

IDENTIFICAÇÃO DE ALIL ISOTIOCIANATO EM CRAMBE POR HPLC

Sidiane Coltro-Roncato^{1*}; José Renato Stangarlin²; Éder Lisandro de Moraes Flores³;
Edilaine Della Valentina Gonçalves¹; Omari Dangelo Forlin Dildey¹; Affonso Celso Gonçalves Júnior²

SAP 13-OU Data envio: 15/08/2014 Data do aceite: 02/10/2014
Scientia Agraria Paranaensis – SAP; ISSN: 1983-1471
Marechal Cândido Rondon, v. 13, n. suplemento, dez., p. 347-352, 2014

RESUMO - A identificação de moléculas presentes nas plantas por meio de técnicas cromatográficas como HPLC, podem trazer resultados promissores para o controle alternativo de doenças, uma vez que brássicas apresentam glicosinolatos, que atuam na defesa das plantas. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de alil isotiocianato por meio de HPLC (cromatografia líquida de alta performance de fase reversa), através de diferentes métodos de extração. Foram utilizadas folhas de *Crambe abyssinica*, secas em estufa a 45 °C por 48 h. Os métodos de extração consistiram em utilizar 200 mg L⁻¹ do material vegetal para cada método: infusão, solução aquosa, cetônico, hidroalcoólico, metanólico, hexânico e clorofórmico. A identificação e quantificação foi por meio de HPLC, com coluna C18, UV a 244 nm. O ensaio consistiu em sete tratamentos com três repetições, utilizando o teste de Tukey a p<0,05. Os solventes metanol e hidroalcoólico foram os que apresentaram afinidade com as moléculas do alil isotiocianato, sendo o metanol o melhor solvente para a extração, com concentração de 133,88 mAU. O alil isotiocianato foi identificado no tempo de 4,29 min e 4,35 min para o extrato metanólico e hidroalcoólico respectivamente.

Palavras-chave: *Crambe abyssinica* Hochst, glicosinolato, cromatografia.

Identification of allyl isothiocyanate in crambe by HPLC

ABSTRACT - The identification of molecules present in plants by chromatographic techniques such as HPLC, can bring promising alternative to the control of plant diseases, since brassicas have glucosinolates, which act in plant defense. The objective of this work was to verify the presence of allyl isothiocyanate by HPLC (High Performance Liquid Chromatography Reverse Phase), using different methods of extraction. The plant material was leaves of *Crambe abyssinica*, dried at 45 °C for 48 h. The extraction methods used consisted of 200 mg L⁻¹ of plant material for each method: infusion, aqueous solution, and cetonic, hydroalcoholic, methanol, hexane and chloroform solutions. The identification and quantification were by HPLC on C18 column UV at 244 nm. The experiment consisted of seven treatments with three replicates using the Tukey p <0.05 test. The solvents methanol and hydroalcoholic presented high affinity to molecules of allyl isothiocyanate, and methanol was the best solvent for the extraction, with a concentration of 133.88 mAU. The allyl isothiocyanate was identified at the time of 4.29 min and 4.35 min for methanol and hydroalcoholic extract respectively.

Key words: *Crambe abyssinica* Hochst, glucosinolate, chromatography.

¹Discentes do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Rua Pernambuco 1777, CEP 85960-000, Marechal Cândido Rondon, PR. E-mail: scoltr@hotmail.com. *Autor para correspondência

²Docentes do Programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Rua Pernambuco 1777, CEP 85960-000, Marechal Cândido Rondon, PR

³Docente Departamento de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, CEP 85884-000, Medianeira, PR

INTRODUÇÃO

O crambe (*Crambe abyssinica* Hochst), nativo da região mediterrânea e pertencente à família Brassicaceae, é uma cultura que nos últimos anos vem sendo introduzido em muitos países, como nova fonte de óleo industrial contendo alto teor de ácido erúico e cujo óleo (triglicerídeos) não é comestível (ONYILAGHA et al., 2003).

Muitas plantas da família Brassicaceae são conhecidas por conter níveis elevados de glicosinolatos (GLS), que são degradados em isotiocianatos (ITCs) quando o material vegetal se decompõe. Os glicosinolatos pertencem ao metabolismo secundário e agem na defesa vegetal (CLARKE, 2010). Espécies de brássicas geralmente contêm mais de um glicosinolato (TRONCOSO et al., 2005).

Os glicosinolatos são ricos em enxofre, são glicosídeos vegetais são responsáveis pelo odor e pelo gosto característico de vegetais como repolho, brócolis e rabanete. A liberação desses compostos é catalisada pela enzima hidrolítica mirosinase, que cliva a glicose na ligação com o átomo de enxofre, resultando na aglicona, que sem açúcar, reorganiza-se com a perda do sulfato para originar produtos quimicamente reativos, incluindo isotiocianatos e nitrilas, dependendo das condições de hidrólise. Os glicosinolatos são armazenados separadamente das enzimas que os hidrolisam, e são colocados em contato com tais enzimas somente quando a planta é lesionada, agindo na defesa vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2004; CLARKE, 2010).

Os glicosinolatos são uma classe de nitrogênio e enxofre, e a variabilidade da cadeia lateral é representada por grupos alifáticos, aromáticos, heteroaromáticos, alquilo ou alquenilo. A diversidade estrutural deste grande grupo de compostos é devida quase inteiramente aos diferentes substituintes possíveis na cadeia lateral (LEONI et al., 1997; FONT et al., 2005; MOHN et al., 2007). Os glicosinolatos possuem pelo menos 120 agliconas diferentes, que podem ser agrupadas no mínimo em 10 classes estruturais, são considerados como forma biologicamente ativa de armazenamento de agliconas (isotiocianatos) (FAHEY et al., 2001; CLARKE, 2010). São vários os glicosinolatos presentes em brássicas, tais como: glicoerucina, neoglicobrassicina, 4-hidróxiglicobrassicina, sinigrina, glicochirolina, progoitrin, glicorafanina e glicoberina (TROYER et al., 2001), entre outros.

A variação na toxicidade dos ITCs depende da brássica selecionada com grandes quantidades de glicosinolatos precursores de ITCs, promovendo mais toxicidade ao organismo alvo (SARWAR et al., 1998). Segundo Leoni et al. (1997), uma dieta rica em brássicas que são ricas com isotiocianato e glicosinolatos, poderia ser responsável pela proteção contra o câncer intestinal. Isotiocianatos também apresentam propriedades antifúngicas quando utilizados em plantas, e não apresentam perigo à saúde humana quando aplicados (TRONCOSO et al., 2005).

Produtos a base de isotiocianatos apresentam efeito nematocida (NEVES et al., 2009; WU et al., 2011). O crambe contém glicosinolatos, e o pó deste, demonstrou toxidez a nematóides (LEONI et al., 1997), demonstrando assim, que métodos alternativos ao químico no controle de doenças à base de isotiocianato, podem ser estudados através da utilização de técnicas de HPLC (*high-performance liquid chromatography*) ou cromatografia líquida de alta eficiência, para identificar e quantificar o alil isotiocianato, um dos compostos resultante da hidrólise de glicosinolatos presentes na família das brássicas.

A cromatografia líquida tornou-se um método indispensável para a separação e purificação de diversas classes de compostos a partir de misturas complexas, tais como extratos de plantas. Glicosinolatos e seus derivados podem ser analisados utilizando este método (fase estacionária é apolar, hidrocarboneto - C18, e a fase móvel é polar – acetonitrila, ou outros) (TROYER et al., 2001). A técnica de HPLC separa misturas que contém um grande número de compostos similares, nesse sistema é empregado coluna fase estacionária e a fase móvel sob altas pressões, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade (JARDIM et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de alil isotiocianato por meio de HPLC através de diferentes métodos de extração.

MATERIAL E MÉTODOS

O preparo dos diferentes métodos de extração de alil isotiocianato foi realizado no Laboratório de Nematologia da UNIOESTE, em Marechal Cândido Rondon, Paraná. As análises cromatográficas por meio de HPLC foram realizadas no Laboratório de Química da UTFPR em Medianeira, Paraná.

Para o preparo dos diferentes métodos de extração de alil isotiocianato, as folhas do crambe cultivar FMS – Brilhante, foram coletadas na fase de crescimento vegetativo (30 dias após o plantio), em área de cultivo de Cascavel – PR, latitude 24° 98' 89"S e longitude 53°44'97"W, altitude de 768 metros com temperatura de 23 °C. As folhas foram secas em estufa a 45 °C por 48 h. Após, foram trituradas manualmente em peneira de 48 Mesh, com partículas aproximadamente de 1 mm, e armazenado em frasco reagente graduado em temperatura ambiente.

Os extratos foram preparados na concentração de 200 mg L⁻¹ para cada solvente, e obtidos da seguinte forma: 1) Extrato por infusão obtido através da adição de água destilada fervente sobre as partes do vegetal; 2) Extrato por solução aquosa obtido por trituração, o material vegetal permaneceu sob agitação por 30 min em água destilada; 3) Extrato cetônico, foi utilizado o solvente acetona em aparelho tipo Soxhlet por um período de 20 h, à temperatura de 60 °C (NEVES et al., 2009); 4) Extrato por solução hidroalcoólica (70% v/v), foi estocada à temperatura ambiente, protegida da luz, por um período de 15 dias (LOGUERCIO et al., 2005); 5) Extrato metanólico, a solução foi composta de álcool metílico

Identificação de alil isotiocianato em crambé ...

(ELBADRI et al., 2008); 6) Extrato hexânico, o solvente foi hexano (ELBADRI et al., 2008); 7) Extrato clorofórmico, utilizou-se o solvente clorofórmio (COSTA et al., 2004).

Para os extratos metanólico, hexânico e clorofórmio, estes solventes foram misturados com o material vegetal e permaneceram em repouso à temperatura ambiente, protegida de luz durante 8 dias. Em todos os solventes testados foi realizada a filtragem com papel filtro Whatman n° 1. Todos os extratos em seguida foram rotos evaporados a vácuo a 50 °C, exceto extrato aquoso por infusão e trituração. Após a retirada do solvente foram diluídos com água destilada, na qual a concentração final fosse de 1 L.

Para quantificar alil isotiocianato presente no extrato aquoso por infusão, por trituração, cetônico,

hidroalcoólico, metanólico, hexânico e clorofórmico, foi necessário a filtragem em membrana 0,22 µm, e utilizada a metodologia citada por Herzallah e Holley (2012) por meio de cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (HPLC) com coluna C18. A fase móvel foi acetonitrila: água Milli Q 60:40, com detector UV a 244 nm. A curva padrão (Figura 1) foi construída utilizando alil isotiocianato (Sigma Aldrich), nas concentrações de 1, 10, 25, 50 75 e 100 mg L⁻¹. Os tempos de retenção na coluna foram utilizados para caracterização dos picos dos padrões puros, e a linearidade da curva foi computada a partir da área do pico de cada concentração do padrão (mg L⁻¹).

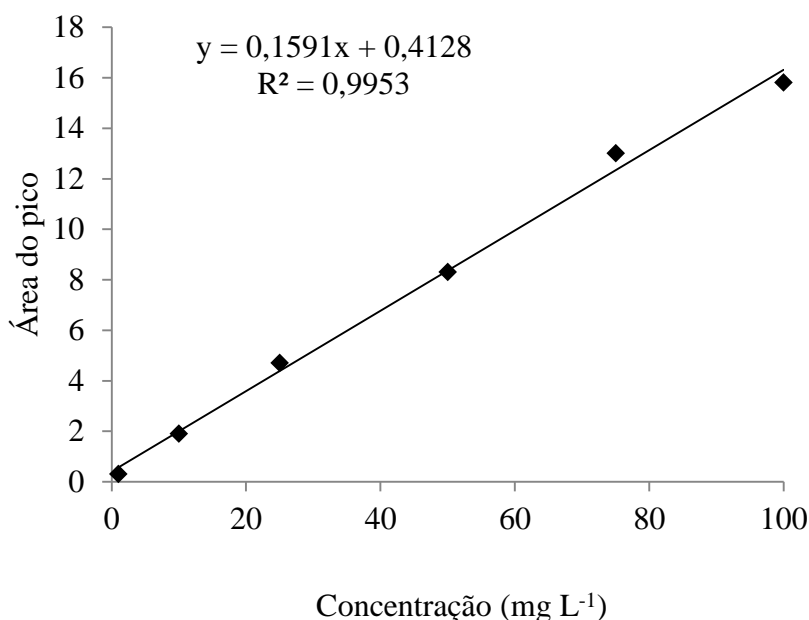


FIGURA 1 – Curva de calibração de alil isotiocianato mensurada à 244 nm, com concentrações de alil isotiocianato variando de 1 a 100 mg L⁻¹ e suas respectivas áreas.

A quantidade de alil isotiocianato nos extratos foram calculados a partir da equação da curva padrão. O ensaio foi composto de sete tratamentos com três repetições, utilizando o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. O programa utilizado foi o software livre Genes (CRUZ, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O alil isotiocianato foi identificado em apenas dois dos extratos avaliados. Conforme a Tabela 1, os solventes metanol (álcool metílico-CH₃OH) e hidroalcoólico (70% v/v álcool etílico-C₂H₆O), foram os

que apresentaram afinidade com as moléculas do alil isotiocianato, sendo o metanol o melhor solvente para a extração, com concentração de 133,88 mg L⁻¹ de alil isotiocianato. Já o solvente hidroalcoólico, apesar da presença do alil isotiocianato na concentração de 13,572 mg L⁻¹, não diferiu estatisticamente dos demais extratos que não apresentaram extração do alil isotiocianato.

A afinidade da molécula de alil isotiocianato foi de acordo com a polaridade dos solventes. Os solventes utilizados apresentam polaridade crescente (hexano, clorofórmio, acetona, etanol, metanol e água), no entanto, o metanol e etanol + água apresentaram maior afinidade no presente trabalho.

Técnicas como HPLC, utilizando metanol, têm sido o melhor método para identificação de compostos derivados da hidrólise enzimática de glicosinatos, que podem ser nitrilas, isotiocianatos, indóis, aminas, epitionitrilas, tiocianatos, entre outros (IOANA et al., 2012).

As brássicas apresentam atividade antioxidante, devido aos vários compostos nestas presentes. Os glicosinatos fazem parte dos benefícios que estas plantas proporcionam, e o conteúdo destes pode variar entre espécies como entre cultivares da mesma espécie. Em brócolis o conteúdo de glicosinatos foi verificado por meio de HPLC, e cerca de sete glicosinatos foram encontrados nas sementes, e a atividade antioxidante foi verificada através da extração com diferentes solventes,

sendo o metanol o melhor solvente para esta finalidade, uma vez que clorofórmio e acetato de etila que apresentam polaridade semelhante não são adequados para a extração (CHUANPHONGPANICH et al., 2006).

Na Figura 2 pode-se observar a presença de alil isotiocianato nos extratos hidroalcoólico e metanólico no tempo de 4 a 6 min. O extrato metanólico, com maior pico de alil isotiocianato apresentou 113,8 mAU (Figura 2-B) no tempo de 4,29 min, já o solvente hidroalcoólico apresentou 23,5 mAU no tempo de 4,35 min (Figura 2-A).

O principal glicosinolato em *C. abyssinica* é o epi-progoitrin. A atividade destes compostos é atribuída à reatividade química do grupo de isotiocianato, que pode facilmente reagir com proteínas (LEONI et al., 1997).

TABELA 1. Concentração (mg L^{-1}) de alil isotiocianato de folhas de *Crambe abyssinica* em cada método de extração avaliado por HPLC.

Solventes	mg L^{-1}
Hidroalcoólico	13,572 b
Metanólico	133,880 a
Trituração	0 b
Hexânico	0 b
Clorofórmico	0 b
Infusão	0 b
Cetônico	0 b
CV (%)	45,62

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey à 5% de probabilidade.

Crambeno é um produto da hidrólise da progoitrina encontrada em crambe, que promove a prevenção do câncer pela ingestão de brássicas, sendo que, a mistura natural dos produtos da hidrólise dos glicosinatos pode ser mais eficiente do que quando utilizados individualmente (NHO; JEFFERY, 2004).

Extrato de *Brassica napus* foi submetido em HPLC para identificação dos glicosinatos, e no tempo de 4 a 5 min foram observados os picos de progoitrin, epi-progoitrin e sinigrina (LAZZERI et al., 1993), confirmando assim, os glicosinatos presentes em *C. abyssinica* (WARWICK; GUGEL, 2003), e condizendo com o tempo de retenção do pico de alil isotiocianato do presente trabalho, derivado de glicosinolato.

Quando sementes de mostarda foram submetidos a análise de HPLC para determinação de sinigrina, sinalbina, alil e benzil isotiocianato, o tempo de retenção foi de 3,8 e 4,8 min para sinigrina e sinalbina, respectivamente. Para os produtos de degradação destes glicosinatos, o tempo de retenção foi de 6,2 e 11,3 min, respectivamente (HERZALLAH; HOLLEY, 2012). Os mesmos autores relatam que tanto acetonitrila como

metanol, são os principais solventes para extração de glicosinatos.

Diferentes compostos podem ser liberados da hidrólise enzimática de glicosinatos dos tecidos de brássicas, pois, em folhas de couve, foram identificados vários isotiocianatos por meio de microextração em fase sólida e espectrometria de massa-cromatografia gasosa, um alifático e três aromáticos, alil isotiocianato, fenil isotiocianato, benzil isotiocianato e 2-feniletil isotiocianato, e a concentração foi de 6, 58, 21 e 32 mg g^{-1} de peso seco, respectivamente (TRONCOSO et al., 2005).

Extratos de raízes de rabano ou raiz-forte (*Armoracia rusticana*) pertencente à família das brássicas, foram analisados por GC-MS e LC-MS/MS, os solventes utilizados foram metanol, ácido fórmico e água. As raízes frescas foram trituradas e extraídas com a mistura de metanol e água, durante dois dias. O composto identificado em maior quantidade foi alil isotiocianato (AISSANI et al., 2013).

Segundo Wu et al. (2011), produtos sintetizados a partir de isotiocianatos apresentam efeito nematocida, tais como acrilil isotiocianato (>95% AcITC) e alil

isotiocianato (>94% AITC), e apresentam pouca toxicidade a organismos não alvo e sem perigos de aplicação.

Pesquisas direcionadas a identificação de moléculas presentes nos extratos vegetais podem trazer resultados promissores no controle alternativo de doenças em plantas, uma vez que a utilização de extratos aquosos com princípio ativo conhecido pode proporcionar proteção de plantas e ser ambientalmente correto. Por isso, técnicas de cromatografia permitem separar e identificar compostos numa amostra. A cromatografia por HPLC é uma técnica que apresenta exatidão e precisão do método, assim como

boa sensibilidade e reprodutibilidade (RODRIGUES et al., 2004).

CONCLUSÕES

O método utilizado no presente ensaio possibilitou a identificação dos principais solventes com maior afinidade ao alil isotiocianato presente em folhas de *Crambe abyssinica*, sendo o metanol o melhor solvente extrator.

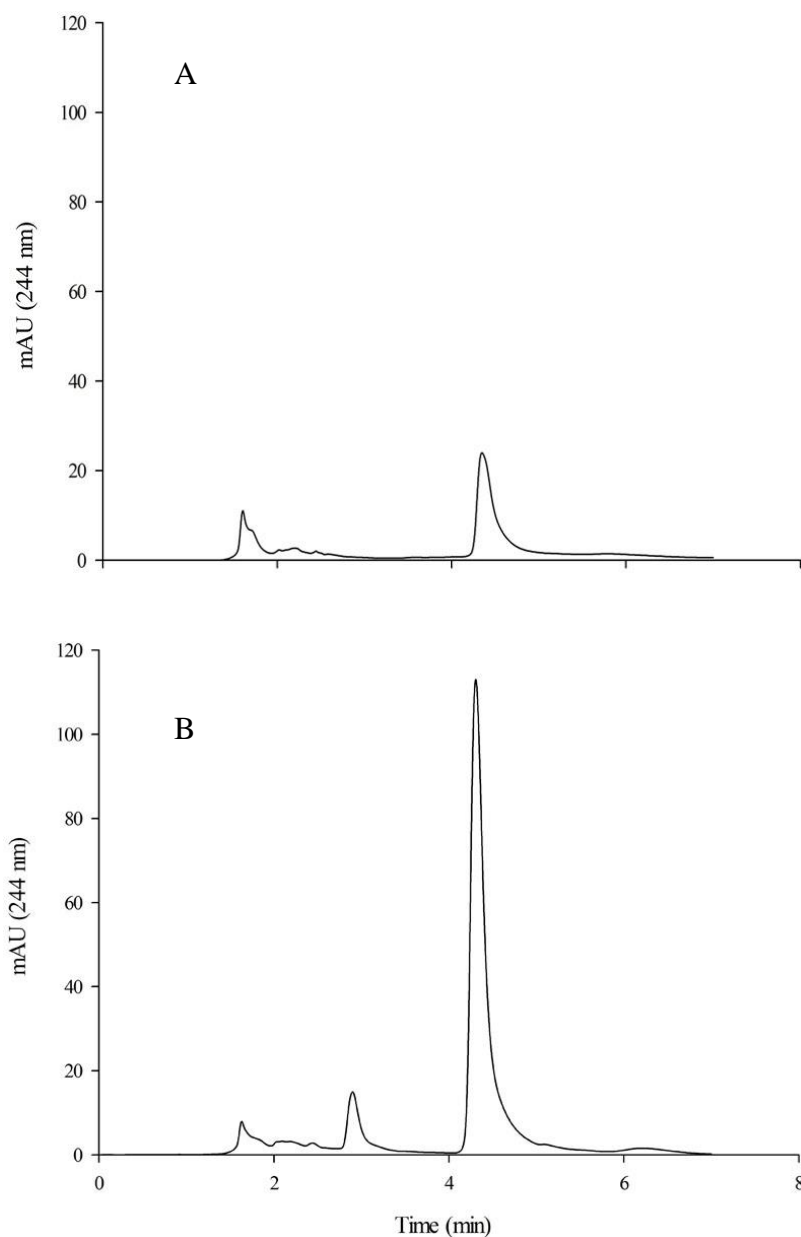


FIGURA 2 - Concentração de alil isotiocianato em mAU (mili-unidades de absorvância) do extrato hidroalcoólico (A) e metanólico (B) de folhas de *Crambe abyssinica*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AISSANI, N.; TEDESCHI, P.; MAIETTI, A.; BRANDOLINI, V.; GARAU, V.L.; CABONI, P. Nematicidal activity of allyl isothiocyanate from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots against *Meloidogyne incognita*. **Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.61, p.4723-4727, fev./abr. 2013.
- CHUANPHONGPANICH, S.; PHANICHPHANT, S.; BHUDDASUKH, D.; SUTTAJIT, M.; SIRITHUNYALUG, B. Bioactive glucosinolates and antioxidant properties of broccoli seeds cultivated in Thailand. **Journal Science Technology**, Nova Jersey, v.28, n.1, p.55-61, dez. 2006.
- CLARKE, D.B. Glucosinolates, structures and analysis in food. **Anal. Methods**, Londres, v.2, n.4, p.310-325, abr. 2010.
- COSTA, M.C.C.D.; AGUIAR, J.S.; NASCIMENTO, S.C. Atividade citotóxica de extratos brutos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (*Verbenaceae*). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v.23, p.349-52. 2004.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes: Biometria**. UFV, 382 p. 2006.
- ELBADRI, G.A.; LEE, D.W.; PARK, J.C.; YU, H.B.; CHOO, H.Y. Evaluation of various plant extracts for their nematicidal efficacies among juveniles of *Meloidogyne incognita*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Filadélfia, v.11, p.99-102, jan./abr. 2008.
- FAHEY, J.W.; ZALCMANN, A.T.; TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. **Phytochemistry**, v.56, p.5-51, abr./jul. 2001.
- FONT, R.; DEL RÍOCELESTINO, M.; ROSA, E.; AIRES, A.; DE HAROBAILÓN, A. Glucosinolate assessment in Brassica oleracea leaves by nearinfrared spectroscopy. **The Journal of Agricultural Science**, Reino Unido, v.143, n.1, p.65-73, fev./jun. 2005.
- HERZALLAH, S.; HOLLEY, R.. Determination of sinigrin, sinalbin, allyl- and benzyl isothiocyanates by RP-HPLC in mustard powder extracts. **Food Science and Technology**, v.47, p.193-299, agost./jan. 2012.
- IOANA, V.S.; SOCACI, S.A., SOCACIU, C. Sinigrin glucosinolate: spectral and chromatographic characteristics before and after enzyme-assisted sulphatase hydrolysis. **Fascicula Protecția Mediului**, v.19, p.299-304, 2012.
- JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H.; GUIMARÃES, L.F.L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COOLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Ed. Unicamp. 2006, cap. 1, p.17-45.
- LAZZERI, L.; TACCONI, R.; PALMIERI, S. *In vitro* activity of some glucosinolates and their reaction products toward a population of the nematode *Heterodera schachtii*. **Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.41, n.5, p. 825-629, 1993.
- LEONI, O.; IORI, R.; PALMIERI, E.E.; MENEGATTI, E.; CORTESI, R.; NASTRUZZI, C. Myrosinase-generated isothiocyanate from glucosinolates: isolation, characterization and *in vitro* antiproliferative studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Grã Bretanha, v.5, n.9, p.1799-1806, 1997.
- LOGUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.C.; HENZEL, A.; WITT, N.M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.2, p.371-376, mar./abr. 2005.
- MOHN, T.; CUTTING, B.; ERNST, B.; HAMBURGER, M. Extraction and analysis of intact glucosinolates - A validated pressurized liquid extraction/liquid chromatography-mass spectrometry protocol for *Isatis tinctoria*, and qualitative analysis of other cruciferous plants. **Journal of Chromatography A**, n.1166, p.142-151, jun./agost. 2007.
- NEVES, W.S.; FREITAS, L.G.; COUTINHO, M.M.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FABRY, C.F.S.; DHINGRA, O.D.; FERRAZ, S. Ação nematicida de extratos de alho, mostarda, pimenta malagueta, de óleo de mostarda e de dois produtos à base de capsainóides e alil isotiocianato sobre juvenis de *Meloidogyne javanica*, (Treub) Chitwood, 1949, em casa de vegetação. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.35, n.4, p. 255-261, mar./nov. 2009.
- NHO, C.W.; JEFFERY, E. Crambene, a bioactive nitrile derived from glucosinolate hydrolysis, acts via the antioxidant response element to upregulate quinone reductase alone or synergistically with indole-3-carbinol. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.198, p.40-48, dez./fev. 2004.
- ONYILAGHA, J.; BALA, A.; HALLETT, R.; GRUBER, M.; SOROKA, J.; WESTCOTT, N. Leaf flavonoids of the cruciferous species, *Camelina sativa*, *Crambe* spp., *Thlaspi arvense* and several other genera of the family Brassicaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.31, p.1309-1322, set./fev. 2003.
- RODRIGUES, P.O.; GONÇALVES, T.C.; SILVA, W.B. Influência de diferentes sistemas de solventes no processo de extração de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v.23, n.1, p.27-31, jun./set. 2004.
- SARWAR, M.; KIRKEGAARD, J.A.; WONG, P.T.W.; DESMARCHELIER, J.M. Biofumigation potential of brassicas. **Plant and Soil**, v.201, p.103-112, mai./fev. 1998.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.
- TRONCOSO, R.; ESPINOZA, C.; SÁNCHEZ-ESTRADA, A.; TIZNADO, M.E.; GARCÍA, H.S. Analysis of the isothiocyanates present in cabbage leaves extract and their potential application to control *Alternaria* rot in bell peppers. **Food Research International**, v.38, p.701-708, jan./fev. 2005.
- 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**, v.919, p.299-304, mar./abr. 2001.
- WARWICK, S.I.; GUGEL, R.K. Genetic variation in the *Crambe abyssinica* - *C. hispanica* - *C. glabrata* complex. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.50, p.291-305, jul./nov. 2003.
- WU, H.; WANG, C.J.; BIAN, X.W.; ZENG, S.Y.; LIN, K.C.; WU, B.; ZHANG, G.A.; ZHANG, X. Nematicidal efficacy of isothiocyanates against root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in cucumber. **Crop Protection**, v.30, p.33-37, jan./set. 2011.