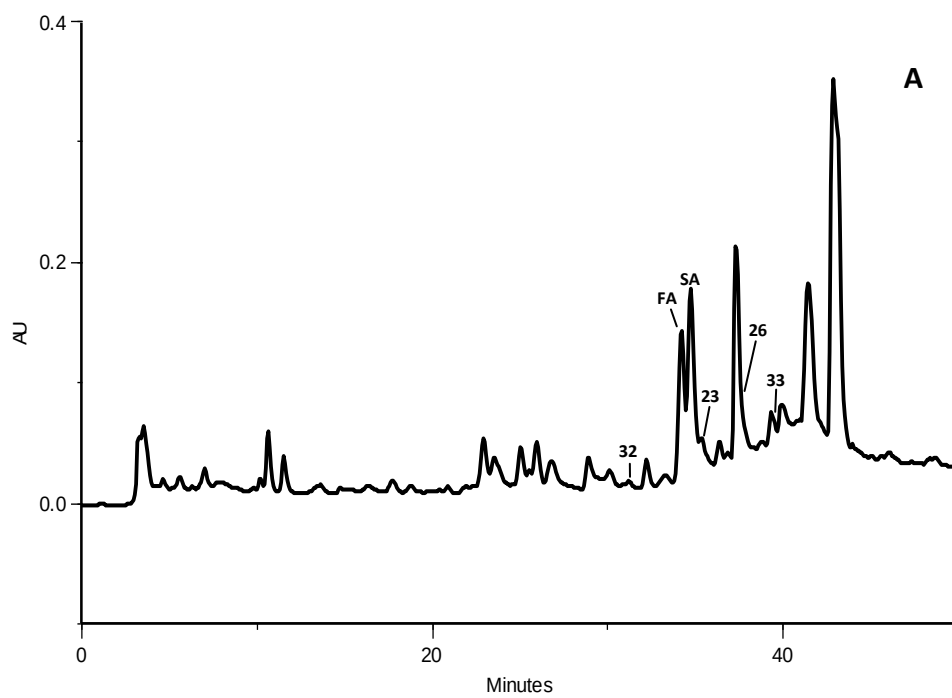


Figure 2.

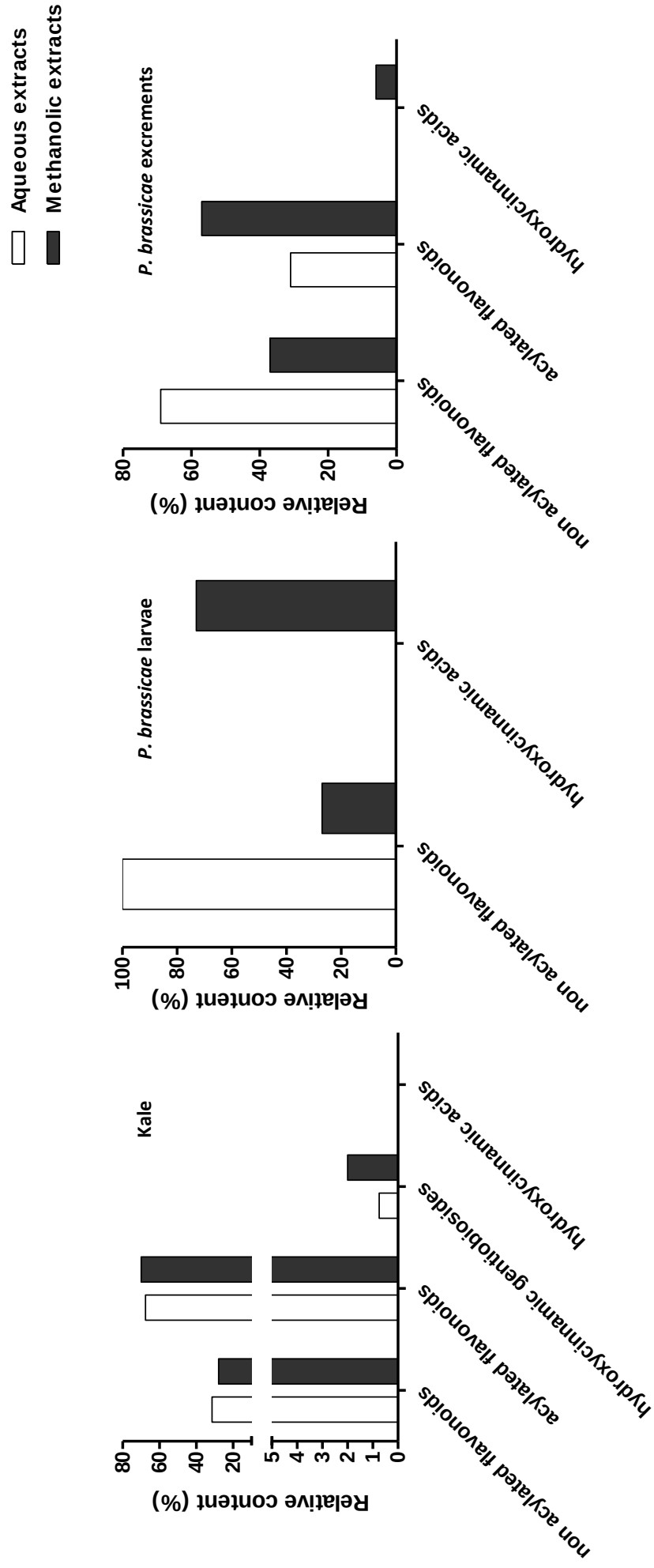


Figure 3.

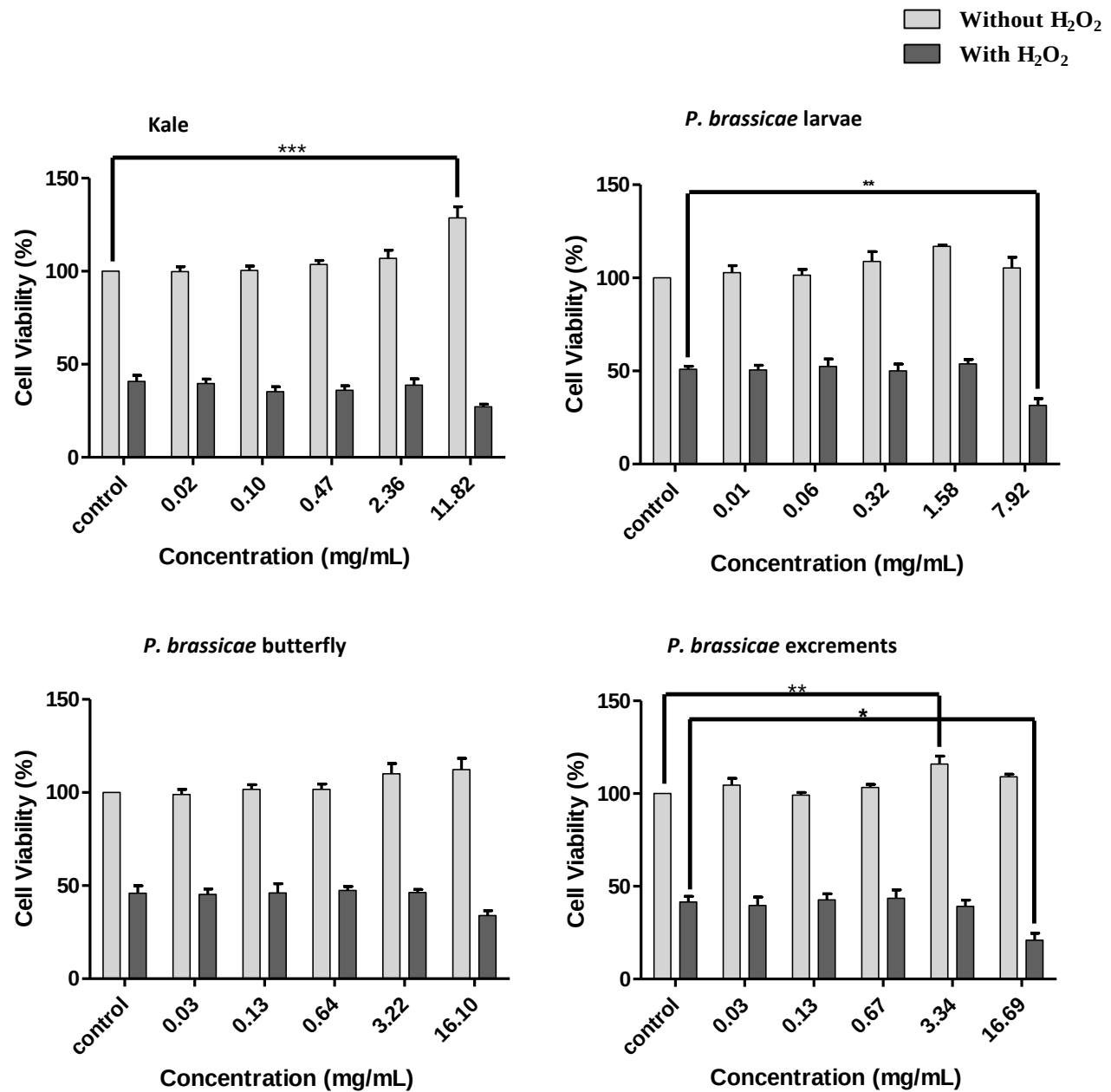


Figure 4.

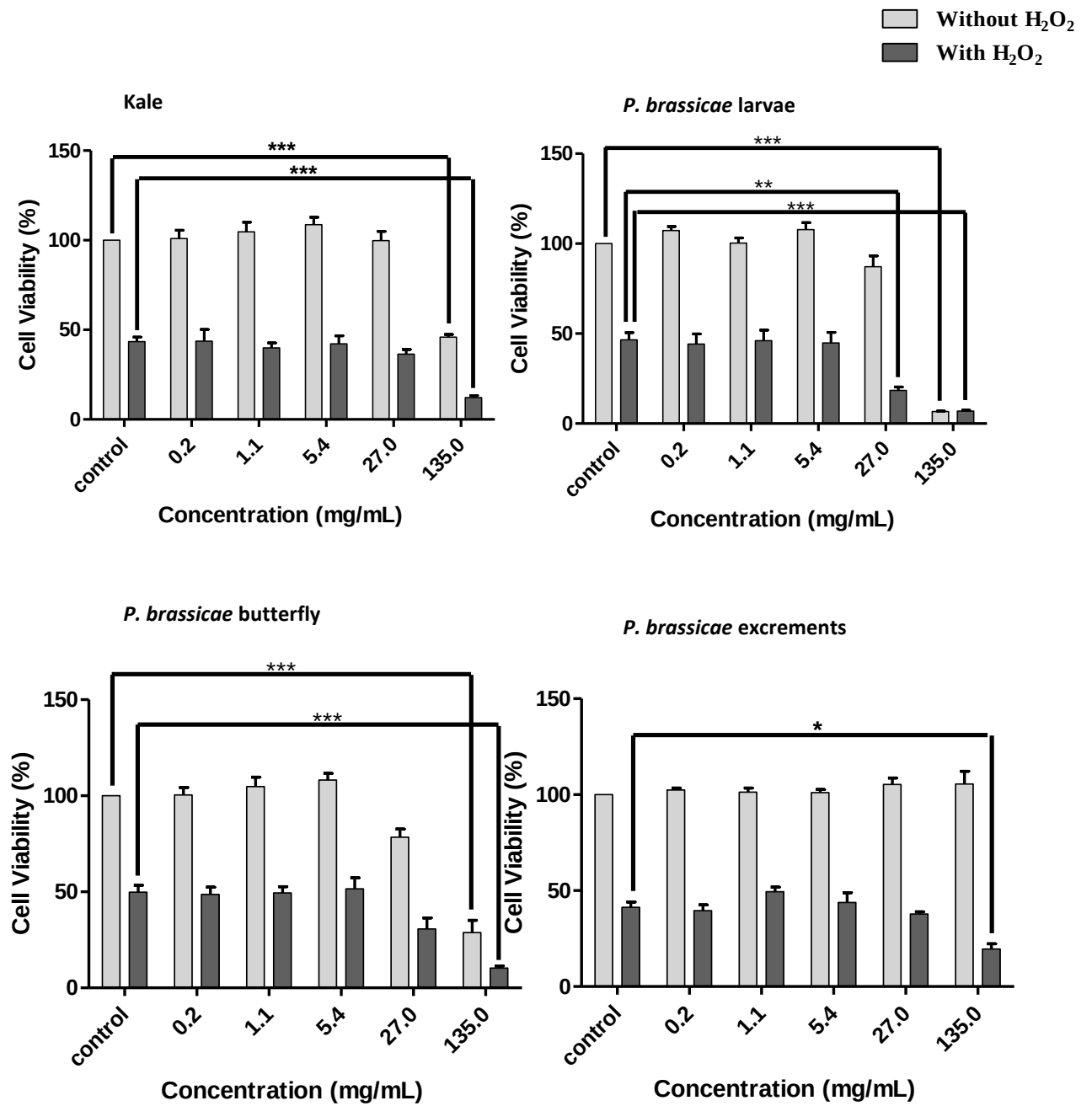


Figure 5.

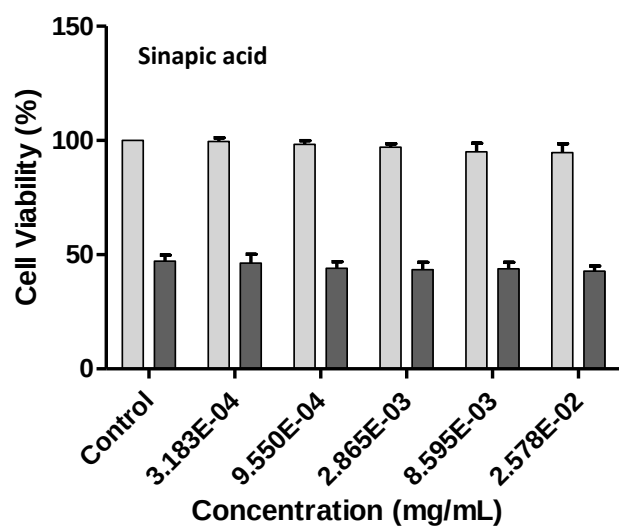
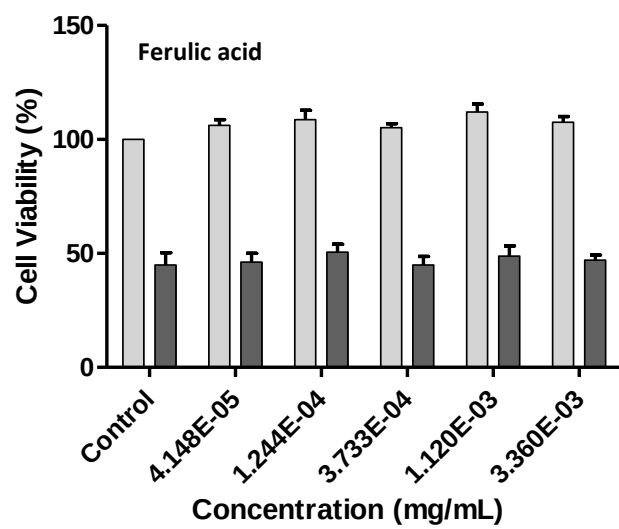
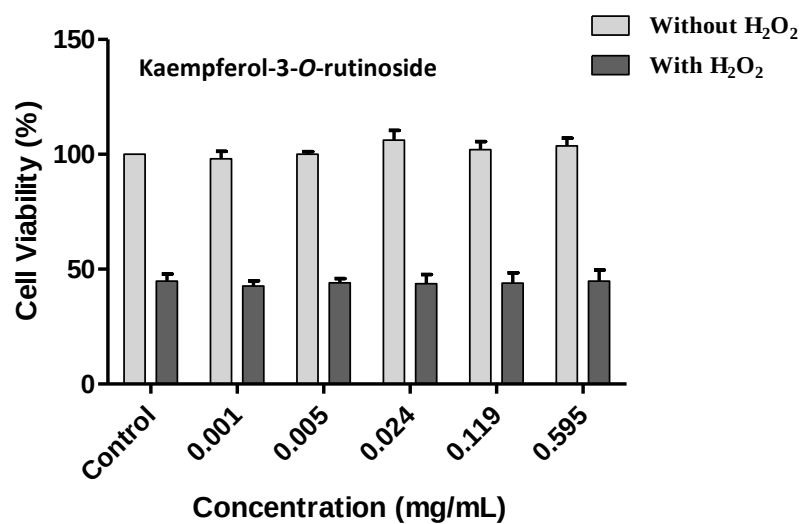


Figure 6.

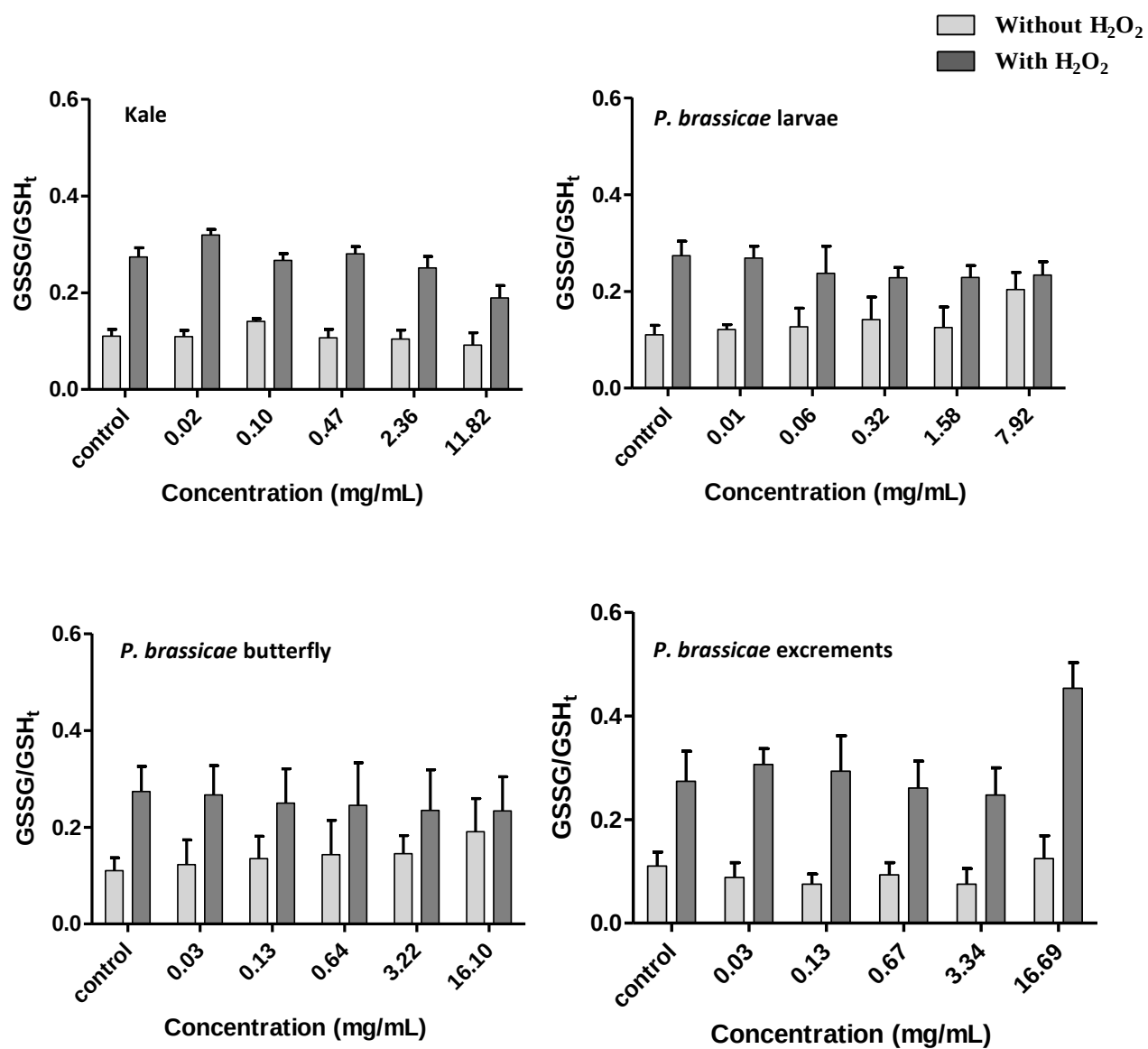


Figure 7.

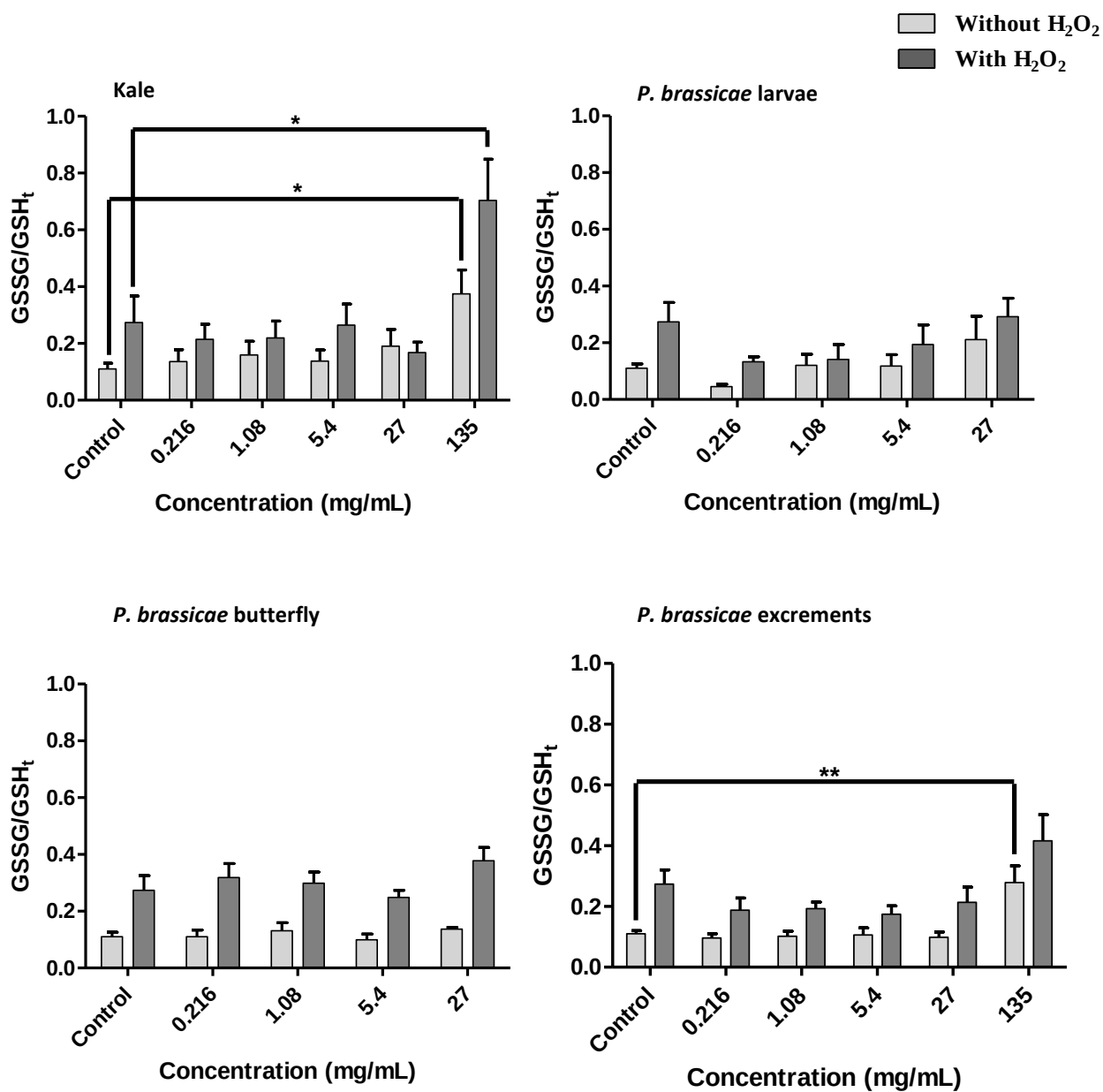


Figure 8.

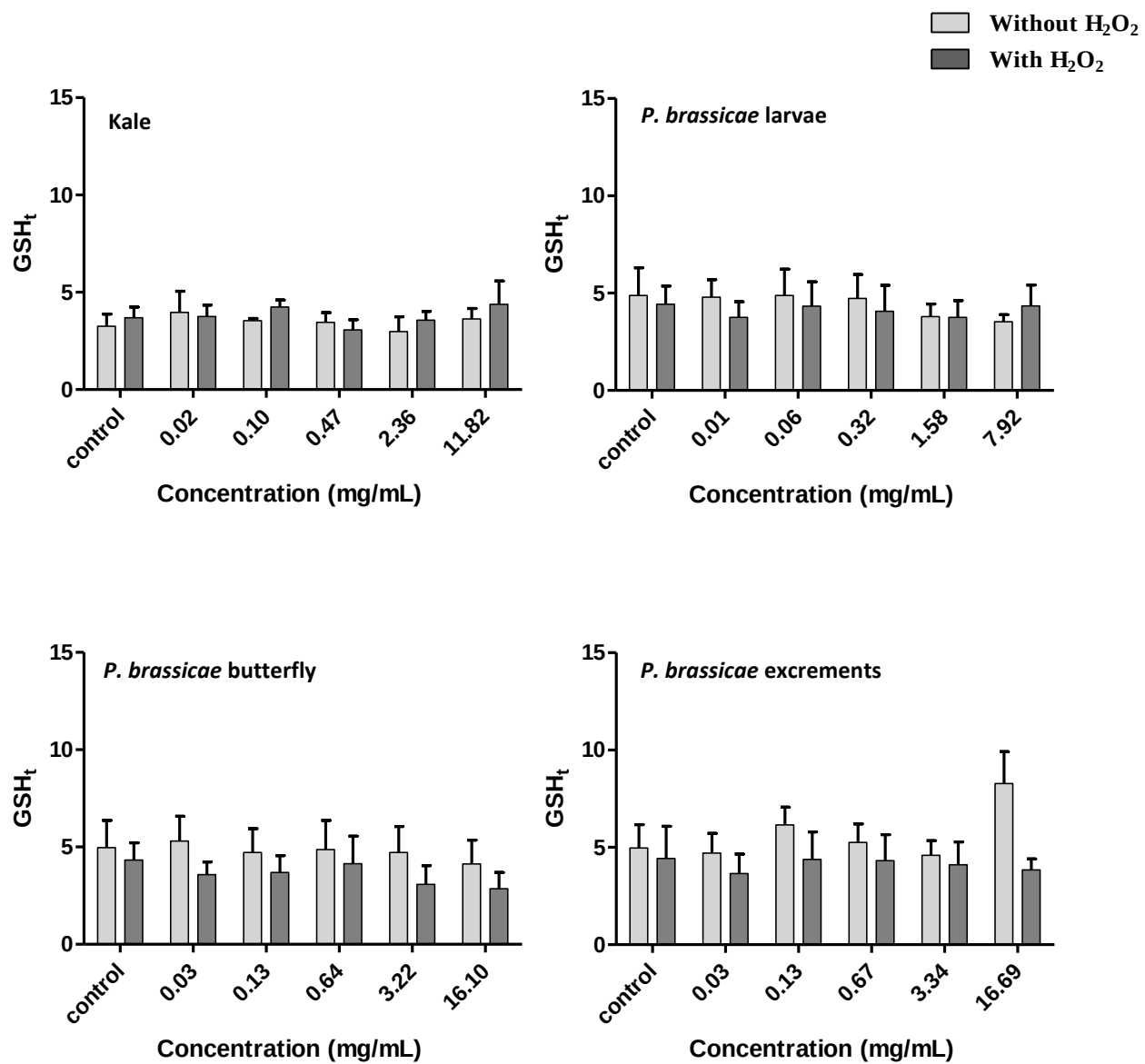


Figure 9.

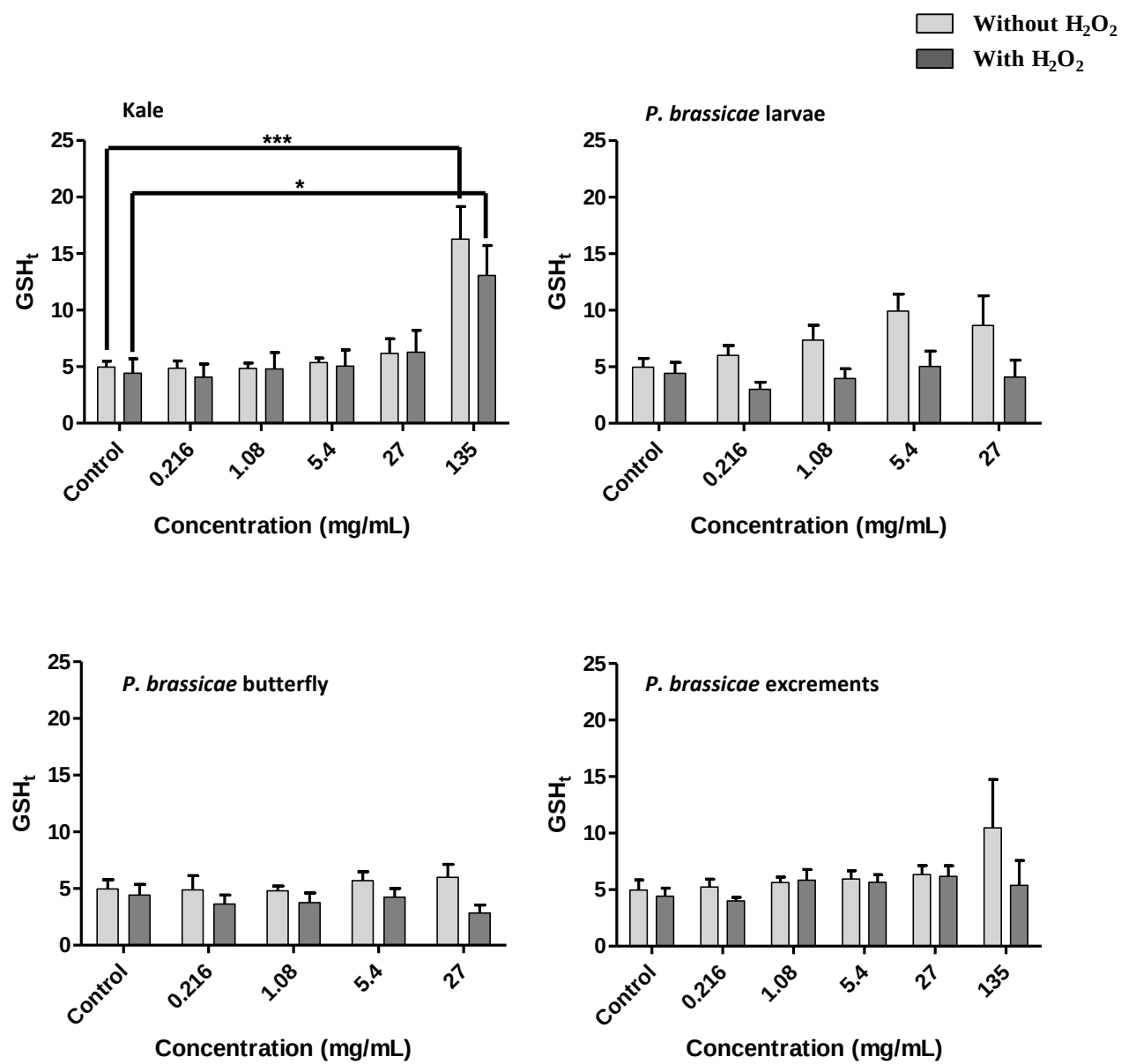


Figure 10.

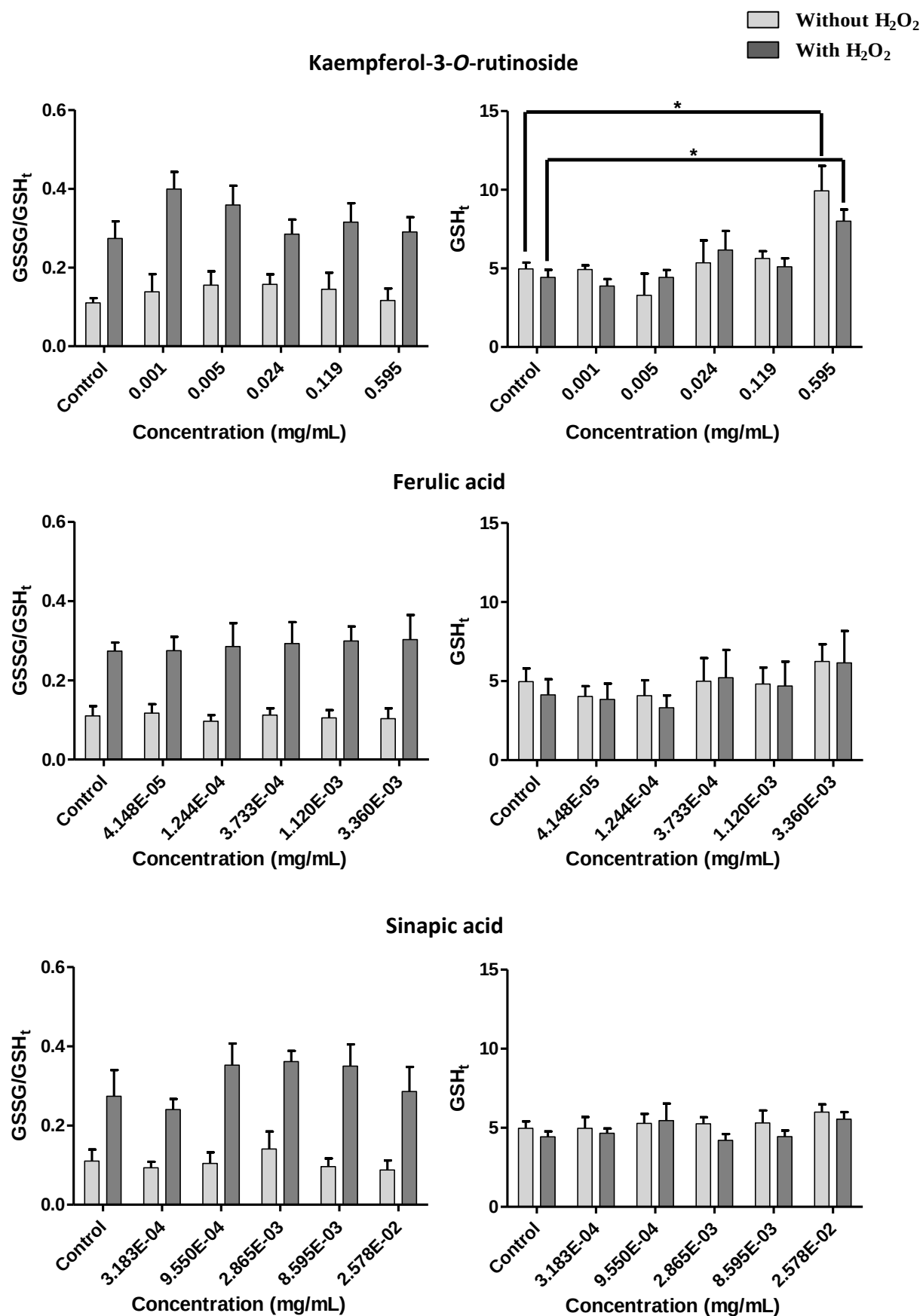


Figure 11.

4.8. *Brassica oleracea* var. *costata* and *Pieris brassicae* aqueous extracts reduce methyl methane sulfonate-induced DNA damage in V79 hamster lung fibroblasts

Submetido para publicação

***Brassica oleracea* var. *costata* and *Pieris brassicae* aqueous extracts reduce methyl methane sulfonate-induced DNA damage in V79 hamster lung fibroblasts**

Carla Sousa¹, Fátima Fernandes¹, Patrícia Valentão¹, Sebastião Rodrigues², Marta Coelho², João P. Teixeira³, Susana Silva³, Federico Ferreres⁴, Paula Guedes de Pinho⁵, Paula B. Andrade^{1*}

¹ REQUIMTE/Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Química, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, R. Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal

² Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa; Rua da Junqueira, 96, 1349-008 Lisboa, Portugal

³ National Institute of Health, Environmental Health Department, Rua Alexandre Herculano, 321, 4000-055 Porto, Portugal

⁴ Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Department of Food Science and Technology, CEBAS (CSIC), P.O. Box 164, 30100 Campus University Espinardo, Murcia, Spain

⁵ REQUIMTE/Laboratório de Toxicologia, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, R. Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal

***Corresponding Author:** Prof. P. B. Andrade, tel +351 222078934, fax +351 222003977, email pandrade@ff.up.pt

Running title: Genoprotective potential of *Brassica oleracea* var. *costata* and *Pieris brassicae*

Key words: *Pieris brassicae* larvae: *Brassica oleracea* var. *costata*: Genoprotection

Abstract

Aqueous extracts obtained from *Brassica oleracea* var. *costata* leaves and *Pieris brassicae* larvae, were assayed for their potential to induce DNA damage, or else to protect against the damage triggered by other agents. None of the extracts at concentrations between 10 and 1000 µg/plate was mutagenic, as assessed by the Ames test reversion assay using *Salmonella* His⁺ TA98 strains, with and without metabolic activation. Using the mammalian V79 fibroblast cell line, the extracts at 500 µg/mL neither induced mutations nor protected against the mutagenic effects caused by methyl methanesulfonate (MMS) in the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) mutation assay. Furthermore, in the comet assay none of the extracts revealed to be genotoxic by itself and both afforded protection against the genotoxicity induced by MMS, being this protection more pronounced with the larvae extract. As it is commonly accepted that the genotoxic/antigenotoxic effects of *Brassica* vegetables is due to isothiocyanates, the extracts were screened for these compounds by HS-SPME/GC-MS. Some low molecular weight volatiles were quantified in the aqueous extracts, but any sulphur compound was detected. These findings demonstrate that both extracts could be useful in chemoprevention against damage caused by genotoxic compounds, being the larvae extract the most promising one.

Introduction

Organisms are exposed to a multitude of compounds that are able to cause DNA damage, directly or after biotransformation. Mutation occurs if the genetic material changes in a permanent transmissible way^(1,2). Genotoxicity refers to potentially harmful effects on genetic material of cells or organisms, which are not necessarily associated with mutagenicity. These changes may involve a single gene or gene segment, a block of genes or whole chromosomes.

Fruits and vegetables, including the ones used in human nutrition, are considered to exert antimutagenic effects against a variety of mutagenic compounds. On the other hand, diet-related mutagenesis plays an etiologic role in chronic diseases, as food plants can be mutagenic by themselves⁽²⁾. Ames suggested that natural chemicals, present in the human diet as complex mixtures, may be a more important source of human mutation than environmental or occupational exposures⁽³⁾.

Epidemiological studies provide evidence that cruciferous vegetables protect humans against cancer⁽⁴⁾. Furthermore, results from animal experiments demonstrate that they reduce chemically-induced tumour formation. These properties have been attributed to alterations in the metabolism of carcinogens by breakdown products of glucosinolates⁽⁵⁾. Other secondary compounds ubiquitously distributed in plants can also contribute to the general effect. Phenolic compounds comprise many examples of antimutagens acting by various mechanisms, including the impairment of metabolic activation of various pro-carcinogens. Both mutagenic and antimutagenic properties have been ascribed to several members of this group⁽²⁾.

Volatile compounds deriving from several biosynthetic pathways can have important bioactivities. Non-conjugated plant volatiles are lipophilic molecules with high vapour pressure, allowing them to cross membranes freely and evaporate into the atmosphere, where there are no barriers to diffusion⁽⁶⁾. As so, they can easily be absorbed by cells and exert either protective or deleterious effects.

Phenolics and low molecular weight compounds have been described in the leaves of *Brassica oleracea* L. var. *costata* DC^(7, 8). However, apart from sulphur compounds, information on their contribution to mutagenicity induction or protection by *Brassica* vegetables is still scarce. Larvae of *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae) are specialists on crucifers, feeding on a variety of Brassicaceae species, including *B. oleracea*

var. *costata*. The larvae metabolize and accumulate secondary metabolites from their host plant⁽⁹⁾, thus deserving to be screened in terms of their biological effects. In this way, the undesirable effects of the plague in the crops yields could be counterbalanced by the use of the plague itself for obtaining bioactive compounds with potential applications as dietary supplements or in food and pharmaceutical industries.

Previously, the aqueous extracts of larvae and host plant were found to act as scavengers of several reactive oxygen species (superoxide and hydroxyl radicals), being the larvae extract the most effective. In addition, the larvae extract exhibited a strong inhibitory effect on xanthine oxidase that was not observed for *B. oleracea* var. *costata* leaves⁽¹⁰⁾. The aqueous extract of *P. brassicae* larvae fed with another *B. oleracea* variety (var. *acephala*) also revealed to be more effective in scavenging nitric oxide radical than that of the host plant⁽¹¹⁾. Because reactive oxidative species can cause a range of DNA lesions, the ability of the extracts to scavenge them is expected to afford some DNA protection, for which other mechanisms can also contribute⁽²⁾.

In this work we intended to evaluate the potential of aqueous extracts of *B. oleracea* var. *costata* leaves and *P. brassicae* larvae to induce DNA damage, using short-term *in vitro* assays involving bacteria (*Salmonella typhimurium* TA98) and mammalian cells (V79 Chinese hamster lung fibroblast cell line). Furthermore, the potential of the extracts to protect against the DNA poison methyl methanesulfonate (MMS) was evaluated. As V79 cells lack CYP activity, MMS was chosen because it is a direct alkylating agent that does not require biotransformation to produce DNA damage⁽¹²⁾. Mutagenicity/antimutagenicity in mammalian cells was assessed using the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) gene mutation assay and the comet assay (single-cell gel electrophoresis) was used to evaluate the genotoxic/antigenotoxic effects at the cell level, since not all DNA insults result in a mutational signature.

Materials and methods

Standards and reagents

Foetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and other biochemicals were obtained from Invitrogen (Gibco, U.S.A). S9 mix was from Trinova Biochem (Giessen, Germany). Chemicals and solvents were of analytical grade and

purchased from Merck (Darmstadt, Germany), Sigma, (St. Louis, MO, USA), SAFC (Steinheim, Germany) and Fluka (Buchs, Switzerland). The water was treated in a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Samples

B. oleracea var. *costata* leaves and *P. brassicae* larvae developed until the fourth instar were grown in greenhouses and collected in November 2008 as previously described⁽⁷⁾. Larvae subjected to 1 hour starvation and its host plant were freeze-dried, powdered and kept in a desiccator in the dark until analysis. Voucher specimens are deposited at the Laboratory of Pharmacognosy from Faculty of Pharmacy of Porto University.

Extracts preparation

Aqueous extracts were prepared by decoction of ca. 1 g sample in 800 mL of water for 30 min, according to a previously described method⁽⁷⁾. The obtained extract was sequentially cooled, filtered, lyophilized and kept in a desiccator in the dark until analysis.

Headspace-Solid Phase Microextraction (HS-SPME)

Approximately 75 mg of lyophilized extract were dissolved in 5 mL of water and submitted to SPME as described before⁽⁹⁾. Samples were stirred at 150 rpm for 5 min, at 40 °C. The fibre (divinylbenzene/PDMS coating, 50/30 µm) was then exposed to the headspace for 20 min. Afterwards the fibre was pulled into the needle sheath and inserted into the injection port of the GC system for thermal desorption during 1 min. Standards were analysed under the same conditions. Samples and standards were assayed in triplicate.

Gas chromatography-mass spectrometry analysis (GC-MS)

Analysis was performed using a Varian CP-3800 gas chromatograph (USA) equipped with a VARIAN Saturn 4000 mass selective detector (USA) and a Saturn GC/MS workstation software version 6.8. The column was VF-5 ms (30 m×0.25 mm×0.25 µm) from VARIAN. The injector port was heated to 220 °C and injections were performed in splitless mode.

The carrier gas was Helium C-60 (Gasin, Portugal), at a constant flow of 1 mL/min. The oven temperature was set at 40 °C for 1 min, increasing 2 °C/min to 220 °C and held for 30 min. All mass spectra were acquired in the electron impact (EI) mode in the range of 40 to 350 m/z, scan speed, 6 scan/s. During the first minute ionization was maintained off. The ion trap detector was set as follows: the transfer line, manifold and trap temperatures were respectively 280, 50 and 180 °C. The emission current was 50 µA, and the electron multiplier was set in relative mode to auto tune procedure. The maximum ionization time was 25,000 µs, with an ionization storage level of 35 m/z. Identification of components was made on the basis of their retention indices relative to C₈-C₂₀ *n*-alkanes indices and mass spectra, which were compared with those of NIST 05 MS Library Database (Match and R.Match > 80%), pure standards analysed under the same conditions and NIST Chemistry WebBook. Peak areas were determined by re-constructed fullscan chromatogram using for each compound some specific ions (Table 1). Quantification was achieved by the external standard method. Three determinations were performed.

Ames test

The assay was performed with the TA98 tester strain of *S. typhimurium*, according to the method described by Ames⁽³⁾. Lyophilized extracts dissolved in water were tested from 10 to 1000 µg/plate. Benzo[a]pyrene (B[a]P) at 5 ng/plate and quercetin at 10 µg/plate, dissolved in DMSO, were used as positive controls in the presence and absence of metabolic activation (S9 mix), respectively. Negative controls were also performed, according to the solvent used to prepare extracts and standards. The assays were carried out in triplicate.

Cell culture and treatments

V79 cells (Chinese hamster lung fibroblasts) were cultured in DMEM, containing 10% heat-inactivated FBS, penicillin/streptomycin (100 U/mL / 100 µg/mL) and 1% non-essential amino acids, in a humidified incubator at 37 °C and 5% CO₂. Cells were seeded at a density of 1x10⁴ cells/cm². After confluence cells were exposed to extracts in concentrations ranging from 4 to 500 µg/mL for 24 hours. Standard volatile compounds dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) were tested in the concentration range 1 to 1000 µg/mL. The final concentration of DMSO (0.1 % v/v) did not affect cellular viability.

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay

Cell viability was assessed by the reduction of MTT to formazan, as described before⁽¹³⁾. Briefly, after exposure, the medium was removed and the cells were incubated for 30 minutes at 37 °C in medium containing 0.5 mg/mL MTT. Then, the solution was removed, formazan crystals were solubilized with DMSO, and the resulting purple solution was measured spectrophotometrically at 570 nm. Data are presented as the percentage of MTT reduction of treated cells relative to control. Three independent assays were conducted, each one of them in triplicate.

Lactate dehydrogenase (LDH) leakage assay

Briefly, the release of the cytosolic enzyme LDH into the culture medium was evaluated as follows: after 24 h exposure, an aliquot of the culture medium was taken and mixed with a NADH and pyruvate buffered solution. LDH activity was measured spectrophotometrically by following the conversion of NADH to NAD⁺, at 340 nm⁽¹⁴⁾. Results are expressed in percentage of control of three independent experiments, performed in triplicate.

HPRT assay

HPRT gene mutation assay was performed according to a previously described method, with some modifications⁽¹⁵⁾. Briefly, cells pre-treated with the aqueous extracts for 24 h were exposed to vehicle or 250 µM MMS, for 4 h. Then cells were detached and 2×10^6 cells were seeded. In order to ensure the expression of mutants, cells were maintained in culture for 7 days, being subcultured as soon as they reached confluence. After this period, the cultures were split into parallel subcultures, being 2×10^5 cells replated into petri-dishes with selective medium (6-thioguanine; 10 µg/mL) and 250 cells in non-selective medium. The 6-thioguanine-resistant colonies and colonies grown in non-selective medium were fixed with methanol, Giemsa-stained and counted 7 days later. Three independent experiments were performed in triplicate for each extract and the mean of mutants/ 10^6 cells were calculated.

Comet assay

The genotoxic effects of the aqueous extracts in V79 cells were evaluated by the alkaline version of comet assay. Antigenotoxic effects against the alkylating agent MMS were also assessed. The assays were performed as previously described by Singh and collaborators⁽¹⁶⁾, with the modifications introduced by Costa and co-workers⁽¹⁷⁾. Briefly, V79 cells were exposed to the extracts for 24 h, washed and detached. For antigenotoxic assays, cells pre-treated with the aqueous extracts were further exposed to 250 μ M MMS for 2 h. After trypsinization cells were collected and viability, assessed by the trypan blue exclusion method, was always higher than 95%. About 5×10^4 cells were diluted in 0.6% low melting point agarose in PBS (pH 7.4) and dropped onto a frosted slide, pre-coated with a 1% normal melting point agarose layer. Slides were then allowed to solidify. Afterwards, slides were immersed in lysing solution and placed on a horizontal electrophoresis tank, filled with alkaline electrophoresis solution (pH 13). Slides were left for 20 min in the dark. Electrophoresis was carried out for 20 min at 30 V and 300 mA (1 V/cm). The slides were then washed with neutralizing solution (pH 7.5) and stained with ethidium bromide solution (20 μ g/mL). Two slides were prepared for each sample and a blind scorer examined 50 randomly selected cells from each slide using a magnification of 400 $\times$. Image capture and analysis were performed with Comet Assay IV software (Perceptive Instruments). Comet tail intensity was the DNA damage parameter evaluated.

Statistical analysis

Comparisons were performed by one-way and two-way analysis of variance (ANOVA), with the Bonferroni post hoc test, using GraphPad Prism 5 software.

Results and discussion

Volatiles characterization

The anticarcinogenic potential of Brassicaceae vegetables is generally attributed to their content in glucosinolates derivatives. Although such compounds were previously identified

in leaves of *B. oleracea* varieties^(8,18) and in *P. brassicae* larvae⁽⁹⁾ they were not detected in the aqueous extracts studied herein. This could be due to the loss of glucosinolates and breakdown products by volatilization during extracts preparation, especially because the tissues were previously disrupted and the extracts were prepared with prolonged heating⁽¹⁹⁾. Even so, the extracts contained some low molecular weight compounds, as screened by HS-SPME/GC-MS technique. One aldehyde (octanal), three norisoprenoids (β -cyclocitral, β -ionone and *trans*-geranylacetone), and two monoterpenes ((-)-menthol and eugenol) were determined (Table 1). Octanal, β -cyclocitral, eugenol and β -ionone were previously characterized in *B. oleracea* var. *costata* leaves⁽⁸⁾. In addition, octanal, (-)-menthol, *trans*-geranylacetone and eugenol were already found in *P. brassicae* fed with another *B. oleracea* variety (var. *acephala*)⁽⁹⁾. When comparing the two aqueous extracts, it can be seen that eugenol is the compound showing the most different content (six fold higher in *B. oleracea* var. *costata* leaves extract).

V79 cells viability

The cytotoxicity of the extracts should be determined before evaluating their mutagenicity, by using an appropriate indicator of cell integrity and growth, in a preliminary range-finding experiment. Because DNA damage is associated with cell death, it is critical that the highest dose tested does not induce excessive cytotoxicity. The extracts were not cytotoxic to V79 cells, at the concentrations range tested (maximum 500 μ g/mL), as verified by MTT and LDH assays (Table 2). The posterior exposure to 250 μ M MMS for 2 h did not affect cell viability (data not shown).

The volatile compounds were cytotoxic at 1 mg/mL, both in MTT and LDH assays ($P<0.001$), with eugenol revealing to be already toxic at 100 μ g/mL in the MTT assay ($P<0.001$) (Fig. 1). These volatiles were present at pg level, or below, at the tested extracts' concentrations: at the highest extract concentration tested (500 μ g/mL), the volatiles ranged between 0.02 pg for (-)-menthol to 2.20 pg for β -ionone in the larvae aqueous extract and from 0.05 pg of β -cyclocitral to 5.65 pg of eugenol in the *B. oleracea* var. *costata* leaves one. So, no toxicity would be expected for the extracts concerning the amount of volatiles present.

In vitro mutagenicity assays

Ames test

The mutagenic potential of the extracts was screened by the *Salmonella* His⁺ reversion assay with TA98 strain, which allows the detection of frame-shift mutations⁽²⁰⁾. Because most vegetables are consumed after cooking, it is important to evaluate the mutagenic potential of extracts that mimic the usual procedure. As it can be seen in Fig. 2, the aqueous extracts did not induce a significant increase in mutation rates, neither in the absence nor in the presence of the external metabolizing enzyme system (S9 fraction from rat liver). The spontaneous mutation rates were in the range of historical controls, and the respective positive controls indicate successful performance of the assay.

Crude juices of *Brassica* vegetables were previously reported to cause genotoxic damage in *Salmonella* TA98 and TA100 strains, without metabolic activation⁽²¹⁾. It is important to refer that the composition of those juices is considerably different from that of the aqueous extracts used in this work. The mutagenic potential of those juices was mainly attributed to isothiocyanates and other glucosinolate breakdown products⁽²¹⁾, being the mutagenicity of allyl and phenethyl isothiocyanates latter confirmed⁽²²⁾. These compounds were not detected in the aqueous extracts assayed herein. However, the aqueous extracts of *P. brassicae* larvae and of *B. oleracea* var. *costata* leaves are rich in flavonoids and phenolic acids, as previously characterized^(7,10). Such compounds were also considered to contribute to the overall mutagenicity of the *Brassica* vegetables juices, although in a lesser extent than the sulphur compounds⁽²¹⁾. The aqueous extracts of *B. oleracea* var. *costata* leaves and *P. brassicae* larvae fed on them mostly contained highly glycosylated kaempferol derivatives^(7,10). It is known that kaempferol is less mutagenic than the more common flavonol quercetin, with the glycosides being considered as non-mutagenic. This can be partly explained by the poor penetration of glycosylated compounds into cells⁽²³⁾. However, considering human nutrition, the glycosides can be hydrolyzed by bacterial glycosidases present in the lower gut, giving rise to the free aglycone with some mutagenic potential⁽²⁴⁾.

Some of the low molecular weight compounds identified in the aqueous extracts were also assayed for their mutagenic potential. Low concentrations of these compounds (eugenol < 1 µg/plate; β-ionone < 50 µg/plate; octanal < 10 µg/plate; β-cyclocitral < 25 µg/plate) exerted antimicrobial activity, as ascertained by the lower density of the bacterial background lawn (data not shown). So, it was not possible to evaluate their mutagenicity

by using the Ames test. Eugenol was previously described as toxic to *S. typhimurium* TA98, TA1537, TA1538, TA100 and TA1535 strains, at 3 mg/plate⁽²⁵⁾. *In silico* screening of mutagenicity to TA98, TA100 and TA1535 strains with the help of Predicted Activity Spectrum for Substances (PASS) indicated n-octanal to be non-mutagenic, while eugenol was predicted to be mutagenic⁽²⁶⁾. β -Ionone and (-)-menthol at non-toxic concentrations were not mutagenic in the assays with TA100, TA98, TA97a and TA1535 strains, with and without metabolic activation^(27,28). Furthermore, it was previously found that β -ionone markedly and dose-dependently antagonized the mutagenic effects of aflatoxin B1 and cyclophosphamide, which was thought to be due to the inhibition of CYP2B enzymes⁽²⁸⁾. Other authors found that eugenol reduced tobacco-induced mutagenicity in the Ames test⁽²⁹⁾. Concerning the volatile composition of the tested extracts, as the amounts of each individual compound were at most in the pg level (Table 1) no mutagenicity was expected.

HPRT assay

The HPRT assay is a widely used test to study mutagenicity in mammalian cells, allowing detecting DNA deletions. Mutation frequency in V79 cells exposed to the extracts did not rise above the spontaneous level (Table 3). The long-time survival of cells previously exposed to the highest concentration of the aqueous extracts was also evaluated. In accordance with the MTT and LDH results, the colony forming ability of the cells was similar to that of the control (data not shown).

Like in bacterial cells, the breakdown products of glucosinolates are able to induce mutagenicity damage to V79 cells at the HPRT *locus*⁽³⁰⁾, but again these compounds were not detected in the aqueous extracts.

The ability of the extracts to protect against the mutagenicity induced by MMS was assessed. MMS is an alkylating agent, which induces many different types of adducts in DNA by reaction with its nucleophilic centres, such as the oxygen and nitrogen atoms of DNA bases. MMS at 250 μ M significantly induced mutagenicity to V79 cells ($P < 0.001$). The extracts (500 μ g/mL) neither protected nor aggravated the mutations caused by MMS (Table 3).

In vitro genotoxicity assay

The potential of the extracts to induce damage in V79 cells DNA was assessed by the comet assay. Tail intensity, which accounts the % of damaged DNA was measured. None

of the aqueous extracts was genotoxic at the tested concentrations (Fig. 3). Furthermore, the larvae aqueous extract protected V79 cells against the genotoxicity induced by MMS (Fig. 3), and a tendency to decrease the deleterious effect of MMS was also observed with the *B. oleracea* var. *costata* one (Fig. 3). It should be emphasized that although the extracts did not reverse the mutagenic effects of MMS at the concentrations necessary to obtain a significant number of HPRT mutants (4 hours exposition were needed to significantly induce mutations, but only 2 hours were used to induce genotoxicity in the comet assay), tail intensity in the comet assay showed a tendency to be reduced by exposure to increasing concentrations of the extracts before the MMS challenge. So, DNA of V79 cells seems to be partly protected by larvae extracts. However if exposition to MMS significantly induce mutations, the extracts fails to protect the cells, as can be seen in Table 3.

The genotoxic/antigenotoxic effects of *Brassica* vegetables seem to depend on the species, test system, doses, duration of the treatment, target tissue, genotoxic agent, among other factors⁽³¹⁾. Several studies performed with juices rather than aqueous extracts have reported positive results in genotoxicity assays, being the effects attributed to glucosinolates or their derived products^(21,32). The results are generally more promising when evaluating the antigenotoxic potential of *Brassica* vegetables. For instance, *B. oleracea* var. *italica* juices displayed clastogenic activity in Chinese hamster ovary cells⁽³³⁾. On the other hand, the protective effects of *Brassica* vegetables against DNA damage induced by heterocyclic amines was reported, both *in vivo* and in mammalian cells^(12, 34). Co-treatment of Hep G2 cells with small amounts of Brussels sprouts juice (0.25–2.0 ml/ml) and B[a]P revealed a reduction of the genotoxic effect of the latter in a dose-dependent manner. In opposition to the protective effect of the crude juice, synergistic effects were observed with allyl isothiocyanate, a breakdown product of sinigrin that is the most abundant glucosinolate in Brussels sprouts, and B[a]P⁽³⁵⁾. The spontaneous rate of mutation of *Drosophila melanogaster* decreased when it was fed with broccoli extracts⁽³¹⁾. The effects of the broccoli diet was dependent on the mechanism of action of the genotoxicant: no effect was observed with a pro-mutagen, synergism was verified with a direct alkylating agent and modulation of the effect was noticed with a pluripotent carcinogen⁽³¹⁾.

Despite some contradictory results, the consumption of cruciferous vegetables at current levels seems to be beneficial regarding cancer reduction in humans, as concluded before^(21,32). The results obtained in this work can support that *P. brassicae* larvae derived products can widen the beneficial effects of its host plant. The present data, however, do

not provide answers as to the phytochemicals responsible for the antigenotoxic effect. One may speculate that flavonol and hydroxycinnamic acids heterosides, as well as small molecular weight molecules, can contribute to the displayed activity. Among them, eugenol has been thoroughly evaluated for its genotoxic potential in mammalian cells. At 600 μ M, eugenol proved to be genotoxic in some human cell lines (VH10 fibroblasts and Caco-2 colon cells), although it had not the same effect in HepG2 hepatocyte cells⁽³⁶⁾. In another work eugenol induced chromosomal aberrations at 410 μ g/mL, in V79 cells, being cytotoxic at higher doses⁽³⁷⁾. With S9 activation the induction of aberrations was increased in a dose-dependent manner⁽³⁷⁾. However, in the aqueous extracts tested herein eugenol concentration is several orders of magnitude below this value (pg).

In conclusion, the aqueous extracts of *B. oleracea* var. *costata* leaves and *P. brassicae* larvae were not mutagenic to bacterial and mammalian cells. Furthermore, the larvae extracts significantly protected V79 cells against the genotoxic effects of MMS and a tendency to decrease MMS genotoxicity was also observed with the leaves one. So, the previously reported genotoxic potential of crude juices of *Brassica* vegetables⁽²¹⁾ could be misleading, since, in general, this kind of vegetables are consumed after prolonged boiling. As the compounds to which the genotoxic effects of the juices were attributed probably exists in minor amounts (for example, isothiocyanates were not detected in the volatile fraction of the aqueous extracts), the consumption of *Brassica* vegetables will not constitute a potential risk to DNA. Concerning the *P. brassicae* larvae extract, it can be regarded as a potential source of bioactive compounds, as it was able to protect the DNA in MMS challenged V79 cells.

Acknowledgements

The authors declare that there are no conflicts of interest. This work was supported by the Fundação para a Ciência e a Tecnologia (PTDC/AGR-AAM/64150/2006 project), "Consolider Ingenio 2010 Project CSD2007-00063 FUN-C-FOOD" and "Grupo de excelencia de la región de Murcia 04486/GERM/06". Fátima Fernandes is indebted to FCT for the grant (SFRH/BD/37963/2007).

References

1. Fenech MF (2010) Dietary reference values of individual micronutrients and nutriomes for genome damage prevention: current status and a road map to the future. *Am J Clin Nutr* **91**, 438S–454S.
2. Ferguson LR & Philpott M (2008) Nutrition and mutagenesis. *Annu Rev Nutr* **28**, 313–329.
3. Ames BN (1979) Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* **204**, 587–593.
4. Cartea ME & Velasco P (2008) Glucosinolates in *Brassica* foods: bioavailability in food and significance for human health. *Phytochem Rev* **7**, 213–229.
5. Steinkellner H, Rabot S, Freywald C, *et al.* (2001) Effects of cruciferous vegetables and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in the bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. *Mutat Res* **480–481**, 285–297.
6. Pichersky E, Noel JP & Dudareva N (2006) Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. *Science* **311**, 808–811.
7. Ferreres F, Fernandes F, Pereira DM, *et al.* (2009) Phenolics metabolism in insects: *Pieris brassicae* - *Brassica oleracea* var. *costata* ecological duo. *J Agric Food Chem* **57**, 9035–9043.
8. Guedes de Pinho P, Valentão P, Gonçalves RF, *et al.* (2009) Volatile composition of *Brassica oleracea* L. var. *costata* DC leaves using solid-phase microextraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **23**, 2292–2300.
9. Fernandes F, Pereira DM, Guedes de Pinho P, *et al.* (2009) Metabolic fate of dietary volatile compounds in *Pieris brassicae*. *Microchem J* **93**, 99–109.
10. Sousa C, Pereira DM, Valentão P, *et al.* (2009) *Pieris brassicae* inhibits xanthine oxidase. *J Agric Food Chem* **57**, 2288–2294.
11. Ferreres F, Fernandes F, Oliveira J, *et al.* (2009) Metabolic profiling and biological capacity of *Pieris brassicae* fed with kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). *Food Chem Toxicol* **47**, 1209–1220.
12. Platt KL, Edenharder R, Aderhold S, *et al.* (2010) Fruits and vegetables protect against the genotoxicity of heterocyclic aromatic amines activated by human xenobiotic-metabolizing enzymes expressed in immortal mammalian cells. *Mutat Res* **703**, 90–98.

13. Pinho BR, Sousa C, Valentão P, *et al.* (2011) Is nitric oxide decrease observed with naphthoquinones in LPS stimulated RAW 264.7 macrophages a beneficial property? *PLoS One* **6**, e24098.
14. Sousa C, Pontes H, Carmo H, *et al.* (2009) Water extracts of *Brassica oleracea* var. *costata* potentiate paraquat toxicity to rat hepatocytes *in vitro*. *Toxicol In Vitro* **23**, 1131-1138.
15. Kreja L & Seidel H-J (2002) Evaluation of the genotoxic potential of some microbial volatile organic compounds (MVOC) with the comet assay, the micronucleus assay and the HPRT gene mutation assay. *Mutat Res* **513**, 143-150.
16. Singh N, McCoy M, Tice R, *et al.* (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* **175**, 184-191.
17. Costa S, Coelho P, Costa C, *et al.* (2008) Genotoxic damage in pathology anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde. *Toxicology* **252**, 40-48.
18. Fernandes F, Pereira DM, Guedes de Pinho P, *et al.* (2010) Headspace solid-phase microextraction and gas chromatography/ion trap-mass spectrometry applied to a living system: *Pieris brassicae* fed with kale. *Food Chem* **119**, 1681-1693
19. Rungapamestry V, Duncan AJ, Fuller Z, *et al.* (2006) Changes in glucosinolate concentrations, myrosinase activity, and production of metabolites of glucosinolates in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cooked for different durations. *J Agric Food Chem* **54**, 7628-7634.
20. Mortelmans K & Zeiger E (2000) The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res* **455**, 29-60.
21. Kassie F, Parzefall W, Musk S, *et al.* (1996) Genotoxic effects of crude juices from *Brassica* vegetables and juices and extracts from phytopharmaceutical preparations and spices of cruciferous plants origin in bacterial and mammalian cells. *Chem Biol Interact* **102**, 1-16.
22. Kassie F & Knasmüller S (2000) Genotoxic effects of allyl isothiocyanate (AITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Chem Biol Interact* **127**, 163-180.
23. Silva ID, Rodrigues AS, Gaspar J, *et al.* (1997) Involvement of rat cytochrome 1A1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin: relevance to the genotoxicity of kaempferol. *Mutagenesis* **12**, 383-390.
24. Silva ID, Rodrigues A, Gaspar J, *et al.* (1996) Mutagenicity of kaempferol in V79 cells: the role of cytochromes P450. *Teratog Carcinog Mutagen* **16**, 229-241.

25. To LP, Hunt TP & Andersen ME (1982) Mutagenicity of *trans*-anetol, estragol, eugenol and safrole in the Ames *Salmonella typhimurium* assay. *Bull Environm Contam Toxicol* **28**, 647-654.
26. Riju A, Sithara K, Suja SN, *et al.* (2009) *In silico* screening major spice phytochemicals for their novel biological activity and pharmacological fitness. *J Bioequiv Availab* **1**, 63-73.
27. Gomes-Carneiro MR, Felzenszwalb I & Paumgartten FJR (1998) Mutagenicity testing of (±)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the *Salmonella*/microsome assay. *Mutat Res* **416**, 129–136
28. Gomes-Carneiro MR, Dias DMM & Paumgartten FJR (2006) Study on the mutagenicity and antimutagenicity of β-ionone in the *Salmonella*/microsome assay. *Food Chem Toxicol* **44**, 522–527.
29. Sukumaran K & Kuttan R (1995) Inhibition of tobacco-induced mutagenesis by eugenol and plant extracts. *Mutat Res* **343**, 25-30.
30. Glatt H, Baasanjav-Gerber C, Schumacher F, *et al.* (2011) 1-Methoxy-3-indolylmethyl glucosinolate; a potent genotoxicant in bacterial and mammalian cells: Mechanisms of bioactivation. *Chem-Biol Interact* **192**, 81-86.
31. Heres-Pulido ME, Dueñas-García I, Castañeda-Partida L, *et al.* (2010) Genotoxicity studies of organically grown broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and its interactions with urethane, methyl methanesulfonate and 4-nitroquinoline-1-oxide genotoxicity in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol* **48**, 120-128.
32. Baasanjav-Gerber C, Hollnagel HM, Brauchmann J, *et al.* (2011) Detection of genotoxicants in Brassicales using endogenous DNA as a surrogate target and adducts determined by ³²P-postlabelling as an experimental end point. *Mutagenesis* **26**, 407-413.
33. Charles GD, Linscombe VA, Tornesi B, *et al.* (2002) An *in vitro* screening paradigm for extracts of whole foods for detection of potential toxicants. *Food Chem Toxicol* **40**, 1391-1402.
34. Humblot C, Lhoste E, Knasmüller S, *et al.* (2004) Protective effects of Brussels sprouts, oligosaccharides and fermented milk towards 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)-induced genotoxicity in the human flora associated F344 rat: role of xenobiotic metabolising enzymes and intestinal microflora. *J Chromatogr B* **802**, 231-237.

35. Laky B, Knasmüller S, Gminski R, *et al.* (2002) Protective effects of Brussels sprouts towards B[a]P-induced DNA damage: a model study with the single-cell gel electrophoresis (SCGE)/Hep G2 assay. *Food Chem Toxicol* **40**, 1077-1083.
36. Slameňová D, Horváthová E, Wsólová L, *et al.* (2009) Investigation of anti-oxidative, cytotoxic, DNA-damaging and DNA-protective effects of plant volatiles eugenol and borneol in human-derived HepG2, Caco-2 and VH10 cell lines. *Mutat Res* **677**, 46-52.
37. Maralhas A, Monteiro A, Martins C, *et al.* (2006) Genotoxicity and endoreduplication inducing activity of the food flavouring eugenol. *Mutagenesis* **21**, 199-204.

Figure 1. Effect of volatile compounds on MTT reduction and LDH release by V79 cells. Results correspond to percentage of control and are expressed as the means and standard errors. *** Mean values were significantly different compared with control ($P<0.001$).

Figure 2. Ames test with *S. typhimurium* TA98 strain exposed to *B. oleracea* aqueous extract (A) and to *P. brassicae* larvae aqueous extract (B), performed with and without metabolic activation. Results are expressed as the means and standard errors.

Figure 3. Comet tail intensity in V79 cells exposed to *B. oleracea* var. *costata* aqueous extracts (A) and to *P. brassicae* larvae aqueous extract (B) either with or without MMS. Results are expressed as the means and standard errors. Mean values were significantly different from cells challenged with MMS (** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

Table 1. Volatile composition of *P. brassicae* larvae and *B. oleracea* var. *costata* leaves aqueous extracts (µg/kg)

Compound	Quantification ions (m/z)	Response factors	<i>P. brassicae</i>		<i>B. oleracea</i> var. <i>costata</i>	
			Mean	SD	Mean	SD
Octanal	43/56/69/84	7.8×10^6	32.377	3.223	85.487	4.996
<i>trans</i> -Geranylacetone	69/107/151/194	6.6×10^6	21.630	2.241	11.612	1.091
Eugenol	77/131/164	4.7×10^5	37.185	1.891	232.546	12.140
β-Cyclocitral	109/137/152	5.3×10^7	4.171	0.417	1.341	0.103
(-)-Menthol	71/81/95/123/155	1.5×10^7	13.358	0.016	30.094	0.408
β-Ionone	43/91/135/177	1.9×10^6	58.098	4.624	85.569	2.227

Table 2. Viability (%) of V79 cells exposed to *P. brassicae* larvae and *B. oleracea* var. *costata* leaves aqueous extracts

Extract ($\mu\text{g/mL}$)	<i>B. oleracea</i> var. <i>costata</i>				<i>P. brassicae</i>			
	MTT assay		LDH assay		MTT assay		LDH assay	
	Mean	SE	Mean	SE	MTT	SE	LDH	SE
4	99.22	2.85	91.47	6.14	107.42	3.53	96.66	0.96
20	99.03	3.94	92.10	5.00	104.60	6.20	97.87	2.60
100	100.19	3.83	89.57	2.41	104.26	5.76	93.82	5.81
500	97.64	2.27	93.43	4.86	106.32	7.84	96.36	2.20

Table 3. Mutation frequency / 1×10^6 cells in the HPRT assay with V79 cells exposed to *P. brassicae* larvae and *B. oleracea* var. *costata* leaves aqueous extracts at 500 $\mu\text{g/mL}$, with or without MMS (250 μM).

	Control		MMS	
	Mean	SE	Mean	SE
Control	8.89	2.74	50.00	7.99
<i>B. oleracea</i> var. <i>costata</i>	3.89	2.74	72.22	7.03
<i>P. brassicae</i>	6.67	1.44	56.11	10.06

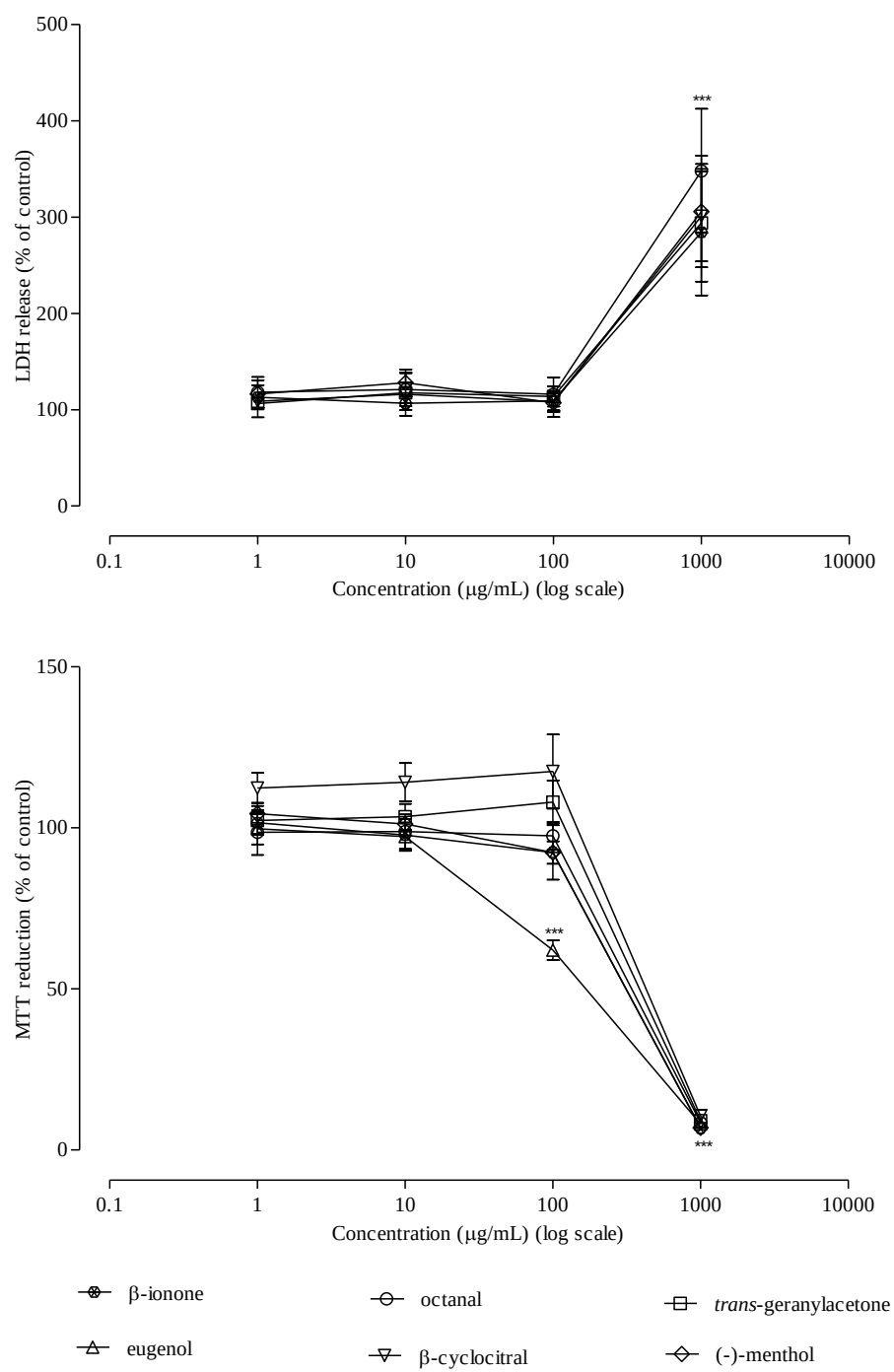


Figure 1

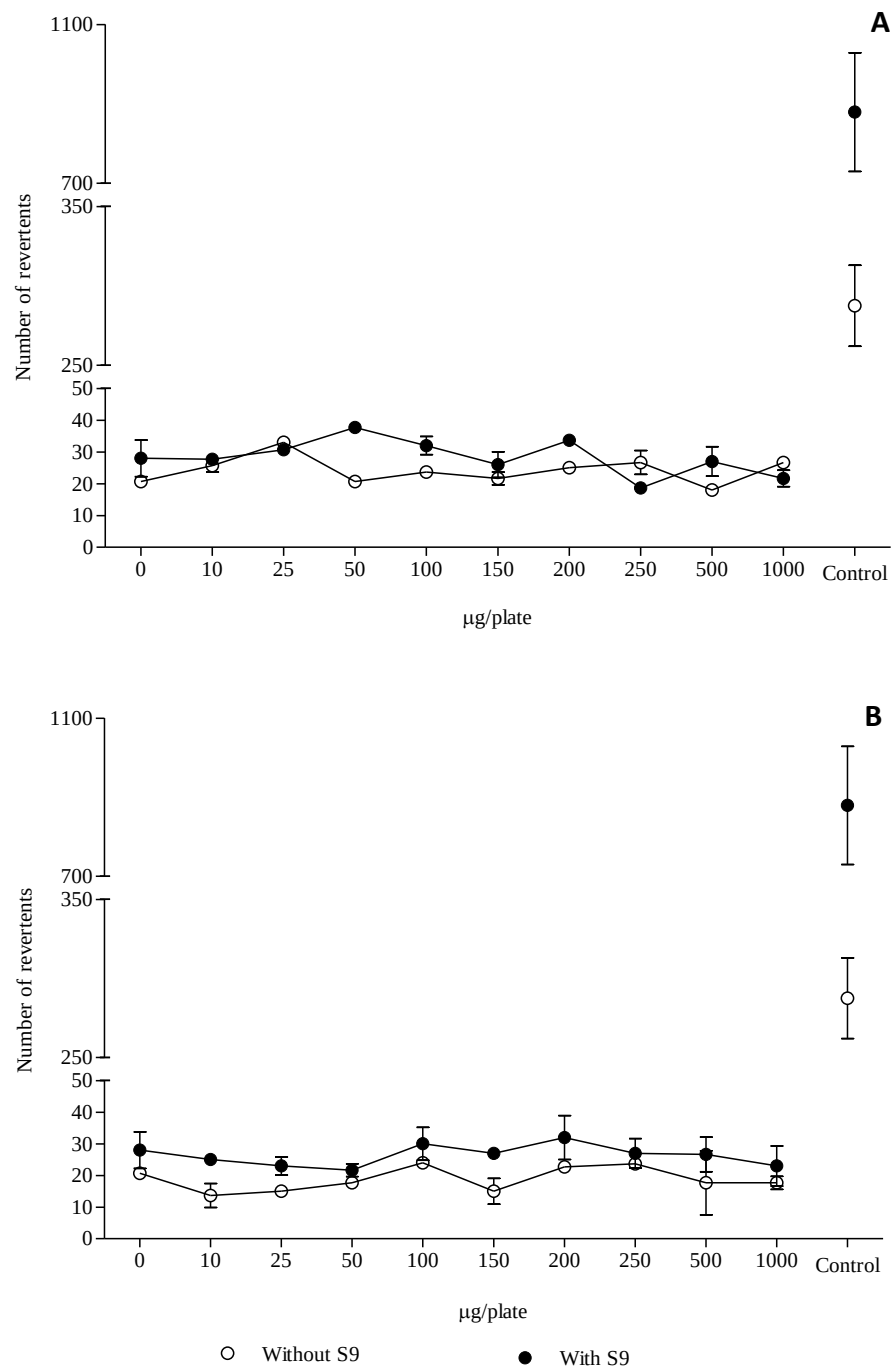


Figure 2

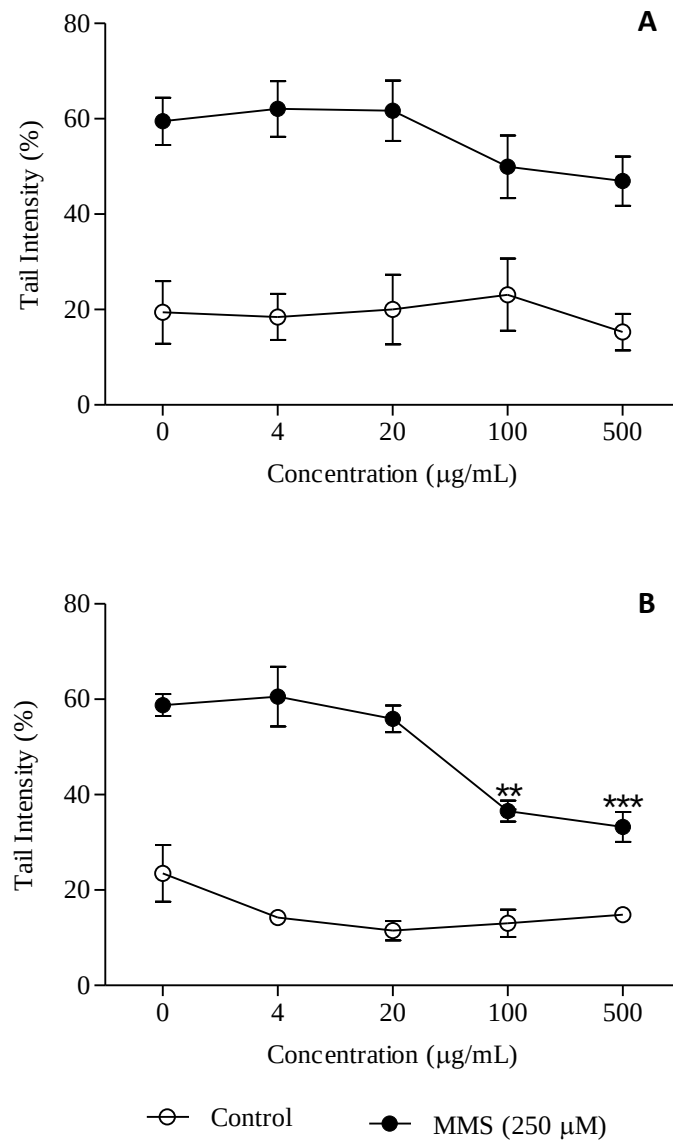


Figure 3

PARTE III

DISCUSSÃO INTEGRADA

CONCLUSÕES

5. DISCUSSÃO INTEGRADA

5.1. Perfil metabólico do sistema *Pieris brassicae* / *Brassica oleracea*

A evolução das plantas transformou o ambiente terrestre num recurso muito valioso para a comunidade de herbívoros. Em ecossistemas naturais, as plantas e os insectos são apenas alguns dos organismos vivos que interagem continuamente de forma complexa (5). Como foi referido anteriormente, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos para reduzir ou evitar a ocorrência de ataques por insectos, incluindo respostas específicas de diferentes vias metabólicas que alteram consideravelmente os seus aspectos fisiológicos. Por outro lado, como consequência da co-evolução, os insectos desenvolveram várias estratégias para superar as barreiras de defesa das plantas, permitindo-lhes alimentarem-se, crescerem e reproduzirem-se nas suas plantas hospedeiras (5, 243).

Esta associação entre planta e insecto pode muitas vezes resultar no aparecimento de novos compostos nos insectos, muitos dos quais inexistentes na planta hospedeira, resultantes dos processos metabólicos que ocorrem no mesmo. Perante tão variada composição e riqueza em diversas classes de compostos, podemos estar na presença de matrizes de elevado potencial biológico. Desta forma, os diversos materiais de *P. brassicae*, alimentada com duas variedades de *B. oleracea* conhecidas por constituírem fontes de compostos bioactivos, podem, eles próprios ter elevado potencial biológico. Nesta tese de doutoramento pretendeu-se apresentar uma perspectiva ecológica integrada de modo a tirar partido dos prejuízos causados pela *P. brassicae* através do uso deste insecto como potencial fonte de compostos bioactivos, com interesse para a saúde.

Nas secções seguintes serão discutidos os resultados obtidos na caracterização do perfil metabólico dos diversos materiais de *P. brassicae* (exúvias, borboletas, larvas e respectivos excrementos), alimentada com *B. oleracea* var. *acephala* (couve-galega) e com *B. oleracea* var. *costata* (couve tronchuda), o seu potencial biológico e a relação com esse perfil.

5.1.1. Compostos fenólicos

Procedeu-se à análise de sementes e folhas das duas variedades de *B. oleracea* usadas como hospedeiras, bem como de todos os materiais correspondentes às diferentes fases do ciclo de vida da *P. brassicae* (exúvias, larvas e borboletas) e dos seus excrementos. Nestas matrizes foram identificados por HPLC-MS 88 compostos fenólicos (Tabela 1) [(4.1, 4.2, 4.3), (171, 179, 244)].

Para o estudo da interacção insecto-planta é fundamental o conhecimento da composição química da planta hospedeira, uma vez que esta influencia o perfil metabólico do insecto. Assim, refere-se seguidamente a caracterização dos materiais das duas variedades de *Brassica* que lhes serviram como substrato de oviposição e alimento nesta tese de doutoramento.

De modo geral, a couve-galega caracteriza-se pela presença de quantidades elevadas de flavonóides e diferentes ácidos hidroxicinâmicos, repartidos por quatro grupos: flavonóides glicosilados, flavonóides glicosilados e acilados com ácidos hidroxicinâmicos, ácidos hidroxicinâmicos e derivados glicosilados de ácidos hidroxicinâmicos [(4.1, 4.3), (179, 244)]. As folhas desta variedade apresentaram uma elevada riqueza em heterósidos flavonólicos, nomeadamente em derivados de campferol, quercetina e isoramnetina, sendo os primeiros os predominantes. Apresenta também heterósidos de ácidos hidroxicinâmicos, nomeadamente de ácidos ferúlico e sinápico, sendo maioritariamente derivados com genciobiose [4.1, (179)].

A couve tronchuda apresenta uma constituição semelhante à da couve-galega, com quantidades elevadas de flavonóides e diferentes ácidos hidroxicinâmicos, podendo diferenciar-se os compostos fenólicos identificados nos mesmos quatro grupos atrás citados [(4.2, 4.3), (171, 244)]. Porém, algumas diferenças qualitativas podem ser observadas. Comparando as duas variedades, a couve tronchuda caracteriza-se por um menor número de derivados da quercetina e pela ausência de derivados da isoramnetina. Contudo, a maior diferença entre estas duas variedades reside na presença de ésteres de ácidos hidroxicinâmicos com ácido quínico nas folhas da couve tronchuda, ausentes na couve-galega [(4.1, 4.2), (171, 179)].

Tabela 1. Compostos fenólicos identificados nas várias matrizes estudadas^a.

	Couve-galega			Couve tronchuda			<i>P. brassicae</i> alimentada com couve galega			<i>P. brassicae</i> alimentada com couve tronchuda						
	S	F	31	S	F	31	L(12h)	Exc	L (1h)	L (2h)	L (4h)	L (6h)	L (8h)	Exc	L (7h)	Exc
Compostos fenólicos	14	31														
1,2,2'-Tri-sinapoilgenciobiósido	x			x												
1,2-Di-sinapoilgenciobiósido	x			x												
Isômero de 1,2-di-sinapoilgenciobiósido	x			x												
Isômero de 1,2-di-sinapoilgenciobiósido	x			x												
1,2-Di-sinapoilglucósido	x			x												
1-Sinapoilglucósido				x												
Isômero de 1-sinapoilglucósido	x			x												
Isômero de 1-sinapoilglucósido				x												
Ácido 3-ferulilquinico						x										
Ácido 3- <i>p</i> -cumaroilquinico						x										
Ácido 4-ferulilquinico						x										
Ácido 4- <i>p</i> -cumaroilquinico						x										
Ácido 5- <i>p</i> -cumaroilquinico						x										
Di-sinapoilgenciobiósido						x										
Isômero de di-sinapoilgenciobiósido						x										
Isômero de di-sinapoilgenciobiósido						x										

Tabela 1. Compostos fenólicos identificados nas várias matrizes estudadas^a (continuação).

	Couve-galega			Couve tronchuda			P. brassicae alimentada com couve galega			P. brassicae alimentada com couve tronchuda					
	S	F	S	F	S	F	L(12h)	Exc.	L (1h)	L (2h)	L (4h)	L (6h)	L (8h)	Exc.	Exc.
Di-ferulilgenciobiósido		X													
Di-sinapoil feruloligenciobiósido		X													
Di-sinapoilgenciobiósido		X													
Ácido férulico							X*	X*	X	X	X	X	X	X	X
Ferulisinapoilgenciobiósido						X									
Isómero de ferulisinapoilgenciobiósido						X									
Isómero de ferulisinapoilgenciobiósido						X									
Isoramnetina-3-O -diglucósido-7-O -glucósido	X														
Isoramnetina-3-O -genciobiósido														X	
Isoramnetina-3-O -genciobiósido-7-O -glucósido		X													
Isoramnetina-3-O -soforósido														X	
Isoramnetina-3-O -soforósido-7-O -glucósido		X													
Campferol-3-O -(sinapoil)diglucósido-7-O -glucósido	X			X											
Campferol-3-O -(sinapoil)triglucósido-7-O -glucósido	X			X											
Campferol-3-O -diglucósido-7-O -glucósido	X														
Campferol-3-O -(cafeoil)soforósido-7-O -glucósido		X		X										X	

Tabela 1. Compostos fenólicos identificados nas várias matrizes estudadas^a (continuação).

	Couve-galega			Couve tronchuda			<i>P. brassicae</i> alimentada com couve galega			<i>P. brassicae</i> alimentada com couve tronchuda				
	S	F	S	S	F	S	L(12h)	Exc.	L (1h)	L (2h)	L (4h)	L (6h)	L (8h)	Exc.
Campferol-3-O-(di-sinapil)triglicósido-7-O-glucósido						X								
Campferol-3-O-(ferulil)soforósido		X			X			X						
Campferol-3-O-(ferulil)soforósido-7-O-diglicósido		X						X						X
Campferol-3-O-(ferulil)soforósido-7-O-glucósido		X			X			X		X				
Isômero de campferol-3-O-(ferulil)soforósido-7-O-glucósido										X				X
Campferol-3-O-(ferulil)soforósido-7-O-ramnósido					X									
Campferol-3-O-(ferulil)soforotriósido								X						
Campferol-3-O-(ferulil)triglicósido-7-O-diglicósido														X
Campferol-3-O-(ferulil)triglicósido-7-O-glucósido					X					X	X			X
Campferol-3-O-(metoxicafeil)soforósido-7-O-glucósido		X												
Campferol-3-O-(p-cumaril)genciobiósido-7-O-glucósido		X												
Campferol-3-O-(p-cumaril)soforósido								X						
Campferol-3-O-(p-cumaril)soforósido-7-O-diglicósido		X												
Campferol-3-O-(p-cumaril)soforósido-7-O-glucósido		X												
Campferol-3-O-(p-cumaril)soforotriósido								X						
Campferol-3-O-(sinapil)soforósido		X			X									

Tabela 1. Compostos fenólicos identificados nas várias matrizes estudadas^a (continuação).

	Couve-galega			Couve tronchuda			<i>P. brassicae</i> alimentada com couve galega			<i>P. brassicae</i> alimentada com couve tronchuda					
	S	F	S	F	S	F	L(12h)	Exc.	L (1h)	L (2h)	L (4h)	L (6h)	L (8h)	Exc.	Exc.
Campferol-3-O-(sinapoil)soforósido-7-O-diglucoósido		X						X							
Campferol-3-O-(sinapoil)soforósido-7-O-glucósido		X			X			X	X	X					
Campferol-3-O-(sinapoil)soforósido-7-O-ramnósido					X										
Campferol-3-O-(sinapoil)soforotriósido								X							
Campferol-3-O-(sinapoil)triglucoósido-7-O-glucósido					X				X	X	X				
Campferol-3-O-(sinapoil)triglucoósido-7-O-ramnósido					X										
Campferol-3-O-genciobiósido								X							
Campferol-3-O-genciobiósido-7-O-diglucoósido		X						X							
Campferol-3-O-genciobiósido-7-O-glucósido		X													
Campferol-3-O-glucósido								X	X	X	X				
Campferol-3-O-glucósido sulfato								X							
Campferol-3-O-soforósido		X			X			X	X	X	X	X	X		
Campferol-3-O-soforósido sulfato								X	X	X	X	X	X		
Campferol-3-O-soforósido-7-O-diglucoósido		X			X			X	X	X	X	X	X	X	
Campferol-3-O-soforósido-7-O-glucósido		X			X			X	X	X	X	X	X	X	
Campferol-3-O-soforósido-7-O-ramnósido					X										X

Tabela 1. Compostos fenólicos identificados nas várias matrizes estudadas^a (continuação).

	Couve-galega			Couve troncuda			P. brassicae alimentada com couve galega			P. brassicae alimentada com couve troncuda				
	S	F	S	S	F	F	L(12h)	Exc.	L (1h)	L (2h)	L (4h)	L (6h)	L (8h)	Exc.
Campherol-3-O-soforotriósido								X						
Campherol-3-O-soforotriósido-7-O-diglucósido								X						
Campherol-3-O-soforotriósido-7-O-glucósido								X						
Campherol-3-O-triglucósido-7-O-diglucósido														X
Campherol-3-O-triglucósido-7-O-glucósido									X					X
Caempherol-3-O-triglucósido-7-O-ramnoglucósido														
Campherol-3-O-triglucósido-7-O-ramnósido														X
Campherol-3-O-triglucósido-7-O-glucósido														
Quercetina-3-O-(feruloi)soforósido														
Quercetina-3-O-(feruloi)soforósido-7-O-diglucósido														
Quercetina-3-O-(feruloi)soforósido-7-O-glucósido														
Quercetina-3-O-(sinapoi)soforósido														
Quercetina-3-O-(sinapoi)soforósido-7-O-glucósido														
Quercetina-3-O-glucósido sulfato														
Quercetina-3-O-soforósido														

Tabela 1. Compostos fenólicos identificados nas várias matrizes estudadas^a (continuação).

	Couve-galega			Couve tronchuda			P. brassicae alimentada com couve galega			P. brassicae alimentada com couve tronchuda					
	S	F	X	S	F	X	L(12h)	Exc.		L (1h)	L (2h)	L (4h)	L (6h)	L (8h)	Exc.
Quercetina-3-O -soforósido-7-O -diglucósido			X												
Quercetina-3-O -soforósido-7-O -glucósido		X			X			X		X	X				
Quercetina-3-O -soforotrióssido-7-O -glucósido		X													
Ácido sinápico							X *			X	X	X	X	X	X
Sinapoiil, feruloligenciobiósido		X													
Sinapolcolina	X				X										
Sinapoligenciobiósido	X				X										
Isómero de sinapoligenciobiósido					X										

^a**S:** sementes; **F:** folhas; **L:** larva e respectivo tempo de jejum; **Exc:** excrementos. *Compostos fenólicos detectados apenas nos extractos metanólicos.

Relativamente às sementes de ambas as variedades verificou-se uma composição mais pobre em compostos fenólicos quando comparadas com as folhas [(4.1, 4.2, 4.3), (171, 179, 244)]. De um modo geral, o perfil fenólico de ambas as sementes é semelhante, sendo de realçar a presença de derivados da isoramnetina nas sementes da couve-galega, os quais estão ausentes nas sementes da couve tronchuda [4.3, (244)]. Contrariamente ao verificado para as folhas, observou-se que nas sementes os heterósidos de ácidos hidroxicinâmicos são os compostos fenólicos mais abundantes [(4.1, 4.2, 4.3), (171, 179, 244)].

Após a caracterização do perfil químico das plantas hospedeiras procedeu-se ao estudo aprofundado da composição de todos os materiais de *P. brassicae*. Confirmou-se a presença de compostos fenólicos em larvas alimentadas com couve tronchuda [4.2, (171)] e foram identificados pela primeira vez compostos fenólicos em larvas alimentadas com couve-galega [4.1, (179)], bem como nos excrementos das larvas alimentadas com as duas espécies de *Brassica* [(4.1, 4.2), (171, 179)]. Estes compostos estão ausentes das exúvias e borboletas [4.1, (179)].

De um modo geral, as larvas e os seus respectivos excrementos caracterizam-se sobretudo pela presença de heterósidos flavonólicos, sendo também a maioria destes derivados do campferol [(4.1, 4.2), (171, 179)]. É de destacar a presença de ácidos hidroxicinâmicos livres e de heterósidos flavonólicos sulfatados nas larvas alimentadas quer com couve-galega, quer com couve tronchuda e nos excrementos das larvas alimentadas com couve-galega, compostos esses inexistentes em ambas as plantas hospedeiras [(4.1, 4.2), (171, 179)]. Na Figura 24 estão esquematizados os padrões de substituição dos flavonóis e ácidos hidroxicinâmicos encontrados em cada uma das matrizes atrás referidas.

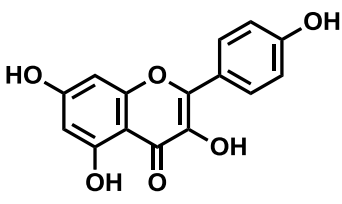
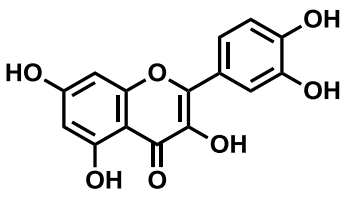
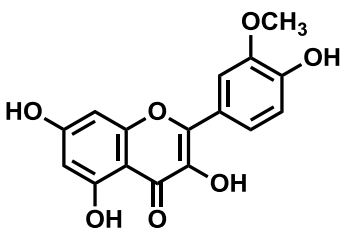
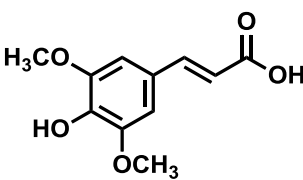
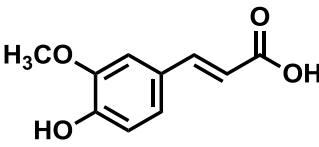
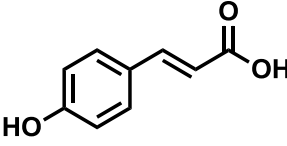
Genina	Açúcares		Grupo Acilo
	Posição 3	Posição 7	Posição 3
 Campferol	Glucose	Glucose	Ácido sinápico
	Soforose	Ramnose	Ácido ferúlico
	Soforotriose	Ramnose-glucose	Ácido <i>p</i> -cumárico
	Genciobiose		Ácido cafeico
			Ácido metoxicafeico
	Posição 3	Posição 7	Posição 3
 Quercetina	Glucose	Glucose	Ácido sinápico
	Soforose		Ácido ferúlico
	Soforotriose		
	Posição 3	Posição 7	Posição 3
 Isoramnetina	Glucose	Glucose	
	Soforose		
	Genciobiose		
 Ácido sinápico	Glucose		Ácido ferúlico
	Soforose		Colina
	Genciobiose		Ácido quínico
 Ácido ferúlico	Genciobiose		Ácido sinápico
			Ácido quínico
 Ácido <i>p</i> -cumárico			Ácido quínico

Figura 24. Padrão de substituição dos compostos fenólicos nos extractos dos materiais de *P. brassicae* (larva e seus excrementos) e das suas plantas hospedeiras.

5.1.1.1. Flavonóis

Todos os materiais de *P. brassicae* bem como das plantas hospedeiras usados neste estudo são caracterizados principalmente pela presença de derivados acilados e glicosilados de flavonóides [(4.1, 4.2), (171, 179)]. Como se pode observar pelas Tabelas 1 e 2, a principal genina encontrada nas diferentes matrizes é o campferol. Os flavonóides aparecem substituídos nos hidroxilos nas posições 3 e/ou 7, com grupos glicosilados com um número variável de açúcares [(4.1, 4.2), (171, 179)]. Em alguns compostos a cadeia glicosídica é acilada com um ou dois ácidos hidroxicinâmicos [(4.1, 4.2), (171, 179)].

Assim, relativamente ao perfil de substituição dos flavonóis, nas sementes de couve-galega identificaram-se 6 heterósidos flavonólicos e nas sementes de couve tronchuda apenas 4, sendo di-substituídos nos dois casos [4.3, (244)].

Nas folhas da couve-galega foram identificados 27 compostos, dos quais 21 são di-substituídos [4.1, (179)]. A couve tronchuda exibiu 20 flavonóis, sendo 17 destes di-substituídos [4.2, (171)]. Este número é menor em ambas as larvas [(4.1, 4.2), (171, 179)].

Nas larvas alimentadas com couve-galega (com 12h de jejum) foram identificados 4 compostos, todos mono-substituídos (Tabelas 1 e 2) [4.1, (179)].

Nas larvas alimentadas com couve tronchuda (com 8h de jejum), identificaram-se 5 heterósidos flavonólicos, também maioritariamente mono-substituídos [4.2, (171)]. Nos excrementos das larvas alimentadas com couve-galega foram identificados 25 compostos, sendo 10 destes di-substituídos [4.1, (179)]. Nos excrementos das larvas alimentadas com couve tronchuda foram identificados 10 compostos, todos eles di-substituídos [4.2, (171)]. As geninas (campferol, quercetina e isoramnetina) não foram detectadas nas matrizes analisadas [(4.1, 4.2), (171, 179)] (Tabelas 1 e 2).

A metabolização de compostos fenólicos pela *P. brassicae* será abordada adiante (item 5.1.1.3.).

Tabela 2. Heterósidos fenólicos encontrados nas matrizes estudadas^a.

Couve-galega			Couve tronchuda			P. brassicae alimentada com couve-galega			P. brassicae alimentada com couve tronchuda						
S	F	S	F	S	F	L (12h)	Exc	L (1h)	L (2h)	L (4h)	L (6h)	L (8h)	Exc		
Heterósidos flavonólicos															
Total	6	27	4	20	4	25	14	10	8	5	5	10	10		
Campferol	4	16	3	19	3	20	12	8	6	4	4	10	10		
Mono-substituídos (em 3)	3		3		3	11	3	3	3	2	2	2			
Di-substituídos (em 3 e 7)	4	13	3	16		9	9	5	3	2	2	10	10		
Glicosilação															
1 açúcar	2				1	2	2	1	1						
2 açúcares	1		3		2	5	3	2	2	2	2	2			
3 açúcares	2	8	1	7		7	3	2	1	1	1	4			
4 açúcares	2	5	2	7		5	4	3	2	1	1	4			
5 açúcares				2		1						2			
Não acilados	2	5	1	8	3	11	6	5	5	4	4	6			
Mono-acilados	2	11	2	10		9	6	3	1			4			
Di-acilados				1											
Derivados metoxicafeoil	1														
Derivados cafeoil	1		1				1								
Derivados sinapoil	2	3	2	6		3	2	2	1						
Derivados feruloil	3			4		4	3	1				4			
Derivados p-cumaroil	3					2									
Sulfatados					2	2	1	1	1	1	1	1			

Tabela 2. Heterósídeos fenólicos encontrados nas matrizes estudadas^a (continuação).

Couve-galega			Couve tronchuda			P. brassicae alimentada com couve galega			P. brassicae alimentada com couve tronchuda				
	S	F	S	F	L (12h)	Exc	L (1h)	L (2h)	L (4h)	L (6h)	L (8h)	Exc	
Quercetina	1	9	1	1	1	3	2	2	2	1	1		
Mono-substituídos (em 3)		3			1	2	1	1	1	1	1		
Di-substituídos (em 3 e 7)	1	6	1	1		1	1	1	1				
Glicosilação													
1 açúcar						1							
2 açúcares		3			1	1	1	1	1	1	1		
3 açúcares	1	3	1	1		1	1	1	1				
4 açúcares		3											
Não acilados	1	4	1	1	1	3	2	2	2	1	1		
Mono-acilados													
Derivados sinapoil		2											
Derivados feruloil		3											
Sulfatados													
						1							
Isoramnetina													
	1	2				2							
Mono-substituídos (em 3)													
						2							
Di-substituídos (em 3 e 7)	1	2											
Glicosilação													
2 açúcares						2							
3 açúcares	1	2											
Não acilados													
	1	2				2							

Tabela 2. Heterósidos fenólicos encontrados nas matrizes estudadas^a (continuação).

Couve-galega			Couve tronchuda			<i>P. brassicae</i> alimentada com couve galega			<i>P. brassicae</i> alimentada com couve tronchuda					
S	F		S	F		L (12h)	Exc		L (1h)	L (2h)	L (4h)	L (6h)	L (8h)	Exc
Heterósidos de ácidos hidroxicinâmicos														
Total	7	4	10	6	6									
Genciobiósidos	5	4	6	6										
Mono-acilados	1		2											
Di-acilados	3	3	3	6										
Tri-acilados	1	1	1											
Glucósidos	2		4											
Mono-acilados	1		3											
Di-acilados	1		1											

^aS: sementes; F: folhas; L: larva e respectivo tempo de jejum; Exc: excrementos.

Quanto à fracção glicosídica dos flavonóis, a glucose é o único açúcar presente, com a excepção da couve tronchuda e dos excrementos das larvas alimentadas com esta planta, onde foram identificados heterósidos de campferol contendo ramnose (Tabela 1) [(4.1, 4.2), (171, 179)]. Os açúcares encontram-se ligados a hidroxilos (O-heterósidos) do carbono 3, nos compostos mono-substituídos, ou dos carbonos 3 e 7, nos compostos di-substituídos, sendo este o padrão de substituição predominante (Tabelas 1 e 2). O número de resíduos de açúcar dos grupos substituintes no carbono 3 é geralmente maior do que no carbono 7, sendo que em alguns compostos é igual. Não existe nenhum composto substituído apenas no carbono 7 [(4.1, 4.2), (171, 179)]. Quando existe mais do que um resíduo de glucose a ligação interglucosídica mais comum é 1→2 (soforoses e soforotrioses) [(4.1, 4.2), (171, 179)]. Para alguns dos compostos não foi possível determinar a ligação interglucosídica. Quanto ao número de açúcares, foram encontrados grupos substituintes contendo desde 1 a 5 açúcares, sendo que os pentaglucósidos apenas foram identificados nas folhas de couve tronchuda e nos excrementos das larvas alimentadas com esta matriz [(4.1, 4.2), (171, 179)]. Estes foram também detectados nos excrementos das larvas alimentadas com couve-galega, mas neste caso em quantidades vestigiais (Tabelas 1 e 2) [(4.1, 4.2), (171, 179)].

No que concerne aos heterósidos flavonólicos acilados com ácidos hidroxixinâmicos (ácidos *p*-cumárico, ferúlico, cafeico, sinápico e metoxicafeico) identificados nas diferentes matrizes, podemos verificar que a acilação ocorre nos açúcares substituintes do hidroxilo no carbono 3, sendo que apenas os substituintes contendo 2 ou 3 açúcares são acilados [(4.1, 4.2), (171, 179)]. Estes compostos são predominantes relativamente aos heterósidos não acilados (Tabela 1).

Nas sementes de cada uma das variedades de *B. oleracea* foram identificados derivados acilados de flavonóides. Esses compostos são mono-acilados com o ácido sinápico [4.3, (244)]. Nas folhas, tanto de couve-galega como de couve tronchuda, verifica-se um aumento do número de flavonóides acilados, tendo sido identificados 18 e 11 compostos, respectivamente (Tabelas 1 e 2) [(4.1, 4.2), (171, 179)].

Na couve-galega, os compostos acilados com os ácidos *p*-cumárico, ferúlico, cafeico, sinápico e metoxicafeico correspondem a derivados de campferol e de quercetina, sendo todos eles mono-acilados [(4.1, 4.3), (179, 244)]. Na couve tronchuda são todos derivados do campferol, acilados com ácidos ferúlico, cafeico e sinápico e todos mono-acilados, com a excepção de um único composto di-acilado com ácido sinápico [(4.2, 4.3), (171, 244)] (Tabelas 1 e 2).

Nas larvas alimentadas com couve tronchuda verificou-se a presença de compostos acilados, mas apenas nas primeiras horas de jejum a que foram submetidas, tendo esses compostos desaparecido após as 4h de jejum [4.2, (171)]. Nas larvas alimentadas com couve-galega não foram encontrados compostos acilados (Tabelas 1 e 2) [4.1, (179)].

Em contrapartida, nos excrementos de ambas as larvas foram encontrados vários derivados acilados e todos igualmente derivados de campferol. Nos excrementos das larvas alimentadas com couve-galega foram adicionalmente detectados derivados de isoramnetina [(4.1, 4.2), (171, 179)]. Nos excrementos de larva alimentada com couve-galega encontram-se derivados acilados com os ácidos *p*-cumárico, ferúlico e sinápico, num total de 9 compostos [4.1, (179)]. Os excrementos da larva da couve tronchuda exibem apenas 4 compostos e todos acilados com ácido ferúlico (Tabelas 1 e 2) [4.2, (171)].

Comparando o perfil de flavonóides de todas as matrizes, é possível verificar que nenhum é comum a todas elas [(4.1, 4.2, 4.3), (171, 179, 244)]. Comparando as sementes e folhas da mesma variedade, verifica-se que não existe nenhum composto em comum [(4.1, 4.2, 4.3), (171, 179, 244)]. Fazendo a comparação entre as matrizes vegetais, observa-se uma semelhança composicional de 80% entre as sementes da couve-galega e as da couve tronchuda, que apresentam 12 compostos em comum [4.3, (244)]. Por outro lado, comparando as folhas de ambas as variedades, a semelhança entre elas desce para menos de 39%. Dos 31 compostos encontrados em ambas as folhas, apenas 8 são comuns às duas variedades [(4.1, 4.2), (171, 179)].

Relativamente à *P. brassicae* verifica-se que dos 6 compostos encontrados na larva alimentada com couve-galega apenas 2 coincidem com os detectados na planta hospedeira, destacando-se, assim, o aparecimento de 4 novos compostos [4.1, (179)]. Por outro lado, entre esta larva e os seus excrementos verifica-se uma coincidência de 5 compostos [4.1, (179)]. Os 2 compostos encontrados em comum na larva e na couve-galega, nomeadamente campferol-3-*O*-soforósido e quercetina-3-*O*-soforósido, estão também presentes nos excrementos [4.1, (179)].

Relativamente à *P. brassicae* alimentada com couve tronchuda foram identificados 10 compostos em comum com a sua planta hospedeira. Destes, 5 estão igualmente presentes nos seus excrementos [4.2, (171)].

Entre os compostos mais frequentemente encontrados nas matrizes analisadas estão o ácido ferúlico, o campferol-3-*O*-(sinapoyl)soforósido-7-*O*-glucósido, o campferol-3-*O*-soforósido, o campferol-3-*O*-soforósido sulfato, o campferol-3-*O*-soforósido-7-*O*-diglucósido, o campferol-3-*O*-soforósido-7-*O*-glucósido, a quercetina-3-*O*-soforósido, a quercetina-3-*O*-soforósido-7-*O*-glucósido e o ácido sinápico, que são encontrados em cinco ou mais matrizes [(4.1, 4.2, 4.3), (171, 179, 244)].

5.1.1.2. Derivados de ácidos hidroxicinâmicos

Os ácidos hidroxicinâmicos foram encontrados em todas as matrizes (Tabelas 1 e 2), sendo compostos abundantes em algumas delas, não apenas associados a heterósidos flavonólicos, mas também esterificados com glucose, genciobiose, ácido quínico e também com colina. Foram identificados 28 compostos diferentes, na sua maioria derivados do ácido sinápico. Verifica-se também a presença de ácidos sinápico e ferúlico livres, mas apenas nos materiais de *P. brassicae* (larvas e excrementos) (Tabela 1) [(4.1, 4.2, 4.3), (171, 179, 244)].

O grupo acilo pode ser constituído por 1 a 3 resíduos de ácidos, que podem ser iguais ou diferentes. Entre os compostos com ácido sinápico, a maioria contém dois resíduos desse ácido (di-sinapoil), havendo, no entanto, alguns que além do ácido sinápico têm ácido ferúlico. Quando estes compostos são glicosilados a fracção glicosídica é quase sempre constituída por 1 ou 2 resíduos de glucose, com ligações interglicosídicas 1 → 6 (genciobiose) [(4.1, 4.2, 4.3), (171, 179, 244)].

Tal como se verificou para os heterósidos flavonólicos, os derivados não flavonólicos de ácidos hidroxicinâmicos são característicos de cada matriz, estando apenas alguns compostos presentes em todas as matrizes e não existindo nenhum comum a todas elas (Tabela 1) [(4.1, 4.2, 4.3), (171, 179, 244)]. As sementes das duas variedades de *B. oleracea* estudadas são similares no que respeita a esta classe de metabolitos, apresentando 8 compostos em comum [4.3, (244)]. No entanto, estes desaparecem ao longo da germinação, estando ausentes das respectivas folhas (Tabela 1) [(4.1, 4.2, 4.3), (171, 179, 244)]. Apesar da ausência destes compostos nas folhas de ambas as variedades, estas revelaram também uma constituição rica e variada em derivados não flavonólicos de ácidos hidroxicinâmicos, tendo sido encontrados 4 e 11 compostos nas folhas de couve-galega e couve tronchuda, respectivamente, não sendo nenhum comum às duas variedades [(4.1, 4.2), (171, 179)]. De realçar a presença de ésteres de ácidos hidroxicinâmicos com ácido quínico nas folhas de couve tronchuda, os quais estão ausentes em todas as outras matrizes estudadas. Nesta matriz foram identificados os ácidos 3-feruloilquínico, 3-*p*-cumaroilquínico, 4-feruloilquínico, 4-*p*-cumaroilquínico e 5-*p*-cumaroilquínico. Verifica-se assim que se trata de compostos característicos de cada uma das variedades de *B. oleracea* e, portanto, poderão ser marcadores químicos das mesmas [4.2, (171)].

A sinapoilcolina (Figura 10) foi identificada nas sementes de couve-galega e de couve tronchuda, tendo-se verificado que este composto desaparece ao longo do

desenvolvimento da planta, não se detectando a sua presença nas folhas de ambas as variedades, nem nas larvas que delas se alimentaram [4.3, (244)]. A degradação da sinapoilcolina origina trimetilamina, um composto que confere um sabor desagradável (84) e que se estivesse presente tornaria as partes comestíveis destas duas variedades menos desejadas.

Nenhum dos derivados não flavonólicos de ácidos hidroxicinâmicos encontrados nas folhas de cada uma das variedades está presente nos materiais de *P. brassicae* (Tabela 1) [(4.1, 4.2), (171, 179)]. Estas matrizes apresentam dois ácidos hidroxicinâmicos livres, os ácidos sinápico e ferúlico, com a excepção dos excrementos da larva alimentada com couve-galega, nos quais não se encontra o ácido sinápico [(4.1, 4.2), (171, 179)]. A sua presença em ambas as larvas resultará de processos de metabolização que serão discutidos seguidamente.

5.1.1.3. Metabolização de compostos fenólicos pela *P. brassicae*

Em todos os materiais de *P. brassicae* estudados foram detectados compostos fenólicos, excepto nas borboletas e nas exúvias [(4.1, 4.2), (171, 179)]. A ausência de compostos fenólicos nestes dois materiais indica que, durante o processamento metabólico que ocorre na *P. brassicae*, estes compostos são degradados ou eliminados pelos excrementos, não sendo acumulados ao nível das suas asas (121, 122, 169-171, 179).

Com o objectivo de avaliar o processo de metabolização realizado pela *P. brassicae* monitorizou-se a evolução do perfil fenólico das larvas após terem sido alimentadas com couve tronchuda, ao longo de 8h [4.2, (171)].

Dos 16 compostos encontrados na larva analisada uma hora após ter sido alimentada, 10 são comuns aos da planta hospedeira, o que se traduz numa semelhança de 62% entre estas duas matrizes. Ao longo do processo digestivo esta semelhança vai diminuindo, sendo de 58% ao fim de 2h de jejum, 50% às 4h e 43% a partir das 6h de jejum [4.2, (171)]. Estes valores reflectem a capacidade da larva para sequestrar parte dos compostos fenólicos presentes na planta hospedeira, podendo estes ser acumulados na sua forma original ou sofrer alterações metabólicas.

Os metabolitos encontrados (Tabela 1) demonstram a ocorrência de vários processos de metabolização na larva e que podem envolver vários compostos que esta sequestra da sua alimentação. Por outro lado, a presença de determinados compostos pode ser o resultado da sua bioacumulação, por se tratar de metabolitos presentes na planta hospedeira numa quantidade que não permite a sua identificação. Nestas condições pode ocorrer uma acumulação total destes compostos, sem saturação dos mecanismos de metabolização da larva, não sendo por isso necessário excretar o excesso dos mesmos (121). Os diversos processos que se verificam na *P. brassicae* serão agora descritos.

Bioacumulação

Nas larvas de *P. brassicae* alimentadas com couve tronchuda, atendendo a todos os tempos de jejum estudados, foram identificados 10 compostos fenólicos em comum com a sua planta hospedeira. Porém, apenas 3 se mantêm durante todo o processo de digestão e estão ausentes dos seus excrementos: campferol-3-O-soforósido, campferol-3-O-soforósido sulfato e quercetina-3-O-soforósido [4.2, (171)]. A presença destes compostos na larva analisada após um jejum de 8h mostra a sua capacidade não só para sequestrar, mas também acumular compostos a partir da planta hospedeira. O mesmo se verificou com as larvas de *P. brassicae* alimentadas com couve-galega, que apresentaram dois compostos em comum à planta hospedeira após 12h de jejum: campferol-3-O-soforósido e quercetina-3-O-soforósido [4.1, (171)].

Relativamente aos restantes 7 compostos comuns à planta hospedeira, apesar de se verificar uma bioacumulação inicial, deixam de ser detectados na larva de *P. brassicae* alimentada com couve tronchuda com o decorrer do jejum, o que sugere que possam ser usados para a produção de outros [4.2, (171)].

Metabolização

Desacilação

Nas larvas alimentadas com couve tronchuda analisadas ao fim de 1h de jejum foram encontrados 6 compostos, todos mono-acilados com os ácidos ferúlico, cafeico ou sinápico e todos derivados do campferol. Esse número diminuiu para 2 nas larvas com 2h de jejum, sendo também derivados do campferol, mono-acilados com ácidos ferúlico e sinápico. Nas larvas com 4 h de jejum apenas foi encontrado um único composto

derivado do campferol e acilado com ácido sinápico. Tal como se verificou com as larvas alimentadas com couve-galega analisadas ao fim de 12 h de jejum, nas larvas da couve tronchuda com 6 e 8h de jejum não foram encontrados quaisquer compostos acilados (Tabelas 1 e 2) [(4.1, 4.2), (171, 179)]. Este desaparecimento de compostos acilados que se verifica ao longo do tempo poderá estar relacionado com processos de desacilação. Adicionalmente, em ambas as larvas foram identificados dois ácidos hidroxicinâmicos livres: ácidos ferúlico e sinápico. Estes compostos, ausentes na planta hospedeira, poderão resultar igualmente da desacilação dos vários compostos acilados característicos da couve.

Uma excepção a este processo parece ser o caso dos derivados do ácido *p*-cumárico. A couve tronchuda apresenta vários compostos deste tipo; porém, o ácido *p*-cumárico não foi encontrado na larva ou excrementos [4.2, (171)]. Uma aparente explicação poderá ser o facto de o ácido *p*-cumárico poder ser desviado para a produção de outras classes de compostos, por exemplo quinonas [4.2, (171)].

Desglicosilação

Relativamente aos heterósidos flavonólicos, ao longo do período de jejum verificou-se uma clara diminuição dos compostos com 3 e 4 açúcares. Estes representam 57% destes compostos na larva com 1h de jejum, correspondendo a 40% às 8h de jejum. Contrariamente, verifica-se um aumento dos compostos com 2 açúcares que sobem de 29% (1h jejum) para 60% às 8h de jejum. Estes resultados demonstram que a *P. brassicae* promove a desglicosilação dos compostos, levando ao aparecimento de outros com um grau de glicosilação inferior. O mesmo se verificou para a larva alimentada com couve-galega e com 12h de jejum, para a qual o nível máximo de glicosilação é com 2 açúcares [4.2, (171)].

Sulfatação

A sulfatação é um processo de destoxificação utilizado pela larva de *P. brassicae*. Os compostos sulfatados possuem uma maior hidrofília o que pode contribuir para uma melhor excreção, uma vez que torna a sua passagem mais difícil através da membrana, impossibilitando a sua absorção (245). Os dois compostos sulfatados encontrados na larva alimentada com couve-galega e nos seus excrementos (campferol-3-*O*-soforósido sulfato e campferol-3-*O*-glucósido sulfato) resultam, provavelmente, de um dos compostos maioritários da planta hospedeira, o campferol-3-*O*-soforósido. Por outro lado,

poderão também surgir da desacilação e/ou desglicosilação na posição 3 ou 7 de heterósidos do campferol, que podem dar origem ao campferol-3-*O*-glucósido ou ao campferol-3-*O*-soforósido com posterior ligação do grupo sulfato. Nos excrementos desta larva foi também identificada a quercetina-3-*O*-glucósido sulfato. Este composto poderá surgir da desglicosilação e posterior sulfatação da quercetina-3-*O*-soforósido, que como está em quantidades pequenas na planta é completamente excretada não sendo detectada na larva [4.1, (179)].

Este processo de destoxificação também se observou na larva alimentada com couve tronchuda. Verificou-se a presença de um composto sulfatado (campferol-3-*O*-soforósido sulfato) durante todo o processo de digestão, estando porém ausente dos seus excrementos, recolhidos ao fim de 8h [4.2, (171)]. Esta situação pode ser explicada pelo facto destes compostos serem excretados apenas após este período de jejum, como verificado com os excrementos de larva alimentada com a couve-galega (sujeita a 12h de jejum). Na Figura 25, estão esquematizadas as possíveis transformações metabólicas dos flavonóides pela *P. brassicae*.

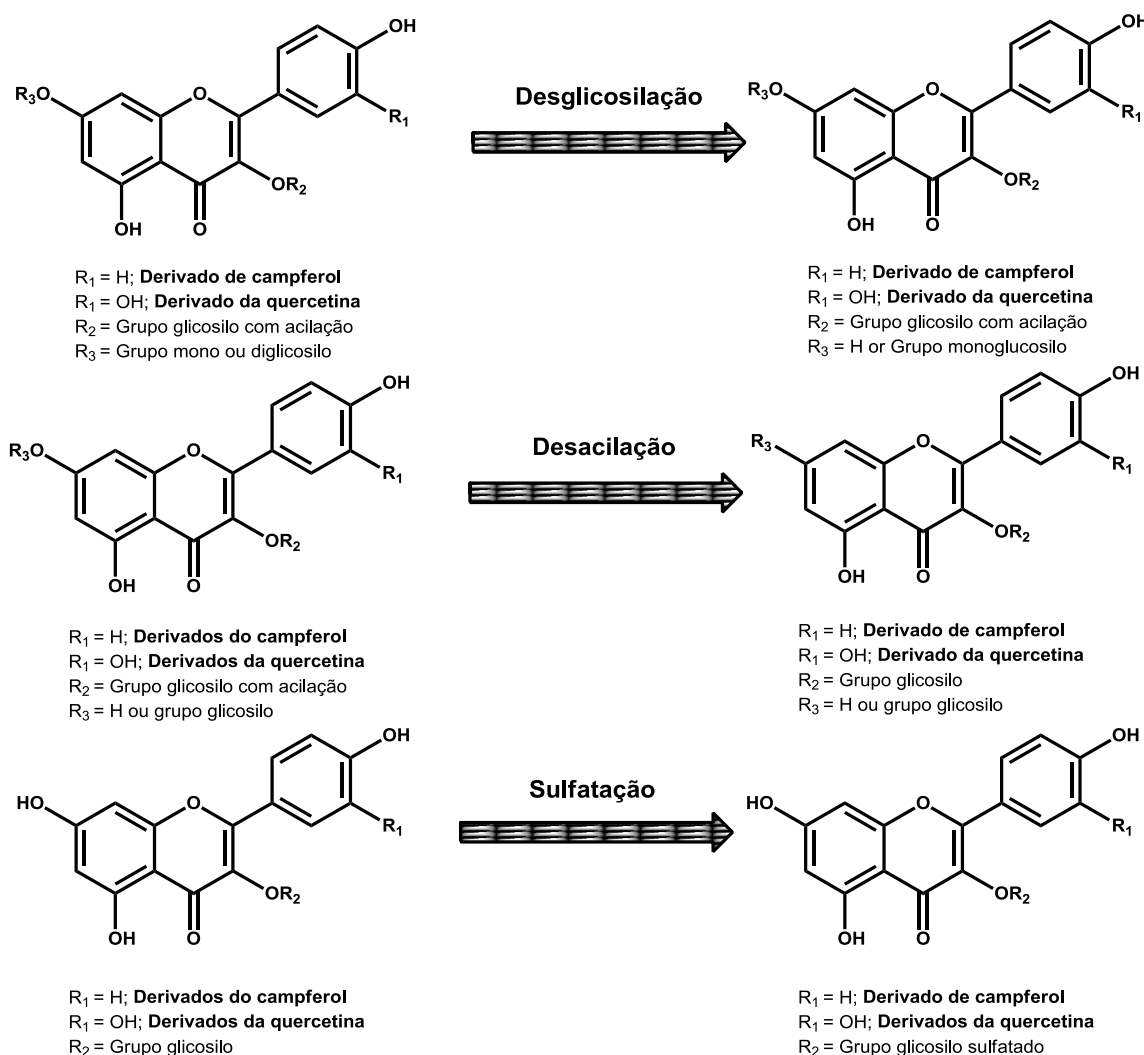


Figura 25. Possíveis transformações metabólicas dos flavonóides pela *P. brassicae* [adaptada de (1)].

Excreção

Além da capacidade para sequestrar os compostos que ingere da planta hospedeira e de os transformar, conforme acima referido, a larva é também capaz de excretar compostos que não lhe interessam ou porque atingiu o seu limite de metabolização. Exemplo disso é o facto dos excrementos resultantes da larva alimentada com couve tronchuda apresentarem 12 compostos fenólicos. Destes, 7 são comuns à planta hospedeira e 3 deles não foram encontrados na larva em nenhum dos tempos de jejum, o que significa que devem ser imediatamente excretados após ingestão [4.2, (171)].

O mesmo se verificou para a larva alimentada com couve-galega, havendo 9 compostos comuns à planta hospedeira e aos excrementos, mas que estão ausentes na larva [4.1, (179)].

5.1.1.4. Algumas considerações sobre os cromatogramas obtidos

Os cromatogramas obtidos com as duas variedades de *B. oleracea* estudadas, bem como com os excrementos das larvas de *P. brassicae* que delas se alimentaram, são muito complexos. Verifica-se que, de uma maneira geral, os heterósidos flavonólicos eluem primeiro do que os não flavonólicos [(4.1, 4.2, 4.3), (171, 179, 244)].

O comportamento cromatográfico dos heterósidos flavonólicos mostra que, em HPLC de fase reversa, os compostos com maior grau de glicosilação têm um tempo de retenção mais baixo. Adicionalmente, a posição da glicosilação no núcleo do flavonóide afecta significativamente o tempo de retenção (176). Regra geral, a introdução de uma glucose no hidroxilo no carbono 7 reduz significativamente o tempo de retenção dos compostos glicosilados no carbono 3. Contudo, a introdução de um segundo resíduo de hexose no carbono 7 aumenta o tempo de retenção (246).

A ordem de eluição dos derivados acilados com o mesmo tipo de substituição glicosídica não coincide com a dos ácidos livres [(4.1, 4.2, 4.3), (171, 179, 244)]. Embora não tenha sido encontrado o ácido cafeico nas matrizes analisadas, pelos dados da bibliografia, tendo em conta as mesmas condições analíticas, os tempos de retenção dos ácidos livres aumentam na seguinte ordem: ferúlico < sinápico, enquanto nos flavonóides acilados a ordem é metoxicafeico < cafeico < sinápico < ferúlico < *p*-cumárico (179, 247).

A acilação com ácidos hidroxicinâmicos afecta a mobilidade cromatográfica de forma diversa, dependendo da substituição glicosídica do flavonóide. Por exemplo, verifica-se que os compostos acilados sem glicosilação no carbono 7 têm tempos de retenção similares ou superiores aos compostos desacilados correspondentes. Todos os compostos que se encontram glicosilados no carbono 7 originam compostos desacilados, com tempos de retenção inferiores aos compostos acilados originais (246), excepto quando a acilação é com o ácido metoxicafeico [(4.1, 4.2), (171, 179)].

Verificaram-se comportamentos cromatográficos distintos em vários compostos: há compostos acilados que eluem antes dos compostos não acilados dos quais derivam (como é o caso do campferol-3-*O*-(metoxicafeoil)soforósido-7-*O*-glucósido identificado nas folhas de couve-galega) [4.1, (179)]; há compostos acilados no açúcar do carbono 3 e sem glicosilação no carbono 7 com tempos de retenção inferiores a alguns compostos glicosilados nas posições 3 e 7 (como é o caso do campferol-3-*O*-(feruloil)soforósido, identificado nas folhas de couve tronchuda, que elui antes do campferol-3-*O*-(feruloil)soforósido-7-*O*-glucósido) e ainda há derivados acilados do mesmo composto que eluem antes ou depois do composto que lhes deu origem (como são exemplos o campferol-3-*O*-(metoxicafeoil)soforósido-7-*O*-glucósido e o campferol-3-*O*-

(cafeoil)soforósido-7-*O*-glucósido presentes nas folhas de couve-galega, que eluem antes e depois do campferol-3-*O*-soforósido-7-*O*-glucósido, respectivamente) [4.1, (179)]. Este último comportamento parece indicar que o ácido presente também influencia a ordem de eluição (121).

5.1.1.5. Quantificação

Neste trabalho procedeu-se à quantificação dos compostos fenólicos das várias matrizes em extractos aquosos, obtidos por decocção [(4.1, 4.2, 4.3), (171, 179, 244)]. Como o método extractivo afecta não só o tipo de compostos como a quantidade em que cada um deles é extraído, este procedimento permitiu avaliar a quantidade de compostos fenólicos disponível na forma de consumo habitual das folhas de couve-galega e de couve tronchuda. Além dos extractos aquosos de todas as matrizes, foram também estudados extractos metanólicos dos materiais de *P. brassicae* e couve-galega hospedeira para aferir sobre a possível extracção de outros compostos fenólicos [4.7, (248)].

Em trabalhos realizados por outros grupos verificou-se que durante o processo de cozedura uma parte dos flavonóides é retida no tecido vegetal, mas a maioria é libertada para a água (188, 249). Nielsen e colaboradores (188) concluíram que apenas 14 a 28% dos heterósidos dos bróculos (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) ficavam retidos, sendo os restantes lixiviados para a água de cozedura, havendo ainda, uma pequena parte que dava origem às geninas. A quantidade de compostos extraídos pela água é maior nos tecidos que apresentam uma grande superfície de contacto. Para aumentar a extracção a partir das nossas matrizes todos os tecidos foram reduzidos a partículas de tamanho semelhante. A quantidade de compostos fenólicos de todos os extractos encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3. Conteúdo em compostos fenólicos de todos os extractos estudados (mg/Kg, peso seco) ^a.

	Couve-galega		Couve tronchuda		<i>P. brassicae</i> alimentada com couve-galega		<i>P. brassicae</i> alimentada com couve tronchuda	
	S	F	S	F	L (12h)	Exc	Lag (8h)	Exc
Extracto aquoso	12227,0	11080,7	24026,3	9556,8	28,5	6043,1	1183,1	6725,3
Extracto metanólico		3779,6			271,5	49,3		

^a**S**: sementes; **F**: folhas; **L**: larva e respectivo tempo de jejum; **Exc**: excrementos.

O conteúdo em compostos fenólicos dos extractos aquosos das sementes de couve-galega e de couve tronchuda apresentam uma grande diferença, sendo o conteúdo do último quase o dobro do das sementes de couve-galega (Tabela 3) [4.3, (244)]. Esta maior riqueza das sementes de couve tronchuda não é no entanto acompanhada pelas folhas, pois embora muito próximas as folhas da couve-galega apresentam um maior teor de compostos fenólicos (Tabela 3) [(4.1, 4.2, 4.3), (171, 179, 244)].

As sementes são constituídas maioritariamente por ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados, que representam cerca de 81 e 89% do conteúdo total de compostos fenólicos presentes nas sementes de couve-galega e couve tronchuda, respectivamente [4.3, (244)]. Este conteúdo diminui para 0,8 e 25% nas folhas de couve-galega e de couve tronchuda, respectivamente, demonstrando que ao longo do processo de germinação e crescimento da planta há uma inversão do perfil fenólico [(4.1, 4.2), (171, 179)].

As folhas da couve tronchuda são mais ricas em ácidos hidroxicinâmicos (1779,9 mg/Kg vs 83,5 mg/Kg na couve-galega) e ésteres de ácidos hidroxicinâmicos com ácido quínico (409,2 mg/Kg), os quais estão ausentes nas folhas de couve-galega (Figuras 26 e 27) [(4.1, 4.2), (171, 179)].

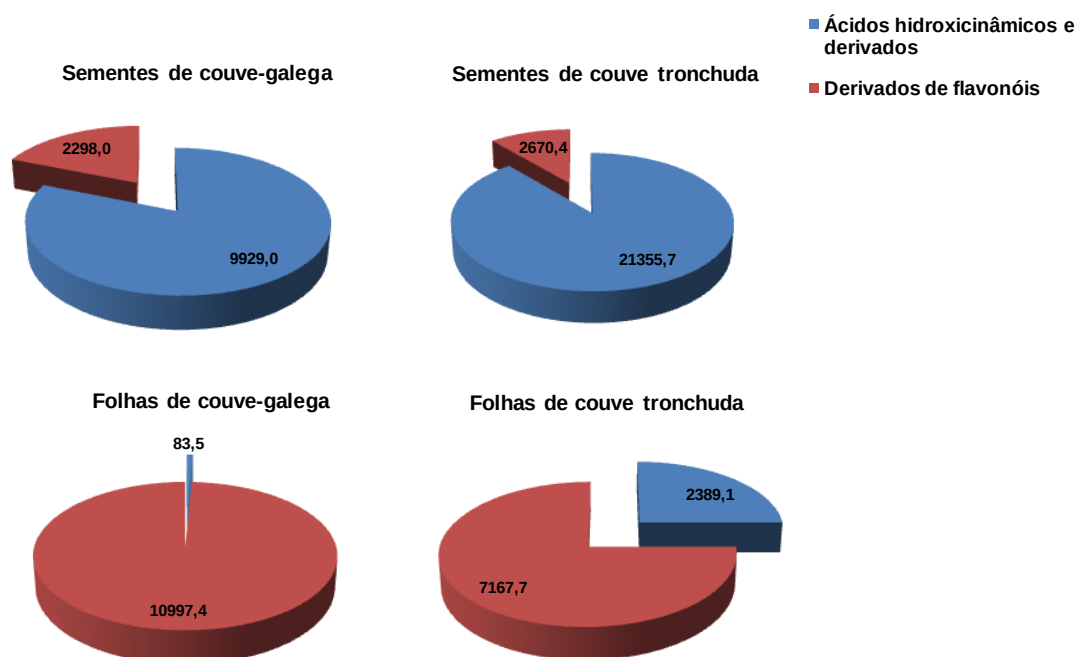


Figura 26. Derivados de ácidos hidroxicinâmicos e de flavonóis nas matrizes estudadas (mg/kg).

Nas folhas de ambas as espécies são os derivados flavonólicos (acilados e não acilados) o grupo maioritário, representando quase a totalidade dos compostos nas de couve-galega (99% do seu conteúdo total) e 75% do teor total de compostos fenólicos nas de couve tronchuda (Figura 26) [(4.1, 4.2), (171, 179)]. Do seu elevado teor em heterósidos flavonólicos destaca-se a predominância dos derivados de campferol, que correspondem a 79% do total destes compostos na couve-galega (8664,4 mg/Kg) [4.1, (179)] e à totalidade dos encontrados nas folhas de couve tronchuda (7167,7 mg/Kg) [4.2, (171)]. Nas folhas de couve-galega encontram-se ainda derivados de quercetina e de isoramnetina, correspondentes a 20 e 1% do seu conteúdo total em heterósidos flavonólicos, respectivamente (Figura 27) [4.1, (179)].

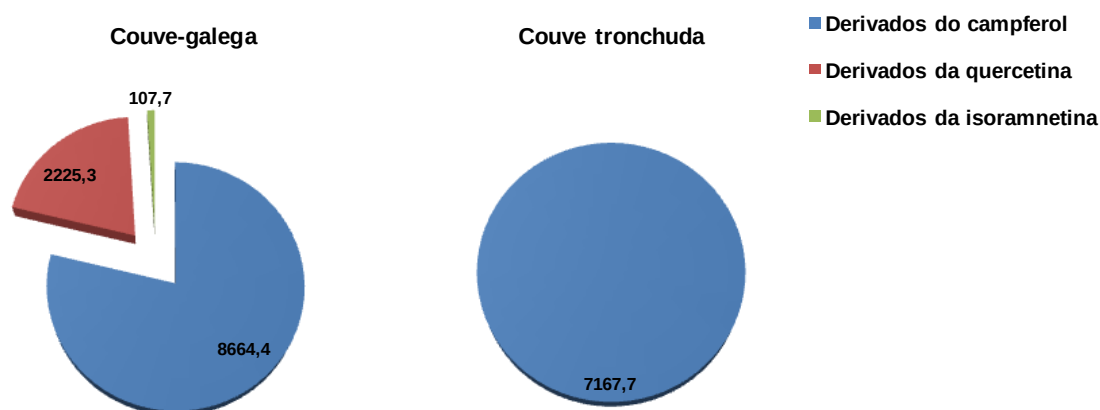


Figura 27. Derivados de campferol, quercetina e isoramnetina nas folhas de couve-galega e de couve tronchuda (mg/kg).

Adicionalmente, verifica-se que a maioria dos heterósidos flavonólicos encontrados nestas matrizes são derivados acilados, correspondendo a 68 e 75% do total destes compostos nas folhas de couve-galega e couve tronchuda, respectivamente [(4.1, 4.2), (171, 179)]. O resíduo acilo mais comum nas folhas de couve-galega é o feruloilo [4.1, (179)], enquanto nas folhas de couve tronchuda é o sinapoilo [4.2, (171)], sendo estes dois os predominantes em ambas as folhas (Figura 28) [(4.1, 4.2), (171, 179)].

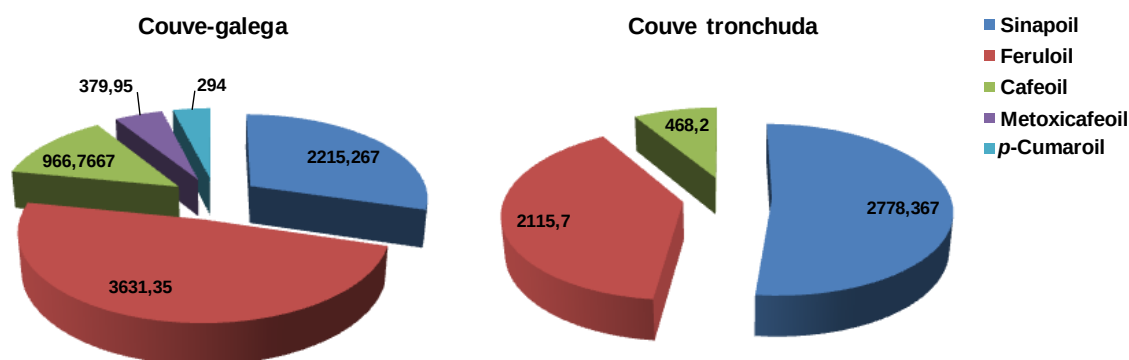


Figura 28. Heterósidos flavonólicos acilados nas folhas de couve-galega e de couve tronchuda (mg/kg).

A larva de *P. brassicae* alimentada com couve-galega apresenta um conteúdo reduzido de compostos fenólicos (28,5 mg/Kg), compreendendo heterósidos flavonólicos não acilados, distribuídos entre 65% de derivados do campferol e 35% de derivados da

quercetina. Os compostos sulfatados encontrados na larva são minoritários ou vestigiais [4.1, (179)].

A larva alimentada com couve tronchuda apresenta um maior teor de compostos fenólicos (1183,1 mg/Kg), exibindo também os heterósidos flavonólicos não acilados como compostos majoritários (92% do total), principalmente derivados do campferol (91% do total de heterósidos flavonólicos), sendo o composto sulfatado encontrado também minoritário [4.2, (171)].

Para a diferença clara que se observa entre o conteúdo em compostos fenólicos da larva alimentada com couve-galega e o da larva alimentada com couve tronchuda poderá contribuir não só o facto das plantas usadas como alimento serem diferentes, mas também os distintos tempos de jejum (12h para a larva alimentada com couve-galega e 8h para a desenvolvida com couve tronchuda). A larva poderá, durante essas 4h continuar o processo de digestão/excreção dos compostos fenólicos que ainda contém no seu organismo. Não foi possível proceder ao estudo da metabolização de compostos fenólicos pela larva alimentada com couve tronchuda até às 12 h de jejum devido a contingências associadas ao número de larvas inicialmente disponível e à necessidade de sacrificar um grande número de indivíduos. Adicionalmente, durante o desenvolvimento das larvas verificou-se uma elevada mortalidade, devida a uma infestação por *C. glomerata*, o que reduziu substancialmente o número de espécimes vivos. Por estas razões, as larvas foram estudadas até às 8h de jejum.

Tanto a grande variedade, como o conteúdo elevado de compostos fenólicos nos excrementos de ambas as larvas (Tabelas 1-3), mostram o elevado grau de metabolização/excreção destes metabolitos pelas mesmas.

Tal como se verifica para ambas as plantas hospedeiras, 89% do total de heterósidos flavonólicos encontrados nos excrementos da larva da couve-galega e a totalidade dos heterósidos flavonólicos determinados nos excrementos da larva da couve tronchuda são derivados do campferol (Figura 29) [4.2, (171)].

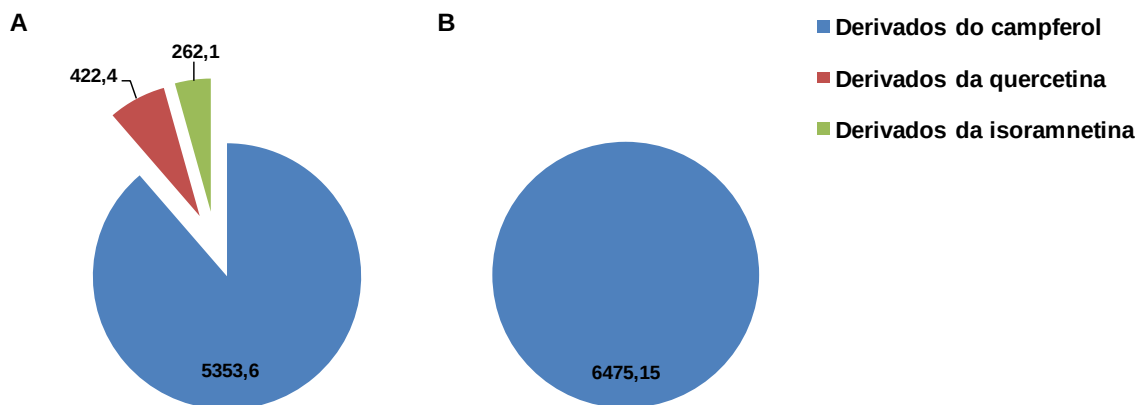


Figura 29. Derivados de campferol, quercetina e isoramnetina nos excrementos de larva de *P. brassicae* alimentada com couve-galega (A) e com couve tronchuda (B) (mg/kg).

Contrariamente ao observado com as plantas hospedeiras, verifica-se a predominância dos derivados não acilados, representando 69 e 75% do conteúdo total em heterósidos flavonólicos nos excrementos das larvas alimentadas com couve-galega e com couve tronchuda, respectivamente (Figura 30) [(4.1, 4.2), (171, 179)].

Esta elevada riqueza em derivados não acilados nos excrementos evidencia a ocorrência de metabolização pela larva, nomeadamente por desacilação de diversos compostos acilados, o grupo maioritário dos heterósidos flavonólicos de ambas as plantas hospedeiras [(4.1, 4.2), (171, 179)].

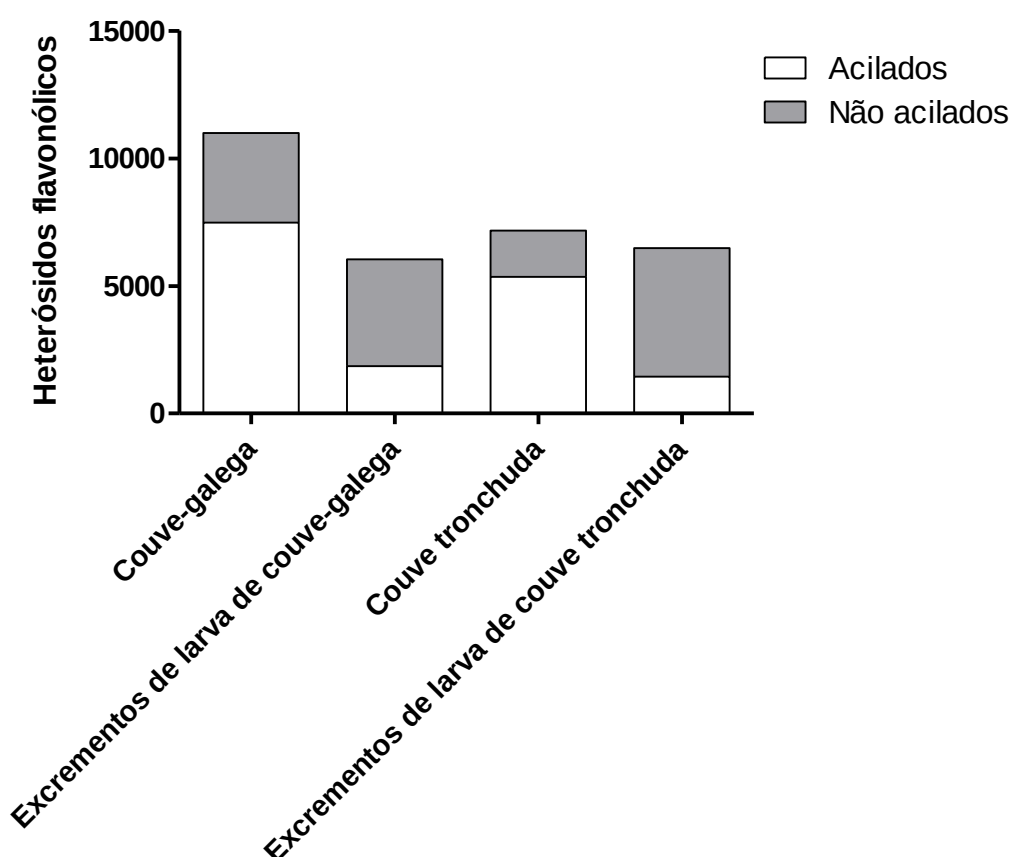


Figura 30. Heterósidos flavonólicos acilados e não acilados em folhas de couve-galega e de couve tronchuda e nos excrementos de *P. brassicae* alimentada por estas (mg/Kg).

Comparando os extractos aquosos e os metanólicos dos diversos materiais, verifica-se uma composição semelhante em termos de variedade de compostos, mas uma grande diferença a nível quantitativo [(4.1, 4.7), (179, 248)]. Com a excepção da larva, que apresenta maior conteúdo de compostos fenólicos no extracto metanólico do que no aquoso, a quantidade destes compostos é consistente e significativamente mais baixa nos extractos metanólicos (Figura 31) [(4.1, 4.7), (179, 248)], o que pode ser explicado pelo elevado grau de glicosilação, típico dos compostos encontrados na couve-galega e nos excrementos.

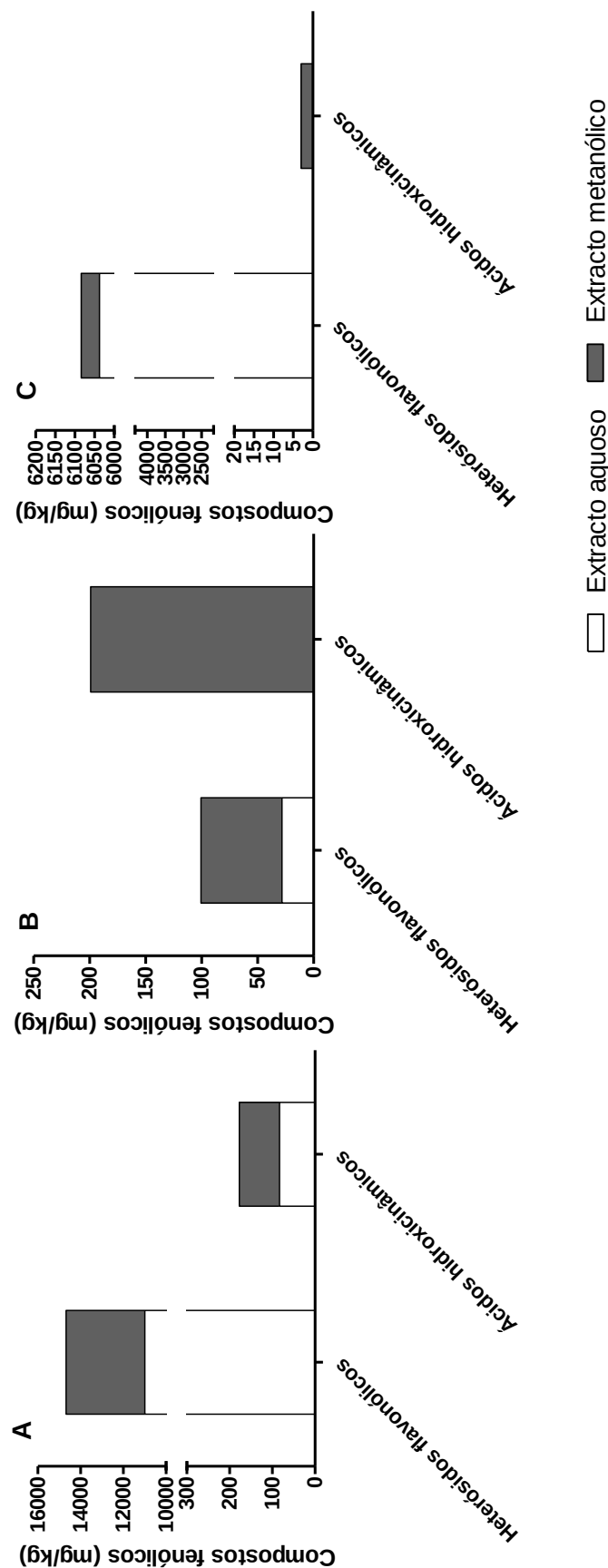


Figura 31. Comparação da composição fenólica dos extractos aquoso e metanólico de (A) folhas de couve-galega hospedeira, (B) larva e (C) excrementos de *P. brassicae*.

No extracto metanólico das folhas de couve-galega, a razão entre os derivados de ácidos hidroxycinâmicos e de heterósidos flavonólicos é maior do que no extracto aquoso (Figura 31) [(4.1, 4.7), (179, 248)]. Verifica-se ainda que, ao contrário do observado com o extracto aquoso, o extracto metanólico de excrementos da larva alimentada com couve-galega mostra uma predominância dos heterósidos flavonólicos acilados sobre os não acilados, correspondendo a 62% do total de heterósidos flavonólicos detectados. O extracto metanólico de couve-galega apresentou, tal como o extracto aquoso, uma predominância dos heterósidos flavonólicos acilados relativamente aos não acilados (71 e 29% do total de heterósidos flavonólicos detectados, respectivamente) (Figura 32) [(4.1, 4.7), (179, 248)].

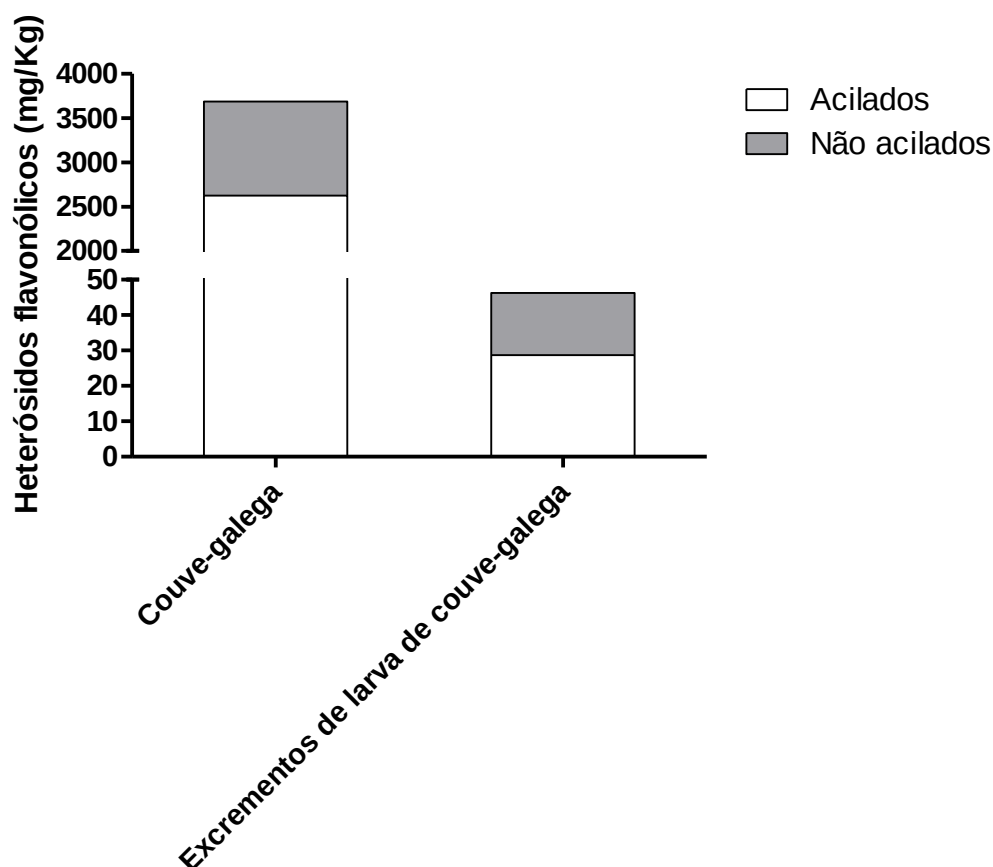


Figura 32. Heterósidos flavonólicos acilados e não acilados em extractos metanólicos de folhas de couve-galega hospedeira e de excrementos de *P. brassicae*.

É de realçar que só nos extractos metanólicos de larva de *P. brassicae* e dos seus excrementos é que aparecem os ácidos sinápico e ferúlico [4.7, (248)]. Esta situação pode dever-se a uma maior afinidade destes compostos para o metanol. O maior conteúdo de compostos fenólicos no extracto metanólico da larva comparativamente ao

extracto aquoso surge da elevada contribuição dos ácidos sinápico e ferúlico, que representam cerca de 73% do conteúdo total de compostos fenólicos nesta matriz [(4.1, 4.7), (179, 248)]. No entanto, o conteúdo de heterósidos flavonólicos encontrados é também maior no extracto metanólico desta matriz (72,2 mg/Kg) do que no extracto aquoso (28,5 mg/kg) (Figura 31), [(4.1, 4.7), (179, 248)] o que pode ser também explicado pelo menor grau de glicosilação dos compostos, ao contrário das restantes matrizes que possuem compostos com maior número de açúcares e por isso maior afinidade para a água.

As espécies de *B. oleracea* estudadas têm grande resistência a condições climáticas adversas, o que torna possíveis várias colheitas durante o ano. Para esta resistência parecem contribuir o elevado teor de compostos fenólicos que as caracteriza. Se por um lado a capacidade destes compostos para funcionarem como filtros solares leva ao aumento da sua produção por parte da planta aquando de uma grande exposição solar, no Verão, por outro, a capacidade que têm para evitar a congelação da água perante temperaturas muito baixas induz a sua biossíntese em meses muito frios (com períodos solares curtos) (250). Contudo, apesar das inúmeras funções de defesa atribuídas aos compostos fenólicos, estes poderão ser determinantes na atracção da *P. brassicae*. Verifica-se que, embora possa haver ataque por parte da *P. brassicae* durante todo o ano, é na altura do Outono que ocorrem maiores níveis de incidência desta praga sobre estas culturas e simultaneamente maior quantidade de fenóis. Este facto corrobora a ideia de que os compostos fenólicos constituem uma classe de compostos atractiva, que influencia o comportamento alimentar das larvas e de oviposição dos insectos adultos (69), exibindo um papel importante na dinâmica do sistema insecto-planta (69, 70).

5.1.2. Compostos voláteis

Com objectivo de estudar a interacção insecto-planta, foram realizados ensaios *in vivo* utilizando o duo ecológico *P. brassicae* / *B. oleracea* var. *acephala*, de modo a melhor mimetizar as condições existentes na Natureza. Os compostos foram determinados por HS-SPME/GC-MS, tendo o cuidado de evitar que o insecto estivesse em condições de stress, o que poderia falsear os resultados (Figura 33). Por um lado, avaliou-se o efeito que a predação pela *P. brassicae* tem na planta hospedeira, através da resposta desta à agressão do insecto; por outro, estudou-se a forma como a lagarta ultrapassa essa resposta, avaliando-se os processos metabólicos que esta realiza para ultrapassar as barreiras impostas pela planta hospedeira.

Adicionalmente, nesta tese de doutoramento foi estudada a variação da composição volátil ao longo do processo de germinação da couve-galega.

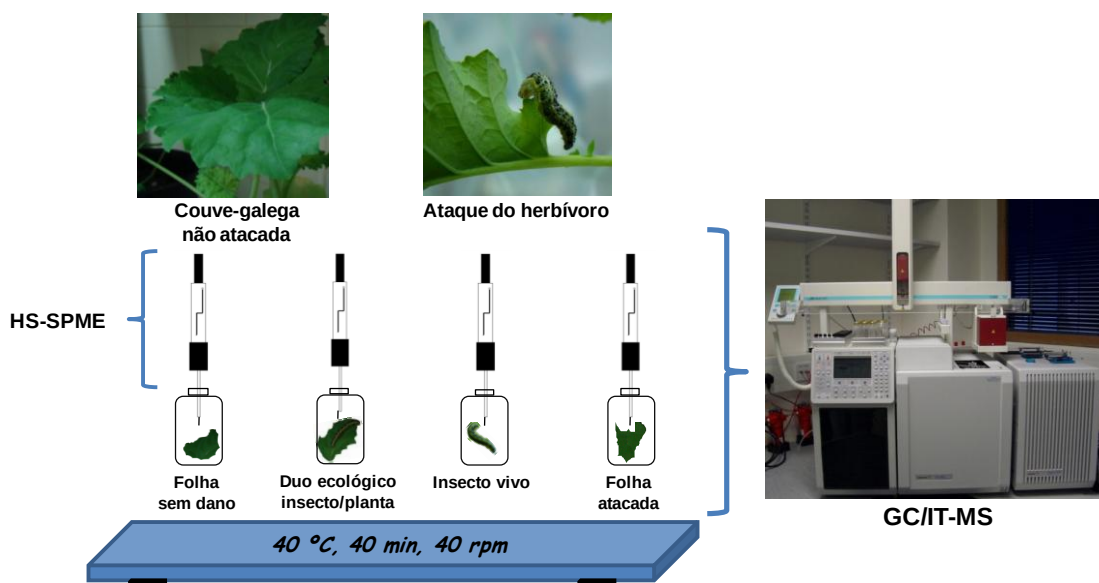


Figura 33. Representação esquemática da determinação de compostos voláteis de larvas de *P. brassicae* e da sua planta hospedeira *B. oleracea* var. *acephala* *in vivo*, por HS-SPME/GC-MS.

5.1.2.1. Reacção da planta hospedeira

De modo a estudar a influência do ataque da *P. brassicae* sobre os compostos voláteis emitidos pela couve-galega esta matriz foi estudada antes e 1, 2, 4, 12 e 24h após o ataque do insecto. De forma a avaliar se a resposta da couve era ou não específica ao ataque pelo herbívoro estudou-se também o efeito do dano mecânico sobre o perfil volátil da couve-galega [4.4, (251)].

Vários compostos voláteis e semi-voláteis foram identificados na couve-galega, atacada ou não, os quais pertencem a classes químicas diferentes, incluindo álcoois, aldeídos, ésteres, cetonas, norisoprenóides, terpenos e compostos de azoto e de enxofre. Dos 57 compostos encontrados, verificou-se que 12 são comuns a todas as amostras e que 6 são específicos da couve-galega (sem dano) [4.4, (251)]. Estes compostos estão armazenados e poderão fazer parte da defesa constitutiva da planta (135).

Tanto o ataque mecânico como o do herbívoro alteram o perfil qualitativo e quantitativo de compostos voláteis emitidos pela planta hospedeira [4.4, (251)]. Verificou-se que 22 compostos aparecem apenas quando a planta é atacada. Destes, 8 são independentes do tipo de ataque (herbívoro ou mecânico), 13 são específicos do ataque por *P. brassicae* e apenas 1 é devido exclusivamente ao dano mecânico [4.4, (251)]. Estes resultados demonstram que, para além de uma resposta constitutiva, a couve-galega emite uma resposta específica, induzida pelo ataque por parte deste herbívoro.

Os 3 aldeídos identificados (hexanal, (*E*)-2-hexenal e heptanal) surgem apenas na couve-galega sujeita a ataque pela *P. brassicae* [4.4, (251)].

Das 3 cetonas identificadas, a 3,5-dimetil-2-octanona é encontrada unicamente na planta não atacada. A 3-pentanona poderá integrar, para além da resposta constitutiva, a resposta indutiva, uma vez que, apesar de presente na planta não danificada, a sua quantidade na couve-galega cresce ao longo do tempo, mostrando que a sua produção é aumentada pelo ataque do herbívoro. A α,α -di-hidroxiacetofenona é produzida apenas após o ataque, evidenciando claramente a resposta indutiva por parte da planta hospedeira [4.4, (251)].

Podemos desta forma verificar que alguns aldeídos e cetonas podem ser utilizados para distinguir o tipo de ataque sofrido pela planta.

Outras classes de compostos foram também encontradas na planta depois do ataque do insecto, especialmente terpenos e ésteres [4.4, (251)]. A quantidade deste tipo de compostos aumenta consideravelmente após o ataque, especialmente a de acetato de (*Z*)-3-hexenilo, o qual está descrito como um composto crucial na modelação da interacção insecto-planta (135, 252). Este composto encontra-se armazenado na planta para ser libertado imediatamente após a agressão e a sua libertação é maior quando a planta é atacada pelo insecto do que quando é danificada mecanicamente, pelo que se supõe que será uma resposta constitutiva orientada para a defesa contra a *P. brassicae*. A principal finalidade deste composto é avisar as plantas vizinhas do ataque de que está a ser alvo, para que elas activem o seu sistema de defesa.

Os terpenos foram a classe de compostos que mais alterações apresentaram após a predação do insecto. Dos 18 compostos desta classe identificados, apenas 8 foram encontrados na couve não atacada. α -Tujeno, sabineno, β -pineno, ψ -cimeno, *m*-cimeno, *o*-cimeno, *p*-cimeno, *l*-canfora, longifoleno e a geranilacetona são exemplos de compostos que surgem exclusivamente após o ferimento da couve-galega, resultando de uma síntese *de novo* por parte da planta atacada e demonstrando que esta classe de compostos está envolvida directamente na defesa da planta [4.4, (251)].

Destes 10 terpenos identificados unicamente após o ataque, 5 são comuns ao ataque pelo herbívoro e ao dano mecânico, sendo os outros 5 específicos do ataque por *P. brassicae* [4.4, (251)], o que demonstra que a planta é capaz de dar uma resposta diferenciada e indutível.

Para além destes terpenos, que aparecem apenas durante o ataque, podemos realçar também o limoneno e o eucaliptol. Estes dois compostos voláteis aumentam consideravelmente após o ataque pela *P. brassicae*, sendo os seus níveis próximos dos basais quando o ataque é mecânico [4.4, (251)]. Desta forma podemos dizer que estes dois compostos são igualmente específicos da resposta contra a *P. brassicae*.

Destaca-se, ainda, que destes 10 terpenos que surgem *de novo* na planta atacada 5 foram encontrados apenas 4h após o ataque da *P. brassicae* [4.4, (251)]. Trata-se, portanto, de uma resposta directa e faseada, que vai perdendo intensidade em termos quantitativos ao longo do tempo, mas variando em termos qualitativos.

Por outro lado, relativamente aos ésteres, há um aumento do número destes compostos logo após o ataque pelo herbívoro, sendo que dos 12 compostos identificados 6 aparecem em todas as matrizes. Estes resultados indicam que os ésteres estão provavelmente acumulados nas folhas e são libertados quando ocorre o dano [4.4, (251)].

Além dos compostos já referidos, o alilisotiocianato e metiltiocianato são também importantes: apesar de existirem na planta não atacada, a sua quantidade aumenta após o dano [4.4, (251)]. Embora a sua quantidade seja muito superior na planta atacada mecanicamente, o que é explicado pelo facto da presença destes compostos ser estritamente consequência do dano tecidual (101, 135), sendo este muito mais extenso do que o provocado pelo insecto, o seu aumento também se verifica na sequência do ataque pelo herbívoro [4.4, (251)]. Estes compostos estão envolvidos na defesa da planta contra predadores pela sua toxicidade, actuando como dissuasores de alimento para a *P. brassicae*. Além disso, poderão actuar como compostos atractivos de outras espécies de insectos, nomeadamente de predadores da *P. brassicae*, constituindo uma defesa indirecta da planta. Por exemplo, Connor e colegas (138) descreveram que a *B. oleracea* var. *gemmifera* depois de ser atacada pela *P. brassicae* torna-se consideravelmente mais atraente para a *C. glomerata* do que as plantas não atacadas, devido à presença destes compostos.

Desta forma podemos verificar que existe uma resposta consertada por parte da couve-galega ao ataque da *P. brassicae*. No entanto, face a esta resposta e sendo a *P. brassicae* um herbívoro especialista, esta desenvolveu mecanismos para ultrapassar essas barreiras e conseguir alimentar-se desta planta. Esses processos são abordados pormenorizadamente no item seguinte.

5.1.2.2. Metabolismo da *P. brassicae*

De modo a melhor compreender o processo metabólico da *P. brassicae* relativamente aos compostos voláteis libertados pela couve-galega quando atacada, estudou-se o perfil de compostos voláteis da larva ao longo do tempo, bem como dos seus excrementos. Neste sistema biológico foram detectados 92 compostos voláteis, os quais incluem álcoois, ésteres, cetonas, norisoprenóides, terpenos e compostos de azoto e de enxofre. Apenas 7 são comuns a todas as amostras analisadas, que incluem a planta hospedeira, a larva com diferentes períodos de jejum (0, 2, 4 e 6 h) e respectivos excrementos (2, 4 e 6 h) [4.5, (253)].

Na larva com 0, 2, 4 e 6h de jejum foram identificados 48 compostos, dos quais os terpenos são a classe maioritária, correspondendo a 38% dos compostos identificados. O

mesmo se verifica para os excrementos, nos quais os terpenos correspondem a 18 dos 55 compostos identificados [4.5, (253)].

Quatro compostos são encontrados apenas na couve-galega e na larva de *P. brassicae*. Destes o β -tujeno somente aparece no tempo de jejum máximo (6h), o que faz supor que seja bioacumulado sem sofrer qualquer tipo de alteração. Por outro lado, os outros 3 compostos, 3-pentanol, (Z)-3-hexeno-1-ol e β -metilionona, aparecem apenas nas primeiras horas de jejum, estando ausentes no período mais tardio, sugerindo uma possível metabolização destes compostos e consequente produção de outros, os quais poderão ser depois excretados ou acumulados [4.5, (253)].

Comparando a couve-galega e os excrementos de *P. brassicae* verifica-se que existem 5 compostos em comum, indicando que são excretados sem sofrer qualquer tipo de alteração. Este facto é mais evidente para os compostos β -ionona e metiltiocianato, os quais estão presentes nos excrementos de todos os períodos estudados [4.5, (253)].

A β -ionona tem uma forte acção nociva contra alguns artrópodes (254). De facto este composto é totalmente excretado, não sendo acumulado no insecto [4.5, (253)], o que revela que o mecanismo de defesa da *P. brassicae* relativamente a este composto é a total excreção [4.5, (253)].

Verifica-se ainda que existem 56 compostos que são encontrados apenas nos materiais de *P. brassicae* (larva e/ou excrementos) [4.5, (253)]. Estes dados evidenciam a capacidade de bioacumulação por parte da larva de *P. brassicae* de compostos que podem estar em quantidade não detectável na planta hospedeira. Uma outra hipótese para o aparecimento destes compostos será a acção metabólica da *P. brassicae*. Os produtos da metabolização poderão também ser acumulados: de facto, verifica-se a presença de 17 compostos, maioritariamente terpenos, apenas na larva. Desta forma, é possível concluir que estes compostos possam aparecer em consequência da metabolização de outros que foram ingeridos (Figura 34) [4.5, (253)].

A possibilidade de metabolização é reforçada pelo facto de existirem 24 compostos que aparecem somente nos excrementos da *P. brassicae*. Assim, a *P. brassicae* deverá ser capaz de alterar os compostos para posterior excreção. Exemplo disto é a destoxificação dos glucosinolatos, os quais são importantes compostos de defesa da couve. A quebra dos glucosinolatos leva à formação de compostos sulfatados, como por exemplo sulfitos e isotiocinatos, que são tóxicos para a larva (255). Por esta razão a maioria dos compostos com enxofre identificados encontram-se nos excrementos. O facto das larvas de *P. brassicae* serem especialistas do género *Brassica*

relaciona-se com a sua capacidade para destoxificar estes compostos, favorecendo a formação de compostos azotados (nitrilos), os quais se encontram quase exclusivamente nos excrementos, demonstrando que são facilmente excretados [4.5, (253)].

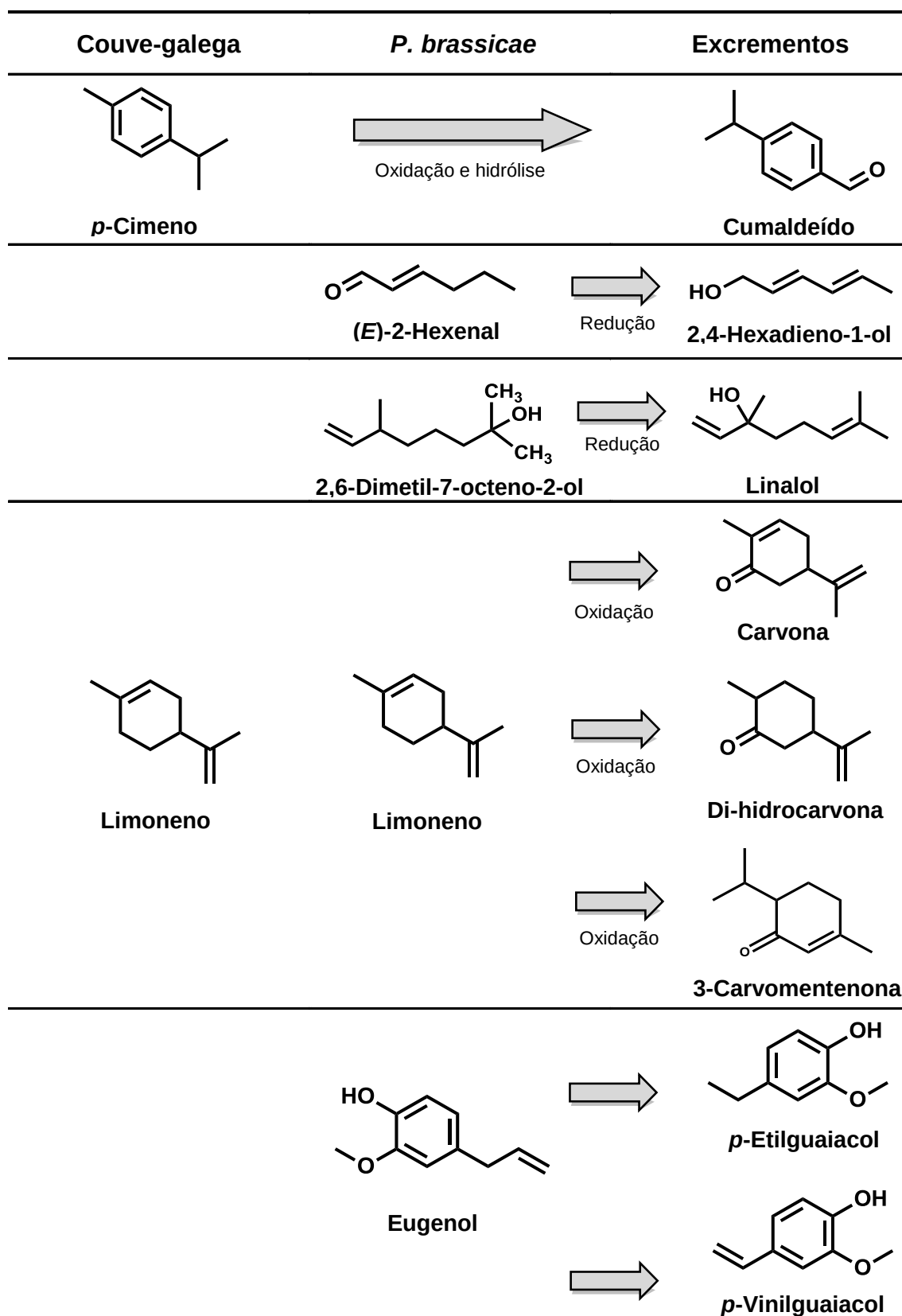


Figura 34. Possíveis mecanismos de metabolização de compostos voláteis da couve-galega pela *P. brassicae*.

Olhando agora mais especificamente para cada uma das classes de compostos podemos realçar que todos os aldeídos encontrados nas larvas e excrementos de *P. brassicae* estão ausentes da couve-galega. Assim, é possível concluir que estes compostos aparecem como produtos da biotransformação de outros presentes na couve-galega. Porém, a quantidade destes compostos na larva de *P. brassicae* diminui drasticamente até às 4h de jejum, mas aumenta significativamente nos excrementos obtidos às 2, 4 e 6h [4.5, (253)]. Os álcoois seguem o mesmo padrão, evidenciando a excreção destes compostos por parte do insecto.

Dos 7 norisoprenóides encontrados na *P. brassicae*, apenas 3 se encontram na couve-galega (β -ciclocitral, β -ionona e β -metilionona) [4.5, (253)], os quais resultaram da quebra oxidativa de carotenóides (159). Como os insectos são incapazes de sintetizar os carotenóides *de novo*, a presença destes produtos na *P. brassicae* dever-se-á à bioacumulação por parte da larva das quantidades vestigiais que podem existir na couve. Outra hipótese está relacionada com a capacidade dos insectos para quebrarem os carotenóides presentes na couve-galega, como já foi descrito para a *Drosophila melanogaster* (256).

Foi também observada uma diferença acentuada do número e conteúdo de ésteres nos excrementos de *P. brassicae* (nos quais foram encontrados apenas o acetato de (Z)-3-hexenilo e o acetato de 2-etilhexilo) quando comparados com os identificados na couve-galega (8 compostos) ou nas larvas de *P. brassicae* (5 compostos) [4.5, (253)]. Esta diferença pode estar associada à presença de carboxiesterases, uma classe de enzimas que foram descritas como responsáveis pela quebra de ésteres nos insectos (257).

Foi também estudado o perfil de compostos voláteis de extractos aquosos de larvas de *P. brassicae* alimentadas com couve tronchuda e da sua planta hospedeira. Como esperado, os extractos apresentaram menos compostos que os materiais *in vivo*, tendo sido encontrados apenas 6 compostos: octanal, β -ciclocitral, β -ionona, *trans*-geranilacetona, eugenol e (-)-mentol. Estes compostos são comuns à larva e à planta hospedeira, sendo o eugenol aquele para o qual se verificou a maior diferença quantitativa entre as duas matrizes (6 vezes superior na planta hospedeira) [(4.4, 4.5, 4.8), (251, 253, 258)].

5.1.2.3. Evolução do perfil de compostos voláteis no processo germinativo

Os compostos voláteis da couve-galega foram monitorizados durante o processo de germinação – sementes, rebentos caulinares com 6 e 9 dias e folhas adultas- tendo sido identificados um total de 66 compostos, distribuídos por várias classes químicas: álcoois, aldeídos, ésteres, cetonas, norisoprenóides, terpenos, compostos de azoto e de enxofre (Figura 35) [4.6, (259)]. De todos os compostos identificados apenas 8 são comuns a todos os tempos de germinação estudados, observando-se várias diferenças ao longo do desenvolvimento da couve-galega [4.6, (259)].

Os compostos de azoto e de enxofre derivam maioritariamente da hidrólise dos glucosinolatos, que são compostos de defesa da planta. São a classe predominante nas sementes e nos rebentos caulinares, em contraste com as folhas adultas, nas quais a maioria destes compostos não está presente (Figura 35) [4.6, (259)]. Estes resultados demonstram que estes compostos serão importantes durante a fase inicial de crescimento, onde há uma maior vulnerabilidade da planta, sendo depois na planta adulta menos necessários, passando então os terpenos a constituir a principal defesa (3, 47).

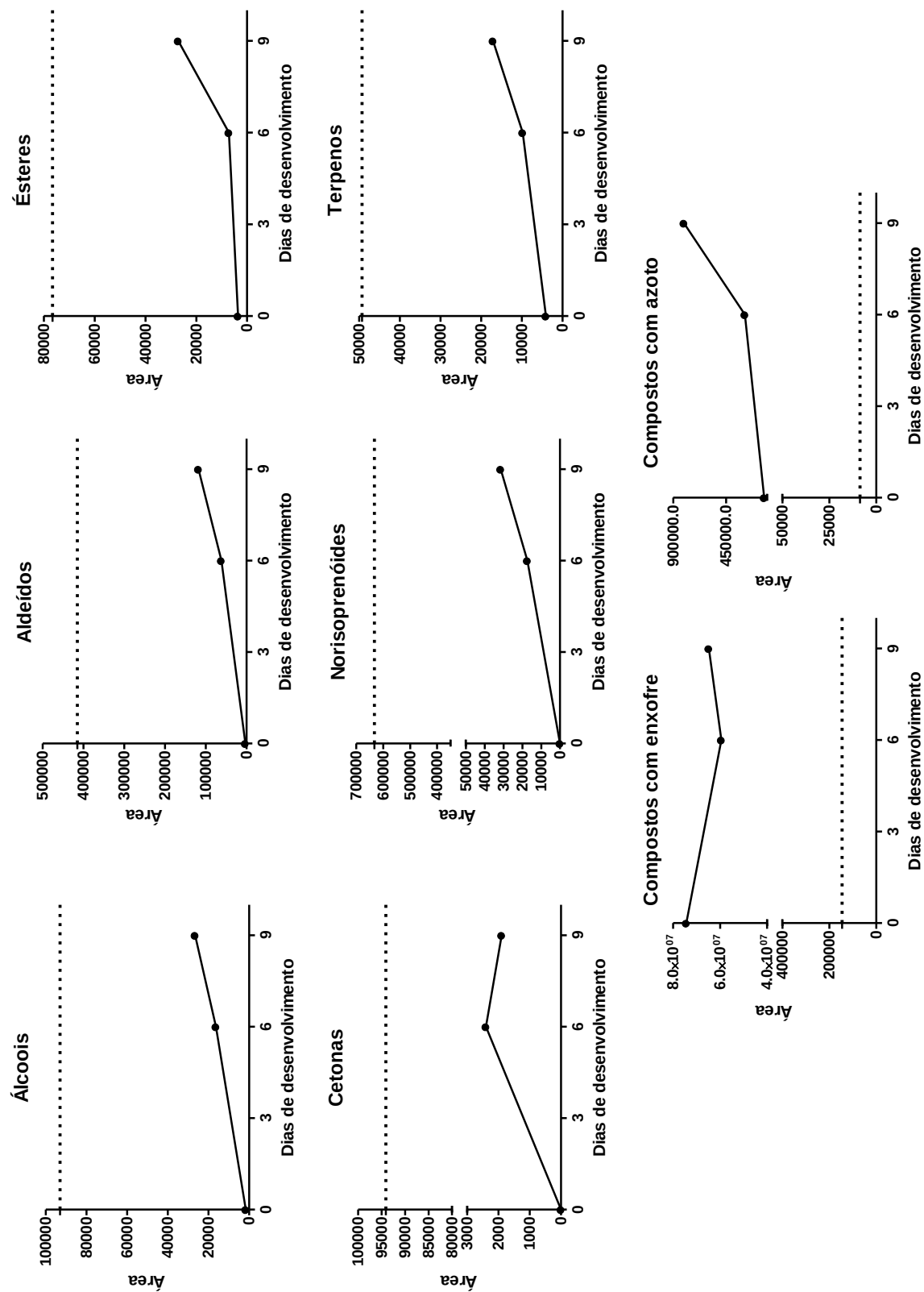


Figura 35. Evolução do perfil de compostos voláteis da couve-galega no início do processo de germinação. A linha pontuada corresponde à composição da planta adulta.

Na planta adulta foram encontrados 7 compostos terpénicos, 4 dos quais foram detectados apenas neste material. Nas sementes e nos rebentos caulinares foram encontrados 3 e 2 terpenos, respectivamente [4.6, (259)].

Os norisoprenóides estão ausentes nas sementes e aparecem em reduzido número e conteúdo nos rebentos caulinares (Figura 35). Dos 12 norisoprenóides identificados, 9 aparecem exclusivamente nas folhas adultas [4.6, (259)]. Este facto está relacionado com a origem destes compostos: os norisoprenóides derivam da quebra oxidativa dos carotenóides, compostos esses que se encontram acumulados nos plastídeos das folhas (129, 159).

As folhas adultas são igualmente caracterizadas pela presença de aldeídos, álcoois, ésteres e cetonas. A maioria destes compostos aparece exclusivamente nas folhas, estando em número e em quantidades reduzidas nos rebentos caulinares, sendo quase inexistentes nas sementes (Figura 35) [4.6, (259)]. Este aumento crescente no número de compostos ao longo do processo germinativo reflecte o aumento da actividade metabólica da planta.

5.1.3. Ácidos orgânicos

No âmbito desta tese procedeu-se ainda à caracterização dos ácidos orgânicos presentes nos extractos aquosos dos materiais de *P. brassicae* (borboletas, larvas e seus excrementos) [4.1, (179)], da couve-galega (folhas e sementes) e das sementes de couve tronchuda [(4.1, 4.3), (179, 244)].

Nas matrizes estudadas foram identificados os ácidos oxálico, aconítico, cítrico, pirúvico, málico, quínico, succínico, xiquímico, acético e fumárico [(4.1, 4.3), (179, 244)].

Tal como se pode ver pelas Figuras 36 e 37, o perfil de ácidos orgânicos encontrado nas diversas matrizes apresenta algumas diferenças.

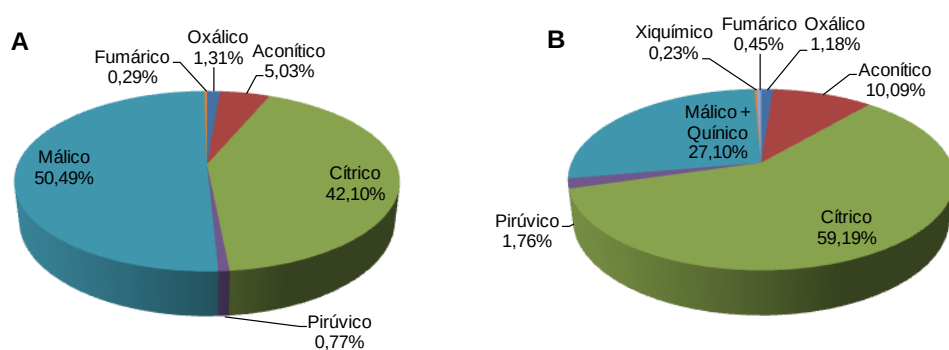


Figura 36. Ácidos orgânicos nas sementes de couve-galega (A) e de couve tronchuda (B).

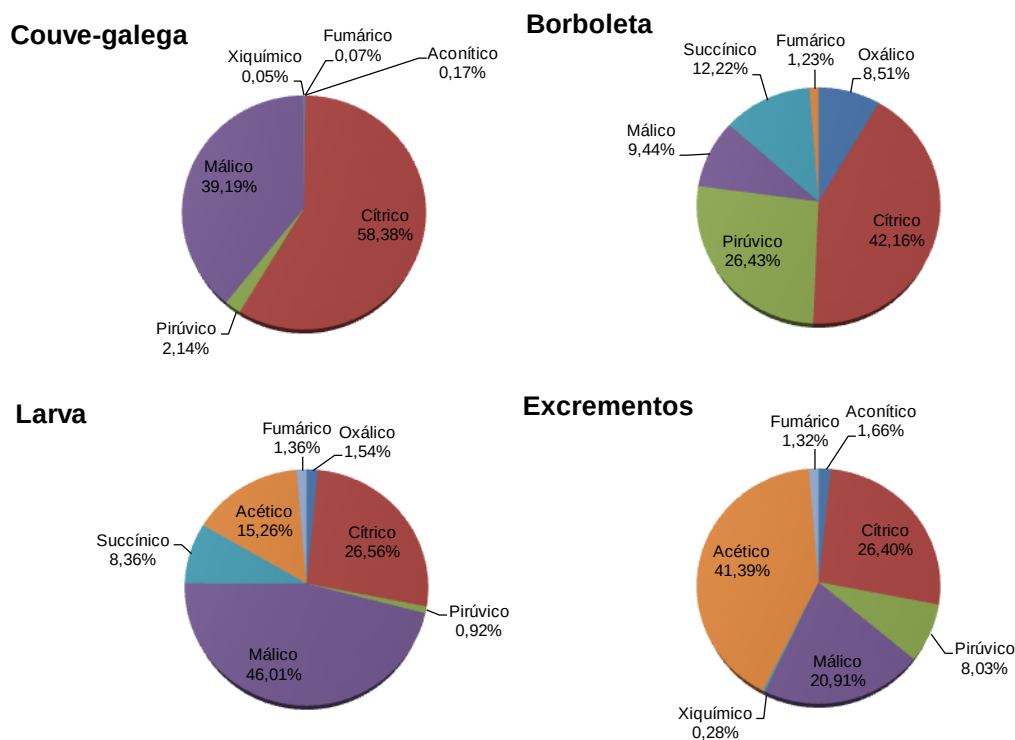


Figura 37. Ácidos orgânicos nos diversos materiais de *P. brassicae* e na planta hospedeira.

Sabe-se que a quantidade de ácidos orgânicos acumulados pela planta é afectada por vários factores, tais como o tipo de fixação de carbono, a actividade catabólica, a

idade e o estado nutricional da planta, bem como pelo tipo de tecido (89, 165). A Tabela 4 apresenta a quantidade total de ácidos orgânicos nos extractos aquosos das diferentes matrizes.

Tabela 4. Ácidos orgânicos nos extractos aquosos de borboleta, larva e excrementos de *P. brassicae* e de folhas da couve-galega hospedeira.

	Couve-galega	<i>P. brassicae</i> alimentada com couve-galega		
	Folhas	Borboleta	Lagarta	Excrementos
mg/Kg (extracto liofilizado)	112294,4	19189,9	24328,8	18860,5

As sementes das duas variedades de *B. oleracea* têm um perfil semelhante (Tabela 5 e Figura 36), com tendência para apresentar o ácido málico como maioritário (50% dos ácidos identificados) [4.3, (244)].

Tabela 5. Ácidos orgânicos nos extractos aquosos das sementes de couve-galega e de couve tronchuda.

	Couve tronchuda	Couve-galega
	Sementes	Sementes
mg/Kg (extracto liofilizado)	42870,0	41369,3

Comparando os materiais vegetais de couve-galega, verifica-se que as folhas adultas têm uma quantidade de ácidos orgânicos quase três vezes superior à das sementes (Tabelas 4 e 5) [(4.1, 4.3), (179, 244)]. Esta diferença está relacionada com a maior taxa metabólica das folhas quando comparada com a semente, que é uma estrutura de reserva (260).

Todos os materiais vegetais (sementes e folhas) são caracterizados pela presença de grandes quantidades dos ácidos cítrico e málico. Esta riqueza seria de esperar, uma vez que estes dois compostos são conhecidos por serem regularmente acumulados nas plantas (89). Nestas matrizes estes compostos representam mais de 85% do total de ácidos orgânicos identificados [(4.1, 4.3), (179, 244)].

Nas folhas adultas o ácido cítrico tende a ser o composto maioritário (58% dos compostos identificados) [4.1, (179)].

Os ácidos málico e cítrico desempenham variadas funções nas plantas, o que justifica a sua acumulação. O ácido málico é um composto versátil, que pode ser facilmente transportado através das membranas que separam os vários compartimentos ou então ser armazenado nos vacúolos. Para além de ser utilizado como substrato para a produção de adenosina 5'-trifosfato (ATP), o ácido málico serve para manter o pH citosólico e actua ainda como agente osmótico e antagonizador dos iões potássio e sódio (165, 261, 262). Por outro lado, o ácido cítrico desempenha um papel importante na translocação do ferro nas raízes e no transporte de longa distância para as folhas através do xilema, além de possuir potencial antioxidante (263).

Para além dos ácidos málico e cítrico, os ácidos aconítico, pirúvico e fumárico são comuns às sementes de ambas as espécies e às folhas de couve-galega [(4.1, 4.3), (179, 244)]. Destes o ácido aconítico é o que está presente em maior quantidade em ambas as sementes e o ácido pirúvico é o mais abundante nas folhas de couve-galega [(4.1, 4.3), (179, 244)].

Os ácidos aconítico e fumárico são produzidos na mitocôndria, no ciclo de Krebs, e em menor extensão no glioxissoma, como parte do ciclo do glioxilato (264). Dada a natureza catalítica do ciclo de Krebs, estes ácidos orgânicos encontram-se geralmente presentes em pequenas quantidades. O ácido aconítico faz parte integrante da biossíntese dos hidratos de carbono e apresenta actividade alelopática (265). O ácido fumárico pode ser metabolizado, originando energia e fornecendo esqueletos de carbono para a produção de outros compostos, e pode ainda ajudar a manter o pH celular e a pressão de turgescência (266).

Além dos ácidos anteriormente descritos, em ambas as sementes foi identificado o ácido oxálico, representando apenas 1% dos ácidos orgânicos identificados [4.3, (244)].

A síntese e acumulação intracelular do ácido oxálico nas plantas estão implicadas na homeostasia celular do cálcio (267). As plantas que crescem em solos alcalinos, em que o cálcio é abundante, muitas vezes reduzem o excesso de cálcio celular combinando-o com ácido oxálico. Esta combinação é essencial uma vez que concentrações elevadas de cálcio interferem com processos celulares essenciais, como a sinalização dependente do cálcio, metabolismo baseado nos fosfatos e a dinâmica do citoesqueleto. A precipitação de cristais de oxalato de cálcio pode ser observada em várias espécies de plantas (268). Do ponto de vista nutricional o ácido oxálico é considerado um antinutriente, quando ingerido em grandes quantidades, uma vez que

diminui a biodisponibilidade do cálcio e, por vezes, de outros minerais (269). Heaney e colaboradores (270) estudaram a absorção de cálcio a partir da couve-galega e de espinafres. Estes autores concluíram que a absorção de cálcio a partir da couve-galega é superior à absorção a partir dos espinafres, o que foi justificado pelos níveis de ácido oxálico comparativamente mais baixos na couve-galega (270).

O ácido xiquímico é também um composto minoritário nas folhas de couve-galega e nas sementes de couve tronchuda. Estas apresentam ainda uma pequena quantidade de ácido quínico. A quantificação do ácido quínico é dificultada pelo facto deste ácido co-eluir com o ácido málico, nas condições de análise utilizadas. Por esta razão, este pico foi quantificado juntamente com o ácido málico.

Embora apresentem uma grande variedade de ácidos orgânicos, os diversos materiais de *P. brassicae* são mais pobres em termos quantitativos do que a sua planta hospedeira, sendo a larva de *P. brassicae* a matriz mais rica nestes compostos [4.1, (179)].

Foram observadas diferenças qualitativas entre os materiais de *P. brassicae* e as folhas da planta hospedeira, havendo também variações em termos de proporção desses compostos (Figura 37) [4.1, (179)]. Considerando a larva de *P. brassicae*, só a nível dos compostos maioritários apresenta similaridade com as folhas da sua planta hospedeira. Nesta matriz, os ácidos cítrico e málico representam 73% do seu conteúdo em ácidos orgânicos. No entanto, foram detectados nas larvas os ácidos acético e succínico, representando 15% e 8% dos ácidos identificados, respectivamente. A larva apresenta ainda ácido oxálico. Este composto foi também identificado na borboleta de *P. brassicae*, correspondendo a 8% do seu conteúdo em ácidos orgânicos [4.1, (179)]. Pelo que atrás foi dito, a presença deste composto na larva e na borboleta e a sua ausência das folhas da sua planta hospedeira pode significar que, sendo considerado um antinutriente, é produzido e acumulado pela larva com a finalidade específica da sua defesa, para afastar os seus próprios predadores.

A borboleta apresenta os ácidos cítrico e pirúvico como maioritários, representando 42% e 26% dos ácidos orgânicos identificados, respectivamente (Figura 37) [4.1, (179)].

Os excrementos de *P. brassicae* apresentam também os ácidos cítrico e málico como compostos importantes sendo, no entanto, o ácido acético o composto mais abundante (Figura 37) [4.1, (179)].

A presença de ácido acético na larva e nos excrementos de *P. brassicae* (em quantidades consideráveis) e a sua ausência nas folhas da planta hospedeira [4.1, (179)]

sugere que este composto resulta dos processos de fermentação da microflora intestinal, como acontece noutros organismos (271, 272).

5.2. Actividade biológica do sistema *Pieris brassicae* / *Brassica oleracea*

5.2.1. Actividade antioxidante

Tal como referido anteriormente, as plantas produzem uma grande variedade de metabolitos secundários que desempenham papéis importantes no metabolismo e na defesa da planta. Estes compostos, especialmente os compostos fenólicos possuem um vasto leque de actividades farmacológicas, incluindo antioxidante, anti-carcinogénica, anti-inflamatória, antimicrobiana, cardioprotectora e vasoprotectora (204). A caracterização do perfil metabólico da couve-galega e couve tronchuda permitiu confirmar que estas matrizes são ricas em metabolitos secundários, particularmente em derivados de flavonóis e de ácidos hidroxicinâmicos, potencialmente protectores do stress oxidativo. Além disso, tendo em conta que quase todos os herbívoros entram em contacto com estes compostos quando se alimentam e que alguns deles são capazes de os acumular e biotransformar (121, 122, 169, 170), [(4.1, 4.2), (171, 179)], os insectos podem ser fonte de compostos bioactivos.

Não existem estudos sobre a actividade antioxidante de *P. brassicae* alimentada com couve-galega. No entanto, foi avaliada anteriormente a capacidade antioxidante da larva de *P. brassicae* alimentada com couve tronchuda e dos vários materiais de *P. brassicae* (borboleta, larva e excrementos) alimentada com *B. rapa* var. *rapa* (nabiça) (122, 170). Nesses trabalhos verificou-se sempre que os extractos têm potencial antioxidante dependente da concentração e, excepto para o radical hipocloroso, foram sempre mais activos do que a sua planta hospedeira (122, 170).

Para avaliar o potencial antioxidante, os extractos aquosos dos vários materiais de *P. brassicae* (borboleta, larva e excrementos), bem como da sua planta hospedeira, *B. oleracea* var. *acephala*, foram testados em sistemas químicos contra as espécies reactivas 1,1- difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e óxido nítrico ($^{\cdot}NO$) [4.1, (179)]. Como se verificou que tinham elevado potencial antioxidante, extractos aquosos e metanólicos dos diversos materiais de *P. brassicae*, bem como das folhas da planta hospedeira foram testados também num sistema celular, usando fibroblastos de pulmão de rato expostos ao peróxido de hidrogénio para induzir stress oxidativo [4.7, (248)]. A capacidade de protecção dos fibroblastos pelos extractos foi avaliada medindo

parâmetros de viabilidade celular e parâmetros dependentes do estado redox da célula, como a glutatona.

5.2.1.1. Sistemas químicos

O potencial antioxidante dos extractos aquosos das várias matrizes de *P. brassicae* bem como da couve-galega foi avaliado inicialmente utilizando o radical DPPH [4.1, (179)]. Como todas as matrizes demonstraram ter actividade antioxidante dependente da concentração contra este radical, prosseguiu-se o estudo avaliando a sua capacidade contra espécies reactivas de oxigénio ($O_2^{\cdot-}$) e de azoto ($\cdot NO$), biologicamente relevantes [4.1, (179)]. Os resultados obtidos estão sumariados na Tabela 6.

Tabela 6. Actividade antioxidante de *P. brassicae* e da planta hospedeira ($\mu g/mL$).

	Couve-galega		<i>P. brassicae</i>		
	Sementes	Folhas	Borboleta	Larva	Excrementos
DPPH (IC₂₅)	120	257	19	116	135
$O_2^{\cdot-}$ (IC₂₅)	19	74	260 ¹	130 ²	51
$\cdot NO$ (IC₂₀)	151	261	47	210	81

¹ Concentração para a qual se obteve a actividade máxima (40,6%);

² Concentração para a qual se obteve a actividade máxima (37,7%).

Da análise da Tabela 6 verifica-se que os extractos têm acção antioxidante, sendo que o potencial de cada matriz varia de acordo com o radical testado. De uma forma geral, os extractos demonstraram ter uma actividade antioxidante dependente da concentração, numa gama relativamente larga de concentrações (0,1-8 mg/mL) [4.1, (179)].

Com a maioria das matrizes, e para todos os radicais estudados, a proporcionalidade entre a concentração de amostra e a actividade deixa de se verificar antes de se atingir 50% da neutralização do radical, não sendo possível, para estes casos, o cálculo do valor de IC₅₀. Nestes casos, foi calculado o valor de IC correspondente a uma concentração para a qual essa proporcionalidade se verifica. Em

alguns ensaios também não foi possível atingir os valores de IC₅₀ por restrições de solubilidade da amostra.

5.2.1.1.1. DPPH

O DPPH é um radical livre estável, dotado de forte absorvência a 515 nm, apresentando uma coloração violeta. Este ensaio é utilizado actualmente em estudos para despistagem da capacidade antioxidante de compostos ou extractos. Apesar de ser um radical que não é formado no organismo, fornece informação sobre a capacidade anti-radicalar daqueles.

Quando em contacto com substâncias que têm a capacidade de doar um electrão ou átomo de hidrogénio, o DPPH é reduzido (Figura 38). Esta reacção tem como consequência uma mudança de coloração para amarelo, devida ao grupo picrilo (273).

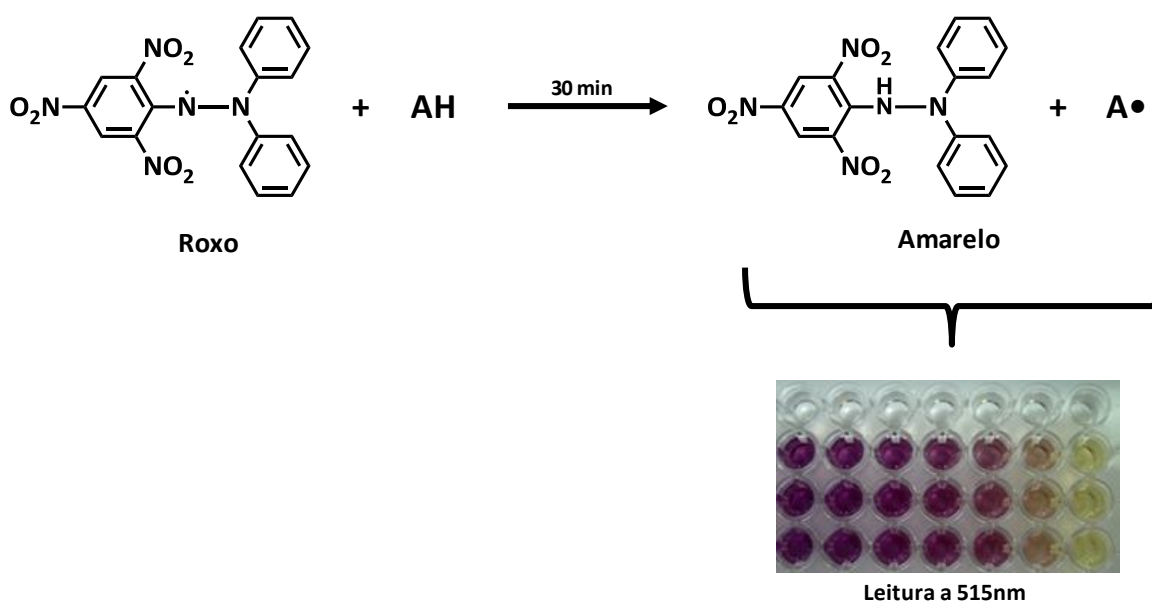


Figura 38. Reacção de interceptação do radical DPPH. AH: antioxidante.

Comparando o potencial antioxidante dos extractos aquosos das várias matrizes estudadas contra o radical DPPH verifica-se que todas os materiais de *P. brassicae* têm um elevado potencial antioxidante, destacando-se as borboletas e as larvas, sendo as folhas da sua planta hospedeira a matriz menos activa na sequestração deste radical [4.1, (179)].

Não parece existir correlação entre a composição fenólica e a actividade antioxidante observada para este radical. As borboletas, a única matriz onde não foram detectados compostos fenólicos, e a larva, pobre nestes compostos, foram, no entanto, as mais activas na sequestração deste radical, sendo, pelo contrário, as folhas de couve-

galega, com o maior conteúdo nesta classe de compostos, a matriz que revelou menor potencial antioxidante [4.1, (179)].

Contudo, não é de negligenciar a actividade antioxidante destes compostos, que poderão contribuir, pelo menos parcialmente, para os resultados obtidos. Sabe-se que o campferol, a principal genina em todas as matrizes, tem características estruturais (Figura 14) importantes para ser um bom antioxidante (274). Contudo, como em todos os extractos estudados o campferol se encontra glicosilado, o potencial antioxidante será menor do que o da genina (275).

Assim, para tentar aferir a contribuição dos compostos fenólicos para a actividade antioxidante exibida pelos materiais de *P. brassicae* bem como pelas folhas da sua planta hospederia, e uma vez que não existem comercialmente disponíveis todos os compostos identificados, o campferol-3-*O*-rutinosídeo foi testado no mesmo sistema, por ser um composto com uma estrutura química similar aos derivados de campferol identificados. As concentrações ensaiadas foram as correspondentes à soma de todos os derivados de campferol, tentando assim mimetizar cada uma das matrizes relativamente a estes compostos. Nessas condições este composto não revelou qualquer capacidade de sequestração do radical DPPH.

De modo a tentar perceber quais os compostos envolvidos na potente actividade revelada pelas larvas e borboletas de *P. brassicae*, procedeu-se ao mesmo estudo usando uma mistura de ácidos orgânicos mimetizando a composição e o conteúdo destes em cada uma das matrizes. No entanto, também não se verificou qualquer efeito por parte destes compostos [4.1, (179)].

Assim, outros compostos não identificados deverão ser responsáveis pela actividade antioxidante exibida por estas matrizes.

As sementes, caracterizadas pela presença de derivados de ácido sinápico, demonstraram também boa capacidade antioxidante relativamente ao radical DPPH [4.3, (244)] (Tabela 6), para a qual, tal como verificado para as outras matrizes, os compostos fenólicos não deverão ser os principais contribuintes. As sementes constituem o tecido vegetal com maior quantidade de lípidos, incluindo os maiores níveis de ácidos gordos poli-insaturados, e, conseqüentemente, níveis elevados de antioxidantes como os tocoferóis protegem os lípidos armazenados da oxidação (276). Apesar dos estudos de actividade antioxidante terem sido feitos em extractos aquosos, é possível que alguns destes antioxidantes com acção preferencial na fase lipídica tenham sido extraídos, o que pode explicar a boa actividade dos extractos de sementes.

5.2.1.1.2. Radical anião superóxido

Comparando o poder oxidante do radical DPPH com o do $O_2^{\cdot-}$, sabe-se que a deslocalização do electrão desemparelhado no radical DPPH o torna mais estável e menos reactivo do que o $O_2^{\cdot-}$ (277). Por esta razão avaliou-se também o potencial antioxidante dos extractos contra o $O_2^{\cdot-}$.

Apesar do seu efeito nefasto, as ROS, nomeadamente o radical superóxido, desempenham, também, um papel importante em processos fisiológicos, tais como nas reacções de oxidação mediadas pelo citocromo P450, regulação do tónus do músculo liso e acção bactericida dos leucócitos (211).

Na avaliação do potencial antioxidante dos extractos dos materiais de *P. brassicae* e das folhas da sua couve-galega hospedeira contra o $O_2^{\cdot-}$ usou-se um sistema não enzimático para formar o radical: após redução pelo NADH, o metassulfato de fenazina (PMS) reduzido reage com o oxigénio, produzindo $O_2^{\cdot-}$ (Figura 39). O radical superóxido formado reage depois com o azul de nitrotetrazólio (NBT), reduzindo-o a formazano (Figura 39), um composto azul que apresenta um máximo de absorção a 560 nm (278). Qualquer molécula capaz de sequestrar $O_2^{\cdot-}$ conduzirá a uma diminuição na velocidade de redução do NBT.

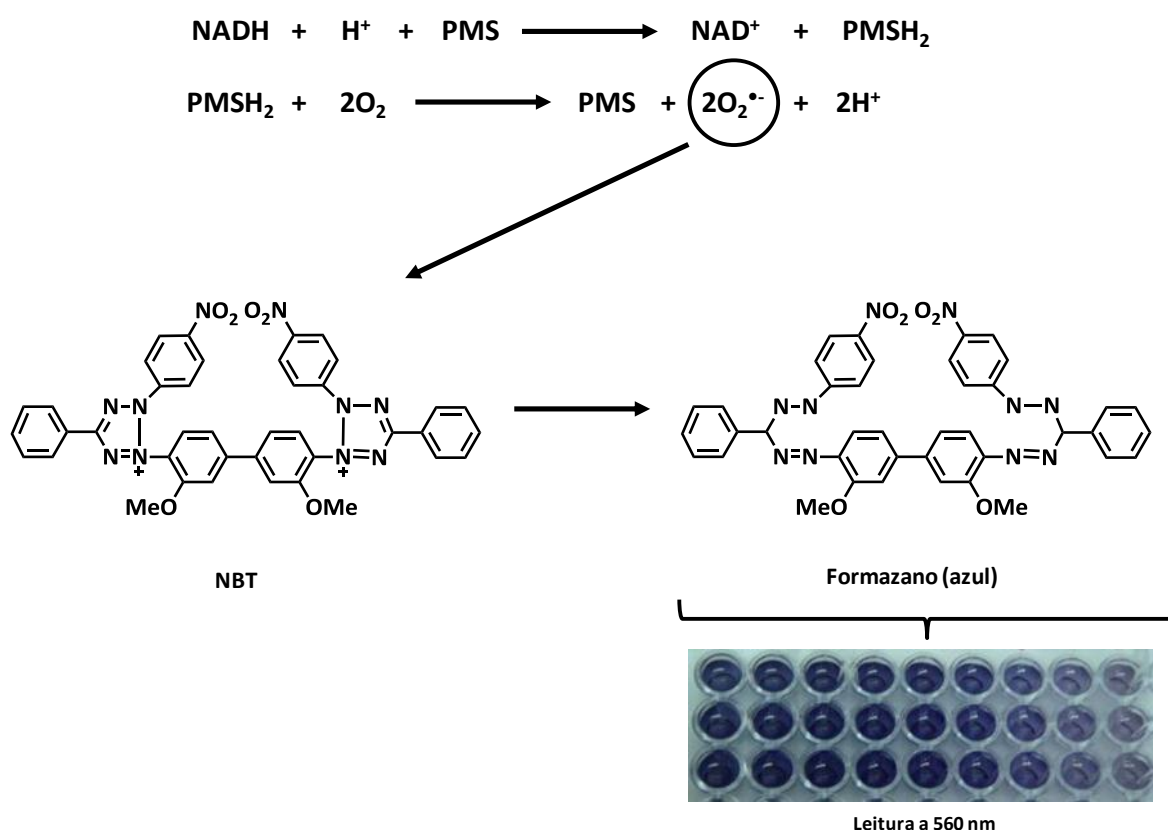


Figura 39. Produção e detecção da sequestração de $\text{O}_2^{\bullet -}$.

Com a excepção das larvas e das borboletas de *P. brassicae*, todas as matrizes estudadas revelaram capacidade para sequestrar o $\text{O}_2^{\bullet -}$ de uma forma dependente da concentração, exibindo as sementes o melhor resultado (Tabela 6). Estas foram, mais uma vez, mais activas do que as folhas de couve-galega [(4.1, 4.3), (179, 244)].

Dos materiais de *P. brassicae*, os excrementos foram os que exibiram maior capacidade de sequestração deste radical (Tabela 6). As larvas e as borboletas mostraram possuir actividade antioxidante, mas apenas para concentrações inferiores a 130 e 260 $\mu\text{g/mL}$ de extracto, respectivamente, a partir das quais há um considerável decréscimo da capacidade de sequestração do $\text{O}_2^{\bullet -}$ [4.1, (179)]. Estes resultados sugerem um efeito duplo destas matrizes, que podem ser antioxidantes até às referidas concentrações e ter uma acção pró-oxidante para concentrações superiores.

No estudo do potencial antioxidante face a este radical também se avaliou a contribuição dos compostos fenólicos e dos ácidos orgânicos. Assim, o efeito do campferol-3-*O*-rutinósido, em concentrações correspondentes à soma de todos os derivados de campferol, bem como uma mistura de ácidos orgânicos mimetizando cada uma das matrizes, foi também avaliado. O campferol-3-*O*-rutinósido mostrou ter alguma

actividade contra este radical: em concentrações representativas da soma dos derivados de campferol nas folhas de couve-galega e de excrementos de *P. brassicae* observou-se o sequestro de 30% e de 23% do radical anião superóxido, respectivamente. Assim, os derivados do campferol deverão ter alguma influência no efeito destas duas matrizes sobre este radical [4.1, (179)].

Esta ideia é reforçada pelos resultados obtidos quando se testou o campferol-3-O-rutinósido em representação do total de derivados de campferol na larva. Nessas condições o composto seguiu exactamente o mesmo comportamento da larva de *P. brassicae*, mostrando um efeito duplo (antioxidante e pró-oxidante) [4.1, (179)].

Tal como se verificou para o radical DPPH, os ácidos orgânicos não mostraram qualquer actividade antioxidante para este radical [4.1, (179)].

5.2.1.1.3. Óxido nítrico

O radical $\cdot\text{NO}$ é uma espécie crítica em muitas funções, incluindo a manutenção da pressão sanguínea devido ao seu efeito vasodilatador, estimulação das defesas do hospedeiro no sistema imunitário, regulação da transmissão neuronal no cérebro, regulação da expressão de genes, agregação de plaquetas, aprendizagem e memória, função sexual masculina, citotoxicidade e citoprotecção (279). Este radical é um segundo mensageiro de grande difusibilidade, que pode desencadear efeitos em locais relativamente distantes do seu local de produção (280). No entanto, o aumento da concentração de $\cdot\text{NO}$ em situações patológicas leva à formação de outras espécies reactivas para níveis potencialmente citotóxicos (281, 282).

O $\cdot\text{NO}$ é formado endogenamente a partir da L-arginina por uma família de enzimas chamadas sintetases do óxido nítrico (NOS). *In vitro* pode ser gerado a partir do nitroprussiato de sódio, em solução aquosa com pH fisiológico. Este radical interage com o oxigénio para produzir nitrito que pode ser determinado pela reacção de Griess. A absorvância do cromóforo formado pela reacção de diazotização do nitrito com a sulfanilamida e subsequente ligação com a naftiletilenodiamina é determinada a 562 nm (283) (Figura 40). Os sequestradores do óxido nítrico competem com o oxigénio reduzindo a produção de nitrito.

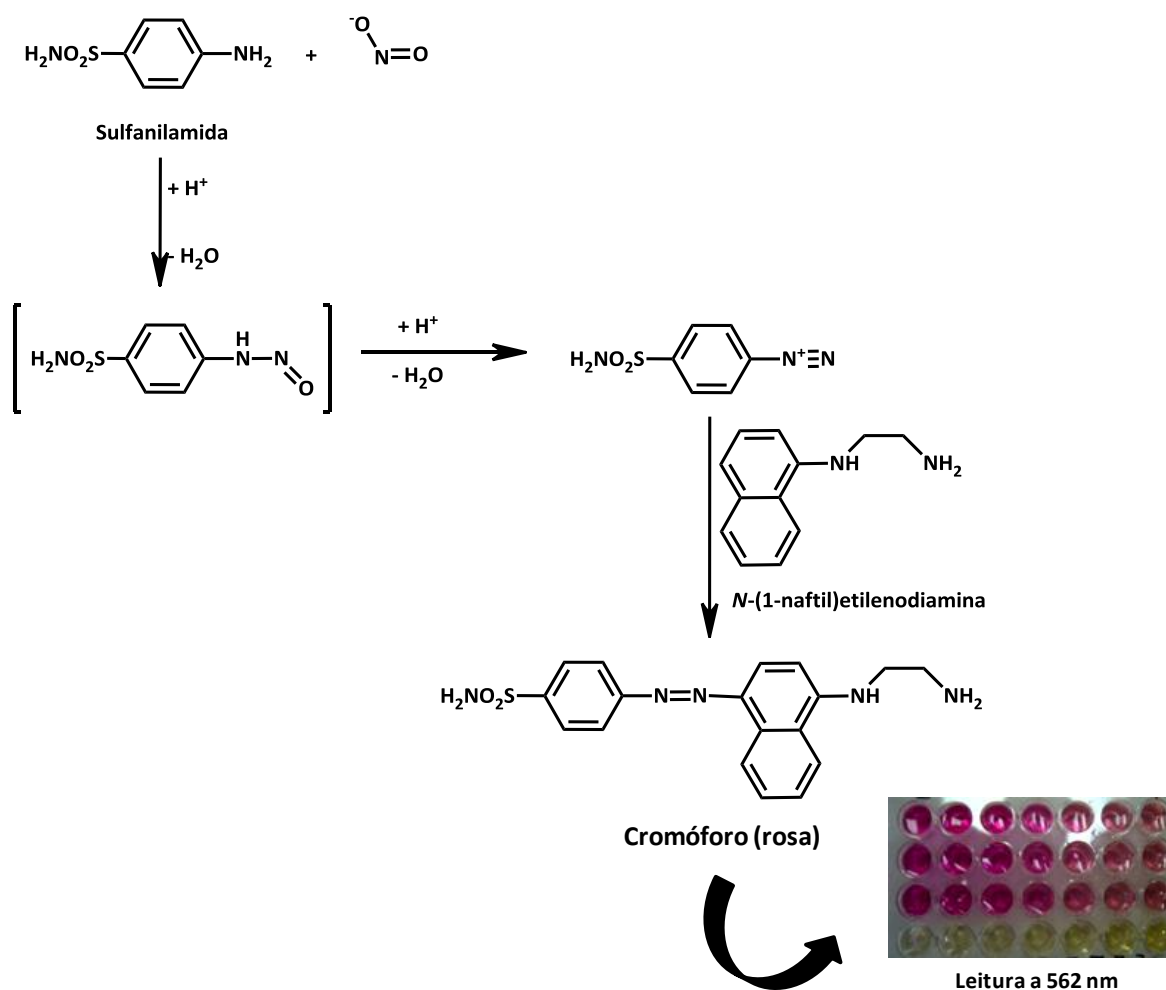


Figura 40. Determinação de nitrito pela reacção de Griess.

Na avaliação do potencial para interceptar o $\cdot\text{NO}$ verificou-se uma dependência entre a actividade antioxidante e a concentração até aos 2083 $\mu\text{g/mL}$ e 520 $\mu\text{g/mL}$ de extracto de sementes e de folhas de couve-galega, respectivamente. Para os materiais de *P. brassicae*, verifica-se que esta dependência ocorre até aos 130 $\mu\text{g/mL}$ de extracto de excrementos; no caso das larvas e das borboletas é observada para concentrações de extracto inferiores a 34 $\mu\text{g/mL}$ [(4.1, 4.3), (179, 244)].

As borboletas de *P. brassicae* foram a matriz mais activa, seguida dos seus excrementos (Tabela 6). Tal como para os outros radicais, os materiais da *P. brassicae* apresentam maior potencial antioxidante do que as folhas da couve-galega, a planta hospedeira (Tabela 6) [4.1, (179)].

Mais uma vez se verificou a inexistência de correlação entre a actividade antioxidante e a quantidade de compostos fenólicos existente nos extractos.

Relativamente ao campferol-3-O-rutinósido também testado, verificou-se que apenas a concentração correspondente ao total de derivados do campferol no extracto de folhas de couve-galega exibiu algum poder antioxidante (aproximadamente 13% de inibição), podendo, tal como se verificou para o radical $O_2^{\bullet-}$, contribuir para a actividade desta matriz [4.1, (179)].

5.2.1.2. Sistema celular

Nos sistemas celulares é importante ter em conta que compostos como o ascorbato, flavonóides, bem como outros compostos fenólicos, e tióis são habitualmente instáveis nos meios de cultura, facilmente oxidáveis e propensos a gerar artefactos se adicionados em concentrações elevadas (284). Além disso, é geralmente reconhecido que as células que sobrevivem em cultura nem sempre são representativas das células *in vivo*, em termos de metabolismo, expressão de genes e níveis enzimáticos, sendo por isso necessário ter algum cuidado na extrapolação dos dados obtidos (285). Apesar destas desvantagens, estes sistemas são muito importantes para a realização de estudos mecanísticos.

Para confirmar o potencial antioxidante demonstrado pelos extractos dos diversos materiais de *P. brassicae* (borboletas, larvas e seus excrementos), bem como de folhas de couve-galega hospedeira, recorreu-se a um sistema celular, utilizando culturas de fibroblastos de pulmão de rato (células V79) [4.7, (248)]. Para avaliar os efeitos citotóxicos ou protectores dos extractos escolheu-se como agente indutor de stress oxidativo o H_2O_2 . Os ciclos de oxidação-redução do H_2O_2 levam à produção de $HO^{\bullet}$ (Figura 21) que, se não for interceptado, pode originar danos celulares. Os extractos com potencial antioxidante podem impedir os danos causados pelo H_2O_2 nas células.

A avaliação de parâmetros de viabilidade celular, nomeadamente a actividade da cadeia respiratória e a lactato desidrogenase, e de parâmetros dependentes do estado redox da célula, como a glutatona, permitem aferir a capacidade de protecção dos extractos de *P. brassicae* e da couve-galega.

Actividade da cadeia respiratória

Os sais de tetrazólio, como o MTT, podem ser usados para determinar a actividade metabólica de células viáveis. Este ensaio permite avaliar o metabolismo mitocondrial e a actividade da cadeia respiratória das células em resposta a determinado extracto. Os sais de tetrazólio são reduzidos a formazano pela succinato desidrogenase mitocondrial (Figura 41), enzima que só está activa em células com metabolismo e cadeia respiratória intactos (286).

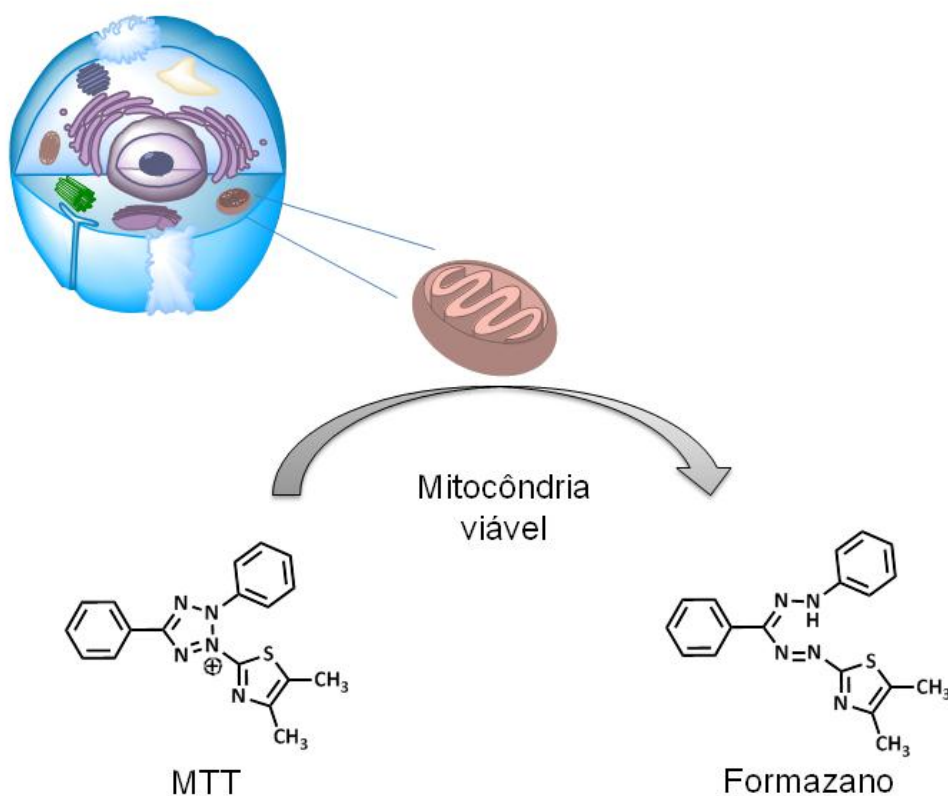


Figura 41. Representação esquemática do ensaio de redução do MTT.

Formam-se, então, cristais insolúveis de formazano, que são solubilizados pela adição de um detergente, como, por exemplo, o dimetilsulfóxido (DMSO). A cor formada pode ser quantificada espectrofotometricamente. Desta forma é possível relacionar a quantidade de MTT reduzido e o número de células viáveis.

Lactato desidrogenase extracelular

A citotoxicidade ou morte celular é determinada pela quantificação dos danos membranares. A enzima intracelular lactato desidrogenase (LDH) é rapidamente libertada das células danificadas para o sobrenadante da cultura de células. O consumo de NADH,

medido cineticamente no sobrenadante, é correlacionado com a quantidade de LDH extracelular (LDHe). Assim, a viabilidade celular é inversamente proporcional à quantidade de LDH libertada.

Nas condições do ensaio (287), a LDH catalisa a conversão do piruvato em lactato, enquanto o NADH é oxidado a NAD^+ . A actividade catalítica é determinada a partir da velocidade de desaparecimento do NADH a 340 nm (Figura 42). Desta forma o decréscimo da absorvância é proporcional à actividade da LDH na amostra analisada.

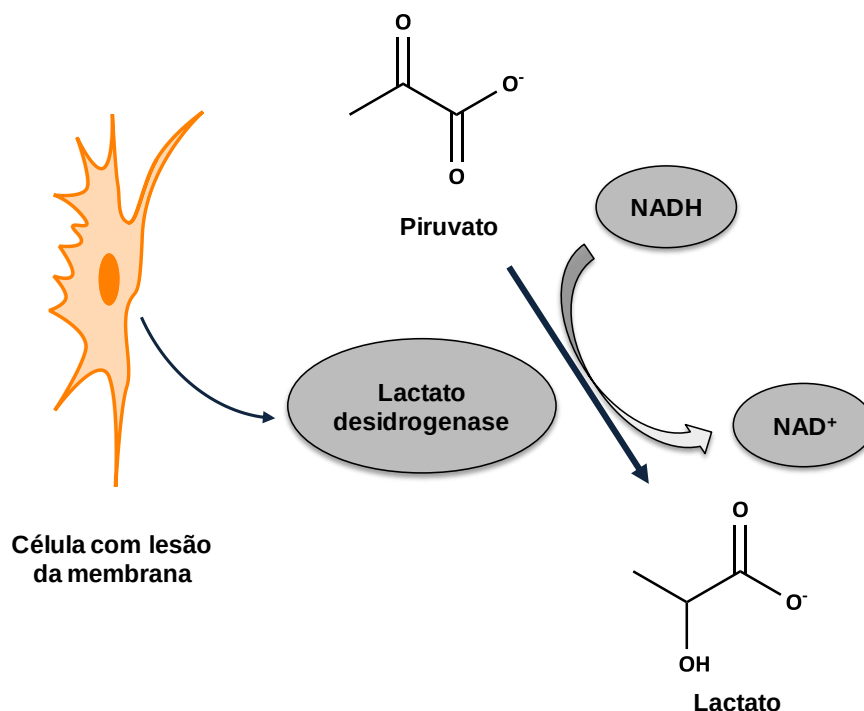


Figura 42. Representação esquemática do ensaio de determinação de LDHe.

Glutathione

A glutathione (γ -glutamylcysteinylglycine) é um antioxidante hidrossolúvel, reconhecido como o tiol não proteico mais importante nos sistemas vivos. É sintetizado no organismo e trata-se de um tripéptido linear, constituído por três aminoácidos, glicina, ácido glutâmico e cisteína, sendo o grupo tiol deste último o local activo responsável pelas propriedades bioquímicas da molécula. Pode encontrar-se na forma reduzida (GSH) ou dimerizada (GSSG, forma oxidada). Em situações normais a GSSG representa apenas uma pequena fracção da glutathione total (menos de 10%). A GSH pode, no entanto, também formar dissulfuretos do tipo GSSR com o tiol da cisteína presente em proteínas (288).

A GSH pode reagir com radicais livres formando o radical glutathionil (GS), que posteriormente poderá dimerizar. Quando a velocidade de oxidação da GSH excede a

capacidade da glutathiona redutase (GR) para a reduzir, a GSSG é activamente transportada para fora da célula, sendo assim eliminada, e consequentemente há uma diminuição dos níveis intracelulares de grupos tióis (289).

Desta forma, quando as células são expostas a níveis crescentes de stress oxidativo irão acumular GSSG e a razão GSSG / GSH irá aumentar. Assim, a quantificação de GSSG e determinação desta razão são indicadores úteis do stress oxidativo nas células e tecidos.

Os níveis de glutathiona foram determinados recorrendo a um processo enzimático. A GSH é oxidada pelo ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), formando-se GSSG e ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB). A GSSG é reduzida a GSH por acção da glutathiona redutase, com consumo de NADPH (Figura 43). A cinética de formação do TNB é monitorizada a 415 nm e é proporcional à soma da GSH e da GSSG (290).

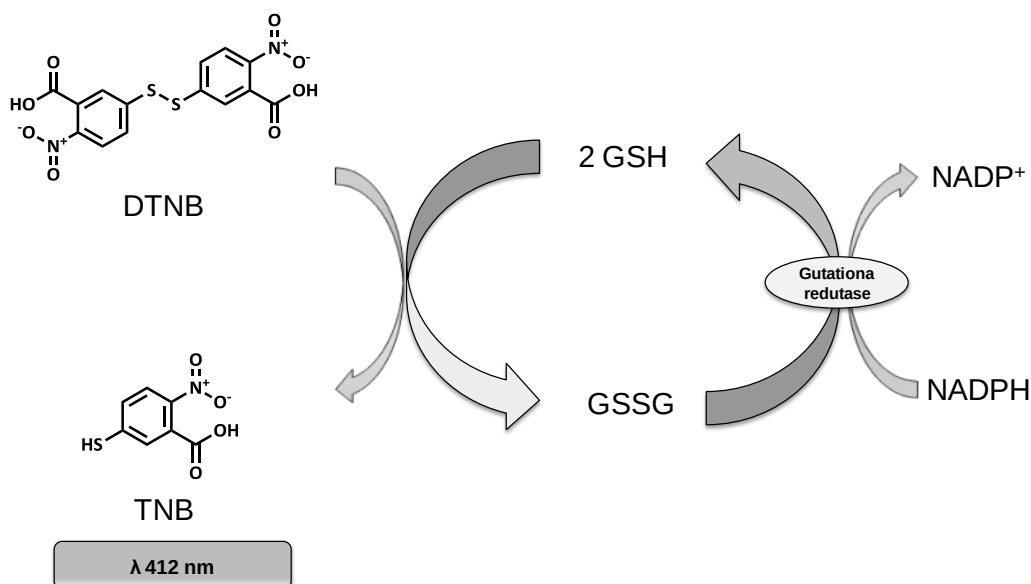


Figura 43. Representação esquemática do ensaio de determinação da glutathiona. DTNB: ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico; GSH: glutathiona reduzida; GSSG: glutathiona oxidada; TNB: ácido 5-tio-2-nitrobenzóico; NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina.

Para a determinação da GSSG deve-se ter em conta a sua baixa concentração nos tecidos (289) e a necessidade de evitar a oxidação de GSH durante a preparação da amostra. Estes são factores importantes para a medição exacta da GSSG e rácios GSSG / GSH. Desta forma para a quantificação da GSSG nos tecidos é necessário bloquear a GSH. Para esse efeito é normalmente utilizada a 2-vinilpiridina (2-VP).

A maioria das amostras exige a remoção de proteínas e enzimas interferentes. Além disso, o ambiente ácido utilizado para a remoção das proteínas melhora a estabilidade da GSH (289).

5.2.1.2.1. Protecção contra o stress oxidativo

As células V79 são conhecidas por responder ao stress oxidativo (222). Para estudar o efeito celular protector dos diversos materiais de *P. brassicae* (borboletas, larvas e excrementos) e das folhas da sua planta hospedeira, *B. oleracea* var. *acephala*, foram usados extractos aquosos e metanólicos, numa gama de concentrações variando entre 0,01 e 16,69 mg/mL e 0,22 e 135 mg/mL, respectivamente [4.7, (248)].

Primeiramente, as células V79 foram expostas aos extractos durante 24h e determinou-se o efeito de cada um deles na viabilidade celular. Nesta primeira avaliação os extractos aquosos dos materiais de *P. brassicae* e de folhas de couve-galega não exibiram qualquer efeito citotóxico nas células. No entanto, com a excepção da couve-galega, todos os extractos aquosos aumentaram a razão GSSG/glutathione total (GSH_t) na concentração máxima testada, sendo esta tendência mais evidente para os extractos de larva e borboleta. Embora estes resultados pareçam sugerir um efeito pró-oxidante, a viabilidade celular não foi afectada.

Com a excepção dos excrementos, os extractos metanólicos das diversas matrizes revelaram-se citotóxicos nas concentrações mais elevadas testadas, pertencendo às larvas e borboletas de *P. brassicae* os efeitos mais deletérios.

De modo a averiguar se a diferença de resultados era devida à distinta composição dos dois extractos da mesma matriz, o campferol-3-O-rutinósido foi também testado, em concentrações representativas do teor de derivados de campferol de cada um. Por outro lado, uma vez que os extractos metanólicos de excrementos e de larvas de *P. brassicae* exibiram os ácidos ferúlico e sinápico, que estavam ausentes dos respectivos extractos aquosos, estes dois compostos foram também avaliados em concentrações correspondentes às encontradas nesses extractos. Nenhum dos compostos testados teve efeito citotóxico nas células V79 [4.7, (248)].

Apesar da citotoxicidade revelada pelas concentrações mais altas da generalidade dos extractos metanólicos, e uma vez que estas matrizes mostraram um enorme potencial antioxidante em todos os ensaios químicos efectuados, foi estudado o possível efeito protector dos extractos aquosos e metanólicos de todas as matrizes contra o stress oxidativo. Para isso, as células foram previamente expostas aos extractos e o stress oxidativo foi induzido pelo peróxido de hidrogénio (H₂O₂).

Tanto para os materiais de *P. brassicae* como para as folhas de couve-galega os resultados foram contraditórios relativamente aos obtidos nos ensaios químicos, principalmente para as concentrações mais elevadas de ambos os extractos testados [4.7, (248)]. De facto, estudos anteriores tinham já revelado que o potencial demonstrado nos ensaios químicos nem sempre corresponde aos resultados observados em ensaios celulares (229).

De uma maneira geral, nenhum extracto foi capaz de proteger as células V79 sujeitas ao stress oxidativo. Adicionalmente, os extractos aquosos de larva e de excrementos de *P. brassicae* e todos os extractos metanólicos revelaram não só não proteger do dano provocado pelo H_2O_2 , mas também potenciar o seu efeito oxidante para as concentrações mais altas testadas, como demonstrado pela diminuição da actividade da cadeia respiratória, pelo aumento da libertação de LDH e pela diminuição dos níveis de GSH intracelular. Este efeito foi mais evidente com o extracto aquoso de excrementos de *P. brassicae*, com o qual se verificou um aumento significativo da razão $GSSG/GSH_t$ para a concentração mais alta testada, traduzindo distúrbio na homeostasia da glutathione [4.7, (248)]. Adicionalmente, destaca-se que a exposição à concentração mais alta de extracto aquoso de excrementos levou ao aumento dos níveis de GSH_t das células no estado quiescente, o que parece indicar que a célula responde ao insulto oxidativo a que o próprio extracto a sujeita.

Relativamente ao extracto aquoso de larva, outro mecanismo de toxicidade parece ser o responsável pela diminuição da viabilidade observada quando as células foram previamente tratadas com aquele, pois não se verificou nenhum aumento da razão $GSSG/GSH_t$ com nenhuma das concentrações testadas [4.7, (248)].

A acção dos extractos metanólicos de larvas e de borboletas, concomitantemente com o H_2O_2 , foi de tal forma nefasta que para a concentração mais elevada a morte celular foi de 100%. Os extractos metanólicos de couve-galega e de excrementos mostraram igualmente agravar o efeito do H_2O_2 . Estes dois extractos perturbaram a homeostasia da glutathione, com aumento da razão $GSSG/GSH_t$ na concentração mais alta testada de ambas as matrizes. Adicionalmente, a concentração mais alta de extracto metanólico de couve-galega levou ao aumento significativo dos níveis de GSH_t nas células. Estes resultados parecem sugerir que as células aumentam os seus níveis de antioxidantes numa tentativa de ultrapassar a agressão que o próprio extracto lhe provoca.

Embora os extractos metanólicos, de uma maneira geral, já tivessem mostrado provocar morte celular nas concentrações mais altas, os extractos aquosos não tinham apresentado qualquer efeito deletério nas células [4.7, (248)].

A eficácia antioxidante dos extractos nas células depende não só da reactividade química contra os radicais, mas também da lipofilia dos constituintes, do metabolismo celular, da interacção com outras moléculas e do destino do radical formado a partir do composto antioxidante. A baixa reactividade para alvos intracelulares críticos é um pré-requisito para o potencial antioxidante dos compostos fenólicos. Pelo contrário, o consumo de agentes redutores, como a GSH, por radicais fenoxilo pode ter efeitos citotóxicos, mesmo que o composto fenólico possa proteger os lípidos ou ácidos nucleicos contra o dano oxidativo (291).

O campferol-3-O-rutinósido e os ácidos ferúlico e sinápico foram testados, em concentrações correspondentes ao seu conteúdo nas diferentes matrizes e verificou-se que não protegiam as células expostas ao H_2O_2 , mas também não agravavam o seu efeito deletério. No entanto, com a concentração mais elevada de campferol-3-O-rutinósido observou-se um aumento dos níveis de GSH_t [4.7, (248)]. Estes resultados mostram que os derivados de campferol podem contribuir para os resultados obtidos com as folhas de couve-galega e com os excrementos de *P. brassicae*, as matrizes mais ricas neste tipo de compostos e que revelaram um comportamento semelhante neste ensaio.

Dos dados recolhidos pode-se inferir que os compostos fenólicos destas matrizes não exercem acção protectora nas células. No entanto, um aspecto a considerar é o facto de os compostos fenólicos característicos destas matrizes apresentarem uma elevada glicosilação, sendo muitos deles também acilados ou sulfatados e, por isso, mais polares do que as geninas, factores que contribuirão para uma dificuldade acrescida para atravessar a membrana celular, não chegando a atingir concentrações intracelulares suficientes para exercerem os seus efeitos antioxidantes. Por outro lado, está descrito que os compostos fenólicos podem exercer efeitos pró e antioxidantes, pelo facto de aqueles que possuem elevada capacidade de sequestração de radicais serem também capazes de produzir H_2O_2 e de induzirem a apoptose celular (292, 293).

Os efeitos revelados por extractos complexos como estes resultam da acção combinatória de todos os seus constituintes, e não da acção individual de um deles.

Assim, para as actividades demonstradas não podem ser considerados apenas os compostos fenólicos, pois outros metabolitos presentes e não determinados interferem. É preciso ainda ter em conta que a acção que determinado composto revela quando testado individualmente, mesmo que existente em determinada matriz, pode não ser representativa da sua acção dentro dela.

5.2.2. Genotoxicidade e mutagenicidade

A genotoxicidade define-se como a capacidade que algumas substâncias têm para induzir alterações no material genético dos organismos a elas expostos. Os compostos genotóxicos podem ser cancerígenos, mutagénicos ou teratogénicos (294).

As substâncias genotóxicas podem causar mutações nas células levando à sua divisão e crescimento descontrolado, ou apresentar efeitos nocivos sobre várias proteínas e outras substâncias reguladoras do crescimento celular normal (242).

Existem várias técnicas que permitem avaliar os danos no DNA, tais como o teste de Ames (usando bactérias), o ensaio da hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HPRT) e o ensaio do cometa (em células de mamíferos), e assim identificar os extractos ou as substâncias com actividade genotóxica, que foram realizados no âmbito desta tese.

Teste de Ames

O teste de Ames (Figura 44) é um ensaio *in vitro* utilizado para avaliar a toxicidade genética. Trata-se de um teste de reversão de mutações, que recorre ao uso de mutantes especialmente construídos de *Salmonella typhimurium*. Essas estirpes são incapazes de crescer em meio de cultura sem histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem a síntese deste aminoácido (242).

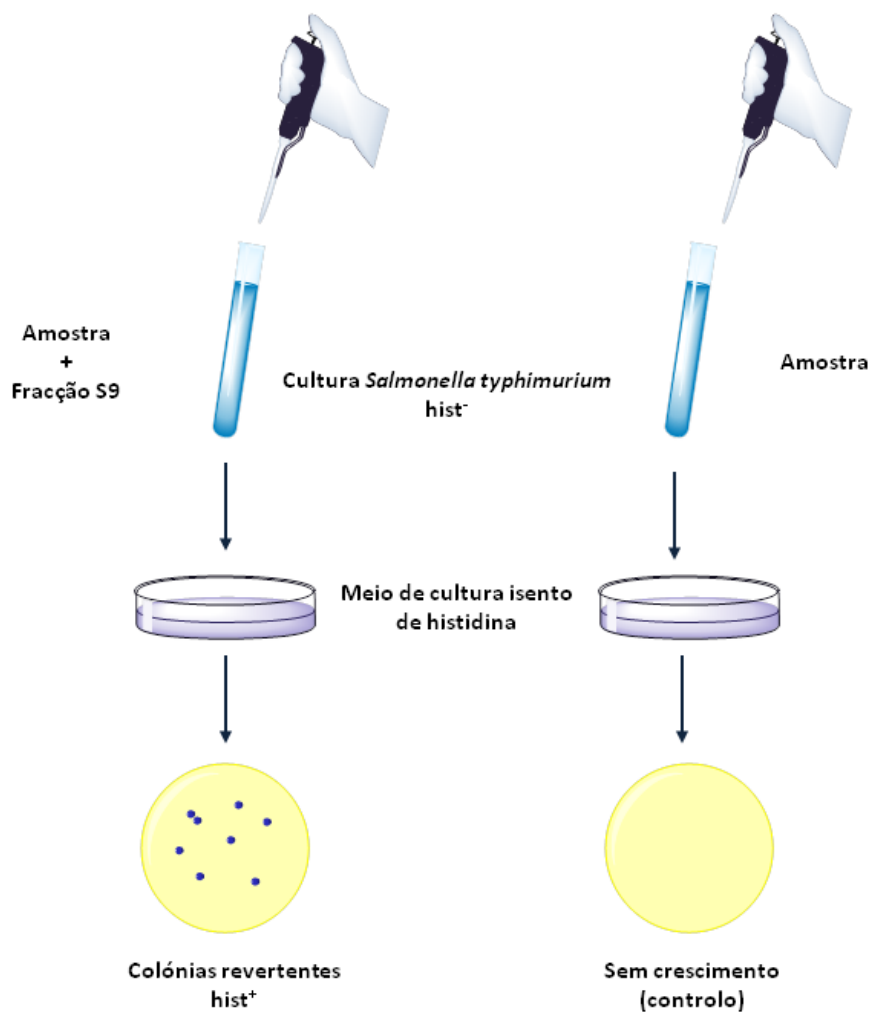


Figura 44. Representação esquemática do teste de Ames com ativação metabólica.

O teste é feito sem e com ativação metabólica, promovida pela fracção S9 contendo várias enzimas microssomais. A presença dessas enzimas no meio simula a metabolização *in vivo* dos compostos químicos primários, sendo possível avaliar também a actividade mutagénica dos compostos secundários.

Atendendo a que as larvas de *P. brassicae* alimentadas com *B. oleracea* var. *costata* revelaram anteriormente uma actividade antioxidante promissora (170), e uma capacidade considerável para inibir a xantina oxidase (170), os extractos aquosos destas duas matrizes foram analisados relativamente ao potencial para proteger o DNA contra os danos desencadeados por outros agentes.

Nenhum dos extractos revelou efeito mutagénico nas concentrações testadas, conforme verificado pelo teste de reversão de Ames usando linhagens de *Salmonella* His+ TA98, com e sem activação metabólica [4.8, (258)].

Testaram-se ainda os compostos voláteis constituintes destas matrizes (octanal, *trans*-geranilacetona, eugenol, β -ciclocitral e (-)-mentol), na gama de concentrações em que se encontravam em cada uma delas. Estes compostos têm baixo peso molecular e por este motivo podem mais facilmente atravessar a célula. No entanto, todos eles revelaram actividade antimicrobiana na concentração mais baixa testada [4.8, (258)], facto que inviabilizou o ensaio por nele ser usada uma estirpe bacteriana.

Ensaio da hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HPRT)

O ensaio da HPRT é utilizado para avaliar a mutação génica em células de mamíferos, sendo adequado para a avaliação inicial da genotoxicidade de um extracto. As células V79 possuem uma cópia funcional do gene que codifica para a HPRT. A actividade desta enzima é importante para a síntese do DNA. O uso de 6-tioguanina (6-TG), nucleosídeo análogo tóxico, constitui a base para o tratamento das células e permite avaliar a ocorrência ou não de mutações: as células sem mutação são destruídas pela incorporação de 6-TG, enquanto as mutantes sobrevivem. Estas últimas são resultantes de uma mutação espontânea ou de uma mutação induzida, causada por um agente químico como o metanossulfonato de metilo (MMS), um agente alquilante.

No caso de se verificar que o extracto por si só não apresenta genotoxicidade, podemos também com este ensaio estudar a sua acção protectora. Para tal as células são tratadas previamente com um agente agressor e avalia-se se o extracto impede a acção desse agente ou se diminui os seus efeitos deletérios. Desta forma, este ensaio pode ser usado para avaliar o potencial do extracto para induzir mutações no *locus* HPRT das células ou para protege-las da acção mutagénica de determinado agente.

Na concentração testada (500 $\mu\text{g/mL}$) os extractos não só não exibiram mutagenicidade por si só, mas também não revelaram qualquer efeito protector do DNA relativamente ao dano induzido pelo MMS [4.8, (258)].

Ensaio do Cometa

Durante a última década, o ensaio do cometa (electroforese de células individuais) tornou-se uma ferramenta básica e muito utilizada pelos investigadores em diferentes áreas para a avaliação da genotoxicidade. O termo “cometa” é usado para identificar os

padrões de migração electroforética do DNA produzidos durante este ensaio (295) (Figura 45).

A “cabeça” circular do cometa correspondente ao DNA não danificado e a “cauda” ao lesado. De um modo geral, quanto mais brilhante e longa for a “cauda”, maior o nível de danos (295).

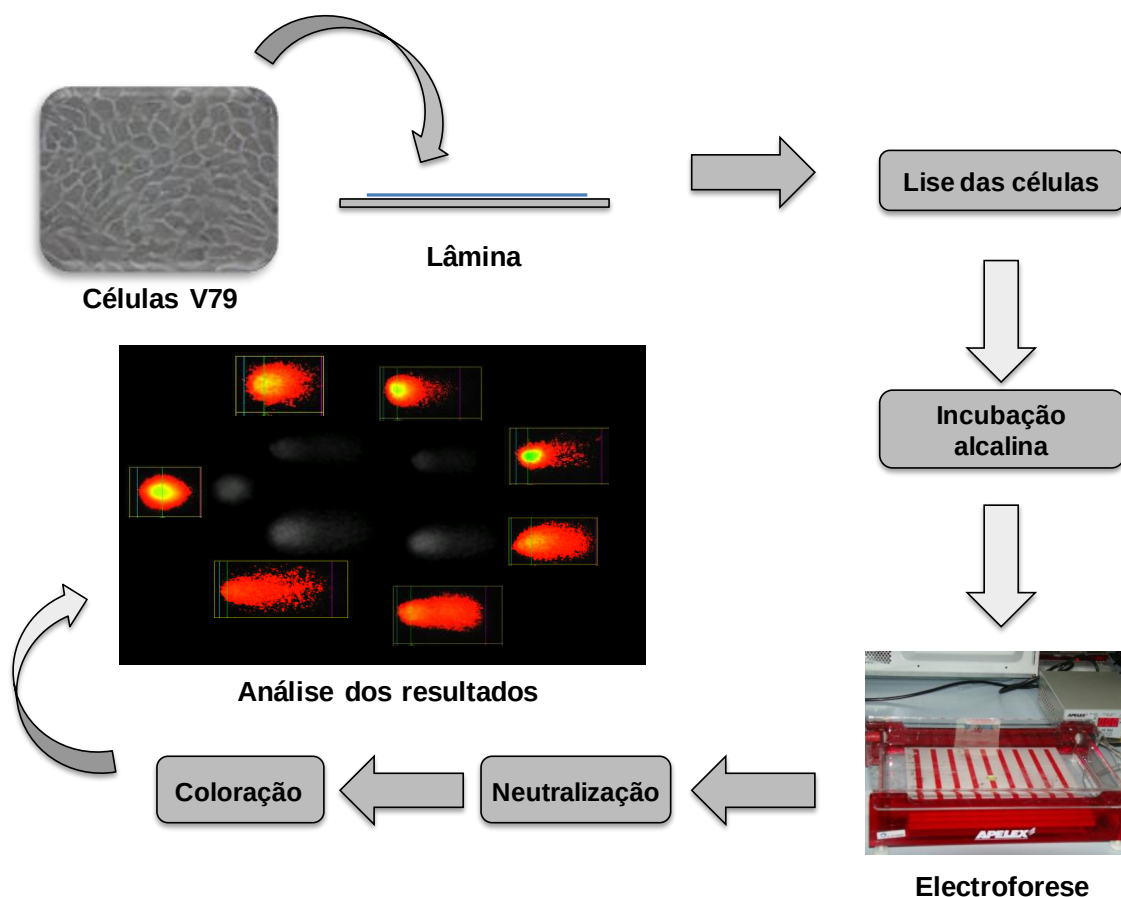


Figura 45. Representação esquemática do ensaio do cometa.

O ensaio do cometa foi usado para testar os extractos aquosos de larvas de *P. brassicae* e da sua planta hospedeira, couve tronchuda, numa ampla gama de concentrações (entre 4 e 500 µg/ml) [4.8, (258)]. Neste ensaio foi avaliada a intensidade da cauda do cometa, que corresponde à percentagem de DNA lesado (237). Nenhum dos extratos aquosos foi genotóxico nas concentrações testadas [4.8, (258)].

Posteriormente, e uma vez que os extractos por si só não revelaram qualquer efeito mutagénico, estes foram avaliados quanto à capacidade que poderiam ter para proteger o DNA dos danos provocados pelo MMS.

Verificou-se que o extracto de larva de *P. brassicae* protegeu significativamente as células V79 contra os efeitos genotóxicos do MMS, e o de couve tronchuda revelou

tendência para diminuir a genotoxicidade provocada por este agente [4.8, (258)]. A diferença de resultados relativamente aos obtidos no ensaio da HPRT poderá ser devida ao facto de as condições usadas neste último serem mais drásticas do que no ensaio do cometa (as células estiveram expostas ao agente alquilante por um período mais longo).

Os dados obtidos neste trabalho parecem sustentar que o extracto de larvas de *P. brassicae* poderá ser mais interessante do que o da planta hospedeira, no que respeita à protecção do DNA. No entanto, os dados que temos não fornecem respostas quanto aos metabolitos responsáveis pelo este efeito antigenotóxico. Pode-se especular que os flavonóis e os heterósidos de ácidos hidroxicinâmicos, bem como pequenas moléculas de peso molecular baixo, como é o caso dos compostos voláteis, poderão contribuir para a actividade exibida.

O eugenol, o principal composto volátil em ambas as matrizes, foi já descrito como genotóxico para duas linhas de células humanas (fibroblastos VH10 e células do cólon Caco-2), mas não tendo qualquer efeito em HepG2 (296, 297). No entanto, o seu conteúdo nos extractos testados [4.8, (258)] é inferior à concentração genotóxica (296, 297).

Considerando os ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade realizados no âmbito desta dissertação, pode-se inferir que os extractos testados não terão efeitos nefastos para o DNA, podendo, em algumas circunstâncias, exercer uma acção protectora contra agentes agressores.

5.2.3. Inibição da acetilcolinesterase

Não se conhece qualquer terapêutica que interfira na origem da DA, existindo apenas algumas que visam o tratamento sintomático desta doença. Os medicamentos aprovados para a terapêutica da DA limitam-se a retardar a evolução natural da doença, permitindo apenas uma melhoria temporária do estado funcional do paciente (231).

O principal mecanismo de acção dos fármacos usados actualmente consiste na inibição enzimática das colinesterases, aumentando assim os níveis de acetilcolina na fenda sináptica (231, 233). Existem vários ensaios para a avaliação desta propriedade, sendo o mais utilizado a determinação espectrofotométrica baseada no método de Ellman (298). Esta consiste na monitorização da hidrólise da acetiltiocolina, seguida da reacção com o reagente de Ellman, produzindo 5-tio-2-nitrobenzoato (299) (Figura 46).

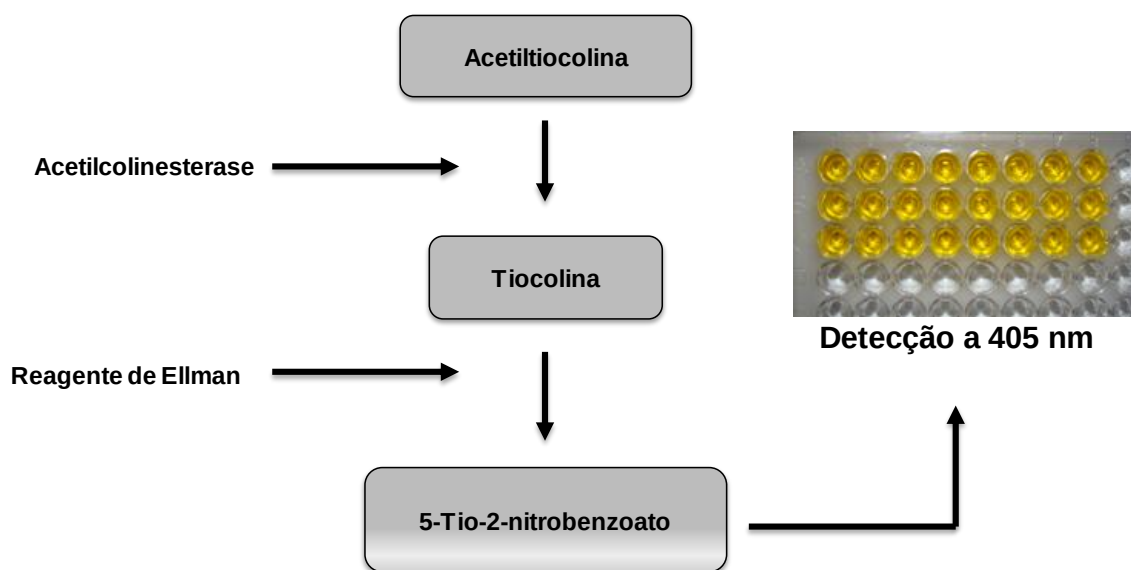


Figura 46. Representação esquemática do ensaio de inibição da acetilcolinesterase.

Vários estudos apontam para o facto de extractos de plantas ricos em compostos fenólicos serem potenciais inibidores da AChE (300, 301). Além disso, conforme referido anteriormente, a sinapoilcolina (Figura 10), marcador quimiotaxonómico do género *Brassica* pela sua presença na maioria das sementes destas plantas (83), apresenta, devido à sua elevada semelhança estrutural com a acetilcolina, uma elevada capacidade para inibir a AChE (302). Nesta tese determinou-se também a capacidade inibitória de AChE pelas sementes de couve-galega e de couve tronchuda, bem como dos diversos materiais de *P. brassicae* (borboletas, larvas e seus excrementos) e das folhas de couve-galega da qual o insecto se alimentou. Os resultados obtidos estão sumariados na Tabela 7.

Tabela 7. Inibição da AChE pelos materiais de *P. brassicae*, folhas e sementes da couve-galega hospedeira.

		µg/ml
Couve-galega (IC ₂₅)	Sementes	897
	Folhas	2051
<i>P. brassicae</i> (IC ₂₅)	Borboletas	563 ¹
	Larvas	563 ²
	Excrementos	2666

¹ Concentração máxima testada e para a qual se verificou uma actividade de 16%;

² Concentração máxima testada e para a qual se verificou uma actividade de 12%.

Todos os extractos revelaram potencial para inibir a AChE de modo dependente da concentração [4.3, (244)]. Comparando as sementes das duas variedades de *B. oleracea*, as de couve-galega revelaram-se maior capacidade do que as de couve tronchuda ($IC_{25}=1424 \mu\text{g/ml}$) sendo estes os materiais mais activos (Tabela 7) [4.3, (244)].

Dos materiais de *P. brassicae*, os excrementos foram aquele que apresentou maior capacidade para inibir a enzima; as larvas e as borboletas mostraram actividade muito reduzida: as borboletas apresentaram uma inibição máxima de 16% e as larvas de 12% para a concentração mais elevada testada. As folhas de couve-galega foram, neste ensaio, mais activas que todos os materiais de *P. brassicae* (Tabela 7) [4.3, (244)].

Estas diferenças entre as diversas matrizes devem-se, em parte, à presença de sinapoilcolina nas sementes de ambas as variedades de *B. oleracea* e à sua ausência nos materiais de *P. brassicae* bem como nas folhas da sua planta hospedeira [(4.1, 4.3), (179, 244)]. Este composto dá, assim, um importante contributo para a inibição da AChE. Face à sua estrutura (Figura 10), com um azoto quaternário, provavelmente liga-se reversivelmente ao mesmo local da enzima onde o amónio quaternário da acetilcolina se une (303), actuando como inibidor competitivo (304).

Outros compostos fenólicos têm também capacidade para inibir esta enzima, como é o caso da quercetina-3-O-galactósido, 3-metoxi-quercetina e quercetina (305). No entanto, apesar das larvas e excrementos de *P. brassicae* e das folhas de couve-galega apresentarem derivados desta genina na sua composição, estes apresentam um padrão de substituição mais complexo, o que pode diminuir a sua actividade como inibidores da AChE.

5.2.4. Efeito no músculo liso

Os compostos fenólicos são também conhecidos por exercerem efeito no músculo liso do intestino (306). Tendo em conta esta premissa, e dada a riqueza nestes compostos de alguns dos materiais estudados nesta tese, foi igualmente avaliado o efeito dos extractos aquosos dos materiais de *P. brassicae* (larvas, borboletas e excrementos), bem como das folhas da sua planta hospedeira, *B. oleracea* var. *acephala*, no músculo liso de intestino de rato (Figura 47) [4.1, (179)].

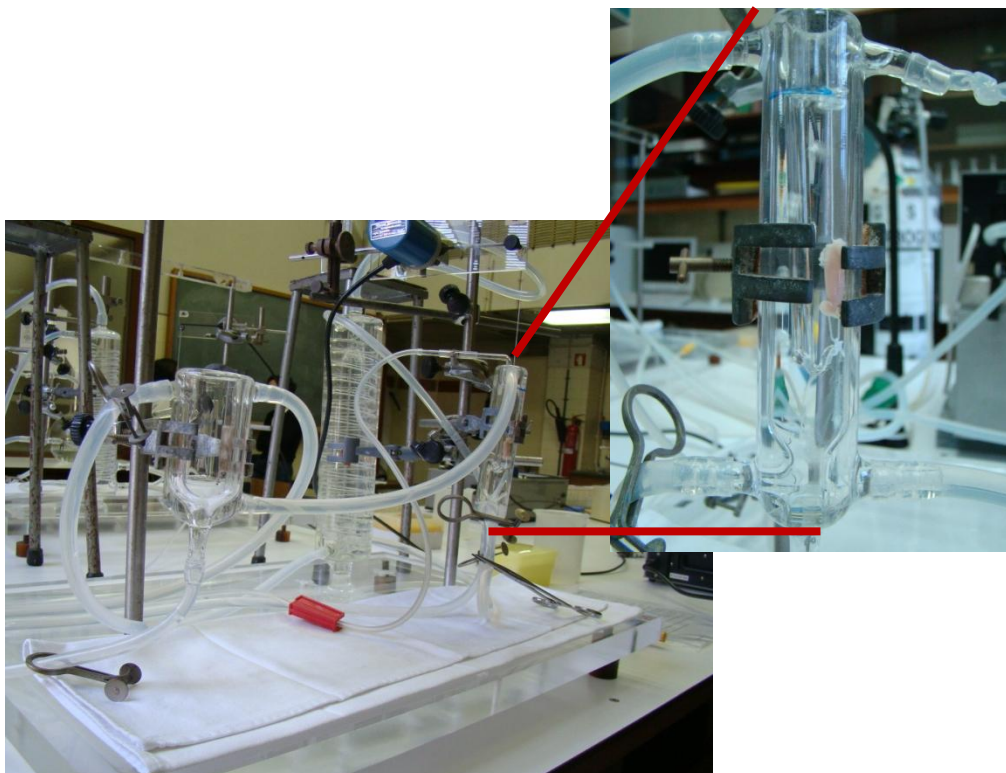


Figura 47. Montagem dos segmentos de intestino de rato para avaliação das alterações longitudinais no comprimento do músculo intestinal.

Os resultados foram analisados de forma qualitativa, pelo relaxamento e/ou contracção causado, e quantitativa (Tabela 8).

Tabela 8. Actividade dos vários materiais de *P. brassicae* e das folhas da couve-galega hospedeira no músculo liso de intestino de rato.

		Efeito	EC ₅₀ (µg/ml)
Couve-galega	Folhas	Relaxamento	33,5
	Borboletas	Relaxamento	36,1
<i>P. brassicae</i>	Larvas	Relaxamento	6,5
	Excrementos	Contracção	47,7

Todos os extractos exerceram efeitos dependentes da concentração, no intervalo de concentrações testado. As folhas de couve-galega causaram pequenos relaxamentos para as concentrações mais baixas, provocando contracção nas doses mais elevadas de extracto [4.1, (179)].

Relativamente aos materiais de *P. brassicae* observaram-se efeitos distintos com as diversas matrizes. A larva exibiu uma potente capacidade relaxante, levando a uma resposta rápida e de curta duração, enquanto os excrementos causaram contracção do músculo liso do intestino para todas as concentrações de extracto. As borboletas de *P. brassicae* proporcionaram uma resposta bifásica peculiar, com rápidos relaxamentos seguidos de um efeito ricochete de rápidas contracções, sem atingir no entanto a contracção máxima exercida previamente pelo carbacol (o composto usado como indutor de contracção) [4.1, (179)].

Para se determinar a contribuição dos compostos fenólicos, o efeito do campferol-3-O-rutinósido, em representação do conteúdo total em derivados de campferol em cada matriz, também foi avaliado. No entanto, este composto não exerceu nenhum efeito no músculo liso do intestino de rato na gama de concentrações testada.

Do mesmo modo, e para se perceber se existe alguma contribuição por parte de outros compostos identificados nestas matrizes, procedeu-se ao mesmo estudo usando uma mistura de ácidos orgânicos mimetizando a composição e o conteúdo destes em cada uma das matrizes. No entanto, também não se verificou qualquer efeito destes compostos no músculo liso [4.1, (179)].

Assim, outros compostos não determinados deverão ser responsáveis pelos efeitos causados por estas matrizes no músculo intestinal.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos trabalhos realizados no âmbito desta dissertação permitiram chegar às seguintes conclusões:

1. Por HPLC-MS foram identificados 88 compostos fenólicos diferentes: 60 heterósidos flavonólicos, 23 heterósidos de ácidos hidroxicinâmicos e 5 ésteres de ácidos hidroxicinâmicos com ácido quínico.
2. O perfil de compostos fenólicos das folhas de *B. oleracea* var. *acephala* (couve-galega) foi constituído maioritariamente por heterósidos do campferol, alguns acilados com ácidos hidroxicinâmicos, e por heterósidos de ácidos hidroxicinâmicos.
3. No perfil fenólico das sementes de couve-galega e de *B. oleracea* var. *costata* (couve tronchuda) predominaram os derivados dos ácidos hidroxicinâmicos.
4. O perfil fenólico exibido pela larva de *P. brassicae* foi característico e definido consoante a planta usada como alimento.
5. A *P. brassicae* sequestrou diversos compostos fenólicos da sua planta hospedeira, que no seu organismo foram acumulados ou passaram por vários processos de metabolização. Estes processos envolveram desglicosilação, desacilação e sulfatação, originando novos compostos, muitos deles ausentes na planta hospedeira.
6. Nas borboletas de *P. brassicae* não foi detectado qualquer composto fenólico.
7. A larva mostrou capacidade para excretar os compostos que não lhe são favoráveis ou que atingem níveis que comprometem a sua metabolização. Nos excrementos foram encontrados compostos ausentes na planta hospedeira, apresentando o material de *P. brassicae* o maior número e conteúdo de compostos fenólicos.
8. O perfil de ácidos orgânicos das sementes de couve-galega e couve tronchuda foi semelhante, sendo os ácidos málico e cítrico os maioritários. Esta tendência verificou-se também nas folhas de couve-galega, bem como na larva de *P. brassicae* alimentada com esta variedade de *B. oleracea*. As borboletas exibiram os ácidos cítrico e pirúvico como

maioritários e nos excrementos os ácidos cítrico e acético foram os mais importantes. Os ácidos cítrico, pirúvico e málico foram comuns a todas as matrizes estudadas.

9. Foram detectados 103 compostos voláteis entre os compostos que a couve-galega libertou no seu estado quiescente e após ser atacada bem como os compostos apresentados pela larva de *P. brassicae* e pelos seus excrementos durante todo o processo de metabolização. Estes compostos agruparam-se em diferentes classes: álcoois, aldeídos, ésteres, cetonas, terpenos, derivados de norisoprenóides, compostos com enxofre e compostos azotados.

10. A couve-galega mostrou responder aos ataques a que foi sujeita. Essa resposta foi constitutiva, com a libertação indiferenciada de compostos que a planta tinha armazenados (e que são comuns ao ataque mecânico e ao ataque pela *P. brassicae*), e indutível, na qual foram libertados compostos apenas devido ao ataque da couve-galega por este herbívoro.

11. A *P. brassicae* revelou capacidade para superar as barreiras impostas pela planta hospedeira, recorrendo à degradação dos glucosinolatos e metabolização de compostos voláteis.

12. Durante o processo de germinação da couve-galega o perfil de compostos voláteis é alterado: as sementes e os rebentos caulinares apresentam os compostos de enxofre e os azotados como os maioritários, enquanto as folhas adultas são maioritariamente constituídas por terpenos, álcoois, aldeídos e derivados de norisoprenóides.

13. Os extractos dos vários materiais de *P. brassicae* (borboletas, lagartas e excrementos) bem como da sua couve-galega hospedeira demonstraram ter capacidade para neutralizar várias espécies reactivas em sistemas químicos. A actividade antioxidante de todos os materiais de *P. brassicae* foi sempre melhor do que a da couve que serviu de alimento à larva de *P. brassicae*.

14. As larvas e as borboletas de *P. brassicae* foram as matrizes que demonstraram ter um maior potencial antioxidante.

15. O potencial antioxidante dos materiais de *P. brassicae*, bem como da couve-galega hospedeira, não foram confirmados no ensaio realizado com fibroblastos de pulmão de hamster (V79) submetidos a stress oxidativo, por acção do peróxido de hidrogénio.
16. Os extractos aquosos dos materiais de *P. brassicae*, bem como da couve-galega hospedeira, por si só não demonstraram ter potencial citotóxico *in vitro*. O mesmo não se verificou com os extractos metanólicos destas matrizes, que revelaram efeito citotóxico para as concentrações mais altas testadas.
17. Os extratos aquosos de larvas de *P. brassicae* e da sua planta hospedeira, couve tronchuda, não foram mutagénicos nem para bactérias, nem para células de mamíferos (V79). Pelo contrário, o extracto de larva de *P. brassicae* revelou capacidade para proteger significativamente as células V79 contra os efeitos genotóxicos do agente mutagénico utilizado (metanossulfonato de metilo) e o de couve tronchuda uma tendência para diminuir a genotoxicidade provocada pelo mesmo.
18. As sementes de couve tronchuda e couve-galega revelaram uma grande capacidade para inibir a acetilcolinesterase e esta actividade está sobretudo relacionada com o seu conteúdo em sinapoilcolina. As folhas de couve-galega também inibem esta enzima. Os materiais de *P. brassicae* têm fraca actividade.
19. Os extractos dos vários materiais de *P. brassicae*, bem como da couve-galega hospedeira, exibiram efeito no músculo liso do intestino de rato, sendo a larva de *P. brassicae* a matriz com maior capacidade para relaxar o intestino previamente contraído. Os excrementos deste herbívoro apenas exerceram efeito de contracção do músculo.
20. Os resultados obtidos nesta tese de doutoramento apontam para o interesse do uso de *P. brassicae* como fonte de compostos bioactivos, tirando-se partido desta praga, responsável por perdas enormes de várias culturas de *B. oleracea*.

PARTE IV

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Taveira M, Fernandes F, Valentão P, Ferreres F, Andrade PB. Plant herbivores: bioactive metabolites besides the pest. In: Sridhar KR, editor. Aquatic plants and plants diseases. USA: Nova Science Publishers; 2011. p. 117-45.
2. Guedes de Pinho P, Pereira DM, Gonçalves RF, Valentão P, Fernandes F, Taveira M, et al. Head-space-solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry applied to determination of volatiles in natural matrices. In: Teixeira da Silva JA, editor. Functional Plant Science & Biotechnology. UK: Global Science Books; 2009. p. 1-15.
3. Schoonhoven LM, Loon JJA, Dicke M. Insect-plant biology. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 2005.
4. Stinchcombe JR. Can tolerance traits impose selection on herbivores? *Evolutionary Ecology* 2002 Nov; 16 (6): 595-602.
5. Mello MO, Silva-Filho MC. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Braz J Plant Physiol* 2002 May; 14: 71-81.
6. Mattiacci L, Rudelli S, Rocca BA, Genini S, Dorn S. Systemically-induced response of cabbage plants against a specialist herbivore, *Pieris brassicae*. *Chemoecology* 2001 Nov; 11 (4): 167-73.
7. Hesbacher S, Giez I, Embacher G, Fiedler K, Max W, Trawöger A, et al. Sequestration of lichen compounds by lichen-feeding members of the *Arctiidae* (Lepidoptera). *J Chem Ecol* 1995 Dec; 21 (12): 2079-89.
8. Weber G, Oswald S, Zöllner U. Die Wirtseignung von Rapssorten unterschiedlichen Glucosinolatgehaltes für *Brevicoryne brassicae* (L.) und *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera, Aphididae). Stuttgart: Ulmer; 1986.
9. Agerbirk N, Müller C, Olsen CE, Chew FS. A common pathway for metabolism of 4-hydroxybenzylglucosinolate in *Pieris* and *Anthracis* (Lepidoptera: Pieridae). *Biochem Syst Ecol* 2006 Oct; 34 (3): 189-98.
10. Nishida R. Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. *Annu Rev Entomol* 2002; 47 (1): 57-92.
11. Després L, David J-P, Gallet C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends Ecol Evol* 2007 Jun; 22 (6): 298-307.
12. Capinera JL. Encyclopedia of entomology. 2nd ed. USA: Springer; 2008.
13. Muriel SB, Grez AA. Effect of plant patch shape on the distribution and abundance of three lepidopteran species associated with *Brassica oleracea*. *Agric For Entomol* 2002 Jul; 4 (3): 179-85.

14. Ehrlich PR, Raven PH. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evol* 1964 Dec; 18 (4): 586-608.
15. Jung Park E, Pezzuto JM. Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev* 2002 Dec; 21 (3): 231-55.
16. Heimler D, Vignolini P, Dini MG, Vincieri FF, Romani A. Antiradical activity and polyphenol composition of local *Brassicaceae* edible varieties. *Food Chem* 2006 Sep; 99 (3): 464-9.
17. Vallejo F, Gil-Izquierdo A, Pérez-Vicente A, García-Viguera C. *In vitro* gastrointestinal digestion study of broccoli inflorescence phenolic compounds, glucosinolates, and vitamin C. *J Agric Food Chem* 2004 Dec; 52 (1): 135-8.
18. Ferreres F, Valentao P, Llorach R, Pinheiro C, Cardoso L, Pereira JA, et al. Phenolic compounds in external leaves of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC). *J Agric Food Chem* 2005 Mar; 53 (8): 2901-7.
19. Peto R, Doll R, Buckley JD, Sporn MB. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? *Nature* 1981 Mar; 290 (5803): 201-8.
20. Stoewsand GS. Bioactive organosulfur phytochemicals in *Brassica oleracea* vegetables - a review. *Food Chem Toxicol* 1995 Jun; 33 (6): 537-43.
21. Verhoeven DTH, Verhagen H, Goldbohm RA, van den Brandt PA, van Poppel G. A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chem Biol Interact* 1997 Feb; 103 (2): 79-129.
22. Rosa EAS. Glucosinolates from flower buds of portuguese *Brassica* crops. *Phytochemistry* 1997 Apr; 44 (8): 1415-9.
23. Rosa E, David M, Gomes MH. Glucose, fructose and sucrose content in broccoli, white cabbage and portuguese cabbage grown in early and late seasons. *J Sci Food Agric* 2001 Jul; 81 (12): 1145-9.
24. Rosa E, Heaney R. Seasonal variation in protein, mineral and glucosinolate composition of portuguese cabbages and kale. *Anim Feed Sci Technol* 1996 Jan; 57 (1-2): 111-27.
25. Ferreres F, Sousa C, Valentão P, Seabra RM, Pereira JA, Andrade PB. Tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) seeds: Phytochemical characterization and antioxidant potential. *Food Chem* 2007 Mar; 101 (2): 549-58.
26. Sousa C, Lopes G, Pereira DM, Taveira M, Valentao P, Seabra RM, et al. Screening of antioxidant compounds during sprouting of *Brassica oleracea* L. var. *costata* DC. *Comb Chem High Throughput Screen* 2007 Jun; 10 (5): 377-86.
27. Sousa C, Valentao P, Rangel J, Lopes G, Pereira JA, Ferreres F, et al. Influence of two fertilization regimens on the amounts of organic acids and phenolic

- compounds of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC). J Agric Food Chem 2005 Oct; 53 (23): 9128-32.
28. Sousa C, Taveira M, Valentão P, Fernandes F, Pereira JA, Estevinho L, et al. Inflorescences of Brassicacea species as source of bioactive compounds: A comparative study. Food Chem 2008 Oct; 110 (4): 953-61.
 29. Vrchovská V, Sousa C, Valentão P, Ferreres F, Pereira JA, Seabra RM, et al. Antioxidative properties of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) external leaves against DPPH, superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. Food Chem 2006 Aug; 98 (3): 416-25.
 30. Sousa C, Pereira DM, Taveira M, Dopico-García S, Valentão P, Pereira JA, et al. *Brassica oleracea* var. *costata*: comparative study on organic acids and biomass production with other cabbage varieties. J Sci Food Agric 2009 Apr; 89 (6): 1083-9.
 31. Ayaz FA, Glew RH, Millson M, Huang HS, Chuang LT, Sanz C, et al. Nutrient contents of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC.). Food Chem 2006 Jun; 96 (4): 572-9.
 32. Kurilich AC, Britz SJ, Clevidence BA, Novotny JA. Isotopic Labeling and LC-APCI-MS quantification for investigating absorption of carotenoids and phyloquinone from kale (*Brassica oleracea*). J Agric Food Chem 2003 Jul; 51 (17): 4877-83.
 33. Lefsrud MG, Kopsell DA, Kopsell DE, Randle WM. Kale carotenoids are unaffected by, whereas biomass production, elemental concentrations, and selenium accumulation respond to, changes in selenium fertility. J Agric Food Chem 2006 Feb; 54 (5): 1764-71.
 34. Romani A, Pinelli P, Galardi C, Corti G, Agnelli A, Heimler D. Analysis of flavonoids in leaves of black cabbage (*Brassica oleracea* var. *acephala* DC subvar. *viridis* forma *serotina*) grown on different soils and heights. Ital J Food Sci 2003 Jun; 15 (1): 197–205.
 35. Futuyma DJ, Slatkin M. Coevolution. Sunderland: Sinauer Associates; 1983.
 36. Rosenthal JP, Kotanen PM. Terrestrial plant tolerance to herbivory. Trends Ecol Evol 1994 Apr; 9 (4): 145-8.
 37. Tiffin P. Mechanisms of tolerance to herbivore damage: what do we know? Evolutionary Ecology 2000 Jul; 14 (4): 523-36.
 38. Kessler A, Baldwin IT. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. Annu Rev Plant Biol 2002 Jun; 53 (1): 299-328.
 39. Tallamy DW, Raupp MJ. Phytochemical induction by herbivores. New York: Wiley Interscience; 1991.
 40. Karban R. Plant variation: its effects on populations of herbivorous insects. In: Simms EL, Fritz RS, editors. Plant Resistance to Herbivores and Pathogens:

- Ecology, Evolution and Genetics. Chicago: University of Chicago Press; 1992. p. 195-202.
41. Mattiacci L, Rocca BA, Scascighini N, D'Alessandro M, Hern A, Dorn S. Systemically induced plant volatiles emitted at the time of "danger". J Chem Ecol 2001 Nov; 27 (11): 2233-52.
 42. Wittstock U, Gershenzon J. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. Curr Opin Plant Biol 2002 Aug; 5 (4): 300-7.
 43. Harborne JB, Grayer RJ. Flavonoids and insects. In: Harborne JB, editor. The flavonoids, advances in research since 1986. London: Chapman & Hall; 1994. p. 589-618.
 44. Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. Phytochemistry 2001 Jan; 56 (1): 5-51.
 45. Holst B, Williamson G. A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. Nat Prod Rep 2004 May; 21 (3): 425-47.
 46. Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3rd ed. Paris: TEC & DOC; 1999.
 47. Halkier BA, Gershenzon J. Biology and biochemistry of glucosinolates. Annu Rev Plant Biol 2006 Jun; 57 (1): 303-33.
 48. Renwick JAA. The chemical world of crucivores: lures, treats and traps. Entomol Exp Appl 2002 Apr; 104 (1): 35-42.
 49. Moyes CL, Collin HA, Britton G, Raybould AF. Glucosinolates and differential herbivory in wild populations of *Brassica oleracea*. J Chem Ecol 2000 Nov; 26 (11): 2625-41.
 50. Jezek J, Haggett BGD, Atkinson A, Rawson DM. Determination of glucosinolates using their alkaline degradation and reaction with ferricyanide. J Agric Food Chem 1999 Oct; 47 (11): 4669-74.
 51. Müller C, Agerbirk N, Erik Olsen C. Lack of sequestration of host plant glucosinolates in *Pieris rapae* and *P. brassicae*. Chemoecology 2003 Mar; 13 (1): 47-54.
 52. van Loon J, Schoonhoven L. Specialist deterrent chemoreceptors enable *Pieris* caterpillars to discriminate between chemically different deterrents. Entomol Exp Appl 1999 Oct; 91 (1): 29-35.
 53. Cardé RT, Millar JG. Advances in insect chemical ecology. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2004.
 54. Kloer D, Schulz G. Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. Cell Mol Life Sci 2006 Oct; 63 (19): 2291-303.

55. McGraw KJ, Hill GE. Carotenoid access and intraspecific variation in plumage pigmentation in male american goldfinches (*Carduelis tristis*) and northern cardinals (*Cardinalis cardinalis*). *Funct Ecol* 2001 Dec; 15 (6): 732-9.
56. Tanaka Y, Ohmiya A. Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. *Curr Opin Biotechnol* 2008 Apr; 19 (2): 190-7.
57. Castenmiller JJM, West CE. Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annu Rev Nutr* 1998 Jul; 18 (1): 19-38.
58. Fraser PD, Bramley PM. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* 2004 May; 43 (3): 228-65.
59. Ahmad S. Biochemical defence of pro-oxidant plant allelochemicals by herbivorous insects. *Biochem Syst Ecol* 1992 Jun; 20 (4): 269-96.
60. Carroll M, Berenbaum M. Lutein sequestration and furanocoumarin metabolism in parsnip webworms under different ultraviolet light regimes in the montane west. *J Chem Ecol* 2006 Feb; 32 (2): 277-305.
61. Bungard RA, Ruban AV, Hibberd JM, Press MC, Horton P, Scholes JD. Unusual carotenoid composition and a new type of xanthophyll cycle in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 Feb; 96 (3): 1135-9.
62. Sakamoto K, Asai R, Okada A, Shimizu I. Effect of carotenoid depletion on the hatching rhythm of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biol Rhythm Res* 2003 Feb; 34 (1): 61-71.
63. Feltwell J, Rothschild M. Carotenoids in thirty-eight species of Lepidoptera. *J Zool* 1974 Aug; 174 (4): 441-65.
64. Czezugha B. The presence of carotenoids in various species of Lepidoptera. *Biochem Syst Ecol* 1986 May; 14 (3): 345-51.
65. Burghardt F, Fiedlert K, Proksch P. Uptake of flavonoids from *Vicia villosa* (Fabaceae) by the lycaenid butterfly, *Polyommatus icarus* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Biochem Syst Ecol* 1997 Sep; 25 (6): 527-36.
66. Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 2002 Jul; 22 (1): 19-34.
67. Cunha APDA, Gulbenkian FC, Graça JAB. Farmacognosia e fitoquímica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2005.
68. Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu C-J, Reddy MSS, Wang L. The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective. *Mol Plant Pathol* 2002 Sep; 3 (5): 371-90.
69. van Loon JJA, Zhu Wang C, Kvist Nielsen J, Gols R, Tong Qiu Y. Flavonoids from cabbage are feeding stimulants for diamondback moth larvae additional to

- glucosinolates: chemoreception and behaviour. *Entomol Exp Appl* 2002 Mar; 104 (1): 27-34.
70. Simmonds MSJ. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. *Phytochemistry* 2001 Feb; 56 (3): 245-52.
71. Loon J, Wang CZ, Nielsen JK, Gols R, Qiu YT. Flavonoids from cabbage are feeding stimulants for diamondback moth larvae additional to glucosinolates: chemoreception and behaviour. *Entomol Exp Appl* 2002 Jul; 104 (1): 27-34.
72. Floss HG, Onderka DK, Carroll M. Stereochemistry of the 3-deoxy-d-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthetase reaction and the chorismate synthetase reaction. *J Biol Chem* 1972 Feb; 247 (3): 736-44.
73. Bender SL, Mehdi S, Knowles JR. Dehydroquinase synthase: the role of divalent metal cations and of nicotinamide adenine dinucleotide in catalysis. *Biochemistry* 1989 Sep; 28 (19): 7555-60.
74. Harris JM, Gonzalez-Bello C, Kleanthous C, Hawkins AR, Coggins JR, Abell C. Evidence from kinetic isotope studies for an enolate intermediate in the mechanism of type II dehydroquinases. *Biochem J* 1996 Oct; 319 (Pt 2): 333-6.
75. Lewis J, Johnson KA, Anderson KS. The Catalytic Mechanism of EPSP Synthase Revisited†. *Biochemistry* 1999 May; 38 (22): 7372-9.
76. Jakeman DL, Mitchell DJ, Shuttleworth WA, Evans JNS. On the Mechanism of 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase†. *Biochemistry* 1998 Aug; 37 (35): 12012-9.
77. Bornemann S, Lowe DJ, Thorneley RNF. The transient kinetics of *Escherichia coli* chorismate synthase: substrate consumption, product formation, phosphate dissociation, and characterization of a flavin Intermediate. *Biochemistry* 1996 Jul; 35 (30): 9907-16.
78. Cotton RGH, Gibson F. The biosynthesis of phenylalanine and tyrosine; enzymes converting chorismic acid into prephenic acid and their relationships to prephenate dehydratase and prephenate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1965 Apr; 100 (1): 76-88.
79. Mavrides C, Orr W. Multispecific aspartate and aromatic amino acid aminotransferases in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1975 Jun; 250 (11): 4128-33.
80. Koukol J, Conn EE. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. *J Biol Chem* 1961 Oct; 236 (10): 2692-8.
81. MacDonald MJ, D'Cunha GB. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochem Cell Biol* 2007 Jun; 85 (3): 273-82.
82. Hoffmann L, Besseau S, Geoffroy P, Ritzenthaler C, Meyer D, Lapierre C, et al. Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinic

- hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 2004 Jun; 16 (6): 1446-65.
83. Bouchereau A, Hamelin J, Lamour I, Renard M, Larher F. Distribution of sinapine and related compounds in seeds of *Brassica* and *Allied* Genera. *Phytochemistry* 1991 May; 30 (6): 1873-81.
84. Milkowski C, Baumert A, Schmidt D, Nehlin L, Strack D. Molecular regulation of sinapate ester metabolism in *Brassica napus*: expression of genes, properties of the encoded proteins and correlation of enzyme activities with metabolite accumulation. *Plant J* 2004 Apr; 38 (1): 80-92.
85. McGleenon, Dynan, Passmore. Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Br J Clin Pharmacol* 1999 Oct; 48 (4): 471-80.
86. Ribéreau-Gayon P. Les composés phénoliques des végétaux. 1st ed. Paris: Dunod; 1968.
87. Cuyckens F, Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J Mass Spectrom* 2004 Jan; 39 (1): 1–15.
88. Jones P, Vogt T. Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* 2001 Jun; 213 (2): 164-74.
89. Harborne JB, Baxter H, Moss GB. *Phytochemical dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants*. 2nd ed. London: Taylor & Francis; 1999.
90. Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biol Med* 2004 Apr; 36 (7): 838-49.
91. Stobiecki M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry* 2000 Jun; 54 (3): 237-56.
92. Riva S. Enzymatic modification of the sugar moieties of natural glycosides. *J Mol Catal B: Enzym* 2002 Dec; 19-20: 43-54.
93. Guglielmone HA, Agnese AM, Núñez Montoya SC, Cabrera JL. Inhibitory effects of sulphated flavonoids isolated from *Flaveria bidentis* on platelet aggregation. *Thromb Res* 2005 Dec; 115 (6): 495-502.
94. De Santi C, Pietrabissa A, Mosca F, Pacifici GM. Glucuronidation of resveratrol, a natural product present in grape and wine, in the human liver. *Xenobiotica* 2000 Jan; 30 (11): 1047-54.
95. Jez JM, Bowman ME, Dixon RA, Noel JP. Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase. *Nat Struct Biol* 2000 Sep; 7 (9): 786-91.
96. Paolocci F, Bovone T, Tosti N, Arcioni S, Damiani F. Light and an exogenous transcription factor qualitatively and quantitatively affect the biosynthetic pathway

- of condensed tannins in *Lotus corniculatus* leaves. J Exp Bot 2005 Apr; 56 (414): 1093-103.
97. Kosuge T. The role of phenolics in host response to infection. Annu Rev Phytopathol 1969 Sep; 7 (1): 195-222.
98. Feeny PP. Inhibitory effect of oak leaf tannins on the hydrolysis of proteins by trypsin. Phytochemistry 1969 Nov; 8 (11): 2119-26.
99. Reinhold L, Liwschitz Y, Harborne JB, Swain T. Progress in phytochemistry. Madison: Interscience; 1981.
100. Schultz JC, Hunter MD, Appel HM. Antimicrobial activity of polyphenols mediates plant-herbivore interactions. In: Hemingway RW, editor. Plant Polyphenols: Biogenesis, Chemical Properties, and Significance. New York: Plenum Press; 1992. p. 621-37.
101. Duffey SS, Stout MJ. Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. Arch Insect Biochem Physiol 1996 Dec; 32 (1): 3-37.
102. Berhow MA, Vaughn SF. Higher plant flavonoids: biosynthesis and chemical ecology. In: Inderjit DKMM, Foy C, editors. Principles and Practices in Plant Ecology. Boca Raton: CRC Press; 1999. p. 423-38.
103. Kennedy GG. Tomato, pests, parasitoids, and predators: tritrophic interactions involving the genus *Lycopersicon*. Annu Rev Entomol 2003 Jan; 48 (1): 51-72.
104. Pierpoint WS. Reactions of phenolic compounds with proteins, and their relevance to the production of leaf protein. In: Telek L, Graham HD, editors. Leaf Protein Concentrates. Westport: Avi Publishing; 1983. p. 235-67.
105. Hurrell RF, Finot PA, Cuq JL. Protein-polyphenol reactions. 1. Nutritional and metabolic consequences of the reaction between oxidized caffeic acid and the lysine residues of casein. J Nutr 1982; 47: 191-211.
106. Matheis G, Whitaker JR. Modification of proteins by polyphenol oxidase and peroxidase and their products. J Food Biochem 1984 Feb; 8 (3): 137-62.
107. Simmonds MSJ, Blaney WM, Delle Monache F, Marini Bettolo GB. Insect antifeedant activity associated with compounds isolated from species of *Lonchocarpus* and *Tephrosia* J Chem Ecol 1990 Feb; 16 (2): 365-80.
108. Haribal M, Renwick JAA. Seasonal and population variation in flavonoid and Iliarinoside content of *Alliaria petiolata*. J Chem Ecol 2001 Aug; 27 (8): 1585-94.
109. Hamamura Y. Food selection by silkworm larvae. Nature 1959 Jun; 183 (4677): 1746-7.
110. Simmonds MSJ. Flavonoid-insect interactions: recent advances in our knowledge. Phytochemistry 2003 Sep; 64 (1): 21-30.

111. Felton GW. Nutritive quality of plant protein: sources of variation and insect herbivore responses. *Arch Insect Biochem Physiol* 1996 Dec; 32 (1): 107-30.
112. Duffey S, Isman M. Inhibition of insect larval growth by phenolics in glandular trichomes of tomato leaves. *Cell Mol Life Sci* 1981 Jun; 37 (6): 574-6.
113. Barbehenn RV, Bumgarner SL, Roosen EF, Martin MM. Antioxidant defenses in caterpillars: role of the ascorbate-recycling system in the midgut lumen. *J Insect Physiol* 2001 Apr; 47 (4-5): 349-57.
114. Johnson KS, Felton GW. Plant phenolics as dietary antioxidants for herbivorous insects: a test with genetically modified tobacco. *J Chem Ecol* 2001 Dec; 27 (12): 2579-97.
115. Thomson DL. The pigments of butterflies' wings. I. *Melanargia galathea*. *Biochem J* 1926; 20 (1): 73-5.
116. Burghardt F, Proksch P, Fiedler K. Flavonoid sequestration by the common blue butterfly *Polyommatus icarus*: quantitative intraspecific variation in relation to larval hostplant, sex and body size. *Biochem Syst Ecol* 2001 Oct; 29 (9): 875-89.
117. Schittko U, Burghardt F, Fiedler K, Wray V, Proksch P. Sequestration and distribution of flavonoids in the common blue butterfly *Polyommatus icarus* reared on *Trifolium repens*. *Phytochemistry* 1999 Jul; 51 (5): 609-14.
118. Geuder M, Wray V, Fiedler K, Proksch P. Sequestration and metabolism of host-plant flavonoids by the lycaenid butterfly *Polyommatus bellargus*. *J Chem Ecol* 1997 May; 23 (5): 1361-72.
119. Knüttel H, Fiedler K. Host-plant-derived variation in ultraviolet wing patterns influences mate selection by male butterflies. *J Exp Biol* 2001 Jul; 204 (14): 2447-59.
120. Burghardt F, Knüttel H, Becker M, Fiedler K. Flavonoid wing pigments increase attractiveness of female common blue (*Polyommatus icarus*) butterflies to mate-searching males. *Naturwissenschaften* 2000 Aug; 87 (7): 304-7.
121. Ferreres F, Sousa C, Valentão P, Pereira JA, Seabra RM, Andrade PB. Tronchuda cabbage flavonoids uptake by *Pieris brassicae*. *Phytochemistry* 2007 Feb; 68 (3): 361-7.
122. Pereira DM, Noites A, Valentão P, Ferreres F, Pereira JA, Vale-Silva L, et al. Targeted metabolite analysis and biological activity of *Pieris brassicae* fed with *Brassica rapa* var. *rapa*. *J Agric Food Chem* 2009 Dec; 57 (2): 483-9.
123. Kliebenstein DJ. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant Cell Environ* 2004 Jun; 27 (6): 675-84.

124. Dudareva N, Negre F, Nagegowda D, Orlova I. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *CRC Crit Rev Plant Sci* 2006 Sep; 25 (5): 417-40.
125. He P-Q, Tian L, Chen K-S, Hao L-H, Li G-Y. Induction of volatile organic compounds of *Lycopersicon esculentum* Mill. and its resistance to *Botrytis cinerea* Pers. by burdock oligosaccharide. *J Integr Plant Biol* 2006 May; 48 (5): 550-7.
126. Park S-W, Liu P-P, Forouhar F, Vlot AC, Tong L, Tietjen K, et al. Use of a synthetic salicylic acid analog to investigate the roles of methyl salicylate and its esterases in plant disease resistance. *J Biol Chem* 2009 Mar; 284 (11): 7307-17.
127. Negre F, Kish CM, Boatright J, Underwood B, Shibuya K, Wagner C, et al. Regulation of methylbenzoate emission after pollination in Snapdragon and Petunia flowers. *Plant Cell* 2003 Dec; 15 (12): 2992-3006.
128. Yan Z-G, Wang C-Z. Wound-induced green leaf volatiles cause the release of acetylated derivatives and a terpenoid in maize. *Phytochemistry* 2006 Jan; 67 (1): 34-42.
129. Schwab W, Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J* 2008 May; 54 (4): 712-32.
130. Turlings TCJ, Tumlinson JH, Lewis WJ. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* 1990 Nov; 250 (4985): 1251-3.
131. Mattiacci L, Dicke M, Posthumus MA. Induction of parasitoid attracting synomone in brussel sprouts plants by feeding of *Pieris brassicae* larvae: role of mechanical damage and herbivore elicitor. *J Chem Ecol* 1994 Sep; 20 (9): 2229-47.
132. Alborn HT, Turlings TCJ, Jones TH, Stenhagen G, Loughrin JH, Tumlinson JH. An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science* 1997 May; 276 (5314): 945-9.
133. Mattiacci L, Dicke M, Posthumus MA. beta-Glucosidase: an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 Mar; 92 (6): 2036-40.
134. Roda AMY, Halitschke R, Steppuhn A, Baldwin IT. Individual variability in herbivore-specific elicitors from the plant's perspective. *Mol Ecol* 2004 Aug; 13 (8): 2421-33.
135. Paré PW, Tumlinson JH. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiol* 1999 Oct; 121 (2): 325-32.
136. Cortesero AM, De Moraes CM, Stapel JO, Tumlinson JH, Lewis WJ. Comparisons and contrasts in host-foraging strategies of two larval parasitoids with different degrees of host specificity. *J Chem Ecol* 1997 Jun; 23 (6): 1589-606.
137. Laing JE, Levin DB. A review of the biology and a bibliography of *Apanteles glomeratus* (L.) (Hymenoptera: Braconidae). *Biocont News Inf* 1982; 3: 7-23.

138. Connor EC, Rott AS, Samietz J, Dorn S. The role of the plant in attracting parasitoids: response to progressive mechanical wounding. *Entomol Exp Appl* 2007 Nov; 125 (2): 145-55.
139. van Dam N, Qiu B-L, Hordijk C, Vet L, Jansen J. Identification of biologically relevant compounds in aboveground and belowground induced volatile blends. *J Chem Ecol* 2010 Aug; 36 (9): 1006-16.
140. Mumm R, Posthumus MA, Dicke M. Significance of terpenoids in induced indirect plant defence against herbivorous arthropods. *Plant Cell Environ* 2008 Apr; 31 (4): 575-85.
141. Bruinsma M, van Loon JJA, Dicke M. Increasing insight into induced plant defense mechanisms using elicitors and inhibitors. *Plant Signal Behav* 2010 Mar; 5 (3): 271-4.
142. Heil M, Silva Bueno JC. Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 Mar; 104 (13): 5467-72.
143. van Wijk M, De Bruijn P, Sabelis M. Predatory mite attraction to herbivore-induced plant odors is not a consequence of attraction to individual herbivore-induced plant volatiles. *J Chem Ecol* 2008 Jun; 34 (6): 791-803.
144. Baldwin IT. An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. *Plant Physiol* 2001 Dec; 127 (4): 1449-58.
145. Feussner I, Wasternack C. The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* 2002 Jun; 53 (1): 275-97.
146. Seo HS, Song JT, Cheong J-J, Lee Y-H, Lee Y-W, Hwang I, et al. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 Apr; 98 (8): 4788-93.
147. Krumm T, Bandemer K, Boland W. Induction of volatile biosynthesis in the Lima bean (*Phaseolus lunatus*) by leucine- and isoleucine conjugates of 1-oxo- and 1-hydroxyindan-4-carboxylic acid: evidence for amino acid conjugates of jasmonic acid as intermediates in the octadecanoid signalling pathway. *FEBS Lett* 1995 Mar; 377 (3): 523-9.
148. Farmer EE, Ryan CA. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 1992 Feb; 4 (2): 129-34.
149. Matsui K. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Curr Opin Plant Biol* 2006 Jun; 9 (3): 274-80.

150. Loreto F, Barta C, Brillì F, Nogues I. On the induction of volatile organic compound emissions by plants as consequence of wounding or fluctuations of light and temperature. *Plant Cell Environ* 2006 Sep; 29 (9): 1820-8.
151. Mithen R. Glucosinolates – biochemistry, genetics and biological activity. *Plant Growth Regul* 2001 May; 34 (1): 91-103.
152. Kim JH, Jander G. *Myzus persicae* (green peach aphid) feeding on *Arabidopsis* induces the formation of a deterrent indole glucosinolate. *Plant J* 2007 Mar; 49 (6): 1008-19.
153. Rask L, Andréasson E, Ekbom B, Eriksson S, Pontoppidan B, Meijer J. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol Biol* 2000 Jan; 42 (1): 93-114.
154. Padilla G, Cartea ME, Velasco P, de Haro A, Ordás A. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa*. *Phytochemistry* 2007 Feb; 68 (4): 536-45.
155. Wittstock U, Agerbirk N, Stauber EJ, Olsen CE, Hippler M, Mitchell-Olds T, et al. Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Apr; 101 (14): 4859-64.
156. Smallegange R, van Loon J, Blatt S, Harvey J, Agerbirk N, Dicke M. Flower vs leaf feeding by *Pieris brassicae*: glucosinolate-rich flower tissues are preferred and sustain higher growth rate. *J Chem Ecol* 2007 Oct; 33 (10): 1831-44.
157. Modzelewska A, Sur S, Kumar SK, Khan SR. Sesquiterpenes: natural products that decrease cancer growth. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents* 2005 Sep; 5 (5): 477-99.
158. Dicke M, Gols R, Ludeking D, Posthumus MA. Jasmonic acid and herbivory differentially induce carnivore-attracting plant volatiles in lima bean plants. *J Chem Ecol* 1999 Aug; 25 (8): 1907-22.
159. Rodríguez-Bustamante E, Sánchez S. Microbial production of C13-norisoprenoids and other aroma compounds via carotenoid cleavage. *Crit Rev Microbiol* 2007 Jul; 33 (3): 211-30.
160. Navia-Giné WG, Gomez SK, Yuan J, Chen F, Korth KL. Insect-induced gene expression at the core of volatile terpene release in *Medicago truncatula*. *Plant Signal Behav* 2009 Jul; 4 (7): 636-8.
161. Schnee C, Köllner TG, Held M, Turlings TCJ, Gershenzon J, Degenhardt J. The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Jan; 103 (4): 1129-34.

162. Rasmann S, Kollner TG, Degenhardt J, Hiltbold I, Toepfer S, Kuhlmann U, et al. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature* 2005 Apr; 434 (7034): 732-7.
163. Hebeish A, Fouda MMG, Hamdy IA, El-Sawy SM, Abdel-Mohdy FA. Preparation of durable insect repellent cotton fabric: limonene as insecticide. *Carbohydr Polym* 2008 Oct; 74 (2): 268-73.
164. İşcan G, Kirimer N, Kürkcüoğlu Mn, Hüsnü Can B, Demirci Fh. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *J Agric Food Chem* 2002 May; 50 (14): 3943-6.
165. Stumpf DK, Burris RH. Organic acid contents of soybean: age and source of nitrogen. *Plant Physiol* 1981 Nov; 68 (5): 989-91.
166. Lopez-Bucio J, Nieto-Jacobo MF, Ramírez-Rodríguez V, Herrera-Estrella L. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 2000 Sep; 160 (1): 1-13.
167. Levenbook L, Hollis Jr VW. Organic acid in insects—I. Citric acid. *J Insect Physiol* 1961 Feb; 6 (1): 52-61.
168. Levenbook L. Organic acids in insects. II. Tricarboxylic acid cycle and related enzymes in the larva of the Southern Armyworm, *Prodenia eridania*. *Arch Biochem Biophys* 1961 Jan; 92 (1): 114-21.
169. Ferreres F, Valentão P, Pereira JA, Bento A, Noites A, Seabra RM, et al. HPLC-DAD-MS/MS-ESI screening of phenolic compounds in *Pieris brassicae* L. reared on *Brassica rapa* var. *rapa* L. *J Agric Food Chem* 2008 Jan; 56 (3): 844-53.
170. Sousa C, Pereira DM, Valentão Pc, Ferreres F, Pereira JA, Seabra RM, et al. *Pieris brassicae* inhibits xanthine oxidase. *J Agric Food Chem* 2009 Feb; 57 (6): 2288-94.
171. Ferreres F, Fernandes F, Pereira DM, Pereira JA, Valentão P, Andrade PB. Phenolics metabolism in insects: *Pieris brassicae*–*Brassica oleracea* var. *costata* ecological duo. *J Agric Food Chem* 2009 Sep; 57 (19): 9035-43.
172. Andrade PB, Ferreres F, Pereira JA, Seabra RM, Sousa C, Valentão P. Tronchuda cabbage flavonoids uptake by *Pieris brassicae*. *Phytochemistry* 2007 Feb; 68: 361-7.
173. Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp Funct Genomics* 2001 Jun; 2 (3): 155-68.
174. Andrade PB, Pereira DM, Valentão P. Phenolic compounds: analysis by HPLC. In: Cazes J, editor. *Encyclopedia of Chromatography*. New York: Taylor & Francis LLC; 2010. p. 1768-76.

175. de Rijke E, Zappey H, Ariese F, Gooijer C, Brinkman UAT. Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments. *J Chromatogr A* 2003 Jan; 984 (1): 45-58.
176. Ferreres F, Tomas-Lorente F, Barberan FAT. Current trends in plant flavonoid analysis. Amsterdam: Elsevier; 1989.
177. Cuyckens F, Claeys M. Optimization of a liquid chromatography method based on simultaneous electrospray ionization mass spectrometric and ultraviolet photodiode array detection for analysis of flavonoid glycosides. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002; 16 (24): 2341-8.
178. de Rijke E, Out P, Niessen WM, Ariese F, Gooijer C, Brinkman UA. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J Chromatogr A* 2006 Apr; 1112 (1-2): 31-63.
179. Ferreres F, Fernandes F, Oliveira JMA, Valentão P, Pereira JA, Andrade PB. Metabolic profiling and biological capacity of *Pieris brassicae* fed with kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). *Food Chem Toxicol* 2009 Jun; 47 (6): 1209-20.
180. Van Sumere CF. Phenols and phenolic acids In: Van Sumere CF, editor. *Methods in plant Biochemistry*. London: Academic Press; 1989. p. 29-73.
181. Waterman PG, Mole S. Analysis of phenolic plant metabolites. *Methods in ecology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1994.
182. He XG. Online identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid-chromatographic - diode-array detection - mass-spectrometric techniques. *J Chromatogr A* 2000 Jun; 880 (1-2): 203-32.
183. Harborne JB. General procedures and measurement of total phenolics. *Methods in plant biochemistry*. In: Harborne JB, editor. *Plant Phenolics*. London: Academic Press; 1989. p. 1-28.
184. Macheix JJ, Fleuriet A. Hydroxycinnamic derivatives in fruits. *Bull Liaison-Groupe Polyphenols* 1986; 13: 337-51.
185. Markham KR. *Techniques of flavonoid identification*. 1st ed. London: Academic Press; 1982.
186. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. *The systematic identification of flavonoids*. 1st ed. Heidelberg: Springer-Verlag; 1970.
187. Markham KR. Flavones, flavonols and their glycosides. In: Dey PM, Harborne JB, editors. *Methods in Plant Biochemistry* 1989. p. 197-235.
188. Nielsen JK, Norbaek R, Olsen CE. Kaempferol tetraglucosides from cabbage leaves. *Phytochemistry* 1998 Dec; 49 (7): 2171-6.

189. Hagel J, Facchini P. Plant metabolomics: analytical platforms and integration with functional genomics. *Phytochem Rev* 2008 Oct; 7 (3): 479-97.
190. Krishnan P, Kruger NJ, Ratcliffe RG. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *J Exp Bot* 2005 Jan; 56 (410): 255-65.
191. Dunn WB. Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. 2008 Mar; 5 (1): 11001.
192. Ferreres F, Llorach R, Izquierdo AG. Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2004 Feb; 39 (3): 312-21.
193. Ferreres F, Taveira M, Pereira DM, Valentão P, Andrade PB. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds: new flavonols and cytotoxic effect. *J Agric Food Chem* 2010 Feb; 58 (5): 2854-61.
194. Hughes RJ, Croley TR, Metcalfe CD, March RE. A tandem mass spectrometric study of selected characteristic flavonoids. *Int J Mass spectrom* 2001 Sep; 210-211: 371-85.
195. Lee JS, Kim DH, Liu K-H, Oh TK, Lee CH. Identification of flavonoids using liquid chromatography with electrospray ionization and ion trap tandem mass spectrometry with an MS/MS library. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005 Dec; 19 (23): 3539-48.
196. Hostettmann K, Hostettmann M. Xanthones. In: Harborne JB, editor. *Plant phenolics*. London: Academic Press; 1989. p. 493-508.
197. Prosen H, Zupančič-Kralj L. Solid-phase microextraction. *TrAC Trends Anal Chem* 1999 Apr; 18 (4): 272-82.
198. Pawliszyn J. *Solid phase microextraction: theory and practice*. New York: Wiley-VCH; 1997.
199. Ulrich S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *J Chromatogr A* 2000 Nov; 902 (1): 167-94.
200. Kataoka H, Lord HL, Pawliszyn J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J Chromatogr A* 2000 Jun; 880 (1-2): 35-62.
201. Maria dFA. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *J Chromatogr A* 2000 Aug; 889 (1-2): 3-14.
202. Fraser AM, Mechaber WL, Hildebrand JG. Electroantennographic and behavioral responses of the sphinx moth *Manduca sexta* to host plant headspace volatiles. *J Chem Ecol* 2003 Aug; 29 (8): 1813-33.

203. Bulen WA, Varner JE, Burrell RC. Separation of organic acids from plant tissues. *Anal Chem* 1952 Jan; 24 (1): 187-90.
204. Visioli F, Poli A, Gall C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev* 2002 Nov; 22 (1): 65-75.
205. Abdalla AE, Roozen JP. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. *Food Chem* 1999 Feb; 64 (3): 323-9.
206. Eastwood MA. Interaction of dietary antioxidants in vivo: how fruit and vegetables prevent disease? *QJM* 1999 Sep; 92 (9): 527-30.
207. Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol* 1995 May; 49 (10): 1341-8.
208. Halliwell B, Aeschbach R, Löliger J, Aruoma OI. The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol* 1995 Jun; 33 (7): 601-17.
209. Crystal RG. Biology of free radicals - Introduction. *American Journal of Medicine* 1991 Sep; 91 (suppl 3C): 1S.
210. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991 Sep; 91 (3C): 14S-22S.
211. Bast A, Haenen GRMM, Doelman CJA. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med* 1991 Sep; 91 (3, Supplement 3): S2-S13.
212. Chen X, Liang H, Van Remmen H, Vijg J, Richardson A. Catalase transgenic mice: characterization and sensitivity to oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 2004 Feb; 422 (2): 197-210.
213. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004 Feb; 44 (1): 239-67.
214. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991 Sep; 91 (3): S31-S8.
215. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993 Mar; 215 (2): 213-9.
216. Embola CW, Sohn OS, Fiala ES, Weisburger JH. Induction of UDP-glucuronosyltransferase 1 (UDP-GT1) gene complex by green tea in male F344 rats. *Food Chem Toxicol* 2002 Jun; 40 (6): 841-4.
217. van Dam RM, Rimm EB, Willett WC, Stampfer MJ, Hu FB. Dietary patterns and risk for type 2 diabetes Mellitus in U.S. men. *Ann Intern Med* 2002 Feb; 136 (3): 201-9.
218. Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem* 2000 Jul; 48 (8): 3396-402.

219. Hink HU, Fukai T. Extracellular superoxide dismutase, uric acid, and atherosclerosis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2002; 67 (5): 483-90.
220. den Hartog GJM, Haenen G, Vegt E, van der Vijgh WJF, Bast A. Efficacy of HOCl scavenging by sulfur-containing compounds: antioxidant activity of glutathione disulfide? *Biol Chem* 2002 Mar; 383 (3-4): 709-13.
221. Liu RH, Finley J. Potential cell culture models for antioxidant research. *J Agric Food Chem* 2005 Apr; 53 (10): 4311-4.
222. Piao MJ, Kang KA, Zhang R, Ko DO, Wang ZH, You HJ, et al. Hyperoside prevents oxidative damage induced by hydrogen peroxide in lung fibroblast cells via an antioxidant effect. *Biochim Biophys Acta* 2008 Dec; 1780 (12): 1448-57.
223. Chen T-J, Jeng J-Y, Lin C-W, Wu C-Y, Chen Y-C. Quercetin inhibition of ROS-dependent and -independent apoptosis in rat glioma C6 cells. *Toxicology* 2006 Jun; 223 (1-2): 113-26.
224. Nakayama T, Niimi T, Osawa T, Kawakishi S. The protective role of polyphenols in cytotoxicity of hydrogen peroxide. *Mutat Res* 1992 Feb; 281 (2): 77-80.
225. Nakayama T, Hori K, Osawa T, Kawakishi S. Suppression of hydrogen peroxide-induced mammalian cytotoxicity by nordihydro-guaiaretic acid. *Biosci Biotechnol Biochem* 1992; 56 (7): 1162-3.
226. Nakayama T. Suppression of hydroperoxide-induced cytotoxicity by polyphenols. *Cancer Res* 1994 Apr; 54 (7 Supplement): 1991s-3s.
227. Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol* 2006 Nov; 72 (11): 1439-52.
228. Fraga CG. Plant polyphenols: how to translate their *in vitro* antioxidant actions to *in vivo* conditions. *IUBMB Life* 2007 Jan; 59 (4-5): 308-15.
229. Sousa C, Pontes H, Carmo H, Dinis-Oliveira RJ, Valentão P, Andrade PB, et al. Water extracts of *Brassica oleracea* var. *costata* potentiate paraquat toxicity to rat hepatocytes *in vitro*. *Toxicol In Vitro* 2009 Sep; 23 (6): 1131-8.
230. Neşe Çokuğraş A. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turk J Biochem* 2003 Oct; 28 (2): 54-61.
231. Katzman R, Saitoh T. Advances in Alzheimer's disease. *FASEB J* 1991 Mar; 5 (3): 278-86.
232. Becker RE, Giacobini E. Cholinergic basis for Alzheimer therapy. Boston: Birkhäuser; 1991.
233. Krasowski M, McGehee D, Moss J. Natural inhibitors of cholinesterases: implications for adverse drug reactions. *Can J Anaesth* 1997 May; 44 (5): 525-34.
234. Inestrosa NC, Alvarez A, Pérez CA, Moreno RD, Vicente M, Linker C, et al. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid- β -peptides into Alzheimer's

- fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron* 1996 Apr; 16 (4): 881-91.
235. de Ferrari GV, Canales MA, Shin I, Weiner LM, Silman I, Inestrosa NC. A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid β -peptide fibril formation. *Biochemistry* 2001 Aug; 40 (35): 10447-57.
 236. Bartolini M, Bertucci C, Cavrini V, Andrisano V. β -Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochem Pharmacol* 2003 Feb; 65 (3): 407-16.
 237. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 1995 Feb; 339 (1): 37-59.
 238. Ames B. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* 1979 May; 204 (4393): 587-93.
 239. Ferguson LR, Philpott M. Nutrition and mutagenesis. *Annu Rev Nutr* 2008 Apr; 28 (1): 313-29.
 240. Cartea M, Velasco P. Glucosinolates in *Brassica* foods: bioavailability in food and significance for human health. *Phytochem Rev* 2008 Jul; 7 (2): 213-29.
 241. Pichersky E, Noel JP, Dudareva N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science* 2006 Feb; 311 (5762): 808-11.
 242. Kocsis A, Molnar H. Genotoxicity: Evaluation, Testing and Prediction. 1st ed. New York: Nova Science Pub Inc; 2009.
 243. Scott JG, Wen Z. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Management Science* 2001 Oct; 57 (10): 958-67.
 244. Ferreres F, Fernandes F, Sousa C, Valentão P, Pereira JA, Andrade PB. Metabolic and bioactivity insights into *Brassica oleracea* var. *acephala*. *J Agric Food Chem* 2009 Sep; 57 (19): 8884-92.
 245. Ortiz de Montellano PR. Biotransformations of drugs and chemicals. In: Meyers RA, editor. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2006. p. 192-202.
 246. Llorach R, Izquierdo AG, Ferreres F, Barberán FAT. Characterization of unusual highly glycosylated acylated flavonoids from Cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) agroindustrial byproducts. *J Agric Food Chem* 2003 May; 51 (13): 3895-9.
 247. Ferreres F, Sousa C, Pereira DM, Valentao P, Taveira M, Martins A, et al. Screening of antioxidant phenolic compounds produced by *in vitro* shoots of *Brassica oleracea* L. var. *costata* DC. *Comb Chem High Throughput Screen* 2009 Mar; 12 (3): 230-40.

248. Fernandes F, Sousa C, Ferreres F, Valentão P, Remião F, Pereira JA, et al. Does kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) really protects against oxidative stress? Submetido para publicação.
249. Price KR, Casuscelli F, Colquhoun IJ, Rhodes MJC. Composition and content of flavonol glycosides in broccoli florets (*Brassica oleracea*) and their fate during cooking. *J Sci Food Agric* 1998 Mar; 77 (4): 468-72.
250. Sousa C, Pereira DM, Pereira JA, Bento A, Rodrigues MA, Dopico-García S, et al. Multivariate analysis of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) phenolics: influence of fertilizers. *J Agric Food Chem* 2008 Feb; 56 (6): 2231-9.
251. Fernandes F, Pereira DM, Guedes de Pinho P, Valentão P, Pereira JA, Bento A, et al. Headspace solid-phase microextraction and gas chromatography/ion trap-mass spectrometry applied to a living system: *Pieris brassicae* fed with kale. *Food Chem* 2010 Apr; 119 (4): 1681-93.
252. Jarmo K H. Multiple functions of inducible plant volatiles. *Trends Plant Sci* 2004 Oct; 9 (11): 529-33.
253. Fernandes F, Pereira DM, de Pinho PG, Valentão P, Pereira JA, Bento A, et al. Metabolic fate of dietary volatile compounds in *Pieris brassicae*. *Microchem J* 2009 Sep; 93 (1): 99-109.
254. Wang S, Ghisalberti EL, Ridsdill-Smith J. Volatiles from *Trifolium* as feeding deterrents of redlegged earth mites. *Phytochemistry* 1999 Oct; 52 (4): 601-5.
255. Agrawal AA, Kurashige NS. A role for isothiocyanates in plant resistance against the specialist herbivore *Pieris rapae*. *J Chem Ecol* 2003 Jun; 29 (6): 1403-15.
256. Kiefer C, Hessel S, Lampert JM, Vogt K, Lederer MO, Breithaupt DE, et al. Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J Biol Chem* 2001 Apr; 276 (17): 14110-6.
257. Clements AN. A study of soluble esterases in *Pieris brassicae* (Lepidoptera). *J Insect Physiol* 1967 Jul; 13 (7): 1021-30.
258. Sousa C, Fernandes F, Rodrigues S, Coelho M, Ferreres F, Teixeira JP, et al. *Brassica oleracea* var. *costata* and *Pieris brassicae* aqueous extracts reduce methyl methane sulfonate-induced DNA damage in V79 hamster lung fibroblasts. Submetido para publicação.
259. Fernandes F, Guedes de Pinho P, Valentão P, Pereira JA, Andrade PB. Volatile constituents throughout *Brassica oleracea* L. var. *acephala* germination. *J Agric Food Chem* 2009 Jul; 57 (15): 6795-802.
260. Westoby M. A leaf-height-seed (LHS) plant ecology strategy scheme. *Plant and Soil* 1998 Feb; 199 (2): 213-27.

261. Hurth MA, Suh SJ, Kretschmar T, Geis T, Bregante M, Gambale F, et al. Impaired pH homeostasis in *Arabidopsis* lacking the vacuolar dicarboxylate transporter and analysis of carboxylic acid transport across the tonoplast. *Plant Physiol* 2005 Mar; 137 (3): 901-10.
262. Scheibe R. Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiol Plant* 2004 Jan; 120 (1): 21-6.
263. López-Millán AF, Morales F, Abadía A, Abadía J. Changes induced by Fe deficiency and Fe resupply in the organic acid metabolism of sugar beet (*Beta vulgaris*) leaves. *Physiol Plant* 2001 May; 112 (1): 31-8.
264. Schnarrenberger C, Martin W. Evolution of the enzymes of the citric acid cycle and the glyoxylate cycle of higher plants. *Eur J Biochem* 2002 Feb; 269 (3): 868-83.
265. Voll E, Voll CE, Filho RV. Allelopathic effects of aconitic acid on wild Poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) and Morningglory (*Ipomoea grandifolia*). *J Environm Sci* 2005 Jan; B40 (1): 69-75.
266. Chia DW, Yoder TJ, Reiter W-D, Gibson SI. Fumaric acid: an overlooked form of fixed carbon in *Arabidopsis* and other plant species. *Planta* 2000 Oct; 211 (5): 743-51.
267. Kidd PS, Llugany M, Poschenrieder C, Gunsé B, Barceló J. The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *J Exp Bot* 2001 Jun; 52 (359): 1339-52.
268. Webb MA. Cell-mediated crystallization of calcium oxalate in plants. *Plant Cell* 1999 Apr; 11 (4): 751-61.
269. Franceschi VR, Nakata PA. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annu Rev Plant Biol* 2005 Jun; 56 (1): 41-71.
270. Heaney R, Weaver C. Calcium absorption from kale. *Am J Clin Nutr* 1990 Apr; 51 (4): 656-7.
271. Zhao G, Nyman M, Åke Jönsson J. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. *Biomed Chromatogr* 2006 Aug; 20 (8): 674-82.
272. Garcia A, Olmo B, Lopez-Gonzalvez A, Cornejo L, Rupérez FJ, Barbas C. Capillary electrophoresis for short chain organic acids in faeces: Reference values in a Mediterranean elderly population. *J Pharm Biomed Anal* 2008 Jan; 46 (2): 356-61.
273. Philip M. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 2004; 26 (2): 211-9.

274. Burda S, Oleszek W. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *J Agric Food Chem* 2001 May; 49 (6): 2774-9.
275. Hopia A, Heinonen M. Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 1999 Jan; 76 (1): 139-44.
276. Sattler SE, Gilliland LU, Magallanes-Lundback M, Pollard M, DellaPenna D. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell* 2004 Jun; 16 (6): 1419-32.
277. Qin CX, Chen X, Hughes RA, Williams SJ, Woodman OL. Understanding the cardioprotective effects of flavonols: discovery of relaxant flavonols without antioxidant activity. *J Med Chem* 2008 Feb; 51 (6): 1874-84.
278. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 1971 Nov; 44 (1): 276-87.
279. Lamattina L, García-Mata C, Graziano M, Pagnussat G. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol* 2003 Jun; 54 (1): 109-36.
280. Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001 Apr; 41 (1): 203-36.
281. Ducrocq C, Blanchard B. Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent. *Cell Mol Life Sci* 1999 Jul; 55 (8): 1068-77.
282. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 Feb; 87 (4): 1620-4.
283. Hazra B, Biswas S, Mandal N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2008 Dec; 8 (1): 63.
284. Chai PC, Long LH, Halliwell B. Contribution of hydrogen peroxide to the cytotoxicity of green tea and red wines. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 May; 304 (4): 650-4.
285. Halliwell B. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Lett* 2003 Apr; 540 (1-3): 3-6.
286. Twentyman PR, Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br J Cancer* 1987 Sep; 56 (3): 279-85.
287. Doug L. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? *Journal of Neuroscience Methods* 2000 Mar; 96 (2): 147-52.

288. Liebler DC, Reed DJ. Free-radical defense and repair mechanisms. In: Wallace KB, editor. Free radical toxicology. Washington: Taylor & Francis; 1997.
289. Sciuto AM. Antioxidant properties of glutathione and its role in tissue protection. In: Baskin SI, Salem H, editors. Oxidants, antioxidants and free radicals. Washington DC: Taylor & Francis; 1997. p. 171-91.
290. Somani SM, Husain K, Schlorff EC. Response of antioxidant system to physical and chemical stress. In: Baskin SI, Salem H, editors. Oxidants, antioxidants and free radicals. Washington DC: Taylor & Francis; 1997. p. 125–41.
291. Kagan VE, Tyurina YY. Recycling and redox cycling of phenolic antioxidants. Ann NY Acad Sci 1998; 854 (1): 425-34.
292. Yokomizo A, Moriwaki M. Effects of uptake of flavonoids on oxidative stress induced by hydrogen peroxide in human intestinal Caco-2 cells. Biosci, Biotechnol Biochem 2006; 70 (6): 1317-24.
293. Bellion P, Olk M, Will F, Dietrich H, Baum M, Eisenbrand G, et al. Formation of hydrogen peroxide in cell culture media by apple polyphenols and its effect on antioxidant biomarkers in the colon cell line HT-29. Mol Nutr Food Res 2009 Oct; 53 (10): 1226-36.
294. Sterner O. Chemistry, Health and Environment. 2nd ed. Lund: John Wiley & Sons; 2010.
295. Dhawan A, Anderson D. The Comet Assay in Toxicology. 1st ed. Lucknow: Royal Society of Chemistry; 2009.
296. Slameňová D, Horváthová E, Wsóllová L, Šramková M, Navarová J. Investigation of anti-oxidative, cytotoxic, DNA-damaging and DNA-protective effects of plant volatiles eugenol and borneol in human-derived HepG2, Caco-2 and VH10 cell lines. Mutat Res Jun-Jul; 677 (1-2): 46-52.
297. Maralhas A, Monteiro A, Martins C, Kranendonk M, Laires A, Rueff J, et al. Genotoxicity and endoreduplication inducing activity of the food flavouring eugenol. Mutagenesis 2006 May; 21 (3): 199-204.
298. Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. Phytomedicine 2007; 14 (4): 289-300.
299. Ellman GL, Courtney KD, Andres jr V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 1961 Jul; 7 (2): 88-95.
300. Pereira DM, Ferreres F, Oliveira J, Valentão P, Andrade PB, Sottomayor M. Targeted metabolite analysis of *Catharanthus roseus* and its biological potential. Food Chem Toxicol 2009 Jun; 47 (6): 1349-54.

301. Orhan I, Aslan M. Appraisal of scopolamine-induced anti-amnesic effect in mice and in vitro antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of some traditionally used Lamiaceae plants. *J Ethnopharmacol* 2009 Mar; 122 (2): 327-32.
302. He L, Li HT, Guo SW, Liu LF, Qiu JB, Li F, et al. Inhibitory effects of sinapine on activity of acetylcholinesterase in cerebral homogenate and blood serum of rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2008; 33 (7): 813-5.
303. Lee BH, Stelly TC, Colucci WJ, Garcia JG, Gandour RD, Quinn DM. Inhibition of acetylcholinesterase by hemicholiniums, conformationally constrained choline analogs. Evaluation of aryl and alkyl substituents. Comparisons with choline and (3-hydroxyphenyl)trimethylammonium. *Chem Res Toxicol* 1992 May; 5 (3): 411-8.
304. Hasan FB, Elkind JL, Cohen SG, Cohen JB. Cationic and uncharged substrates and reversible inhibitors in hydrolysis by acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7). The trimethyl subsite. *J Biol Chem* 1981 Aug; 256 (15): 7781-5.
305. Khan MTH, Orhan I, Şenol FS, Kartal M, Şener B, Dvorská M, et al. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chem Biol Interact* 2009 Oct; 181 (3): 383-9.
306. Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 2000 Nov; 55 (6): 481-504.

