**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Atividade antiproliferativa “in vitro” em diferentes estádios de maturação
do brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *itálica*) biofortificados ou não com
selênio**

Patricia Bachiega

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2014**

Patricia Bachiega
Farmacêutica Generalista

**Atividade antiproliferativa “in vitro” em diferentes estádios de maturação do brócolis
(*Brassica oleracea* L. var. *itálica*) biofortificados ou não com selênio**

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. **JOCELEM MASTRODI SALGADO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Bachiega, Patricia

Atividade antiproliferativa "in vitro" em diferentes estádios de maturação do brócolis
(*Brassica oleracea* L. var. *italica*) biofortificados ou não com selênio / Patricia Bachiega. - -
Piracicaba, 2014.
78 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.
Bibliografia.

1. Câncer 2. Brássicas 3. Selenato de sódio 4. Atividade antioxidante 5. Alimentos
funcionais I. Título

CDD 613.2
B123a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Aos meu pais, irmãos, avós e avôs.

AGRADECIMENTO

É difícil encontrar as melhores palavras para descrever a imensa alegria por ter concluído mais esta etapa. Chegar a conclusão deste trabalho não foi uma tarefa fácil, no entanto, seria mais difícil ainda se não tivesse inúmeras pessoas ao meu lado. Por este motivo quero agradecer de todo coração:

Primeiramente a Deus, por estar sempre guiando meus caminhos e me mostrando em pequenos gestos que todo o esforço vale a pena. Por sempre me fortalecer nos momentos de angústia e dar força e coragem para enfrentar cada dificuldade.

Aos meu pais (Artenize e Valdir) e irmãos (Thiago e Gabriel) por sempre apoiarem as decisões que tomei e por sempre acreditarem em mim. Agradeço especialmente à minha mãe, meu melhor exemplo, a mulher guerreira que sempre me manteve forte e com todo seu amor sempre esteve ao meu lado mesmo a quilômetros de distância.

À minha orientadora, Dra. Jocelen Mastrodi Salgado, por abrir as portas do seu laboratório e do seu grupo de pesquisa. Obrigada por confiar no meu trabalho e por todos os ensinamentos durante todo o decorrer de nossa pesquisa.

Às amigas (os) e companheiras (os) de Piracicaba: Maressa, Fúvia, Kélin, Gizele, Gabi, Antônio, Marina. Obrigada por compartilharem comigo momentos tão bons, estarem ao meu lado nos momentos difíceis e pela confiança. Todas as experiências trocadas me fizeram evoluir muito e ter vocês ao meu lado foi fundamental para a conclusão desta etapa.

À minha amiga Maressa Caldeira Morzelle, por sempre me incentivar e por todos os conselhos. Obrigada por ser sempre minha companheira e por todas as conversas e risadas. Te desejo muita sorte e muita sabedoria nesta nova etapa da sua vida. Desejo também que a pequena Helena venha com muita saúde e que proporcione momentos indescritíveis.

À Kélin Schwarz por toda a ajuda no decorrer do experimento, principalmente por me ajudar a carregar muitos sacos de substratos no sol quente (rs). Obrigada também por toda a ajuda na estatística. Te desejo muito sucesso! Você merece.

Agradeço as minhas amigas de faculdade (Hyanne, Bruna, Tixa e Naiarinha). Sabemos que distância não significa nada quando a amizade é verdadeira. Obrigada por sempre me apoiarem e sempre torcerem pelo meu sucesso. Sinto falta de vocês!

Agradeço ao meu namorado, Rafael Campagnol, por todo amor, paciência, carinho e cumplicidade. Obrigada por sempre estar ao meu lado, incentivando a conquista de todos os meus sonhos. Você é uma pessoa iluminada e me faz feliz todos dias! Torço muito pelo seu sucesso!

Ao GEAF, Grupo de Estudos em Alimentos Funcionais, por toda receptividade. Em especial as estagiárias Jéssica Aranha, Jéssica Scatolin, Alana Rodrigues e Marina Paraluppi.

A todos os funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, em especial à Vana, Helo, Fábio, Ana e Débora.

A professora Ellen, por ter aberto a primeira porta do mundo científico e sempre incentivar meu crescimento.

A CAPES pela bolsa concedida durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. Keigo Minami pelos primeiros ensinamentos com relação ao cultivo do brócolis e pela doação das sementes.

A Sakata Seed Sudamerica pelo fornecimento das sementes.

Ao pesquisador Sílvio Junio Ramos pela paciência em tirar todas as minhas dúvidas a respeito da biofortificação com selênio e pela doação do selenato de sódio.

Agradeço ao GEVOL por todo o auxílio durante o cultivo das inflorescências, em especial a doutoranda Sueyde pela ajuda durante todo o período de cultivo.

A técnica Helena, do Laboratório de sementes, por ter sido tão gentil ao me ajudar no cultivo dos brotos dos brócolis.

Agradeço a IBS Mudanças pelo auxílio no cultivo das mudas de brócolis, em especial, a funcionária Joyce, por sempre me receber de forma tão simpática.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho por abrir as portas do seu laboratório, permitindo a realização da principal análise desta dissertação.

Agradeço com muito carinho a Dr^a Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz, por toda simpatia e disponibilidade em tirar minhas dúvidas e me ensinar sobre o teste de atividade antiproliferativa.

Obrigada a todas as pós-graduandas do CPQBA (Giovana Fiorito, Giovanna Longato, Débora Vendramini, Ana Paula Oliveira Höhne) e a técnica Sirlene Valerio Tinti pela realização da análise do câncer.

Ao doutorando Tiago Tezotto, pelos ensinamentos e auxílio na realização da determinação de selênio.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho e que por ventura não mencionei, meu sincero agradecimento.

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho”.

(Dalai Lama)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1 Revisão Bibliográfica	17
2.1.1 Brócolis: um representante das brássicas	17
2.1.2 Glicosinatos e os seus produtos de degradação	20
2.1.3 Isotiocianatos como potentes agentes anticancerígenos	21
2.1.4 Selênio.....	22
2.1.5 Câncer	27
2.1.6 Magnitude do câncer	32
2.2 Material e métodos	34
2.2.1 Material experimental	34
2.2.2 Obtenção da matéria prima	34
2.2.2.1 Brotos de brócolis.....	34
2.2.2.2 Mudas de brócolis	35
2.2.2.3 Inflorescências de brócolis	35
2.2.3 Preparo da amostra	36
2.2.4 Quantificação de selênio por Espectrometria de fluorescência de raios-X por energia dispersiva.....	36
2.2.5 Determinação da atividade antioxidante	37
2.2.5.1 Elaboração dos extratos.....	37
2.2.5.2 Ensaio pelo método DPPH.....	37
2.2.5.3 Ensaio pelo método ABTS	38
2.2.5.4 Ensaio pelo método FRAP	38
2.2.6 Quantificação de compostos fenólicos.....	38
2.2.7 Ensaio <i>in vitro</i>	39
2.2.7.1 Obtenção dos extratos brutos	39
2.2.7.2 Células.....	40
2.2.7.3 Cultivo celular.....	40
2.2.8 Atividade antiproliferativa em cultura de células	41
2.2.8.1 Plaqueamento das células.....	41
2.2.8.2 Preparo e aplicação das amostras	41
2.2.8.3 Ensaio de sulforrodamina B (SRB).....	43
2.2.8.4 Análise dos resultados	43
2.2.9 Análise estatística.....	44
2.3 Resultados e Discussão	45
2.3.4 Aquisição das amostras vegetais e rendimentos	45
2.3.5 Quantificação de selênio	46
2.3.6 Atividade antioxidante e compostos fenólicos.....	48
2.3.7 Atividade antiproliferativa em cultura de células	52
3 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS	63

RESUMO

Atividade antiproliferativa “in vitro” em diferentes estádios de maturação do brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *itálica*) biofortificados ou não com selênio

O câncer é a segunda causa de morte da população mundial e constitui-se em sério problema de saúde pública no mundo. Seu tratamento acarreta além de elevados gastos, diversos efeitos colaterais aos pacientes. Dessa forma, alternativas que possam minimizar esses fatos são extremamente viáveis. Diversos estudos já comprovaram o efeito sinérgico dos isotiocianatos e do selênio e a sua contribuição como agentes protetores contra danos oxidativos e aumentam a expressão de enzimas responsáveis pela desintoxicação de compostos cancerígenos. Com base nisso, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência da suplementação com selênio, durante o processo de maturação do brócolis, em parâmetros das atividades antioxidantes e antiproliferativo. No presente estudo foi constatado que a biofortificação do brócolis com selênio é possível uma vez que, as amostras tratadas foram capazes de absorver este mineral. Além disso, a biofortificação acarretou o aumento tanto da atividade antioxidante como dos compostos fenólicos em todas as amostras testadas. A avaliação do potencial antiproliferativo do brócolis demonstrou que os extratos brutos diclorometânicos apresentaram tal potencial. Os extratos brutos diclorometânicos das mudas de brócolis biofortificadas com selênio se destacaram perante os demais extratos quanto a atividade antiproliferativa. Concluindo, a biofortificação com selênio constitui-se uma técnica viável para o aumento do potencial antioxidante do brócolis e os estudos iniciais sobre a atividade antiproliferativa demonstram que as mudas de brócolis biofortificadas com selênio são as amostras mais promissoras para realização de estudos futuro.

Palavras-chave: Câncer; Brássicas; Selenato de sódio; Atividade antioxidante; Alimentos funcionais

ABSTRACT

Antiproliferative activity "*in vitro*" in different broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) maturation stages biofortified or not with selenium

Worldwide cancer is the second leading cause of death and constitutes a serious public health problem. The traditional treatment beyond expensive has several side effect, thus alternatives that can minimize these realities are extremely viable. Isothiocyanates and selenium have synergic effect, contributes as protective agents against oxidative damage and increase the expression of detoxification enzymes responsible for eliminate carcinogenic compounds. Therefore, the aim of this research was to evaluate the influence of selenium supplementation during the broccoli maturation in antioxidant and antiproliferative parameters. In the present study it was found that broccoli biofortification with selenium is possible since plants were able to absorb this mineral. Furthermore, an increase of both antioxidant activity and phenolic compounds was observed in all samples supplemented. All dichloromethanic crude extracts showed better antiproliferative activity when compared with ethanolic extracts being seedlings supplemented with selenium the best antiproliferative agent among the extracts tested. In conclusion, biofortification with selenium constitutes a viable technique for increasing the antioxidant potential of broccoli. Initial studies with antiproliferative activity showed that the broccoli seedlings biofortified with selenium are the most promising samples for future studies.

Keywords: Cancer; Brassica; Sodium selenite; Antioxidant activity; Functional foods

1 INTRODUÇÃO

É indiscutível que atualmente a alimentação transcende os patamares da nutrição. Diversos estudos científicos já comprovaram que a alimentação consiste em um dos fatores cruciais para o bem-estar e para a promoção da saúde, através da prevenção de diversas doenças. Nesta nova concepção de alimentação as pessoas buscam não só satisfazerem suas necessidades nutricionais, mas também buscam melhorias na qualidade de vida.

Modificações nos padrões saúde-doença, devido ao processo global de industrialização, mudanças nos hábitos alimentares e estilo de vida, tiveram como consequência diminuição das doenças infectocontagiosas e aumento exorbitante das doenças crônico-degenerativas, tendo destaque o câncer.

Ganhando dimensões cada vez maiores, o câncer tornou-se um evidente problema de saúde pública mundial. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) no ano de 2030 teremos a incidência de cerca de 27 milhões de novos casos de câncer, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com esta doença.

A elevada incidência do câncer envolve não somente problemas econômicos devido aos elevados gastos com saúde pública, mas também promovem significativa redução da qualidade de vida do paciente além de danos às famílias. Diante deste triste cenário, tornam-se cada vez mais importantes e vantajosas medidas que previnam a incidência desta doença. Como exemplo de medidas extremamente promissoras e vantajosas pode-se destacar os alimentos funcionais, os quais possuem em sua composição compostos bioativos responsáveis por modulações fisiológicas que irão resultar em benefícios ao nosso organismo.

Neste sentido, a pesquisa realizada teve como principal objetivo avaliar o efeito da suplementação com selênio, durante o cultivo do brócolis, nas atividades antioxidantes e antiproliferativa observadas em três diferentes estádios de maturação do brócolis.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Brócolis: um representante das brássicas

Evidências científicas relacionando dieta e doenças crônicas têm se tornado a cada ano mais fortes. Com base nessas evidências, surgem no mundo inteiro orientações dietéticas com o objetivo de prevenir as doenças crônicas, como câncer, doenças cardiovasculares e diabetes. Dentre as orientações dietéticas a principal recomendação é o aumento no consumo de frutas e verduras, sendo essas fontes significativas de fitoquímicos biologicamente ativos.

Dentre as variedades de vegetais temos as brássicas, pertencentes à família *Brassicaceae*, conhecidos anteriormente como *Cruciferae* devido à disposição cruciforme de suas pétalas. Nos últimos anos as brássicas e, mais especificadamente o brócolis, tem se destacado com relação ao seu poder na prevenção de diversos tipos de cânceres (ARES et al., 2014).

O brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) é originário do Mediterrâneo oriental e foi introduzido nos tempos medievais na Europa. Consumido e valorizado pela população do mundo todo, o brócolis possui em sua composição uma ampla diversidade de compostos bioativos, como por exemplo, carotenoides, clorofilas, fenólicos e vitaminas. Entre estes os mais importantes no brócolis são os glicosinolatos, os quais são responsáveis pelos resultados satisfatórios na promoção da saúde (ARES; NOZAL; BERNAL, 2013; LATTÉ; APPEL; LAMPEN, 2011; RAZIS; NOOR, 2013).

Jaiswal e colaboradores (2012) ao estudarem diferentes tipos de brássicas observaram que o brócolis apresentou maior atividade antioxidante e compostos fenólicos. Foi relatado que no brócolis os compostos fenólicos são responsáveis por 80-95% da sua capacidade antioxidante total, demonstrando assim a significativa influência destes compostos (KURILICH et al., 2002). Estes resultados reforçam ainda mais a importância do brócolis na alimentação humana como uma fonte rica em compostos que podem combater os agentes oxidantes e, consequentemente, prevenir doenças como o câncer.

A atividade antioxidante dos compostos presentes nos alimentos está relacionada com a sua estrutura química, a qual é a responsável por suas propriedades redox, e que desempenham um papel fundamental na adsorção e neutralização das espécies reativas de

oxigênio (ROS), eliminando o oxigênio singlete e triplete, ou decompondo os peróxidos (CARTEA et al., 2011).

Os principais compostos fenólicos encontrados nas brássicas são os ácidos hidroxicinâmicos, sendo que os ácidos sinápico, ferúlico e p-cumárico, encontram-se frequentemente conjugados com açúcares ou outros ácidos hidroxicinâmicos (CARTEA, et al. 2011).

Quanto aos glicosinolatos presentes no brócolis, estudos que investigaram o perfil destes compostos detectaram cerca de 16 glicosinolatos diferentes, sendo que dentre eles a glicorafanina (1), glicoiberina (2), glicobrassicina (3) e neoglicobrassicina (4) são os que apresentam maior destaque, conforme a Figura 1 (GUO; YUAN; WANG, 2011; LATTÉ; APPEL; LAMPEN, 2011; MEYER; ADAM, 2008).

Figura 1 - Estrutura dos principais glicosinolatos presentes no Brócolis

Fonte: Latté; Appel; Lampen, 2011.

Apesar das inflorescências dos brócolis serem mundialmente consumidas e reconhecidas pelas suas propriedades anticarcinogênicas, uma nova vertente no mercado mundial vem ganhando destaque: o consumo dos brotos.

Dentre os brotos, os de brócolis têm se destacado como relevante alternativa na prevenção do câncer. Comprovadamente, estes brotos possuem quantidades substancialmente

elevadas de antioxidantes, vitamina C e compostos fenólicos do que as inflorescências (YUAN et al., 2010).

Segundo Pérez-Balibrea; Moreno e García-Viguera (2011) os brotos de brócolis constituem uma excelente fonte de compostos fenólicos, o que pode explicar a sua considerável atividade antioxidante (PAJAK et al., 2014). Dentre os principais compostos fenólicos formados nos brotos de brócolis podemos citar os derivados do ácido hidroxicinâmico, como por exemplo, o ácido ferúlico e sinápico (KAULMANN et al., 2014). Além disso, nos brotos de brócolis também podem ser encontradas quantidades significativas de ácido benzoico e seus derivados, incluindo os ácidos salicílico e gálico (PAJAK et al., 2014).

Durante o período de germinação, os brotos de brócolis sofrem significativas alterações no metabolismo tanto bioquímico como fisiológico produzindo co-fatores, os quais são responsáveis pelo aumento a atividade da enzima mirosinase (PÉREZ-BALIBREA; MORENO; GARCÍA-VIGUERA, 2011). Dessa forma, os brotos de brócolis tornam-se mais promissores na produção de isotiocianatos do que os brócolis adultos (GUO et al., 2013).

Quanto aos glicosinolatos, os brotos de brócolis constituem uma importante fonte destes compostos, já tendo sido comprovado que possuem cerca de 15 vezes mais glicorafanina (glicosinolato precursor do sulforafano) do que os brócolis maduros (AIRES; ROSA; CARVALHO, 2006). Ávila et al. (2013) detectaram por meio de análise em Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC) que os brotos de brócolis possuem um total de 9 glicosinolatos, sendo 5 deles glicosinolatos alifáticos (glicoiberina, glicorafanina, glicolissina, glicoibervirina e glicocerucina) e 4 indóis (4-hidroxiglicobrassicina, glicobrassicina, 4-metoxiglicobrassicina, neoglicobrassicina). Vale ainda ressaltar que, segundo os autores os glicosinolatos glicorafanina e glicocerucina foram os mais abundantes, representando 72% e 13% do total dos glicosinolatos.

Sem dúvidas, estes dados são muito relevantes, uma vez que o glicosinolato glicorafanina é precursor direto do isotiocianato sulforafano, aumentando assim o potencial desse material vegetal em prevenir o câncer. Além disso, estudos também têm comprovado que o glicosinolato glicocerucina desempenha um papel importante para a saúde, podendo também apresentar atividades quimiopreventivas (ABB AOUI et al., 2012; BARILLARI et al., 2005).

Com relação às mudas de brócolis, não foram encontrados na literatura trabalhos avaliando o perfil de glicosinolatos nesse estágio de maturação. Assim como também não há relatos de testes de atividade antioxidante e potencial antiproliferativo. Dessa forma, este

trabalho torna-se inédito com relação à utilização desse estágio de maturação como alternativa para impedir a proliferação de células malignas e a determinação do seu potencial antioxidante.

2.1.2 Glicosinolatos e os seus produtos de degradação

Os glicosinolatos constituem os metabólitos secundários ricos em enxofre (MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ et al., 2013) derivados de açúcares ou aminoácidos, sendo os seus produtos de hidrólise os responsáveis pelos efeitos benéficos à saúde, além dos sabores e odores características das brássicas (RAZIS; NOOR, 2013).

Quimicamente, os glicosinolatos possuem em comum a presença de um grupo β -D-glicopirranose com cadeia lateral variável derivada de metionina, triptofano ou fenilalanina (FAHEY; ZALCMANN; TALALAY, 2001; MITHEN et al., 2000; WILLIAMS et al., 2009).

Além disso, os glicosinolatos, em sua maioria, também contêm grupos hidroxila ou carbonila, ou ligações de enxofre em vários estados de oxidação. Outro pequeno grupo de benzil glicosinolatos, possui em sua ligação glicosídica um anel aromático com uma molécula de açúcar ramnose ou arabinose adicional, apesar do papel desses açúcares ainda não estar elucidado (FAHEY; ZALCMANN; TALALAY, 2001).

Nos vegetais, os glicosinolatos estão em quantidades mais elevadas em relação aos isotiocianatos. Esta conversão ocorre por processos de fermento, mastigação dos vegetais ou danos nos tecidos provocados por contusões ou congelamento-descongelamento durante o cultivo, colheita, manuseio ou transporte e processamento mecânico dos alimentos (VERMEULEN et al., 2009).

Além de todos esses processos, para que ocorra a conversão dos glicosinolatos em isotiocianatos também é necessário o contato com a enzima mirosinase (β -tioglucosidase) (MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ et al., 2013) que, na presença de água, provoca a hidrólise imediata destes compostos, gerando então os produtos de hidrólise: uma porção aglicona, glicose e sulfato. A porção aglicona, no entanto, é instável e se reorganiza para formar os isotiocianatos, tiocianatos, nitrilos, oxazolidinetionas e epitionitrilas dependendo da estrutura dos glicosinolatos e das condições da reação (KOROLEVA et al., 2010; VIG et al., 2009). Nas plantas, a mirosinase está armazenada em compartimentos celulares diferentes dos glicosinolatos para evitar qualquer dano à própria planta (RATZKA et al., 2002).

Micro-organismos presentes na flora intestinal humana, mesmo em pequenas quantidades, também podem contribuir no processo de conversão dos glicosinolatos em isotiocianatos (BROWN; HAMPTON, 2011). Dessa forma, interferências na microbiota,

como por exemplo, o tratamento com antibiótico pode prejudicar a conversão (SHAPIRO et al, 1998).

2.1.3 Isotiocianatos como potentes agentes anticancerígenos

Evidências científicas já comprovaram que os isotiocianatos, presentes nas brássicas, apresentam importantes propriedades quimioprotetoras (TSE; ESLICK, 2014). As primeiras investigações foram realizadas entre 1960 e 1970 e comprovaram, em modelos de roedores, os primeiros benefícios destes compostos (DINKOVA-KOSTOVA; KOSTOV, 2012).

A eficácia quimiopreventiva dos isotiocianatos deve-se ao fato de que cada isotiocianato apresenta um mecanismo de ação diferente, com destaque para: modulação da biotransformação de enzimas citoprotetoras, atividade anti-inflamatório via inibição do fator nuclear kappa β , inibição da proliferação através da indução de paralização do ciclo celular e de morte celular programada (apoptose), modulação da expressão de receptores hormonais, potencial anti-angiogênico e anti-metástase e indução da autofagia (DINKOVA-KOSTOVA; KOSTOV, 2012; NAVARRO; LI; LAMPE, 2011).

No entanto, a capacidade de aumentar a atividade de enzimas envolvidas na desintoxicação dos agentes cancerígenos é a atividade biológica mais conhecida e estudada dos isotiocianatos (CHAUDHARY et al., 2014). Talalay et al. (1978) foram os pioneiros na investigação da influência destes compostos sobre a redução da ativação de fatores pro-carcinogênicos, através da inibição de enzimas da fase I e indução da transcrição de enzimas citoprotetoras (fase II).

Com relação às enzimas de fase I e II, sabe-se que as enzimas de fase I (superfamília do citocromo P450) são responsáveis pelas reações de oxidação, redução e hidrólise, resultando na formação de metabólitos polares, catalisando a bioativação de carcinógenos (LATTÉ, APPEL, LAMPEN, 2011). Já as enzimas de fase II (enzimas de conjugação) como por exemplo, a glutathione-S-transferase, são responsáveis por inibir o estresse oxidativo através da eliminação de espécies reativas de oxigênio, contribuindo para a conversão de substâncias cancerígenas em metabólitos inativos, impedindo-os de interagir com o DNA (KWAK; KENSLER, 2010).

Evidências tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo* comprovam que os isotiocianatos exibem uma modulação na atividade dos sistemas enzimáticos através da bioativação de enzimas de desintoxicação da fase II (RAZIS; NOOR, 2013). No entanto, ainda são poucas as evidências comprovando a ação destes compostos sobre as enzimas de fase I (CONAWAY;

YANG; CHUNG, 2002). Os únicos compostos com comprovada atividade em enzimas de fase I e II são os isotiocianatos indóis e nitrilos (NHO; JEFFERY, 2004).

Dentre todos os isotiocianatos estudados, o sulforafano possui maior destaque devido ao seu elevado benefício à saúde e prevenção do câncer, além de ser o principal isotiocianato presente nos brócolis (HOUGHTON; FASSETT; COOMBES, 2013). Este isotiocianato apresentou resultados satisfatórios, principalmente para o câncer de pulmão, colorretal, mama, próstata e bexiga (LATTÉ, APPEL, LAMPEN, 2011).

Com relação aos seus efeitos quimiopreventivos, o sulforafano é responsável pela indução de enzimas de fase II, aumento da apoptose, indução da interrupção do ciclo celular e a inibição da proliferação celular (BEAVER et al., 2012; CLARKE et al., 2010). Além disso, apresenta também um significativo potencial nutrigenômico, uma vez que, pode ativar a expressão de vários genes citoprotetores através de fatores de transcrição do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nfr2) (KLAASSEN; REISMAN, 2010).

O Nfr2 é responsável pela regulação de 200 genes em humanos e animais, relacionados em grande parte aos mecanismos de defesa celular endógenos (HAYES; McMAHON, 2009; NITURE et al., 2010; ZHU et al., 2008). Dessa forma, o sulforafano, pode promover uma sequência de eventos que culminam em aumento da expressão de moléculas antioxidantes endógenas, como por exemplo, a glutatona e a tioredoxina (HART et al., 2012; ZHANG et al., 2010).

Devido ao fato do brócolis, assim como todos os outros vegetais pertencentes à família das brássicas, possuir uma mistura de diferentes tipos de isotiocianatos, o consumo do alimento em si é mais vantajoso do que o consumo dos compostos isolados, fornecendo assim maior proteção (NAVARRO; LI; LAMPE, 2011).

2.1.4 Selênio

A saúde humana e a nutrição mineral de plantas, na maioria das vezes, são vistas como áreas totalmente distintas, no entanto, quando analisadas mais a fundo, podem-se estabelecer relações extremamente favoráveis entre elas. Diversos nutrientes que são fundamentais para o desenvolvimento das plantas também são comprovadamente essenciais aos homens e animais, desempenhando, em muitos casos, mecanismos de ação similares (RAMOS, 2011). Como exemplo desta relação pode-se destacar o selênio e o brócolis.

Os primeiros estudos com selênio abordaram o seu poder tóxico, no entanto, em meados da década de 1990 este elemento emergiu como um dos agentes quimiopreventivos

mais promissores, sendo demonstrado seu papel essencial na saúde e no desenvolvimento humano (HATFIELD et al., 2014).

A toxicidade do selênio foi descrita pela primeira vez em 1856 por um cirurgião do exército, o qual relatou que este elemento foi o responsável por um distúrbio (necrose no casco e perda excessiva de pelos na crina e na cauda) em animais que pastavam nas planícies dos territórios de Nebraska e Dakota. Foi apenas em 1957 que o selênio deixou de ser considerado uma toxina, quando Schwartz e Foltz comprovaram que este elemento impediu a necrose hepática em ratos. A partir destes estudos, tornou-se claro que o selênio só apresenta potencial tóxico quando ingerido em níveis elevados, mas quando em níveis baixos, este elemento é um micronutriente essencial na dieta (SCHWARZ; FOLTZ, 1958).

O selênio pode ser encontrado em plantas e na carne, podendo apresentar-se tanto nas formas inorgânicas (selenito, selenato e seleneto), como orgânicas (selenometionina, metilselenocisteína e selenocisteína) (DÖRR, et al., 2013; RAYMAN, 2008; RAYMAN, INFANTE, SARGENT, 2008). Dentre as fontes mais ricas de selênio estão o pescado marinho, órgãos viscerais dos animais e a castanha do Brasil. Os cereais, ovos, grãos, legumes e produtos lácteos também podem ser considerados fontes desse elemento (RAYMAN, 2008; RAYMAN, INFANTE, SARGENT, 2008; YAMASHITA; YAMASHITA, 2010).

As formas químicas em que o selênio está disponível em suas fontes são: na forma de selenato podendo ser encontrado em pescado e repolho; como Se-metilselenocisteína em alho, cebola e brócolis; selenometionina em fontes vegetais; e selenocisteína em alimentos de origem animal e carnes (RAYMAN, 2008; RAYMAN, INFANTE, SARGENT, 2008; RAYMAN, 2012).

Após a ingestão do selênio, este é absorvido principalmente no duodeno pelos eritrócitos através de um sistema de transporte de aminoácidos e catabolizado em selênio alimentar, o qual é incorporado na glutathione peroxidase. As selenoproteínas são então transportadas até o fígado, onde ocorrerá a conversão em selenoproteínas P e posteriormente distribuída pelo cérebro, coração, músculos, rim e gônadas (FAIRWEATHER-TAIT et al., 2011; NAVARRO-ALARCON; CABRERA-VIQUE, 2008).

Países como os Estados Unidos, Reino Unido e China tem relatado um consumo de selênio abaixo do recomendado (BECK; LEVANDER; HANDY, 2003; JACKSON; BROOME; McARDLE, 2003; McCANN; AMES, 2011), o que pode resultar em doenças e perturbações, como a disfunção da glândula da tireóide, lesão cerebral irreversível, cardiopatias, diminuição da resposta imunológica contra infecções virais, aumento do risco de

diversos tipos de câncer, diabetes tipo 2 e redução da fertilidade, devido a redução significativa da atividade das selenoproteínas (ANSONG; YANG; DIAMOND, 2014).

Diversos países atentos à deficiência de selênio na população passaram a desenvolver estratégias para aumentar a ingestão deste nutriente. Desde meados da década de 1980, a Finlândia tem efetuado a aplicação de selênio na adubação de culturas e também promovido o melhoramento genético destas. Essas intervenções promoveram o aumento da concentração deste mineral nas culturas biofortificadas (EUROLA et al., 1991) e, conseqüentemente, aumentaram a ingestão de selênio (BROADLEY et al., 2006).

Na população brasileira, dados indicam um baixo consumo de selênio. Trabalhos que se preocupam com esta questão ainda são raros (FERREIRA et al., 2002). Dessa forma, tornam-se válidas as pesquisas que têm como foco a introdução deste elemento nos alimentos com o intuito de minimizar não só a deficiência nutricional, mas também aliar essa fortificação com a saúde, através da prevenção de diversas patologias.

De maneira geral, as plantas são capazes de absorver e metabolizar as formas inorgânicas de selênio: selenato (Se^{6+}) e selenito (Se^{+4}). Essa incorporação pode ser realizada através da aplicação no solo, de solução nutritiva (em sistema de cultivo hidropônico) ou via foliar, através da pulverização das folhas (PILON-SMITS; QUINN, 2010; SORS et al., 2005). No entanto, os melhores resultados para absorção e distribuição são encontrados quando este elemento se encontra na forma de selenato, ao invés de selenito (CARTES et al., 2005).

Um estudo recente demonstrou que nos brotos de brócolis a concentração total de selênio nos brotos previamente tratados com selenato era 35% maior do que aquela observada para brotos tratados com selenito. Também foi comprovado que brotos com 7 dias de idade expostos a concentração de 100 μM de selenato e de 75 μM e 100 μM de selenito apresentaram nítidos sintomas de toxicidade, como diminuição do crescimento da raiz e cotilédonos roxos. Além disso, estes sintomas foram mais expressivos nos brotos tratados com 100 μM de selenito, comprovando o maior potencial de toxicidade deste composto (ÁVILA et al., 2013).

Com relação à capacidade de acumulação de selênio, as plantas podem ser classificadas em não acumuladoras (possuem toxicidade ao selênio suportando concentrações inferiores a 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ ou 10 $\mu\text{g g}^{-1}$), indicadoras (acumulam selênio em concentrações maiores do que 100 $\mu\text{g g}^{-1}$, mas não necessitam dele para o seu desenvolvimento) e acumuladoras (acumulam selênio para o seu crescimento sendo que a capacidade de acumulação varia entre 20-30 mg g^{-1}) (DHILLON; DHILLON, 2003; TERRY et al., 2000; WHITE et al., 2004). Algumas espécies podem ainda ser classificadas como

hiperacumuladoras, sendo o selênio essencial para o seu desenvolvimento podendo acumular quantidades superiores a $1000 \mu\text{g g}^{-1}$ por matéria seca, e ser divididas em acumuladoras primárias (plantas com capacidade de acumulação de milhares de miligramas de selênio ($>2000 \text{ mg kg}^{-1}$)) e acumuladoras secundárias (acumulação de centenas de miligramas de selênio) (TERRY et al., 2000).

Dentre as poucas culturas agrícolas que têm capacidade de acumular selênio, como já mencionado anteriormente, podemos destacar o brócolis classificado como acumulador secundário deste mineral (RAMOS et al., 2011a). Estudos recentes indicam que as inflorescências e os brotos deste vegetal conseguem acumular quantidades significativas de Se-metilselenocisteína, aumentando assim o seu potencial anticancerígeno (ÁVILA et al., 2013).

Segundo Pilon-Smits e Quinn (2010), as plantas absorvem o selênio pela mesma via de assimilação e mesmos transportadores do enxofre (S). Como pode ser observado na Figura 3, o selenato (SeO_4^{-2}) é absorvido pelas raízes das plantas de forma ativa pelos transportadores de sulfato, mantendo-se nesta forma até a ação da ATP sulfurilase (*APS*), transformando-o em adenosina fosforoselenato (*APSe*). Posteriormente a enzima adenosina fosforoselenato redutase (*APR*) converte a *APSe* em selenito (SeO_3^{-2}), que será transformado em Se^{-2} pela intervenção da sulfito redutase. Por fim, o Se^{-2} será convertido em selenocisteína (*SeCys*) por meio da ação da O-acetilserina (tiol)liase (*OAS*). Devido a sua alta instabilidade, a *SeCys* é rapidamente transformada em outros compostos como metilselenocisteína (*MeSeCys*) e proteínas, sendo que todas essas etapas tem ocorrência nos plastídios. Já no citosol da planta, a enzima metionina sintase transforma a *SehomoCys* em selenometionina (*SeMet*), podendo esta ser transformada em compostos voláteis de Se, proteínas ou, entrar nos plastídios e se ligar a proteínas.

Figura 2 - Esquema do metabolismo de selênio nas plantas. APSe = adenosina fosfatoselenato; OAS = O-acetilserina (tiol)liase; OPH = Ofosforohomoserina; SeCys = selenocisteína; SeMet = selenometionina; DMSeP = di-metil selenopropionato; DMSe = di-metil seleneto; DMDSe = di-metil di-seleneto. Os números indicam enzimas conhecidas. (1) ATP sulfirase; (2) adenosina fosforoselenato redutase; (3) sulfito redutase; (4) O-acetilserina (tiol)liase; (5) SeCys metil transferase; (6) SeCys liase; (7) cistationa-γ-sintase; (8) cystationa-β-liase; (9) metionina sintase; (10) metionina metil transferase; (11) DMSP liase; (12) γ-glutamil-cisteína sintase. Fonte: Adaptado de Pilon-Smits e Quinn (2010)

Para manter a saúde humana, pequenas quantidades de selênio (55 µg por dia) necessitam ser consumidas. Diferentemente dos demais semi-metais, o selênio é incorporado em proteínas pelo mecanismo de co-tradução, como parte do aminoácido selenocisteína, o 21º aminoácido utilizado para a síntese de proteínas humanas (ROMAN; JITARU; BARBANTE, 2014), formando cerca de 25 selenoproteínas (ANSONG; YANG; DIAMOND, 2014; KUMAR; PRIYADARSINI, 2014). No entanto, fatores como ingestão diária, espécie de selênio presente no alimento, estilo de vida (prática de exercício, tabagismo), polimorfismo genético, idade e estado de saúde influenciam fortemente na distribuição do selênio entre as selenoproteínas (THOMSON, 2004).

Dentre as funções desempenhadas pelas selenoproteínas, a mais importante é a sua capacidade antioxidante, minimizando os danos oxidativos (BRUMMER et al., 2013; KUMAR et al., 2011; KUNWAR et al., 2013).

Para proteger o corpo humano contra o estresse oxidativo, as células possuem sistema de autodefesa, subdivididos em dois tipos de sistemas antioxidantes, a saber, os antioxidantes internos e os complementares. Os antioxidantes internos, representados pelas enzimas glutatona peroxidase, catalase, superóxido dismutase, tioredoxina redutase, são sintetizados

nas células e agem como principal sistema de defesa contra os radicais livres. Já os antioxidantes complementares, como vitaminas e selênio, são o sistema de defesa contra os radicais livres (KIELISZEK; BŁAŻEJAK, 2013; SZYMONIK-LESIUK, et al. 2003).

A glutathiona peroxidase e a tioredoxina redutase são as principais defesas antioxidantes internas para a neutralização dos radicais livres com elevada reatividade. A glutathiona peroxidase é responsável por converter a glutathiona reduzida para glutathiona oxidada, reduzindo peróxidos e convertendo-os em álcoois inofensivos, mantendo dessa forma, a integridade da membrana (KIELISZEK; BŁAŻEJAK, 2013; KUNWAR et al., 2007).

Ao longo dos últimos 20 anos, a relação direta entre selênio e câncer tem sido estudada extensivamente em modelos animais e humanos, na maioria dos órgãos e contra ampla variedade de câncer (ROMAN; JITARU; BARBANTE, 2014). A maioria das evidências aponta para ação deste elemento nos sistemas endócrino e imunológico, além de reparo do DNA, propriedades antioxidantes, modulação da angiogênese e indução de morte celular (KUMARA; PRIYADARSINI, 2014).

Porém, fatores como forma química, dose e tipo específico de câncer influenciam diretamente nos efeitos benéficos do selênio, já sendo relatada correlação entre baixos níveis plasmáticos de selênio e câncer gastrointestinal, pele, pulmão e próstata em humanos e animais (COMBS; CLARK; TURNBULL, 1997; CLARKE et al., 2011; REID et al., 2008).

2.1.5 Câncer

As doenças não transmissíveis são definidas como uma condição médica ou como uma doença caracterizada por não ser infecciosa e não transmissível entre as pessoas. Estas doenças são responsáveis por mais de 30 milhões de mortes em todo o mundo, sendo as principais as doenças cardiovasculares, câncer, doenças pulmonares e diabetes (KIM; OH, 2013).

O Instituto Nacional do Câncer – INCA (2014) afirma que câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que apresentam por sua vez, características comuns, como por exemplo, o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo através de vasos linfáticos e sanguíneos.

O processo de formação do câncer recebe o nome de carcinogênese ou oncogênese. Este complexo processo em que as células normais gradualmente adquirem um fenótipo neoplásico pode ocorrer a longo prazo, podendo levar vários anos (INCA, 2011). Por meio de

múltiplas etapas as células neoplásicas (ou tumorais) podem adquirir características que irão favorecer o desenvolvimento do tumor e posteriormente a malignidade (HANAHA; WEINBERG, 2011).

A carcinogênese pode ser dividida em três estágios: iniciação, promoção e progressão (INCA, 2011). No estágio de iniciação (Figura 3A) as células sofrem a ação dos denominados agentes carcinógenos ou cancerígenos. Tais agentes irão promover mudanças irreversíveis no DNA e também a ativação de oncogenes e/ou inativação de genes supressores de tumor. Passando para o segundo estágio (promoção), Figura 3B, as células que já foram modificadas irão de forma lenta e gradual sendo transformadas em uma célula maligna, através de um contato contínuo com o agente cancerígeno promotor. O último estágio da carcinogênese (Figura 3C) caracteriza-se por uma multiplicação descontrolada e irreversível das células que sofreram as alterações posteriores, além do aumento de tamanho, invasão de tecidos adjacentes e metástase. Na fase de progressão, o câncer já se encontra instalado e evolui até o aparecimento das primeiras manifestações clínicas da doença (KARIN; GRETEN, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996; VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012).

Figura 3 - Estágios do processo de formação do tumor. A) iniciação; B) promoção; C) progressão

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996.

Diversos estudos já comprovaram que o câncer é o resultado do acúmulo de diversas mutações específicas, podendo ocorrer mais de 11 mil variações em uma única célula, na qual as mais comuns são as substituições de aminoácidos e as duplicações de genes (MA et al., 2010; VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012; WEINBERG, 2008).

Essas alterações proporcionam vantagens às células tumorais e constituem os *hallmarks* (características) do câncer, ou seja, durante o desenvolvimento do tumor as células tumorais adquirem algumas capacidades que vão contribuir para sua manutenção. Dentre tais capacidades podemos destacar a resistência à morte celular, replicação ilimitada, proliferação auto sustentada, indução de angiogênese, evasão de sinais supressores de crescimento e ativação de invasão e metástase (HANAHA; WEINBERG, 2011).

Os erros que ocorrem naturalmente durante os processos celulares de divisão e proliferação, podem ser causados por fatores ambientais e pela hereditariedade. No entanto, estudos apontam que a minoria dos cânceres tem causas relacionadas com o comportamento reprodutivo e os efeitos resultantes do meio hormonal (WEINBERG, 2008). Os principais causadores desta doença envolvem os agentes externos ao corpo, como por exemplo, o tabagismo, alcoolismo, hábitos sexuais, fatores ocupacionais, exposição prolongada ao sol, medicamentos e hábitos alimentares (INCA, 2012).

Alguns estudos têm apontado que a prevalência do câncer também está associada ao envelhecimento, sendo que o processo de tumorigênese está relacionado com aumento da proliferação, concomitantemente com diminuição drástica das respostas apoptóticas (BECKER et al., 2010; MUSICCO et al., 2013).

O câncer cerebral de origem glial está no grupo dos dez cânceres que mais causam mortes no mundo (CHECLER; ALVES-DA-COSTA, 2014). Com base nas suas características histopatológicas, estes tumores podem ser classificados numa escala de I a IV (LOUIS et al., 2007), sendo os graus III e IV considerados malignos, com ocorrência de pelo menos cinco casos a cada cem mil pessoas (CBTRUS, 2011). O subtipo mais comum dos gliomas, de alto grau é o glioblastoma multiforme, sendo considerado o mais agressivo e com menores chances de sobrevivência dos pacientes, praticamente nula (JURATLI; SCHACKERT; KREX, 2013; LAWLER; CHIOCCA, 2013).

O glioblastoma multiforme pode afetar todas as faixas etárias, no entanto, sua incidência tem relação direta com o aumento da idade, afetando principalmente adultos entre 75 a 84 anos. Suas características envolvem a presença marcante de proliferação celular descontrolada, infiltração difusa, propensão para recorrência, necrose, proliferação microvascular, resistência à apoptose e alta instabilidade genômica (CBTRUS, 2011).

O câncer de mama é um dos tipos de cânceres mais comuns e constitui-se como a causa mais frequente de morte em mulheres no mundo (GONZAGA et al., 2014). Dados revelam que aproximadamente meio milhão de mulheres perdem a vida todos os anos por causa deste câncer (FERLAY et al., 2010), sendo que nos países em desenvolvimento esta

incidência é ainda mais acentuada, explicada pelas mudanças nas condições de vida, padrões reprodutivos, aumento da idade média e uso da reposição hormonal. Já nos países desenvolvidos, devido aos avanços na medicação e radioterapia, assim como na detecção precoce de tumores em estágios iniciais, como resultado dos programas de rastreio, a incidência desta doença tem sido cada ano mais baixa (SCHÄSSBURGER et al., 2014).

Ao investigarem o câncer de mama, vários estudos já apontaram que em mulheres mais jovens este câncer tem demonstrado ser mais agressivo e com taxas de mortalidade mais elevadas em comparação às mulheres mais velhas (EL SAGHIR et al., 2007). Caracterizado como uma doença heterogênea, este câncer tem como características a desregulação das múltiplas vias celulares, diferentes morfologias e sensibilidade a vários tratamentos (DAWOOD et al., 2010).

Representando cerca de 3% de todas as neoplasias humanas, o carcinoma de células renais é apontado como a décima causa de morte por câncer no mundo (GUPTA et al., 2008; LJUNGBERG et al., 2010; SCHRADER; HOFMANN, 2008). Dentre os fatores de riscos apontados para o câncer em células renais destacam-se a obesidade, hipertensão arterial, tabagismo, exposição química e doença renal em estágio final. Além disso, o fator hereditário também pode influenciar, compreendendo cerca de 3-5% dos casos deste câncer (PASCUAL; BORQUE, 2008; PFAFFENROTH; LINEHAN, 2008; RINI; CAMPBELL; ESCUDIER, 2009).

O câncer em células renais, geralmente é resistente à quimioterapia convencional, beneficiando apenas uma pequena porcentagem dos pacientes que aderem a esse tipo de tratamento (HERRMANN et al., 2010). De forma geral, a intervenção cirúrgica é o primeiro tratamento realizado em pacientes com este tipo de câncer, porém cerca de 20-40% dos pacientes que são submetidos à nefrectomia desenvolvem metástases posteriormente (INMAN et al., 2013; SCHERR et al., 2011).

Morfologicamente, os tumores renais podem ser classificados em quatro subtipos diferentes: carcinoma de células claras, papilar, cromóforo e de dutos coletores, sendo que o primeiro (carcinoma de células claras) é o subtipo mais comum, representando cerca de 75% de todos os tumores renais (BERA et al., 2013).

Considerado como um sério problema em todo o mundo, o câncer de pulmão é mais comumente diagnosticado em homens e o quarto mais diagnosticado em mulheres (FERLAY et al., 2010). Devido ao seu curso assintomático inicial, o câncer de pulmão é frequentemente diagnosticado numa fase tardia, o que caracteriza o fato de possuir um índice de mortalidade extremamente alto (CAVALHERI et al., 2014; CRANDALL et al., 2014).

De acordo com as suas características anatomopatológicas, o câncer de pulmão pode ser classificado em dois principais tipos: células pequenas e não pequenas, sendo o último, o câncer de pulmão mais comum, correspondendo a cerca de 85% dos casos (SHER; DY; ADJEI, 2008).

Aproximadamente 40% dos pacientes com câncer de pulmão em células não pequenas que são submetidos à cirurgia de ressecção pulmonar completa do tumor primário tem sobrevida aumentada (POGHOSYAN et al., 2013). No entanto, os pacientes com câncer de pulmão em células pequenas, são diagnosticados com metástase e a opção cirúrgica é raramente uma opção de tratamento (SUZUKI et al., 2011).

Dentre todos os cânceres, o colorretal constitui-se como a principal causa de morte relacionada ao câncer no mundo ocidental. Seu diagnóstico é geralmente feito tardiamente, sendo detectado apenas quando se encontra em estágio avançado e quando os sintomas passam a ser aparentes. Vários fatores de risco estão envolvidos no câncer colorretal, incluindo estilo de vida, dieta, idade e histórico pessoal e familiar (MISHRA et al., 2013).

Este câncer pode ser classificado em quatro estágios distintos, juntamente com um quinto estágio chamado de “recorrente”. A fase 0 é caracterizada como uma fase precoce do câncer de cólon, na qual os pólipos são formados no revestimento da mucosa do cólon. Na fase I, os pólipos se desenvolvem num tumor e invadem o revestimento interno da mucosa. A cirurgia é a principal opção de tratamento do câncer nesta fase, com uma taxa de sobrevivência de 95%. A fase II é caracterizada pelo espalhamento do câncer além do cólon, mas ainda não atinge os gânglios linfáticos. A cirurgia de ressecção é a única opção para eliminação do câncer, com taxa de sobrevivência de 85%. Na fase III, o câncer já é caracterizado por seu espalhamento em toda a parede do cólon e também para os gânglios linfáticos circundantes e a taxa de sobrevida é de 30-60%. Como forma de tratamento pode-se empregar a cirurgia e a quimioterapia. Por fim, temos a fase IV, na qual o câncer atingiu outros órgãos como fígado, ovários, testículos e intestinos. A taxa de sobrevivência nessa fase é de apenas 3% (HEIDELBAUGH; TORTORELLO, 2012).

Outro tipo de câncer muito comum, é o de pele não melanoma, um tumor maligno representando aproximadamente 95% dos casos das neoplasias cutâneas. Apesar de apresentar baixa taxa de mortalidade, a incidência deste tipo de câncer tem aumentado significativamente, afetando diretamente a qualidade de vida do paciente e também promovendo um impacto financeiro sobre o sistema de saúde (LOMAS; LEONARDI-BEE; BATH-HEXTALL, 2012; ROGERS et al., 2010).

A incidência de câncer de pele não melanoma tem aumentado a cada ano e os dois principais tipos desse tumor são: o carcinoma basocelular e carcinoma de células escamosas (PAYETTE; WHALEN; GRANT-KELS, 2010). O carcinoma basocelular é uma neoplasia maligna de queratinócito localizadas na camada basal da epiderme. Uma significativa exposição ao sol pode ser um fator determinante para a ocorrência deste tipo de câncer, uma vez que diversos estudos já demonstraram relação direta entre a sua incidência e a exposição aos raios UV (YOUSSEF et al., 2010).

Clinicamente, o carcinoma basocelular é subdividido em quatro tipos principais: superficial, nodular-ulcerativo, pigmentado e morféico. O subtipo nodular-ulcerativo é o mais comum, representando cerca de 50% a 85% de todos os casos (CHINEM; MIOT, 2011).

2.1.6 Magnitude do câncer

O câncer foi considerado no passado como uma patologia típica de países de alta renda. No entanto, nas últimas quatro décadas, os países em desenvolvimento têm registrado elevados números de casos desta doença, ganhando dessa forma, dimensões cada vez maiores, sendo hoje considerado como um problema sério de saúde pública mundial (FERLAY et al., 2010).

É evidente que nos últimos anos o Brasil passou por um processo de mudança no seu perfil epidemiológico e o câncer é uma das doenças que está envolvida nessa transição. Os fatores relacionados a esse processo estão ligados principalmente com a intensa exposição aos agentes cancerígenos, fatores de riscos próprios do mundo contemporâneo. Além disso, o prolongamento da expectativa de vida e o envelhecimento populacional, acarretados por uma melhoria das condições sociais e econômicas, evolução da medicina e diminuição do número médio de filhos, também são fatores que contribuíram para o perfil atual de saúde dos brasileiros (INCA, 2012; INCA, 2014).

Dados anteriores relevam que em 1995 os EUA gastaram cerca de 96 bilhões de dólares/ano com tratamento, pesquisas, cirurgias, internações dentre outros fatores relacionados ao câncer (SCHUETTE et al., 1995). Passados 18 anos, as estimativas eram ainda muito alarmantes. Segundo dados publicados em 2012, os EUA gastam em média 16% (mais 2 trilhões de dólares) de seu produto interno bruto em saúde, sendo que estudos alertam que este porcentual tende a aumentar até 2017 para 20%. O câncer representa uma parcela de 5% destes dois trilhões de dólares (100 bilhões) (KEEHAN et al., 2008; MEROPOL et al., 2009).

Segundo o Instituto Nacional de Saúde dos EUA, o ônus econômico com relação aos custos indiretos associados à perda de produtividade e morte em 2008 era estimado em 219,2 bilhões de dólares (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008). Esses valores tendem a aumentar devido aos novos tratamentos dispendiosos e o acentuado aumento da incidência de câncer. Neste panorama nada favorável, a prevenção das doenças com elevado destaque ao câncer, tem recebido crescente atenção por parte dos pesquisadores, principalmente em relação ao seu custo benefício (HOFFMAN et al., 2008).

Segundo as estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, no mundo inteiro, no ano de 2012 foram computados um total de 14,1 milhões de casos novos de câncer e 8,2 milhões de mortes por esta doença. O projeto afirma ainda que se não forem tomadas medidas preventivas, os casos de cânceres permanecerão crescendo nos países em desenvolvimento e aumentarão ainda mais nos países desenvolvidos. Pesquisas já apontam que no ano de 2030 cerca de 21,4 milhões de pessoas serão diagnosticadas com câncer e que 13,2 milhões terão como causa de morte esta doença (INCA, 2014).

No Brasil as estimativas também não são animadoras. A carga nacional para o ano de 2014, válida também para o ano de 2015, é de aproximadamente 576 mil novos casos, sendo que o câncer de pele tipo não melanoma será o mais incidente na população, totalizando 182 mil casos novos. Desconsiderando-se este câncer, são estimados outros 395 mil casos, os quais afetarão 190 mil mulheres e 204 mil homens (INCA, 2014).

Os demais tumores com maior incidência na população brasileira serão o câncer de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil). Os tipos de cânceres incidentes em mulheres serão os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide; e nos homens o de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral (INCA, 2014).

Devido a evidente gravidade do cenário da saúde pública, juntamente com os inúmeros gastos com o tratamento do câncer e os efeitos colaterais que estes tratamentos podem acarretar, o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento e prevenção torna-se urgentemente necessário (ALSHATWI et al., 2011).

2.2 Material e métodos

2.2.1 Material experimental

A cultivar de brócolis utilizada no experimento foi Avenger (Sakata Seed Sudamerica). Esta cultivar apresenta características como cabeça de formato arredondado, grande, compacta e pesada. Apresenta baixa brotação lateral, granulação fina e florete definido. Quanto a sua coloração, apresenta coloração verde intensa, acarretando em uma ótima qualidade visual.

2.2.2 Obtenção da matéria prima

2.2.2.1 Brotos de brócolis

A produção dos brotos de brócolis foi realizada no Laboratório de Sementes, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP), Piracicaba-SP e ocorreu entre os dias 11 à 19 de março de 2013.

As caixas de germinação (11 x 11 x 3 cm) foram inicialmente higienizadas com uma solução de álcool 70% e quando estavam completamente secas, foram colocadas duas folhas de mata borrão (10,5 x 10,5 cm) em cada uma das caixas.

As caixas de germinação foram divididas em dois tratamentos: água destilada (controle) e solução de selenato de sódio 50 μ M (ÁVILA et al., 2013). Posteriormente os papéis de germinação foram umidificados com seus respectivos tratamentos e foram adicionadas 25 sementes de brócolis em cada caixa de germinação. As caixas de germinação foram embaladas em sacos plásticos e transferidas para câmaras de germinação com alternância de temperatura (Modelo MA 402, MARCONI, Brasil) onde permaneceram por 8 dias nas seguintes condições: 8 horas na luz à 30 °C e 16 horas no escuro à 20 °C (BRASIL, 2009).

Quando os brotos completaram 4 dias de crescimento, os papéis de germinação foram novamente umedecidos com a solução correspondente a cada tratamento. Após completarem 8 dias de germinação os brotos de brócolis sem selênio (BS) e os brotos de brócolis com selênio (BC) foram colhidos, devidamente armazenados em sacos plásticos e transportados ao laboratório de Nutrição Humana da Esalq/USP.

2.2.2.2 Mudas de brócolis

As mudas de brócolis foram fornecidas pela empresa IBS MUDAS, especializada na produção de mudas de hortaliças, localizada na cidade de Piracicaba-SP e o período de cultivo ocorreu entre 3 de julho à 01 de agosto de 2013.

As mudas foram produzidas em bandejas de polietileno preta de 200 células preenchidas com substrato comercial (Fibra de coco). Estas permaneceram por aproximadamente 30 dias em estufa agrícola do tipo arco, com 8 m de largura, 103 m de comprimento, laterais fechadas com telas antianfídeos, coberta com filme de polietileno aditivado (anti-UV) com 150 μm de espessura e altura do pé direito de 4,5 m. O sistema de irrigação das mudas foi feito por meio de barras automatizadas contendo microaspersores.

As mudas de brócolis foram divididas em dois tratamentos: água destilada e solução de selenato de sódio 50 μM (ÁVILA et al., 2013), sendo que cada tratamento possuía 10 bandejas. Quando as mudas de brócolis completaram 15 dias de germinação estas receberam manualmente 2 mL de suas respectivas soluções. Após completarem 30 dias de semeadura, as mudas sem selênio (MS) e as com selênio (MC) foram coletadas e levadas ao laboratório de Nutrição Humana em caixas de poliestireno.

2.2.2.3 Inflorescências de brócolis

O cultivo das inflorescências de brócolis foi na área experimental do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP) entre os dias 16 de abril à 20 de agosto de 2013.

As plantas de brócolis foram cultivadas em estufa agrícola do tipo arco com 7 m de largura, 20 m de comprimento, 3 m de pé direito, laterais fechadas com malha de sombreamento e coberta com filme de polietileno aditivado (anti-UV) com 150 μm de espessura. As mudas, fornecidas pela empresa IBS mudas, foram produzidas em bandejas de polietileno de 200 células e quando atingiram o tamanho apropriado (45 dias após a semeadura - DAS) foram transplantadas para vasos de 8 litros preenchidos com substrato comercial a base de casca de Pínus.

A irrigação foi realizada diariamente através de gotejadores autocompensantes com vazão de 2,0 L h⁻¹. A nutrição das plantas foi feita via água de irrigação, sendo que a solução nutritiva aplicada às plantas foi confeccionada com 750 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio, 361 mg L⁻¹ de nitrato de potássio, 260 mg L⁻¹ de sulfato de potássio, 316 mg L⁻¹ de sulfato de magnésio, 152 mg L⁻¹ de fosfato mono amônico, 19 mg L⁻¹ de quelato de ferro, 26 mg L⁻¹ de ácido bórico e 25 mg L⁻¹ de micronutrientes quelatados (1,8% Cu; 7,3% Fe; 1,8% Mn; 0,7% Zn;

0,4% Mo; 1,8% B; 0,4% Ni). A frequência das fertirrigações foi ajustada de acordo com as condições climáticas da estufa, mantendo sempre um volume de solução drenada pelos vasos de aproximadamente 20% do total aplicado a fim de evitar a salinização do substrato.

Os vasos foram divididos em tratamento controle e tratamento com selenato de sódio, sendo que cada tratamento possuía 25 vasos. As aplicações de selênio iniciaram aos 112 DAS e foram repetidas aos 115, 118, 121 e 125 DAS, totalizando 5 aplicações. Cada aplicação foi feita com 100 mL de solução de selenato de sódio 1,5 mM, resultando numa dose total de 6,5 mM de selenato de sódio (ÁVILA et al., 2013). No tratamento controle, as plantas receberam quantidades equivalentes de água. As inflorescências foram colhidas aos 127 DAS e levadas ao laboratório de Nutrição Humana em caixas de poliestireno.

2.2.3 Preparo da amostra

Com o objetivo de remover sujidades e reduzir a carga microbiana todo o material vegetal coletado foi lavado com água corrente; higienizado por 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio 20 ppm e enxaguado com água destilada. Por fim, as amostras foram armazenadas em embalagens plásticas, congeladas em freezer (Modelo Eletrônico 280 - Brastemp) à -20°C e liofilizadas (Modelo E-C - Modulyo). Após o término da liofilização as amostras foram trituradas em moinho (Modelo TE 345, MARCONI, Brasil) e armazenadas em recipientes de vidro à -20°C protegidos da luz.

2.2.4 Quantificação de selênio por Espectrometria de fluorescência de raios-X por energia dispersiva

Para a quantificação de selênio, 1 g das amostras vegetais brotos sem selênio (BS), broto com selênio (BC), mudas sem selênio (MS), mudas com selênio (MC), inflorescência sem selênio (IS) e inflorescência com selênio (IC) liofilizadas e trituradas foi transferida para um recipiente de polietileno de 20 mm de diâmetro interno e coberto com um filme de polipropileno de 60 μm de espessura (Mylar[®]). As amostras foram irradiadas com 300 s usando Espectrômetro de Fluorescência de Raios X por Energia Dispersiva (Modelo EDX-720 – Shimadzu).

A detecção foi realizada utilizando o detector de Si (Li) resfriado com nitrogênio líquido. Os resultados foram expressos em g selênio 100 g^{-1} amostra integral com base em uma curva padrão de selênio (TEZOTTO et al., 2013).

2.2.5 Determinação da atividade antioxidante

Existem na literatura diferentes métodos para a determinação da atividade antioxidante, fato importante, uma vez que as matrizes alimentares são constituídas por uma complexidade de compostos que apresentam grupos funcionais, comportamentos químicos e polaridades diferentes. Essa complexidade apresentada pelas matrizes faz com que, dependendo do teste empregado, seus resultados sejam contraditórios, não expressando adequadamente a atividade antioxidante da matriz de interesse (ÖZTÜRK, 2012). Sabendo disso, este trabalho empregou três métodos químicos para avaliar este potencial: Capacidade de sequestro do radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical e 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic (ABTS); e capacidade de redução de ferro (FRAP).

2.2.5.1 Elaboração dos extratos

Os extratos das amostras vegetais (BS, BC, MS, MC, IS e IC) foram preparados em escala laboratorial, em condições de baixa luminosidade e curto tempo com o objetivo de evitar possíveis degradações e oxidações dos compostos bioativos.

Os extratos foram obtidos pelo método de percolação do material vegetal em metanol 60% na proporção 1:10 (material vegetal [g]: solvente [mL]). A escolha do solvente empregado na preparação dos extratos foi baseada no fato de que este solvente apresentou os melhores resultados quando comparados com o etanol 60% e acetona 60% (JAISWAL; ABU-GHANNAM; SHILPI GUPTA, 2012). A extração foi conduzida sob agitação em banho-maria (Modelo Dubnoff SL-157 - Solab), à 40 °C, durante 2 horas. Ao fim deste período os extratos foram centrifugados (Modelo NT 825 - Novatecnica), filtrados e armazenados em frascos âmbar, protegidos da luz, à temperatura de – 20 °C até o momento da realização das análises de atividade antioxidante e compostos fenólicos.

2.2.5.2 Ensaio pelo método DPPH

Avaliação da atividade antioxidante dos extratos pelo método DPPH tem como fundamento a avaliação da atividade antioxidante de alimentos ou extratos, por meio do sequestro do radical DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Uma alíquota de 500 µL da diluição adotada (1:5 para todos os extratos) reagiu por 45 minutos com 300 µL do radical DPPH. As absorbâncias foram lidas a 517 nm em espectrofotômetro (modelo Unico® 2800 UV/VIS – Interprise Brasil). Os resultados foram expressos em µM

Trolox 100 g⁻¹ amostra integral e os valores calculados segundo equivalência a curva padrão de trolox.

2.2.5.3 Ensaio pelo método ABTS

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS adotou-se a metodologia da EMBRAPA (2007). Este método tem como base a formação do radical ABTS^{•+} através da reação do ABTS (7 mM) com persulfato de potássio 2,45 mM. Para a realização da análise, foi pipetado uma alíquota de 20 µL da diluição adotada inicialmente (1:10 para todos os extratos) que reagiu com 2,0 mL do radical ABTS.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (modelo Unico® 2800 UV/VIS – Interprise Brasil) a 734 nm e para a construção da curva padrão foi utilizado o antioxidante Trolox, nas concentrações de 100 – 2000 µM. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em µM Trolox 100 g⁻¹ amostra integral.

2.2.5.4 Ensaio pelo método FRAP

A determinação da atividade antioxidante total por meio de redução do ferro (FRAP) foi baseada na metodologia descrita por EMBRAPA (2006) e tem como fundamento a medida direta da habilidade dos antioxidantes (redutores) da amostra em reduzirem, em meio ácido (pH 3,6) o complexo Fe³⁺/tripiridiltriázina (TPTZ), para formar Fe²⁺, com coloração azul intenso e absorção máxima de 595 nm. A preparação do reagente FRAP ocorreu no momento em que a análise foi realizada, sendo que este se constituiu da mistura de 25 mL de tampão acetato (0,3 M, pH 3,6), 2,5 mL de uma solução TPTZ (10 mM) e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico (20 mM).

Para a realização da análise, foi pipetado uma alíquota de 90 µL da diluição adotada (1:5 para todos os extratos) e adicionada a 2,7 mL do reagente FRAP. Posteriormente esta solução foi homogeneizada e mantida em banho-maria (Modelo Dubnoff SL-157 - Solab) a 37 °C por 30 minutos. Decorrido este tempo, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (modelo Unico® 2800 UV/VIS – Interprise Brasil). A curva de calibração foi feita com sulfato ferroso (500-2000 µM) e os resultados foram expressos em µM sulfato ferroso 100 g⁻¹ amostra integral.

2.2.6 Quantificação de compostos fenólicos

O conteúdo de compostos fenólicos nos extratos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu de acordo com a metodologia proposta por Sigleton e Rossi (1965) e

posteriormente modificada por Woisky e Salatino (1998), utilizando ácido gálico como padrão. O reagente Folin-Ciocalteu é uma solução complexa de íons poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente tem a capacidade de oxidar os fenolatos, promovendo a redução dos ácidos a um complexo azul Mo-W.

Em um tubo de ensaio foi transferido uma alíquota de 0,5 mL de extrato da diluição adotada (1:5 para todos os extratos) e adicionado 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu, diluído em água destilada 1:10. A mistura foi agitada em agitador de tubos de ensaio (Modelo MX-F – LAB 1000) e deixada em repouso por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 2 mL de uma solução de carbonato de sódio 4% e os tubos foram deixados em repouso por 2 horas ao abrigo da luz.

A absorbância foi medida em espectrofotômetro (modelo Unico® 2800 UV/VIS – Interprise Brasil) a 740 nm. Os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos mg de ácido gálico 100 g^{-1} amostra integral, com base em uma curva de calibração de ácido gálico com concentrações variando de 10 a $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.2.7 Ensaio *in vitro*

A análise das atividades antiproliferativas *in vitro* dos extratos brutos diclorometânicos (EDB) e extratos brutos etanólicos (EBE) dos BS, BC, MS, MC, IS e IC foram realizadas na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

2.2.7.1 Obtenção dos extratos brutos

Para a preparação dos extratos brutos utilizados na análise de atividade antiproliferativa *in vitro*, as amostras vegetais (BS, BC, MS, MC, IS e IC) foram inicialmente submetidas a uma extração em mesa agitadora (Modelo TE 1401 - Tecnal) com diclorometano na proporção 1:5 (material vegetal [g]: solvente [mL]) durante um período de 2 horas. Esse procedimento inicial foi repetido por 3 vezes e no final das 6 horas de extração, os volumes foram reunidos e filtrados. Posteriormente, o volume final do filtrado foi eliminado sob vácuo em rotaevaporador (Modelo 801 – Frisatom) em temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ obtendo-se o EBD.

Os resíduos vegetais do processo de obtenção do EBD foram deixados na capela até que estivessem completamente secos. Em seguida, os materiais vegetais foram novamente pesados, retomados em etanol 70% na proporção 1:5 (material vegetal [g]: solvente [mL]) e submetidos a agitação em mesa agitadora (Modelo TE 1401 – Tecnal) novamente por três

vezes (2 horas cada extração). Após este período, os volumes foram reunidos, filtrados e o solvente orgânico foi eliminado sob vácuo (Modelo 801 – Frisatom) em temperatura de 37 °C. Após a eliminação total do etanol, o extrato foi liofilizado (Modelo E-C - Modulyo) obtendo-se o EBE, conforme Figura 4.

Figura 4 - Fluxograma do processo de extração para obtenção dos EBE e EBD

2.2.7.2 Células

As linhagens tumorais humanas foram cedidas pelo NCI (National Cancer Institute, EUA) ao CPQBA/Unicamp e encontram-se listadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Linhagens celulares tumorais e não tumorais utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro* e suas DI

Tipo celular	Nome	Origem	DI (x 10 ⁴ células ml ⁻¹)
Glioma	U251	Ectoderme	4,0
Mama	MCF-7	Ectoderme	6,0
Rim	786-0	Mesoderme	4,5
Pulmão	NCI-H460	Endoderme	4,0
Cólon	HT29	Endoderme	4,0
Queratinócito humano*	HaCat	Ectoderme	4,0

DI: Densidade de inoculação

*linhagem não tumoral

2.2.7.3 Cultivo celular

As linhagens celulares utilizadas no experimento em questão foram cultivadas em frascos de 25 cm² (T25) com 5 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino

(SFB) a 37 °C em atmosfera úmida com 5% CO₂. Quando a monocamada celular atingia cerca de 80% de confluência, as linhagens eram repicadas em condições estéreis, o que ocorria geralmente uma vez por semana.

2.2.8 Atividade antiproliferativa em cultura de células

Para o teste de atividade antiproliferativa foi utilizado o mesmo protocolo desenvolvido pelo National Cancer Institute (USA), o qual emprega esta metodologia há mais de vinte e três anos (MONKS et al., 1991).

2.2.8.1 Plaqueamento das células

No primeiro dia do experimento, foi realizado o plaqueamento das células em placas de 96 poços. Em outra placa, a placa controle (T₀), foram inoculadas todas as linhagens celulares empregadas no experimento. A suspensão celular foi preparada com meio RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2 mg L⁻¹) e ajustada em sua respectiva densidade de inoculação. Após este procedimento, 100 µL de suspensão celular foram inoculados nas placas e incubados por 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido.

2.2.8.2 Preparo e aplicação das amostras

Os EBD e EBE de todas as amostras vegetais foram diluídos em solução estoque de dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,1 g mL⁻¹. Para a adição à cultura de células, estas soluções foram diluídas em pelo menos 400 vezes em RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2mg/L), o que evita a toxicidade do DMSO.

As amostras foram adicionadas nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg mL⁻¹, (100 µL compartimento⁻¹) em triplicata, como pode ser observado na Figura 5, e a seguir foram incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Como controle positivo utilizou-se o quimioterápico doxorrubicina, nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg mL⁻¹ (100 µL compartimento⁻¹) em triplicata.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			250	25	2,5	0,25	250	25	2,5	0,25	250	25
B		Células	250	25	2,5	0,25	250	25	2,5	0,25	250	25
C		Células	250	25	2,5	0,25	250	25	2,5	0,25	250	25
D		Células	250	25	2,5	0,25	250	25	2,5	0,25	250	25
E		Células	250	25	2,5	0,25	250	25	2,5	0,25	250	25
F		Células	250	25	2,5	0,25	250	25	2,5	0,25	250	25
G		Células	250	25	2,5	0,25	250	25	2,5	0,25	250	25
H			250	25	2,5	0,25	250	25	2,5	0,25	250	25

Figura 5 - Placa teste. A primeira coluna cinza representa o controle do meio de cultura (branco do meio). A segunda coluna cinza-escuro representa o controle de células tumorais. As cores em degradê indicam as substâncias-teste, e as cores escuras respectivas o controle das substâncias-teste (branco da amostra) nas concentrações de 250; 25; 2,5 e 0,25 µg/mL

No momento de adição das amostras, as células inoculadas na placa controle T₀ foram fixadas com a adição de 50 µL compartimento⁻¹ de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para determinação da quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram aplicadas, sendo este o valor basal 0, conforme pode ser observado na Figura 6. O TCA tem como função fixar as células, precipitando assim as proteínas. Células viáveis se mantêm fixas na placa, enquanto células não viáveis se desprendem, sendo lavadas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 6 - Placa T₀. A primeira coluna cinza representa o controle do meio de cultura (branco do meio, contendo apenas meio com soro fetal bovino). Cada coluna colorida corresponde a uma linhagem em sua densidade de inoculação

Após 48 horas de incubação as células foram fixadas com 50 µL de TCA a 50% e novamente incubadas por 1 hora a 4 °C. Em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água corrente para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários e a seguir foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa.

2.2.8.3 Ensaio de sulforrodamina B (SRB)

Após a secagem das placas, foram adicionados 50 μL $\text{compartimento}^{-1}$ do corante protéico sulforrodamina B a 0,4 % (peso volume⁻¹) dissolvido em ácido acético a 1 % e em seguida as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com solução de ácido acético 1% e novamente incubadas à temperatura ambiente até secagem completa. Posteriormente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150 μL $\text{compartimento}^{-1}$ de Trizma Base (10 μM , pH 10,5). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de microplacas a 540 nm (Modelo VersaMax - Molecular Devices®).

A sulforrodamina B é um corante protéico que tem como função se ligar aos resíduos de aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação. Sendo assim, quanto maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, mais células viáveis e consequentemente menor a atividade antiproliferativa da amostra em teste.

2.2.8.4 Análise dos resultados

Para análise dos resultados, foram calculadas as médias das absorbâncias dos compartimentos contendo células + amostras, descontando-se seus respectivos brancos, que são compartimentos contendo apenas amostra. Através das fórmulas a seguir, a porcentagem de crescimento (%C) de cada amostra testada foi calculada.

Se $T > C$ = a amostra estimulou o crescimento.

Se $T \geq T_0$ e $< C$, a amostra foi citostática e a fórmula utilizada foi $100 \times [(T - T_0)/(C - T_0)]$.

Se $T < T_0$ a amostra foi citocida e a fórmula utilizada foi $100 \times [(T - T_0)/(T_0)]$.

Onde:

T é a média da absorbância da célula tratada

C é o controle de célula

T_0 é o controle das células no dia da adição das amostras.

Com esses valores, foram elaborados gráficos relacionando a porcentagem de crescimento com a concentração da amostra testada. As amostras foram consideradas ativas quando apresentaram inibição de crescimento maior que 50%. A concentração efetiva para inibição de 50% da proliferação celular (GI_{50}) foi calculada por regressão não linear, tipo sigmoidal, empregando-se *software* Origin versão 7.5.

2.2.9 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Para análise de determinação de selênio foi realizada uma leitura por amostra, a análise de atividade antioxidante e compostos fenólicos foram realizadas em quadruplicata e o teste de atividade antiproliferativa em triplicata.

Os resultados foram submetidos à análise de homogeneidade das variâncias (Box-Cox) e normalidade dos dados (Shapiro-Wilk) e, quando indicado pelos testes, foram realizadas as transformações necessárias para então proceder a análise de variância. Os dados obtidos para cada estágio de maturação dos brócolis e os três estádios de maturação sem o tratamento com selênio foram submetidos separadamente à análise de variância (ANOVA), utilizando o software SAS (SAS/STAT, 2003). As características que apresentaram diferença significativa pelo teste F em resposta à biofortificação de selênio foram submetidas ao teste de Tukey ($p < 0,05$) para a comparação de médias.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.4 Aquisição das amostras vegetais e rendimentos

Os materiais (brotos, mudas e inflorescências) utilizados no preparo das amostras, depois de cultivados e colhidos, foram levados ao laboratório de Nutrição Humana, sendo devidamente higienizados, seccionados, armazenados e em seguida liofilizados. A técnica da liofilização foi empregada com o objetivo de evitar possíveis perdas de compostos bioativos sensíveis ao calor, conservando com maior qualidade as amostras coletadas e dando maior confiabilidade aos resultados encontrados na pesquisa.

O aspecto visual das amostras no momento da coleta das amostras pode ser observado na Figura 7.

Figura 7 - Aspecto visual das amostras de brócolis coletadas: A) BS (broto sem selênio); B) BC (broto com selênio); C) MS (muda sem selênio); D) MC (muda com selênio); E) IS (inflorescência sem selênio); F) IC (inflorescência com selênio)

A Tabela 2 apresenta o rendimento (porcentagem em relação a massa fresca) de cada uma das amostras vegetais utilizadas neste estudo após o processo de liofilização.

Tabela 2 - Rendimento das amostras vegetais após o processo de liofilização

Material vegetal*	Rendimento (%)
BS	6,45±0,04 ^b
BC	8,22±0,14 ^a
MS	11,20±0,12 ^a
MC	11,24±0,10 ^a
IS	11,54±0,17 ^b
IC	14,39±0,54 ^a

*BS: broto sem selênio; BC: broto com selênio; MS: mudas sem selênio; MC: mudas com selênio; IS: inflorescência sem selênio; IC: inflorescência com selênio

Como pode ser observado na Tabela 2 as amostras BS e BC apresentaram os menores rendimentos, ou seja, continham maior quantidade de água por unidade de massa fresca. A amostra BC apresentou rendimento significativamente maior que a amostra BS, o que também pode ser observado com relação às amostras IS e IC. Com relação ao rendimento das amostras MS e MC este não diferiu significativamente entre si. Dentre todas as amostras a IC apresentou o maior rendimento.

2.3.5 Quantificação de selênio

Para a determinação do conteúdo de selênio presente nas amostras de brócolis foi utilizada a técnica de espectrometria de fluorescência de raios-X por energia dispersiva (EDXRF). Esta técnica é muito utilizada, especialmente em amostras sólidas, para avaliar a concentração dos elementos presentes na mesma. A escolha da EDXRF deve-se ao fato de que esta técnica apresenta inúmeras vantagens, tais como, relativa simplicidade, capacidade de analisar várias amostras ao mesmo tempo sem que ocorra a sua destruição, dispensando, assim, o emprego de pré-tratamentos químicos (PALTRIDGE et al., 2012).

A biofortificação com selênio foi realizada utilizando o selenato de sódio. Esta escolha está fundamentada no fato de que no brócolis, assim como em outras brássicas, a absorção e a distribuição do selênio ocorrem mais rapidamente quando se emprega o selenato em relação ao selenito, comprovando assim sua maior eficácia em promover o acúmulo de selênio (BRUMMELL et al., 2011; RAMOS et al., 2010; RAMOS et al., 2011b; SHARMA et al., 2010).

Os valores de selênio presente nas amostras (BS, BC, MS, MC, IS e IC) encontram-se dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 - Conteúdo de selênio nas amostras integrais

Material vegetal*	Conteúdo de Selênio na amostra integral
	(g selênio 100 g ⁻¹)
BS	nd
BC	1,32
MS	nd
MC	1,48
IS	nd
IC	1,66

nd = não detectado

*BS: broto sem selênio; BC: broto com selênio; MS: mudas sem selênio; MC: mudas com selênio; IS: inflorescência sem selênio; IC: inflorescência com selênio

Como pode ser observado, não houve a detecção do selênio nas amostras que receberam apenas a água destilada (BS, MS e IS). Já para as amostras BC, MC e IC a quantidade de selênio aumentou conforme o desenvolvimento do brócolis.

O brócolis, assim como outros representantes das brássicas, são classificados como acumuladores secundários de selênio, pois estes vegetais têm capacidade de acumular centenas de mg de selênio g⁻¹ matéria seca (RAMOS et al., 2011c; TERRY et al., 2000). Estudos prévios apontaram que o conteúdo total de selênio sofre alteração de acordo com os diferentes estádios de maturação de brócolis (RAMOS et al., 2011c), fato também observado nesta pesquisa.

As mudas e as inflorescências de brócolis apresentaram, respectivamente, 1,12 e 1,26 vezes mais selênio do que os brotos (Tabela 3). O tempo de exposição, arquitetura do sistema radicular e o manejo das plantas (por exemplo, a irrigação) podem ser os responsáveis pela diferença observada no acúmulo de selênio entre esses estádios de maturação (ÁVILA et al., 2013).

O selênio constitui um importante elemento à saúde humana, auxiliando na prevenção de diversas doenças, entre elas o câncer. De acordo com o Instituto de Medicina, sua recomendação diária para adultos é de 55 µg por dia (BENDICH et al., 2001). Levando-se em conta os resultados obtidos nesta pesquisa, temos que o consumo de 4,17; 3,72 e 3,31 g de brotos, mudas e inflorescências biofortificadas com selênio, respectivamente, suprem as necessidades diárias desse mineral.

Considerando a pequena quantidade de matéria vegetal necessária para suprir a demanda diária recomendada de selênio, a biofortificação dos brócolis com este mineral torna-se uma alternativa extremamente viável para ser empregada como um aditivo alimentar.

2.3.6 Atividade antioxidante e compostos fenólicos

A capacidade antioxidante dos extratos metanólicos de brócolis (BS, BC, MS, MC, IS e IC), mensurada por três métodos diferentes, e a quantidade de compostos fenólicos estão descritos na Tabela 4. A análise estatística foi realizada comparando-se os valores médios obtidos para cada estágio de maturação do brócolis separadamente.

A extração de compostos com atividade antioxidante pode ser realizada empregando-se diferentes solventes orgânicos. O principal ponto a ser observado na escolha do solvente de extração é a sua capacidade de recuperar os compostos responsáveis por expressar tal atividade, necessitando, assim, que os compostos presentes nessas matrizes sejam solúveis no solvente em questão. Dentre os solventes mais utilizados para este fim destacam-se a acetona, metanol, etanol e suas misturas aquosas. Porém, para a avaliação da atividade antioxidante do brócolis o solvente metanol 60% demonstrou ser mais eficiente como solvente extrator, expressando maior atividade antioxidante e maior quantidade de fenólicos em relação aos solventes acetona 60% e etanol 60% (JAISWAL; ABU-GHANNAM; GUPTA, 2012). Diante deste fato, o presente trabalho empregou o metanol 60% como solvente de escolha para a extração dos compostos e posteriores análises de capacidade antioxidante e quantificação total de compostos fenólicos.

Tabela 4 - Atividade antioxidante e compostos fenólicos das amostras de brócolis biofortificadas e não biofortificadas com selênio

Amostra**	DPPH	ABTS	FRAP	Compostos Fenólicos
	(μM Trolox 100 g^{-1} amostra integral)	(μM Trolox 100 g^{-1} amostra integral)	(μM sulfato ferroso 100 g^{-1} amostra integral)	(mg de ácido gálico 100 g^{-1} amostra integral)
BS	531,68 $\pm$ 13,69 ^a	448,03 $\pm$ 5,28 ^b	2257,00 $\pm$ 17,32 ^b	95,64 $\pm$ 1,36 ^b
BC	548,02 $\pm$ 3,55 ^a	559,77 $\pm$ 30,52 ^a	2804,50 $\pm$ 55,60 ^a	120,09 $\pm$ 1,39 ^a
MS	629,07 $\pm$ 7,50 ^b	812,71 $\pm$ 39,18 ^b	4152,00 $\pm$ 62,72 ^b	179,08 $\pm$ 3,10 ^b
MC	730,86 $\pm$ 10,93 ^a	897,02 $\pm$ 31,28 ^a	4587,00 $\pm$ 80,21 ^a	188,84 $\pm$ 2,19 ^a
IS	531,68 $\pm$ 10,56 ^a	703,00 $\pm$ 31,28 ^a	2217,00 $\pm$ 84,26 ^b	94,65 $\pm$ 1,39 ^b
IC	512,83 $\pm$ 36,13 ^a	754,81 $\pm$ 33,43 ^a	3194,50 $\pm$ 75 ^a	105,94 $\pm$ 0,55 ^a

*Letras diferentes na coluna e dentro do mesmo estágio de maturação diferem entre si a 5% de significância. A comparação de médias foi realizada para cada estágio de maturação do brócolis separadamente.

**BS: broto sem selênio; BC: broto com selênio; MS: mudas sem selênio; MC: mudas com selênio; IS: inflorescência sem selênio; IC: inflorescência com selênio

Como pode ser observado na Tabela 4, a amostra BC apresentou maior atividade antioxidante quando mensurada pelos métodos ABTS e FRAP do que a amostra BS. Esse aumento também foi evidente na quantidade de compostos fenólicos. No entanto, para a análise de DPPH, as amostras não diferiram significativamente entre si.

Com relação às mudas, observou-se que a amostra MC apresentou valores de atividade antioxidante significativamente superior ao MS nos três métodos empregados (DPPH, ABTS, FRAP), e também valores mais elevados de compostos fenólicos em relação a amostra MS.

Para as inflorescências, a amostra IC também apresentou resultados superiores em relação à amostra IS para atividade antioxidante e quantidade de compostos fenólicos. No entanto, sua atividade frente aos radicais DPPH e ABTS não diferiram significativamente da atividade da amostra IS. Já para o FRAP e quantidade de compostos fenólicos na amostra IC apresentou valores superiores às obtidas pela amostra IS.

Um fato comum ocorrido entre todas as amostras foi que a atividade antioxidante pelo método FRAP apresentou os maiores resultados quando comparadas ao DPPH e ABTS. Resultados semelhantes também foram encontrados por Baenas; Moreno, García-Viguera (2012).

Apesar dos métodos empregados para a determinação da atividade antioxidante serem métodos diretos, ou seja, tanto o de DPPH, ABTS e FRAP fundamentam-se na competição

entre uma sonda oxidável e o antioxidante pelos radicais gerados por um fonte de radicais livres (ROGINSKI et al., 2005), houve diferenças entre os resultados encontrados, que podem ser explicados pelo fato de que cada método possui uma particularidade quanto a sua maneira de avaliar a capacidade antioxidante das amostras testadas.

Além disso, também podem existir particularidades em cada método de análise quanto à solubilidade dos compostos, sendo que no ABTS é possível considerar aqueles que são lipofílicos e os que são hidrofílicos, já o DPPH não apresenta esta capacidade, sendo mais sensível aos compostos hidrofílicos (DASTMALCHI et al., 2011; MÜLLER; FRÖHLICH; BÖHM, 2011).

Aliado a estes fatos, também podemos considerar que alterações no clima e fertilização podem afetar diretamente na composição bioquímica, ou no perfil e concentração de compostos bioativos nas brássicas, o que resulta em alterações na sua capacidade antioxidante e na quantidade de compostos fenólicos (AIRES et al., 2011; CISKA; MARTYNIAK-PRZYBYSEWSKA; KOZLOWSKA, 2000; ROSS; BETA; ARNTFIELD, 2009). As plantas da mesma espécie e cultivar que são produzidas em condições agrícolas similares também podem sofrer significativas variações em seus compostos bioativos, afetando diretamente suas atividades biológicas (CARTEA et al., 2008).

Os compostos fenólicos são os principais antioxidantes naturais das brássicas, especialmente no brócolis, sendo que, quanto maior a quantidade destes compostos, maior é a sua atividade antioxidante (FERNÁNDEZ-LEÓN et al., 2013), o que pode ser verificado neste trabalho uma vez que, as amostras que apresentaram maior quantidade de compostos fenólicos, também obtiveram resultados maiores com relação a atividade antioxidante.

Na Figura 8 são apresentadas as comparações de médias das análises DPPH, ABTS, FRAP e compostos fenólicos para as amostras que não receberam selênio.

Figura 8 - Comparação de médias das análises DPPH, ABTS, FRAP e compostos fenólicos entre as amostras BS, MS e IS

Como observado na Figura 8, as mudas de brócolis apresentaram resultados significativamente superiores aos obtidos pelos brotos e inflorescência. Possivelmente isso seja atribuído ao fato da atividade antioxidante das brássicas ser máxima quando suas folhas ainda são jovens, como demonstrado em pesquisas realizadas por Soengas et al. (2012) e Samec et al. (2011), nas quais verificaram que a atividade antioxidante nessa espécie tem início quando os brotos começam a ser formados, atingindo o máximo decorridos três meses após a semeadura, sendo que posterior a este período a atividade antioxidante sofre significativa redução.

Isso corrobora com os resultados obtidos nesse experimento, onde as mudas de brócolis que não foram biofortificadas com selênio apresentaram quantidade de compostos fenólicos significativamente superior aos brotos e inflorescências, o que também está relacionado com o aumento ocorrido na atividade antioxidante, uma vez que, quanto maior a quantidade de compostos fenólicos na amostra maior a sua atividade antioxidante.

A biofortificação com selênio e os efeitos sobre os compostos fenólicos ainda é contraditório. Pesquisas científicas apontam que o estresse abiótico, como por exemplo, a aplicação de selênio, pode resultar no aumento da produção de compostos fenólicos (DUTTA; MAHARIA, 2012; KOVACIK; KLEJDUS, 2008) e que a manutenção adequada das condições de exposição pode estimular o metabolismo desses compostos (ATKINSON et al., 2011; COHEN; KENNEDY, 2010; YUAN et al., 2010). De acordo com Robbins et al. (2005)

as plantas que possuem entre 100 e 1000 ppm de selênio em amostra seca apresentam maior quantidade de compostos fenólicos. No entanto, se a concentração de selênio na planta exceder 1000 ppm pode ocorrer estresse tóxico que resultará numa diminuição desses metabólitos secundários.

Em estudo realizado com diferentes variedades de brócolis, demonstrou que a quantidade dos compostos fenólicos aumentou com a aplicação de selênio (ROBBINS et al., 2005). Isso corrobora com os resultados obtidos no presente experimento para todas as amostras (BS; BC; MS; MC; IS e IC), uma vez que a partir da análise de quantificação de compostos fenólicos foi possível detectar que as plantas que foram biofortificadas com selênio apresentaram quantidade de compostos fenólicos significativamente maiores do que as plantas controle, o que pode explicar também o aumento da atividade antioxidante destes tratamentos.

2.3.7 Atividade antiproliferativa em cultura de células

Os compostos bioativos presentes no brócolis apresentam importante atividade biológica no organismo humano. Essa atividade está relacionada às elevadas concentrações de compostos organosulfurados presentes neste vegetal, como por exemplo, os isotiocianatos, responsáveis por aumentarem a atividade de enzimas que estão envolvidas na desintoxicação de agentes cancerígenos. Além disso, os compostos bioativos presentes no brócolis podem provocar a apoptose ou a inibição da progressão do ciclo celular (CHAUDHARY et al., 2014).

Com o intuito de obter maior amplitude quanto à atividade antiproliferativa dos diferentes estádios de maturação do brócolis (broto, muda e inflorescência) biofortificados ou não com selênio e sabendo-se que uma mesma amostra pode se comportar e apresentar esta atividade diferenciada frente às linhagens celulares, empregou-se neste estudo linhagens tumorais humanas de diferentes origens histológicas e genéticas. As linhagens de glioma (U251) e de mama (MCF-7) possuem origem ectodérmicas, a linhagem de rim (786-0) mesodérmica e as linhagens de pulmão (NCI-H460) e cólon (HT29) endodérmicas. Além disso, também foi avaliada a atividade anticâncer em células com fenótipos não-tumorais, de origem ectodérmica como é o caso da HaCat (queratinócito humano).

A escolha inicial da realização dos testes *in vitro* deve-se ao fato de que esta triagem emprega uma técnica que permite a avaliação do potencial anticâncer de uma determinada amostra com maior especificidade, eficiência, rapidez e reprodutibilidade. Além disso, é possível, a partir dos resultados obtidos, escolher qual das amostras submetidas ao teste

apresentam maior potencial para serem futuramente utilizados em modelos experimentais de câncer *in vivo* (MONKS et al., 1991).

Após a obtenção das médias dos valores de absorbância, calculou-se os percentuais de inibição de crescimento, sendo estes posteriormente utilizados na elaboração dos gráficos de atividade antiproliferativa (Figuras 9 a 13) que relacionam este parâmetro com a concentração dos extratos. Estes gráficos podem fornecer informações referentes à atividade citostática (inibição de crescimento), que compreende os valores na faixa de 50 e zero, atividade citocida (morte celular) para os valores negativos, e inibição total de crescimento para os valores que atingem o zero.

A Tabela 5 apresenta os valores de GI_{50} (concentração efetiva para inibição de 50% da proliferação celular), ou seja, a concentração de amostra necessária, em $\mu\text{g mL}^{-1}$, para inibição de 50% da proliferação celular. A partir destes resultados é possível comparar a potência entre os extratos brutos testados e o controle, sendo de significativa importância para a análise dos dados.

Tabela 5 - Valores de GI_{50} da doxorubicina e dos extratos brutos (EBD e EBE) de cada amostra em seis linhagens tumorais humanas ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

	U251	MCF-7	786-0	NCI-H460	HT29	HaCat
Doxorrubicina	<0,025	<0,025	0,025	<0,025	0,089	0,035
Extrato Diclorometano						
BS	>250	96,7	123,6	>250	>250	>250
BC	>250	>250	>250	>250	>250	>250
MS	61,7	94,6	12,0	94,9	>250	58,4
MC	28,5	68,1	20,7	149,2	>250	64,9
IS	209,7	98,9	>250	>250	178,1	>250
IC	>250	132,4	>250	>250	>250	>250
Extrato EtOH 70%						
BS	>250	>250	>250	>250	>250	>250
BC	>250	>250	>250	>250	>250	>250
MS	>250	>250	>250	>250	>250	>250
MC	>250	>250	>250	>250	>250	>250
IS	>250	>250	>250	>250	>250	>250
IC	>250	>250	>250	>250	>250	>250

U251 – glioma, MCF-7 – mama, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, HT29 – cólon, HaCat – queratinócito

As atividades antiproliferativas dos extratos brutos diclorometânicos e etanólicos submetidos ao teste *in vitro* estão ilustrados nas Figuras 9 a 13. A Doxorubicina (Figura 9) foi escolhida para ser empregada como controle positivo devido à sua eficácia no tratamento do câncer.

Figura 9 - Atividade antiproliferativa do quimioterápico doxorrubicina (controle positivo) sobre as linhagens celulares, relacionando porcentagem de crescimento *versus* concentração de amostra. (U251 – glioma, MCF-7 – mama, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, HT29 – cólon, HaCat – queratinócito)

Na figura 9, o controle positivo (doxorrubicina), apresentou resposta concentração dependente, demonstrando elevada potência e seletividade em baixas concentrações para a maioria das células estudadas. Com relação ao efeito citocida, esse composto ou medicamento demonstrou atividade em todas as linhagens testadas, exceto para HT29 (cólon) e NCI-H460 (pulmão).

Figura 10 - Atividade antiproliferativa dos EBDs das amostras BS (A) e BC (B) sobre as linhagens celulares, relacionando porcentagem de crescimento *versus* concentração de amostra. (U251 – glioma, MCF-7 – mama, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, HT29 – cólon, HaCat – queratinócito)

O EBD do BS (Figura 10A) apresentou atividade antiproliferativa um pouco maior quando comparado ao EBD do BC (Figura 10B), sendo que o primeiro apresentou atividade

citostática para as linhagens 786-0 (rim) e MCF-7 (mama) com valores de IG_{50} iguais a 123,6 e 96,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Tabela 5). Quanto à atividade citocida, tanto o BS quanto o BC não apresentaram tal atividade.

Figura 11 - Atividade antiproliferativa dos EBDs das amostras MS (A) e MC (B) sobre as linhagens celulares, relacionando porcentagem de crescimento *versus* concentração de amostra. (U251 – glioma, MCF-7 – mama, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, HT29 – cólon, HaCaT – queratinócito)

Observa-se na figura 11 (A e B) que os EBDs das amostras MS e MC apresentaram perfil de atividade antiproliferativa próximas, uma vez que, ambas demonstraram atividade citostática seletiva para a linhagem 786-0 com GI_{50} 12,0 e 20,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Tabela 5). Além disso, o EBD da MC (Figura 11B) manifestou atividade citocida com GI_{50} de 28,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a linhagem de glioma.

Figura 12 - Atividade antiproliferativa dos EBDs das amostras IS (A) e IC (B) sobre as linhagens celulares, relacionando porcentagem de crescimento *versus* concentração de amostra. (U251 – glioma, MCF-7 – mama, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, HT29 – cólon, HaCat – queratinócito)

Por fim, temos os gráficos referentes à atividade antiproliferativa dos EBD da IS e da IC (Figura 12 A e B). O EBD da IS (Figura 12A) apresentou atividade citostática fraca para as linhagens MCF-7 – mama ($98,9 \mu\text{g mL}^{-1}$), HT29 – cólon ($178,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e U251 - glioma ($209,7 \mu\text{g mL}^{-1}$). O EBD da IC (Figura 12B), por sua vez, demonstrou atividade citostática fraca para a linhagem MCF-7 ($132,4 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Figura 13 - Atividade antiproliferativa dos EBEs das amostras BS(A), BC(B), MS(C), MC(D), IS(E) e IC(F) sobre as linhagens celulares, relacionando porcentagem de crescimento *versus* concentração de amostra. (U251 – glioma, MCF-7 – mama, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, HT29 – cólon, HaCat – queratinócito)

O EBE é obtido após a obtenção do EBD, sendo que o ultimo remove inicialmente os compostos que apresentam baixa polaridade e o EBE remove o restante dos compostos que

apresentam maior polaridade. Os EBEs de todas as amostras (BS, BC, MS, MC, IS, IC) não apresentaram atividade citostática e citocida (Figura 13).

A partir dos gráficos de crescimento celular em função da concentração da amostra ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pode-se afirmar que os EBD foram mais ativos que o EBE, sendo que dentre todas as amostras analisadas a MC apresentou atividade antiproliferativa mais pronunciada.

Para que um composto apresente potente atividade antineoplásica, este deve apresentar valor de $\text{GI}_{50} \leq 30 \mu\text{g mL}^{-1}$ (FOUCHE et al., 2008). Levando em conta os resultados apresentados pelos extratos estudados, podemos observar que os extratos EDB das amostras MS e MC foram os que apresentaram atividade antiproliferativa com valores de GI_{50} próximos ao considerado limítrofe para as linhagens de câncer de rim (786-0) e glioma (U251) (Tabela 5).

Os resultados de GI_{50} (Tabela 5) das amostras IS e IC testadas na linhagem tumoral MCF-7 foram semelhante aos encontrados por Wang et al. (2013). Segundo este autor, os brócolis apresentam potencial antiproliferativo próximo aos de outros vegetais como por exemplo, o tomate e a couve-flor roxa. Seeram et al. (2006) avaliaram o potencial antiproliferativo da amora e da framboesa e encontraram valores de GI_{50} respectivamente $122,00 \pm 0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $190,80 \pm 0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$, valores superiores aos encontrados nesta pesquisa.

Ao adicionar diferentes proporções de brócolis em chá verde, Domínguez-Perles, Moreno e García-Viguera (2012) observaram que as infusões com brócolis não demonstraram efeitos tóxicos às linhagens celulares controle (CCD-18Co). Quando estas infusões foram testadas em células de adenocarcinoma humano (Caco-2), promoveram a indução da morte das células malignas nas primeiras 24 horas. Este estudo demonstrou que aplicação do brócolis em produtos comerciais pode ser uma estratégia interessante, podendo ser utilizado como um ingrediente na indústria de alimentos, para o enriquecimento da composição fitoquímica de novos alimentos.

Chaudhary et al. (2014) ao avaliarem a atividade antiproliferativa de brotos e inflorescência de brócolis em linhagens de próstata humana, relataram que todos as amostras testadas apresentaram valores de IC_{50} variando entre 25 à $143 \mu\text{g mL}^{-1}$ de extrato. Um fato importante demonstrado neste estudo foi que as células tratadas com as amostras de brócolis não apresentaram alterações morfológicas, o que sugere a indução de um processo de morte celular programada.

Explicações com relação ao mecanismo pelo qual o brócolis poderia agir sobre células cancerígenas ainda precisam ser elucidados. Alguns estudos apontam que esta capacidade está

relacionada ao teor de isotiocianatos e indóis, os quais interagem com fatores de translocação envolvidos na apoptose (CARTEA et al., 2008).

Poucos estudos que avaliam a atividade antiproliferativa do brócolis foram encontrados na literatura. De maneira geral, os estudos são conduzidos avaliando isoladamente os compostos bioativos das brássicas. A exemplo, temos a pesquisa conduzida por Lai et al. (2010), que demonstrou que o fenetil isotiocianato possui efeito anti-invasivo e anti-migratório em células HT29 (cólon). A brassinina também apresentou resultados satisfatórios para o câncer de cólon ao inibir o crescimento celular das células cancerígenas através da paralisação do ciclo celular na fase G1 (IZUTANI et al., 2012).

Para o câncer prostático, estudos apontam que a erucina é um promissor fitoquímico, promovendo de forma dose dependente o aumento significativo da expressão de proteínas que são responsáveis pela regulação do crescimento celular, acarretando na inibição da proliferação das células cancerígenas (MELCHINI et al., 2013).

Pesquisas demonstraram que o sulforafano inibiu a invasão das células cancerígenas através da inibição da expressão de enzimas ligadas à metástase, quando testado em células de linhagens mamárias (LEE et al., 2013). O fenetil isotiocianato também foi eficiente na prevenção do câncer de mama, diminuindo a sobrevivência do tumor e reduzindo a sua incidência em modelos animais (ARAS et al., 2013).

Além do câncer de mama, o sulforafano também demonstrou efeito positivo para o câncer pancreático. Este isotiocianato inibiu o crescimento das células com IC₅₀ de cerca de 10-15 µM e induziu a apoptose (LI et al., 2013).

Quanto ao papel desempenhado pelo selênio na prevenção do câncer, apesar de ser encontrado em níveis muito baixos nos seres humanos, apresenta funções únicas e muito importantes, uma vez que promove a formação de selenoproteínas, responsáveis pela defesa antioxidante do corpo humano (ROMAN; JITARU; BARBANTE, 2014).

Dessa forma, ao aliarmos o brócolis e os seus compostos bioativos juntamente com o selênio, resultados mais expressivos poderão ser encontrados quando o objetivo é a prevenção do câncer, fato já comprovado por Barrera et al. (2012). De acordo com estes autores, o tratamento das linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) com uma associação de isotiocianatos (sulforafano e iberina) e selênio promoveram uma expressão mais elevada das enzimas tioredoxina redutase 1 e glutatona peroxidase, do que quando estes compostos foram testados isoladamente.

Li et al. (2012) também comprovaram a eficiência do sinergismo entre os isotiocianatos e o selênio, na qual a combinação do sulforafano com o selênio também

resultou em aumento da expressão da tioredoxina redutase 1, contribuindo para proteção mais eficiente contra danos oxidativos mediados por radicais livres em hepatócitos humanos. Quanto à influência do selênio na formação dos glicosinolatos em brócolis, Barickman, Kopsell e Sams (2014) observaram que a biofortificação dos vegetais com este mineral não alterou de forma significativa a formação destes compostos.

Os atuais fármacos quimioterápicos apresentam capacidade de induzir a citotoxicidade em células tumorais por meio de vários mecanismos. Porém, não apresentam resposta de forma específica, promovendo efeitos tóxicos em células normais, o que pode acarretar aos pacientes inúmeros efeitos colaterais. Dessa forma, é de extrema importância a busca por novas alternativas que reduzem estes efeitos (MACHADO, 2000; OLIVEIRA; ALVES, 2002)

Para que novos compostos com potencial anticâncer sejam descobertos, o primeiro passo a ser dado é a avaliação do seu desempenho em análises *in vitro*. Estes testes tem sido amplamente empregados nas pesquisas científicas, tendo a capacidade de avaliar um grande número de amostras em várias linhagens celulares, podendo ser realizados empregando-se diferentes metodologias, entre elas os métodos colorimétricos (HOUGHTON et al., 2007), como o escolhido para a realização dos testes do potencial antiproliferativo das amostras de brócolis.

Os testes *in vitro* realizados foram os primeiros passos dessa pesquisa, que teve como objetivo avaliar qual dos três estádios de maturação do brócolis biofortificados ou não com selênio poderiam apresentar potencial uso como agente anti-câncer. Dessa forma, mais estudos devem ser conduzidos a fim de avaliar de maneira detalhada os possíveis mecanismos de ação dos compostos bioativos do brócolis, juntamente com o selênio, a fim de comprovar a eficiência desta união no controle do câncer.

3 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos foram sugeridas as seguintes conclusões:

A biofortificação com selênio é eficaz, havendo acumulação deste elemento nos três estádios de maturação.

A biofortificação com selênio aumenta a quantidade de compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos brotos, mudas e inflorescências.

Os extratos brutos diclorometânicos de todas as amostras testadas apresentam atividade antiproliferativa.

O extrato bruto diclorometânico da amostra BS apresenta melhor atividade antiproliferativa que o BC.

Os extratos brutos diclorometânicos das amostras MS e MC têm atividade antiproliferativa próximas, com seletividade para a linhagem de rim (786-0).

O extrato bruto diclorometânico da amostra MC apresenta atividade antiproliferativa para linhagem de glioma (U251).

Os extratos brutos diclorometânicos das amostras IS e IC apresentaram fraca atividade antiproliferativa.

Os extratos brutos etanólicos de todas as amostras testadas não apresentam atividade antiproliferativa.

REFERÊNCIAS

- ABBAOUI, B.; RIEDL, K.M.; RALSTON, R.A.; THOMAS-AHNER, J.M.; SCHWARTZ, S. J.; CLINTON, S.K.; MORTAZAVI, A. Inhibition of bladder cancer by broccoli isothiocyanates sulforaphane and erucin: characterization, metabolism, and interconversion. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 56, n. 11, p. 1675–1687, Nov. 2012.
- AIRES, A.; FERNANDES, C.; CARVALHO, R.; BENNETT, R.N.; SAAVEDRA, M.J.; ROSA, E.A. Seasonal effects on bioactive compounds and antioxidant capacity of six economically important brassica vegetables. **Molecules**, Basel, v. 16, n. 8, p. 6816–32, Aug. 2011.
- AIRES, A.; ROSA, E.; CARVALHO, R. Effect of nitrogen and sulfur fertilization on glucosinolates in the leaves and roots of broccoli sprouts (*Brassica oleracea* var. *italica*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 86, p. 1512–1516, June 2006.
- ALSHATWI, A.A.; SHAFI, G.; HASAN, T.N.; AL-HAZZANI, A.A.; ALSAIF, A.M.; ALFAWAZ, A.M.; LEI, K.Y.; MUNSHI, A. Apoptosis-Mediated Inhibition of Human Breast Cancer Cell Proliferation by Lemon Citrus Extract. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, IIsan-ro, v. 12, n. 6, p. 1555–1559, 2011.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2008**. Atlanta, 2008. 68p.
- ANSONG, E.; YANG, W.; DIAMOND, A.M. Molecular cross-talk between members of distinct families of selenium containing proteins. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 58, n. 1, p. 117–123, Jan. 2014.
- ARAS, U.; GANDHI, Y.A.; MASSO-WELCH, P.A.; MORRIS, M.E. Chemopreventive and anti-angiogenic effects of dietary phenethyl isothiocyanate in an N-methyl nitrosourea-induced breast cancer animal model. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, Chichester, v. 34, n. 2, p. 98–106, Mar. 2013.
- ARES, A.M.; NOZAL, M.J.; BERNAL, J. Extraction, chemical characterization and biological activity determination of broccoli health promoting compounds. **Journal of chromatography**, Amsterdam, v. 25, n. 1313, p. 78–95, Oct. 2013.
- ARES, A.M.; NOZAL, M.J.; BERNAL, J.L.; BERNAL, J. Optimized extraction, separation and quantification of twelve intact glucosinolates in broccoli leaves. **Food Chemistry**, Barking, v. 152, p. 66–74, June 2014.
- ATKINSON, N.J.; DEW, T.P.; ORFILA, C.; URWIN, P.E. Influence of combined biotic and abiotic stress on nutritional quality parameters in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 17, p. 9673–9682, Sept. 2011.
- ÁVILA, F.W.; FAQUIN, V.; YANG, Y.; RAMOS, S.J.; GUILHERME, L.R.G.; THANNHAUSER, T.W.; LI, L. Assessment of the Anticancer Compounds Se-Methylselenocysteine and Glucosinolates in Se-Biofortified Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) Sprouts and Florets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 61, n. 26, p. 6216–6223, June 2013.

BAENAS, D.A. MORENO, C. GARCÍA-VIGUERA. Selecting sprouts of Brassicaceae for optimum phytochemical composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 60, n. 45, p. 11409–11420, Nov. 2012.

BARICKMAN, C.; KOPSELL, D.A.; SAMSA, C.E. IMPACT OF SELENIUM FERTILIZATION ON GLUCOSINOLATE CONCENTRATION IN ARABIDOPSIS THALIANA AND RAPID CYCLING BRASSICA OLERACEA. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 37, n. 3, p. 343-356, Jan. 2014.

BARILLARI, J.; CANISTRO, D.; PAOLINI, M.; FERRONI, F.; PEDULLI, G. F.; IORI, R.; VALGIMIGLI, L. Direct antioxidant activity of purified glucoerucin, the dietary secondary metabolite contained in rocket (*Eruca sativa* Mill.) seeds and sprouts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 7, p. 2475–2482, Apr. 2005.

BARRERA, L.N.; CASSIDY, A.; WANG, W.; WEI, T.; BELSHAW, N.J.; JOHNSON, I.T.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; BAO, Y. TrxR1 and GPx2 are potently induced by isothiocyanates and selenium, and mutually cooperate to protect Caco-2 cells against free radical-mediated cell death. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1823, n. 10, p. 1914-1924, Oct. 2012.

BEAVER, L.M.; YU, T.W.; SOKOLOWSKI, E.I.; WILLIAMS, D.E.; DASHWOOD, R.H.; HO, E. 3,3'-Diindolylmethane, but not indole-3-carbinol, inhibits histone deacetylase activity in prostate cancer cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 15, n. 3, p. 345–351, Sept. 2012.

BECK, M.A.; LEVANDER, O.A.; HANDY, J. Selenium deficiency and viral infection. **The Journal of nutrition**, Springfield, p. 133, n. 5, p. 1463S-7S, May 2003.

BECKER, C.; BROBERT, G.P.; JOHANSSON, S.; JICK, S.S.; MEIER, C.R. Cancer risk in association with Parkinson disease: a population-based study. **Parkinsonism & related disorders**, Kidlington, v. 16, n. 3, p. 186–190, Mar. 2010.

BENDICH, A. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. **Nutrition, National Academy Press**, Washington, 2001; v. 17, p. 364, 2001.

BERA, A.; GHOSH-CHOUDHURY, N.; DEY, N.; DAS, F.; KASINATH, B.S.; ABBOUD, H.E.; CHOUDHURY, G.G. NFκB-mediated cyclin D1 expression by microRNA-21 influences renal cancer cell proliferation. **Cellular signaling**, Oxford, v. 25, n. 12, p. 2575-2686, Dec. 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, July 1995.

BRASIL. Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 395p.

BROADLEY, M.R.; WHITE, P.J.; BRYSON, R.J.; MEACHAM, MC.; BOWEN, H.C.; JOHNSON, S.E.; HAWKESFORD, M.J.; MCGRATH, S.P.; ZHAO, F.J.; BREWARD, N.; HARRIMAN, M.; TUCKERA, M. The Proceedings of the Nutrition Society. **The Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 65, n. 2, p. 169-181, May. 2006.

BROWN, K.K.; HAMPTON, M.B. Biological targets of isothiocyanates. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1810, n. 9, p. 888-894, Sept. 2011.

BRUMMELL, D.A.; WATSON, L.M.; PATHIRANA, R.; JOYCE, N.I.; WEST, P.J.; HUNTER, D.A.; MCKENZIE, M.J. Biofortification of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit with the anticancer compound methylselenocysteine using a selenocysteine methyltransferase from a selenium hyperaccumulator. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 20, p. 10987–10994, Oct. 2011.

BRUMMER, M.; HAYES, S.; DAWSON, K.A.; LAWRENCE, L.M. Measures of antioxidant status of the horse in response to selenium depletion and repletion. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, n. 5, p. 2158–2168, May. 2013.

CARTEA, M.E.; FRANCISCO, M.; SOENGAS, P.; VELASCO, P. Phenolic Compounds in Brassica Vegetables. **Molecules**, Basel, v. 16, n. 1, p. 251-280, Dec. 2011.

CARTEA, M.E.; VELASCO, P.; OBREGÓN, S.; PADILLA, G.; DE HARO, A. Seasonal variation in glucosinolate content in Brassica oleracea crops grown in northwestern Spain. **Phytochemistry**, Oxford, v. 68, n. 2, p. 403-410, Jan. 2008.

CARTES, P.; GIANFREDA, L.; MORA, M.L. Uptake of selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenate and selenite forms. **Plant and Soil**, The Hague, v. 276, n. 1-2, p. 359–367, Oct. 2005.

CAVALHERI, V.; TAHIRAH, F.; NONOYAMA, M.; JENKINS, S.; HILL, K. Exercise training for people following lung resection for non-small cell lung cancer - A Cochrane systematic review. **Cancer Treatment Reviews**, London, v. 40, n. 4, p. 585-594, May 2014.

CBTRUS. CBTRUS Statistical Report: **Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004–2007**. Hinsdale, 2011. 27p.

CHAUDHARY, A.; SHARMA, U.; VIG, A.P.; SINGH, A.B.; ARORA, S. Free radical scavenging, antiproliferative activities and profiling of variations in the level of phytochemicals in different parts of broccoli (*Brassica oleracea italica*). **Food Chemistry**, Barking, v. 148, n. 2014, p. 373–380, Oct. 2014.

CHECLER, F.; ALVES- DA-COSTA, C. p53 in neurodegenerative diseases and brain cancers. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 142, n. 1, p. 99-113, Apr. 2014.

CHINEM, V.P.; MIOT, H.A. Epidemiology of basal cell carcinoma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Brasil, v. 86, n. 2, p. 292–305, Mar-Apr. 2011.

CISKA, E.; MARTYNIAK-PRZYBYSEWSKA, B.; KOZLOWSKA, H. Content of glucosinolates in cruciferous vegetables grown at the same site for two years under different climatic conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 7, p. 2862-2867, July 2000.

CLARKE, J.D.; HSU, A.; YU, Z.; DASHWOOD, R.H.; HO, E. Differential effects of sulforaphane on histone deacetylases, cell cycle arrest and apoptosis in normal prostate cells versus hyperplastic and cancerous prostate cells. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 55, n. 7, p. 999-1009, July 2011.

COHEN, S.D.; KENNEDY, J.A. Plant metabolism and the environment: implications for managing phenolics. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 50, n. 7, p. 620-643, Aug. 2010.

COMBS, G.F. Jr; CLARK, L.C.; TURNBULL, B.W. Reduction of cancer mortality and incidence by selenium supplementation. **Medizinische Klinik**, Munich, v. 92, n. 3, p. 42-45, Sept. 1997.

CONAWAY, C.C.; YANG, Y.M.; CHUNG, F.L. Isothiocyanates as cancer chemopreventive agents: their biological activities and metabolism in rodents and humans. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v. 3, n. 3, p. 233-255, June. 2002.

CRANDALL, K.; MAGUIRE, R.; CAMPBELL, A.; KEARNEY, N. Exercise intervention for patients surgically treated for Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A systematic review. **Surgical Oncology**, Oxford, v. 24, n. 14, p. 1-14, Jan. 2014.

DASTMALCHI, K.; FLORES, G.; PETROVA, V.; PEDRAZA-PENALOSA, P.; KENNELLY, E.J. Edible Neotropical Blueberries: Antioxidant and Compositional Fingerprint Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 59, n. 7, p. 3020-3026, Mar. 2011.

DAWOOD, S.; BROGLIO, K.; BUZDAR, A.U.; HORTOBAGYI, G.N.; GIORDANO, S.H. Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment: an institutional-based review. **Journal of clinical oncology**, New York, v. 28, n. 1, p. 92-98, Jan. 2010.

DHILLON, K.S.; DHILLON, S.K. Distribution and management of seleniferous soils. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 79, p. 119-184, June 2003.

DINKOVA-KOSTOVA, A.T.; KOSTOV, R.V. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. **Trends in Molecular Medicine**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 337-347, June 2012.

DOMÍNGUEZ-PERLES, R.; MORENO, D.A.; GARCÍA-VIGUERA, C. Analysis of the tumoral cytotoxicity of green tea-infusions enriched with broccoli. **Food Chemistry**, Barking, v. 132, p. 1197-1206, Nov. 2012.

DÖRR, A.J.; ABETE, M.C.; PREARO, M.; PACINI, N.; LA PORTA, G.; NATALI, M.; ELIA, A.C. Effects of selenium supplemented diets on growth and condition indexes in juvenile red swamp crayfish, *Procambarus clarkia*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 36, n. 2, p. 484-492, Sept. 2013.

DUTTA, R.K.; MAHARIA, R.S. Antioxidant responses of some common medicinal plants grown in copper mining areas. **Food Chemistry**, Barking, v. 131, n. 1, p. 259–265, Mar. 2012.

EL SAGHIR, N.S.; KHALIL, M.K.; EID, T.; EL KINGE, A.R.; CHARAFEDDINE, M.; GEARA, F.; SEOUD, M.; SHAMSEDDINE, A.I. Trends in epidemiology and management of breast cancer in developing Arab countries: a literature and registry analysis. **International Journal of Surgery**, London, v. 5, n. 4, p. 225-233, 2007.

EMBRAPA. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Fortaleza, 2007. 4p. Disponível em: <www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/Cot_128.pdf>. Acesso em: 10 out. 2013.

EMBRAPA. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Fortaleza, 2006. 4p. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/cot_125.pdf>. Acesso em: 11 out. 2013.

EUROLA, M.H.; EKHOLM, P.I.; YLINEN, M.E.; KOIVISTOINEN, P.E.; VARO, P.T. Selenium in Finnish foods after beginning the use of selenate supplemented fertilizers. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 56, p. 57–70, Jan. 1991.

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

FAIRWEATHER-TAIT, S.J.; BAO, Y.; BROADLEY, M.R.; COLLINGS, R.; FORD, D.; HESKETH, J.E.; HURST, R. Selenium in human health and disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, Larchmont, v. 14, n. 7, p. 1337–1383, Apr. 2011.

FERLAY, J.; SHIN, H.R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D.M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International journal of cancer**, New York, v. 127, n. 12, p. 2893–2917, Dec. 2010.

FERNÁNDEZ-LEÓN, M.F.; FERNÁNDEZ-LEÓN, A.M.; LOZANO, M.; AYUSO, M.C.; GONZÁLEZ-GÓMEZ, D. Altered commercial controlled atmosphere storage conditions for ‘Parhenon’ broccoli plants (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). Influence on the outer quality parameters and on the health-promoting compounds. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 50, p. 665-672, July, 2013.

FERREIRA, K.S.; GOMES, J.C.; BELLATO, C.R.; JORDÃO, C.P. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, v. 11, n. 3, p. 172-177, Mar. 2002.

FOUCHE, G.; CRAGG, G.M.; PILLAY, P.; KOLESNIKOVA, N.; MAHARAJ, V.J.; SENABE, J. In vitro anticancer screening of South African plants. **International Society for Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 119, n. 3, p. 455-461, Oct. 2008.

GONZAGA, C.M.; FREITAS-JUNIOR, R.; SOUZA, M.R.; CURADO, M.P.; FREITAS, N.M. Disparities in female breast cancer mortality rates between urban centers and rural areas of Brazil: Ecological time-series study. **Breast**, Edinburgh, v. 23, n. 2, p. 180-7, Apr. 2014.

GUO, Q.; GUO, L.; WANG, Z.; ZHUANG, Y.; GU, Z. Response surface optimization and identification of isothiocyanates produced from broccoli sprouts. **Food Chemistry**, Barking, v. 141, n. 3, p. 1580-1586, Dec. 2013.

GUO, R.; YUAN, G.; WANG, Q. Effect of sucrose and mannitol on the accumulation of health-promoting compounds and the activity of metabolic enzymes in broccoli sprouts. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 128, n. 3, p. 159–165, Apr. 2011.

GUPTA, K.; MILLER, J.D.; LI, J.Z.; RUSSELL, M.W.; CHARBONNEAU, C. Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): a literature review. **Cancer treatment reviews**, London, v. 34, n. 3, p. 193-205, May 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, Cambridge, v. 144, n. 5, p. 646-674, Mar. 2011.

HART, C.; COHEN, R.; NORWOOD, M.; STEBBING, J. The emerging harm of antioxidants in carcinogenesis. **Future Oncology**, London, v. 8, n. 5, p. 535–548, May 2012.

HATFIELD, D.L.; TSUJI, P.A.; CARLSON, B.A.; GLADYSHEV, V.N. Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 39, n. 3, p. 112-120, Mar. 2014.

HAYES, J.D.; McMAHON, M. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 34, n. 4, p. 176–188, Apr. 2009.

HEIDELBAUGH, J.J.; TORTORELLO, M. The adult well male examination. **American Family Physician**, Kansas City, v. 85, n. 10, p. 964–971, May. 2012.

HERRMANN, E.; BIERER, S.; WULFING, C. Update on systemic therapies of metastatic renal cell carcinoma. **World Journal of Urology**, Berlin, v. 28, n. 3, p. 303–309, June. 2010.

HOFFMAN, J.M.; SHAH, N.D.; VERMEULEN, L.C; DOLORESCO, F.; GRIM, P.; HUNKLER, R.J.; HONTZ, K.M.; SCHUMOCK, G.T. **American Journal of Health-System Pharmacy**, Bethesda, v. 65, n. 3, p. 234-253, Feb. 2008.

HOUGHTON, C.A.; FASSETT, R.G.; COOMBES, F.S. Sulforaphane: translational research from laboratory bench to clinic. **Nutrition Reviews**, New York, v. 71, n. 11, p. 709–726, Nov. 2013.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P.J.; LEE, C.C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, San Diego, v. 42, n. 4, p. 377-387, Aug. 2007.

INMAN, B.A.; HARRISON, M.R.; GEORGE, D.J. Novel immunotherapeutic strategies in development for renal cell carcinoma. **European Urology**, Basel, v. 63, n. 5, p. 881–889, May. 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativas 2012, Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2011. 118p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro, 2012. 129p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2014, Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2014. 122p.

IZUTANI, Y.; YOGOSAWA, S.; SOWA, Y.; SAKAI, T. Brassinin induces G1 phase arrest through increase of p21 and p27 by inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in human colon cancer cells. **International Journal of Oncology**, London, v. 40, n. 3, p. 816-824, Mar. 2012.

JACKSON, M.J.; BROOME, C.S.; MCARDLE, F. Marginal dietary selenium intakes in the UK: are there functional consequences? **The Journal of nutrition**, Springfield, v. 133, n. 5, p. 1557S-9S, May. 2003.

JAISWAL, A.K.; ABU-GHANNAM, N.; GUPTA, S. A comparative study on the polyphenolic content, antibacterial activity and antioxidant capacity of different solvent extracts of Brassica oleracea vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 223–231, Feb. 2012.

JURATLI, T.A.; SCHACKERT, G.; KREX, D. Current status of local therapy in malignant gliomas - a clinical review of three selected approaches. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 139, n. 3, p. 341-58, Sept. 2013.

KARIN, M.; GRETEN, F.R. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nature reviews. Immunology**, London, v. 5, n. 10, p. 749-759, Oct. 2005.

KAULMANN, A.; JONVILLE, M.C.; SCHNEIDER, Y.J.; HOFFMANN, L.; BOHN, T. Carotenoids, polyphenols and micronutrient profiles of Brassica oleraceae and plum varieties and their contribution to measures of total antioxidant capacity. **Food Chemistry**, Barking, v. 155, p. 240–250, Jan. 2014.

KEEHAN, S.; SISKI, A.; TRUFFER, C.; SMITH, S.; COWAN, C.; POISAL, J.; CLEMENS, M.K. Health spending projections through 2017: The baby-boom generation is coming to Medicare. **Health affairs**, Millwood, v. 27, n. 2, p. 145-155, Mar-Apr. 2008.

KIELISZEK, M.; BŁAŻEJAK, S. Selenium: significance, and outlook for supplementation. **Nutrition**, London, v. 29, n. 5, p. 713–718, May. 2013.

KIM, H.C.; OH, S.A. Noncommunicable Diseases: Current Status of Major Modifiable Risk Factors in Korea. **Journal of Preventive Medicine and Public Health**, Gyeongju, v. 46, n. 4, p. 165-71, July 2013.

- KLAASSEN, C.D.; REISMAN, S.A. Nrf2 to the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 244, n. 1, p. 57–65, Apr. 2010.
- KOROLEVA, O.A.; GIBSON, T.M.; CRAMER, R.; STAIN, C. Glucosinolate-accumulating S-cells in Arabidopsis leaves and flower stalks undergo programmed cell death at early stages of differentiation. **The Plant Journal**, Oxford, v. 64, n. 3, p. 456–69, Nov. 2010.
- KOVACIK, J.; KLEJDUS, B. Dynamics of phenolic acids and lignin accumulation in metal-treated *Matricaria chamomilla* roots. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, n. 3, p. 605–615, Mar. 2008.
- KUMAR, B.S.; KUNWAR, A.; SINGH, B.G.; AHMAD, A.; PRIYADARSINI, K.I. Anti-hemolytic and peroxy radical scavenging activity of organoselenium compounds: an in vitro study. **Biological Trace Element Research**, London, v. 140, n. 2, p. 127–138, May. 2011.
- KUMARA, B.S.; PRIYADARSINI, K.I. Selenium nutrition: How important is it? **Biomedicine & Preventive Nutrition**, London, Feb. 2014. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2210523914000075#>>. Acesso em: 28 abr. 2014.
- KUNWAR, A.; JAIN, V.K.; PRIYADARSINI, K.I.; HASTON, C.K. A selenocysteine derivative therapy affects radiation-induced pneumonitis in the mouse. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, New York, v. 49, n. 4, p. 654–661, Oct. 2013.
- KUNWAR, A.; MISHRA, B.; BARIK, A.; KUMBHARE, L.B.; PANDEY, R.; JAIN, V.K. PRIYADARSINI, K.I. 3,3(-diselenodipropionic acid, an efficient peroxy radical scavenger and a GPx mimic, protects erythrocytes (RBCs) from AAPH-induced hemolysis. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 20, n. 10, p. 1482–1487, Oct. 2007.
- KURILICH, A.C.; JEFFERY, E.H.; JUVIK, J.A.; WALLIG, M.A.; KLEIN, B.P. Antioxidant capacity of different broccoli (*Brassica oleracea*) genotypes using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 18, p. 5053– 5057, Aug. 2002.
- KWAK, M.K.; KENSLER, T.W. Targeting NRF2 signaling for cancer chemoprevention. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 244, n. 1, p. 66–76, Apr. 2010.
- LAI, K.C.; HSU, S.C.; KUO, C.L.; IP, S.W.; YANG, J.S.; HSU, Y.M.; HUANG, H.Y.; WU, S.H.; CHUNG, J.G. Phenethyl Isothiocyanate Inhibited Tumor Migration and Invasion via Suppressing Multiple Signal Transduction Pathways in Human Colon Cancer HT29 Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 20, p. 11148–11155, Sept. 2010.
- LATTÉ, K.P.; APPEL, K.E.; LAMPEN, A. Health benefits and possible risks of broccoli – An overview. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 49, n. 12, p. 3287–3309, Dec. 2011.

LAWLER, S.E.; CHIOCCA, E.A. **Genomic and Personalized Medicine**. 2 th ed. New York: Elsevier, 2013. 764p.

LEE, Y.R.; NOH, E.M.; HAN, J.H.; KIM, J.M.; HWANG, B.M.; KIM, B.S.; LEE, S.H.; JUNG, S.H.; YOUN, H.J.; CHUNG, E.Y.; KIM, J.S. Sulforaphane controls TPA-induced MMP-9 expression through the NF- κ B signaling pathway, but not AP-1, in MCF-7 breast cancer cells. **BMB Reports**, Seoul, v. 46, n. 4, p. 201-206, Apr. 2013.

LI, D.; WANG, W.; SHAN, Y.; BARRERA, L.N.; HOWIE, A.F.; BECKETT, G.J.; WU, K.; BA, Y. Synergy between sulforaphane and selenium in the up-regulation of thioredoxin reductase and protection against hydrogen peroxide-induced cell death in human hepatocytes. **Food Chemistry**, Barking, v. 133, n. 2, p. 300–307, July 2012.

LI, S.H.; FU, J.; WATKINS, D.N.; SRIVASTAVA, R.K.; SHANKAR, S. Sulforaphane regulates self-renewal of pancreatic cancer stem cells through the modulation of Sonic hedgehog–GLI pathway. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 373, n. 1/2, p. 217–227, Jan. 2013.

LJUNGBERG, B.; COWAN, N.C.; HANBURY, D.C.; HORA, M.; KUCZYK, M.A.; MERSEBURGER, A.S.; PATARD, J.J.; MULDER, P.F.; SINESCU, I.C.; EUROPEAN ASSOCIATION OF UROLOGY GUIDELINE GROUP. EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update. **European urology**, Basel, v. 58, n. 3, p. 398–406, Sept. 2010.

LOMAS, A.; LEONARDI-BEE, J.; BATH-HEXTALL, F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. **The British Journal of Dermatology**, Oxford, v. 166, n. 5, p. 1069-1080, May. 2012.

LOUIS, D.N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O.D.; CAVENEE, W.K.; BURGER, P.C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B.W.; KLEIHUES, P. The 2007 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous. **Acta Neuropathologica**, New York, v. 114, n. 2, p. 97–109, Aug. 2007.

MA, W.; BRENNER, D.; WANG, W.; DAUBER, B.; EHRHARDT, C.; HÖGNER, K.; HEROLD, S.; LUDWIG, S.; WOLFF, T.; YU, K.; RICHT, J.A.; PLANZ, O.; PLESCHKA, S. The NS-segment of an H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) is sufficient to alter Replication Efficiency, cell tropism and host range of an H7N1 HPAIV. **Journal of Virology**, Washington, v. 84, n. 4, p. 2122-2133, Feb. 2010.

MACHADO, A.E.D. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 237-243, Apr. 2000.

MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, G.B.; GÓMEZ, P.A.; GARCÍA-TALavera, N.V.; ARTÉS-HERNÁNDEZ, F.; MONEDERO-Saiz, T.; SÁNCHEZ-ÁLVAREZ, C.; ARTÉS, F. Human metabolic fate of glucosinolates from kailan-hybrid broccoli. Differences between raw and microwaved consumption. **Food Research International**, Barking, v. 53, n. 1, p. 403–408, Aug. 2013.

MCCANN, J.C.; AMES, B.N. Adaptive dysfunction of selenoproteins from the perspective of the triage theory: why modest selenium deficiency may increase risk of diseases of aging. **FASEB journal**, Bethesda, v. 25, n. 6, p. 1793-1814, Jun. 2011.

MELCHINI, A.; TRAKA, M.H.; CATANIA, S.; MICELI, N.; TAVIANO, M.F.; MAIMONE, P.; FRANCISCO, M.; MITHEN, R.F.; COSTA, C. Antiproliferative Activity of the Dietary Isothiocyanate Erucin, a Bioactive Compound from Cruciferous Vegetables, on Human Prostate Cancer Cells. **Nutrition and Cancer**, United States, v. 65, n. 1, p. 132-138, 2013.

MEROPOL, N.J.; SCHRAG, D.; SMITH, T.J.; MULVEY, T.M.; LANGDON JR, R.M.; BLUM, D.; UBEL, P.A.; SCHNIPPER, L.E. American Society of Clinical Oncology Guidance Statement: The Cost of Cancer Care. **Journal of clinical oncology**, New York, v. 27, n. 23, p. 3868-3874, Aug. 2009.

MEYER, M.; ADAM, M.S. Comparison of glucosinolate levels in commercial broccoli and red cabbage from conventional and ecological farming. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 226, n. 6, p. 1429–1437, Apr. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER. COORDENAÇÃO NACIONAL DE CONTROLE DE TABAGISMO - CONTAPP. **Falando Sobre Câncer e Seus Fatores de Risco**. Rio de Janeiro:editora, 1996. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319>. Acesso em: 28 abr. 2014.

MISHRA, J.; DRUMMOND, J.; QUAZI, S.H.; KARANKI, S.S.; SHAW, J.J.; CHEN, B.; KUMAR, N. Prospective of colon cancer treatments and scope for combinatorial approach to enhanced cancer cell apoptosis. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Boca Raton, v. 86, n. 3, p. 232-250, June 2013.

MITHEN, R.F.; DEKKER, M.; VERKERK, R.; RABOT, S.; JOHNSON, I.T. The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, n. 7, p. 967–984, May. 2000.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 83, n. 11, p. 757-766, June 1991.

MÜLLER, L.; FRÖHLICH, K.; BÖHM, V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (aTEAC), DPPH assay and peroxyl radical scavenging assay. **Food Chemistry**, Barking, v. 129, n. 1, p. 139-148, Nov. 2011.

MUSICCO, M.; ADORNI, F.; Di SANTO, S.; PRINELLI, F.; PETTENATI, C.; CALTAGIRONE, C.; PALMER, K.; RUSSO, A. Inverse occurrence of cancer and Alzheimer disease: a population-based incidence study. **Neurology**, Minneapolis, v. 81, n. 4, p. 322–328, July. 2013.

NAVARRO, S.L.; LI, F.; LAMPE, J.W. Mechanisms of action of isothiocyanates in cancer chemoprevention: an update. **Food & Function**, Cambridge, v. 2, n. 10, p. 579-587, Oct. 2011.

NAVARRO-ALARCON, M.; CABRERA-VIQUE, C. Selenium in food and the human body: a review. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 400, n. 1/3, p. 115–141, Aug. 2008.

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**, New York, v. 198, n. 1, p. 40-48, July. 2004.

NITURE, S.K.; KASPAR, J.W.; SHEN, J.; JAISWAL, A.K. Nrf2 signaling and cell survival. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 244, n. 1, p. 37–42, Apr. 2010.

OLIVEIRA, R.B.; ALVES, R.J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6, p. 976-984, Fev. 2002.

ÖZTÜRK, M. Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. **Food Chemistry**, Barking, v.134, n. 1, p. 48–54, Sept. 2012.

PAJA, K. P.; SOCHA, R.; GALKOWSKA, D.; ROZNOWSKI, J.; FORTUNA, T. Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. **Food Chemistry**, Barking, v. 143, p. 300–306, Jan. 2014.

PALTRIDGE, N.G.; MILHAM, P.J.; ORTIZ-MONASTERIO, J.I.; VELU, G.; YASMIN, Z.; PALMER, L.J.; GUILD, G.E.; STANGOULIS, J.C.R. Energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry as a tool for zinc, iron and selenium analysis in whole grain wheat. **Plant and Soil**, The Hague, v. 361, n. 1/2, p. 261-269, Dec. 2012.

PASCUAL, D.; BORQUE, A. Epidemiology of kidney cancer. **Advances in urology**, Cairo, v. 4, p. 782–831, Nov. 2008.

PAYETTE, M.J.; WHALEN, J.; GRANT-KELS, J.M. Nutrition and nonmelanoma skin cancers. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 28, n. 6, p. 650-62, Nov-Dec. 2010.

PÉREZ-BALIBREA, S.; MORENO, D.A.; GARCÍA-VIGUERA, C. Genotypic effects on the phytochemical quality of seeds and sprouts from commercial broccoli cultivars. **Food Chemistry**, Barking, v. 125, n. 2, p. 348–354, Mar. 2011.

PFaffenroth, E.C.; LINEHAN, W.M. Genetic basis for kidney cancer: opportunity for disease-specific approaches to therapy. **Expert Opinion on Biological Therapy**, London, v. 8, n. 6, p. 779–790, June 2008.

PILON-SMITS, E.A.H.; QUINN, C.F. Selenium metabolism in plants. In: HELL, R.; MENDEL, R.R. **Cell Biology of Metals and Nutrients**. Heidelberg: Plant Cell Monographs, 2010. p. 225–241.

POGHOSYAN, H.; SHELDON, L.K.; LEVEILLE, S.G.; COOLEY, M.E. Health-related quality of life after surgical treatment in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review. **Lung Cancer**, Amsterdam, v. 81, n.1, p. 11-26, June 2013.

RAMOS, S.J. **BIOFORTIFICAÇÃO, VARIAÇÃO GENOTÍPICA E METABOLISMO ENVOLVENDO Se EM PLANTAS DE ALFACE E BRÓCOLIS**. 2011. 115p. Tese (Doutorado em Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

RAMOS, S.J.; FAQUIN, V.; GUILHERME, L.R.G.; CASTRO, E.M.; AVILA, F.W.; CARVALHO, G.S.; BASTOS, C.E.A.; OLIVEIRA, C. Selenium biofortification and antioxidante activity in lettuce plants feed with selenate and selenite. **Plant Soil Environmental** Slezská, v. 56, n. 12, p. 583–587, July. 2011a.

RAMOS, S.J.; FAQUIN, V.; GUILHERME, L.R.G.; CASTRO, E.M.; AVILA, F.W.; CARVALHO, G.S.; BASTOS, C.E.A.; OLIVEIRA, C. Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. **Plant, Soil and Environment**, Slezská, v. 56, n. 12, p. 584–588, May 2010.

RAMOS, S.J.; RUTZKE, M.A.; HAYES, R.J.; FAQUIN, V.; GUILHERME, L.R.G.; LI, L. Selenium accumulation in lettuce germplasm. **Planta**, Berlim, v. 233, n. 4, p. 649–660, Apr. 2011b.

RAMOS, S.J.; YUAN, Y.X.; FAQUIN, V.; GUILHERME, L.R.G.; LI, L. Evaluation of genotypic variation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) in response to selenium treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 8, p. 3657–3665, Apr. 2011c.

RATZKA, A.; VOGEL, H.; DANIEL, D.; KLIEBENSTEIN, J.; MITCHELL-OLDS, T.; KROYMANN, J. Disarming the mustard oil bomb. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 17, p. 1223–1228, June 2002.

RAYMAN, M.P. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 100, n. 2, p. 254–268, Aug. 2008.

RAYMAN, M.P. Selenium and human health. **The Lancet**, London, v. 379, n. 9822, p. 1256–1268, Mar-Apr. 2012.

RAYMAN, M.P.; INFANTE, H.G.; SARGENT, M. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 100, n. 2, p. 238–253, Aug. 2008.

RAZIS, A.F.A.; NOOR, N.M. Cruciferous Vegetables: Dietary Phytochemicals for Cancer Prevention. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Bangkok, v. 14, n. 3, p.1565–1570, June 2013.

REID, M.E.; DUFFIELD-LILLICO, A.J.; SLATE, E.; NATARAJAN, N.; TURNBULL, B.; JACOBS, E.; COMBS, G.F. Jr, ALBERTS, D.S.; CLARK, L.C.; MARSHALL, Jr. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v. 60, n. 2, p. 155–63, Jan. 2008.

RINI, B.I.; CAMPBELL, S.C.; ESCUDIER, B. Renal cell carcinoma. **Lancet**, London, v. 373, n. 9669, p. 1119–1132, Mar. 2009.

ROBBINS, R.J.; KECK, A.S.; BANUELOS, G.; FINLEY, J.W. Cultivation conditions and selenium fertilization alter the phenolic profile, glucosinolate, and sulforaphane content of broccoli. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 8, n. 2, p. 204-214, 2005.

ROGERS, H.W.; WEINSTOCK, M.A.; HARRIS, A.R.; HINCKLEY, M.R.; FELDMAN, S.R.; FLEISCHER, A.B.; COLDIRON, B.M. Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer in the United States, 2006. **Archives of Dermatology**, Chicago, v. 146, n. 3, p. 283-7, Mar. 2010.

ROGINSKI, D.A.; CARVAJAL, M.; LÓPEZ-BERENGUER, C.; GARCÍA-VIGUERA, C. Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, Oxford, v. 4, n.5, p. 1508-1522, Aug. 2005.

ROMAN, M.; JITARU, P.; BARBANTE, C. Selenium biochemistry and its role for human health. **Metallomics**, Cambridge, v. 6, n. 1, p. 25-54, Jan. 2014.

ROSS, K.A.; BETA, T.; ARNTFIELD, S.D. A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. **Food Chemistry**, Barking, v. 113, n. 1, p. 336-344, Mar. 2009.

SAMEC, D.; PILJAC-ZAGARAC, J.; BOGOVIC, M.; HABJANIC, K.; GRUZ, J. Antioxidant potency of white (*Brassica oleracea* L. var. capitata) and Chinese (*Brassica rapa* L. var. pekinensis (Lour.)) cabbage: The influence of development stage, cultivar choice and seed selection. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 128, n. 2, p. 78-83, Mar. 2011.

SCHÄSSBURGER, K.U.; LÖFGREN, L.; LAGERSTEDT, U.; LEIFLAND, K.; THORNEMAN, K.; SANDSTEDT, B.; AUER, G.; WIKSELL, H. Minimally-invasive treatment of early stage breast cancer: A feasibility study using radiofrequency ablation under local anesthesia. **Breast**, Edinburgh, v. 23, n. 2, p. 152-158, Apr. 2014.

SCHERR, A.J.; LIMA, J.P.; SASSE, E.C.; LIMA, C.S.; SASSE, A.D. Adjuvant therapy for locally advanced renal cell cancer: a systematic review with meta-analysis. **BMC Cancer**, London, v. 31, n. 11, p. 115, Mar. 2011.

SCHRADER, A.J.; HOFMANN, R. Metastatic renal cell carcinoma: recent advances and current therapeutic options. **Anticancer Drugs**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 235-245, Mar. 2008.

SCHUETTE, H.L.; TUCKER, T.C.; BROWN, M.L.; POTOSKY, A.L.; SAMUEL, T. The costs of cancer care in the United States: implications for action. **Oncology**, New York, v. 9, n. 11, p. 19-22, Nov. 1995.

SCHWARZ, K.; FOLTZ, C.M. Factor 3 activity of selenium compounds. **Nutrition Reviews**, New York, v. 47, n. 4, p. 108-110, Apr. 1989.

SEERAM, N.P.; ADAMS, L.S.; ZHANG, Y.; LEE, R.; SAND, D.; SCHEULLER, H.S.; HEBER, D. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 25, p. 9329-39, Dec. 2006.

SHAPIRO, T.A.; FAHEY, J.W.; WADE, K.L.; STEPHENSON, K.K.; TALALAY, P. Human metabolism an excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v. 7, n. 12, p. 1091–1100, Dec. 1998.

SHARMA, S.; BANSAL, A.; DHILLON, S.K.; DHILLON, K.S. Comparative effects of selenate and selenite on growth and biochemical composition of rapeseed (*Brassica napus* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 329, n. 1/2, p. 339–348, Apr. 2010.

SHER, T.; DY, G.K.; ADJEI, A.A. Small cell lung cancer. **Mayo Clinic proceedings**, Rochester, v. 83, n. 3, p. 355–367, Mar. 2008.

SIGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, n. 3, p. 144–158, Feb. 1965.

SOENGAS, P.; CARTEA, M.E.; FRANCISCO, M.; SOTELO, T.; VELASCO, P. New insights into antioxidant activity of Brassica crops. **Food Chemistry**, Barking, v. 134, n. 2, p. 725–733, Sept. 2012.

SORS, T.G.; ELLIS, D.R.; SALT, D.E. Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. **Photosynthesis Research**, Hague, v. 86, n. 3, p. 373–389, Dec. 2005.

SUZUKI, H.; HIRASHIMA, T.; KOBAYASHI, M.; SASADA, S.; OKAMOTO, N.; TAMIYA, M.; MATSUURA, Y.; MORISHITA, N.; UEHARA, N.; MATSUI, K.; KAWASE, I. Prognosis of small-cell lung cancer since the introduction of amrubicin. **Medical oncology**, Northwood, v. 28, n. 4, p. 1430–1435, Dec. 2011.

SZYMONIK-LESIUK, S.; CZECHOWSKA, G.; STRYJECKA-ZIMMER, M.; SŁOMKA, M.; MADRO, A.; CELIŃSKI, K.; WIELOSZ, M. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. **Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery**, Tokyo, v. 10, n. 4, p. 309–315, Jan. 2003.

TALALAY, P.; BATZINGER, R.P.; BENSON, A.M.; BUEDING, E.; CHA, Y.N. Biochemical studies on the mechanisms by which dietary antioxidants suppress mutagenic activity. **Advances in Enzyme Regulation**, Oxford, v. 17, p. 23–36, Nov. 1978.

TERRY, N.; ZAYED, A.M.; De SOUZA, M.P.; TARUN, A.S. Selenium in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, p. 401–432, June 2000.

TEZOTTO, T.; FAVARIN, J.L.; NETO, A.P.; GRATÃO, P.L.; AZEVEDO, R.A.; MAZZAFERA, P. Simple procedure for nutrient analysis of coffee plant with energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry (EDXRF). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, n. 4, p. 263–267, July-Aug. 2013.

THOMSON, C.D. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 58, n. 3, p. 391–402, Mar. 2004.

TSE, G.; ESLICK, G.D. Cruciferous vegetables and risk of colorectal neoplasms: a systematic review and meta-analysis. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v. 66, n. 1, p. 128-39, Dec. 2014.

VENDRAMINI-COSTA, D.B.; CARVALHO, J.E. Molecular Link Mechanisms between Inflammation and Cancer. **Current Pharmaceutical Design**, Netherlands, v. 18, n. 26, p. 3831-3852, May 2012.

VERMEULEN, M.; BOERBOOM, A.M.; BLANKVOORT, B.M.; AARTS, J.M.; RIETJENS, I.M.; Van BLADEREN, P.J.; VAES, W.H. Potency of isothiocyanates to induce luciferase reporter gene expression via the electrophile-responsive element from murine glutathione S-transferase Ya. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 617–621, June 2009.

VIG, A.P.; RAMPAL, G.; THIND, T.S.; ARORA, S. Bio-protective effects of glucosinolates – A review. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 42, n. 10, p. 1561–1572, Dec. 2009.

WANG, S.; ZHU, F.; MECKLING, K.A.; MARCONE, M.F. Antioxidant capacity of food mixtures is not correlated with their antiproliferative activity against MCF-7 breast cancer cells. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 16, n. 12, p. 1138-1145, Dec. 2013.

WEINBERG, R.A. **A biologia do câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2008. 864p.

WHITE, P.J.; BOWEN, H.C.; PARMAGURU, P.; FRITZ, M.; SPRACKLEN, W.P.; SPIBY, R.E.; MEACHAM, M.C.; MEAD, A.; HARRIMAN, M.; TRUEMAN, L.J.; SMITH, B.M.; THOMAS, B.; BROADLEY, M.R. Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 404, p. 1927–1937, Aug. 2004.

WILLIAMS, D.J.; CRITCHLEY, C.; PUN, S.; CHALIHA, M.; O'HARE, T.J. Differing mechanisms of simple nitrile formation on glucosinolate degradation in *Lepidium sativum* and *Nasturtium officinale* seeds. **Phytochemistry**, Oxford, v. 70, n. 11-12, p. 1401-1409, July-Aug. 2009.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 37, n. 2, p. 99-105, June 1998.

YAMASHITA, Y.; YAMASHITA, M. Identification of a novel selenium-containing compound, selenoneine, as the predominant chemical form of organic selenium in the blood of bluefin tuna. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 285, n. 24, p. 18134–18138, June 2010.

YOUSSEF, K.K.; Van KEYMEULEN, A.; LAPOUGE, G.; BECK, B.; MICHAUX, C.; ACHOURI, Y.; SOTIROPOULOU, P.A.; BLANPAIN, C. Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. **Nature Cell Biology**, London, v. 12, n. 3, p. 299–305, Mar. 2010.

YUAN, G.; WANG, X.; GUO, R.; WANG, Q. Effect of salt stress on phenolic compounds, glucosinolates, myrosinase and antioxidant activity in radish sprouts. **Food Chemistry**, Barking, v. 121, n. 4, p. 1014–1019, Aug. 2010.

ZHANG, Q.; PI, J.; WOODS, C.G.; ANDERSEN, M.E. A systems biology perspective on Nrf2-mediated antioxidant response. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 244, n. 1, p. 84–97, Apr. 2010.

ZHU, H.; JIA, Z.; STROBL, J.S.; EHRLICH, M.; MISRA, H.P.; LI, Y. Potent induction of total cellular and mitochondrial antioxidants and phase 2 enzymes by cruciferous sulforaphane in rat aortic smooth muscle cells: cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. **Cardiovascular Toxicology**, Totowa, v. 8, n. 3, p. 115–125, July. 2008.