

**Isolamento e Caracterização Química
do Glicosinolato *epi*-progoitrina de
*Crambe abyssinica***



ISSN 1679-6543

Maio, 2017

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria Tropical
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 133

Isolamento e Caracterização Química do Glicosinolato *epi*-progoitrina de *Crambe abyssinica*

Angélica Maria Reinaldo da Silva

Ana Sheila de Queiroz Souza

Kirley Marques Canuto

Lorena Mara Alexandre e Silva

Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro

Edy Sousa de Brito

Embrapa Agroindústria Tropical

Fortaleza, CE

2017

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

Embrapa Agroindústria Tropical
Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici
CEP 60511-110 Fortaleza, CE
Fone: (85) 3391-7100
Fax: (85) 3391-7109
www.embrapa.br/agroindustria-tropical
www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente: *Gustavo Adolfo Saavedra Pinto*
Secretária-executiva: *Celli Rodrigues Muniz*
Secretária-administrativa: *Eveline de Castro Menezes*
Membros: *Janice Ribeiro Lima, Marlos Alves Bezerra, Luiz Augusto Lopes Serrano, Marlon Vagner Valentim Martins, Guilherme Julião Zocolo, Rita de Cássia Costa Cid, Eliana Sousa Ximendes*

Supervisão editorial: *Ana Elisa Galvão Sidrim*
Revisão de texto: *Marcos Antônio Nakayama*
Normalização: *Rita de Cassia Costa Cid*
Foto da capa: *Clenilson Martins Rodrigues*
Editoração eletrônica: *Arilo Nobre de Oliveira*

1ª edição

On-line (2017)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroindústria Tropical

Isolamento e caracterização química do glicosinolato *epi*-progoitrina de *Crambe abyssinica* / Angélica Maria Reinaldo da Silva... [et al.]. – Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2017.

21 p. : il. ; 14,8 cm x 21 cm. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1679-6543; 133).

Publicação disponibilizada on-line no formato PDF.

1. Defesa biológica. 2. Brassicaceae. 3. Sementes de crambe. 4. Glicosinolatos. I. Silva, Angélica Maria Reinaldo da. II. Souza, Ana Sheila de Queiroz. III. Canuto, Kirley Marques. IV. Silva, Lorena Mara Alexandre e. V. Ribeiro, Paulo Riceli Vasconcelos. VI. Brito, Edy Sousa de. VI. Série.

CDD 583.64

© Embrapa 2017

Sumário

Resumo	4
Abstract.....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos.....	9
Resultados e Discussão.....	11
Conclusão	19
Agradecimentos	19
Referências	20

Isolamento e Caracterização Química do Glicosinolato *epi*-progoitrina de *Crambe abyssinica*

Angélica Maria Reinaldo da Silva¹

Ana Sheila de Queiroz Souza²

Kirley Marques Canuto³

Lorena Mara Alexandre e Silva⁴

Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro⁵

Edy Sousa de Brito⁶

Resumo

Os glicosinolatos são sulfatos orgânicos de tiohidroximatos glicosilados frequentemente encontrados em brássicas (ex.: couve-flor, brócolis, repolho). Esses compostos e seus produtos de hidrólise enzimática exibem um papel de defesa da planta contra insetos herbívoros e apresentam várias atividades biológicas, tais como antifúngica, antibacteriana, antiproliferativo, inseticida e herbicida. Tendo em vista o potencial biológico dos glicosinolatos, o presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar quimicamente a *epi*-progoitrina das sementes de crambe (*Crambe abyssinica* - Brassicaceae). As sementes, previamente trituradas em nitrogênio líquido para inativação da enzima mirosinase, foram aquecidas com água a 97 °C e em seguida extraídas com etanol 70%. O extrato hidroalcoólico foi submetido a

¹ Química pela Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, angelevini@hotmail.com

² Graduada em Farmácia pela Universidade de Fortaleza, Fortaleza, CE, anasheilapetunifor@gmail.com

³ Farmacêutico, D.Sc. em Química Orgânica, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, kirley.canuto@embrapa.br

⁴ Química, D. Sc. em Química, analista da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, lorena.mara@embrapa.br

⁵ Químico, doutorando em Química Orgânica, analista da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, paulo.riceli@embrapa.br

⁶ Químico, D.Sc. em Ciência de Alimentos, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, edy.brito@embrapa.br

duas extrações em fase sólida sequenciais, utilizando-se cartuchos C18 e amino propil, seguidas por purificação em cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). A separação cromatográfica resultou no isolamento de um sólido amarelo caracterizado como epi-progoitrina, por meio de análises de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , incluindo técnicas bidimensionais, e por Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR).

Termos para indexação: glicosinolatos, RMN, mirosinase, crambe.

Isolation and Chemical Characterization of the Glucosinolate *epi*-progoitrin from *Crambe abyssinica*

Abstract

The glucosinolates are organic sulfates from glucosylated thiohydroxymates often found in brassica (eg.: cauliflower, broccoli, cabbage). These compounds and their enzymatic hydrolysis products play role as plant defense against herbivore insects and exhibit various biological activities such as antifungal, antibacterial, anti-proliferative, insecticide and herbicide. Given the biological potential of glucosinolates the present study aimed to isolate epi-progoitrin from crambe seeds (Crambe abyssinica - Brassicaceae). Crambe seeds, previously ground in liquid nitrogen for myrosinase enzyme inactivation, were boiled with water at 97 °C and then extracted with 70% ethanol. The hydroalcoholic extract was subjected to two sequential procedures of solid phase extraction, using C18 and aminopropyl cartridges followed by purification by high-performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD). The chromatographic separation resulted in the isolation of a yellow solid epi-progoitrin, which was characterized by means of ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance analysis, including two dimensional techniques, as well as High Resolution Mass Spectrometry (HRMS).

Index terms: glucosinolates, NMR, myrosinase, crambe.

Introdução

Glicosinolatos (β -tioglicosídeo-N-hidroxisulfato) são sais orgânicos de tiohidroximatos ligados a resíduos de β -glicose e sulfato, contendo uma cadeia lateral formada por um derivado de aminoácido (alanina, valina/leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina/tirosina e triptofano) (AGERBIRK; OLSEN, 2012). Mais de 130 glicosinolatos já foram relatados na literatura, variando estruturalmente quanto aos grupos químicos ligados à unidade glicosídica e à cadeia lateral (alquílica, insaturada, aromática). Esses compostos são encontrados quase que exclusivamente na ordem Brassicales, em especial na família Brassicaceae (Cruciferae). Logo, muitos dos glicosinolatos ocorrem em vegetais comestíveis tais como brócolis, repolho, couve-flor e em oleaginosas de importância econômica (ex.: mostarda, canola e crambe). Essas substâncias sulfuradas são responsáveis pelo sabor característico das hortaliças brássicas (CLARKE, 2010; AGERBIRK; OLSEN, 2012). Os glicosinolatos específicos são geralmente restritos dentro das famílias de plantas, sendo o mais simples deles (glucocapparina, um derivado metilado) encontrado em alcaparras (Caparidaceae) enquanto um dos mais complexos (glucomoringina, um derivado rhamnosil-benzilado) ocorre em moringa (Moringaceae) (CLARKE, 2010).

Fisiologicamente, os glicosinolatos têm um papel importante na defesa da planta contra insetos herbívoros. Quando o tecido vegetal é rompido, os glicosinolatos são convertidos pela enzima mirosinase a isotiocianatos tóxicos para o inseto agressor (CLARKE, 2010). Em geral, as propriedades biológicas dos glicosinolatos são atribuídas aos seus metabólitos resultantes da hidrólise enzimática (isotiocianatos, nitrilas, e oxazolidinonas), que têm demonstrado tanto efeitos benéficos, tais como atividades antifúngica, antibacteriana, antiproliferativo, inseticida e herbicida (VIG et al., 2009; DINKOVA-KOSTOVA; KOSTOV, 2012), como deletérios, observados principalmente em animais: ações bociogênica, nefrotóxica, hepatotóxica e mutagênica (TRIPATHI; MISHRA, 2007)

A despeito das aplicações potenciais dos glicosinolatos, o isolamento costuma ser um procedimento complicado e com rendimentos frequentemente insatisfatórios, em virtude da possibilidade de decomposição enzimática, além da instabilidade química desses compostos. A extração com solvente a quente para inativar a enzima mirosinase pode levar à degradação térmica do glicosinolato, quando exposto a um longo tempo de extração. Por isso, os procedimentos de inativação enzimática mais eficientes são precedidos pelo uso de nitrogênio líquido ou micro-ondas. Os extratos são obtidos com solventes hidrofílicos puros ou combinados (água, metanol, etanol) com e sem adição de tampão (ex.: fosfato) dada a alta polaridade dos glicosinolatos. As separações cromatográficas são realizadas em resinas aniônicas, cromatografias de contracorrente ou de par iônico (CLARKE, 2010). Entretanto, neste último caso, a introdução de um aditivo à fase móvel é inconveniente, pois requer uma etapa adicional para sua remoção (ROCHFORT et al., 2006).

Em razão das dificuldades citadas acima, a obtenção de padrões analíticos é feita preferencialmente a partir de fontes com altos teores e pouco complexas. Além disso, certas espécies produzem exclusivamente um determinado estereoisômero, dispensando assim a necessidade de separações mais refinadas. Por exemplo, as sementes de crambe contêm cerca de 3-4% de *epi*-progoitrina, o que corresponde a mais de 90% dos glicosinolatos existentes (Figura 1). Por outro lado, nas sementes de canola, encontra-se apenas o seu epímero R (progoitrina) (DAUBOS et al., 1998; LEONI et al., 2003).

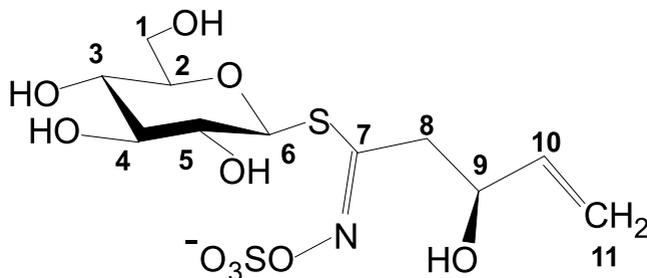


Figura 1. Estrutura química da *epi*-progoitrina.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo isolar a *epi*-progoitrina das sementes de crambe, adaptando-se metodologia anteriormente empregada para obtenção de glucorafinina, o principal glicosinolato das sementes de brócolis (ROCHFORT et al., 2006).

Material e Métodos

Extração das sementes de crambe

Dez gramas de sementes de crambe (variedade FMS Brilhante), oriundas do Banco de Germoplasma de Crambe da Fundação MS (Maracaju, MS), foram trituradas com pistilo e gral contendo N₂ líquido. Em seguida, o referido material foi cozido em 60 mL de água destilada a 97 °C em chapa quente por 5 minutos. Logo após, a solução aquosa foi resfriada em banho de gelo onde também foi mantida por 5 minutos. À amostra resfriada, foram adicionados 140 mL de etanol 70%, para remoção de proteínas, e, em seguida, foi filtrada em papel de filtro. Então, a amostra foi rotaevaporada para eliminação de etanol e finalmente liofilizada, resultando no extrato hidroetanólico das sementes de crambe (CSHE) (TAO; HE, 2004).

Isolamento da *epi*-progoitrina

O procedimento de isolamento foi baseado no método descrito por Rochfort et al. (2006). O extrato CSHE (5,9 g) foi solubilizado em 20 mL de água ultrapura (Milli-Q) e aplicado em dois cartuchos C18 (Silicycle, 5 g), previamente ativados com 50 mL de metanol e equilibrados com 50 mL de água ultrapura. Inicialmente, a amostra foi eluída com 40 mL de H₂O (cada cartucho). O eluato foi coletado em um mesmo becker. Adicionou-se 0,8 mL de ácido acético ao eluato do C18 e aplicou-se em quatro cartuchos Aminopropil (Varian- Bond Elut NH₂, 1 g), previamente ativados com 20 mL de metanol e equilibrados com H₂O contendo 1% de ácido acético. Em cada cartucho, a eluição foi feita com 10 mL de metanol seguido pela adição de 15 mL de metanol contendo 2% de NH₄OH. A solução foi rotaevaporada para retirar todo o metanol e NH₄OH e posteriormente liofilizada, obtendo-se 199,2 mg de um sólido amarelo, denominado CSHE-1.

A fração CSHE-1 foi analisada em um cromatógrafo analítico 920 LC Varian, com detector de arranjo de diodos, munido de coluna Microsorb C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 μ m) mantida em forno a 40 °C, vazão de 0,65 mL/min, utilizando-se uma fase móvel isocrática de CH₃CN/H₂O (3:97, v/v) e um volume de injeção de 20 μ L. A detecção da substância foi feita a 230 nm.

Caracterização química da *epi*-progoitrina

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN ¹H e ¹³C), incluindo bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC), foram obtidos em um espectrômetro DD2-Agilent de 600 MHz, por meio de uma sonda de detecção direta de 5 mm, operando nas frequências do ¹H e ¹³C a 599,94 MHz e 150,87 MHz, respectivamente. As amostras foram dissolvidas em 0,6 mL de água deuterada (D₂O, Cambridge Isotope Laboratories) e analisadas em tubos de vidro de 5 mm. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm).

Nos experimentos unidimensionais de ¹H e de ¹³C, foram estabelecidos os seguintes valores para os parâmetros de aquisição, respectivamente: larguras espectrais de 16 ppm e 251 ppm, tempo de aquisição de 1,7 s e 0,865 s, larguras de pulso de 450 de 3,80 μ s (60 dB) e 4,20 μ s (56 dB), número de transientes de 16 e 16K, e tempo de relaxação de 1 s. Os experimentos unidimensionais foram adquiridos com 32.768 pontos e processados com 65.356 pontos. Os espectros bidimensionais de correlação homonuclear (COSY) e heteronuclear foram adquiridos com gradiente de campo, empregando um número de transientes de 16 e 32, respectivamente. No COSY, foram utilizados 897 x 128 pontos para a matriz de dados de aquisição e 4.096 x 4.096 pontos para o processamento, enquanto, para os experimentos HSQC e HMBC, foram utilizados 1.142 x 256 pontos na aquisição e 4.096 x 2.048 pontos no processamento.

O espectro de massas (EM) foi registrado em um sistema UPLC-ESI-Q-TOF (Acquity-Xevo, Waters), equipado com uma coluna Waters Acquity UPLC BEH (150 mm x 2,1 cm, 1,7 μ m) mantida a 40 °C. As

fases móveis foram compostas de água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), com gradiente variando 0-15 min (2-95%) de B; 15,1-17 min (100%) de B; 17,1-19,1 min (2%) de B, fluxo de 0,4 mL/min e volume de injeção da amostra de 5 µL. A amostra foi dissolvida em água ultrapura (Milli-Q, MILLIPORE) e filtrada em filtro de PTFE- 0,22 µm (Allcrom, São Paulo). A substância isolada foi detectada no modo de ionização negativo.

Resultados e Discussão

O fracionamento sequencial em cartuchos de extração em fase sólida do extrato hidroalcoólico das sementes de crambe, seguido de isolamento por CLAE, resultou na obtenção de um sólido amarelo denominado, inicialmente, CSHE-1p1 e posteriormente caracterizado como sendo o glicosinolato *epi*-progoitrina por meio de técnicas espectrométricas.

A *epi*-progoitrina já havia sido relatada anteriormente em espécies de crambe (*Crambe abyssinica* e *C. maritima*), em *Coyncia* e (FAHEY et al., 2001) e, mais recentemente, nas brássicas *Isatis indigotica* (ANGELINIA et al., 2015) e *I. tinctoria* (GALLETTI et al., 2015). A identificação química desse e outros glicosinolatos era tradicionalmente realizada por meio de CLAE precedida de reação de dessulfatação (LAZZERI et al., 1994); contudo, em virtude da popularização do uso da espectrometria de massas (EM) de alta resolução, a detecção desses compostos passou a ser desenvolvida por meio de CLAE-EM equipada com analisador de massas do tipo tempo de voo, buscando-se a massa exata no cromatograma do extrato (LELARIO et al., 2012).

Com relação ao isolamento, os métodos descritos na literatura apresentam alguns inconvenientes. Daubos et al. (1998) adaptaram um método de Visentin et al. (1992) e extraíram a *epi*-progoitrina com o solvente imidazol-formato, seguido por remoção de proteínas com sulfatos de bário e chumbo. A separação cromatográfica foi efetuada em resina trocadora de ânions de DEAE-Sephadex A-25, e, por fim, realizou-se a recristalização com etanol. Esse método é laborioso,

consistindo em várias etapas de centrifugação e rotaevaporação, além de utilizar um solvente pouco acessível.

Enquanto isso, Prestera et al. (1996) obtiveram *epi-progoitrina* por cromatografia de par iônico com brometo de tetradecilamônio. A remoção do contra-íon foi feita pela partição líquido-líquido com clorofórmio/cloreto de amônio. A desvantagem do método é que a corrida cromatográfica é longa (mais de 20 min) e gera muito resíduo de contra-íon.

Por outro lado, a estratégia apresentada no presente trabalho, uma adaptação do método de Rochfort et al. (2006), tem como vantagem a praticidade. O uso de cartuchos de extração em fase sólida em série (C18 e aminopropil) favoreceu a obtenção de uma fração altamente polar, porém desprovida de açúcares e rica em sais aniônicos orgânicos tais como o sulfato existente na estrutura dos glicosinolatos. Em razão disso, a separação por CLAE foi atingida em tempo curto (6 min) e sem o uso inconveniente de um par iônico (Figura 2). A *epi-progoitrina* foi coletada no tempo de 4,76 min.

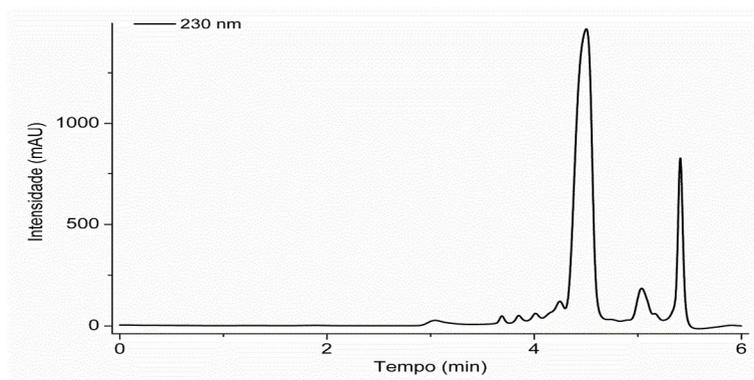


Figura 2. Cromatograma de CLAE-UV da fração CSHE-1.

Quanto à caracterização química, o espectro de massas de alta resolução (Figura 3) da fração CSHE-1p1 foi obtido no modo de ionização negativo (IES⁻), apresentando uma molécula desprotonada de m/z 388.0354 ($[M-H]^-$, calcd. 388.0372).

Portanto, a referida massa foi compatível com a fórmula molecular $C_{11}H_{19}NO_{11}S_2$ e em concordância com o valor de massa exata relatada na literatura para *epi*-progoitrina (LELARIO et al., 2012). A justificativa dos íons detectados foi baseada na proposta de Cataldi et al. (2010) para fragmentação de glicosinatos: os íons produto m/z 308 e 195 corresponderam às perdas de SO_3 (-80 Da) e da cadeia lateral (-193 Da), respectivamente (Figura 4). Os íons de m/z 275 e 259 foram formados a partir de um rearranjo intramolecular, no qual o grupo sulfato foi transferido para a o fragmento tioglicosídico. Por outro lado, o íon de m/z 210 foi gerado pela perda do resíduo de tioglicose.

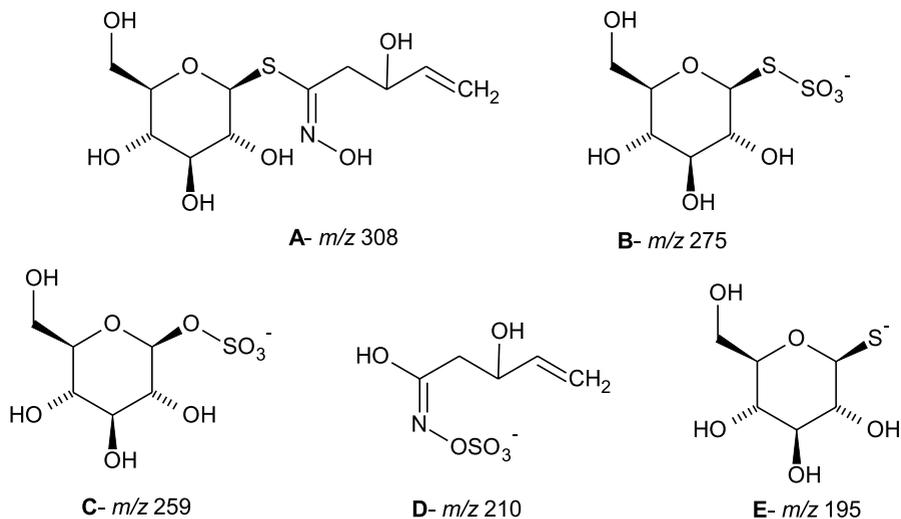


Figura 4. Estruturas dos íons formados a partir da fração CSHE-1p1, no sistema UPLC-ESI-Q-TOF (CATALDI et al., 2010).

O espectro de RMN 1H da fração CSHE-1p1 (600 MHz, D_2O) (Figura 5) exibiu sinais em δ 5,95 (1H, m, H-10), 5,35 (1H, d, $J = 17,4$ Hz, H-11a) e 5,23 (1H, d, $J = 10,8$ Hz, H-11b) associados a hidrogênios olefínicos, sinais na faixa de δ 5,01-3,44, relacionados a hidrogênios glicosídicos, bem como sinal em δ 2,94 (2H, m, H-8), correspondente a hidrogênios alifáticos.

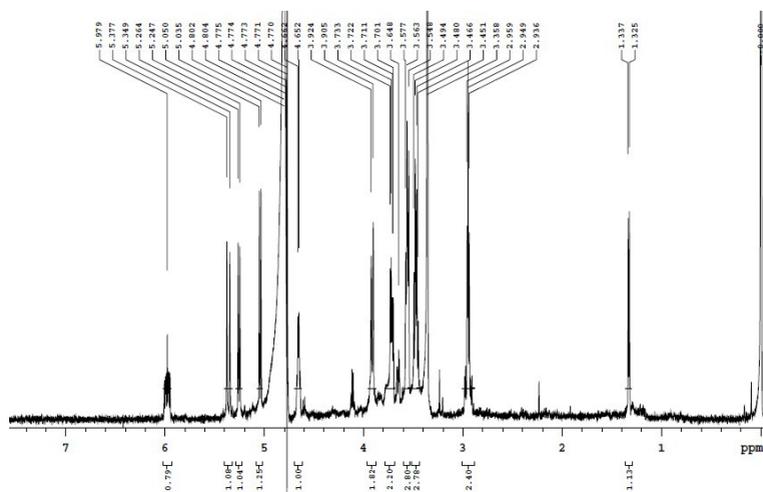


Figura 5. Espectro de RMN ^1H de CSHE-1p1.

No espectro de RMN ^{13}C -CPD (150 MHz, D $_2\text{O}$) (Figura 6), foram observadas 11 linhas espectrais. Comparando-se o espectro de CSHE-1 com dados da literatura, foi possível identificar os sinais característicos do glicosinolato: o carbono imínico em δ 160,1 (C-7), os carbonos vinílicos em δ 138,2 (C-10) e 116,3 (C-11), os carbonos oxigenados em δ 81,8 (C-6), 80,2 (C-2), 77,0 (C-4), 71,9 (C-5), 69,8 (C-9), 69,1 (C-3) e 60,6 (C-1), além do carbono sp^3 não funcionalizado em δ 39,4 (C-8).

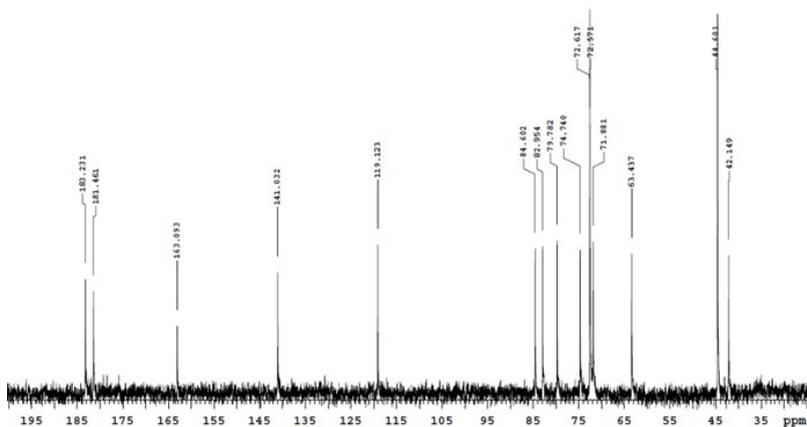


Figura 6. Espectro de RMN ^{13}C de CSHE-1p1.

A determinação estrutural inequívoca de CSHE-1p1 foi conseguida por meio dos espectros de RMN bidimensionais. O espectro RMN HSQC (D₂O) (Figura 7) revelou os carbonos hidrogenados, correlacionando cada carbono ao seu respectivo hidrogênio, como no caso do acoplamento entre o sinal de carbono em δ 81,8 (C-6) com o sinal de hidrogênio em δ 5,01 (H-6), que evidenciou a existência do carbono anomérico. O espectro de RMN-COSY (Figura 8) mostrou o acoplamento escalar entre os sinais de hidrogênio em δ H 4,62 (H-9) e 2,94 (H-8), evidenciando a ligação entre os carbonos carbinólico e metilênico.

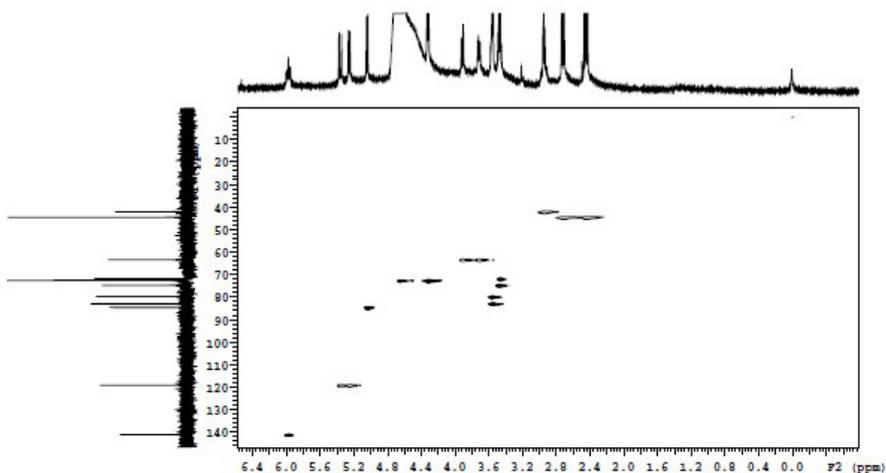


Figura 7. Espectro de RMN bidimensional ¹H-¹³C HSQC de CSHE-1p1.

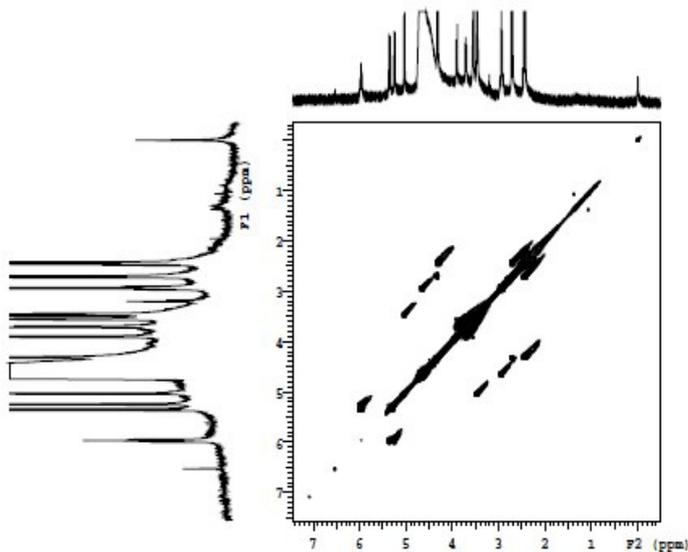


Figura 8. Espectro de RMN bidimensional ¹H-¹H COSY de CSHE-1p1.

O espectro de RMN-HMBC (Figura 9) mostrou correlações entre os sinais de hidrogênio em δ H 2,94 (H-8) com os sinais de carbono em δ C 160,1 (C-4), 138,2 (C10) e 69,8 (C-9) caracterizando a ligação do grupo hidroxibutenila ao carbono imínico sulfatado (Tabela 1).

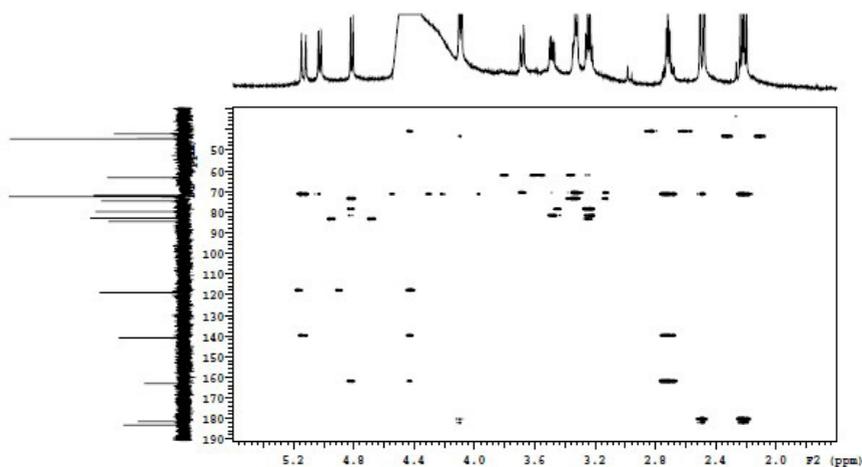


Figura 9. Espectro de RMN bidimensional ¹H-¹³C HMBC de CSHE-1p1.

Tabela 1. Dados de RMN da fração CSHE-1p1 obtidos em um espectrômetro Agilent DD2-600, utilizando-se água deuterada como solvente.

#C	δ C D ₂ O	δ H (int., multipl, J em Hz)	HMBC	COSY
7	160,1	-	5,01; 4,62; 2,94	
10	138,2	5,95 (1H, m)	5,35; 4,62; 2,94	5,35; 5,23
11	116,3	5,35 (1H, 17,4, d) 5,23 (1H, 10,8, d)	4,62	5,95
6	81,8	5,01 (1H, 10,8, d)	3,48	3,48
2	80,2	3,53	5,01	
4	77,0	3,55	5,01; 3,48	
5	71,9	3,48 (1H, 10,8, d)	5,01; 3,55	5,01
9	69,8	4,62 (1H, m)	5,95; 5,35; 2,94	2,94
3	69,1	3,44 (1H, q)	3,92; 3,55	
1	60,6	3,92; 3,71 (2H, dd)	3,55	3,53
8	39,4	2,94	4,62	4,62

Além disso, a correlação entre os sinais de hidrogênio em δ H 5,01 (H-6) e 4,62 (H-9) com o sinal de carbono em δ C 160,1 (C-7) corroborou a existência da ligação tioglicosídica por meio do carbono imínico. Além disso, dados da literatura ratificaram atribuição dos sinais de RMN feitas para a estrutura da *epi*-progoitrina (Tabela 2) (COX et al., 1984; PRESTERA et al., 1996).

Tabela 2. Comparação dos deslocamentos químicos da fração CSHE-1p1 com dados de RMN da literatura da *epi*-progoitrina.

#C	δ C D ₂ O CSHE-1p1	δ CD ₂ O <i>epi</i> -progoitrina (COX et al., 1984)	δ HD ₂ O CSHE-1p1	δ CD ₂ O <i>epi</i> -progoitrina (PRESTERA et al., 1996)
7	160,1	161,2	-	-
10	138,2	139,3	5,95	5,98
11	116,3	117,0	5,35; 5,23	5,35; 5,25
6	81,8	82,8	5,01	5,03
2	80,2	80,8	3,53	3,56
4	77,0	77,9	3,55	3,57
5	71,9	72,8	3,48	3,49
9	69,8	70,5	4,62	4,65
3	69,1	69,9	3,44	3,47
1	60,6	61,4	3,92; 3,71	3,90; 3,72
8	39,4	40,1	2,94	2,92

Conclusão

O uso combinado de extração em fase sólida em série com CLAE-UV é um método prático e escalonável para o isolamento de glicosinolatos, mostrando-se potencialmente útil para obtenção de *epi*-progoitrina como padrão analítico.

Agradecimentos

À Fundação MS pela doação das sementes de crambe e à Embrapa pelo apoio financeiro ao projeto "Fastchrom"-SEG 03.12.01.011.0000.

Referências

AGERBIRK, N.; OLSEN, C. E. Glucosinolate structures in evolution. **Phytochemistry**, v. 77, p. 16-45, 2012.

ANGELINIA, L. G.; TAVARINIA, S.; ANTICHA, D.; BAGATTAB, M.; MATTEO, R.; LAZZERI, L. Fatty acid and glucosinolate patterns of seed from *Isatis indigotica* Fortune as bioproducts for green chemistry. **Industrial Crops and Products**, v. 75, p. 51-58, 2015.

CATALDI, T. R. I.; LELARIO, F.; ORLANDO, D.; BUFO, S. A. Collision-induced dissociation of the A + 2 isotope ion facilitates glucosinolates structure elucidation by electrospray ionization-tandem mass spectrometry with a linear quadrupole ion trap. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 5686-5696, 2010.

CLARKE, D.B. Glucosinolates, structures and analysis in food. **Analytical Methods**, v. 2, p. 310-325, 2010.

COX, J.; Hanley, A. B.; BELTON, P. S.; FENWICK, G.R. NMR spectra (¹H, ¹³C) of glucosinolates. **Carbohydrate Research**, v.132, p. 323-329, 1984.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; KOSTOV, R. V. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, p. 337-347, 2012.

DAUBOS, P.; GRUMEL, V.; IORI, R.; LEONI, O.; PALMIERI, S.; ROLLIN, P. Crambe abyssinica meal as starting material for the production of enantiomerically pure fine chemicals. **Industrial Crops and Products**, v. 7, p. 187-193, 1998.

FAHEY, J. W.; ZALCMANN, A. T.; TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 5–51, 2001.

GALLETTI, S.; BAGATTA, M.; BRANCA, F.; ARGENTO, S.; DE NICOLA, G. R.;

CIANCHETTA, S.; IORI, R.; NINFALI, P. *Isatis canescens* is a rich source of glucobrassicin and other health-promoting compounds. **Journal of Science Food and Agriculture**, v. 95, p. 158-164, 2015.

LAZZERI, L.; LEONI, O.; CONTE, L.S.; PALMIERI, S. Some technological characteristics and potential uses of *Crambe abyssinica* products. **Industrial Crops and Products**, v. 3, p. 103-112, 1994.

LELARIO, F.; BIANCO, G.; BUFO, S. A.; CATALDI, T. R. I. Establishing the occurrence of major and minor glucosinolates in Brassicaceae by LC-ESI-hybrid linear ion-trap and Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Phytochemistry**, v. 73, p. 74-83, 2012.

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.

PRESTERA, T.; FAHEY, J. W.; HOLTZCLAW, W. D.; ABEYGUNAWARDANA, C.; KACHINSKI, J. L.; TALALAY, P. Comprehensive chromatographic and spectroscopic methods for the separation and identification of intact glucosinolates. **Analytical Biochemistry**, v. 230, p.168-179, 1996.

TAO, C.C.; HE, B. B.; Isolation of intact glucosinolates from mustard seed meal to increase the sustainability of biodiesel utilization. In: ASAE ANNUAL INTERNATIONAL MEETING, 2004, Ottawa. [Proceedings...] Ottawa: ASAE/CSAE, 2004.

TRIPATHI, M. K.; MISHRA, A. S. Glucosinolates in animal nutrition: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 132, p. 1-27, 2007.

ROCHFORT, S.; CARIDI, D.; STINTON, M.; TRENERRY, V. C.; JONES, R. The isolation and purification of glucoraphanin from broccoli seeds by solid phase extraction and preparative high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1120, p. 205210, 2006.

VIG, A. P.; RAMPAL, G.; THIND, T. S.; ARORA, S. Bio-protective effects of glucosinolates-a review. **LWT- Food Science and Technology**, v. 42, p. 1561-1572, 2009.

VISENTIN, M.; TAVA, A.; IORI, R.; PALMIERI, S. Isolation and identification for trans-4-(methylthio)-3-butenyl glucosinolate from radish roots (*Raphanus sativus* L.). **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 40, p. 1687-1691, 1992.



Agroindústria Tropical



MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

