



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**



THALISSON AMORIM DE SOUZA

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *NEOCALYPTROCALYX LONGIFOLIUM* MART.
CORNEJO & ILTIS (CAPPARACEAE)**

**JOÃO PESSOA – PB
2020**

THALISSON AMORIM DE SOUZA

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *NEOCALYPTROCALYX LONGIFOLIUM* MART.
CORNEJO & ILTIS (CAPPARACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento as exigências para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacoquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva

**JOÃO PESSOA – PB
2020**

THALISSON AMORIM DE SOUZA

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *NEOCALYPTROCALYX LONGIFOLIUM* MART.
CORNEJO & ILTIS (CAPPARACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento as exigências para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacoquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva
(Universidade Federal da Paraíba)

Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida
(Universidade Federal do Vale do São Francisco)

Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Vanderlei de Souza
(Universidade Federal da Paraíba)

**JOÃO PESSOA – PB
2020**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S729e Souza, Thalisson Amorim de.

Estudo fitoquímico de *Neocalyptrocalyx longifolium*
Mart. Cornejo & Iltis (Capparaceae) / Thalisson Amorim
de Souza. - João Pessoa, 2020.
99f.

Orientação: Marcelo Sobral da Silva.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. Caatinga. 3. Capparaceae. 4.
Neocalyptrocalyx. I. Silva, Marcelo Sobral da. II.
Título.

UFPB/BC

CDU 547.9(043)

DEDICATÓRIA

À Noelia e Liodete, minhas avós, pelo carinho e apoio durante essa jornada formativa.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela sua proteção e por me conceder coragem para lidar com os novos ciclos e desafios.

À minha família pelo carinho e exemplos de determinação e resiliência. Características centradas nas Figuras do meu pai, Erisvaldo, e minha mãe, Ofélia. Aos meus irmãos, Thenisson e Geisa pela compreensão e apoio, amo todos vocês.

Aos meus amigos de longa data; Eugênio, Maiara e Yndiane com quem tenho prazer de dividir mais um momento de realização, é sempre ótimo revê-los.

Aos amigos que levo desde a graduação; Aline, Doug, Myla, Didi e Rai, além das horas em experimentos partilhamos muitas felicidades, espero poder contar sempre com vocês.

Aos meus amigos em Sergipe, principalmente Gui, Mai, E' e Jhon, apesar da distância fazem o possível para continuarem presentes nestes ciclos formativos e certamente compartilham da minha alegria, vocês estarão sempre comigo.

Aos meus amigos na Bahia; Mila, Dani Pimenta, Gu, Pi, Dannily e Dani Reis, pelos vários momentos que compartilhamos e por todo apoio, sobretudo quando estou em Salvador, assim que possível estarei entre vocês novamente.

Às amigadas construídas em João Pessoa, Jordana, Geovana, Fernandinha, Elaine e Tainá pela diversão e vinhos que partilhamos.

Aos Professores Marcelo Sobral e Josean Fechine pelos ensinamentos durante esses dois anos e pelo exemplo de compromisso e ética na pesquisa em produtos naturais.

Às amigadas que pude construir como parte da equipe; Kaio, Anderson, Diego, Rose, Sabrina, Aninha, Arthur, Ranna, Cesar, Gabi e Natã, os quais também me acolheram quando cheguei a João Pessoa.

De modo especial agradeço aqueles que me acompanharam no desenvolvimento dos projetos, seja durante a noite ou nos finais de semana; Joanda, Lucas e Laiane, amigos que admiro pela dedicação e competência, vocês são um verdadeiro exemplo. Fico feliz em poder compartilhar vários momentos e aprender com cada um de vocês.

Aos técnicos Marcelo, Sócrates e Evandro cuja colaboração permitiu a concretização deste trabalho. A Nonato e D. Glória pela disponibilidade e ajuda com os materiais. A Rose, pelas conversas e longas risadas. A Carol, por ser um exemplo de eficiência e estar sempre disposta a ajudar.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente, muito obrigado.

RESUMO

A Caatinga é um ecossistema encontrado exclusivamente no Nordeste brasileiro, ocupa uma grande extensão geográfica, cerca de 60% da sua área total. Historicamente esse bioma é associado à seca, no século XIX von Martius o definiu como “uma floresta sem folhas no verão”. Contudo, nos dias atuais essa perspectiva tem mudado e sua biodiversidade se torna cada vez mais reconhecida, estima-se que a Caatinga possui 1159 espécies endêmicas, dentre as quais várias possuem utilização medicinal descrita a partir dos saberes populares e tradicionais dos grupos que habitam a região. Entre as famílias de plantas adaptadas às condições típicas desse domínio fitogeográfico Capparaceae surge como uma das principais, devido a ampla distribuição e seu uso na medicina popular. Comumente conhecido como "incó" o *Neocalyptrocalyx longifolium* Mart. Cornejo & Iltis (syn. *Capparis jacobinae*) é endêmico do Nordeste brasileiro e indicado para o tratamento de problemas digestivos, dor abdominal, intoxicação, febre, diabetes, inflamação, problemas pulmonares, cardíacos e emenagogo. Apesar da vasta indicação, não há relatos na literatura sobre sua composição química. Assim, o objetivo deste trabalho é isolar e identificar as substâncias presentes em *N. longifolium*. O material vegetal, composto por partes subterrâneas, foi coletado no estado da Paraíba, identificado pelo Prof. Dr. José Iranildo Miranda e uma exsicata foi armazenada no Herbário Manuel de Arruda Câmara da Universidade Estadual da Paraíba, registrado no Sisgen sob o número A885D6F. A raiz foi seca, pulverizada e extraída em etanol. A solução utilizada foi concentrada em evaporador sob pressão reduzida. Em seguida, o extrato foi particionado, adicionando solventes imiscíveis entre si, de acordo com a polaridade. As soluções foram concentradas, a fase diclorometano foi fracionada por meio de coluna cromatográfica em sílica-gel, eluída com hexano e acetato de etila aumentando o gradiente de polaridade a partir de misturas binárias dos solventes utilizados. Depois disso, as frações foram purificadas por HPLC tendo como fase móvel metanol e água acidificada a 0,1%. As amostras foram analisadas por ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e sua fórmula molecular confirmada por espectrometria de massas de alta resolução. Os resultados permitiram identificar cinco substâncias; 5-etil-5-metil-oxazolidin-2-ona, 5-dimetil-oxazolidin-2-ona bem como 5-etil-5-metil-oxazolidin-2-tiona, 5-dimetil-oxazolidina-2-tiona e ácido siríngico isoladas pela primeira vez neste gênero. O estudo contribui para ampliar o conhecimento sobre espécies de Capparaceae neotropicais endêmicas do semiárido brasileiro.

Palavras-Chave: Caatinga, Capparaceae, *Neocalyptrocalyx longifolium* (incó), fitoquímica, oxazolidina-2-tiona

ABSTRACT

Caatinga is an ecosystem found exclusively in the northeastern region of Brazil, occupying a large geographical area, about 60% of its total area. Historically this biome has been associated with drought, in the 19th century von Martius defined it as "a leafless forest in summer". However, nowadays this perspective has changed and its biodiversity have been recognized, it is estimated that the Caatinga counts with 1159 endemic species, among them, several have medicinal uses described from the popular and traditional knowledge. Among the families of plants adapted to the typical conditions of this phytogeographic domain Capparaceae appears as one of the main ones, due to its number of widely distributed species and its use in popular medicine. Commonly known as "incó" *Neocalyptocalyx longifolium* Mart. Cornejo & Iltis (syn. *Capparis jacobinae*, *Cholicodendron longifolium*) is endemic to northeastern Brazil and indicated for the treatment of several diseases such as; digestive problems, abdominal pain, intoxication, fever, diabetes, inflammation, lung, heart and emenagogue problems. Despite the vast indication, there are no reports in the literature on its chemical composition. Thus, the objective of this work is to isolate and identify the substances present in *N. longifolium*. The plant material, composed of underground parts, was collected in the State of Paraíba, identified by Prof. Dr. José Iranildo Miranda and stored as a voucher at Herbário Manuel de Arruda Câmara of the State University of Paraíba, registered at Sisgen under number A885D6F. The root was dried, pulverized and extracted in ethanol. The solution used was concentrated in an evaporator under reduced pressure at 40 ° C. Then, the extract was partitioned, adding solvents increasing the polarity order. The solutions were concentrated, and the dichloromethane phase fractionated by means of a chromatographic column, on silica gel with hexane and ethyl acetate in a gradient. After that, the fractions were purified by HPLC using MeOH / H₂O as the mobile phase. The samples were analyzed by ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance and their molecular formula confirmed by high resolution mass spectrometry. The results allowed the identification of 5-dimethyl, 5-ethyl-5methyl oxazolidine-2-one and 5-dimethyl, 5-ethyl-5methyl oxazolidine-2-thione and syringic acid all isolated for the first time in this genus. This study contributes to expand the knowledge about Neotropical Capparaceae species endemic in the Brazilian semiarid region.

Keywords: Caatinga, Capparaceae, *Neocalyptocalyx longifolium* (incó), phytochemistry, oxazolidine-2-thione.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa apresentando a distribuição global das espécies de Capparaceae.....	5
Figura 2: Mapa apresentando as principais áreas de endemismo das espécies de Capparaceae neotropicais.....	7
Figura 3: Mapa apresentando a distribuição de <i>Neocalyptrocalyx</i> no Brasil..	8
Figura 4: Imagens de <i>Neocalyptrocalyx longifolium</i>	9
Figura 5: Estrutura básica de um glucosinolato.....	12
Figura 6: Alongamento de cadeia de aminoácidos.....	14
Figura 7: Biossíntese do núcleo glucosinolato.	15
Figura 8: Mecanismo geral da ação da mirosinase sobre glucosinolatos.	17
Figura 9: Mecanismo clássico do rearranjo de Lossen.	19
Figura 10: Esquema geral da biossíntese de isotiocianatos.	19
Figura 11: Esquema geral da biossíntese de oxazolidino-2-tionas.	23
Figura 12: Estrutura química de goitrina	23
Figura 13: Métodos convencionais para análise de glucosinolatos.....	27
Figura 14: Estrutura do composto identificado como NL-1.....	39
Figura 15: Espectro no infravermelho de NL-1.....	39
Figura 16: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, Acetona-d6) de NL-1.	40
Figura 17: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, Acetona-d6) de NL-1.	40
Figura 18: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, Acetona-d6) de NL-1.	41
Figura 19: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, Acetona-d6) de NL-1.	41
Figura 20: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, Acetona-d6) de NL-1.	42
Figura 21: Mapa de contorno ^1H x ^{13}C HMBC (400 e 100 MHz, Acetona-d6) de NL-1.	42
Figura 22: Expansão do mapa de contorno ^1H x ^{13}C HMBC (400 e 100 MHz, Acetona-d6) de NL-1.	43

Figura 23: Estrutura do composto identificado como NL-2.....	45
Figura 24: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOD) de NL-2.	45
Figura 25: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) de NL-2.	46
Figura 26: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) de NL-2.	46
Figura 27: Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (400 e 100 MHz, MeOD) de NL-2.	46
Figura 28: Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (400 e 100 MHz, MeOD) de NL-2.	47
Figura 29: Estrutura do composto identificado como NL-3.....	49
Figura 30: Espectro de infravermelho do composto identificado como NL-3. ..	50
Figura 31: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona-d6) do composto identificado como NL-3.....	51
Figura 32: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona-d6) do composto identificado como NL-3.	51
Figura 33: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, acetona-d6) do composto identificado como NL-3.....	52
Figura 34: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, acetona-d6) do composto identificado como NL-3.	52
Figura 35: Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400, 100 MHz, acetona-d6) do composto identificado como NL-3.	53
Figura 36: Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400, 100 MHz, acetona-d6) do composto identificado como NL-3.	53
Figura 37: Estrutura do composto identificado como NL-4.....	55
Figura 38: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona-d6) do composto identificado como NL-4.....	55
Figura 39: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona-d6) do composto identificado como NL-4.	56
Figura 40: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, acetona-d6) do composto como NL-4 identificado.	56
Figura 41: Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400, 100 MHz, acetona-d6) do composto identificado como NL-4.	57
Figura 42: Expansão do Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400, 100 MHz, acetona-d6) do composto identificado como NL-4.	57

Figura 43: Estrutura do composto identificado como N L-5.....	58
Figura 44: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona-d6) do composto identificado como NL-5.....	58
Figura 45: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, acetona-d6) do composto identificado como NL5.....	59
Figura 46: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, acetona-d6) do composto identificado como NL-5.	60
Figura 47: Cromatograma de ions totais da fase butanólica	61
Figura 48: Fragmentos resultantes da transferência de sulfato.....	62
Figura 49: Fragmentos comuns formados a partir da tioglicose.....	63
Figura 50: Espectro de massas com fragmentos em MS^2 e MS^3 do pico 1.	64
Figura 51: Via de fragmentação de glucoconringina.	64
Figura 52: Espectro de massas com fragmentos em MS^2 e MS^3 do pico 2.	65
Figura 53: Via de fragmentação de glucocleominaa.	65
Figura 54: Espectro de massas com fragmentos em MS^2 e MS^3 do pico 3.	66
Figura 55: Via de fragmentação de progoitrina.	66

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Fracionamento da fase diclorometano e rendimento das frações	34
Fluxograma 2: Isolaento das substancias NL-2 a NL-5 a partir das frações cinco a oito.	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Exemplos de algumas substâncias isoladas de espécies de Capparaceae.....	10
Quadro 2: Estruturas de alguns isotiocianatos isolados em Capparaceae.	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de cleomina.	43
Tabela 2: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de conringina	48
Tabela 3: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de 5-etil-5-metil-oxazolidin-2-ona.	54
Tabela 4: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de 5-dimetil-oxazolidin-2-ona.	58
Tabela 5: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) do ácido siríngico.	60
Tabela 6: Perfil de glucosinolatos presentes na fase butanol da raiz <i>N. longifolium</i>	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APT	“Attached Proton Test”
AcOEt	Acetato de etila
BB	Broad Band
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CD3OD	Metanol deuterado
CHCl ₃	Clorofórmio
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Da	Dalton
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
dddd	Duplo duplo duplo dubleto
EEB	Extrato etanólico bruto
EM	Espectrometria de massas
ESI	“Electrospray ionization”
EtOH	Etanol
gr	grama(s)
HMBC	“Heteronuclear Multiple Bond Correlation”
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRESI-MS	“High Resolution Eletron Spray Ionization Mass Spectra”
J	Constante de acoplamento
m	Multiplete
MALDI-TOF	“Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight”
MeOH	Metanol
MSI	“Mass spectra image”
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos	
ppm	Partes por milhão
R _f s	Fatores de retenção

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
UHPLC-Q-Orbitrap-MS	“Ultra high pressure liquid chromatography quantitative – outer barrel-like íon trap mass spectrometry”
s	Simpleto
sl	Simpleto largo
t	Tripleto
tl	Tripleto largo
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REFERENCIAL TEÓRICO	5
2.1. Considerações sobre a família Capparaceae	5
2.2. Considerações sobre o gênero <i>Neocalyptrocalyx</i> e a espécie <i>N. longifolium</i>	7
2.2.1. <i>Neocalyptrocalyx</i>	8
2.2.2. <i>Neocalyptrocalyx longifolium</i> (Martius) Cornejo & Iltis	8
2.3. Composição química da família Capparaceae	10
2.3.1. Glucosinolatos	12
2.3.1.1. Aspectos gerais	12
2.3.1.2. Biossíntese.....	13
2.3.1.3. Atividade biológica.....	15
2.3.2. Substâncias derivadas de glucosinolatos	16
2.3.2.1. Mirosinases.....	16
2.3.2.2. Isotiocianatos	18
2.3.2.2.1. Aspectos gerais	18
2.3.2.2.2. Biossíntese.....	18
2.3.2.2.3. Atividade biológica	20
2.3.2.3. Oxazolidino-2-tionas	22
2.3.2.3.1. Aspectos gerais	22
2.3.2.3.2. Biossíntese.....	22
2.3.2.3.3. Atividade biológica	23
2.3.3. Identificação de glucosinolatos e seus derivados.....	24
3. OBJETIVOS.....	29
3.1. Objetivo geral	29
3.2. Objetivos específicos.....	29
4. METODOLOGIA.....	31
4.1. Coleta e identificação do material vegetal	31
4.2. Processamento das raízes de <i>Neocalyptrocalyx longifolium</i>	31
4.3. Partição do EEB.....	31

4.4. Isolamento e purificação dos constituintes químicos de <i>N. longifolium</i> ...	32
4.4.1. Métodos cromatográficos	32
4.4.2. Métodos espectroscópicos	33
4.4.2.1. Infravermelho	33
4.4.2.2. Ressonância Magnética Nuclear	33
4.4.3. Técnicas hífenadas	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1. Determinação estrutural de NL-1	37
5.2. Determinação estrutural de NL-2	44
5.3. Determinação estrutural de NL-3	48
5.4. Determinação estrutural de NL-4	54
5.5. Determinação estrutural de NL-5	58
5.6. Proposta de Identificação de compostos por HPLC-EM.....	60
6. CONCLUSÕES.....	69
7. REFERÊNCIAS	71

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais possuem propriedades curativas conhecidas por gerações, são utilizadas frente a várias doenças e são vistas como fonte de substâncias com potencial bioativo. O conhecimento acerca da composição química dessas plantas é obtido a partir dos estudos fitoquímicos que fornecem a base científica para atestar eficácia e segurança das substâncias presentes nos vegetais, também buscam conhecer as rotas biossintéticas envolvidas na produção dessas substâncias (SIMÕES et al., 2016). Assim, além de inspirar pesquisas de síntese em laboratório, identificam aplicações tecnológicas para substâncias e enzimas, importantes no desenvolvimento de processos e produtos em indústrias (VERPOORTE; CONTIN; MEMELINK, 2002, BHAGYAWANT; SRIVASTAVA, 2019).

Os biomas brasileiros são conhecidos pela sua ampla biodiversidade, contudo, dentre os domínios fitogeográficos a Caatinga é proporcionalmente a menos estudada. Por isso, sua diversidade biológica tem sido subestimada apesar de abrigar cerca de mil espécies endêmicas (LEAL; TABARELLI; SILVA, 2003) muitas delas representantes de Capparaceae, ainda desconhecidas do ponto de vista químico e farmacológico.

Capparaceae é uma família botânica de distribuição tropical e possui várias espécies com utilização medicinal em diferentes partes do mundo como; *Capparis spinosa* L., alcaparra, *Capparis flexuosa* L., o feijão bravo, e *Crataeva tapia* L., trapiá, entre outras (ALBUQUERQUE et al., 2011). Acerca da diversidade química, além de terpenoides, esteroides, flavonoides e alcaloides, a presença de tiocompostos, principalmente glucosinolatos, e nitrilas também é relatada em nessa família.

Entre as espécies de Capparaceae endêmicas, o semiárido brasileiro abriga *Neocalyptocalyx longifolium* Mart. Cornejo e Iltis. Conhecida popularmente como incó, tem ampla utilização medicinal na região nordeste no combate de diarreia, pneumonia e bronquite (ALBUQUERQUE et al., 2007). Com relação aos seus constituintes químicos, poucos estudos são relatados apenas as partes aéreas foram analisadas e sendo indicada a ocorrência de

compostos fenólicos e glucosinolatos. Não foram encontrados registros de atividade farmacológica.

Considerando o potencial químico da família e a escassez de estudos da espécie, endêmica do semiárido, este trabalho tem como objetivo contribuir com a caracterização do perfil fitoquímico das Capparaceae neotropicais a partir do estudo das raízes *Neocalyptrocalyx longifolium* Mart. Cornejo & Iltis.

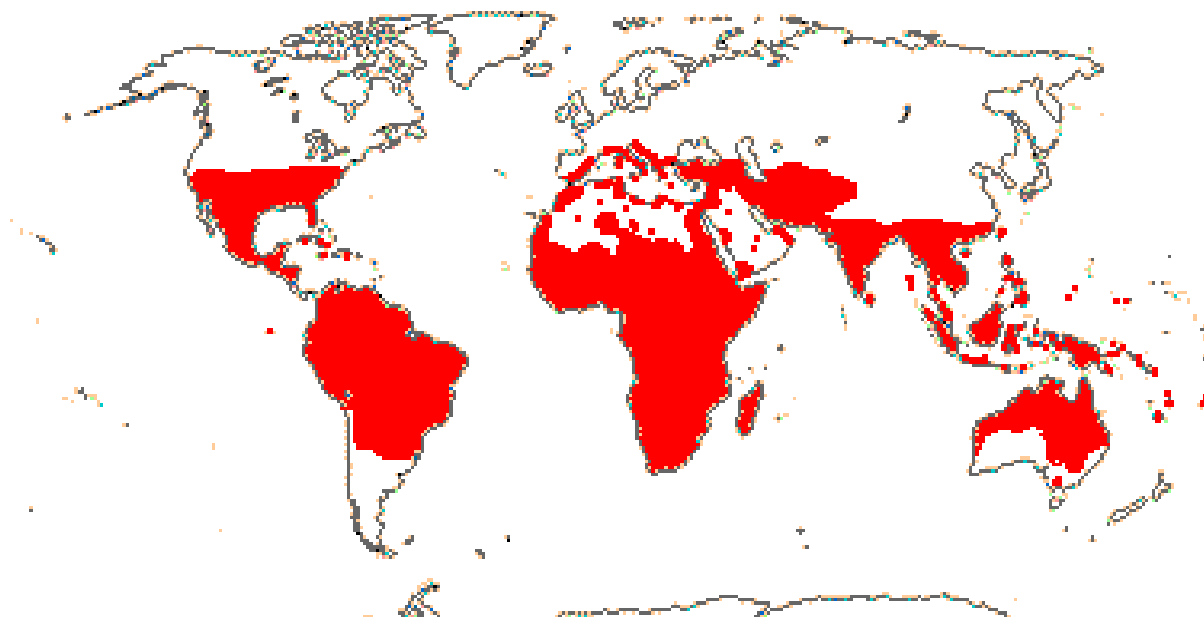
Referencial teórico

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Considerações sobre a família Capparaceae

Capparaceae é uma família botânica composta por 33 gêneros e cerca de 700 espécies, constituídas por ervas, sub-arbustos, arbustos ou árvores, e estão presentes em habitats por várias regiões do planeta (Figura 1), como áreas tropicais, subtropicais e regiões temperadas. De acordo com Kers (2003) é possível encontrar espécies em ampla faixa de altitude, variando desde o nível próximo ao mar até 2600 m, de florestas tropicais a savanas, em sua maioria adaptadas à aridez e habitats abertos.

Figura 1: Mapa apresentando a distribuição global das espécies de Capparaceae.



Fonte: Disponível em Blažević et al., 2014.

O uso medicinal de suas espécies é relatado em diferentes regiões do mundo. Na África, espécies do gênero *Cadaba* e *Boscia* são bastante utilizadas; *C. glandulosa* Forssk, *C. farinosa* Forssk e *C. natalensis* Sond são empregadas para o tratamento de ferimentos tópicos, problemas hemorrágicos, desordens menstruais e dores no peito (RIBEIRO et al., 2010; HASSAN-ABDALLAH et al.,

2013). Ao passo que *Boscia angustifolia* A. Rich é usada no tratamento de oftalmias e neuralgia, e também na profilaxia dos sintomas decorrentes da malária (CHIBI et al., 1992).

No contexto medicinal, também é atribuído destaque às espécies do gênero *Capparis*, este táxon é o maior da família e tem como um dos seus componentes *C. decídua* Forsk Edgew (Figura 2), utilizada na medicina ayurveda e em outros vários sistemas de medicina tradicional (SHARMA et al., 2010; DHAKAD et al., 2016; NAZAR, 2020). Outro exemplo é a *C. spinosa*, utilizada nos países mediterrâneos por suas propriedades curativas frente a problemas gastrointestinais, hipertensão, anemia, disfunção hepática, reumatismo e diabetes, os primeiros registros de uso datam desde a babilônia (JIANG et al., 2007; GULL et al., 2014; ANWAR et al., 2016).

Na América Latina, as espécies de *Capparaceae*, possuem características morfoanatômicas diferentes daquelas encontradas nas outras regiões do mundo. Devido a isso, desde a última década, elas têm sido reclassificadas compondo o grupo das “Capparaceas Neotropicais”. Segundo essa divisão, cerca de 104 espécies se agruparam em 20 novos gêneros, também denominados como “taxa do novo mundo” (CORNEJO, 2018), ainda pouco conhecidos do ponto de vista químico e farmacológico.

No Brasil são reconhecidos 12 gêneros e 28 espécies de *Capparaceae*. O clima semi-árido torna o Nordeste brasileiro uma das regiões com alto índice de endemismo das espécies neotropicais, Figura 2 (GOMEZ; ESCALANTE, 2018; GOMEZ et al., 2020). Assim, esta família aparece como uma das principais, seja pelo número de espécies ou por sua ampla distribuição (SOARES NETO et al., 2014).

Figura 2: Mapa apresentando as principais áreas de endemismo das espécies de Capparaceae neotropicais.



Fonte: Disponível em Gomez; Escalante, 2018.

Dentre as espécies com ocorrência na Caatinga, algumas possuem relatos de uso medicinal como a *Capparis flexuosa* L., conhecida como feijão bravo é utilizada por comunidades rurais e indígena Fulni-ô, no interior do estado de Pernambuco (ALBUQUERQUE et al., 2011). Outra espécie que pode ser citada é *Crataeva tapia* Linn, ou trapiá, que possui vários usos descritos, inclusive atividade angiogênica e antitumoral comprovada recentemente (SHARMA; PATIL; PATIL, 2013; BATISTA et al., 2019; FERREIRA et al., 2013).

O semiárido abriga ainda espécies de quatro gêneros neotropicais, dentre estes se destaca *Neocalyptrocalyx*, por ser endêmico do Nordeste brasileiro e ter a espécie *N. longifolium* Mart. Cornejo e Iltis, utilizada medicinalmente pela população em Pernambuco, Rio Grande do Norte e Paraíba no combate a diversas afecções (SOARES NETO; JARDIM, 2015).

2.2. Considerações sobre o gênero *Neocalyptrocalyx* e a espécie *N. longifolium*

2.2.1. *Neocalyptrocalyx*

A etimologia do termo *Neocalyptrocalyx* deriva de aspectos morfológicos. Este gênero compreende sete espécies, encontradas ao leste da Venezuela, Guianas e Brasil (ILTIS et al., 1996). Dentre estas, cinco possuem ocorrência relatada no Brasil, distribuídas principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país, conforme Figura 3.

Figura 3: Distribuição do gênero *Neocalyptrocalyx* no Brasil.



Em verde; *N. lepieuri*, em rosa claro; *N. longifolium* e *N. nectareus*, em rosa escuro; *N. eichleriana* e *N. grandipetala*.

Fonte: Disponível em <http://reflora.jbrj.gov.br/>. Acessado em 10 de janeiro de 2020.

2.2.2. *Neocalyptrocalyx longifolium* (Martius) Cornejo & Iltis

Conhecida popularmente como incó ou incó verdadeiro, *N. longifolium* Mart. Cornejo e Iltis, figura 4, é uma árvore ou arbusto de até 2,5 m de altura e

ocorrência restrita ao Nordeste brasileiro (GOMEZ; ESCALANTE, 2018) e possui diversas aplicações descritas na literatura.

Figura 4: Imagens de *Neocalyptrocalyx longifolium*.



Fonte: Disponível em: <http://biochapada.blogspot.com>. Acessado em 10 de janeiro de 2020.

Em seus estudos com comunidades no Pernambuco, Lucena et al (2007), Lucena et al (2008), Cruz et al (2013) e Cruz et al (2014) constataram a utilização de diferentes partes da planta; a madeira empregada como combustível, as sementes apesar de amargas são consumidas em bebidas quentes, em substituição ao café, enquanto as folhas, o tronco e as raízes como medicinais.

Nesse contexto, outros trabalhos relatam as propriedades medicinais de *N. longifolium*, Ferreira-Júnior et al (2011), trata sobre seu potencial anti-inflamatório, Trindade (2013) cita uso como abortivo, Almeida et al (2005) e Almeida et al (2006) descreve o uso das folhas contra intoxicação, febre, diabetes, diarreia, pneumonia e bronquite. Albuquerque et al (2007) cita a utilização de todas as partes da planta para o tratamento de tosse, coqueluche, resfriados, problemas digestivos, doenças de pele, dor abdominal, intoxicação, febre, diabetes, problemas pulmonares inflamatórios e problemas cardíacos. Agra et al (2007) também descreve as propriedades medicinais de toda a planta, atribuindo as raízes atividade emenagoga. Nestes estudos os autores destacam que estudos químicos e farmacológicos para espécie são escassos.

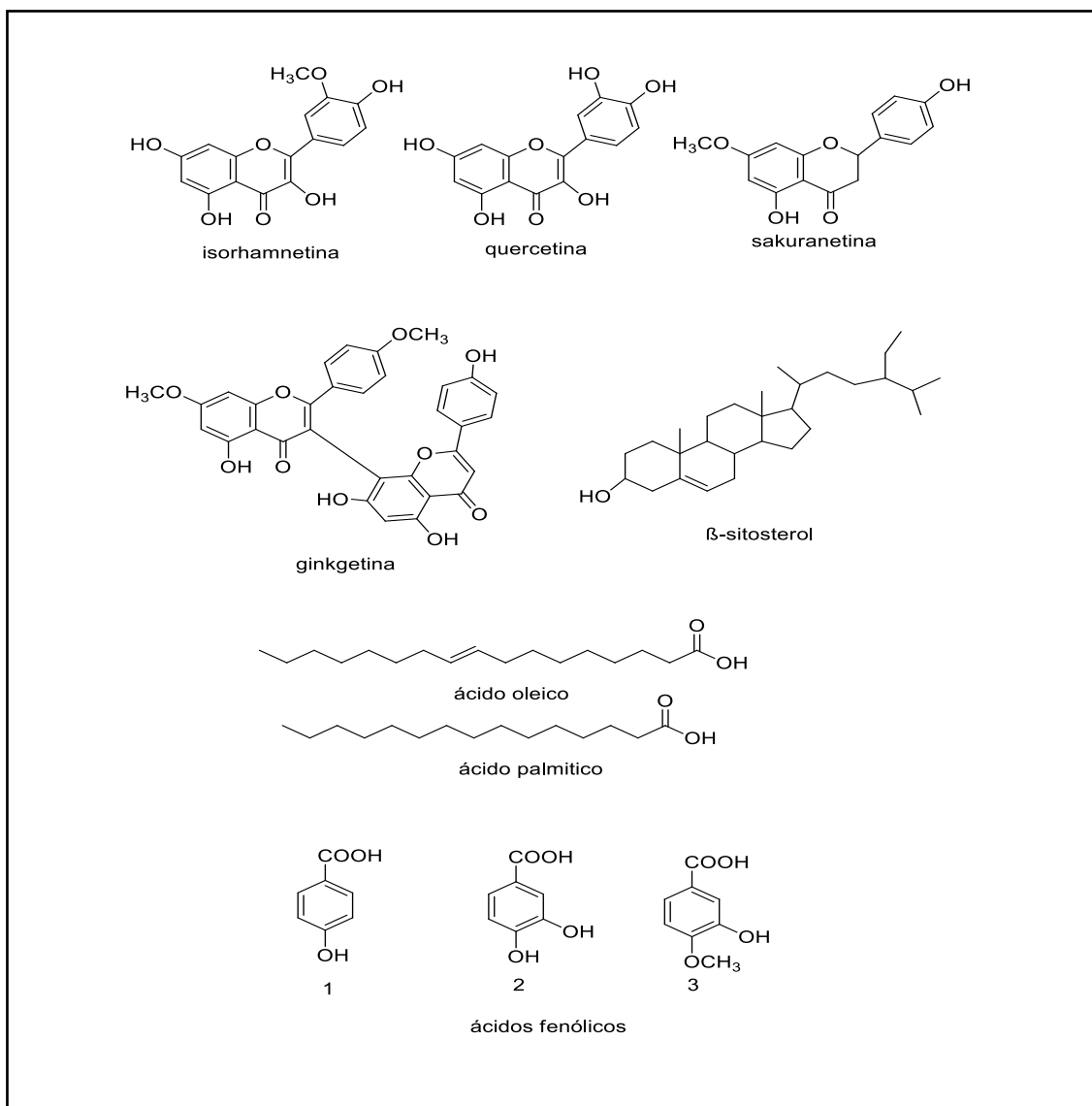
Acerca da composição química de *N. longifolium*, foram encontradas apenas duas referências; Almeida et al (2005) cita a presença de compostos

fenólicos e tânicos, enquanto Mithen et al (2010) indica a presença de hidroxi-butiril e hidroxi-pentil glucosinolatos, ambos nas partes aéreas.

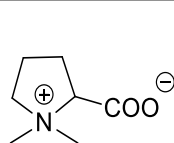
2.3. Composição química da família Capparaceae

A ampla utilização de espécies de Capparaceae no tratamento de doenças tem despertado o interesse da comunidade científica por substâncias com potencial farmacológico, estimulando a realização dos estudos fitoquímicos. Entre os metabólitos secundários identificados em espécies desta família, destacam-se flavonoides, esteroides, ácidos fenólicos, ácidos graxos, alcaloides derivados de espermidina e betaína, além de tiocompostos e nitrilas, evidenciadas no Quadro 1.

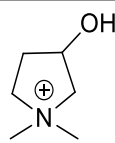
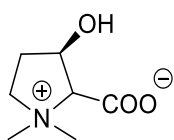
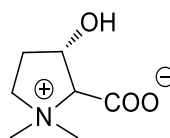
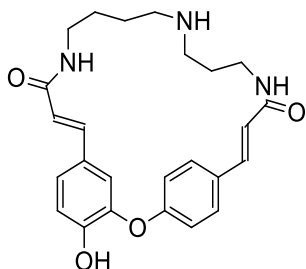
Quadro 1: Exemplos de algumas substâncias isoladas de espécies de Capparaceae.



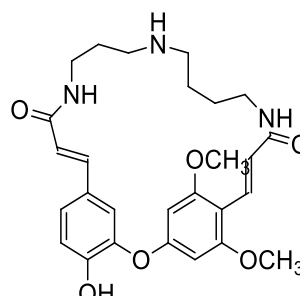
Continuação do quadro 1.



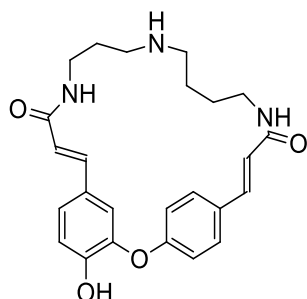
stachidrina

3- hydroxyl-1,1
-dimetilpirrolidíniotrans-3-hidroxi
prolinebetainacis-3- hidroxi
prolinebetaina

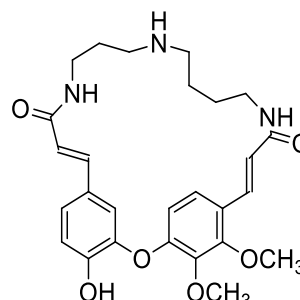
cadabicina



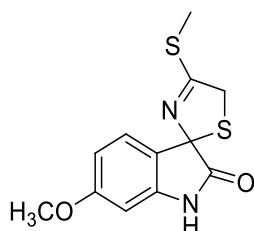
capparisinina



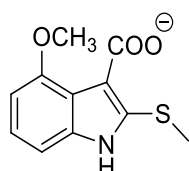
isocadabicina



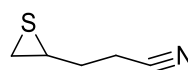
capparidisina



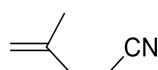
capparina A



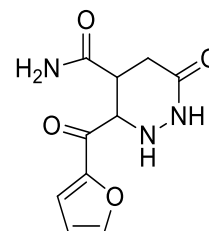
capparina B



epitionitrila



4-metil-4-pentenitrila



capparina C

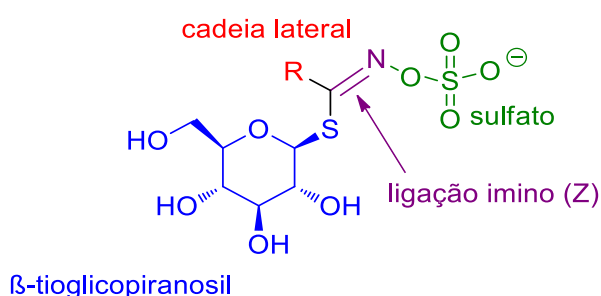
Entre os tiocompostos presentes em Capparaceae, os glucosinolatos podem ser considerados os mais importantes, pois além de compor um dos principais mecanismos químicos de defesa do organismo vegetal esta classe de ampla diversidade de estruturas, está intimamente relacionada a biossíntese de compostos biologicamente ativos, os quais vem sendo estudados contra diferentes tipos de câncer, doenças neurodegenerativas, entre outros.

2.3.1. Glucosinolatos

2.3.1.1. Aspectos gerais

Os glucosinolatos estão presentes em dezesseis famílias de angiospermas dicotiledôneas, incluindo um grande número de espécies comestíveis como brócolis, alcaparras, wassabi entre outras. São compostos por uma unidade hidrofílica de β -tioglucopiranosil e uma função anomérica O-sulfatada de (Z) tio-hidroximato a qual se conecta a uma cadeia lateral hidrofóbica cuja constituição deriva de α -aminoácidos (Figura 5) e representa a mais frequente variante estrutural da classe (IBRAHIM et al., 2018).

Figura 5: Estrutura básica de um glucosinolato.



Fonte: Adaptado de Ibrahim et al., 2018.

A diversidade química dos glucosinolatos resulta da ampla variedade de estruturas na cadeia lateral, as quais podem ser alifáticas, saturadas e insaturadas, conter átomos de enxofre e nitrogênio, indóis, carboidratos, anéis

aromáticos, entre outras (FAHEY et al., 2001). Estima-se que cerca de 137 glucosinolatos são conhecidos em plantas, destes, apenas 88 foram devidamente caracterizados a luz de técnicas espectroscópicas modernas (BLAŽEVIĆ et al., 2019), indicando que estudos de isolamento e determinação estrutural contribuem significativamente ao conhecimento desta classe.

2.3.1.2. Biossíntese

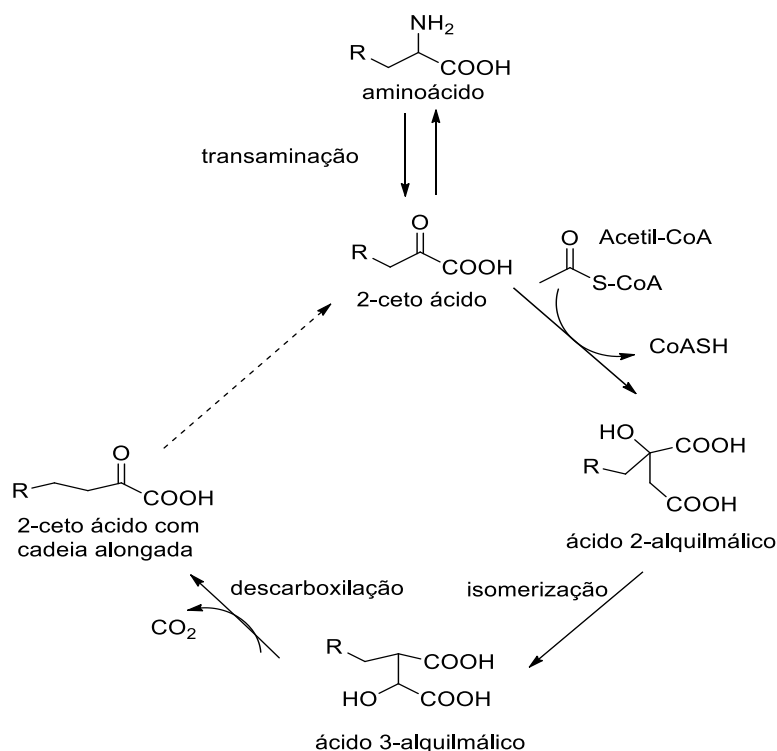
Os glucosinolatos são sintetizados a partir de um pequeno número de aminoácidos primários. Leucina, isoleucina, valina e metionina (aminoácidos de cadeia ramificada) originam os alifáticos, a fenilalanina (ou tirosina) está envolvida na produção dos aromáticos, enquanto o triptofano na formação dos indólicos (OLSEN et al., 2016).

A biossíntese desta classe de metabólitos secundários tem sido bastante estudada. Nesse sentido, o emprego de técnicas moleculares tem auxiliado na descoberta das sequências de genes, enzimas e mecanismos envolvidos nas rotas biossintéticas (WITTSTOCK; HELKIER, 2002). Os glucosinolatos alifáticos são predominantemente descritos em Brassicaceae, Cleomaceae e Capparaceae, famílias que apresentam alta afinidade filogenética entre si (LEITE; CASTILHO, 2017).

As reações que compõe a biossíntese dos glucosinolatos podem ser divididas em três etapas independentes. A primeira é o alongamento das cadeias de aminoácidos. A segunda envolve três reações: 1 - formação de aldoxima, 2 - formação de ácidos tio-hidroxicímicos e 3 - formação de desulfo-glucosinolatos e glucosinolatos. A terceira etapa resulta em modificações da cadeia lateral (BELL, 2019).

O alongamento das cadeias ocorre através da transaminação dos aminoácidos para produzir um α -cetoácido, seguida de condensação com acetil-CoA, passa por isomerização envolvendo uma mudança na oxidação do grupo hidroxila resultando em um cetoácido alongado, que é transaminado para formar o aminoácido alongado (GRASER et al., 2000), conforme representado na Figura 6.

Figura 6: Alongamento de cadeia de aminoácidos.



Fonte: Adaptado de Graser et al., 2000

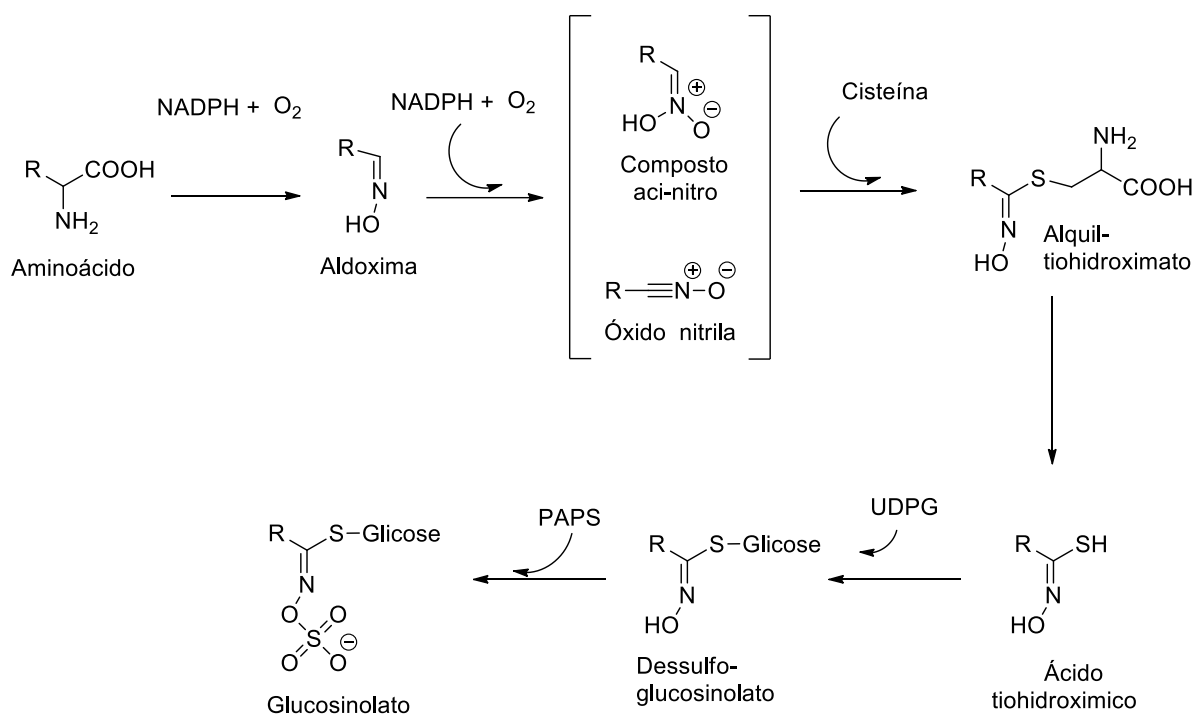
Cabe salientar que esse tipo de reação não é observado nos glucosinolatos derivados de triptofano e que o cetoácido alongado pode sofrer condensações adicionais com acetil-CoA para resultar em múltiplos alongamentos da cadeia (QUIROS et al., 2000).

Nas reações da segunda etapa, o núcleo do glucosinolato é constituído pela ação dos citocromos P450 (CYP) a partir da formação da aldoxima. Cada aminoácido precursor sofre ação de uma enzima específica, as CYP79B2 e CYP79B3 metabolizam triptofano, CYP79A2 usa fenilalanina como substrato, enquanto CYP79F1 e CYP79F2 convertem derivados de metionina. (SØNDERBY et al., 2010).

Em seguida, formam-se os ácidos tio-hidroximicos a partir oxidação da aldoxima que é acelerada pelos catalisadores CYP83A1 ou / e CYP83B1 para produzir um composto aci-nitro ou um composto de óxido de nitrila, que funciona como receptor de tiol. Depois disso, o ácido tio-hidroximico é formado pela clivagem do S-tioalquil-hidroximato em uma reação que catalisada por uma C-S

liase. Na última etapa, o tio-hidroxiato é S-glucosilado por um UDPG solúvel: a glicosiltransferase de tio-hidroxiato (S-GT) para produzir um desulfoglucosinolato. Este é sulfatado por uma 3-fosfoadenosina 5-fosfosulfato solúvel (PAPS): dessulfoglucosinolato sulfotransferase, conforme demonstrado na Figura 7 (VO, 2020).

Figura 7: Biossíntese do núcleo glucosinolato.



Fonte: Adaptado de Wittstock; Helkier, 2002.

Na terceira etapa, as modificações na cadeia lateral incluem oxigenações, hidroxilações, alquilações, benzoilações, glicosilações entre outros.

2.3.1.3. Atividade biológica

A literatura atribui várias atividades aos glucosinolatos. Chew (1988) avalia seu efeito contra diferentes organismos, principalmente insetos herbívoros e fungos. Brown e Morra (1995), relatam o potencial bioherbicida dos glucosinolatos. Entre outras atividades, Radošević et al (2017) comprova atividade antioxidante e antiproliferativa de glucosinolatos contra duas linhagens de células tumorais (MCF-7 e HeLa). Cuadrado et al (2019) descreve o potencial

inseticida frente a *Aphis cytisorum*, os autores Alshailabi e Kalifa (2019) tratam da atividade gastroprotetora do 3-indol-metil glucosinolatos em ratos.

Apesar de relatos semelhantes aos citados anteriormente serem comuns na literatura, atualmente é sabido que os glucosinolatos em sua forma natural são pouco ativos. Deste modo a resposta biológica é atribuída às substâncias derivadas dessa classe de metabólitos secundários (MANICI; LAZZERI; PALMIERI, 1997, ARGEBIRK et al 2009, HANDA, 2019).

2.3.2. Substâncias derivadas de glucosinolatos

Estudos fitoquímicos e metabólicos constataram que a chave para atividade biológica dos glucosinolatos é a ação de um grupo de enzimas, conhecido como mirosinases, estas convertem os glucosinolatos em diferentes metabólitos bioativos. Deste modo, as mirosinases são elemento de diversificação estrutural essencial para o estudo e compreensão dos mecanismos envolvendo a atividade dos glucosinolatos (KLIEBENSTEIN, KROYMANN, MITCHELL-OLDS, 2005; KROYMANN, 2011, FAHEY et al, 2012).

2.3.2.1. Mirosinases

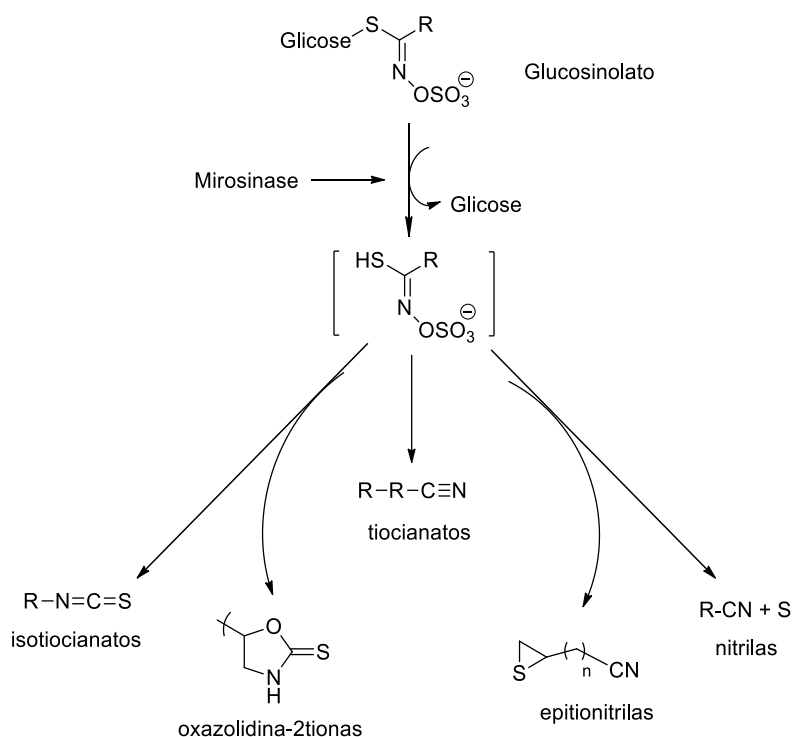
As mirosinases são tioglucosidases presentes em plantas, microorganismos e insetos. Estas enzimas são responsáveis pela hidrólise de glucosinolatos, pertencem a um grande grupo de β -glucosidases e são as únicas enzimas que catalisam a clivagem da ligação S-glicosídica usando ascorbato como cofator em um mecanismo de reação que mantém a configuração anomérica na clivagem (PARCHEM, PIEKARSKA; BARTOSZEK, 2020).

Na natureza são descritas múltiplas formas de mirosinase, o primeiro relato acerca da existência dessas isoenzimas foi publicado na década de 70 (Eriksson et al., 2001). As isoformas foram posteriormente atribuídas a diferentes subfamílias MA (Myr1), MB (Myr2) e MC que diferem na sequência genômica, peso molecular e solubilidade (livre ou associado a outras proteínas) (BHAT; VYAS, 2019).

Com relação à distribuição no organismo vegetal, os glucosinolatos são armazenados em vacúolos dispersos nas diferentes partes da planta (SHROFF, 2008). As mirosinases também são compartimentalizadas em células idioblásticas especializadas conhecidas como “células de mirosina”, presentes na superfície externa da parede celular da planta. Quando há injúria nos tecidos, seja causada por ataque de herbívoros ou mesmo durante a mastigação os compartimentos se rompem e constituem o sistema “glucosinolato-mirosinase” (CHEN, 2019).

O mecanismo envolvido no sistema “glucosinolato-mirosinase”, inicia-se a partir da liberação de um gluco-*D*-tiohidroximato-*O*-sulfatado instável. Dependendo da estrutura dos glucosinolatos precursores, das condições de hidrólise (pH, temperatura), presença de íons Fe^{2+} e fatores proteicos adicionais, a aglicona é convertida em substâncias de classes diferentes, incluindo: isotiocianatos, tiocianatos, nitrilas, epitionitrilas, oxazolidina-2-tionas e indóis, sendo estas as principais substâncias responsáveis pela defesa do organismo vegetal. Os produtos formados estão demonstrados na Figura 8 (EISENSCHMIDT-BONN et al., 2019).

Figura 8: Mecanismo geral da ação da mirosinase sobre glucosinolatos.



Fonte: Adaptado de Wittstock, 2002.

Além da biossíntese, a ação da tioglicosidase permite uma maior diversificação estrutural, uma vez que dependendo da cadeia lateral os glucosinolatos podem ser convertidos em diferentes entidades químicas. Deste modo, do ponto de vista farmacológico, a ação das mirosinases se torna uma fonte natural de substâncias bioativas, dentre as quais se destacam os isotiocianatos e oxazolidino-2-tionas.

2.3.2.2. Isotiocianatos

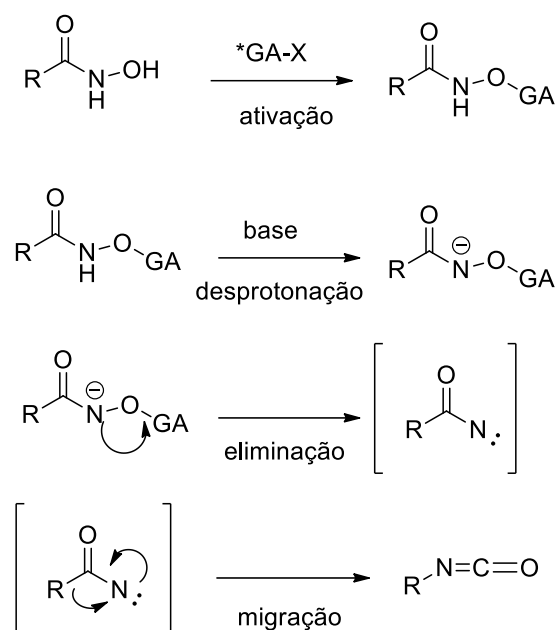
2.3.2.2.1. Aspectos gerais

Os isotiocianatos são ésteres do ácido isotiocianico (H-NCS). Eles também podem ser considerados como análogos de enxofre dos isocianatos (R-NCO), a medida que são isômeros dos tiocianatos (R-SCN) e isoelétricos com tiocetonas ($R_2C = C = S$) (SHARMA, 1989; KALA et al., 2018).

2.3.2.2.2. Biossíntese

A formação desta classe de metabólitos secundários ocorre via rearranjo de Lossen, que permite a conversão de ácidos hidroxâmicos em isocianatos conforme Figura 9 (THOMAS et al., 2019). Apesar desta reação ser conhecida a mais de um século, somente em 1956 foi proposta como mecanismo químico envolvida na hidrólise enzimática de glucosinolatos (ETTLINGER; LUNDEEN, 1956).

Figura 9: Mecanismo clássico do rearranjo de Lossen.

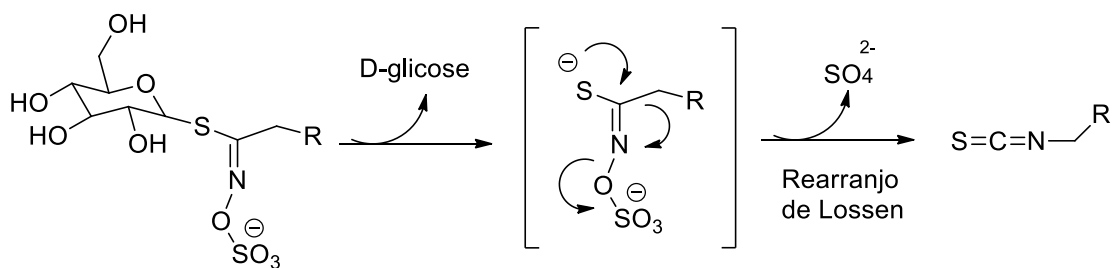


*GA - grupo abandonador

Fonte: Adaptado de Thomas et al., 2019.

Nos glucosinolatos, a formação dos isotiocinatos ocorre a partir da perda de sulfato, gerando um N com deficiência de elétrons, a qual é suprida a partir do recrutamento de uma ligação da cadeia lateral e formação simultânea de um S com ligação dupla usando elétrons do sulfeto. Em seguida, a aglicona instável passa por rearranjos, favorecidos em pH neutro, formando os isotiocinatos, conforme demonstrado na Figura 10 (PRIETO, 2019).

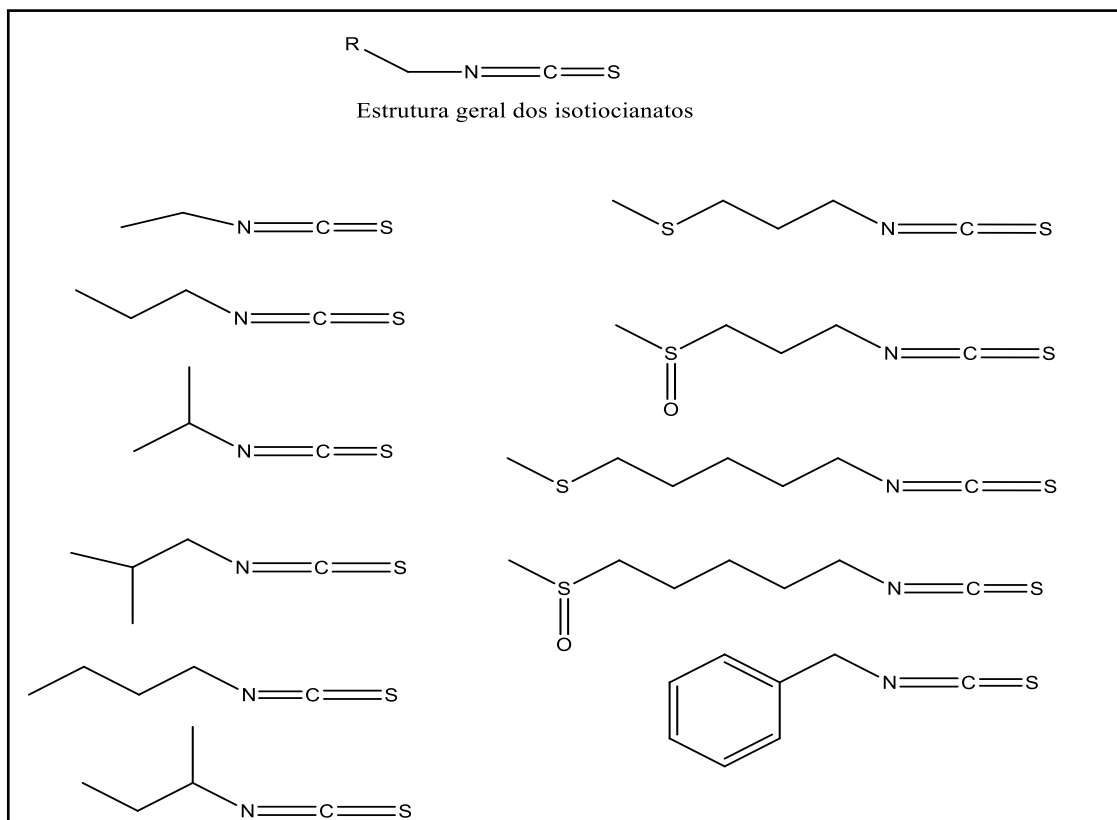
Figura 10: Esquema geral da biossíntese de isotiocinatos.



Fonte: Adaptado de Rollin, 2011.

Os isotiocianatos, similarmente aos seus precursores biossintéticos, podem ser classificados de acordo com sua cadeia lateral. Assim, apresentam composição química diversificada e podem ser alifáticos, sulfurados, aromáticos, indólicos entre outros, sendo mais comuns em Capparaceae os isotiocianatos alifáticos (quadro 3).

Quadro 2: Estruturas de alguns isotiocianatos isolados em Capparaceae.



2.3.2.2.3. Atividade biológica

Com relação à atividade biológica, isotiocianatos apresentam resultados frente a diversos alvos, o átomo de enxofre em sua estrutura lhes confere propriedades farmacológicas singulares. Os compostos organossulfurados estão entre as classes de medicamentos mais prescritos nos Estados Unidos (AYELEN e RAMALLO 2018). Deste modo, o estudo de identificação e isolamento de tiocompostos naturais apresenta grande potencial para descoberta de novas substâncias bioativas.

Dentre os isotiocianatos os do tipo alil, benzil e metilsulfinil são extensivamente estudados, sua atividade antibacteriana e antifúngica, neuroprotetora, anti-inflamatória e antitumoral são bem relatadas na literatura.

Nesse contexto, os isotiocianatos apresentaram alta atividade antimicrobiana frente a bactérias gram-positivas, gram-negativas e também contra fungos, sendo o benzil-isotiocinato tão ativo quanto sulfato de estreptomicina (MASUDA et al., 2001; MELROSE, 2019; BLAŽEVIĆ et al., 2019; BLAŽEVIĆ et al., 2020). Romeo et al (2018) trata sobre propriedades antimicrobianas de isotiocianatos e seu mecanismo de ação contra patógenos humanos resistentes a terapias convencionais. Também é possível citar a ação de isotiocianatos sobre o *quórum sensing* em biofilmes (GANIN et al., 2013) e fatores de virulência de fungos e bactérias (SILVA et al., 2016; YANG et al., 2020).

A atividade neuroprotetora foi demonstrada por 4- α -L-raminopiranosil-oxibenzil isotiocianato no combate à astrocitoma maligno e neuroblastoma em células humanas (RAJAN et al., 2016; JAFARU et al., 2019). Os isotiocianatos naturais também foram ativos contra doenças neurodegenerativas, entre estas; Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson e dois tipos de esclerose; múltipla e lateral amiotrófica (ANGELONI et al., 2016).

Os alil isotiocianatos também apresentam atividade anti-inflamatória, incorporados em nanopartículas, reduziram a produção de fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-6, NO e iNOS induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em macrófagos RAW 264.7, o 4-metilsulfinilbutil isotiocianato também apresentou resultados similares (CHANG et al., 2019; VO et al., 2019).

Uma das atividades mais proeminentes dessa classe é o efeito quimioprotetor (substâncias que interferem no processo de desenvolvimento de câncer ou carcinogênese antes que ocorra invasão e metástase) (SURH, 2003), normalmente associado ao consumo de vegetais. A maioria dos isotiocianatos dietéticos, são formados pela ação de mirosinases provenientes das bactérias gastrointestinais (ZHANG; TALALAY, 1994). Deste modo, sua formação a partir da mirosinase é essencial à atividade biológica (GUPTA et al., 2014). Entre os isotiocianatos mais estudados estão sulforafano e sulforafeno, ativos frente a

diversas linhagens de células tumorais (CHENG et al., 2020; BAIRD; YAMAMOTO 2020, KABOLI et al., 2020).

Atualmente, os isotiocianatos são objetos de pesquisas relacionadas ao autismo (NADEEM et al., 2019; NADEEM et al., 2020). Além disso, o metil-isotiocianato (encontrado em espécies de capparaceas), é muito utilizado na indústria de medicamentos como componente químico básico na síntese de ranitidina e cimetidina. Além disso, essa substância é usada diretamente na proteção de solos contra fungos e nematódeos (RECIO et al., 2017).

2.3.2.3. Oxazolidino-2-tionas

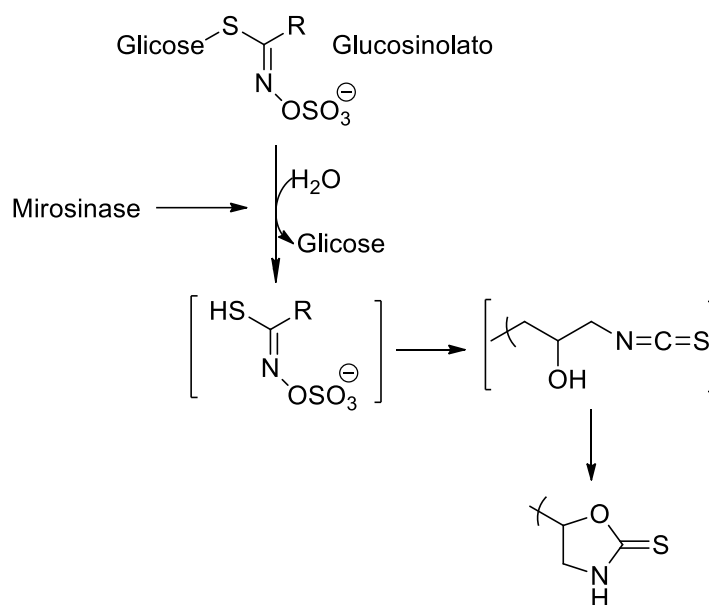
2.3.2.3.1. Aspectos gerais

No reino vegetal a ocorrência de tiocarbamatos pode ser considerada rara, pois apenas alguns táxons possuem enzimas capazes de incorporar enxofre ao seu metabolismo secundário e arranjá-lo de modo a constituir esse grupo. No entanto, em capparaceas a presença de oxazolidinotionas, tiocarbamatos cíclicos é bem descrita (DAXENBICHLER et al., 1991; SMOLINSKA et al. ,1997; IRANSHAHI, 2012)

2.3.2.3.2. Biossíntese

Oxazolidinotionas naturais também são produtos da ação das mirosinases. Porém, se formam em pH neutro, apenas quando a cadeia lateral contém um grupo hidroxila na posição β , representado na Figura 11. Por meio de adição nucleofílica ocorre uma ciclização espontânea resultando em oxazolidino-2-tionas (ORTIZ; SANSINENEA, 2014).

Figura 11: Esquema geral da biossíntese de oxazolidino-2-tionas.

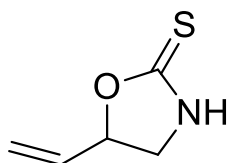


Fonte: Adaptado de Barba et al., 2016

2.3.2.3.3. Atividade biológica

Em humanos e animais, goitrógenos são substâncias que interferem na síntese da tiroxina, reduzindo drasticamente o suprimento de iodo à glândula tireóide, resultando no desenvolvimento de bócio e outros problemas associados (DI GIOIA, 2020). Historicamente, as oxazolidino-2-tionas naturais são objeto de estudo principalmente devido ao seu efeito antinutricional como compostos goitrogênicos (GREER 1956; TAMER, SUNA e ÖZCAN-SINIR, 2019). Dentre a classe, o composto 5-viniloxazolidina-2-tiona (goitrina), Figura 12, é um dos goitrógenos naturais mais conhecidos, tanto pela sua ampla ocorrência quanto pela sua toxicidade (WONG, 2017).

Figura 12: Estrutura química de goitrina



Fonte: o autor

Assim como os isotiocianatos, as oxazolidinotinas se formam no organismo humano a partir da ação de bactérias presentes no trato gastrointestinal (OGINSKY; STEIN; GREER, 1965). Considerando o uso medicinal e alimentício das espécies produtoras de oxazolidinotinas, vários estudos foram desenvolvidos no intuito de identificar e monitorar o teor destas substâncias bem como seus precursores, os glucosinolatos, seja em amostras vegetais ou biológicas (BERTUZZI et al., 2016, LI et al., 2019, ISO 9167:2019).

Apesar do potencial gointrogênico evidenciado pela literatura, outras atividades biológicas de oxazolidino-2-tionas são pouco conhecidas. Nesse contexto, observa-se que a reinvestigação de alguns metabólitos desta classe tem levado a novas descobertas, como atividade anti-inflamatória testada em cultura de células *in vitro* (RADULOVIĆ et al., 2017) e antiviral *in vitro*, frente ao vírus influenza A (H1N1) (NIE et al., 2020).

Ambos os trabalhos citados apontam uma característica importante tanto do ponto de vista químico quanto do biológico a estereoquímica do carbono quiral (C-5) é determinante à atividade, ratificando a necessidade de novos estudos que permitam a melhor compreensão sobre as oxazolidino-2-tionas naturais e seu uso no âmbito farmacológico.

Com relação a outras aplicações, o interesse em oxazolidina-2-tionas permanece constante ao longo dos anos. Isso porque essas substâncias têm sido direcionadas para a preparação de auxiliares quirais eficientes, tornando-se ferramenta chave na síntese assimétrica. Consequentemente, possibilitando a obtenção de um grande número de compostos com atividades biológicas diversificadas (MORALES-NAVA e OLIVO, 2019).

2.3.3. Identificação de glucosinolatos e seus derivados

Inicialmente a análise do glucosinolatos era baseada exclusivamente a partir dos produtos da ação das mirosinase, o que representava um obstáculo analítico, uma vez que dependendo de cada planta diferentes metabólitos são formados, alguns podem ser instáveis ou bastante reativos como é o caso dos isotiocianatos, sensíveis a reagentes nucleofílicos.

A reatividade dos isotiocianatos foi bastante utilizada no intuito de possibilitar identificação desses metabólitos a partir de técnicas espectroscópicas, Figura 13. Quando reagidos com amônia e aminas, produzem tioureias substituídas que absorvem a 243 nm. Os isotiocianatos também podem ser facilmente transformados em tiocarbamatos, por reação com álcoois, que absorvem a na faixa de 244 nm no UV. No entanto, alguns glucosinolatos contêm grupos aromáticos e produzem isotiocianatos instáveis, portanto, ao final da reação outros produtos podem ser identificados (WETTER; YOUNGS, 1976; OLSEN; SØRENSEN, 1981).

Com relação aos isotiocianatos e nitrilas, não são detectáveis espectrometricamente, sendo analisados por cromatografia gasosa (CG). Deste modo, o CG-EM é amplamente utilizado na análise dessas substâncias. Contudo, algumas cadeias laterais dos glucosinolatos produzem derivados pouco voláteis, contendo indóis ou hidroxilas, por exemplo. Nesse sentido, recomenda-se utilização de HPLC, ideal para análise de oxazolidinotinas e indóis (VERKERK; MATTHIJS, 2008).

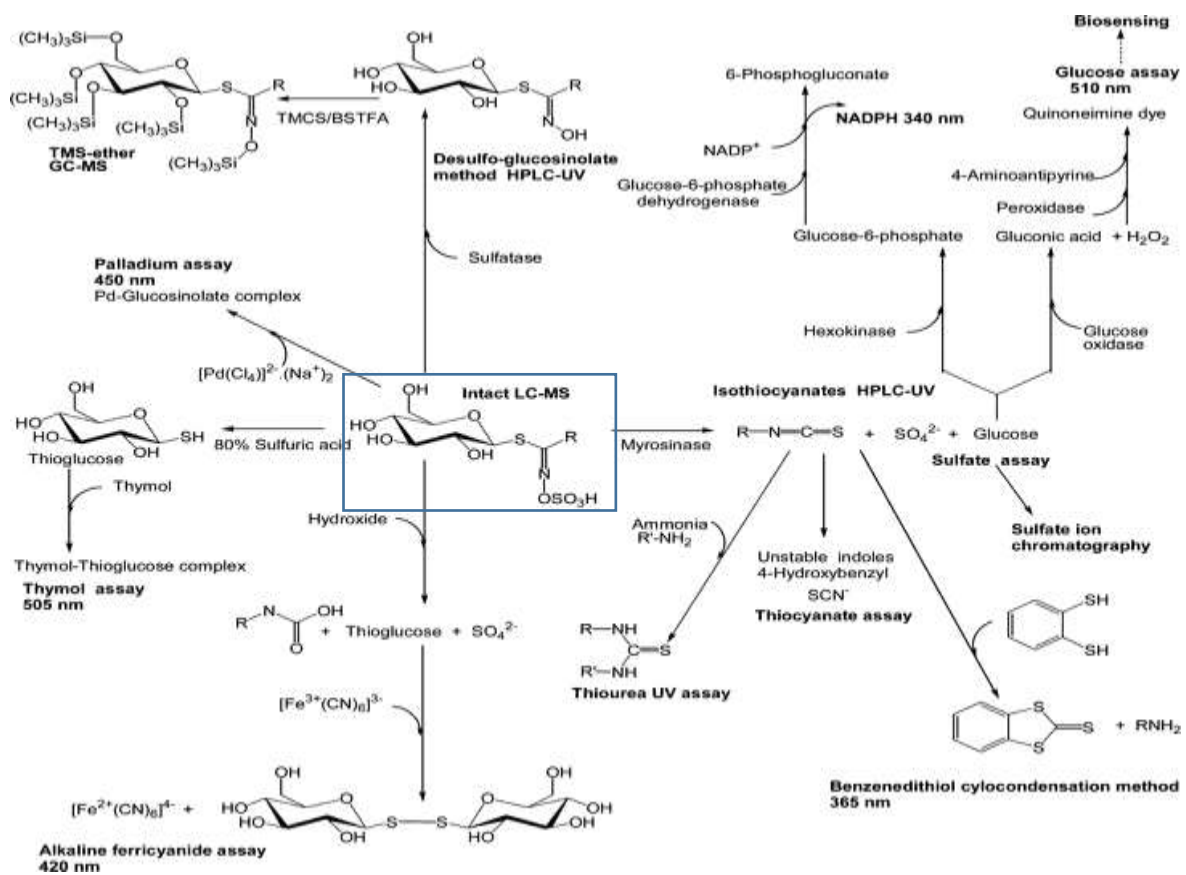
A partir da década de 80 o HPLC passou a ser empregado na análise de glucosinolatos intactos e desulfatados. Porém, o isolamento de glucosinolatos ainda é uma tarefa laboriosa uma vez que são moléculas altamente carregadas e solúveis em água. Deste modo, a separação de compostos dessa classe depende entre outros fatores da polaridade da cadeia lateral, a qual influencia diretamente a resolução cromatográfica (PRESTERA et al., 1996). Diante disso, diferentes técnicas são aplicadas para isolar glucosinolatos como a cromatografia de pares de ions (*ion-pair chromatography*) e a cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) (TROYER et al., 2001; MONTAUT et al., 2019).

A ressonância magnética nuclear (RMN) tem se mostrado uma ferramenta bastante útil, tanto na determinação estrutural quanto em estudos de *fingerprint* e metabolômica de espécies produtoras de glucosinolatos. Também é relatado o uso de RMN na quantificação de glucosinolatos em diferentes matrizes, evidenciando a versatilidade desta técnica (ABDEL-FARID et al., 2007; ONGARO, ZAGOTTO e RIBAUDO, 2018; MCALPINE et al., 2019; MÄKELÄ et al., 2019).

Entre as técnicas analíticas empregadas no estudo desta classe, a HPLC-EM tem sido bastante utilizada atualmente. Quando comparada a metodologias convencionais o HPLC-EM apresenta algumas vantagens no processamento da amostra, permite eliminar as etapas de derivação, nos resultados levou à identificação de glucosinolatos intactos e seus derivados de forma mais eficiente em diferentes matrizes (ALEXANDRE et al., 2020).

Nesse sentido, Sun et al (2020) investigou perfil de metabólitos de glucosinolato na urina e plasma humanos após consumo de brócolis, Šamec e Zeljković (2020) relatam a aplicação da técnica em alimentos ricos em glucosinolatos. Para identificação rápida dessa classe de metabólitos em extratos brutos de plantas o LC-ESI-TOF é a configuração mais utilizada (CLARKE, 2010; ELKHATEEB et al., 2019; TAN e NOEL, 2019). Atualmente, outras técnicas também são utilizadas com essa finalidade em matrizes vegetais como LC-HRMS, MALDI-TOF, MSI e UHPLC-Q-Orbitrap-MS, também pautadas sobre o perfil de fragmentação característico dos glucosinolatos (SARSBY et al., 2012; HWANG et al., 2019; AYDOĞAN, 2020).

Figura 13: Métodos convencionais para análise de glucosinolatos.



Fonte: Disponível em Clarke, 2010.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Contribuir com a caracterização do perfil químico das Capparaceae neotropicais a partir do estudo de *Neocalyptrocalyx longifolium* Mart. Cornejo & Iltis.

3.2. Objetivos específicos

- Extrair, isolar e purificar metabólitos secundários presentes nas raízes da espécie *Neocalyptrocalyx longifolium*;
- Identificar a estrutura dos constituintes químicos utilizando método espectrométrico (espectrometria de massas) e técnicas espectroscópicas (infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C com técnicas uni e bidimensionais);
- Avaliar a presença de metabólitos através da análise por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (CL/EMⁿ).

Metodologia

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta e identificação do material vegetal

O material vegetal, composto pelas raízes de *N. longifolium*, foi coletado no Estado da Paraíba na região de Monteiro, localizado a 7.8888° S, 37.1171° W. Em seguida foi identificado pelo Professor Dr. José Iranildo Miranda, parte do material foi armazenado sob forma de exsicata no Herbário Manuel de Arruda Câmara da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), registrado como HACAM 971. Por conseguinte, cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) sob o código A885D6F.

4.2. Processamento das raízes de *Neocalyptrocalyx longifolium*

A raiz foi seca em estufa com ar circulante a temperatura média de 40°C, em seguida pulverizada em moinho mecânico e submetida a maceração com etanol 96%, em ciclos de 72 horas cada, esse processo foi repetido por três vezes. A solução extrativa obtida foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40 °C, obtendo-se 100 gramas de extrato etanólico bruto (EEB).

4.3. Partição do EEB

Cerca de 90 gr do extrato etanólico bruto foi solubilizado em uma mistura de metanol e água na proporção de 7:3 (v/v) seguido da adição sequencial de solventes imiscíveis entre si de acordo com sua polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) em ampola de separação. As soluções resultantes desse processo foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida à temperatura de 40 °C, obtendo-se 30 gr da fase em hexano, 6 gr em diclometano, 3 gr em acetato, 10 gr em butanol e 40 gr de fase hidroalcoólica (Fluxograma 1, pág 34).

4.4. Isolamento e purificação dos constituintes químicos de *N. longifolium*

4.4.1. Métodos cromatográficos

Dois gramas da fase diclorometano foram submetidos ao fracionamento por meio de cromatografia em coluna (CC), foi utilizada sílica gel 60, ART 7734 da MERCK, com tamanho de partícula entre 0,063-0,200 mm. As frações obtidas (Fluxograma 1, pág. 34) foram secas e analisadas por meio de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)

Para CCDA, foi usada sílica gel 60 PF254 ART 7749 da MERCK. A revelação das placas foi realizada por meio da exposição à lâmpada de irradiação ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 366 nm) utilizando aparelho Mineralight, modelo UVGL-58. Em seguida, as placas foram submetidas à revelação em câmara saturada com vapor de iodo.

Após avaliar o perfil das amostras por meio de CCD e RMN de ^1H , as frações de quatro a oito foram analisadas por HPLC da marca Shimadzu, utilizando coluna cromatográfica analítica C18 (YMC - 250 mm X 4,6 mm X 5 μm) na escala analítica e C18 (YMC - 250 mm x 20 mm x 5 μm) na preparativa. Como fase móvel, foram utilizadas misturas binárias de metanol grau HPLC e água ultrapura (tipo I), acidificada com 0,1% de ácido fórmico, e fluxo de 0,6 ml/min.. Esta análise permitiu desenvolver métodos eficientes para o isolamento das substâncias presentes nas frações.

Para transposição de escala, foram preparadas soluções contendo 0.1 mg/ μL da amostra. Em seguida, essas soluções foram injetadas em volumes de 100 μL . O fluxo dos métodos desenvolvidos na fase analítica foi adaptado para 8 mL/min. As frações obtidas foram concentradas sob pressão reduzida a uma temperatura de 40 °C em rotaevaporador. A utilização de água acidificada pode ter resultado no isolamento de substâncias em sua forma protonada, de modo que foram analisadas por ressonância magnética nuclear (fluxograma 2) em metanol e acetona deuterados.

4.4.2. Métodos espectroscópicos

4.4.2.1. Infravermelho

Os espectros no infravermelho foram obtidos em pastilhas de KBr, em equipamento da marca Bruker, modelo vertex 70.

4.4.2.2. Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (HMBC) foram obtidos em um espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) a 400 MHz (^1H) e 100 MHz (^{13}C), localizado no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da UFPB. Na preparação das amostras foi utilizado solvente deuterado (CD_3COCD_3 e CD_3OD) da Cambridge Isotope Laboratories.

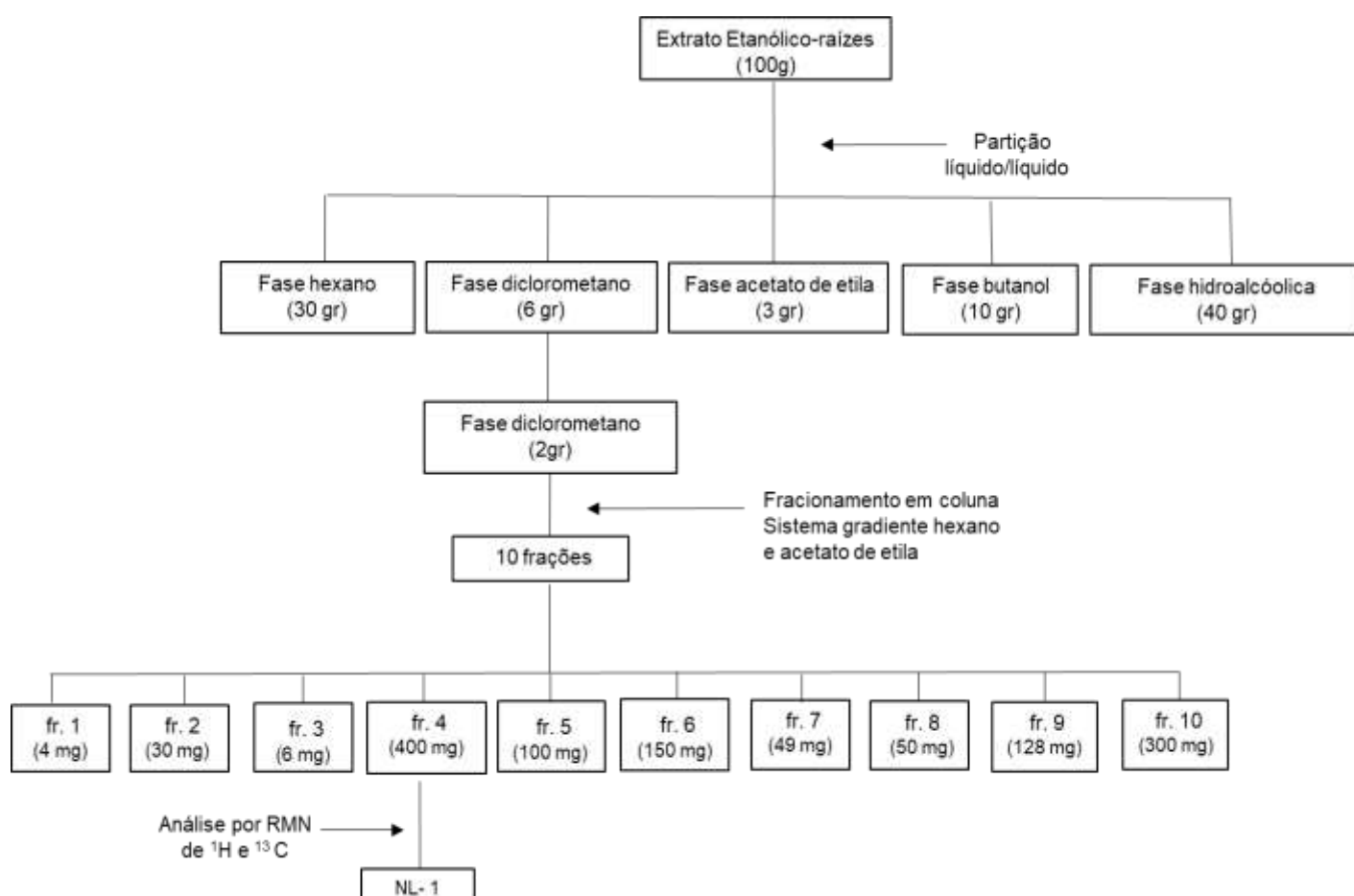
A determinação estrutural dos constituintes isolados foi efetuada a partir da análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (HMBC), e pela comparação com dados descritos na literatura. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e como padrão interno foram utilizados os sinais característicos de ^1H e ^{13}C dos solventes utilizados. Para RMN ^1H os sinais característicos são em δ_{H} 3,30 para o metanol e δ_{H} 2,05 para acetona. Para os espectros de RMN de ^{13}C , os sinais característicos são em δ_{H} 49,0 e δ_{C} 29,84 para os mesmos solventes. As constantes de acoplamento (J) foram dadas em Hz e as multiplicidades no espectro de RMN ^1H foram indicadas segundo as convenções: *s* (simpleto), *sl* (simpleto largo), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *dl* (duplete largo), *t* (triplete), *q* (quadruplete) e *m* (multiplete). Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos utilizando-se a técnica de APT e BB.

4.4.3. Técnicas hífenadas

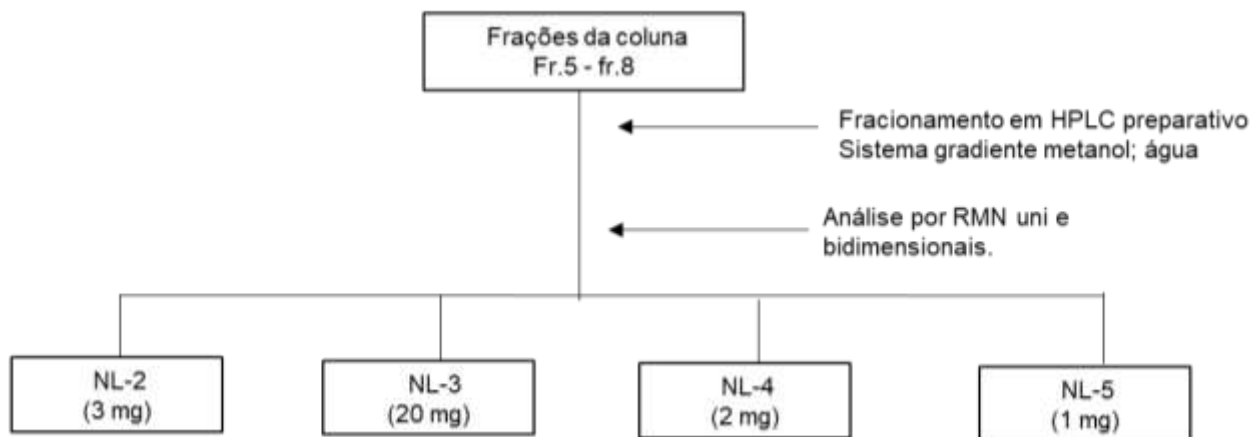
Para análise por meio de HPLC-EM, foi utilizado equipamento da marca Shimadzu, coluna cromatográfica analítica C18 (Kromasil - 250 mm x 4,6 mm x 5 μm), acoplado ao espectrômetro de massas (Ion-Trap AmazonX, Bruker ou microTOFII, Bruker), com Ionização por Eletrospray (IES).

A amostra foi solubilizada em metanol (1 mg/mL), com posterior filtração em filtros PVDF (Fluoreto de Polivinilideno), com malha de 0,45 μm . O método cromatográfico desenvolvido utilizou os solventes metanol (solvente B) de grau cromatográfico e água ultrapura tipo I (Mili-Q), acidificada com ácido fórmico (0,1% v/v) (solvente A), com análise em gradiente de concentração (5 a 100% de B em 60 minutos). O volume de injeção foi de 10 μL e taxa de fluxo foi de 0,6 mL/minuto. Os parâmetros de aquisição no Ion Trap e TOF foram os seguintes: faixa de 50-1000 Da, capilar 4,5 kV, offset da placa final 500 V, gás nebulizador 35 psi, gás seco (N_2) com fluxo de 8 mL/minuto e temperatura de 300 $^\circ\text{C}$. As amostras foram analisadas em modo de ionização positivo e negativo, a identificação dos compostos foi baseada nos dados (MS/MS) reportados pela literatura.

Fluxograma 1: Fracionamento da fase diclorometano e rendimento das frações.



Fluxograma 2: Isolamento das substâncias NL-2 a NL-5 a partir das frações cinco, seis, sete e oito.



Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação estrutural de NL-1

A substância codificada como NL-1 foi isolada da fração 4 obtida da fase diclorometano, e purificada em HPLC em coluna de fase reversa C-18 com sistema binário isocrático composto por metanol água, 0,1% de ácido fórmico, na proporção de 10:90 (v/v). NL-1 foi obtida na forma de óleo transparente com odor pungente.

NL-1 foi analisada por espectrometria de massas de alta resolução (EMAR), onde foi observado íon de m/z 146,0628 [M+H] (calculado 146,0634 e erro de 4.5 ppm) compatível com fórmula molecular $C_6H_{11}NOS$ e índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a dois.

Com relação a análise por infravermelho (Figura 15, pág. 39), literatura relatada a vibração C=S como uma banda de média intensidade na região 1000-1300 cm^{-1} . O espectro da substância NL-1 registrou banda em 1134 cm^{-1} , atribuída a presença deste grupo funcional. Em compostos onde o grupo C=S está ligado a um átomo de nitrogênio podem aparecer bandas acima de 1500 cm^{-1} evidenciando o estiramento referente a ligação C-N. No espectro de NL-1 foi observada banda intensa em 1543 cm^{-1} , sugerindo a presença do grupo N-C=S. A banda em 1720 cm^{-1} reforça essa hipótese uma vez que resulta do estiramento da porção C=S, neste grupo o caráter C-N é mais proeminente justificando a intensidade das bandas observadas no espectro. As bandas em 1207 cm^{-1} e 3182 cm^{-1} foram atribuídas a ligação C-O de éter e N-H associado à tioamida, indicando a presença desses heteroátomos na estrutura. (CRISTIANI; DEVILLANOVA; VERANI, 1977; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005)

Ao analisar o espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 16 e 17, pág. 40), foram observados seis sinais. Destes, dois foram atribuídos a carbonos não hidrogenados (δ_c 90,55 e δ_c 189,60) dois metilênicos (δ_c 33,11 e δ_c 53,83) e dois metílicos (δ_c 7,95 e δ_c 24,88).

Acerca do carbono δ_c 189,60, (Figura 18, pág. 41) sinais nessa região são comumente associados a compostos carbonílicos. Contudo, a partir dos dados

encontrados na análise de massas e infravermelho, o deslocamento desse carbono sugere a presença de uma tiona, pois o efeito eletrônico gerado pelo átomo de enxofre resulta em carbonos mais blindados que os carbonílicos, em cetonas (CHAUHAN; STILL, 1975; BARBARELLA et al., 1987).

O sinal observado em δ_c 53,83 (Figura 17, pág. 40) sugeriu que este carbono se encontrava em ambiente químico desprotegido, deslocamentos entre δ_c 45 e δ_c 60 descritos para carbonos metilenos em sistemas cíclicos contendo heteroátomo, a presença do ciclo confirmaria o valor encontrado no cálculo de IDH. O espectro de infravermelho registrou banda atribuída a uma tioamida, a desproteção observada em δ_c 53,83 no espectro de RMN de ^{13}C pode ser resultante do efeito gerado pelo N no carbono C-4 (ELIEL; RAO; PIETRUSIEWICZ, 1979; AGERBIRK; OLSEN, 2015).

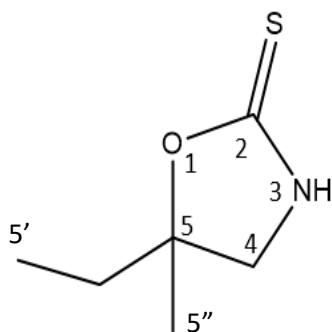
Com base no espectro de infravermelho que indica ocorrência de uma ligação do tipo éter, sugeriu-se então que o carbono δ_c 90,55 sustentava essa ligação, pois a presença do oxigênio ocasiona uma desproteção do carbono da posição α , contribuindo para justificar o deslocamento desse sinal (PAVIA et al., 2015).

A partir no mapa de contorno de HMBC (Figura 21 pág. 42, Figura 22 pág. 43) foi possível observar correlação entre δ_{Hb} 3,4 e δ_{Ha} 3,5 (2H, sistema AB, $J=10$) (Figura 20, pág. 42) e δ_c 189,60 (C=S). Deste modo, inferiu-se que apenas os hidrogênios do carbono metileno C-4 se correlacionavam ao carbono da tiona, confirmando a presença de um sistema cíclico composto pela tioamida, unido pela ligação com carbono oxigenado δ_c 90,55, compondo um tiocarbamato.

A partir deste mesmo mapa de contorno (Figura 22, pág. 43) observou-se correlação de δ_{H} 0,9 (3H, *t*) apenas com δ_c 33,11 a J_2 e δ_c 90,55 a J_3 , indicando presença de um grupo etil ligado ao δ_c 90,55. Além disso, δ_{H} 1,79 (2H, *q*) se relacionou a J_2 com δ_c 7,9 e δ_c 90,55 e a J_3 com os carbonos δ_c 24,8 e δ_c 53,83, reforçando a proposta de um grupo etil nesta posição. Enquanto δ_{H} 1,4 (3H, *s*) se correlacionou com os carbonos metilênicos δ_c 33,11 e δ_c 53,83 a J_3 e com carbono não hidrogenado δ_c 90,55 a J_2 . Corroborando o padrão de substituição no δ_c 90,55 por dois grupos, etil e um metil (Tabela 1, pág. 43).

Os deslocamentos químicos de δ_H e δ_C , somados aos dados de HMBC foram condizentes com esqueleto de uma oxazolidina-2-tiona substituída. A partir da comparação dos dados experimentais com a literatura (OGUAKWA et al., 1981), foi constatado que NL-1 se trata de uma substância previamente isolada em *Ritchiea longipedicellata* G. a 5-etil-5metil-oxazolidina-2-tiona (Tabela 1, pág. 43), comumente denominada cleomina (Figura 14, pág. 39)

Figura 14: A. Estrutura do composto identificado como NL-1.



Fonte: o autor

Figura 15: Espectro no infravermelho de NL-1.

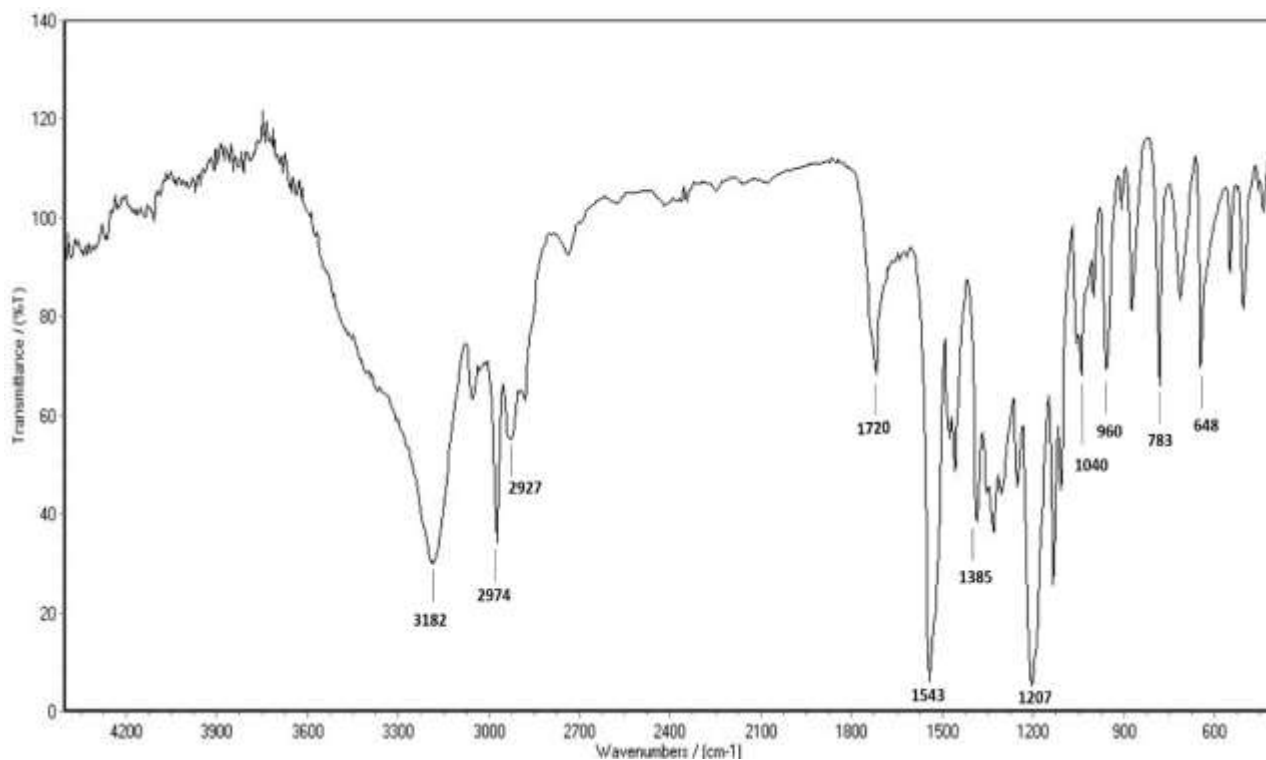


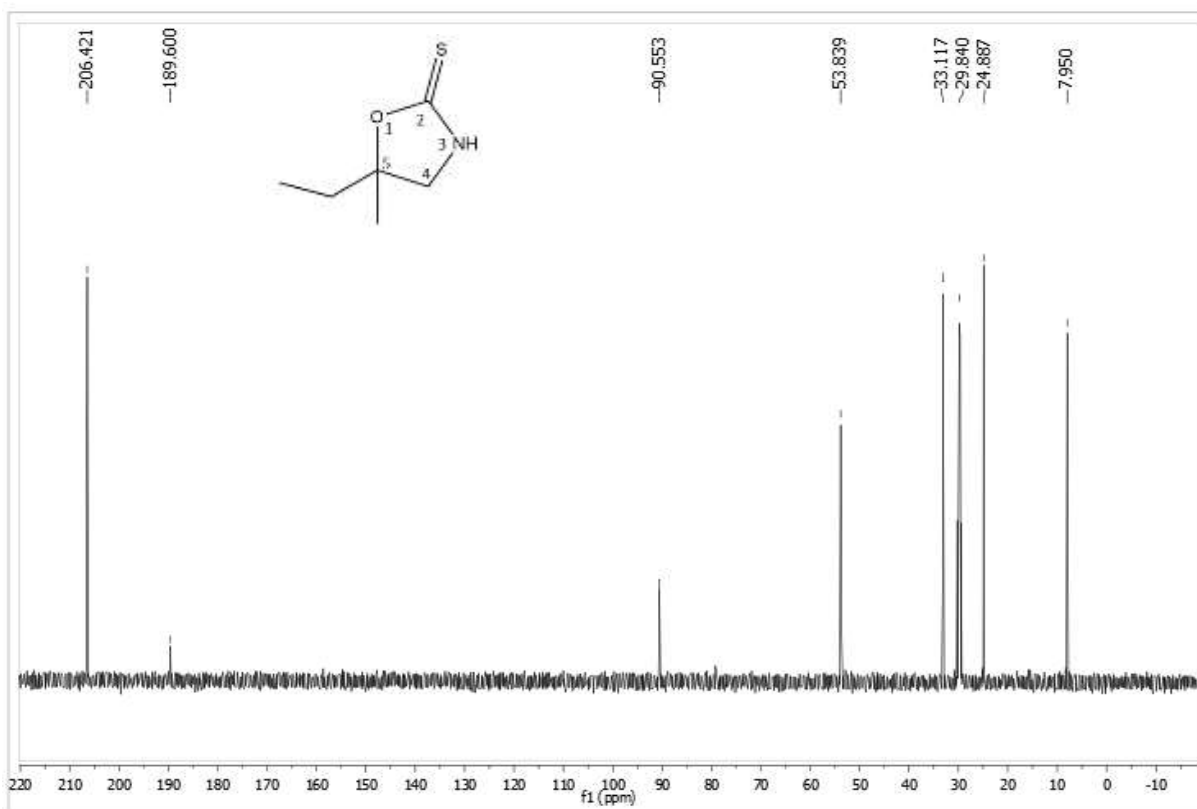
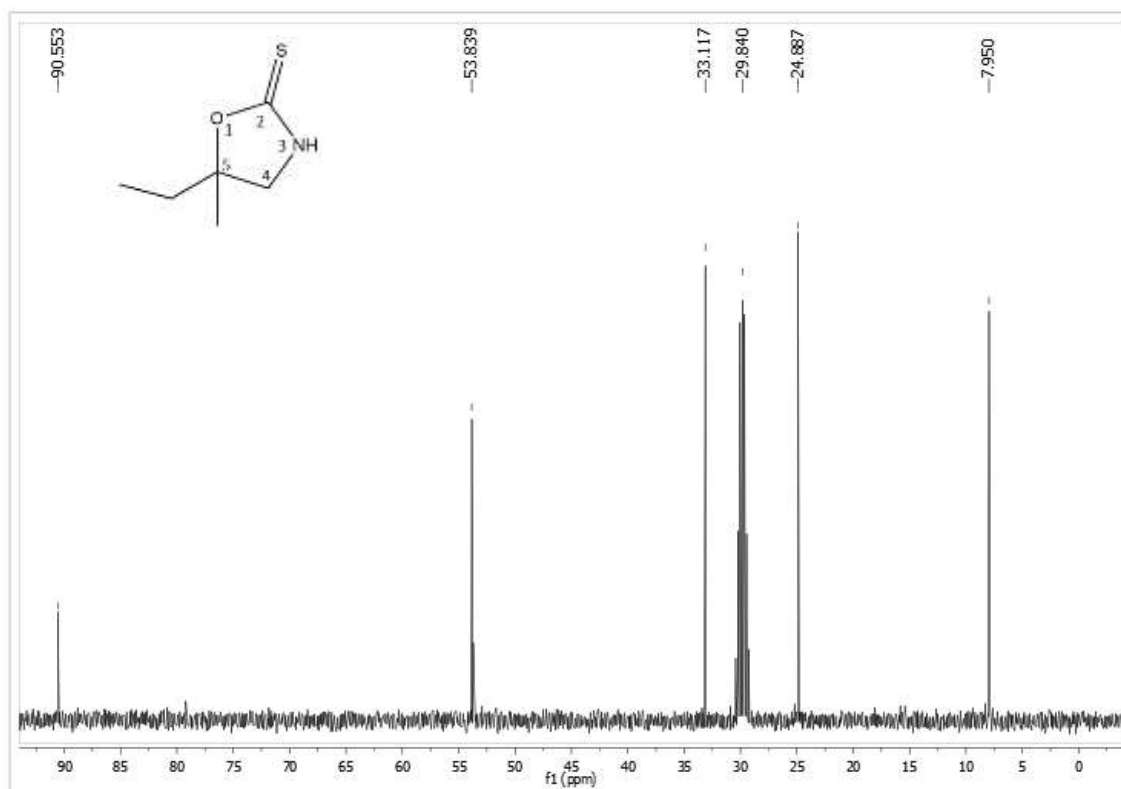
Figura 16: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, Acetona-d₆) de NL-1.Figura 17: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, Acetona-d₆) de NL-1.

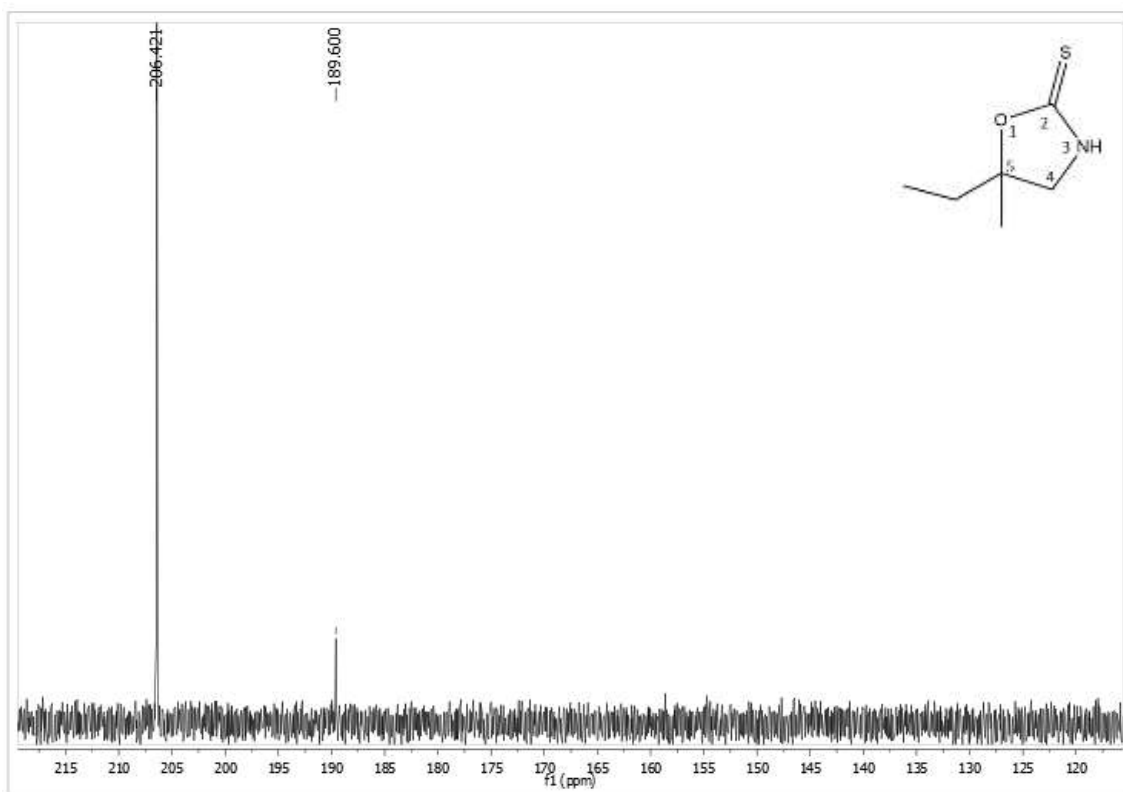
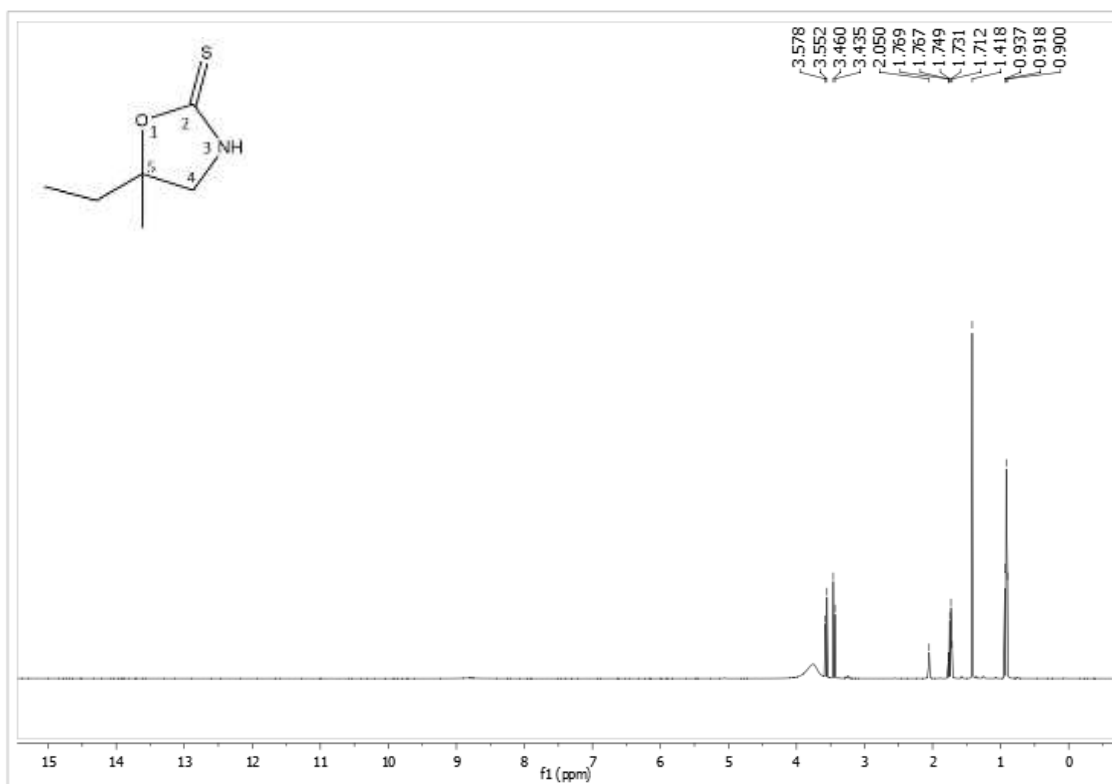
Figura 18: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, Acetona- d_6) de NL-1.Figura 19: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, Acetona- d_6) de NL-1.

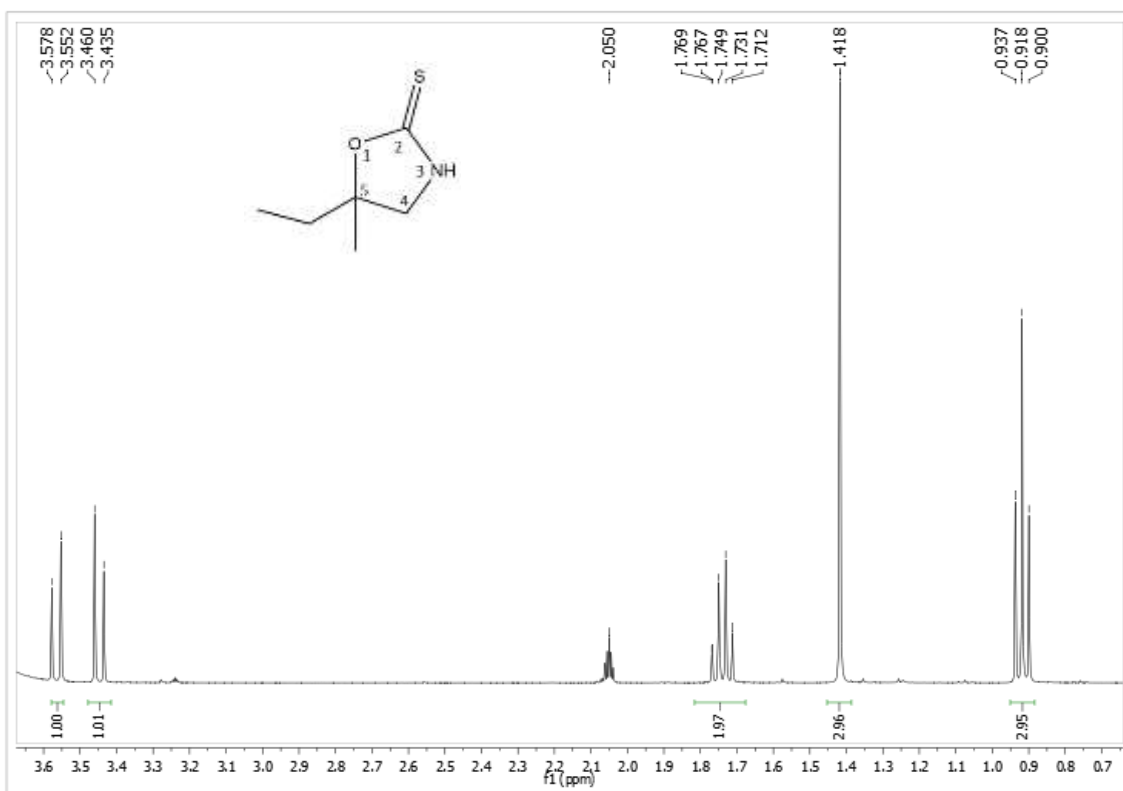
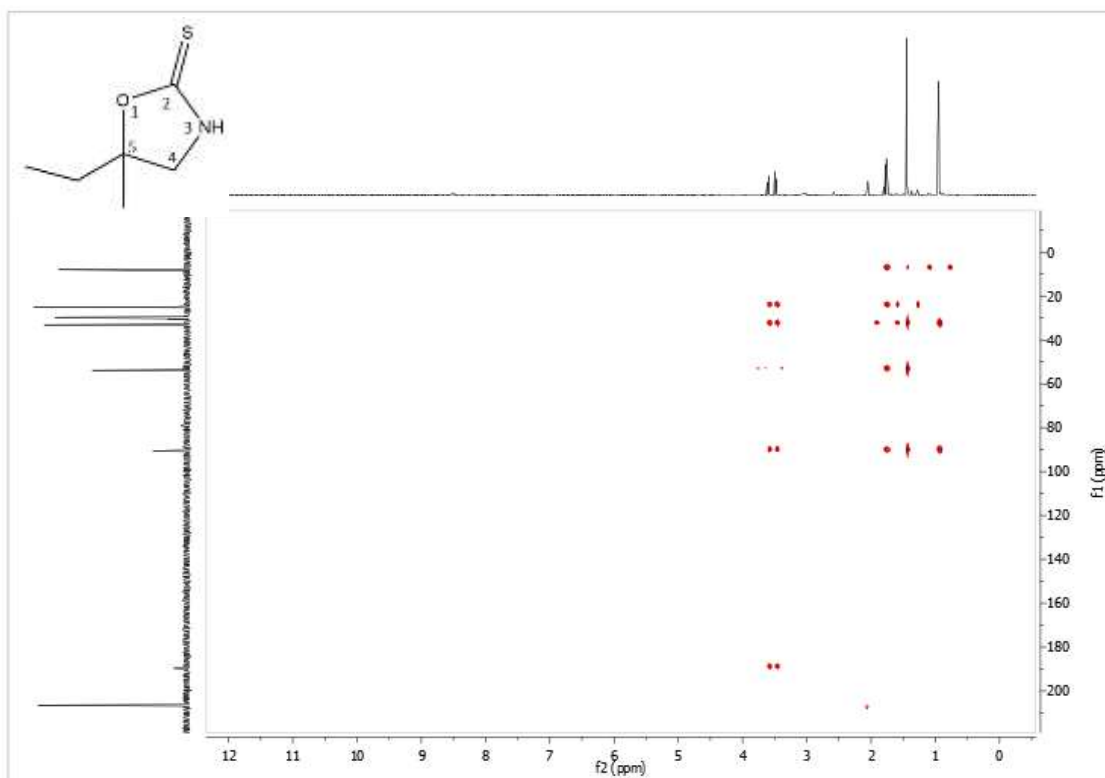
Figura 20: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, Acetona- d_6) de NL-1.Figura 21: Mapa de contorno ^1H x ^{13}C HMBC (400 e 100 MHz, Acetona- d_6) de NL-1.

Figura 22: Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (400 e 100 MHz, Acetona- d_6) de NL-1.

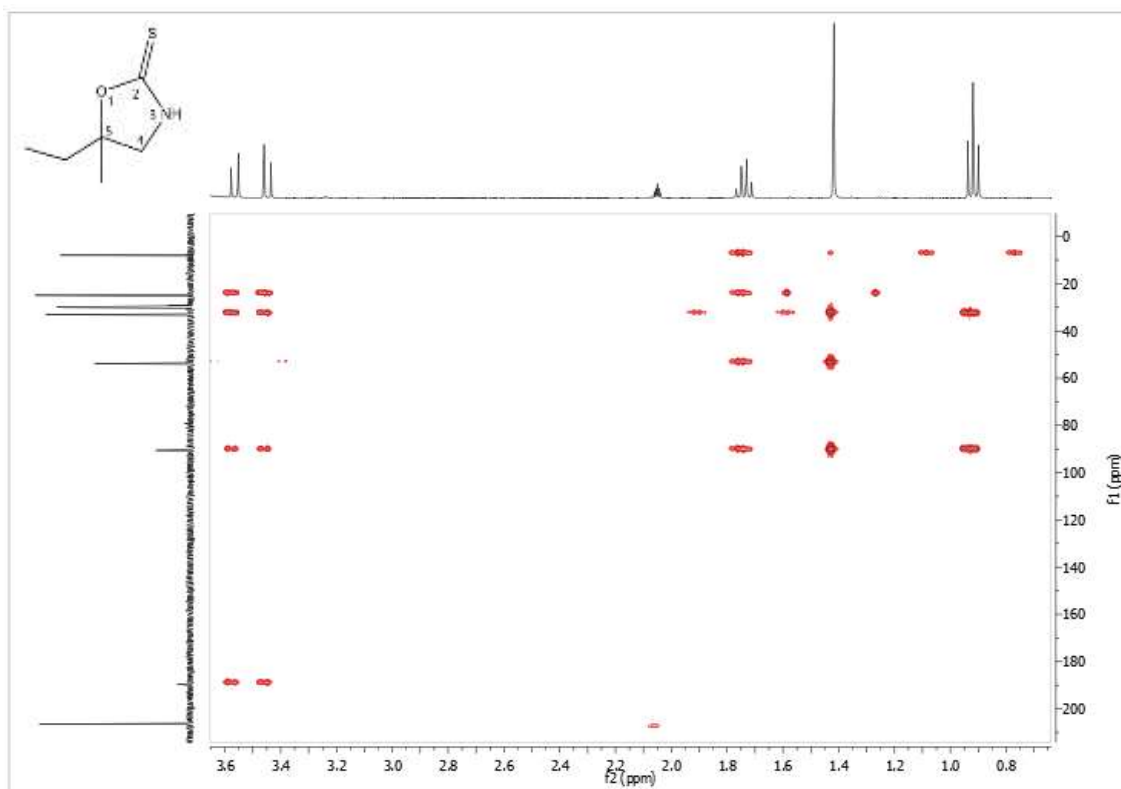


Tabela 1: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de cleomina em CD_3COCD_3 .

Posição	NL-1 em CD_3COCD_3		Literatura Oguakwa et al., 1981, em CDCl_3	
	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}
2	-	189,60	-	189,6
4	3,43 (1H, d, J= 10) 3,55 (1H, d, J= 10)	53,83	3,43 (1H, d, J= 10) 3,56 (1H, d, J= 10)	54,3
5	-	90,55	-	92,0
5'	1,74 (2H, q)	33,11	1,79	33,4
5'	0,91 (3H, t, J= 7.6)	7,95	0,99	7,93
5''	1,41 (3H, s)	24,88	1,50	25,0

5.2. Determinação estrutural de NL-2

A substância codificada como NL-2 foi identificada na fração 5 obtida da fase diclorometano e purificada por HPLC em coluna de fase reversa C-18 com sistema metanol/água (0,1% de ácido fórmico) isocrático a 20%. Apresentando-se como sólido amorfo de cor branca e odor pungente.

NL-2 foi analisada por espectrometria de massas de alta resolução (EMAR), onde foi observado íon de m/z 132,0474 [M+H] (calculado 132,0478, erro ppm de 2.4) compatível com fórmula molecular C_5H_9NOS e IDH igual a dois.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 24 pág. 45) permitiu constatar presença de quatro sinais atribuídos a cinco carbonos. Destes, dois foram atribuídos a carbonos não hidrogenados (δ_C 89,26 e δ_C 190,10) um metilênico (δ_C 56,40) e dois metílicos (δ_C 26,78).

Os deslocamentos observados no espectro de RMN de 1H (Figura 25) auxiliou a determinação dos substituintes. Apenas dois sinais foram registrados, um correspondia a hidrogênios metílicos δ_H 1,48 (3H, s), o outro em δ_H 3,48 (1H , s) chamou a atenção inicialmente pelo valor da integral, indicando apenas 1H , não correspondendo a faixa de deslocamento típica de prótons metínicos. O outro aspecto foi sua multiplicidade; comparativamente, NL-1 apresentou, na mesma região, prótons diastereotópicos como dubletos resultantes da quiralidade no carbono 5. A partir dessa premissa, considerou-se que os substituintes do carbono 4 (δ_C 56,40) em NL-2 seriam iguais, resultando em prótons homotrópicos registrados no espectro como simpleto. Consequentemente, conclui-se que as integrais deveriam ser duplicadas, indicando a presença de dois prótons metilênicos (δ_H 3,48) e duas metilas, registradas no espectro de RMN de ^{13}C como um único sinal de forte intensidade em δ_C 26,78 (Tabela 2, pág. 48).

O mapa de contorno de HMBC (Figuras 26 e 27, pág. 47) confirmou as correlações entre δ_H 1,48 (3H, s) e o carbono não hidrogenado δ_C 89,26 a J_2 e com o carbono metilênico δ_C 56,40 a J_3 . Ao passo que δ_H 3,48 (1H , s) se relaciona com δ_C 89,26 a J_2 , δ_C 26,78 e δ_C 190,10 a J_3 . Este perfil de correlações indicou estrutura composta pelo núcleo oxazolidina-2-tiona, como observado em NL-1. A partir da comparação dos dados experimentais com a literatura (LEONI

et al., 1999) foi constatado que NL-2, trata-se de 5-dimetil-oxazolidina-2-tiona, comumente denominada conringiin (Figura 23), isolada previamente de *Conringia orientalis* L.

Figura 23: Estrutura do composto identificado como NL-2.

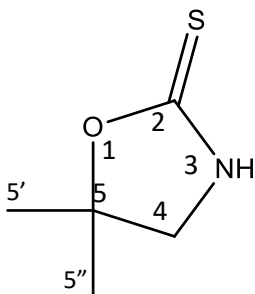


Figura 24: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOD) de NL-2.

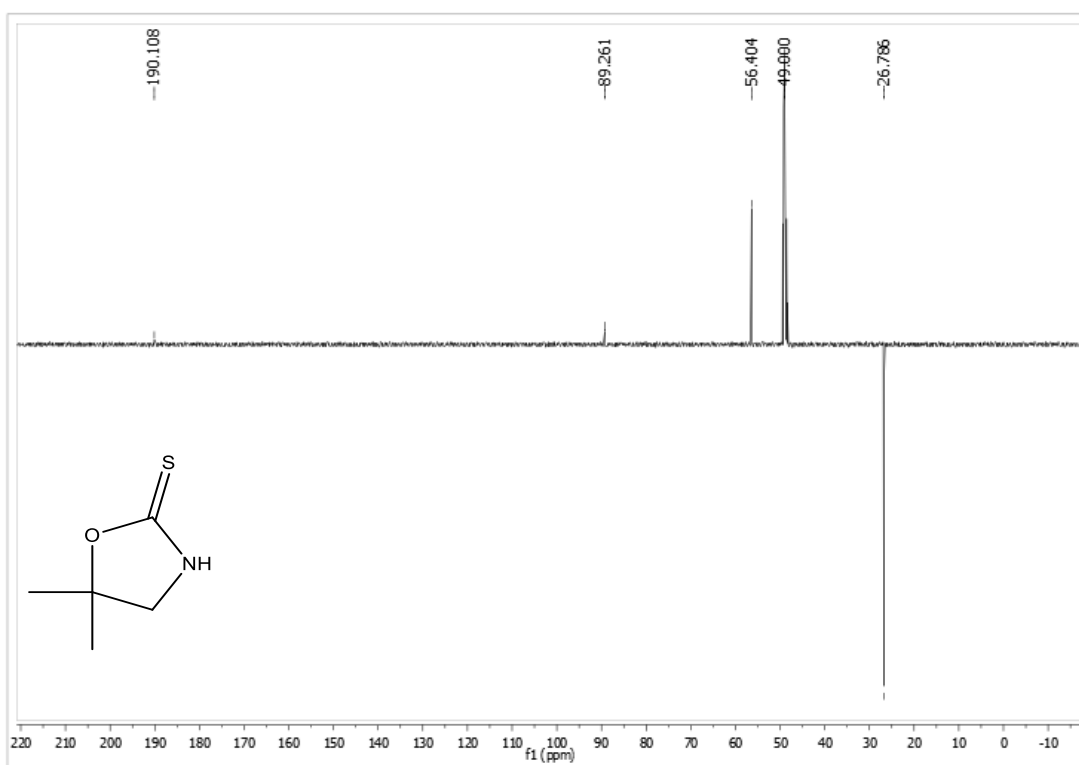


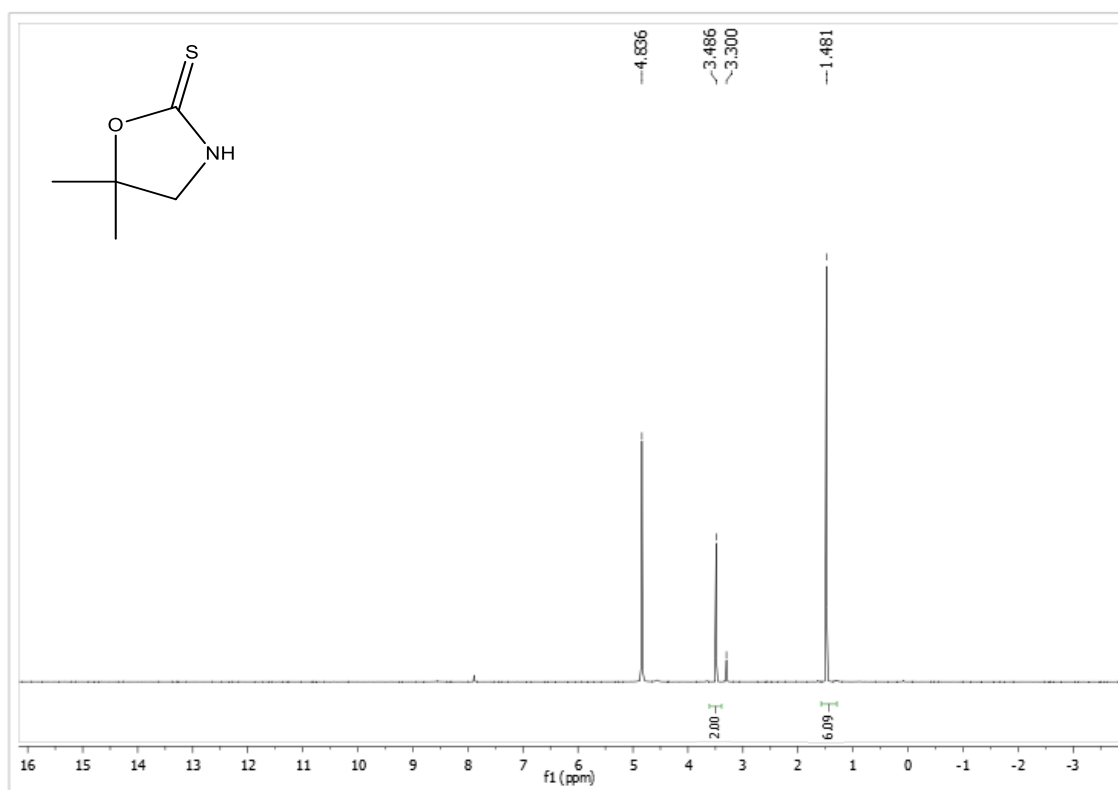
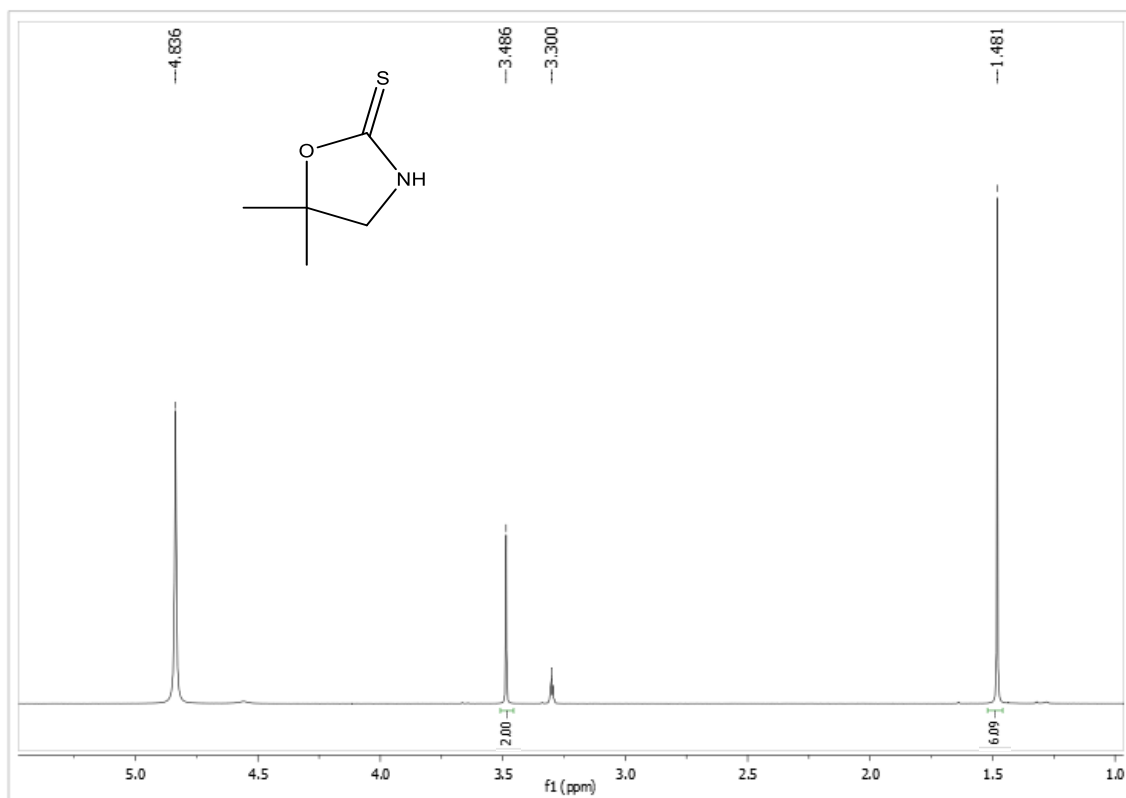
Figura 25: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) de NL-2.Figura 27: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) de NL-2.

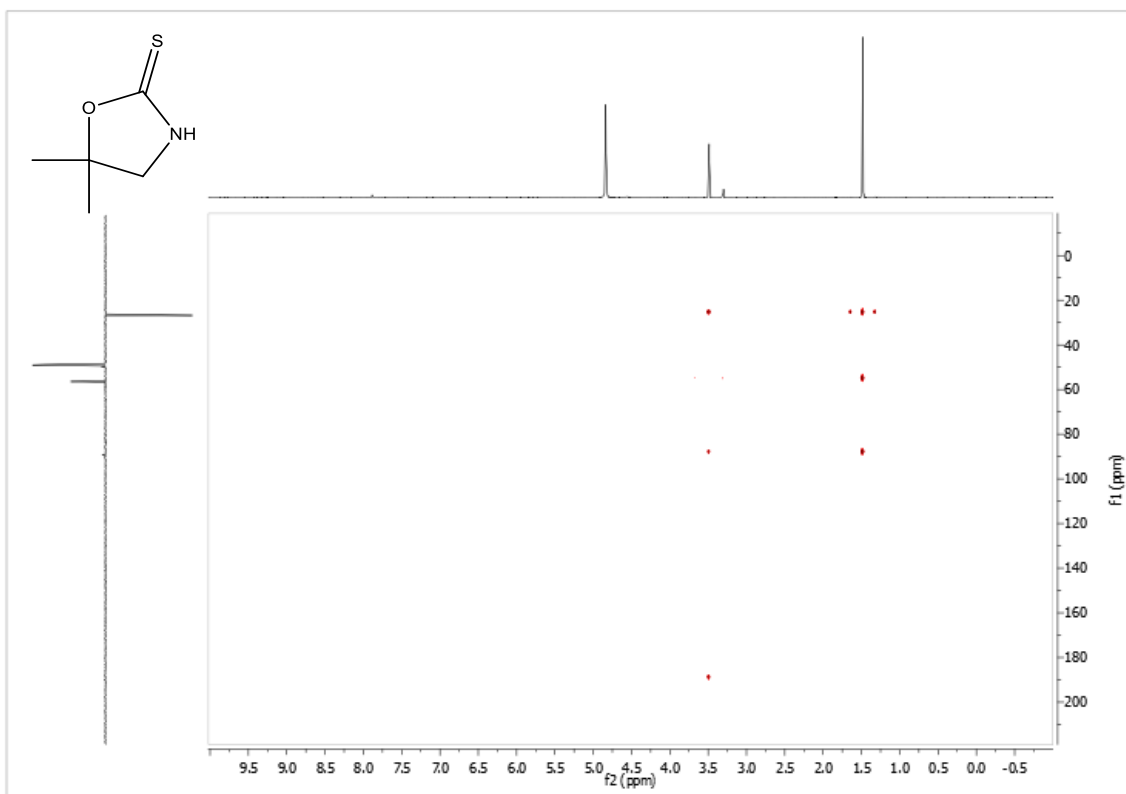
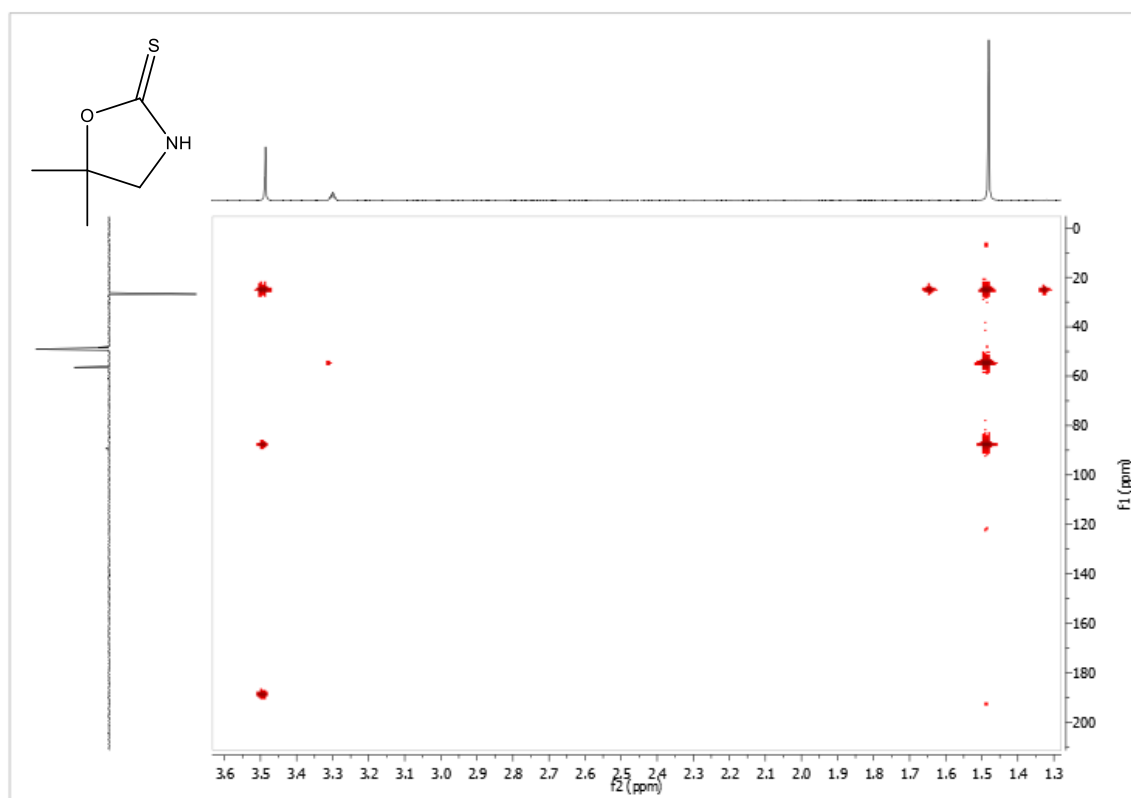
Figura 28: Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (400 e 100 MHz, MeOD) de NL-2.Figura 29: Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (400 e 100 MHz, MeOD) de NL-2.

Tabela 2: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de conringin em MeOD.

Posição	NL-2 em MeOD		Literatura Leoni et al., 1999 em CDCl_3	
	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}
2	-	190,1	-	188,6
4	3,48 (2H, s)	56,4	3,53	55,3
5	-	89,2	-	88,4
5' e 5''	1,48 (6H, s)	26,7	1,50	26,7

5.3. Determinação estrutural de NL-3

A substância codificada como NL-3 foi identificada na fração 6 obtida da fase diclorometano, e purificada por HPLC em coluna de fase reversa C-18 a 30% metanol/água (0,1% de ácido fórmico). Apresentando-se como cristais brancos.

A partir da análise por espectrometria de massas de alta resolução (EMAR), observou-se íon de m/z 131,0352 [M+H] (calculado 131,0369, erro ppm de 3.4) compatível com fórmula molecular $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$ e índice de deficiência de hidrogênio igual a dois.

Com relação a análise por infravermelho, Figura 30 pág. 50, o espectro da substância NL-3 apresentou bandas em 1265 cm^{-1} e 3440 cm^{-1} foram sugestivas de ligação N-H livre em amidas. Diferente do perfil observado anteriormente, em NL-3 foram registradas bandas intensas características de vibrações atribuídas a C=O de lactonas em 1739 cm^{-1} e lactamas e 1709 cm^{-1} , respectivamente. Considerando o sistema cíclico das substâncias anteriormente descritas, sugeriu-se a substituição do enxofre por oxigênio, uma vez que o caráter da ligação C=O é maior em amidas do que em tioamidas, onde predomina o caráter C=N.

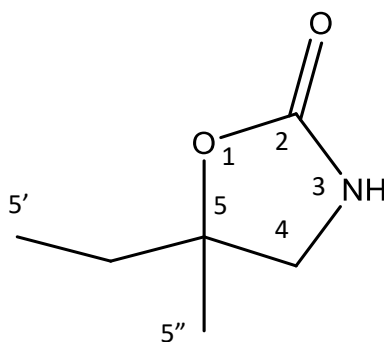
O espectro de RMN de ^1H (Figuras 31 e 32, pág. 51) apresentou sinais na mesma faixa de deslocamento químico e multiplicidade ao encontrado em NL-1,

δ_H 0,93(3H, t), δ_H 1,36 (3H, s) δ_H 1,70 (2H, q), δ_H 3,25 e 3,37 (2H, dd, $J = 10$). Indicando o mesmo padrão de substituição, etil e metil.

O espectro de RMN de ^{13}C Figuras 33 e 34, pág. 51, apresentou seis sinais. Destes, dois foram atribuídos a carbonos não hidrogenados (δ_C 82,86 e δ_C 159,52) dois metilênicos (δ_C 33,43 e δ_C 50,93) e dois metílicos (δ_C 7,92 e δ_C 25,22). A mudança mais evidente, em relação a NL-1 e NL-2, foi o carbono com deslocamento δ_C 159,52, atribuído a uma carbonila, indicando o esqueleto de oxazolidin-2-ona.

O mapa de contorno de HMBC Figura 35 e 36, pág. 52, também apresentou perfil similar aos encontrados em NL-1. Observando-se, correlação entre δ_H 3,25 e 3,37 (2H, sistema AB, $J = 10$) e δ_C 159,5, sugerindo presença de uma oxazolidinona. As correlações entre de δ_H 0,93 (3H, t) apenas com δ_C 33,47 a J_2 e δ_C 82,55 a J_3 e δ_H 1,36 (3H, s) com os carbonos metilênicos δ_C 33,11 e δ_C 53,83 a J_3 indica substituição na posição 5. A partir da comparação dos dados experimentais com a literatura (ELENKOV et al., 2008, MONJANE; UAMUSSE; STERNER, 2016) foi constatado que NL-3, trata-se de 5-etil-metil-oxazolidin-2-ona.

Figura 30: Estrutura do composto identificado como NL-3.



Fonte: o autor

As oxazolidinonas são um grupo importante de substâncias devido a sua atividade antibiótica e representam uma classe de medicamentos utilizados no combate a bactérias Gram-positivas (ZAPPIA et al., 2007; LEACH et al., 2011).

Assim como as oxazolidinotonas, são empregadas como reagentes em síntese orgânica (CORDERO, LASCIALFARI, MACHETTI, 2020).

A ocorrência de oxazolidinonas é mais comum em organismos marinhos (MACHERLA et al., 2007; HABBU et al., 2016). Em plantas, essas substâncias foram identificadas em poucas famílias entre elas Capparaceae (MONJANE et al., 2016). Os resultados deste estudo indicam a presença de oxazolidinotonas nas raízes de *N. longifolium*. Similarmente, Argebiq et al (2018) descreve a ocorrência dessas enzimas em *Barbarea vulgares* R.Br. e sugere que elas se relacionam ao *turnover* dos glucosinolatos, o qual é dependente da ação das mirosinases. A presença de oxazolidinotonas é mais um elemento de diversificação estrutural além do sistema glucosinato-mirosinase para produção de substâncias com potencial bioativo.

Figura 31: Espectro de infravermelho do composto identificado como NL-3.

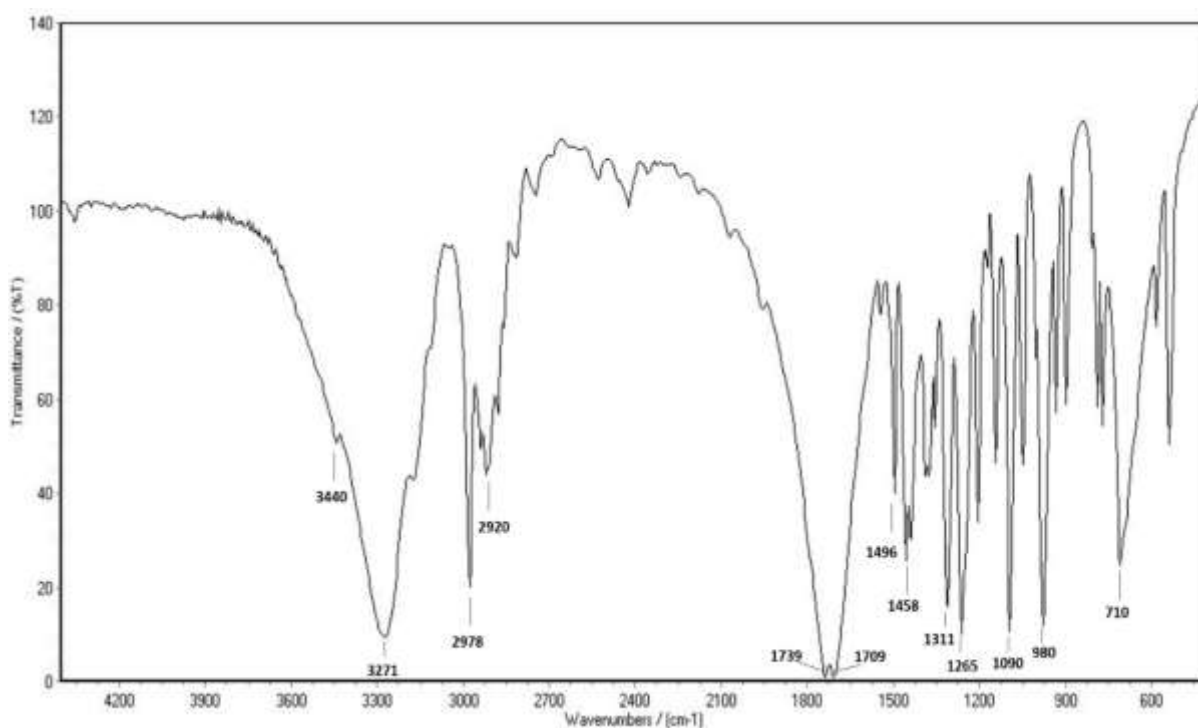


Figura 32: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do composto identificado como NL-3.

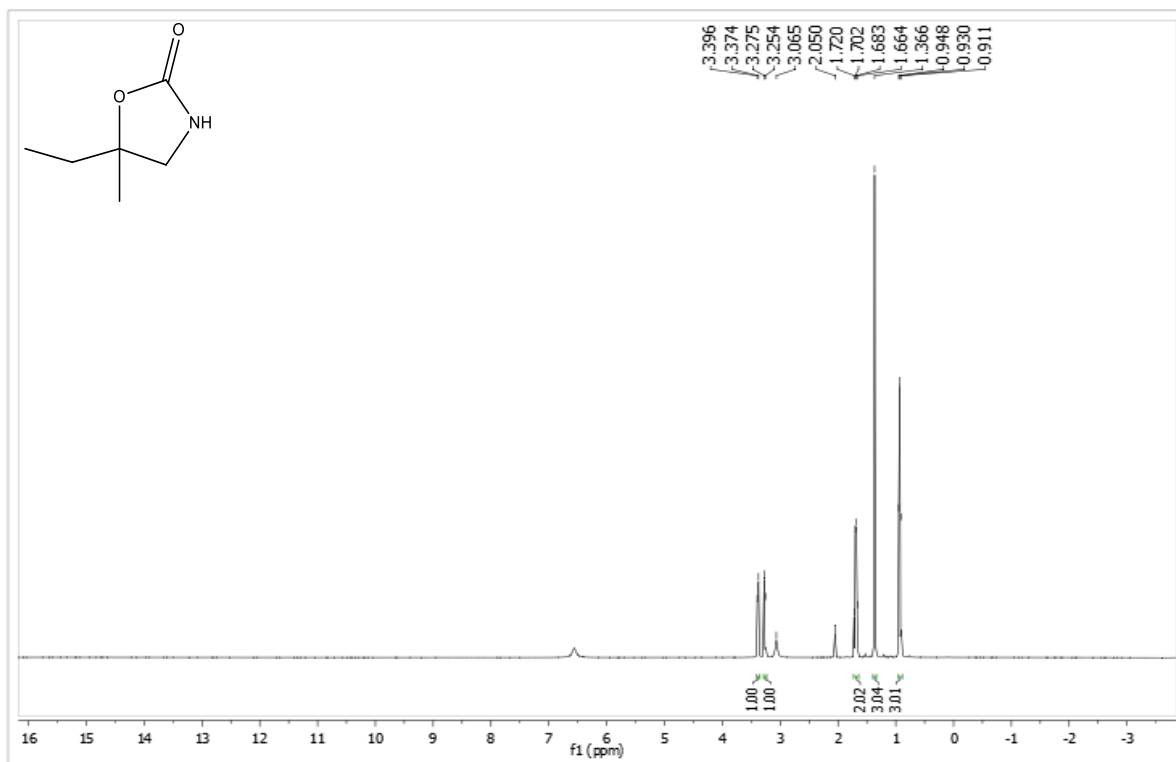


Figura 33: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do composto identificado como NL-3.

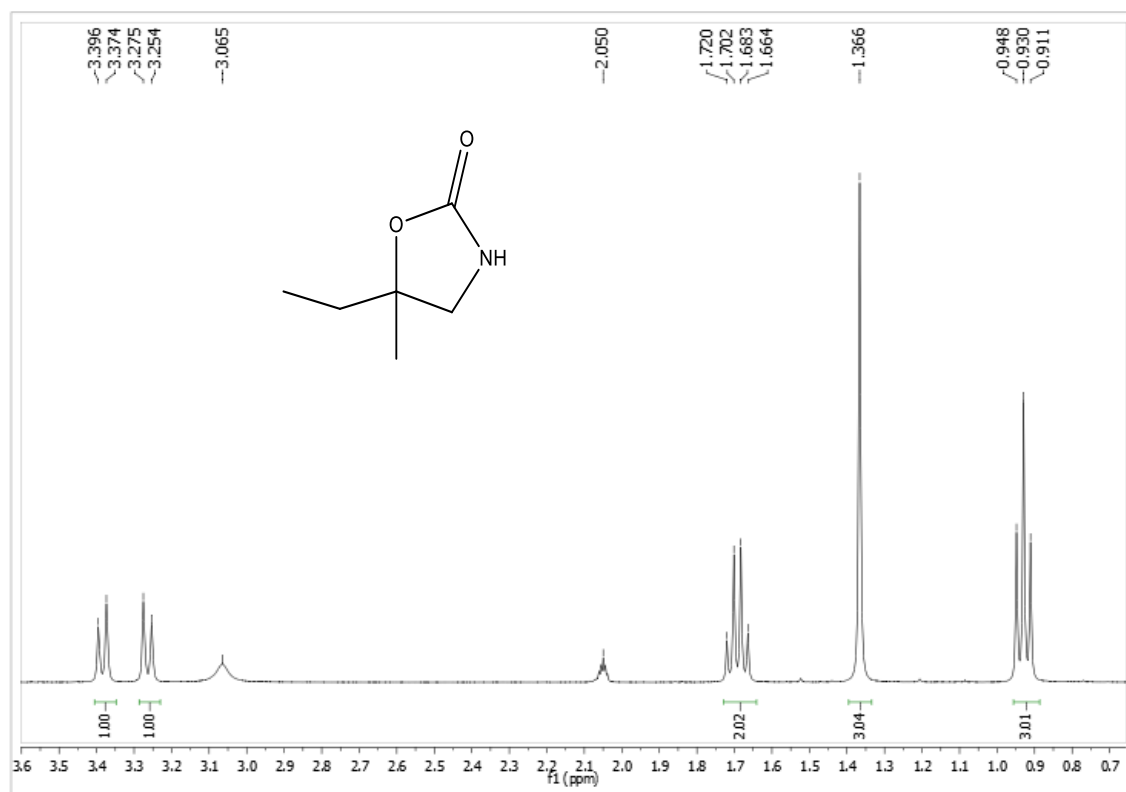


Figura 34: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6) do composto identificado como NL-3.

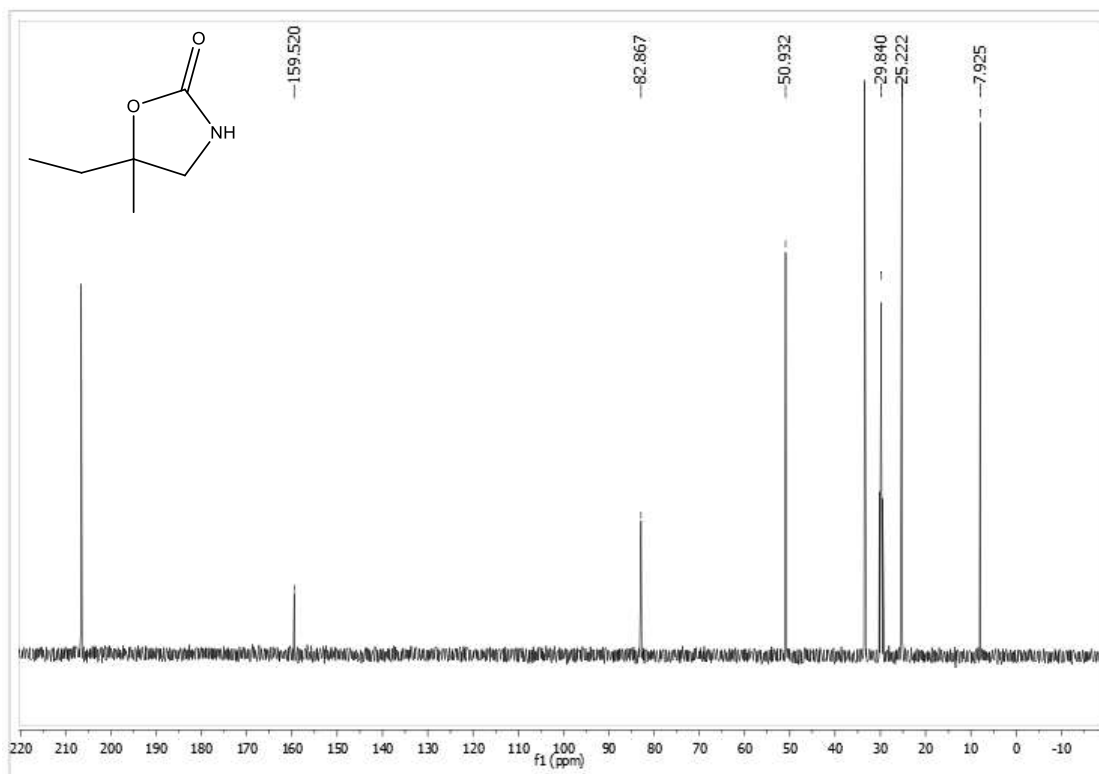


Figura 35: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6) do composto identificado como NL-3.

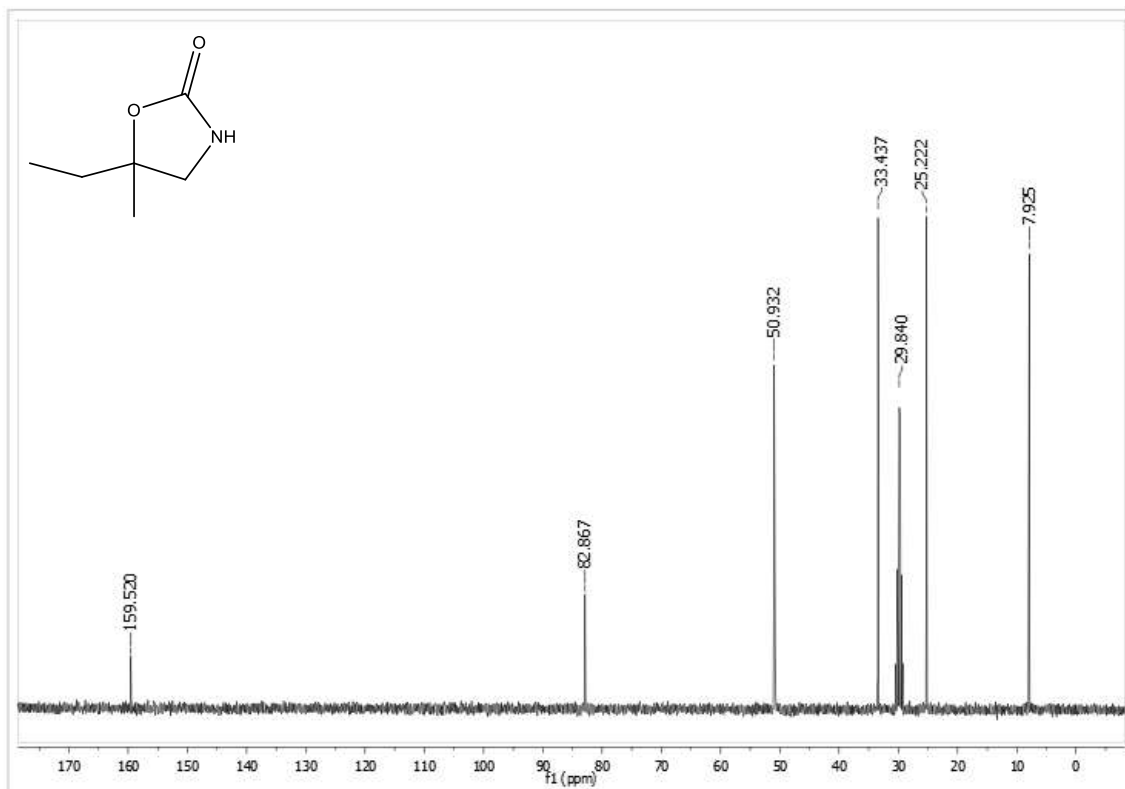


Figura 36: Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400, 100 MHz, acetona- d_6) do composto identificado como NL-3.

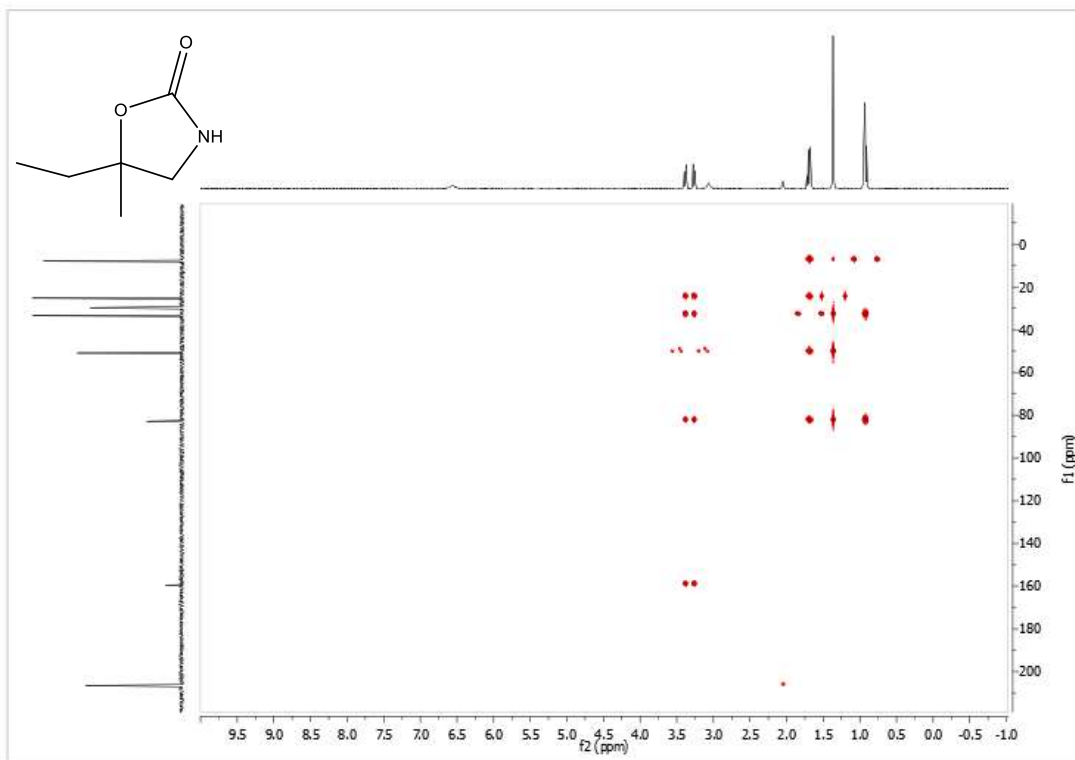


Figura 37: Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400, 100 MHz, acetona- d_6) do composto identificado como NL-3.

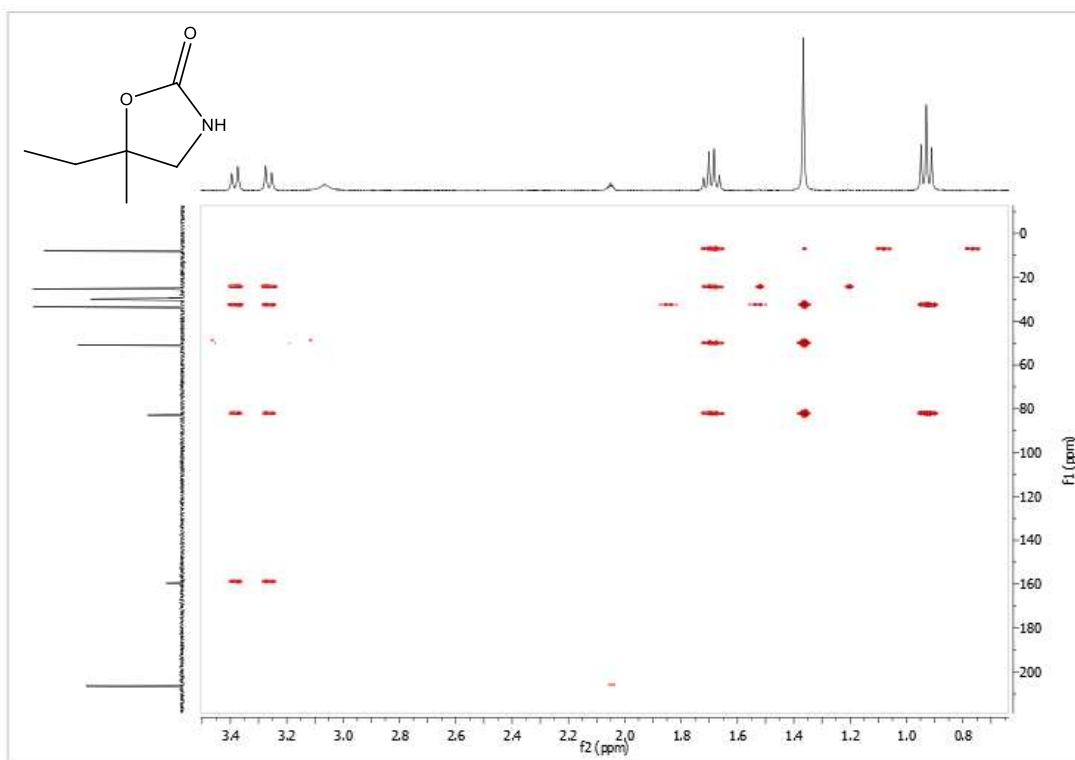


Tabela 3: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de 5-etil-5-metil-oxazolidin-2-ona.

	NL-3 em CD_3COCD_3		Literatura Elenkov et al., 2008 em CDCl_3	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
<i>Posição</i>	-	-	-	-
2	-	159.5	-	159.4
4	3.25 (1H, d, J= 10) 3.37 (1H, d, J= 10)	50.9	3,30 3,42	50.7
5	-	82.8	-	83.6
5'	1.70 (2H, q)	33.4	1,76	32.9
5''	0.93 (3H, t, J=7,6)	7.9	1,00	7.7
5'''	1.36 (3H, s)	25.2	1,49	25.1

5.4. Determinação estrutural de NL-4

A substância codificada como NL-4 foi isolada a partir da fração 7 por HPLC em coluna de fase reversa C-18 a 40% metanol/água (0,1% de ácido fórmico). Apresentando-se como cristais.

NL-4 foi analisada por espectrometria de massas de alta resolução (EMAR), onde foi observado íon de m/z 116,0711 [M+H] (calculado 116,0706, erro em ppm de 4.3) compatível com fórmula molecular $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$, índice de deficiência de hidrogênio igual a dois.

O perfil espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Figuras 38 a 40, págs. 55 e 56), foi semelhante ao encontrado em NL-2. O deslocamento em δ_{C} 158.61, registrado no mapa de contorno de HMBC (Figuras 40 e 41, págs. 57), confirmou a presença da ligação C=O, a qual se relaciona com δ_{H} 3,33 a J₃. A partir da comparação dos dados experimentais com a literatura (BULL, DAVIES e SANGANEE, 1999), foi constatado que NL-4, trata-se de 5-dimetil-oxazolidin-2-ona (Figura 36 pág. 55).

Figura 38: Estrutura do composto identificado como NL-4

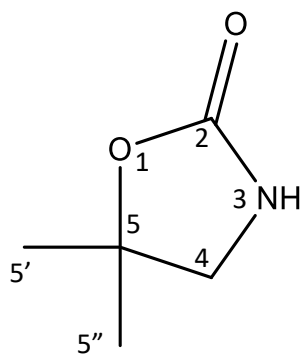
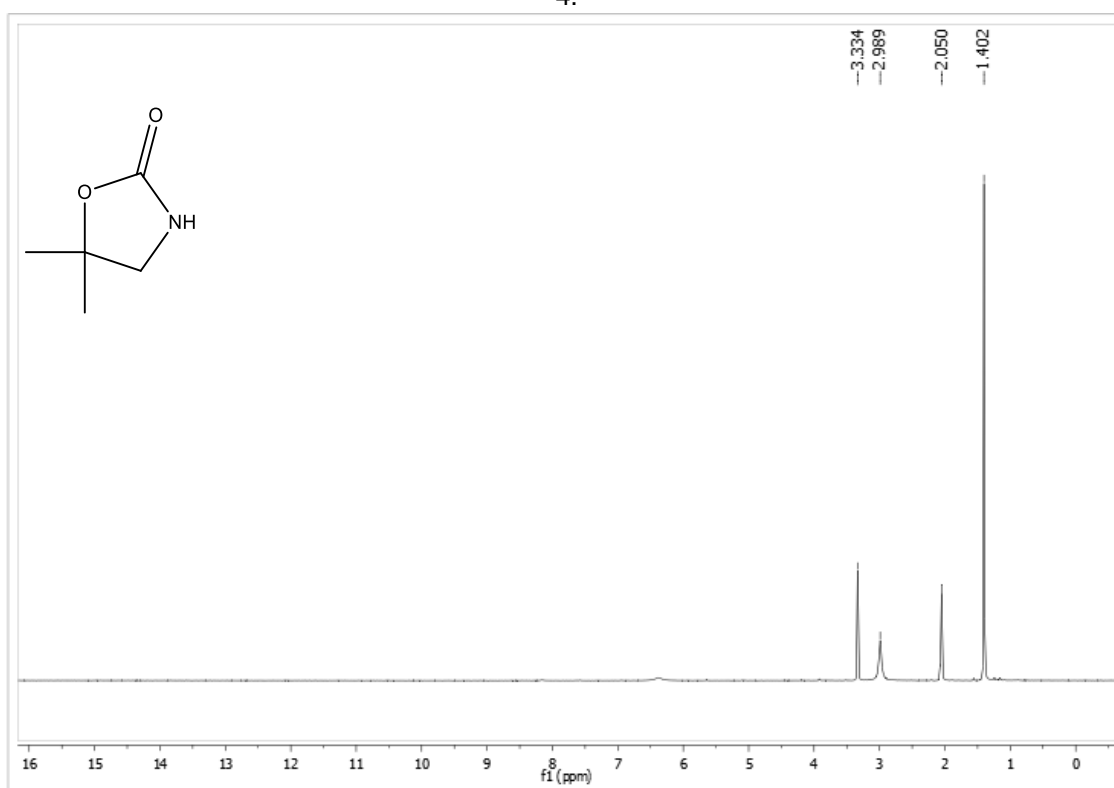
Figura 39: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do composto identificado como NL-4.

Figura 40: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do composto identificado como NL-4.

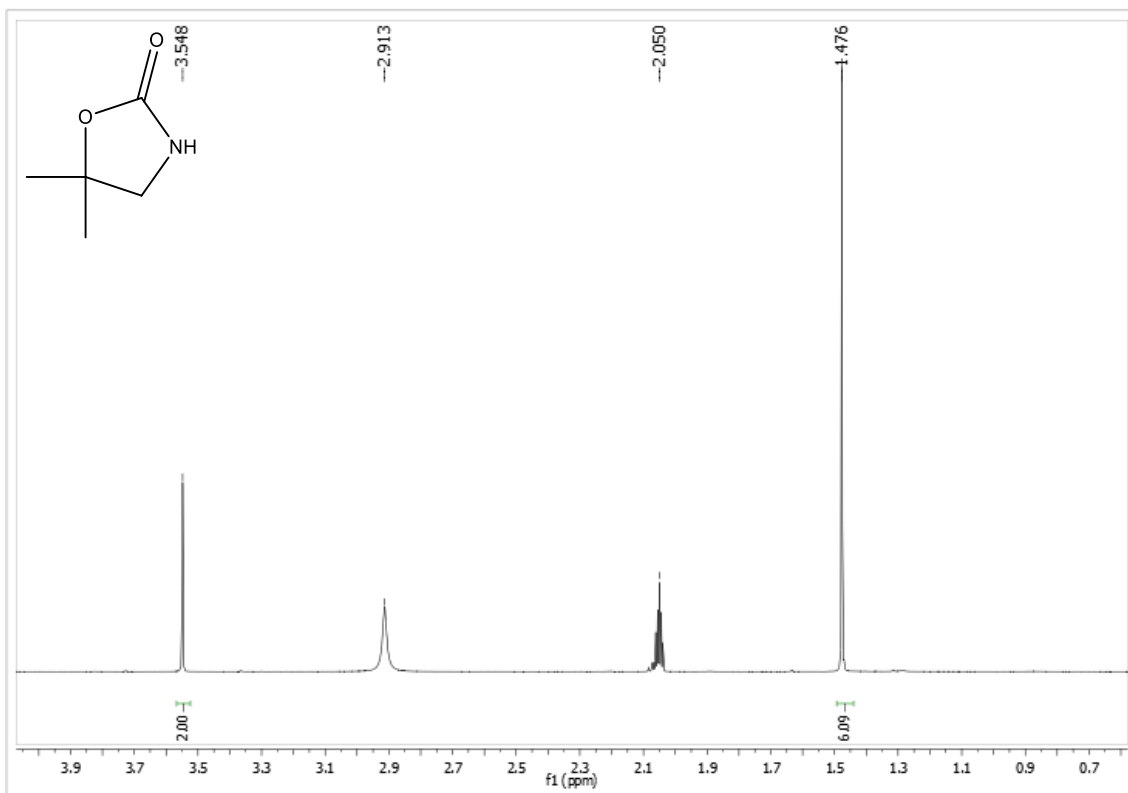


Figura 41: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6) do composto identificado como NL-4.

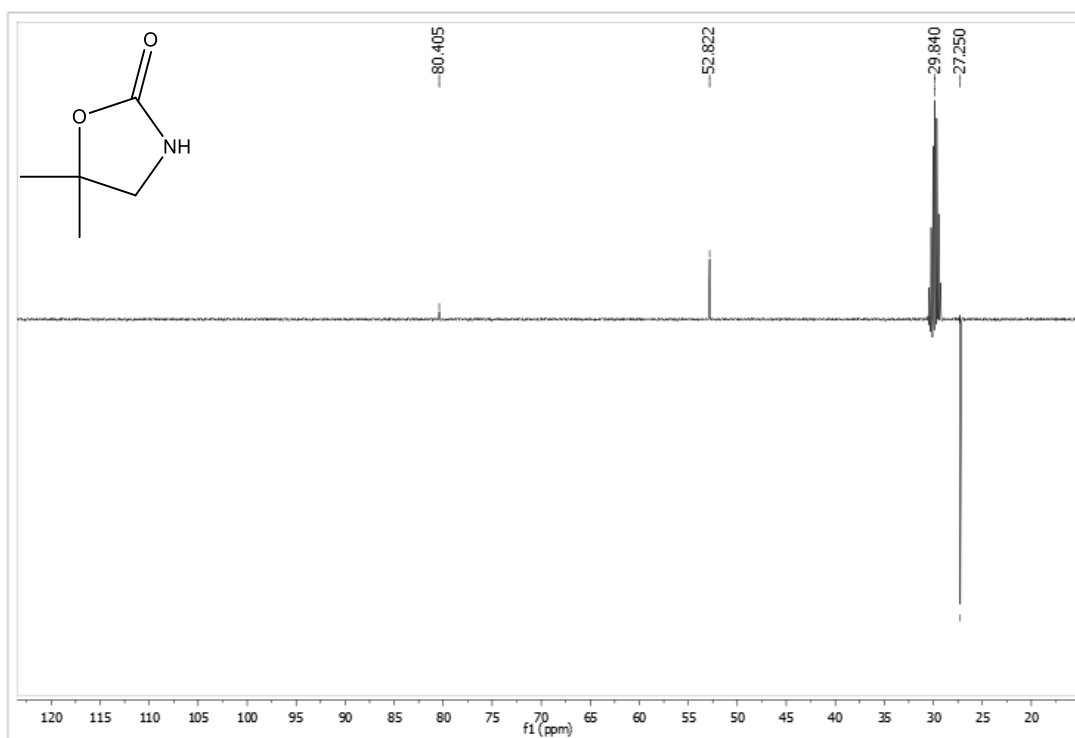


Figura 42: Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400, 100 MHz, acetona-d₆) do composto identificado como NL-4.

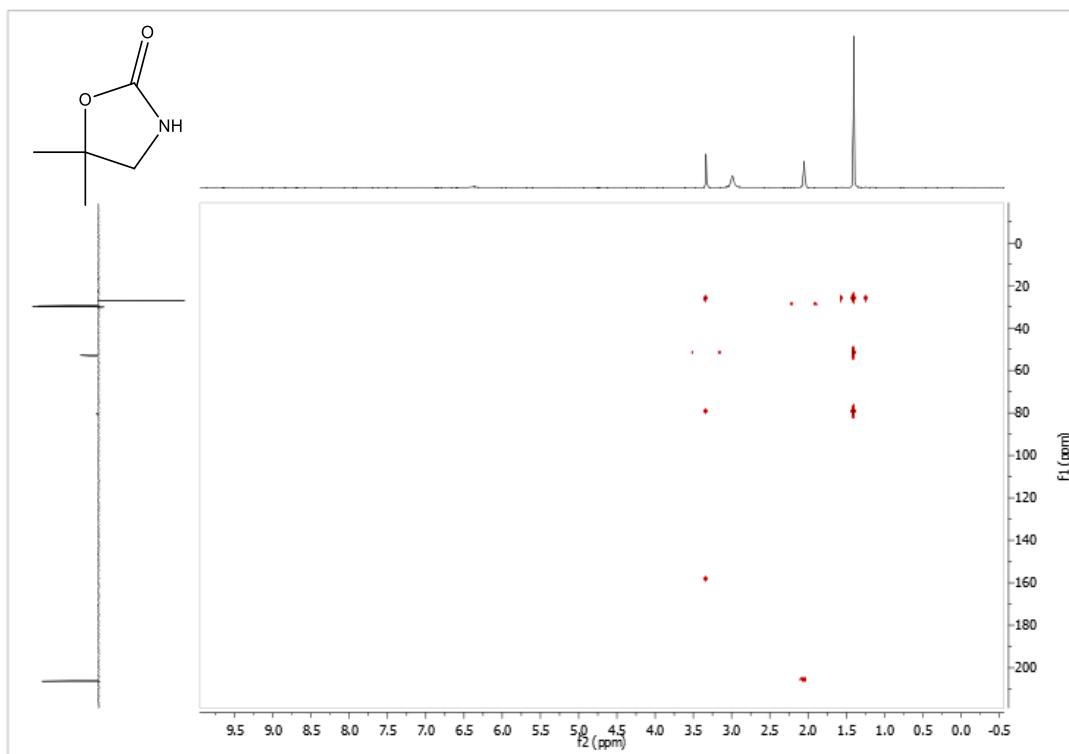


Figura 43: Expansão do Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400, 100 MHz, acetona-d₆) do composto identificado como NL-4.

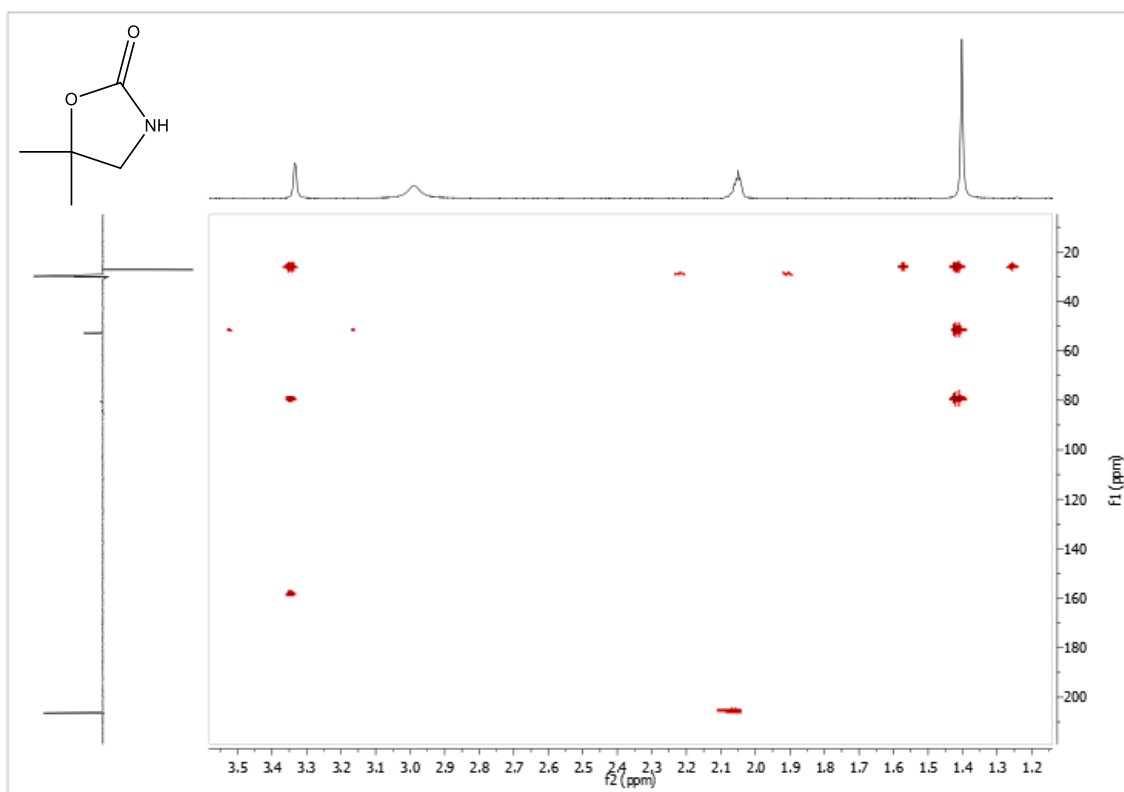


Tabela 4: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de 5-dimetil-oxazolidin-2-ona.

Posição	NL-4 em CD_3COCD_3		Literatura BULL; DAVIES; SANGANEE, 1999, em CDCl_3	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
2	-	158.6	-	160,4
4	3,33 (2H, s)	52.8	3,38	52.7
5	-	80.4	-	81.4
5' e 5''	1.40 (6H, s)	27.2	1,49	27.1

5.5. Determinação estrutural de NL-5

A substância codificada como NL-5 foi isolada a partir na fração 8 por HPLC em coluna de fase reversa C-18 a 60% metanol/água (0,1% de ácido fórmico). Apresentando-se como sólido branco amorfo.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 44, pág. 59) registrou apenas dois sinais, δ_{H} 7,32 (^1H , s) δ_{H} 3,88 (3H, s) o primeiro indica presença de um próton metínico, em região típica de prótons em sistema aromático, enquanto o segundo foi atribuído a presença de metoxila estericamente empedida.

Esses dados foram relacionados aos sinais no RMN de ^{13}C , (Figura 45, pág. 59 e Figura 61, pág. 60), o qual apresentou seis sinais, atribuídos aos carbonos metoxilo em δ_{C} 56.11, metínicos δ_{C} 108,14, três não hidrogenados δ_{C} 148,39, δ_{C} 121,59, δ_{C} 141,56 e um carbonílico δ_{C} 167,58 indicando presença de um anel aromático substituído. A comparação dos dados experimentais com a literatura permitiu a identificação de NL-5 como, ácido siríngico (Figura 43, pág. 58).

Figura 44: Estrutura do composto identificado como NL-5.

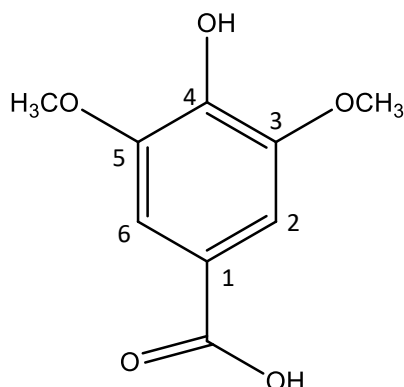


Figura 45: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona-d₆) do composto identificado como NL-5.

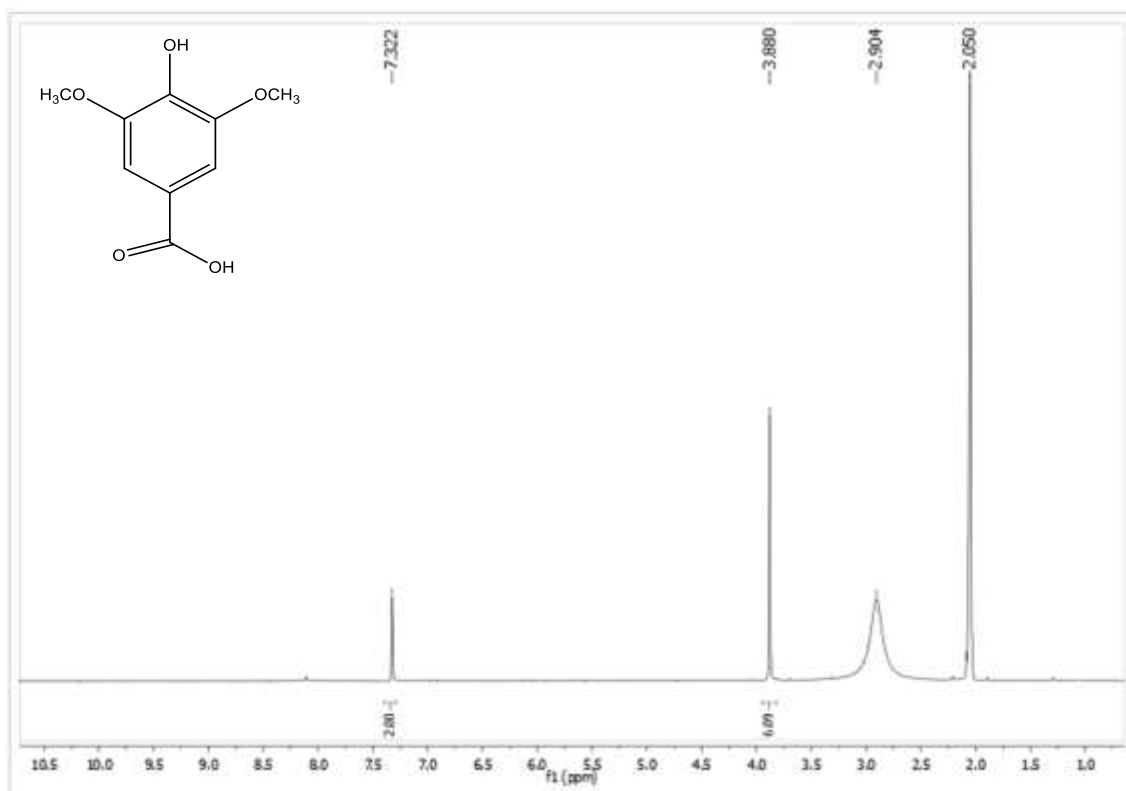


Figura 46: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, acetona-d₆) do composto identificado como NL-5.

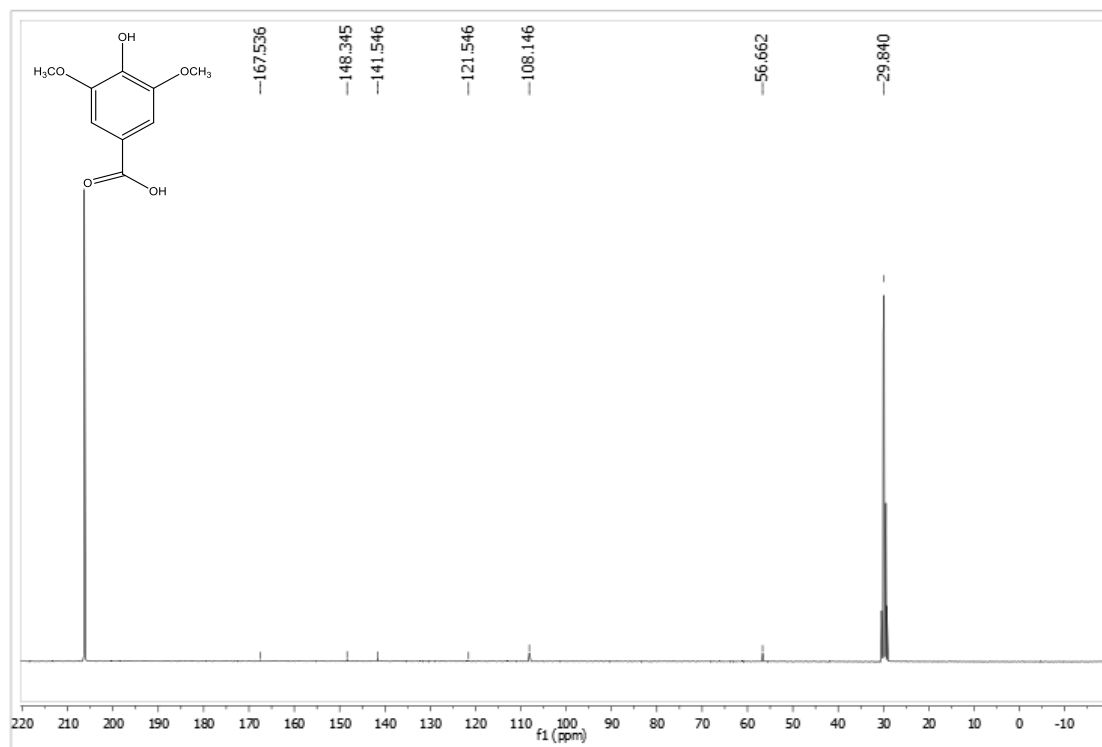


Figura 47: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6) do composto identificado como NL-5.

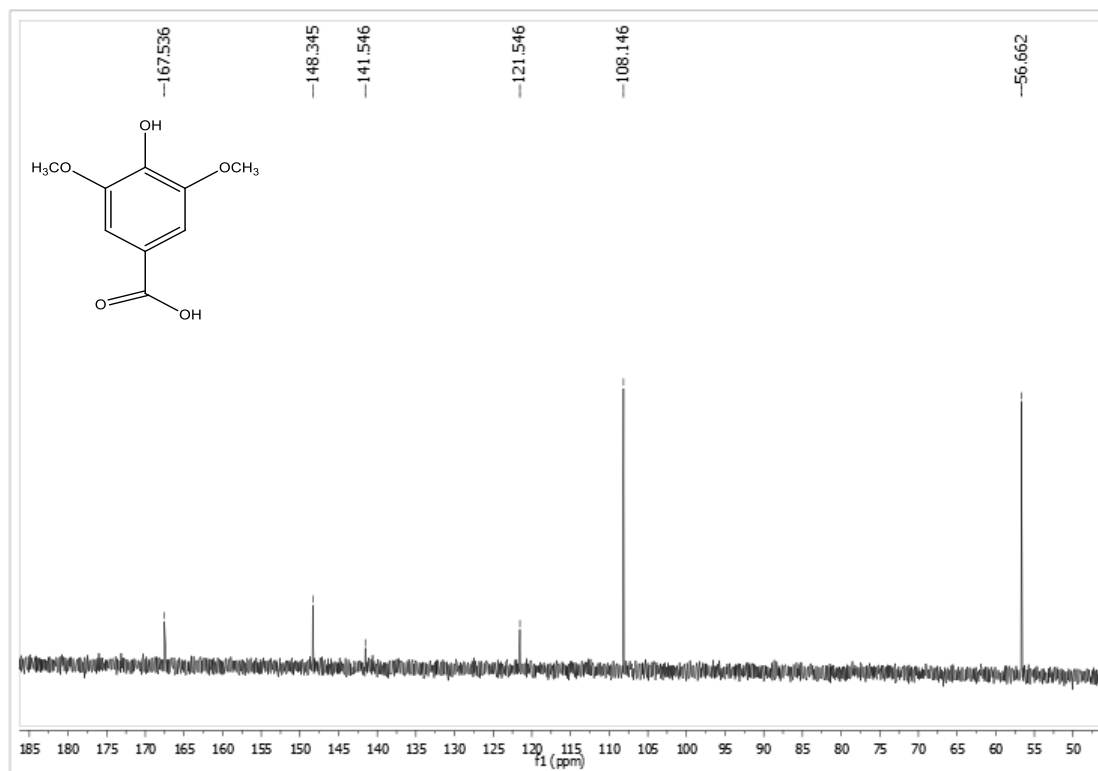


Tabela 5: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) do ácido siríngico.

Posição	NL-5 em CD_3COCD_3		Literatura Öksüz et al., 2002, em DMSO	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1	-	121.5	-	121
2	7,33 (1H, s)	108.1	7,37	108,7
3	-	148.3	-	147,7
4	-	141.5	-	142,0
5	7,33 (1H, s)	148.3	7,37	147,7
6	-	108.1	-	108,7
7	-	167.7	-	168,9
OCH_3	3.88 (3H, s)	56,6	3.90	56,6

5.6. Proposta de Identificação de compostos por HPLC-EM

Tendo em vista a presença das oxazolidino-2-tionas isoladas e sua origem biogenética, buscou-se determinar o perfil de glucosinolatos presente nas raízes de *N. longifolium* através de HPLC-EM.

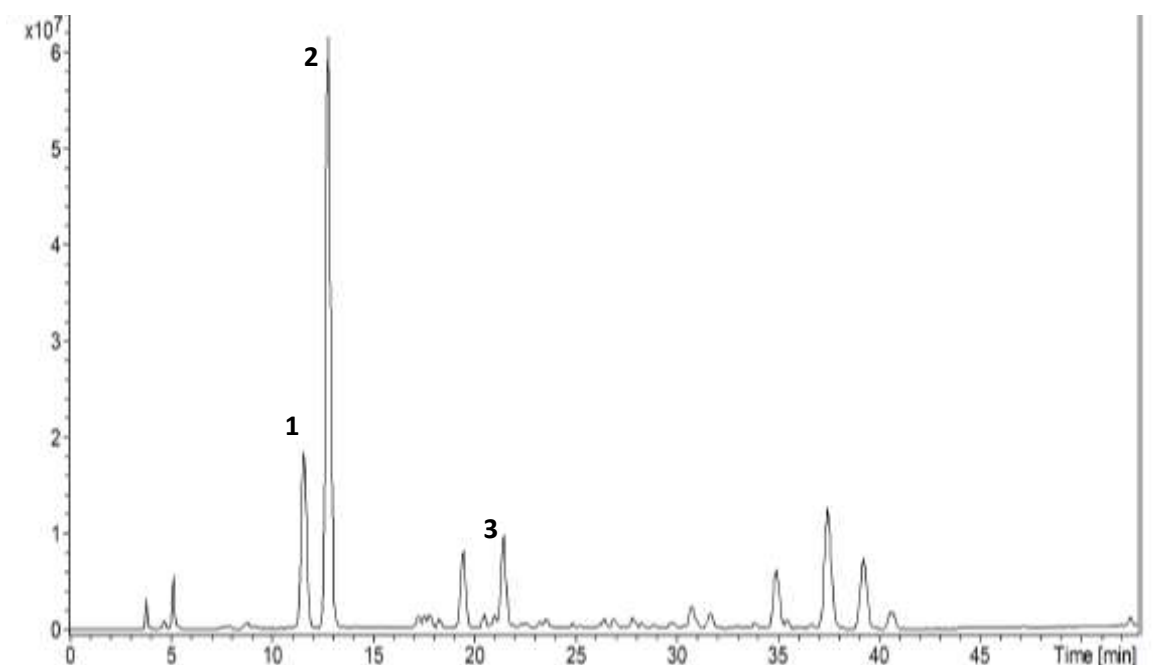
A partir dos fragmentos m/z 96 e m/z 97, indicativos da presença de substâncias sulfatadas, a fase n-butanol foi escolhida para continuidade do estudo, HPLC-ESI-HRMS foi utilizado para obtenção da fórmula molecular, demonstrados na tabela 6.

Tabela 6: Perfil de glucosinolatos presentes na fase butanol da raiz *N. longifolium*.

Pico	[M-H] ⁻ (m/z)	Tr.* (min)	Fórmula Molecular	MS ⁿ (m/z)	Composto	Referência
1	390.0543	11.6	C ₁₁ H ₂₁ NO ₁₀ S ₂	308,275,259,241, 195,139	Glucoconringina	Kim et al., 2016
2	404.0716	12.8	C ₁₂ H ₂₃ NO ₁₀ S ₂	332, 259,226,195,162 241,139,96	Glucocleomina	Maldine et al., 2017 Kusznierewicz et al., 2013
3	388.0765	21.5	C ₁₁ H ₁₉ NO ₁₀ S ₂	344,275,259,195 241,139,96	Progoitrina	Maldine et al., 2017

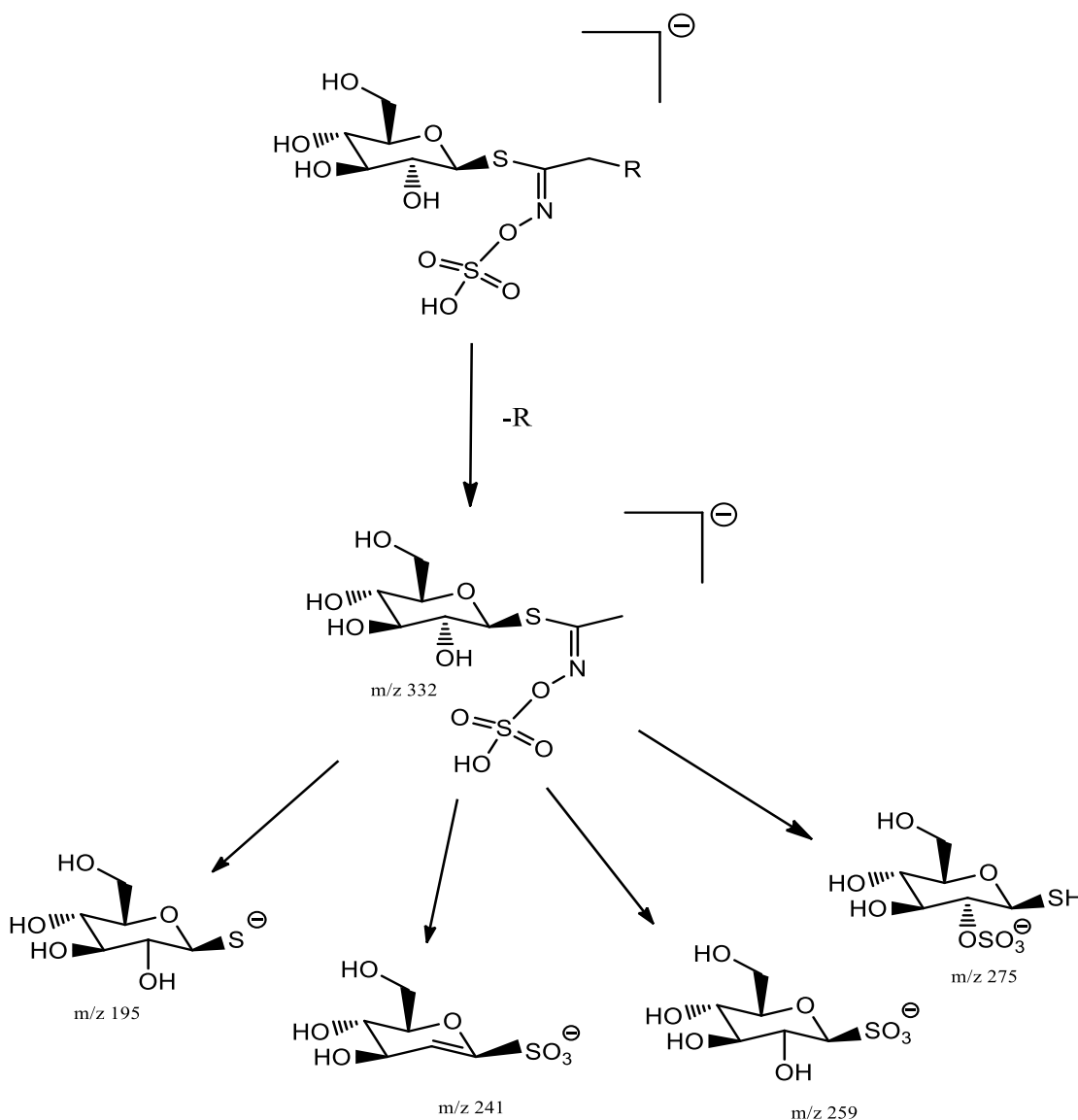
*Tempo de retenção

Figura 48: Cromatograma de íons totais da fase butanólica.



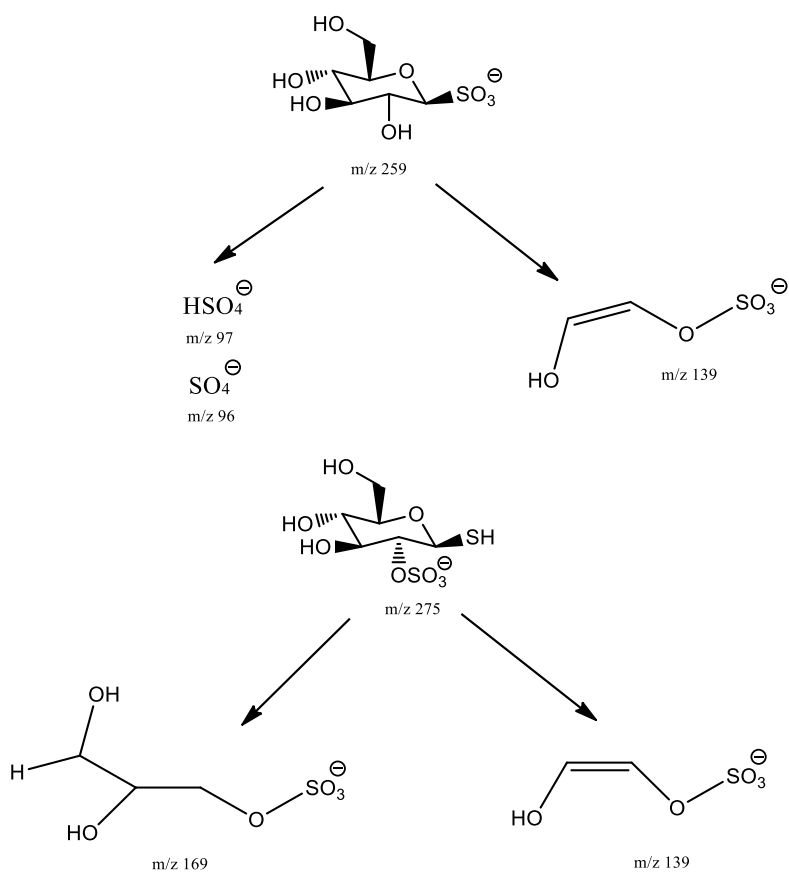
Analisando o padrão de fragmentação de MS / MS de glucosinolatos, observa-se inicialmente clivagem das cadeias alquil, glicose e sulfato, resultando em íons principais para o sulfato de hidrogênio m/z 97, ânion radical sulfato m/z 96. Íons menores resultantes da clivagem da tioglicose e da transferência do grupo sulfato m/z 195, 241, 259, 275 e 291 (Figura 48 e 49, págs. 62 e 63) estão presentes na maioria dos espectros de fragmentação dos glucosinolatos (CATALDI et al., 2007; ROCHFORT et al., 2008; LEE et al., 2008; BIANCO et al., 2016).

Figura 49: Fragmentos resultantes da transferência de sulfato.



Fonte: Adaptado de CATALDI et al., 2007.

Figura 50: Fragmentos comuns formados a partir da tioglicose.



Fonte: Adaptado de BIANCO et al., 2016.

Com base na fragmentação apresentada, a proposta de identificação dos glucosinolatos presentes nas raízes de *N. longifolium* segue demonstrada nas Figuras 50 a 54, págs. 64 a 66.

Figura 51: Espectro de massas com fragmentos em MS2 e MS3 do pico 1.

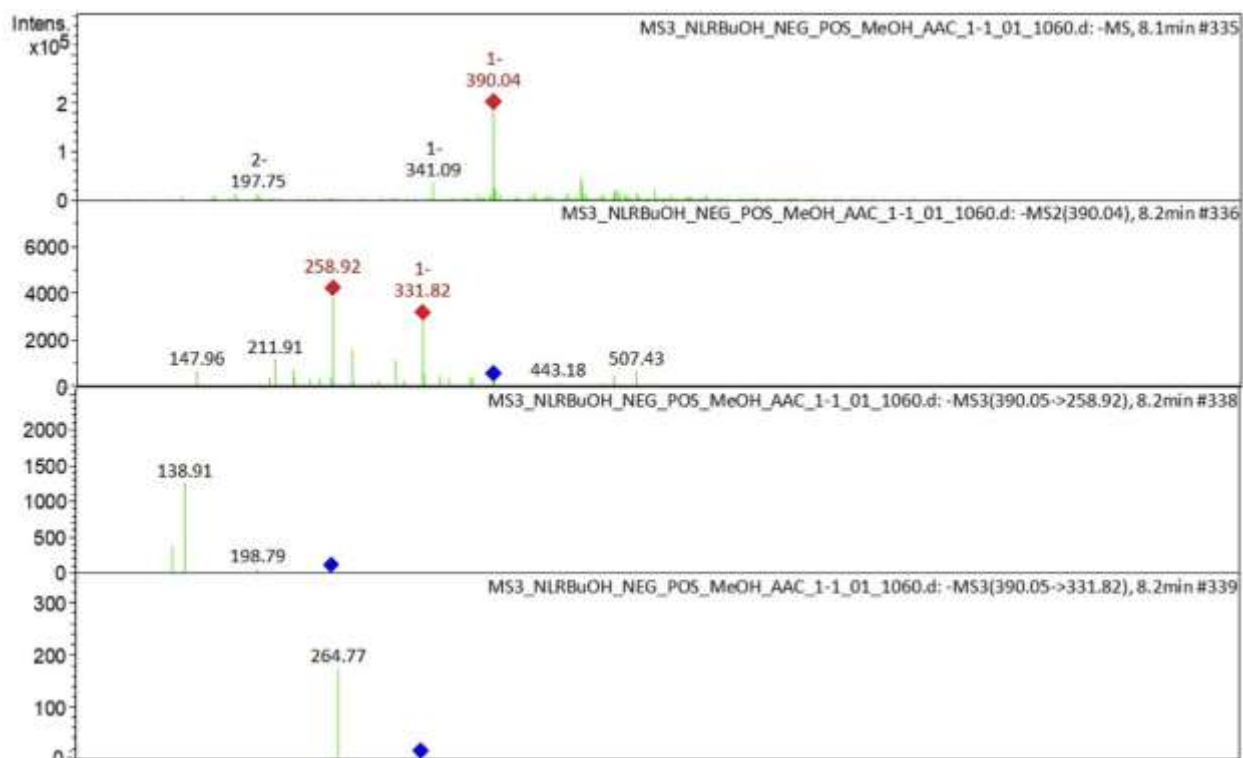
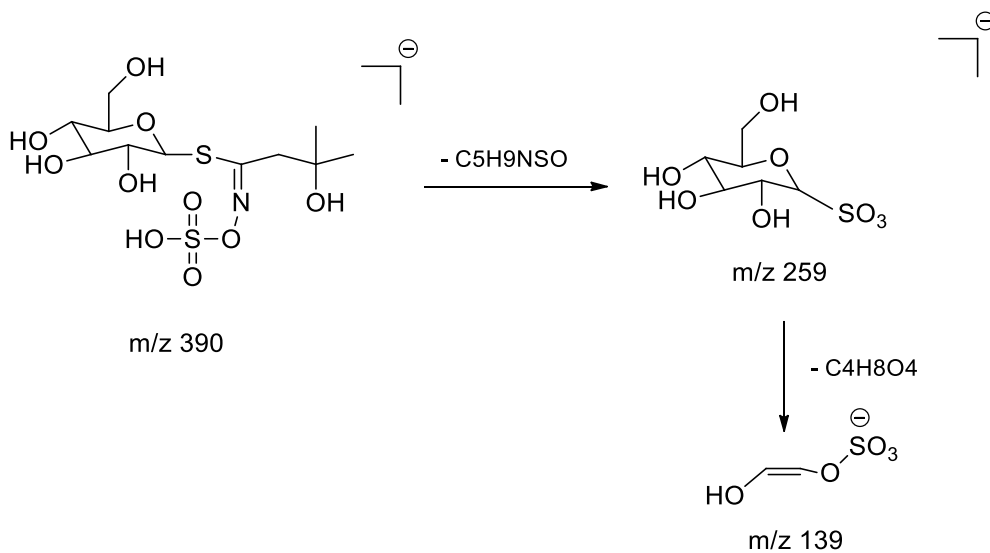


Figura 52: Via de fragmentação de glucoconringina.



Fonte: o autor

Figura 53: Espectro de massas com fragmentos em MS2 e MS3 do pico 2.

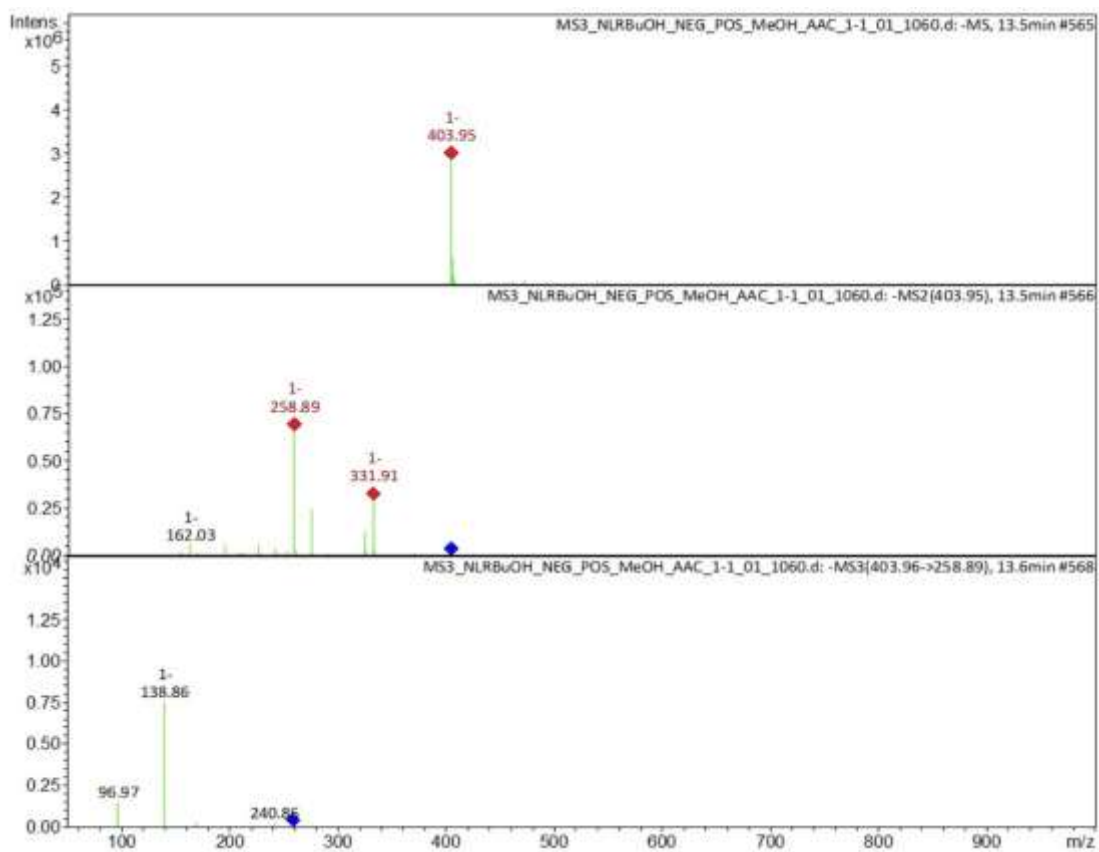
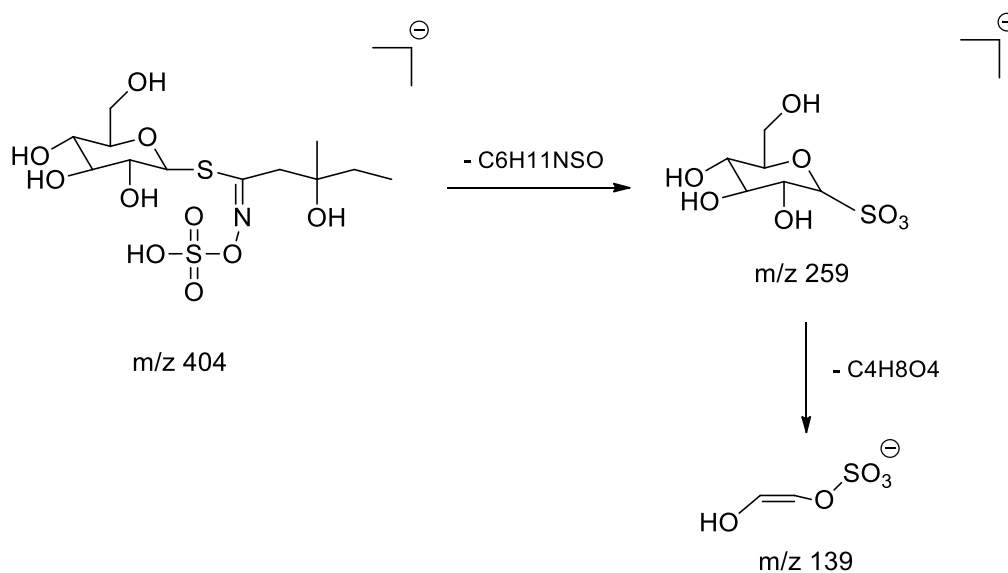


Figura 54: Via de fragmentação de glucocleomina.



Fonte: o autor

Figura 55: Espectro de massas com fragmentos em MS2 e MS3 do pico 3.

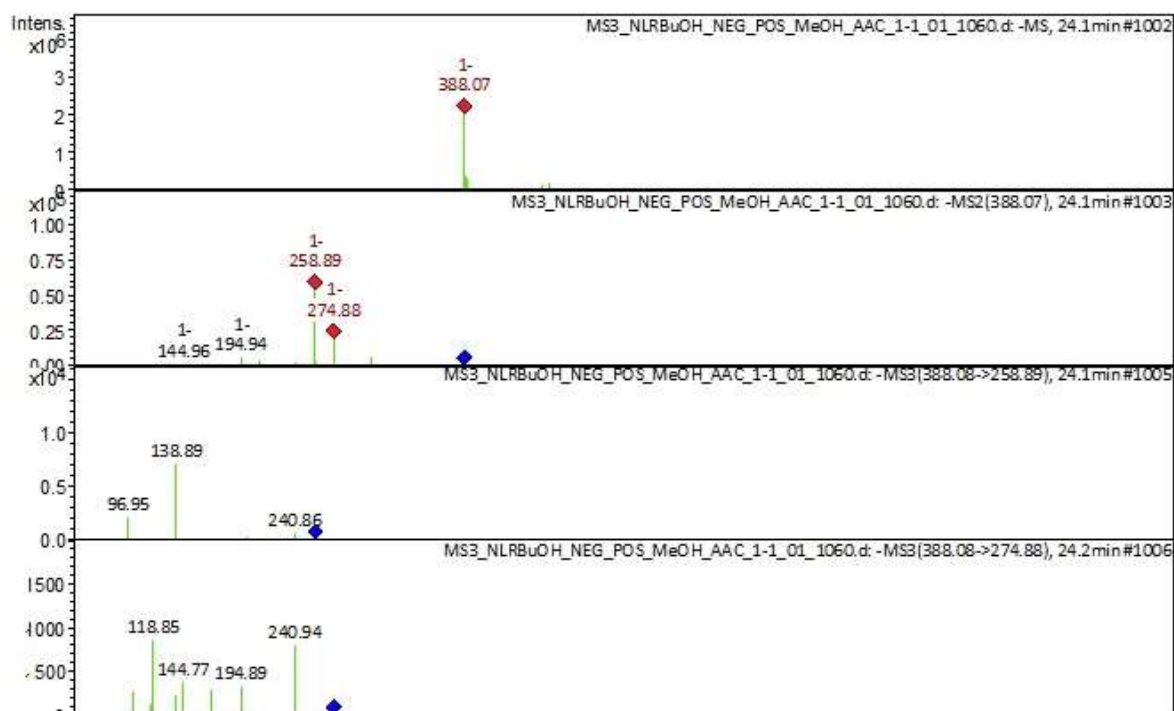
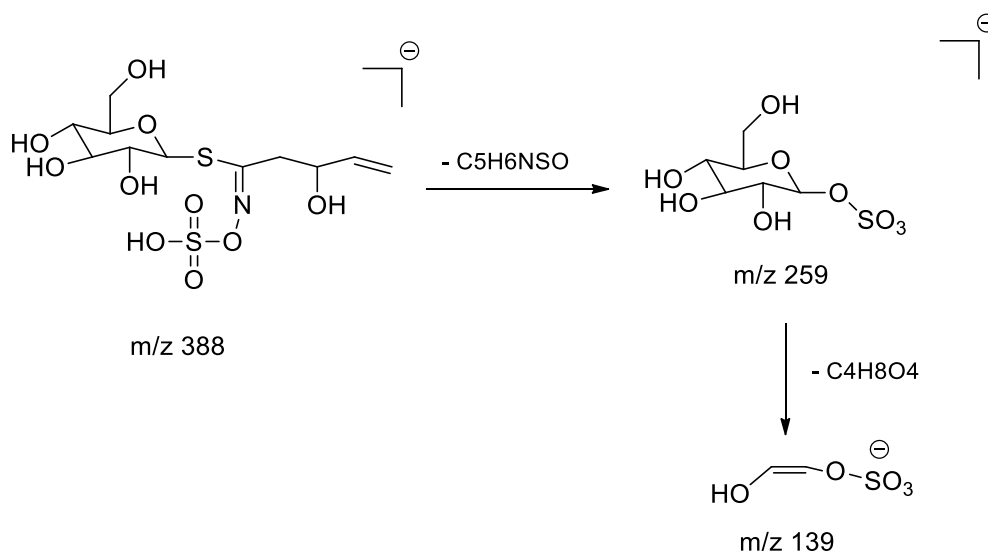


Figura 56: Via de fragmentação de progoitrina.



Fonte: o autor

A ocorrência de glucosinolatos alifáticos nas raízes de *N. longifolium* condiz com o perfil encontrado na família Capparaceae . A duração e intensidade do estresse hídrico, típico do clima semiárido, torna as espécies de capparaceae neotropicais principalmente da Caatinga nordestina, como o *N. longifolium*, uma fonte em potencial desse tipo de metabólito (GOBBO-NETO e LOPES, 2013; Shawon et al., 2020). A identificação de progoitrina na fase butanol reforça a hipótese de outras oxazolidino-2-tionas e oxazolidinonas estarem presentes no extrato.

Considerando o uso medicinal das raízes de incó, mais estudos devem ser realizados no intuito mensurar os níveis de oxazolidino-2-tionas. Uma vez que o seu consumo pode acarretar em efeitos deletérios à saúde humana.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- Este é o primeiro estudo fitoquímico do gênero *Neocalyptrocalyx*. A partir da pesquisa com as raízes de *N. longifolium* cinco substâncias foram isoladas.
- A caracterização estrutural a partir das técnicas espectroscópicas permitiu a identificação de duas oxazolidino-2-tionas, duas oxazolidin-2-onas e um derivado de ácido fenólico.
- Este trabalho descreve pela primeira vez a ocorrência de 5-dimetiloxazolidin-2-ona em plantas e demonstra a diversidade química das espécies de Capparaceae do semiárido brasileiro.
- A análise por espectrometria de massas permitiu identificação de três glucosinolatos alifáticos, indicando que estes se distribuem por todo organismo vegetal.

Referências

7. REFERÊNCIAS

ABDEL-FARID, I. B. et al. Metabolic Characterization of Brassica rapa Leaves by NMR Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55(19), 7936–7943, 2007.

AGERBIRK, N., DE VOS, M., KIM, J. H., & JANDER, G. Indole glucosinolate breakdown and its biological effects. **Phytochemistry Reviews**, ed 8(1), p. 101, 2009.

AGERBIRK, N., OLSEN, C. E. Glucosinolate hydrolysis products in the crucifer *Barbarea vulgaris* include a thiazolidine-2-one from a specific phenolic isomer as well as oxazolidine-2-thiones. **Phytochemistry**, ed. 115, p. 143–151, 2015.

AGERBIRK, N., MATTHES, A., ERTHMAN, P. Ø., UGOLINI L., CINTI, S., LAZARIDI, E., NUZILLARD, J., MULLER, C., BAK, S., ROLLIN, P., LAZZERI, L. Glucosinolate turnover in Brassicales species to an oxazolidin-2-one, formed via the 2-thione and without formation of thioamide. **Phytochemistry**, ed. 153, p. 79-93, 2018.

AGRA, M. D. F. et al Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, 111(2), 383-395, 2007.

ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of ethnopharmacology**, ed. 114(3), p. 325-354, 2007.

ALBUQUERQUE, U. P. et al. Rapid ethnobotanical diagnosis of the Fulni-ô Indigenous lands (NE Brazil): floristic survey and local conservation priorities for medicinal plants. **Environment, development and sustainability**, ed 13(2), p.277-292, 2011.

ALEXANDRE, E. M. et al. Analysis of glucosinolates content in food products. In: GALANAKIS, C.M. **Glucosinolates: Properties, Recovery, and Applications**, Academic Press, p 213-250, 2020.

ALMEIDA, C. F. C. B. R. et al. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). **Journal of arid environments**, ed. 62(1), p. 127-142, 2015.

ALMEIDA, C. F. C. B. R. et al. Medicinal plants popularly used in the Xingó region – a semi-arid location in Northeastern Brazil. **J Ethnobiology Ethnomedicine** ed 2, p.15, 2006.

ALSHAILABI, Eda MA; KHALIFA, Samah A. Chemoprotective activity of on induced gastric mucosal injury in male rats. **Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 18, n. 2, 2019.

AYDOĞAN, C. Recent advances and applications in LC-HRMS for food and plant natural products: a critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, p.1-19, 2020.

AYELEN RAMALLO, I. et al. Chemical Diversification of Natural Product Extracts. **Studies in Natural Products Chemistry**, ed 60, p. 371-398, 2018.

BAIRD, L., YAMAMOTO, M. The Keap1-Nrf2 pathway: From mechanism to medical applications. **Oxidative Stress**, ed 9, p. 125–147, 2020.

BARBA, F. J. et al. Bioavailability of glucosinolates and their breakdown products: Impact of processing. **Frontiers in nutrition**, ed 3, p. 24, 2016.

BARBARELLA, G., BONGINI, A., CHATGILIALOGLU, C., ROSSINI, S., TUGNOLI, V. Sulfur-33 NMR of cyclic sulfides, sulfoxides, and sulfones. **The Journal of Organic Chemistry**, ed 52(17), p. 3857–3860, 1987.

BATISTA, F. P. et al. Crataeva tapia bark lectin (CrataBL) is a chemoattractant for endothelial cells that targets heparan sulfate and promotes in vitro angiogenesis. **Biochimie**, 2019.

BELL, L. et al. The *Eruca sativa* genome and transcriptome: A targeted analysis of sulfur metabolism and glucosinolate biosynthesis pre and postharvest. **BioRxiv**.2019.

BERTUZZI, T. et al. Trace monitoring of goitrina and thiouracil in milk and cheese. **Food Analytical Methods**, ed 9(10), p. 2952-2959, 2016.

BHAGYAWANT, S. S., E SRIVASTAVA, N. Plant-Derived Enzymes: A Treasure for Food Biotechnology. **Enzymes in Food Biotechnology**, 2019.

BHAT, R., VYAS, D. Myrosinase: insights on structural, catalytic, regulatory, and environmental interactions. **Critical Reviews in Biotechnology**, ed 39, p. 1–16, 2019.

BIANCO G. et al. Investigation of Glucosinolates by Mass Spectrometry. In: MÉRILLON JM., RAMAWAT K. (eds) **Glucosinolates. Reference Series in Phytochemistry**. Springer, Cham, 2016.

BLAŽEVIĆ I. et al. Glucosinolates: Novel Sources and Biological Potential. In: MÉRILLON, J.M., RAMAWAT K. (eds) **Glucosinolates. Reference Series in Phytochemistry**. Springer, Cham. 2014.

BLAŽEVIĆ, I. et al. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Lepidium latifolium* L. Hydrodistillate, Extract and Its Major Sulfur Volatile Allyl Isothiocyanate. **Chemistry & Biodiversity**, 2019.

BLAŽEVIĆ, I. et al. Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants. **Phytochemistry**, 2020.

BROWN, P. D., & MORRA, M. J. Glucosinolate-containing plant tissues as bioherbicides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, ed 43(12), p. 3070–3074, 1995.

BULL, S., DAVIES, S., SANGANEE, H. Asymmetric alkylations using SuperQuat auxiliaries—an investigation into the synthesis and stability of enolates derived

from 5, 5-disubstituted oxazolidin-2-ones. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, (4), 387-398, 1999.

CATALDI, T. R., RUBINO, A., LELARIO, F., & BUFO, S. A. Naturally occurring glucosinolates in plant extracts of rocket salad (*Eruca sativa* L.) identified by liquid chromatography coupled with negative ion electrospray ionization and quadrupole ion-trap mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom.**, ed 21(14), p. 2374-2388, 2007.

CHANG, W. J. et al. Preparation of allyl isothiocyanate nanoparticles, their anti-inflammatory activity towards RAW 264.7 macrophage cells and anti-proliferative effect on HT1376 bladder cancer cells. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, ed 99(6), p. 3106-3116, 2019.

CHAUHAN M. S., STILL I. W. J. ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Organic Sulfur Compounds: Cyclic Sulfides, Sulfoxides, Sulfones, and Thiones. **Revue canadienne de chimie**, ed 53(19), p. 2880-2890, 1975.

CHEN, S. Chemodiversity of the glucosinolate-myrosinase system at the single cell-type resolution. **Frontiers in plant science**, ed 10, p. 618, 2019.

CHENG, L. et al. Sulforaphane and sulforaphene: Two potential anticancer compounds from glucosinolates. In: GALANAKIS, C.M. **Glucosinolates: Properties, Recovery, and Applications**, Academic Press, cap 9, p. 281-312, 2020.

CHEW, F. S. Biological Effects of Glucosinolates. **American Chemical Society** Cap 12, 155-181, 1988.

CHINI, C., BILIA, A. R., KEITA, A., MORELLI, I. Protoalkaloids from *Boscia angustifolia*. **Planta medica**, 58(05), 476-476, 1992

CLARKE, D. B. Glucosinolates, structures and analysis in food. **Analytical Methods**, ed 2(4), p. 310-325, 2010.

CORDERO, F. M., LASCIALFARI, L., & MACHETTI, F. Five-Membered Ring Systems: With O & N Atoms. **Progress in Heterocyclic Chemistry**, 399–429, 2020.

CORNEJO X. Notes on the nomenclature of Neotropical Capparaceae: an answer to Global Flora. **Harvard Papers in Botany** ed 23: p.179–185, 2018.

CRISTIANI, F., DEVILLANOVA, F. A., & VERANI, G. Infrared study of 1,3-thiazolidin(e)-2-one, -2-thione, and -2-selone and their 1-oxa-analogues. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, v. 3, p. 324-327, 1977.

CRUZ, M. P. et al. "I eat the manofê so it is not forgotten": local perceptions and consumption of native wild edible plants from seasonal dry forests in Brazil. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, ed.10(1), p.45, 2014.

CRUZ, M. P., PERONI, N., ALBUQUERQUE, U. P. Knowledge, use and management of native wild edible plants from a seasonal dry forest (NE, Brazil). **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, ed 9(1), p. 79, 2013.

CUADRADO, J. L. C. et al. Insecticidal Properties of Capsaicinoids and Glucosinolates Extracted from *Capsicum chinense* and *Tropaeolum tuberosum*. **Insects**, 10(5), 132, 2019.

DAXENBICHLER, M. E. et al. Glucosinolate composition of seeds from 297 species of wild plants. **Phytochemistry**, ed. 30(8), p. 2623-2638, 1991.

DHAKAD, P. K., SHARMA, P. K., & KUMAR, S. A review on ethnobiological & medicinal potential of *Capparaceae* family plant: *Capparis decidua* (Forssk.) Edgew. **Advances in Pharmacology and Pharmacy**, ed 4(3), p. 27-39, 2016.

DI GIOIA, F., PINELA, J., DE HARO BAILÓN, A., FERREIRA, I. C., & PETROPOULOS, S. A. The dilemma of “good” and “bad” glucosinolates and the potential to regulate their content. In: Galanakis, C.M. **Glucosinolates: Properties, Recovery, and Applications**, Academic Press, p. 1-45, 2020.

EISENSCHMIDT-BÖNN, D et al. Structural diversification during glucosinolate breakdown: Mechanisms of thiocyanate, epithionitrile and simple nitrile formation. **The Plant Journal**, ed 99 (2), p. 329-343, 2019.

ELENKOV, M. M. et al. Formation of enantiopure 5-substituted oxazolidinones through enzyme-catalysed kinetic resolution of epoxides. **Organic letters**, 10(12), 2417-2420, 2008.

ELIEL, E. L., RAO, V. S., PIETRUSIEWICZ, K. M. Carbon-13 NMR spectra of saturated heterocycles: VIII—tetrahydrofurans and 1,3-dioxolanes. **Organic Magnetic Resonance**, ed. 12(8), p. 461–466, 1979.

ELKHATEEB, A. et al. LC-ESI-MS Analysis, Antitumor and Antiviral Activities of *Bosica senegalensis* Aqueous Methanolic Extract. **Egyptian Journal of Chemistry**, ed 62(1), p. 77-83, 2019.

ERIKSSON, S. et al. Identification and characterization of soluble and insoluble myrosinase isoenzymes in different organs of *Sinapis alba*. **PHYSIOLOGIA PLANTARUM**, ed. 111, p.353–364, 2001.

ETTLINGER, M. G., & LUNDEEN, A. J. The structures of sinigrin and sinalbin; an enzymatic rearrangement. **Journal of the American Chemical Society**, ed 78(16), p. 4172–4173, 1956.

FAHEY, J. W., WEHAGE S. L, HOLTZCLAW W. D, et al. Protection of humans by plant glucosinolates: Efficiency of conversion of glucosinolates to isothiocyanates by the gastrointestinal microflora, **Cancer Prev. Res.**, 5, 603–611, 2012.

FAHEY, J. W.; ZALCMANN, A. T.; TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. **Phytochemistry**, v. 56, n. 1, p. 5-51, 2001.

FAROOQ ANWAR, G. M. et al. *Capparis spinosa* L.: a plant with high potential for development of functional foods and nutraceuticals/pharmaceuticals. **International Journal of Pharmacology**, ed 12, p. 201-219, 2016.

FERREIRA, R.S. et al. Crystal Structure of Crataeva tapia Bark Protein (CrataBL) and Its Effect in Human Prostate Cancer Cell Lines. **PLOS ONE**, ed 8(6), 2013.

GANIN, H. et al. Sulforaphane and erucin, natural isothiocyanates from broccoli, inhibit bacterial quorum sensing. **MedChemComm**, ed 4 (1), p. 175-179, 2013.

GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, Apr. 2007.

GRASER, G. et al. The Methionine Chain Elongation Pathway in the Biosynthesis of Glucosinolates in *Eruca sativa* (*Brassicaceae*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, ed 378(2), p. 411–419, 2000.

GREER, M. A. Isolation from Rutabaga Seed of Progoitrinaa, the Precursor of the Naturally Occurring Antithyroid Compound, Goitrina (L-5-Vinyl-2-thiooxazolidone). **Journal of the American Chemical Society**, ed 78(6), p. 1260-1261, 1956.

GULL, T. et al. *Capparis* species: A potential source of bioactives and high-value components: A review. **Industrial Crops and Products**, ed 67, p. 81–96, 2015.

GUPTA, P. et al. Molecular targets of isothiocyanates in cancer: Recent advances. **Molecular Nutrition & Food Research**, ed 58(8), p. 1685–1707, 2014.

HABBU, P. et al. Antimicrobial metabolites from marine microorganisms. **Chinese Journal of Natural Medicines**, 14(2), 101–116, 2016.

HANDA, N. Glucosinolates: Multifaceted Plant Metabolites. **Journal of the Gujarat Research Society**, v. 21, n. 8, p. 981-988, 2019.

Hassan-Abdallah, A. et al. Medicinal plants and their uses by the people in the Region of Randa. **Journal of Ethnopharmacology**, Djibouti, ed. 148(2), p.701–713, 2013.

HWANG, I. M. Et al. Simultaneous direct determination of 15 glucosinolates in eight Brassica species by. **Food chemistry**, ed. 282, p. 127-133, 2019.

IBRAHIM, N. et al. Advanced NMR-based structural investigation of glucosinolates and desulfoglucosinolates. **Journal of natural products**, ed 81(2), p. 323-334, 2018.

IRANSHAHI, M. A review of volatile sulfur-containing compounds from terrestrial plants: biosynthesis, distribution and analytical methods. **Journal of essential oil research**, v. 24, n. 4, p. 393-434, 2012.

ISO 9167:2019 Rapeseed and rapeseed meals — Determination of glucosinolates content — Method using high-performance liquid chromatography

JAAFARU, M. S. et al. Neuroprotective effects of glucomoringin-isothiocyanate against H₂O₂-Induced cytotoxicity in neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. **Neurotoxicology**, ed. 75, p. 89-104, 2019.

JIANG, H.E. et al. The discovery of *Capparis spinosa* L. (*Capparidaceae*) in the Yanghai Tombs (2800 years b.p.), NW China, and its medicinal implications. **Journal of Ethnopharmacology, China**, ed 113(3), p. 409–420, 2007.

JÚNIOR, W. S. F., LADIO, A. H., DE ALBUQUERQUE, U. P. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. **Journal of ethnopharmacology**, ed. 138(1), p. 238-252, 2011.

KABOLI, P. J. et al. Targets and mechanisms of sulforaphane derivatives obtained from cruciferous plants with special focus on breast cancer–contradictory effects and future perspectives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, ed. 121, 109635.

KALA, C. et al. N. Isothiocyanates: a review. **Research Journal of Pharmacognosy**, ed 5(2), p.71-89, 2018.

KERS, L.E. *Capparaceae*. In: KUBITZKI, K., BAYER, C. (eds) **Flowering Plants - Dicotyledons**, vol 5. Springer, Berlin, Heidelberg, 2003.

KIM, H. W. et al. Identification and quantification of glucosinolates in Korean leaf mustard germplasm (*Brassica juncea* var. *integrifolia*) by liquid chromatography–electrospray ionization/tandem-mass spectrometry. **European Food Research and Technology**, ed 242(9), p.1479-1484, 2016.

KLIEBENSTEIN, D. J., KROYMANN, J., MITCHELL-OLDS, T. The glucosinolate–myrosinase system in an ecological and evolutionary context. **Current Opinion in Plant Biology**, 8(3), 264–271, 2005.

KROYMANN, J. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, 14(3), 246–251, 2011.

KUSZNIEREWICZ, B. Convenient identification of glucosinolates based on mass spectra obtained during liquid chromatography–diode array–electrospray ionisation mass spectrometry analysis: Method verification for sprouts of different Brassicaceae species extracts. **Journal of Chromatography A**, 1278, 108–115, 2013.

LEACH, K. L., BRICKNER, S. J., NOE, M. C., & MILLER, P. F. Linezolid, the first oxazolidinone antibacterial agent. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1222(1), 49–54, 2011.

LEAL, I. R., TABARELLI, M., SILVA, J. M. C. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Editora Universitária UFPE, 2003.

LEE, K. C. et al. Rapid screening method for intact glucosinolates in Chinese medicinal herbs by using liquid chromatography coupled with electrospray ionization ion trap mass spectrometry in negative ion mode. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 22(18), 2825-2834, 2008.

LEITE, P.M., CASTILHO, R.O. Chemosystematics of Brassicales. **Biochemical Systematics and Ecology**, ed 71, p. 205-211, 2017.

LEONI, O., BERNARDI, R., GUEYRARD, D., ROLLIN, P., & PALMIERI, S. Chemo-enzymatic preparation from renewable resources of enantiopure 1, 3-oxazolidine-2-thiones. **Tetrahedron: Asymmetry**, ed10 (24), p. 4775-4780, 1999.

LI, J. et al. Metabolic profiles and pharmacokinetics of goitrina in rats through liquid chromatography combined with electrospray ionization–tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**. 2019.

LIANG, H., & YUAN, Q. Natural sulforaphane as a functional chemopreventive agent: including a review of isolation, purification and analysis methods. **Critical Reviews in Biotechnology**, ed 32(3), p. 218–234, 2011.

LUCENA, R. F. P. et al. Local uses of native plants in an area of Caatinga vegetation (Pernambuco, NE Brazil). **Ethnobotany Research and Applications**, ed 6, p. 3-14, 2008.

LUCENA, R. F., Albuquerque, U. P., Monteiro, J. M., Cecília De Fátima, C. B. R., Florentino, A. T., & Ferraz, J. S. F. Useful plants of the semi-arid northeastern region of Brazil—a look at their conservation and sustainable use. **Environmental Monitoring and Assessment**, 125(1-3), 281-290, 2007.

MACHERLA, V. R. et al. Lipoxazolidinones A, B, and C: Antibacterial 4-Oxazolidinones from a Marine Actinomycete Isolated from a Guam Marine Sediment. **Journal of Natural Products**, 70(9), 1454–1457, 2007.

MÄKELÄ, V., VAAHTERA, L., HELMINEN, et al. Automated Processing and Statistical Analysis of NMR spectra obtained from *Arabidopsis thaliana* Extracts. **bioRxiv**, 2019.

MALDINI, M. et al. Identification and quantification of glucosinolates in different tissues of *Raphanus raphanistrum* by liquid chromatography tandem-mass spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, 61, 20-27, 2017.

MANICI, L. M., LAZZERI, L., & PALMIERI, S. In vitro fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45(7), 2768-2773, 1997.

MASUDA, H. et al. Antimicrobial Activities of Isothiocyanates. **Aroma Active Compounds in Foods**, ed 19, p. 229–250, 2001.

MCALPINE, J. B., CHEN, S. N., KUTATELADZE, A. et al. The value of universally available raw NMR data for transparency, reproducibility, and integrity in natural product research. **Natural product reports**, 36(1), 35-107, 2019.

MELROSE, J. The Glucosinolates: A Sulphur Glucoside Family of Mustard Anti-Tumour and Antimicrobial Phytochemicals of Potential Therapeutic Application. **Biomedicines**, ed 7(3), p 62-89, 2019.

MERCADO GÓMEZ, J. D., & ESCALANTE, T. Areas of endemism of the Neotropical species of *Capparaceae*. **Biological Journal of the Linnean Society**, ed 126(3), p. 507-520, 2018.

MITHEN, R., BENNETT, R., MARQUEZ, J. Glucosinolate biochemical diversity and innovation in the Brassicales. **Phytochemistry**, ed 71(17-18), p. 2074–2086, 2010.

MONJANE, J. A., UAMUSSE, A., & STERNER, O. Novel metabolites from the roots of *Cadaba natalensis*. **Phytochemistry letters**, 16, 283-286, 2016.

MONTAUT, S., READ, S. et al. Investigation of the glucosinolates in *Hesperis matronalis* L. and *Hesperis laciniata* All. Unveiling 4'-O- β -D- apiofuranosylglucomatronalin. **Carbohydrate Research**, 2019.

MORALES-NAVA, R., OLIVO, H. F. Chiral Sulfur-Containing Imide Auxiliaries in Medicinal Chemistry. **Imides**, p. 169–253, 2019.

NADEEM, A. et al. Nrf2 activator, sulforaphane ameliorates autism-like symptoms through suppression of Th17 related signaling and rectification of oxidant-antioxidant imbalance in periphery and brain of BTBR T+ tf/J mice. **Behavioural brain research**, ed 364, p. 213-224, 2019.

NADEEM, A. et al. Differential regulation of Nrf2 is linked to elevated inflammation and nitrate stress in monocytes of children with autism. **Psychoneuroendocrinology**, 113, 2020.

NAZAR, S. et al. *Capparis decidua* Edgew (Forssk.): A comprehensive review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology and nutraceutical potential. *Capparis decidua* Edgew (Forssk.): A comprehensive review, **Arabian Journal of Chemistry**, 2018.

NIE, L. et al. Antiviral activity of *Isatidis Radix* derived glucosinolate isomers and their breakdown products against influenza A in vitro/ovo and mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**, 2020.

OGINSKY, E. L., STEIN, A. E., GREER, M. A. Myrosinase Activity in Bacteria as Demonstrated by the Conversion of Progoitrina to Goitrina. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, ed.119 (2), p. 360-364, 1965.

OGUAKWA, J. U. et al. Isolation of Cleomin from roots of *Ritchiea longipedicillata*. **Planta medica**, 41(04), 410-412, 1981.

ÖKSÜZ, S., ULUBELEN, A., BARLA, A., & VOELTER, W. Terpenoids and aromatic compounds from *Euphorbia heteradena*. **Turkish Journal of Chemistry**, 26(4), 457-464, 2002.

OLSEN, C. E. et al. Glucosinolate diversity within a phylogenetic framework of the tribe Cardamineae (Brassicaceae) unraveled with HPLC-MS/MS and NMR-based analytical distinction of 70 desulfoglucosinolates. **Phytochemistry**, 132, 33–56, 2016.

OLSEN, O., SØRENSEN, H. Recent advances in the analysis of glucosinolates. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 58(9), 857–865, 1981.

ONGARO, A., POVOLO, C., ZAGOTTO, G., & RIBAUDO, G. HPLC and NMR quantification of bioactive compounds in flowers and leaves of Brassica rapa: the influence of aging. **Natural product research**, 1-4, 2018.

ORTIZ, A., SANSINENA, E. The synthetic versatility of oxazolidinethiones. **Journal of Sulfur Chemistry**, ed 28(2), p. 109-147, 2007.

PARCHEM, K., PIEKARSKA, A., BARTOSZEK, A. Enzymatic activities behind degradation of glucosinolates. In: GALANAKIS, C.M. **Glucosinolates: Properties, Recovery, and Applications**, Academic Press, cap 3, p. 79–106, 2020.

PAVIA, D., LAPMAN, G., KRIZ, G., VYVIAN, J., **Introdução à espectroscopia**, quinta edição, ed. Cengage, Estados Unidos, 2015.

PRESTERA, T. et al. Comprehensive Chromatographic and Spectroscopic Methods for the Separation and Identification of Intact Glucosinolates. **Analytical Biochemistry**, 239(2), 168–179, 1996.

PRIETO, M. A., LÓPEZ, C. J., SIMAL-GANDARA, J. Glucosinolates: Molecular structure, breakdown, genetic, bioavailability, properties and healthy and adverse effects. **Advances in Food and Nutrition Research**. ed 90, p. 305-350, 2019.

QUIROS, H. C. et al. α -Keto acid elongation and glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis thaliana. **Theoretical and Applied Genetics**, ed 101(3), p. 429-437, 2000.

RADULOVIĆ, N. S. et al. Two goitrogenic 1, 3-oxazolidine-2-thione derivatives from Brassicales taxa: challenging identification, occurrence and immunomodulatory effects. **Food and Chemical Toxicology**, ed110, p. 94-108, 2017.

RAJAN, T. S. et al. Anticancer activity of glucomoringin isothiocyanate in human malignant astrocytoma cells. **Fitoterapia**, ed. 110, p. 1-7, 2016.

RECIO, R. Biologically Active Isothiocyanates: Protecting Plants and Healing Humans. **Studies in Natural Products Chemistry**, ed 53, p. 167-242, 2017.

RIBEIRO, A. et al. Ethnobotanical survey in Canhane village, district of Massingir, Mozambique: medicinal plants and traditional knowledge. **J. Ethnobiol. Ethnomed.** ed 6, p.1–15, 2010.

ROCHFORT, S. J. et al. Class targeted metabolomics: ESI ion trap screening methods for glucosinolates based on MSⁿ fragmentation. **Phytochemistry**, ed 69(8), 1671-1679, 2008.

ROLLIN, P., TATIBOUËT, A. Sulfur Metabolites in Brassicales: From Daily Vegetables to Thiofunctional Chemistry. **Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements**, ed 186(5), p. 1130–1136, 2011.

ROMEO, L. et al. Isothiocyanates: An Overview of Their Antimicrobial Activity against Human Infections. **Molecules**, ed 23(3), p. 624, 2018.

ŠAMEC, D., & ZELJKOVIĆ, S. Ć.. Analytical methods focused on studying phytonutrients in food. In **Phytonutrients in Food**, p. 237-244, Woodhead Publishing, 2020.

SARSBY, J., Towers, M. W., Stain, C., Cramer, R., & Koroleva, O. A. (2012). Mass spectrometry imaging of glucosinolates in Arabidopsis flowers and siliques. **Phytochemistry**, 77, 110-118.

SHARMA, B. et al. Anti-diabetic potential of alkaloid rich fraction from Capparis decidua on diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, ed. 127(2), p. 457–462, 2010.

SHARMA, P., PATIL, D., PATIL, A. Crataeva tapia linn.-an important medicinal plant: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, 4(2), 582, 2013.

SHARMA, S. Isothiocyanates in Heterocyclic Synthesis. **Sulfur Reports**, ed 8(5), p. 327–454, 1989.

SHAWON, R. A. et al. Influence of drought stress on bioactive compounds, antioxidant enzymes and glucosinolate contents of Chinese cabbage (*Brassica rapa*). **Food Chemistry**, 308, 2020.

SHROFF, R. et al. Nonuniform distribution of glucosinolates in Arabidopsis thaliana leaves has important consequences for plant defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, ed 105(16), p. 6196–6201, 2008

SILVA, L. N. et al. Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors. **Chemical Reviews**, ed 116(16), p. 9162–9236, 2016

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. in Cap. 2 Infrared Spectrometry, pag. 102-106 Sétima edição. Jhon Wiley & Sons. 2005.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., e PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 2016.

SMOLINSKA, U. et al. Toxicity of glucosinolate degradation products from *Brassica napus* seed meal toward *Aphanomyces euteiches* f. sp. *Phytopathology*, ed 87(1), p. 77-82, 1997.

SOARES NETO, R. L. et al. Flora do Ceará, Brasil: Capparaceae. **Rodriguésia**, ed 65(3), p. 671-684, 2014.

SOARES NETO, R. L., JARDIM, J. G.. Capparaceae no Rio Grande do Norte, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro , v. 66, n. 3, p. 847-857, Sept. 2015 .

SØNDERBY, I.E.; GEU-FLORES, F.; HALKIER, B.A. Biosynthesis of glucosinolates—gene discovery and beyond. **Trends in plant science**, v. 15, n. 5, p. 283-290, 2010.

SUN, J., et al. Profiling glucosinolate metabolites in human urine and plasma after broccoli consumption using non-targeted and targeted metabolomic analyses. **Food chemistry**, p. 309,2020.

SURH, Y.-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature Reviews Cancer**, ed 3(10), p. 768–780, 2003.

TAMER, C. E., SUNA, S., ÖZCAN-SINIR, G. Toxicological Aspects of Ingredients Used in Nonalcoholic Beverages. In: GRUMEZESC, A. **Non-Alcoholic Beverages**, ed 1, v6, p.441–481, 2019.

TAN, M. C. S., & NOEL, M. G. Glucosinolates, Degradation Products and Myrosinase Activity in *Raphanus sativus* Linn. **Pharmacognosy Journal**, ed11. P. 866, 2019.

THOMAS, M. et al. The Lossen rearrangement from free hydroxamic acids. **Organic & biomolecular chemistry**, ed 17(22), p. 5420-5427, 2019.

TRINDADE, M. R. O. Uso e disponibilidade da vegetação lenhosa em comunidades rurais no Rio Grande do Norte e Paraíba, Brasil. 2013. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade; Biologia Estrutural e Funcional.) - **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, Natal, 2013.

TROYER, J. K., STEPHENSON, K. K., & FAHEY, J. W. Analysis of glucosinolates from broccoli and other cruciferous vegetables by hydrophilic interaction liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 919(2), 299-304, 2001.

VERPOORTE, R., CONTIN, A. E MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Phytochemistry Reviews**, vol. 1, p. 13–25, 2002.

VO, Q. V. et al. Anti-inflammatory activity of synthetic and natural glucoraphanin. **Journal of the Serbian Chemical Society**, ed 84(5), p. 445-453, 2019.

VO, Q. V. Biosynthesis and nutritious effects. In: GALANAKIS, C.M. **Glucosinolates: Properties, Recovery, and Applications**, Academic Press, cap. 2 p 47–78, 2020.

WETTER, L. R.; YOUNGS, C. G. A thiourea-UV assay for total glucosinolate content in rapeseed meals. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 53, n. 4, p. 162-164, 1976.

WITTSTOCK, U. et al. Glucosinolate Breakdown. **Advances in Botanical Research**. Ed 80, p. 125-169, 2016.

WITTSTOCK, U., HALKIER, B. A. Glucosinolate research in the Arabidopsis era. **Trends in Plant Science**, ed. 7(6), p. 263–270, 2002.

WONG, D. W. S. Natural Toxicants. **Mechanism and Theory in Food Chemistry**, ed 2, p. 327–359, 2017.

YANG, C.-X. et al. Comparison of the inhibitory potential of benzyl isothiocyanate and phenethyl isothiocyanate on Shiga toxin-producing and enterotoxigenic *Escherichia coli*. **LWT**. 2019.

ZAPPIA, G. et al. The Contribution of Oxazolidinone Frame to The Biological Activity of Pharmaceutical Drugs and Natural Products. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 7(4), 389–409, 2007.

ZHANG, Y., TALALAY, P. Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms. **Cancer research**, ed 54(7), p. 1976-1981, 1994.