

PERFIL CROMATOGRÁFICO E ESPECTROFOTOMÉTRICO DE DIFERENTES ESTÁGIOS FENOLÓGICOS DA *Brassica oleracea* var. *capitata*

CHROMATOGRAPHIC AND SPECTROPHOTOMETRIC PROFILES OF DIFFERENT PHENOLOGIC STAGES
OF *Brassica oleracea* var. *capitata*

Tancredo G. de Oliveira^{1,2}, Camilo A. de Carvalho^{1,2}, Gema G. Dal’Piva^{3,4}, Leandro M. de Carvalho^{3,4},
Marcelo B. da Rosa^{5,6*}

¹ Universidade Vale do Rio Doce - UNIVALE, 35020-220, Governador Valadares, MG, Brasil;

² Acadêmico do Curso de Farmácia;

³ Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, 97119-970, Santa Maria, RS, Brasil;

⁴ Professor(a) de Química Analítica;

⁵ Centro Regional Sul de Pesquisas Espaciais, CRS/INPE, 97119-970, Santa Maria, RS, Brasil;

⁶ Laboratório de Exobiologia e Biosfera

*Autor para correspondência: mbdarosa@lasesm.ufsm.br

Recebido em 20/08/2007 - Aceito em 22/10/2007

RESUMO: A produção de fitoterápicos exige, a priori, um controle de qualidade que possa garantir uma constante concentração/presença das substâncias ativas da planta no produto comercial. Neste estudo, a variação dos constituintes globais polares das folhas de *Brassica oleracea* var. *capitata* foi acompanhada com base no perfil cromatográfico da planta para diferentes estágios fenológicos (desenvolvimento da planta), onde foram comparados os decaimentos de oito picos/compostos majoritários a partir de tempos de retenção distintos. Além disso, um estudo espectrofotométrico analisando os perfis espectrais para comprimentos de onda e solventes (etanol, água e diclorometano) específicos foi realizado. Cromatograficamente obteve-se um valor médio de redução da concentração dos constituintes globais polares da *Brassica* de $70,8 \pm 6,6\%$ ao longo da maturação da planta. Espectrofotometricamente este valor foi de $71,7 \pm 14,2\%$, sendo considerados estes valores estatisticamente iguais. Portanto, ressalta-se que este estudo colabora, tanto para o controle da qualidade da matéria-prima (concentração de substâncias na planta na forma de seu extrato bruto), quanto para o processo de fabricação de fitofármacos.

PALAVRAS-CHAVE: *Brassica oleracea* var. *capitata*, perfil cromatográfico e espectrofotométrico, estágios fenológicos.

ABSTRACT: The production of phytomedicine demand a quality control or a real guarantee that a constant concentration of active substances are presents in the commercial products. In this study, the variation of the polar global constituents of *Brassica oleracea* var. *capitata* leafs was obtained by chromatographic (HPLC) and spectrophotometric (UV-VIS) profiles at different phenologic stages. The decays of eight majority compounds were chromatographically compared at peaks with specific retention times. Besides, a spectrophotometric study analyzing the spectral profiles at specific wavelengths and different solvents was performed. The HPLC analysis presented a reduction about $70.8 \pm 6.6\%$ for the global *Brassica* sp. constituents along of the plant maturation. Spectrophotometrically these values were about $71.7 \pm 14.2\%$, which are considered statistically the same. Therefore, this study collaborates in terms of the quality control of phytomedicines, as well in terms of the prediction of nature concentrations of substances in the plants, as well for the commercial fabrication of phytomedicines.

KEY-WORDS: *Brassica oleracea* var *capitata*, chromatographic and spectrophotometric profiles, phenologic stages.

INTRODUÇÃO

A *Brassica oleracea* var. *capitata* (repolho) é uma hortaliça anual herbácea da família Brassicaceae e tem como região de origem a Costa Norte Mediterrânea, Ásia Menor e Costa Ocidental Européia. Na América, o repolho foi trazido pelos conquistadores europeus por volta do século XV (MONSALVE & CANO, 2003; FRACARO et al., 1999). A família *Brassicaceae* compreende aproximadamente 350 gêneros e 3000 espécies, distribuídas em todo o mundo, mas principalmente em regiões de clima temperado (MONSALVE & CANO, 2003). Constitui a família botânica que abrange o maior número de culturas oleráceas, ocupando lugar proeminente na olericultura do centro-sul do Brasil (FILGUEIRA, 2000).

Plantas da família *Brassicaceae* tais como mostarda, canola, brocolis e outras produzem substâncias chamadas glucosinolatos, que através de ação enzimática se transformam em isotiocianatos (ITC), sendo estas substâncias muito eficientes como biocidas naturais.

De acordo com BALBACH & BOARIM (1993), a *Brassica oleracea* var. *capitata* é uma espécie de couve com folhas enoveladas, parecendo um globo, que por sua vez encerra excelentes propriedades medicinais e nutritivas. Entre as variedades botânicas da espécie *Brassica oleracea*, a de maior importância econômica é o repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*). O mesmo se destaca pelo seu elevado teor de ácido ascórbico (vitamina C) e baixo conteúdo de açúcares, podendo ser consumido por pessoas diabéticas (200g/dia), além de ser um alimento de fácil digestão e bastante versátil a mesa (LÉDO et al., 1996).

Conforme FILGUEIRA (2000), essa espécie apresenta caule curto, direto, sem ramificações e folhas arredondadas e cerosas, havendo superposição das folhas centrais, formando uma “cabeça” compacta. Foi desenvolvido, originalmente, para as condições européias, fazendo com que temperaturas mais elevadas ocasionem a formação de cabeças pouco compactadas, ou total ausência de cabeça.

A condição climática apresenta grande influência na produção e qualidade do repolho. Temperaturas elevadas associadas à alta precipitação pluviométrica retardam o crescimento e a boa formação da cabeça, contribuindo para maior incidência de doenças, principalmente a podridão negra - *Xanthomas campestris* (LÉDO et al., 1996).

Constituintes como os glucosinolatos, compostos polares facilmente extraídos pela água, possuem propriedade de promover a agregação plaquetária, que é fundamental num processo de cicatrização (SIMÕES et al., 2004). Quando coágulos de sangue se formam, em uma ferida, por exemplo, as plaquetas do sangue são incorporadas ao coágulo e acionadas para liberar o fator de crescimento derivado das plaquetas. Este então se liga ao receptor da enzima tirosinoquinase das células sobreviventes no local da ferida, estimulando-as a proliferação e conseqüentemente cicatrização da mesma (ALBERTS et al., 2006). Outras moléculas que podem estar correlacionadas à ação cicatrizante da *Brassica* sp. são os taninos (polifenólicos) e flavonóides. Os ácidos fenólicos e flavonóides pertencem a uma classe de metabólitos secundários, largamente distribuídos em plantas (HAVSTEEN, 2002; GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Estes possuem pelo menos um anel aromático com um ou mais grupamentos hidroxila, juntamente com outros substituintes (SILVA & SILVA, 1999). Os polifenóis de leguminosas e cereais são predominantemente taninos de origem flavonóide (BARBOSA-FILHO, 1985). Os flavonóides conferem uma ação antioxidante com potencial terapêutico (JANG et al., 1995). Estudos “in vitro” têm mostrado que a quercetina e outros flavonóides inibem fortemente, tanto a produção de óxido nítrico, como a necrose tumoral provocadas pelas células de Kupffer quando estimuladas por injúria (KAWADA et al., 1998). Portanto, esta pode ser uma possível via de atuação da *Brassica* sp. nos processos de cicatrização, através de um possível sinergismo entre glucosinolatos e polifenóis.

Conforme BALBACH & BOARIM (1993), esta espécie contém 25,00 kcal em 100 gramas de folhas, 93% de água, 4,3% de carboidratos, 1,4% de proteínas, 0,2% de lipídios e 1,1% de sais. Além destes constituintes encontra-se para cada 100 g, 35 mg de cálcio, 14 mg de fósforo, 0,2 mg de ferro, 4 mg de sódio e 150 mg de potássio.

A avaliação bromatológica do extrato aquoso de *Brassica* apresenta: matéria seca (0,51%), cinza (0,12%), nitrogênio (0,0116%), fósforo (0,0041%), potássio (0,0488%), cálcio (0,0111%), manganês (0,0049%), ferro (2,7 mg/L), zinco (0,43 mg/L), cobre (0,24 mg/L), magnésio (0,97 mg/L). Além disso, ainda contém vitamina A (225 UI/100 g), tiamina (110 µg%), riboflavina (60 µg%), niacina (0,4 mg%) e ácido ascórbico (41,3 mg%) (PAULA Jr. & VENSON, 2007).

Uso Medicinal

Os romanos já empregavam a *Brassica* sp. interna e externamente como abstergente (produto utilizado para limpar ferimentos) e na forma de cataplasmas (papa medicamentosa que se aplica, entre dois panos, a uma parte do corpo inflamada) no tratamento das feridas (BALBACH & BOARIM, 1993). Relatos informam ainda o uso da *Brassica* sp. a mais de um milênio em processos de cicatrização de abscessos, cefalgias idiopáticas (dores de cabeça de causas desconhecidas), independentes de febre ou distúrbios intestinais, dores reumáticas e reumatóides, tumores, prevenção de tuberculose, auxílio em casos de afonia, desnutrição, anemia, enfermidades do estômago, úlceras internas, hemorróidas, alcoolismo, gota e reumatismo.

No tratamento de feridas, tem-se intensificado a pesquisa de produtos naturais para auxiliar a cicatrização. A cicatrização de feridas é um processo fisiológico que se inicia com a resposta inflamatória caracterizada pelo aumento de fluxo sanguíneo, permeabilidade capilar e migração de leucócitos para a região lesada. A permeabilidade capilar promove extravasamento de plasma e seus componentes formando o exsudato inflamatório. Inicialmente, uma ferida é preenchida por coágulos, fibrinas e exsudato formando uma crosta que a isola do meio ambiente quase que imediatamente. Os neutrófilos e macrófagos são as primeiras células a migrarem para a região lesada em resposta do organismo à invasão bacteriana e, ao fagocitarem, as bactérias se degeneram formando o pus com os tecidos necróticos (EURIDES et al., 1996; BALBINO et al., 2005).

Segundo SILVA et al. (2006), a *Brassica sp.* é um exemplo de planta medicinal utilizada em forma de pomada para cicatrização de feridas e ultimamente manipulada por uma farmácia em Governador Valadares, tendo seu uso recomendado no tratamento de alguns ferimentos como em abscessos, feridas infectantes, cirúrgicas e em diabéticos. Os autores fazem referência ao uso e comercialização na forma magistral para o tratamento de diversas feridas da pele (23%), tratamento de ferimentos cirúrgicos (15%) e ferimentos em pessoas portadoras de diabetes (19%).

Fenologia

Cada área geográfica possui uma história peculiar, propiciando condições ao favorecimento da distribuição de espécies e gêneros, sendo estes compartimentados em esquemas de classificação de tipos de vegetação que podem ter divisões mutuamente exclusivas. Existem vários tipos de vegetação, sendo descritos com base na estrutura – fisionômica ou florística. Outros são descritos em função das características biofísicas do ambiente, como também baseados na classificação do solo/tipo florestal (VERONA, 2002).

WALTER (1986) verificou que o clima é o fator preponderante que interfere na formação e constituição da vegetação e do solo. Assim, sua proposta de classificação se baseia neste elemento (clima) e a Terra é então subdividida em zonas climáticas, os *zonobiomas*. De acordo com NELSON (1994), o conceito “tipo de vegetação” pode ser caracterizado a partir de vários atributos. Um deles diz respeito à forma, ou à fisionomia da vegetação.

A fenologia pode ser definida como o estudo dos eventos biológicos repetitivos, sendo no reino vegetal representados, em maior grau de importância, pela floração e frutificação das angiospermas, que representam os principais mecanismos de perpetuação da espécie e pode ser explicada por fatores genéticos e/ou por fatores externos, como variações climáticas (seca, chuva, diminuição da umidade relativa), tipo do solo, entre outros (VERONA et al., 2005).

Alguns estudos discutem a importância da classificação fenológica da vegetação como guia a processos de mudanças climáticas, como descritores de elementos da paisagem, tanto local quanto regional, entre outros, como por exemplo, na melhoria da classificação de fisionomias vegetais (NELSON, 1994; SCHRIEVER & CONGALTON, 1995; WOLTER et al., 1995).

NELSON (1994) aponta para a importância que deve ser dada à identificação e à quantificação dos fenômenos claramente naturais, entre eles os de origem fenológica, principalmente, por apresentarem uma dinâmica natural e poderem, no entanto, ofuscar uma possível causa de um evento ocorrido em outros locais. Um exemplo seria o de distinguir a sazonalidade climática da deciduidade provocada pela redução de chuvas originada por fenômenos antrópicos, como o desmatamento.

Estudos relacionados à fenologia vegetal têm oferecido resultados auxiliares às pesquisas de cunho ecológico, pois têm direcionado importantes questões a respeito de modelagens globais, monitoramento e mudanças climáticas. O autor destaca a importância de estudos e realiza um levantamento de sua evolução apontando para as dificuldades em categorizá-los, dada sua natureza interdisciplinar (VERONA et al., 2005).

Nesse sentido, um sistema de classificação da terra e/ou tipo da cobertura florestal preciso constitui-se em informação importante para a realização de efetivos programas de manejo dos recursos naturais (SCHRIEVER & CONGALTON, 1995; WOLTER et al., 1995).

Portanto, uma relação entre o estágio de desenvolvimento da planta, estágio fenológico, e a presença, ou não, de diferentes concentrações de determinados constituintes químicos que derivam deste, são importantes quando se deseja mapear ou afirmar em que estágio fenológico se encontram na planta os constituintes majoritários que evidenciam suas aplicações fitoterápicas (ANDALORO et al., 1983).

O ciclo vegetativo da cultura do repolho é dividido em fases fenológicas, assumindo valores distintos, como pode ser visto na **Figura 1** e **Tabela 1**. Essas fases são conhecidas como período de crescimento, ou período vegetativo da cultura, formação da colheita (aumento do tamanho) e/ou maturação.

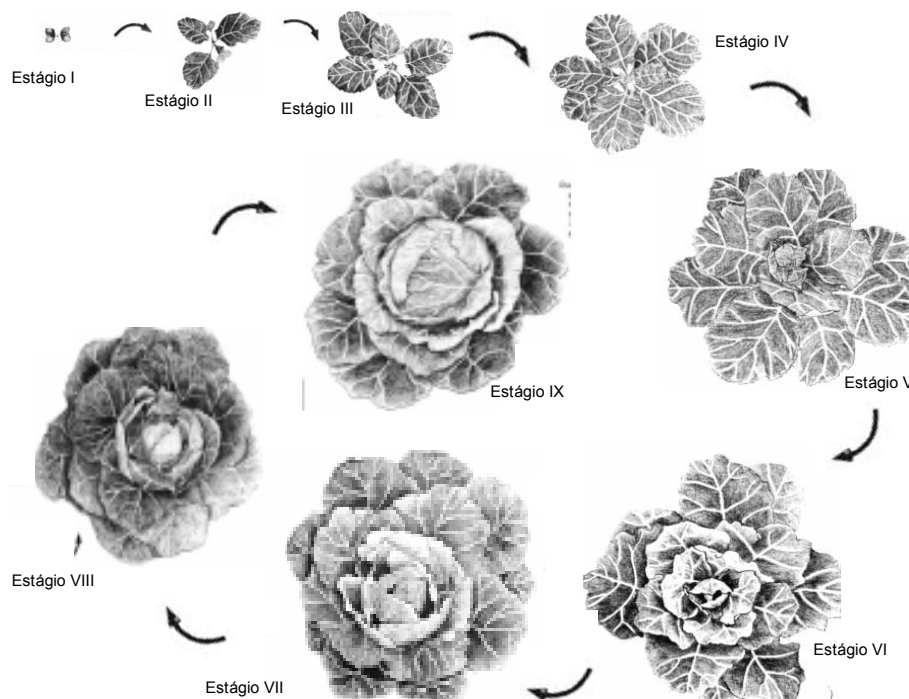


Figura 1. Representação esquemática do desenvolvimento fenológico da cultura da *Brassica sp.* (Fonte: Adaptado de Andaloro et. al., 1983).

Tabela 1. Descrição dos estágios fenológicos da *Brassica oleracea* variedade *capitata* (Adaptado de ANDALORO et al., 1983.).

Estágios	Características do desenvolvimento
I	Cotilédones (folhas de semente). Nenhuma folha verdadeira presente.
II	Até 5 folhas verdadeiras*.
III	6 a 8 folhas verdadeiras*.
IV	9 a 12 folhas verdadeiras. Base de talo ainda visível (vista superior).
V	Área foliar possui aproximadamente 13 a 19 folhas ao final desta fase. A base do talo e a bases de todas as folhas estão escondidas, quando a planta é vista de acima. As folhas do "coração" são visivelmente distintas das folhas circunvizinhas.
VI	Área foliar possui aproximadamente 20 a 26 folhas. O "coração" íntimo, parte que ainda está crescendo em uma moda vertical, é escondido pelas folhas maiores, mais velhas que os cercam.
VII	O formato da cabeça é de aproximadamente 8,2cm de diâmetro. O coração interno, em desenvolvimento é como a estrutura de uma bola de folhas escondida pelas folhas grandes circunvizinhas. Estas folhas não se apertam contra a cabeça em desenvolvimento e desdobram-se para se tornar folhas de armação posteriormente.
VIII	O formato da cabeça é de aproximadamente 14 cm de diâmetro. Uma cabeça firme é visível dentro das folhas de envoltura. A cabeça não tem conteúdo completamente desenvolvido e, assim, não é de tamanho ideal para a colheita.
IX	O formato da cabeça é de aproximadamente 23 cm de diâmetro. Não há produção de folhas novas depois que a cabeça atinge seu tamanho máximo. A cabeça está pronta para colheita.

* Folhas verdadeiras são as primeiras folhas geradas a partir dos cotilédones, na fase juvenil (Ferreira et al., 2001).

Neste estudo, a cromatografia líquida de alta eficiência e a espectrofotometria são propostas como ferramentas para o monitoramento de algumas classes de compostos globais hidrofílicos, que são constituintes das folhas da *Brassica sp.*, bem como na determinação do perfil de concentração global relativa vinculada a cada estágio do desenvolvimento vegetativo/fenológico da planta. Cabe ressaltar que a identificação dos constituintes ativos específicos/isolados não é focalizada neste estudo, pois a literatura já apresenta essas informações de forma bem detalhada e satisfatória (HAVSTEEN, 2002).

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparo das mudas

As mudas foram produzidas sob ambiente protegido, em bandejas de isopor de 128 células, preenchidas com substrato agrícola comercial recomendado para a cultura e três sementes (ISLA® - Coração de Boi - Lote 15787 – sem defensivos) por célula. O preparo dos vasos para o plantio ocorreu durante o mês de abril de 2006.

Para o transplante das mudas foram preparados três canteiros, dispondo-se em cada 32 mudas, sendo um para a colheita no estágio fenológico IV, o segundo para estágio fenológico V e o terceiro para o estágio fenológico VII (**Tabela 1**). O espaçamento entre linhas utilizado nos canteiros foram 30 x 30 x 50 cm (**Figura 2**). O preparo do solo consistiu de uma aração e abertura dos sulcos de plantio. As adubações com os demais nutrientes foram realizadas com base na análise química do solo e recomendações para a cultura no Estado de Minas Gerais (RIBEIRO et al., 1999). Contados 28 dias após a semeadura das sementes, as mudas já contendo de 4 a 5 folhas definitivas, correspondente ao estágio II (ANDALORO et al., 1983), foram transplantadas para o local definitivo. Todo o plantio foi realizado na área agrícola experimental do Curso de Agronomia da Universidade Vale do Rio Doce – Campus II, Governador Valadares.

Durante a condução do experimento, realizaram-se duas capinas manuais aos 18 e 31 dias após a transplantação para o canteiro definitivo. Aos 30 dias de crescimento no canteiro definitivo, foi realizada uma pulverização à base de extrato aquoso de folhas de Nim (*Azadiraca indica*), para controle da traça do repolho (*Plutella xylostella*). As irrigações foram realizadas diariamente por aspersão convencional.



Figura 2. Foto do canteiro com repolho no estágio fenológico IV e espaçamento 30 x 30 x 50 cm.



Figura 3. Estágios fenológicos de desenvolvimento da Brassica selecionados para este estudo, sendo (a) estágio IV, (b) estágio V e (c) estágio VII. Todas as coletas e registros fotográficos foram realizados às 08h00min.

Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico Merck: etanol, diclorometano e hexano. A água utilizada no preparo das soluções e limpeza das vidrarias foi de origem de filtro de osmose reversa (Permutation®). Metanol e acetonitrila foram de grau HPLC (Vetec®).

Foram preparados três extratos para cada estágio fenológico, iniciando-se no estágio IV, depois no estágio V e por último no estágio VII (**Figura 3**). Em cada canteiro foram colhidas dez plantas uniformes. As folhas coletadas foram lavadas em água corrente, secas em estufa a temperatura de 40°C e umidade relativa controlada. Após isso, foram moídas em moinho de facas (Marconi - Modelo 340).

Para cada estágio fenológico, uma massa de 10g da *Brassica sp.* seca e triturada foi adicionada a 100ml de solvente. Os solventes utilizados foram água, etanol e diclorometano para análise espectrofotométrica e hexano para análise cromatográfica. As suspensões foram submetidas a 60 minutos de ultrassonicação (Unique® - MaxiClean 1400), a temperatura ambiente (28°C). Todos os extratos foram filtrados a vácuo, sendo a torta eliminada.

Preliminarmente uma prospecção fitoquímica qualitativa do extrato aquoso, alcoólico e em diclorometano foi realizada com a finalidade de se avaliar a presença de classes de compostos majoritários nas folhas da *Brassica sp.* de acordo com seu estágio fenológico, conforme descrito em SIMÕES et al., 2004. A prospecção fitoquímica foi realizada em triplicata. Os testes se baseiam em reações cromáticas e de precipitação. Nesta prospecção avaliou-se a presença qualitativa de açúcares redutores, compostos fenólicos, taninos, flavonóides,

cumarinas, compostos antracênicos, heterosídeos cardiotônicos, saponinas, naftoquinonas, antraquinonas, triterpenos e esteróides.

Análise cromatográfica (HPLC-RP)

Para o estudo do perfil cromatográfico dos compostos moderadamente ou bastante polares para os diferentes estágios fenológicos da *Brassica sp.*, um cromatógrafo líquido Dionex com eluição isocrática de 60:40 (H₂O:CH₃CN), fluxo de 1ml/min, com injeção manual, coluna C-18 (à 25°C); 5µm; 120 Å; 4,6x150 mm, detecção UV em 254nm, controlado por software Chromeleon 6.7 foi utilizado. O hexano utilizado na extração foi posteriormente evaporado e o extrato seco redissolvido em CH₃OH para posterior injeção no cromatógrafo. O método utilizado foi adaptado de LEONI et al., 2003. Este método foi proposto originalmente para a determinação de glucosinolatos. Tendo em vista que os compostos majoritários da *Brassica sp.* são em sua maioria, ou moderadamente, ou bastante hidrofílicos, este enquadrou-se de forma eficiente para esta análise.

Análise espectrofotométrica (UV-VIS)

Foram retiradas alíquotas de 1mL de cada extrato à 10% e diluídas mil vezes para as análises espectrofotométricas. Os espectros foram medidos com espectrômetro Femto 800 XI, usando cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico com varredura de 200 a 700 nm, com intervalos de 2nm. As absorvâncias dos solventes etanol, água e diclorometano foram considerados como os brancos para os espectros obtidos para cada um dos extratos obtidos destes solventes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação da concentração global relativa dos constituintes fisiológicos em uma cultura específica depende de vários fatores que podem variar principalmente com a distribuição demográfica e sazonal da cultura (PILLAR et al., 1992). Essas variações podem ocorrer em função de pequenas mudanças climáticas: incidência luminosa, recursos hídricos, etc (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Em termos dos resultados da prospecção fitoquímica, estes mostraram qualitativamente a presença positiva de compostos fenólicos, flavonóides, triterpenos e esteróides para os extratos etanólicos nos estágios IV e V. Contudo, o estágio V revelou ainda a possível presença de taninos e heterosídeos cardiotônicos. Os extratos aquosos dos estágios IV e V revelaram positivamente a presença de açúcares redutores, compostos fenólicos, taninos, flavonóides, cumarinas, heterosídeos cardiotônicos, triterpenos e esteróides. Os extratos etanólicos e aquosos do estágio VII revelaram a presença de açúcares redutores, compostos fenólicos, flavonóides, taninos e heterosídeos cardiotônicos. Os extratos em diclorometano, para todos os estágios fenológicos, apresentaram resultados negativos para todas as classes analisadas, devido a sua hidrofobicidade.

A **Figura 4** mostra o perfil cromatográfico dos extratos de *Brassica sp.* para seus diferentes estágios fenológicos. Para efeito de cálculo e como cada pico representa um constituinte ou classe de constituintes com polaridade muito próxima. Adotou-se o decréscimo relativo de cada pico em relação ao estágio fenológico como sendo a redução da concentração global relativa dos constituintes fisiológicos da *Brassica*. Uma análise matemática destes decaimentos é apresentada na **Tabela 2**.

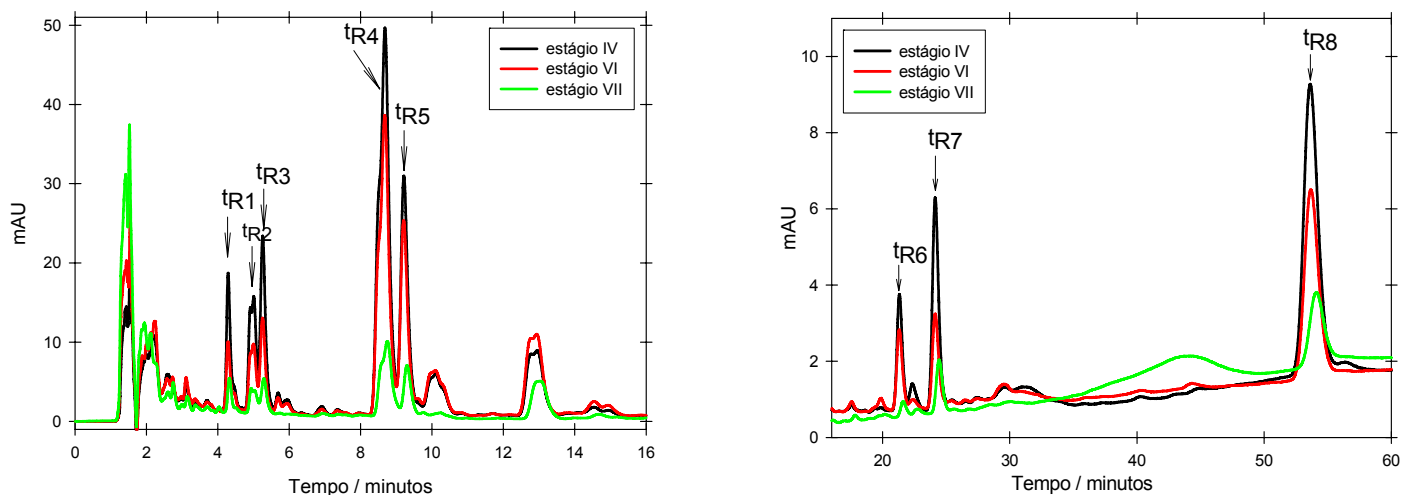


Figura 4. Perfil cromatográfico para os estágios fenológicos IV, V e VII da *Brassica sp.*, bem como os decaimentos dos picos majoritários dos extratos preparados sob a mesma concentração inicial (10%, massa seca pesada em 100g de eluente) .

Os espectros obtidos para diferentes solventes (água, etanol e diclorometano) e estágios fenológicos da *Brassica sp.*, assim como uma relação matemática envolvendo os decaimentos das concentrações dos constituintes globais entre cada estágio fenológico são apresentados na **Figura 5** e **Tabela 3**, respectivamente. Foi obtido o espectro para a semente (**Figura 5A**) para o extrato etanólico da semente a fim de verificar possível presença e concentração de substâncias com o mesmo perfil espectral apresentado pelo extrato obtido das folhas. No entanto a semente encontra-se na fase estacionária do ciclo vegetativo da planta. Dessa forma, apesar de conter todas as informações genéticas de sua espécie, a semente não pode ser classificada por estágios, pois não possui mudanças macroscópicas em função do tempo, exceto quando receber estímulos físicos e/ou químicos para ocorrência da germinação até o surgimento de um novo vegetal (ANDAROLO et al., 1983).

Os glucosinolatos apresentam caracteristicamente uma hidrofiliabilidade de moderada a forte, dependendo dos grupamentos que integram sua macro-estrutura (LEONI et al., 2003). Os polifenóis podem ser extraídos com solventes polares ou apolares de acordo com a hidrofiliabilidade ou hidrofobicidade dos grupamentos ligados aos anéis. Se a cadeia carbônica for extensa e os ligantes possuírem baixa polaridade certamente este composto não será extraído com sucesso utilizando-se solventes polares como água e etanol. Entretanto, a maioria dos polifenóis, presentes nos organismos vegetais, encontra-se sob a forma de glicogeninas, ou seja, genina ligada a um açúcar, geralmente glicose, que configuram uma hidrofiliabilidade de moderada a alta (HAVSTEEN, 2002).

Tabela 2. Resultados obtidos a partir da análise do perfil cromatográfico da *Brassica sp.* (Figura 4) para os estágios fenológicos, IV, V e VII.

Estágio ↓	t _{R1} = 4,28 min	t _{R2} = 4,91 min	t _{R3} = 5,00 min	t _{R4} = 8,68 min	t _{R5} = 9,21 min	T _{R6} = 21,32 min	t _{R7} = 24,13 min	t _{R8} = 53,62 min
Altura pico _{IV}	18,71	14,39	15,77	49,67	30,98	3,75	6,29	9,27
Altura pico _V	10,03	9,76	13,04	38,64	25,36	2,82	3,24	6,50
Altura pico _{VII}	5,44	4,15	5,40	10,11	7,06	0,94	2,03	3,80
% Redução IV → VII	71,0	71,2	65,7	79,6	77,2	74,9	67,7	59,0

Média de redução ± s.d = (70,8±6,6 %) – considerando todos os t_R (t_R = tempos de retenção obtidos da Figura 4)

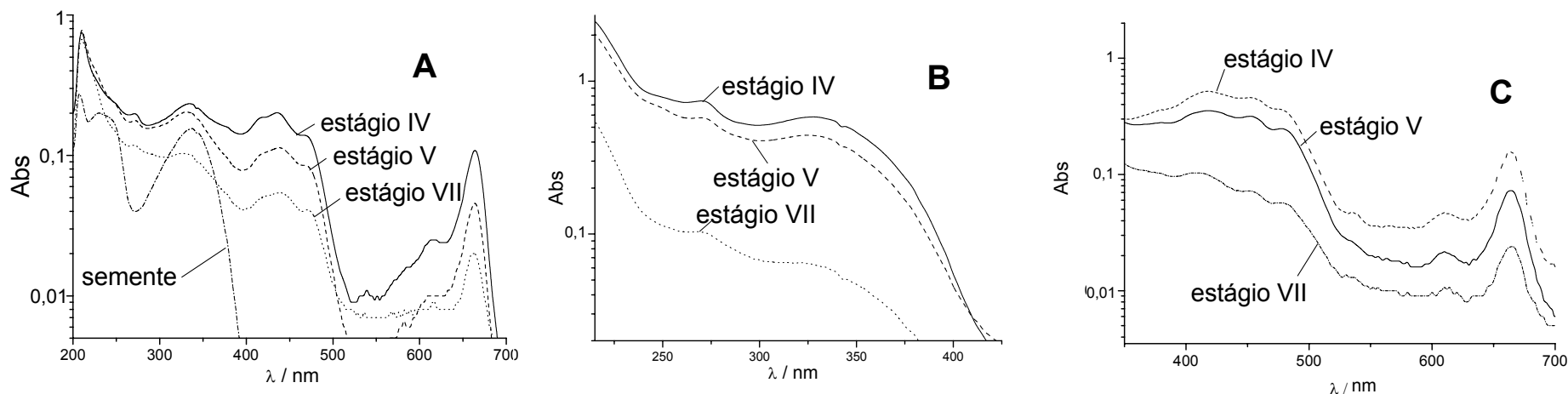


Figura 5. Espectros dos extratos etanólicos (A), aquosos (B) e em diclorometano (C) da *Brassica sp.* para os estágios fenológicos IV, V e VII.

Tabela 3. Resultados obtidos da análise espectrofotométrica (Figura 5) dos extratos com diferentes solventes (decaimentos das absorvâncias para λ específicos).

Solvente →	Etanol (A)			Água (B)			Diclorometano (C)		
λ / nm →	400nm	450nm	660nm	265nm	300nm	325nm	270nm	340nm	410nm
% Redução IV → VII	71,4	68,7	77,7	86,1	86,0	89,6	52,0	54,8	58,9
Média de redução ± s.d. = (71,7±14,2 %) – considerando todos os extratos									

Como pôde ser observada pela análise cromatográfica e espectrofotométrica, a redução média dos constituintes globais parcialmente ou bastante polares foi de cerca de 70% considerando a passagem do estágio IV → VII. O estágio IV é considerado, *neste estudo*, como uma planta com cerca de 40 dias de plantio, ou cerca de 68 dias após sua semeadura. Já o estágio V, 60 dias (88 dias após semeadura) e o estágio VII cerca de 80 dias (108 dias após semeadura) de plantio.

Os comprimentos de onda adotados para análise espectrofotométrica foram escolhidos de acordo principalmente com o paralelismo existente entre as diferentes bandas dos espectros, para os mesmos comprimentos de onda, dos diferentes estágios fenológicos.

A *Brassica sp.* usada em formulações fitoterápicas é manipulada de plantas que encontram-se no estágio IX (aproximadamente 150 dias após sua semeadura). Isso reflete em uma concentração muito baixa dos princípios ativos desejáveis. Porém o custo de aquisição da planta é extremamente baixo, praticamente obrigando o manipulador a trabalhar com uma quantidade maior de planta para se extrair uma mesma concentração de princípios ativos de uma planta no estágio IV. Como a planta é ainda pouco desenvolvida no estágio IV para ser comercializada, torna-se inviável nesta fase fenológico, pois se necessita de uma área maior de plantio e uma série de custos agregados, como adubação, mão-de-obra, irrigação, controle de pragas, etc. Isso é um indicativo de que as farmácias que trabalham com a manipulação da *Brassica sp.* teriam que possuir seu próprio plantio controlado, para se extrair com menor tempo e maior concentração seus princípios ativos desejados. Essa realidade ideal é, porém quase utópica na realidade econômica (fitofármacos) brasileira.

CONCLUSÃO

A partir das análises do perfil cromatográfico e espectrofotométrico dos estágios IV, V e VII da *Brassica sp.*, verificou-se que o estágio IV é o que apresenta a maior concentração global relativa dos seus constituintes. Neste estágio é que a planta alcança um estado de maturação mínimo, com folhas uniformes e verdadeiras evidentes.

Apesar dos constituintes encontrados em água serem de polaridade relativamente próxima aos do extrato etanólico, a água é evidentemente, segundo os próprios espectros, o melhor extrator para os compostos de interesse como derivados polifenólicos. Isso leva a compreender que um veículo hidroalcoólico seria mais adequado para formulação de fitoterápicos à base de *Brassica sp.* de uso tópico.

A padronização do estágio fenológico permite uma redução no tempo do cultivo da cultura, de mão-de-obra e principalmente de agressões causadas por pragas, resumindo, no custo do produto final.

Este trabalho contribui para o aperfeiçoamento da aplicação do repolho na fitoterapia, visto que as características demográficas e sazonais podem variar, mas não o estágio fenológico. A padronização do estágio fenológico permite uma redução no tempo do cultivo da cultura, de mão-de-obra e principalmente de injúrias causadas por pragas. Esta redução é fundamental para a economia das indústrias, pois como foi mostrado, não se necessita aguardar o estágio fenológico IX para a colheita, que leva em média 150 dias, dependendo das condições climáticas e ambientais da região. Isto leva a redução evidente dos custos. Entretanto, em nível magistral (produção de fármacos em farmácias de manipulação de acordo com prescrição médica), este trabalho não possui muitas contribuições, pois o cultivo de plantas é inviável economicamente para pequenas empresas.

Muitas formulações farmacêuticas nas farmácias magistrais são preparadas a partir de extratos brutos adquiridos de indústrias de fitoterápicos e com preços acessíveis. Vale ressaltar que farmacêuticos poderão adquirir extratos brutos de *Brassica sp.* de indústrias que utilizam desta metodologia e conseqüentemente obterão melhores resultados na terapia da cicatrização de feridas dos seus clientes, pois os constituintes ativos encontrar-se-ão mais concentrados.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela FAPEMIG (CAG-1985/05) e CNPq (385524/2006-4).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M. ROBERTS, K.; WALTER, P. *Fundamentos da Biologia Celular*. 2º ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

ANDALORO, J. T.; ROSE K. B., SHELTON A. M.; HOY C. W.; BECKER R. F. Cabbage Growth Stages. *New York's Food and Life Sciences Bulletin*. n. 101, p. 362-369, 1983.

BALBACH, A; BOARIM, D. *As Hortaliças na Medicina Natural*. 2ª Ed. Itaquacetuba: Vida Plena, 1993.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURTI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 41, n. 1, p 27-51, 2005.

- BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, T. H. C.; ALENCAR A. A.; BATISTA, L. M.; OLIVEIRA, R. A. G.; DESHPANDE, S.S. & CHERYAN, M. Evaluation of vanillin assay for tannin analysis of dry beans. *Journal of Food Scienc.* v.50, n. 4, p.905-910, 1985.
- EURIDES, D.; MAZZANTI, A.; BELLETI, M. E.; SILVA, L. A. F. da; FIORAVANTE, M. C. S.; TRONCOSO NETO, N. S.; CAMPOS, V. A. de; LEMOS, R. C.; SILVESTRINI JUNIOR P. L. Morphological And Morphometrical Studies On Tissue Repair Of Mice Cutaneous Wounds Treated With Barbatiman Aqueous Solution (Stryphnodendron Barbatiman martius). *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia.* v. 2/3, n. 1, p. 35-40, 1996.
- FERREIRA, R. A.; BOTELHO, S. A.; DAVIDE, A. C.; MALAVASI, M. DE M. Morphology of fruits, seeds, seedlings and saplings of *Dimorphandra mollis* Benth. - faveira (Leguminosae Caesalpinioideae). *Rev.Brasileira de Botânica.* v.24, n.3, p.303-309, 2001.
- FILGUEIRA, F.A.R. *Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças.* Viçosa, MG: UFV, 2000.
- FRACARO, F.; SARTORI, M.; BIZZANI, E.; GRELMAN, E.; ECHEVERRIGARAY, S. Agronomic Behavior of Cabbage Cultivars and Hybrids in the Northeast Region of Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista de Ciência Rural.* Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 465-468, 1999.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova.* v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonóides. *Pharmacology & Therapeutics.* v. 96, p. 67– 202, 2002.
- JANG, M.; CAI L.; UDEANI G.O.; SLWOING K.V.; THOMAS C.F.; BEECHER, D.M. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease. *Clinic Chimica Acta.* v. 235, p. 207-19, 1995.
- KAWADA, N.; SEKI, S.; INOUE M.; KUROKI, T. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and kupfer cells. *Hepatology.* v. 27, p. 1265-1274, 1998.
- LÉDO, F. J. S.; SOUZA, J. A.; ARAÚJO, H. M.; SILVA, M. R. *Introdução e avaliação de cultivares de repolho (Brassica oleracea var. capitata) para o período seco no estado do Acre.* Porto Velho, Acre. Embrapa, v. 91, p. 1-2. dez., 1996.
- LEONI, O.; CINTI, S.; ALIANO, N.; TITTONEL, E. D. A rapid chromatographic method for determining the glucosinolate content in crambe seed. *Plant Breeding.* v. 122, p.517—520, 2003.
- MONSALVE, C.; CANO, A. La Familia Brassicaceae em la província de Huaylas, Áncash. *Revista Peruana de Biología.* v.10, n 1, p 20-32, 2003.
- NELSON, B.W. Inventário florístico e fisionômico da Amazônia: tendência de amostragem nos herbários e potencial do sensoriamento remoto. 1994. 216p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- PAULA, J. R., T. J.; VENSON, M. (Org.). *101 Culturas - Manual de Tecnologias Agrícolas.* Belo Horizonte: EPAMIG, 2007.
- PILLAR, V. D. P.; BOLDRINI, I. I.; LANGE, O. *Padrões de variação da vegetação campestre sob eucalipto.* UFRGS, Santa Maria. 1992.
- RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. H. *Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação.* Viçosa: Comissão de fertilidade do solo do estado de Minas Gerais, 1999.
- SCHRIEVER, J.R.; CONGALTON R.G. Evaluating seasonal variability as aid to cover-type mapping from Landsat thematic mapper data in the Northeast. *Photogrammetric Engineering and Remote Sensing.* v. 6, n 1, p.321-327. 1995.
- SIMÕES, C.O., SCHENKEL, E. P., GOSMÃO, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P. R. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento.* 5ªed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2004.

SILVA, M. B.; SILVA, C. A.; MALAQUIAS, L. C. C.; SARANDY, M. M.; FREIRE, M. C. M.; ANTUNES, F. R.; COSTA, A. S. V. da . Comparative effect of a phytotherapeutic product from Brassica sp as cicatrizing. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. v. 8, p. 136-138. 2006.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. *Revista de Nutrição*. v.12, n. 1, p.21-32. 1999.

VERONA, J. D. Classificação e monitoramento fenológico foliar da cobertura vegetal na região da floresta nacional do tapajós - pará, utilizando dados multitemporais do sensor thematic mapper (tm) do landsat. 2002. 159p. Dissertação (Mestrado) – INPE. São José dos Campos, 2002.

VERONA, J. D.; SHIMABUKURO, Y.E.; SANTOS, J. R. dos. Potencialidade das imagens-fração multitemporais TM/Landsat na caracterização de variações fenológicas em área de floresta tropical na Amazônia. Anais XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Goiânia, Brasil, INPE, 2005.

WALTER, H. *Vegetação e zonas climáticas: tratado de ecologia global*. São Paulo: EPU, Pedagógica e Universitária, 1986.

WOLTER, P. T.; MLADENOFF, D. J.; HOST, G. E.; CROW, T. R. Improved Forest Classification in the northern Lake states using multi-temporal Landsat Imagery. *Photogrammetric Engineering and Remote Sensing*. v. 61, n. 6, p. 1129-1143, 1995.