

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

FACULDADE DE AGRONOMIA “ELISEU MACIEL”

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



Tese de doutorado

Screening biológico de extrato de brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*) não encapsulado e encapsulado por *electrospraying*

Marjana Radünz

Pelotas, outubro de 2020

MARJANA RADÜNZ

Screening biológico de extrato de brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*) não encapsulado e encapsulado por *electrospraying*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de orientação – Prof.^a Dr.^a Eleessandra da Rosa Zavareze
– Prof.^a Dr.^a Francieli Moro Stefanello

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R124s Radünz, Marjana

Screening biológico de extrato de brócolis (*brassica oleracea* l. var. *italica*) não encapsulado e encapsulado por electrospraying / Marjana Radünz ; Elessandra da Rosa Zavareze, orientadora ; Francieli Moro Stefanello, coorientadora. — Pelotas, 2020.

150 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Brócolis - Extrato - Cápsula. 2. Compostos fenólicos .
3. Glicosinolatos. I. Zavareze, Elessandra da Rosa, orient. II. Stefanello, Francieli Moro, coorient. III. Título.

CDD : 664

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Elessandra da Rosa Zavareze (orientadora)

Prof.^a Dr.^a Francieli Moro Stefanello

Prof.^a Dr.^a Rosana Colussi

Prof.^a Dr.^a Dianini Hüttner Kringel

Dr.^a Helen Cristina dos Santos Hackbart

Data de defesa: 05 de outubro de 2020

Dedicatória

Dedico a minha família

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais Sony e Leonida por sempre me incentivarem nessa caminhada;

Ao meu irmão André, por todo auxílio e motivação;

A minha orientadora, Eleessandra da Rosa Zavareze e a minha coorientadora Francieli Moro Stefanello por todo auxílio, paciência e aprendizados;

Aos meus queridos amigos, Taiane, Helen, Camila, Elisa e Jardel por estarem sempre comigo, deixando essa caminhada mais leve;

Ao João Pedro, Natália Bona e a Nathalia Pedra por todo o auxílio nas análises;

A Central Analítica da UFPel e ao Centro de Microscopia Eletrônica da Zona Sul da FURG pelas análises realizadas;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos e a Universidade Federal de Pelotas pela possibilidade de realizar esta tese;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela concessão da bolsa de doutorado;

A todos os outros que de uma maneira ou outra contribuíram para a concretização deste trabalho, deixo meu muito obrigada.

“Feliz aquele que transfere o que sabe, e aprende o que ensina”

(Cora Coralina)

Resumo

RADÜNZ, Marjana. Screening biológico de extrato de brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*) não encapsulado e encapsulado por *electrospraying*. 2020. 150f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

As doenças crônicas não transmissíveis são um grave problema de saúde pública, devido ao alto grau de morbimortalidade, destacando-se a diabetes mellitus tipo II, cânceres e doenças neuroinflamatórias. Assim, surge a necessidade do desenvolvimento de alternativas naturais para a prevenção e o controle destas doenças. O brócolis apresenta em sua composição compostos fenólicos e glicosinolatos, que possuem diversos efeitos biológicos, como ação antioxidante, antimicrobiana, antihiperglicêmica e antitumoral. Apesar de seus benefícios, estes compostos são muito instáveis a temperaturas elevadas e alterações de pH, sendo assim, surge a necessidade de sua encapsulação a fim de melhorar a sua biodisponibilidade. Desta forma, o objetivo do trabalho foi encapsular extrato de brócolis pelas técnicas de *electrospinning/electrospraying* e realizar um screening biológico do extrato não encapsulado e do extrato encapsulado por *electrospraying*. A cápsula produzida por *electrospraying* que apresentou as melhores características foi avaliada quanto as suas atividades antioxidante, antimicrobiana, antihiperglicemiante, atividade antitumoral frente a tumor de glia e atividade neuroprotetora *in vitro*. Os extratos encapsulado e não encapsulado foram submetidos a simulação de digestão e avaliados quanto ao perfil antioxidante e antihiperglicemiante. O extrato de brócolis apresentou em sua composição glicosinolatos e compostos fenólicos. A técnica de *electrospinning* produziu fibras e a de *electrospraying* produziu cápsulas com morfologia lisa, alta eficiência de encapsulação e boa estabilidade térmica. A cápsula com adição de 50% de extrato em relação a zeína apresentou as melhores características e foi escolhida para a avaliação das atividades biológicas. O extrato de brócolis encapsulado e o não encapsulado apresentaram atividade antioxidante frente aos radicais DPPH e hidroxila, não sendo detectada atividade frente ao radical óxido nítrico. O extrato de brócolis apresentou halo de inibição frente a *S. aureus*, *E. coli* e *S. Typhimurium*, e ausência de inibição de *L. monocytogenes*, as concentrações testadas não foram bactericidas. Os extratos encapsulado e não encapsulado apresentaram alta inibição da enzima α -amilase e moderada inibição da α -glicosidase. A simulação da digestão demonstrou que os compostos são degradados e tem sua concentração reduzida ao longo do processo digestório, o que impactou significativamente em sua atividade antioxidante e antihiperglicemiante. O extrato e a cápsula apresentaram efeito antitumoral frente a linhagem celular de glioma, não demonstrando toxicidade em cultura primária de astrócitos, além disto, apresentaram efeito neuroprotetor em astrócitos expostos ao lipopolissacarídeo, atuando na diminuição das espécies reativas de oxigênio e preservando a atividade de enzimas antioxidantes. A técnica de *electrospinning/electrospraying* foi eficiente para a proteção dos compostos presentes no extrato de brócolis. Os extratos encapsulado e não encapsulado apresentaram efeitos antioxidantes, antihiperglicemiantes, antitumorais e neuroprotetores, podendo atuar no controle de doenças crônicas não transmissíveis.

Palavras-chave: glicosinolatos, antimicrobiano, antihiperglicemiante, antitumoral, antioxidante

Abstract

RADÜNZ, Marjana. Biological screening of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*) extract unencapsulated and encapsulated by electrospraying. 2020. 150f. Thesis (Doctorate in Food Science and Technology) - Graduate Program in Food Science and Technology. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2020.

Chronic non-communicable diseases are a serious public health problem, due to the high degree of morbidity and mortality, especially type II diabetes mellitus, cancers, and neuroinflammatory diseases. Thus, there is a need to develop natural alternatives for the prevention and control of these diseases. Broccoli has glucosinolate and phenolic compounds in its composition, which have several biological effects, such as antioxidant, antimicrobial, antihyperglycemic, and antitumor action. Despite their benefits, these compounds are very unstable at elevated temperatures and pH changes, so there is a need for encapsulation in order to improve their bioavailability. Thus, the objective of the work was to encapsulate broccoli extract by electrospinning/electrospraying techniques and to perform a biological screening of the unencapsulated extract and the encapsulated extract by electrospraying. The capsule produced by electrospraying that showed the best characteristics was evaluated for its antioxidant, antimicrobial, antihyperglycemic, antitumor activity against glioma cell line, and neuroprotective activity in vitro. The encapsulated and non-encapsulated extracts were subjected to digestion simulation and evaluated for antioxidant and antihyperglycemic profile. The broccoli extract presented glucosinolates and phenolic compounds in its composition. The electrospinning technique produced fibers and the electrospraying technique produced capsules with smooth morphology, high encapsulation efficiency, and good thermal stability. The capsule with the addition of 50% of extract in relation to zein presented the best characteristics and was chosen for the evaluation of biological activities. The encapsulated and unencapsulated broccoli extract showed antioxidant activity against DPPH and hydroxyl radicals, with no activity detected against the nitric oxide radical. The broccoli extract showed an inhibition halo against *S. aureus*, *E. coli*, and *S. Typhimurium*, and the absence of inhibition of *L. monocytogenes*, the tested concentrations were not bactericidal. The encapsulated and unencapsulated extracts showed high inhibition of the α -amylase enzyme and moderate inhibition of α -glucosidase. The simulation of digestion demonstrated that the compounds are degraded and their concentration is reduced throughout the digestive process, which significantly impacted their antioxidant and antihyperglycemic activity. The extract and the capsule had an antitumor effect against the glioma cell line, showing no toxicity in primary astrocyte culture, in addition, they had a neuroprotective effect in astrocytes exposed to lipopolysaccharide, acting on the reduction of reactive oxygen species and preserving the activity of enzymes antioxidants. The electrospinning/electrospraying technique was efficient for protecting the compounds present in the broccoli extract. The encapsulated and unencapsulated extracts showed antioxidant, antihyperglycemic, antitumor, and neuroprotective effects, and can act in the control of chronic non-communicable diseases.

Keywords: glucosinolates, antimicrobial, antihyperglycemic, antitumor, antioxidant

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema do processo de digestão no organismo humano.....	35
Figura 2 - Estrutura dos glicosinolatos.....	40
Figura 3 - Hidrólise dos glicosinolatos por ação da enzima mirosinase.....	41
Figura 4 - Tiobarbomoilação do isotiocianato.....	41
Figura 5 - Proposta do modelo de proteção neuronal por ação de isotiocianatos.....	43
Figura 6 - Esquema básico de encapsulação por <i>electrospraying</i> e <i>electrospinning</i>	46
Figura 7 - Modelo estrutural da zeína.....	47
Figura 8 - Morfologia das cápsulas de extrato de brócolis e zeína em diferentes proporções. A: cápsula de zeína sem adição de extrato; B: 10:90 (v:v); C: 20:80 (v:v); D: 30:70 (v:v); E: 40:60 (v:v); F: 45:55 (v:v); G: 50:50 (v:v). H: 60:40 (v:v); I: 70:30 (v:v); J: 80:20 (v:v); K: 90:10 (v:v).....	87
Figura 9 - Morfologia das fibras de extrato de brócolis e zeína em diferentes proporções. A: fibra 20:80 (v:v); B: fibra 25:65 (v:v); C fibra 30:70 (v:v); D: fibra 35:65 (v:v); E: fibra 40:60 (v:v); F: fibra 50:50 (v:v).....	88
Figura 10 - Atividade antitumoral frente a células de glioma GL261 tratadas com extrato de brócolis encapsulado e não encapsulado nas concentrações de 50, 100, 200, 300 e 400 µg/mL durante 48 (A) e 72 h (B). Citotoxicidade celular (C) frente a astrócitos tratados com extrato de brócolis não encapsulado (Ex) e encapsulado com zeína (Caps) nas concentrações de 300 e 400 µg/mL durante 72 h. Veículo consiste em aplicação de dimetilsulfóxido, Zeína refere-se a cápsula de zeína sem adição de extrato. *** $P < 0,001$ comparado ao veículo.....	104
Figura 11 - Viabilidade celular de astrócitos expostos ao lipopolissacarídeo (LPS) e tratados com extrato de brócolis não encapsulado (Ext) e encapsulado (Caps) nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 µg/mL durante 48 h. Controle consiste em aplicação de dimetilsulfóxido, Zeína refere-se à cápsula de zeína sem adição de extrato. ### $P < 0,001$ comparado ao controle. *** $P < 0,001$ comparado ao LPS.....	107
Figura 12 - Produção de espécies reativas de oxigênio e níveis de nitritos em	

astrócitos expostos ao LPS e tratados com extrato de brócolis não encapsulado (Ext) e encapsulado (Caps) nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 µg/mL durante 48 h. Controle consiste em aplicação de dimetilsulfóxido, Zeína refere-se à cápsula de zeína sem adição de extrato. ### $P<0,001$ comparado ao controle.

*** $P<0,001$ comparado ao LPS..... 109

Figura 13 - Atividade da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em astrócitos expostos ao lipopolissacarídeo (LPS) e tratados com extrato de brócolis não encapsulado (Ext) e encapsulado (Caps) nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 µg/mL durante 48 h. Controle consiste em aplicação de dimetilsulfóxido, Zeína refere-se à cápsula de zeína sem adição de extrato. # $P<0,05$ comparado ao controle..... 112

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Grupos reativos presentes na zeína.....	48
Tabela 2 - Caracterização das amostras de brócolis.....	69
Tabela 3 - Identificação dos compostos presentes nos extratos de brócolis por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.....	72
Tabela 4 - Condutividade elétrica das soluções poliméricas de extrato de brócolis e zeína 9% em diferentes proporções.....	74
Tabela 5 - Condutividade elétrica das soluções poliméricas de extrato de brócolis e zeína 30% em diferentes proporções.....	75
Tabela 6 - Eficiência de encapsulação por determinação espectrofotométrica de compostos fenólicos do extrato hidroalcólico de brócolis com zeína (v:v) pela técnica de <i>electrospraying</i>	76
Tabela 7 - Eficiência de encapsulação por determinação espectrofotométrica de compostos fenólicos do extrato hidroalcólico de brócolis com zeína (v:v) pela técnica de <i>electrospinning</i>	77
Tabela 8 - Espectros no infravermelho com Transformada de Fourier do brócolis liofilizado e das cápsulas de extrato de brócolis e zeína em diferentes proporções produzidas por <i>electrospraying</i>	79
Tabela 9 - Espectros no infravermelho com Transformada de Fourier do brócolis liofilizado e das fibras de extrato de brócolis e zeína em diferentes proporções produzidas por <i>electrospinning</i>	79
Tabela 10 - Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura das cápsulas de extrato hidroalcólico de brócolis:zeína (v:v) produzidas por <i>electrospraying</i>	81
Tabela 11 - Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura das fibras de extrato hidroalcólico de brócolis: zeína (v:v) produzidas por <i>electrospinning</i>	82
Tabela 12 - Termograma da perda de massa das cápsulas de extrato de brócolis e zeína (v:v) produzidas por <i>electrospraying</i>	84
Tabela 13 - Termograma da perda de massa das fibras de extrato de brócolis e zeína (v:v) produzidas por <i>electrospinning</i>	86
Tabela 14 - Atividade antioxidante do extrato de brócolis encapsulado e não encapsulado frente aos radicais DPPH, hidroxila e óxido nítrico.....	91

Tabela 15 - Halos de inibição do extrato de brócolis não encapsulado frente as bactérias <i>Salmonella Typhimurium</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	92
Tabela 16 - Inibição de enzimas digestivas α -amilase e α -glicosidase por extrato de brócolis encapsulado e não encapsulado.....	94
Tabela 17 - Efeito da simulação da digestão <i>in vitro</i> frente aos compostos presentes no extrato de brócolis não encapsulado.....	96
Tabela 18 - Efeito da simulação da digestão <i>in vitro</i> frente aos compostos presentes no extrato de brócolis encapsulado.....	98
Tabela 19 - Atividade antioxidante frente aos radicais DPPH, hidroxila e óxido nítrico das frações de brócolis encapsulado e não encapsulado submetidos a simulação da digestão.....	99
Tabela 20 - Atividade antihiperglicemiante frente a α -amilase e α -glicosidase das frações de brócolis encapsulado e não encapsulado submetidos a simulação da digestão.....	101

Lista de abreviaturas e siglas

CAT – Catalase

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

COX-2 – Cicloxigenase-2

DAMPS – Moléculas associadas ao dano celular

DCFH-DA – 2,7-diclorodi-hidrofluoresceína-diacetato

DCNT – Doenças Crônicas Não Transmissíveis

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMII – Diabetes Mellitus tipo II

DMSO – dimetilsulfóxido

DP – Doença de Parkinson

DPPH – 2,2- difenil-1-picril-hidrazil

DSC – Calorimetria Diferencial de Varredura

DTAs – Doenças Transmitidas por Alimentos

DTNB – Reagente de Ellman

EDS – Espectroscopia de energia dispersiva

EE – Eficiência de encapsulação

EROS – Espécies reativas de oxigênio

FTIR – Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier

HLA – Receptores de antígenos leucocitários humanos

IL -1 β – Interleucina 1 β

IL6 – Interleucina 6

KEAP 1 – Proteína 1 Associada a ECH Semelhante a Kelch

LPS – Lipopolissacarídeo

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MTT – Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolium]

Nrf2 – Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2

OH[•] – Radical hidroxila

OMS – Organização Mundial de Saúde

ON – Radical óxido nítrico

PAMPS – Moléculas associadas a patógenos

PBS – Tampão fosfato salino

PGE2 – Prostaglandina E2

PLA2 – Fosfolipase A2

PNS – Pesquisa Nacional de Saúde

SFB – Soro fetal bovino

SFN – Sulforafano

sMaff – *small musculoaponeurotic fibrosarcoma*

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido dismutase

TGA – Análise de termogravimetria

TNFR2 – Receptor do fator de necrose tumoral 2

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

VET – Valor Energético Total

Sumário

1. Introdução.....	19
2. Objetivos.....	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. Revisão bibliográfica	23
3.1 Doenças crônicas não transmissíveis	23
3.1.1 Diabetes mellitus tipo II.....	23
3.1.2 Cânceres.....	26
3.1.3 Doenças neurológicas e inflamação	27
3.2 Atividade antioxidante.....	30
3.2.1 Radical hidroxila.....	31
3.2.2 Radical óxido nítrico.....	32
3.2.3 Radical 2,2- difenil-1-picril-hidrazil.....	33
3.3 Atividade antimicrobiana.....	33
3.4 Ingestão X biodisponibilidade de alimentos.....	34
3.5 Brócolis.....	39
3.6 Encapsulação.....	44
4. Materiais e métodos.....	49
4.1 Material.....	49
4.2 Caracterização das amostras.....	49
4.3 Obtenção dos extratos.....	50
4.4 Caracterização dos extratos.....	51
4.5 Encapsulação.....	52
4.5.1 Condutividade elétrica das soluções poliméricas.....	53
4.5.2 Eficiência de encapsulação.....	53
4.5.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.....	54
4.5.4 Calorimetria diferencial de varredura.....	54
4.5.5 Análise termogravimétrica.....	55
4.5.6 Microscopia eletrônica de varredura acoplada a sistema de espectroscopia de energia dispersiva.....	55

4.6 Atividade biológicas.....	56
4.6.1 Atividade antioxidante.....	56
4.6.1.1 Atividade de eliminação de radicais de DPPH.....	56
4.6.1.2 Atividade de eliminação de radicais hidroxila.....	57
4.6.1.3 Atividade de eliminação de radicais óxido nítrico.....	57
4.6.2 Atividade antimicrobiana.....	58
4.6.2.1 Reativação dos microrganismos.....	58
4.6.2.2 Disco difusão.....	59
4.6.2.3 Concentração inibitória mínima.....	59
4.6.2.4 Concentração bactericida mínima.....	60
4.6.3 Potencial antihiperglicemiante.....	60
4.6.3.1 Inibição da atividade da α -amilase.....	60
4.6.3.2 Inibição da atividade da α -glicosidase.....	61
4.6.4 Simulação da digestão biológica.....	61
4.6.4.1 Preparo da amostra.....	61
4.6.4.2 Simulação da digestão na boca.....	62
4.6.4.3 Simulação da digestão no estômago.....	62
4.6.4.4 Simulação da digestão no intestino.....	63
4.6.4.5 Avaliação da digestão biológica.....	63
4.6.5 Análise da citotoxicidade em astrócitos.....	64
4.6.6 Atividade antitumoral em glioma.....	65
4.6.7 Atividade neuroprotetora <i>in vitro</i>	66
4.6.7.1 Viabilidade celular.....	67
4.6.7.2 Espécies reativas de oxigênio.....	67
4.6.7.3 Determinação de nitritos.....	67
4.6.7.4 Ensaio da superóxido dismutase.....	68
4.6.7.5 Ensaio da catalase.....	68
5. Resultados e discussão.....	69
5.1 Caracterização da amostra.....	69
5.2 Caracterização do extrato.....	70
5.3 Caracterização das cápsulas e fibras.....	74

5.3.1 Condutividade elétrica das soluções poliméricas.....	74
5.3.2 Eficiência de encapsulação.....	75
5.3.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.....	77
5.3.4 Calorimetria diferencial de varredura.....	80
5.3.5 Análise termogravimétrica.....	83
5.3.6 Microscopia eletrônica de varredura acoplada a sistema de espectroscopia de energia dispersiva.....	86
5.4 Atividades biológicas.....	90
5.4.1 Atividade antioxidante.....	90
5.4.2 Atividade antimicrobiana.....	92
5.4.3 Atividade antihiperglicemiante.....	93
5.4.4 Efeito da digestão na biodisponibilidade de compostos.....	95
5.4.5 Citotoxicidade e atividade antitumoral.....	103
5.4.6 Atividade neuroprotetora <i>in vitro</i>	106
5.4.6.1 Viabilidade celular.....	106
5.4.6.2 Espécies reativas e oxigênio e níveis de nitritos.....	108
5.4.6.3 Enzimas antioxidantes.....	111
6. Considerações finais.....	113
7. Referências bibliográficas.....	115
8. Apêndices.....	146
8.1 Apêndice 1.....	147
8.2 Apêndice 2.....	149
8.3 Apêndice 3.....	150

1. INTRODUÇÃO

Atualmente as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são responsáveis por mais de 70% das mortes não acidentais no Brasil. Dentre as DCNT destacam-se diabetes mellitus tipo II, doenças cardiovasculares, doenças respiratórias e doenças neurológicas, que apresentam entre si quatro fatores de risco em comum: alimentação inadequada, baixa frequência de atividade física, consumo excessivo de álcool e tabagismo (BRASIL, 2014).

Devido à alta morbimortalidade das DCNT são necessárias alternativas que estimulem a promoção e a prevenção destas, como a utilização de compostos naturais oriundos do metabolismo especializado de plantas, como técnicas nutracêuticas auxiliares para a diminuição da incidência destas doenças. Dentre os compostos que possuem atividades biológicas, destacam-se os glicosinolatos e compostos fenólicos presentes nas hortaliças do gênero das Brassicas, como o brócolis.

Os glicosinolatos são compostos de proteção das Brassicas, que em situações de estresse da planta, como dano mecânico, ou pela própria cocção do alimento, são hidrolisados por enzimas mirosinases formando subprodutos como isotiocianatos. Os isotiocianatos e os compostos fenólicos presentes no brócolis possuem diversas atividades no organismo humano como efeito antitumoral, antioxidante, anti-hiperglicêmico, antimicrobiano, entre outros (VILLARREAL-GARCÍA & JACOBO-VELÁZQUEZ, 2016; WU et al., 2017; THOMAS et al., 2018). Entretanto, estes compostos possuem baixa estabilidade térmica a temperaturas elevadas, mudanças de pH e luminosidade restringindo suas atividades (LELARIO et al., 2012).

Desta forma a encapsulação surge como uma alternativa para a preservação de compostos bioativos. Entre as diversas técnicas de encapsulação, destacam-se o *electrospinning* e o *electrospraying*, que não utilizam temperaturas elevadas no processo, aumentando a eficiência de encapsulação, a estabilidade térmica e promovendo a formação de fibras ou cápsulas com morfologia uniforme e em escala nanométrica (BUSHANI & ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014).

Apesar dos benefícios dos compostos presentes no brócolis, não existem, até o presente momento, estudos que visam encapsular estes compostos pelas técnicas de *electrospinning* e *electrospraying* utilizando zeína como material de parede, bem como avaliar os efeitos antioxidantes, antimicrobianos, antitumorais, antihiperglicemiantes e neuroprotetores dos encapsulados.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um screening biológico de extrato de brócolis não encapsulado e encapsulado pela técnica de *electrospraying*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir extrato de brócolis rico em glicosinolatos e compostos fenólicos;
- Produzir cápsulas contendo extrato de brócolis pela técnica de *electrospraying* utilizando zeína como material de parede;
- Produzir fibras contendo extrato de brócolis pela técnica de *electrospinning* utilizando zeína como material de parede;
- Caracterizar cápsulas e fibras quanto à condutividade elétrica, eficiência de encapsulação, estabilidade térmica, grupos funcionais e morfologia;
- Definir a técnica e a concentração de extrato mais apropriado para realizar as análises biológicas;
- Avaliar a atividade antioxidante pelos métodos de inibição dos radicais DPPH, hidroxila e óxido nítrico do extrato de brócolis não encapsulado e do extrato de brócolis encapsulado;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato de brócolis não encapsulado e do extrato de brócolis encapsulado pelos métodos de disco de difusão, concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima frente a bactérias do gênero *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium*;

- Avaliar o efeito citotóxico do extrato de brócolis não encapsulado e do extrato de brócolis encapsulado frente a cultivo primário de astrocitos;
- Avaliar o efeito antitumoral do extrato de brócolis não encapsulado e do extrato de brócolis encapsulado frente a linhagem celular de glioma GL261;
- Avaliar o efeito da simulação da digestão sobre o perfil de compostos do extrato de brócolis não encapsulado e do extrato de brócolis encapsulado;
- Avaliar o efeito antihiperglicemiante do extrato de brócolis não encapsulado e do extrato de brócolis encapsulado por meio da inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase;
- Avaliar o efeito neuroprotetor *in vitro* do extrato de brócolis não encapsulado e do extrato de brócolis encapsulado frente a insulto excitotóxico induzido por lipopolissacarídeo em astrócitos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são consideradas problemas graves de saúde pública devido ao seu alto índice de morbimortalidade, principalmente em indivíduos em situação de vulnerabilidade social e idosos (MALTA et al., 2011). As principais DCNT segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) são diabetes mellitus tipo II, cânceres, doenças cardiovasculares, doenças respiratórias e doenças neurológicas, que possuem como principais fatores de riscos o tabagismo, o excesso de peso, o sedentarismo e a má alimentação (BRASIL, 2014).

No Brasil, o Ministério da Saúde lançou em 2011 o Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (2011-2022) que visa atuar frente os fatores de risco para DCNT (BRASIL, 2011). Baseado no Plano de Ações, em 2013 surgiu a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), que revelou que as DCNT atingem cerca de 40% da população adulta brasileira levando a diminuição da qualidade de vida e causando 70% das mortes não acidentais no país (BRASIL, 2014). A PNS também indicou que há um consumo de sal e gorduras acima das recomendações diárias e um baixo consumo de frutas e hortaliças (apenas 37% da população possuía um consumo adequado de 400 gramas diárias) e baixa atividade física, todos fatores de risco para o surgimento de DCNT (BRASIL, 2014).

3.1.1 DIABETES MELLITUS TIPO II

Diabetes mellitus tipo II (DMII) é considerada um distúrbio metabólico caracterizado por um processo hiperglicêmico resultante de defeitos na secreção e/ou ação da

insulina (DIRETRIZES SBD, 2017). Esta doença possui alto grau de morbimortalidade, sendo considerada a terceira maior causa de morte prematura no mundo (OMS, 2016). Segundo a Federação Internacional de Diabetes, no ano de 2015, cerca de 8,8% da população mundial adulta era diabética, sendo 75% desta incidência em países em desenvolvimento (IDF, 2014).

No ano de 2015, o Brasil foi considerado o quarto país com maior número de indivíduos portadores de diabetes (14,3 milhões de pessoas), perdendo apenas para a China, Índia e Estados Unidos (IDF, 2014). Destes, os indivíduos mais afetados segundo a Pesquisa Nacional de Saúde de 2013, são mulheres e indivíduos com baixo grau de escolaridade (BRASIL, 2014).

A DMII apresenta caráter poligênico associado à hereditariedade e aos fatores ambientais, como baixa atividade física e hábitos alimentares inadequados que levam a obesidade. A adiposidade visceral central, característica de acúmulo de gordura visceral, é um fator de risco importante para a DMII, pois nestes casos o tecido encontra-se hipertrofiado, e por consequência ocorre a produção de citocinas pró-inflamatórias que levam a resistência à insulina (DIRETRIZES SBD, 2017).

A DMII, além da hiperglicemia, está associada a hiperglucagonemia, disfunção incretínica, aumento da lipólise, resistência insulínica dos tecidos periféricos, aumento da produção hepática de glicose e de ácidos graxos livres, aumento da reabsorção renal de glicose e deficiência da síntese e na secreção de insulina pela célula β pancreática (DIRETRIZES SBD, 2017).

As enzimas α -glicosidase e α -amilase estão relacionadas ao desenvolvimento de DMII, pois são responsáveis pelo metabolismo de compostos glicoconjugados, atuando

na absorção da glicose nos enterócitos, onde ocorre a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 da amilose e amilopectina do amido por ação da α -amilase, e dos dissacarídeos pela ação da α -glicosidase (YAMAGISHI et al., 2009; WILLIAMSON, 2013; YIN et al., 2014).

A α -amilase pancreática, enzima secretada pelo pâncreas, é responsável pela clivagem das ligações glicosídicas α -1,4, promovendo uma hiperglicemia pós-prandial. A degradação de amido, principal fonte energética da alimentação, inicia-se na boca pela ação da α -amilase salivar. Quando chega ao intestino delgado, entra em ação a α -amilase pancreática que completa a conversão dos polissacarídeos em dissacarídeos. A α -glicosidase é uma enzima presente na borda em escova do intestino delgado, que atua quebrando, após a ação da α -amilase, os dissacarídeos em monossacarídeos, como glicose, que serão absorvidos e enviados a corrente sanguínea (ANDRADE-CETTO et al., 2008; OBOH et al., 2011; WU et al., 2011).

A inibição parcial dessas enzimas pode ser uma alternativa para o controle da DMII, pois promove o retardo da absorção da glicose no intestino delgado, reduzindo a glicemia pós-prandial. Existem diversos medicamentos no mercado, como a acarbose, que atuam inibindo a ação destas enzimas, promovendo um retardo da absorção de glicose. Apesar dos benefícios, a acarbose promove uma gama de distúrbios gastrointestinais, tais como flatulência, distensão abdominal, diarreia e meteorismo, que diminuem a qualidade de vida dos indivíduos portadores da doença (JAIN & SARAF, 2010; OBOH et al., 2011; WU et al., 2011). Desta maneira, estudos tem se voltado para a busca de novos inibidores naturais das enzimas que sejam seguros e com baixos efeitos adversos.

3.1.2 CÂNCERES

O câncer é uma doença crônica não transmissível que apresenta elevada morbimortalidade e acomete uma grande parcela da população. No Brasil estima-se que a cada ano, surjam 600 mil novos casos da doença, sendo em 2018 os tumores de próstata (31,7%), traqueia/brônquios/pulmão (8,7%), cólon/reto (8,1%) e estômago (6,3%) os mais prevalentes em homens; e os de mama (29,5%), cólon/reto (9,4%), colo de útero (8,1%) e traqueia/brônquio/pulmão (6,2%) mais prevalentes em mulheres (INCA, 2019).

A incidência e a mortalidade de tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) vêm crescendo nos últimos anos, ocupando a 10ª posição para homens e 9ª para mulheres, representando 2,7% dos casos de cânceres para ambos os sexos. O principal câncer do SNC é o glioma (40-60% dos casos), um tumor agressivo e de difícil tratamento devido a seu grau de infiltração, levando a morte em 92% dos casos (DEIGHTON et al., 2010; LATHIA et al., 2015).

O processo carcinogênico divide-se em três estágios: iniciação, promoção e progressão. A iniciação consiste na ação de agentes cancerígenos sobre as células saudáveis, que promovem mudanças em nível de DNA causando danos irreversíveis, bem como a ativação de oncogenes e/ou inativação de genes supressores da formação de tumores. O estágio da promoção ocorre quando as células que já sofreram ação dos agentes cancerígenos começam uma transformação lenta e gradual para célula maligna. Por fim, a progressão ocorre com uma multiplicação irreversível e sem controle das células modificadas, que sofrem aumento de tamanho e começam a invadir tecidos saudáveis e produzir metástase. Apesar deste crescimento desenfreado

de células carcinogênicas, os sintomas clínicos podem demorar a aparecer, diminuindo as chances de tratamento e cura (VENDRAMINI-COSTA & CARVALHO, 2012).

As células tumorais surgem após o acúmulo de diversas mutações, como substituição de aminoácidos ou duplicações de genes causadas por fatores genéticos e ambientais, que além de favorecerem a proliferação celular, diminuem as respostas apoptóticas, tornando a célula maligna mais resistente a morte celular, com replicação ilimitada, proliferação autossustentada e com característica invasiva metastática (BECKER et al., 2010; HANAHAN et al., 2011; MUSICCO et al., 2013).

Devido ao alto grau de morbimortalidade dos tumores, buscam-se alternativas naturais para o controle destas doenças. De 1981 a 2014 dos 174 medicamentos anticâncer produzidos, 100 eram baseados em produtos naturais (NEWMANN & CRAGG, 2016).

3.1.3 DOENÇAS NEUROLÓGICAS E INFLAMAÇÃO

As doenças neurológicas vêm ganhado destaque nos últimos anos devido ao aumento da expectativa de vida da população, destacando-se as doenças de Parkinson (DP) e de Alzheimer (DA). Estas apresentam elevada morbidade e quadro clínico irreversível, restando apenas tratamentos paliativos realizados por equipe multidisciplinar (JELLINGER, 2009; GIACOPPO et al., 2015).

A neuroinflamação é considerada um processo importante que ocorre nessas doenças neurodegenerativas, sendo definida como uma resposta inflamatória originada no SNC após uma injúria e que leva a uma ativação de células da glia (MORALES et al., 2014). Uma resposta aguda é considerada benéfica, uma vez que contribui para o

reparo tecidual, minimizando danos adicionais (WILKINS et al., 2014). Entretanto, quando essa resposta persiste, isto é, torna-se crônica, pode desencadear alterações no funcionamento cerebral, contribuindo para a disfunção e morte neuronal (AGOSTINHO et al., 2010; CALSOLARO & EDISON, 2016).

Os principais tipos celulares envolvidos no processo neuroinflamatório são os astrócitos e a microglia (WILKINS et al., 2014). Quando os neurônios sofrem alguma lesão por um agente tóxico, as células da micróglia são ativadas e promovem a liberação de fatores pró-inflamatórios como as citocinas e as quimiocinas (HIRSCH & HUNOT, 2009).

As principais citocinas liberadas são o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e as interleucinas 1 β e 6 (IL-1 β e IL-6) que são importantes para as sinalizações autócrina (a célula emite o sinal e este atua sobre ela mesma) e parácrina (uma célula emite um sinal que atua sobre uma célula vizinha) das micróglias promovendo a apoptose neuronal (HIRSCH & HUNOT, 2009; PETERSON & FLOOD, 2012).

O TNF- α é uma das primeiras citocinas pró-inflamatórias a serem liberadas, portanto sua dosagem sanguínea é considerada um marcador do processo neuroinflamatório. Após a liberação o TNF- α se liga ao receptor do fator de necrose tumoral 2 (TNFR2) expresso por células gliais, promovendo um processo inflamatório que pode levar à morte celular (IDRISS & NAISMITH, 2000; McCOY & TANSEY, 2008; OLMOS & LLADÓ, 2014; CHEN et al., 2014).

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória sintetizada pela enzima caspase-1 na presença de moléculas associadas à patógenos (PAMPs do inglês *Pathogen-associated molecular pattern*) e moléculas associadas ao dano celular (DAMPs do

inglês *Damage-associated molecular pattern*). Essa citocina atua no processo neuroinflamatório, pois ativa a transcrição de genes que codificam para as enzimas ciclooxigenase-2 (COX-2) e fosfolipase A2 (PLA2) que atuam na síntese de óxido nítrico (SIMI et al., 2007; SHAFTEL et al., 2008; EDER, 2009).

As citocinas TNF- α e IL-1 β atuam de forma sinérgica promovendo um aumento da expressão e atividade da COX-2 e da PLA2 responsáveis pela síntese de prostaglandina E2 (PGE2) que em excesso possui ação pró-inflamatória (ROCHA et al., 2003; DINARELLO, 2009; MILATOVIC et al., 2011). As quimiocinas também atuam no processo inflamatório, pois possuem a função de recrutar linfócitos T auxiliares das CD4+ que promovem ataque a antígenos, controlando desta forma, a resposta imune pela liberação de citocinas (HIRSCH & HUNOT, 2009).

Além da expressão de fatores pró-inflamatórios, ocorre também após a lesão neuronal, um aumento da expressão dos receptores de antígenos leucocitários humanos pertencentes ao complexo de histocompatibilidade, responsáveis pela identificação do agente invasor e por impedir que ele se espalhe pelo organismo (HIRSCH et al., 1998).

A DP é caracterizada pela degeneração lenta e progressiva dos neurônios dopaminérgicos da parte compacta da substância nigra. Diversos estudos indicam que a neuroinflamação crônica pode ser um mecanismo desencadeador da DP. Isto pode ocorrer devido a liberação de citocinas pró-inflamatórias, que pode levar à morte dos neurônios dopaminérgicos do sistema nigroestriatal danificados, e também dos saudáveis (HUNOT & HIRSCH, 2003; BRAAK et al., 2004; LONG-SMITH et al., 2009; MORE et al., 2013; BLANDINI, 2013; ROCHA et al., 2015; HERRERO et al., 2015).

A DA é caracterizada pela degeneração progressiva de algumas funções cognitivas, como memória e linguagem, devido à perda dos neurônios piramidais afetando as estruturas límbicas do lobo temporal (DAVIES et al., 1992). A degeneração ocorre devido a formação de placas senis de peptídeo beta-amiloide ($A\beta$) e pelos emaranhados neurofibrilares que induzem a ativação das micróglia e dos astrócitos levando a um processo inflamatório local sutil. Quando este processo vai avançando ocorre a produção de radicais livres e aumento do processo inflamatório levando a morte neuronal (HASS, 2004; SELKOE, 2005). A formação das placas senis e dos emaranhados neurofibrilares ocorre devido a hiperfosforilação da proteína Tau (fosfoproteínas do SNC que se encontram associadas aos microtúbulos neuronais e tem a função de atuar no processo de divisão celular), levando a um colapso da estrutura tubular (PAULA et al., 2009).

3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são constantemente produzidas no organismo humano através de processos metabólicos oxidativos, não apresentando efeitos tóxicos em baixas concentrações. Entretanto, o problema ocorre quando no organismo há desequilíbrio entre os sistemas pró-antioxidantes e antioxidantes, resultando no estresse oxidativo. As EROS, quando em excesso, causam diversos danos oxidativos em componentes celulares, favorecendo o desenvolvimento de diversas DCNT (CHARRIER & ANASTASIO, 2011).

Os agentes antioxidantes possuem a capacidade de impedir, retardar e/ou minimizar as alterações causadas pelo estresse oxidativo, podendo ser endógenos

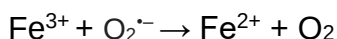
como as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase, bem como exógenos, destacando-se alguns compostos presentes em frutas e hortaliças (ROESLER et al., 2007).

Os mecanismos de atuação destes compostos podem ser por duas vias: a via primária, onde os compostos atuam interrompendo a reação ao doarem elétrons para as EROS, tornando-os produtos termodinamicamente estáveis; enquanto a ação pela via secundária ocorre pelo sequestro de oxigênio, da complexação de metais, da absorção de radiação ultravioleta, de decomposição de hidroperóxidos ou desativação de oxigênio singleto retardando assim, o início da autoxidação (ANGELO & JORGE, 2007).

3.2.1 RADICAL HIDROXILA (OH[•])

Dentre as diversas EROS, a mais abundante e destrutiva no organismo é o radical OH[•], que causa um dano ao DNA e atua no processo de peroxidação lipídica da membrana celular (LIPINSKI, 2011). Este radical é produzido em duas etapas:

1. Primeiramente ocorre a redução do íon férrico em íon ferroso:



2. A segunda etapa é a reação de Fenton, onde o íon ferroso reage com o peróxido de hidrogênio:



Quando o radical OH[•] for produzido próximo ao DNA, e esse estiver ligado a um metal, como por exemplo o ferro, pode promover modificações nas bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. Ainda pode ocasionar a

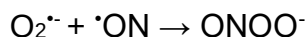
inativação de enzimas ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) em pontes dissulfeto (-SS). É também o principal radical envolvido na lipoperoxidação, levando a perda da seletividade da membrana celular na troca iônica, liberando o conteúdo de organelas e formando produtos com potencial citotóxico, como o malonaldeído que promove a morte celular (BEKTAŞOĞLU et al., 2006).

3.2.2 RADICAL ÓXIDO NÍTRICO (ON)

O óxido nítrico é responsável por modular o processo inflamatório, sendo benéfico quando produzido em pequenas concentrações. Entretanto quando este radical for produzido em excesso, e se apresentar com um elétron desemparelhado, pode reagir com outros radicais, além de complexar-se com metais de transição como o ferro, causando diversos danos ao organismo, e atuando no desenvolvimento de DCNT, como as de cunho neurológico (LUIKING & DEUTZ, 2003).

A L-arginina, nas células do endotélio vascular e na presença de oxigênio, produz ON e L-citrulina em um processo catalisado pela enzima óxido nítrico sintase. Após a produção, o ON estimula a enzima guanilato ciclase solúvel promovendo a formação de monofosfato cíclico de guanosina intracelular, que leva a uma diminuição intracelular dos níveis de cálcio, que por sua vez, leva ao relaxamento do endotélio (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004; RADI, 2018).

No estresse oxidativo ocorre uma superprodução de $O_2^{\cdot-}$ que diminui a atividade do ON e reage com este, produzindo peroxinitrito, um composto muito reativo e prejudicial para as células que leva peroxidação lipídica (RADI, 2013; RADI, 2018):



O peroxinitrito, além de causar a peroxidação lipídica, promove a liberação de fatores pró-apoptóticos, bem como promove um processo de inflamação exacerbado, levando a morte celular (RADI, 2013).

3.2.3 RADICAL 2,2- DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZIL (DPPH)

O DPPH não é um radical produzido pelo organismo humano, mas é muito utilizado para determinar a atividade antioxidante, pois é um dos poucos radicais estáveis disponíveis no mercado, capazes de aceitar um radical elétron ou hidrogênio para se tornar uma molécula estável. A reação para a determinação da capacidade antioxidante de compostos frente ao DPPH ocorre quando sua forma radical é reduzida por um antioxidante (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os compostos antimicrobianos são os responsáveis por reduzir ou eliminar o crescimento de microrganismos patogênicos, podendo ser de origem natural ou sintética (RAMOS et al., 2007).

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) têm sido relatadas como um grave problema de saúde pública, principalmente devido a crescente resistência dos microrganismos frente a antimicrobianos convencionais. Neste sentido, a indústria tem se voltado para o desenvolvimento de alternativas naturais para o controle do crescimento de microrganismo patogênicos, destacando-se a utilização de compostos produzidos pelo metabolismo especializado das plantas (SILVA & FERNANDES JÚNIOR, 2010).

As principais bactérias causadoras de DTAs no Brasil entre 2009 e 2018, segundo o Ministério da Saúde foram *Escherichia coli*, *Salmonella* ssp e *Staphylococcus aureus*, representando 44,1% de todos os casos notificados (BRASIL, 2019). Apesar da *Listeria monocytogenes* não aparecer na lista dos 10 microrganismos com maior número de notificações, esta bactéria é de grande importância, pois apresenta uma alta taxa de mortalidade (BUCHANAN et al., 2004). Os principais sintomas das DTAs são gastrointestinais, entretanto a intensidade e duração destes são influenciadas pelo tipo de microrganismo, quantidade de toxina produzida e pelo estado do sistema imunológico do indivíduo (OLIVEIRA et al., 2010).

Os produtos naturais, podem atuar como agentes antimicrobianos, pois possuem capacidade de inibir os sistemas enzimáticos responsáveis pela síntese de compostos estruturais e de produção de energia das bactérias, levando a morte do microrganismo (FREIRE et al., 2011).

3.4 INGESTÃO X BIODISPONIBILIDADE DE ALIMENTOS

A digestão e absorção dos compostos são influenciadas pela idade e sexo do indivíduo, pelo estado de jejum, pela interação entre as matrizes alimentares e por alterações patológicas que acometem o trato gastrointestinal humano, tais como úlceras, doença celíaca, doença de Crohn, retocolite ulcerativa, entre outras (HUR et al., 2011).

Para que um determinado composto apresente seus efeitos benéficos a saúde, ele deve resistir ao processo digestório e ser metabolizado pelo fígado para ser distribuído, mantendo ativas suas propriedades (GÜLCIN, 2012).

Após a ingestão de um alimento (Figura 1), a primeira etapa da digestão ocorre na boca, onde os dentes trituram o alimento, e a saliva, rica em enzima α -amilase salivar, inicia a degradação de amido e de outros polissacarídeos em dissacarídeos. A presença de sais na saliva neutraliza o pH da boca, melhorando a atuação da enzima. Em seguida, a língua empurra o alimento triturado para o fundo da faringe, onde as ondas peristálticas encaminham para o esôfago. No esôfago ocorre o relaxamento da cárdia, uma válvula que permite uma liberação controlada do bolo alimentar até o estômago (TORTORA & DERRICKSON, 2009).

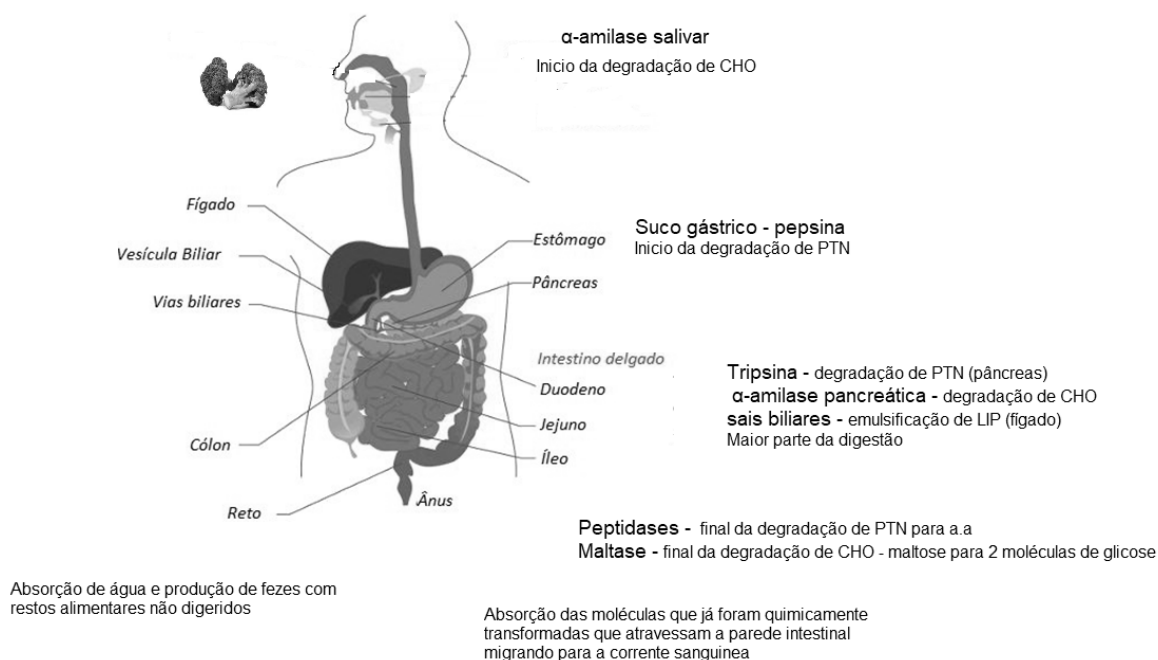


Figura 1 - Esquema do processo de digestão no organismo humano. Fonte: a autora

No estômago, ocorre a digestão de alimentos proteicos, com auxílio da secreção de suco gástrico. O suco gástrico, é composto por ácido clorídrico e sais biliares que mantém o pH ácido (pH 2,0), o que permite a atuação da enzima pepsina. A pepsina é secretada no estômago na forma de pepsinogênio, sendo convertida quando em contato com o ácido clorídrico. Esta enzima catalisa a digestão de proteínas, atuando

com auxílio dos movimentos peristálticos por até 4 horas nas ligações peptídicas que unem os aminoácidos, produzindo oligopeptídeos e aminoácidos livres. Após ser digerido pelo estômago, o bolo alimentar apresenta forma semilíquida e cremosa, e passa a ser denominado de quimo. O relaxamento do piloro permite uma liberação controlada do quimo na primeira porção do intestino delgado (TORTORA & DERRICKSON, 2009).

O intestino delgado é composto por duodeno, jejuno e íleo, sendo que a maior parte da digestão ocorre predominantemente no duodeno, onde são secretados o suco pancreático, a bile e o suco entérico. O suco pancreático, produzido pelo pâncreas, é rico em bicarbonato de sódio que mantém um pH entre 8 e 8,5; α -amilase pancreática responsável pela finalização da degradação de carboidratos; lipase pancreática que hidrolisa lipídeos; nucleases que separam os nucleotídeos dos ácidos nucleicos; proteases como tripsinogênio e o quimiotripsinogênio que são as formas inativas em que são secretadas as enzimas proteolíticas tripsina e quimiotripsina, responsáveis pela hidrólise de polipeptídios (TORTORA & DERRICKSON, 2009).

A bile, produzida pelo fígado e armazenada na vesícula biliar, tem função detergente, promovendo a emulsificação de gorduras. A mucosa intestinal produz também suco entérico rico em enzimas como a enterocinase e dissacaridases, que hidrolisam dissacarídeos em monossacarídeos. Após o processo de digestão no duodeno, o quimo passa a se chamar de quilo (TORTORA & DERRICKSON, 2009).

A absorção dos nutrientes ocorre nas porções do jejuno e do íleo pelo processo de difusão passiva, sendo então enviados para o fígado onde serão metabolizados e distribuídos pelo resto do organismo. Os compostos lipídicos chegam a corrente

sanguínea sem serem metabolizados no fígado, pois nas células da mucosa intestinal esses compostos são transformados em triglicerídeos e envelopados por uma camada de proteínas, formando os quilomícrons que são transferidos para os vasos linfáticos e, em seguida, para os vasos sanguíneos, onde alcançam os adipócitos, sendo, então, armazenados (TORTORA & DERRICKSON, 2009).

Por fim, o que não foi absorvido no intestino delgado, é enviado pelos movimentos peristálticos para o intestino grosso, onde bactérias promovem a dissolução dos resíduos não absorvidos. Como esta parte do sistema digestório retém água, o conteúdo intestinal se condensa até formar detritos inúteis, que são evacuados. No final do processo de digestão diário, são utilizados em média, um litro de saliva, dois litros de suco gástrico e dois de pancreático, bem como um litro de sais biliares (TORTORA & DERRICKSON, 2009).

Durante este processo de digestão ocorrem diversas perdas de compostos bioativos dos alimentos, como os compostos fenólicos, sendo apenas uma parte desses realmente absorvidos, podendo ficar biodisponível para realizar as funções biológicas no organismo após ser metabolizado no fígado (CHIANG et al., 2013; NIMALARATNE, 2016).

Para ser considerado um alimento bioativo, os compostos que se encontram dentro da matriz alimentar devem ser absorvidos e ao chegarem local de ação em níveis necessários para exercerem os efeitos benéficos pretendidos. Por este motivo, é necessário avaliar a biodisponibilidade destes (CROWE & FRANCIS, 2013; CILLA et al., 2013).

A biodisponibilidade consiste no percentual de determinado nutriente que foi consumido, que será realmente metabolizado e aproveitado pelo organismo (GONZÁLEZ-ARIAS et al., 2013). Para determinar a real biodisponibilidade de um composto, os ensaios mais fidedignos são os *in vivo*, entretanto nem sempre podem ser realizados por questões éticas, interações e fatores fisiológicos, desde modo, os ensaios *in vitro* podem ser utilizados, simulando o processo digestório na boca, estômago e intestino delgado mimetizando as condições fisiológicas (VERSANTVOORT et al., 2005, HUR et al., 2011; MÉNARD et al., 2014; ASSUNÇÃO et al., 2014).

Para avaliar a biodisponibilidade, deve-se considerar a bioacessibilidade e a bioatividade. A bioacessibilidade consiste na fração de composto que é liberada da matriz alimentar onde está inserida por ação do suco digestório, ficando disponível para ser absorvida (CILLA et al., 2013). Após este processo, os compostos precisam ser enviados para o intestino, onde serão transportados ao fígado para serem metabolizados. A bioatividade consiste nas propriedades de determinado composto, desde as interações entre eles, até seu processo de metabolização e distribuição aos tecidos alvos para exercerem suas atividades (CILLA et al., 2013).

Os modelos de simulação *in vitro* são ferramentas valiosas para o estudo da biodisponibilidade, influenciando as fases de digestão da boca, estômago e intestino (HUR et al., 2011; MINEKUS, et al., 2014).

3.5 BRÓCOLIS

O brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*) é uma hortaliça originária da região Mediterrânea do Oriente Médio (AUGUSTINE et al., 2014). A produção mundial dessa hortaliça dobrou nos últimos anos devido ao aumento de seu consumo em razão principalmente de seu perfil nutricional (FAOSTAT, 2016). No Brasil, a produção de brócolis no ano de 2017 foi de 272 mil toneladas, sendo as regiões Sul e Sudeste as maiores produtoras devido ao clima mais frio. Segundo dados dos últimos três Censos Agropecuários realizados, o brócolis passou de 27º hortaliça mais produzida na década de 1990, para 20º posição no ano de 2006 e em 2017 alcançou a posição de 8º hortaliça mais produzida (IBGE, 2018).

Os brócolis possuem ácido ascórbico, minerais (manganês, potássio e selênio), compostos fenólicos (flavonoides e ácidos hidroxicinâmicos), carotenoides (luteína e zeaxantina), fibras e glicosinolatos que possuem diversos benefícios para a saúde (REIS et al., 2015; VILLARREAL-GARCÍA & JACOBO-VELÁZQUEZ, 2016; THOMAS et al., 2018).

Os principais compostos fenólicos presentes no brócolis são os ácidos hidroxicinâmicos e os flavonoides que possuem atividade antioxidante, atuando sobre as EROS no organismo (VALLEJO et al., 2003; BACHIEGA et al., 2016). Os principais carotenoides presentes no brócolis são a luteína e zeaxantina, que possuem efeito quimiopreventivo frente a diversos tipos de cânceres e podem prevenir doenças cardiovasculares pois modulam a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (KIM et al., 1998; DWYER et al., 2004; CHEW et al., 2004). O ácido ascórbico é outro

composto presente no brócolis que possui efeito preventivo para o surgimento de cânceres e de aterosclerose (PADAYATTY et al., 2003).

Os glicosinolatos, compostos de ocorrência exclusivas das Brassicas, são derivados dos aminoácidos e podem ser agrupados em glicosinolatos alifáticos (quando derivados da leucina, isoleucina, metionina ou valina), glicosinolatos aromáticos (derivados da tirosina e fenilalanina) ou glicosinolatos indólicos (derivados do triptofano) (CLARKE, 2010; LELARIO et al., 2012). Sua estrutura química é composta por ésteres de (Z)-N-hidroximinosulfato unidos à β -D-glicopirranose por enxofre e uma cadeia lateral de aminoácidos (R) (Figura 2) (SONDERBY et al., 2010).

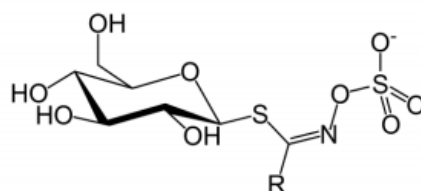


Figura 2 - Estrutura dos glicosinolatos. Fonte: Sonderby et al., 2010

Os glicosinolatos são hidrolisados pelas enzimas mirosinases quando a planta é submetida a condições estressoras levando à perda do grupamento açúcar e formando isotiocianatos, tiocianatos, nitrilas, epitionitrilas e oxazolidine-2-thiones (Figura 3) (WU et al., 2017). Se os glicosinolatos forem consumidos de forma intacta, podem ser hidrolisados por ação de mirosinases produzidas por bactérias do trato gastrointestinal, permitindo a absorção dos isotiocianatos (biodisponibilidade ideal) pelo organismo (PADILLA et al., 2007).

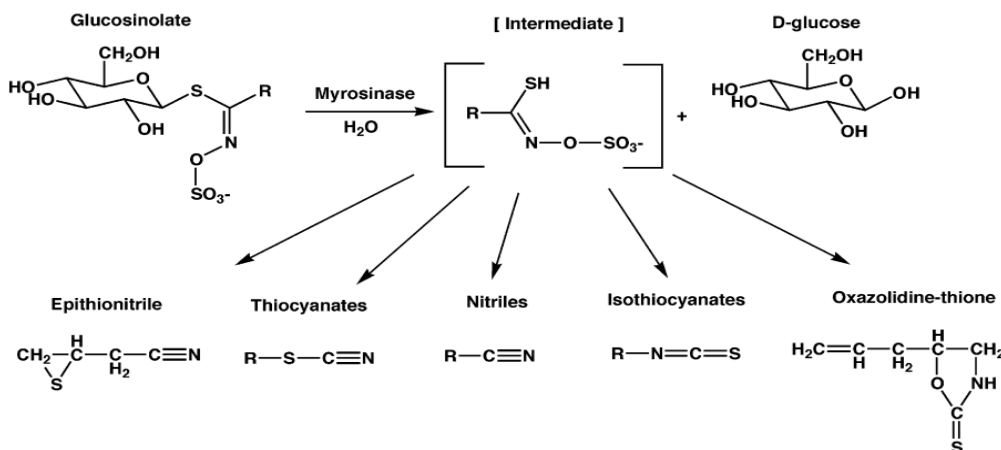


Figura 3 - Hidrólise dos glicosinolatos por ação da enzima mirosinase. Fonte: Rask et al., 2000

Após a ingestão os isotiocianatos atravessam a rede capilar por difusão passiva (quando a concentração do isotiocianato é menor no interior da célula do que no meio extracelular ele penetra na célula) no trato gastrointestinal e ligam-se espontaneamente a grupos amino e tióis proteicos livres do plasma (tiocarbamoilação de proteínas) formando compostos derivados de ditiocarbamoil e tiourea (Figura 4) que cruzam a membrana plasmática para as células dos tecidos onde atuam (THORNALLEY, 2002).

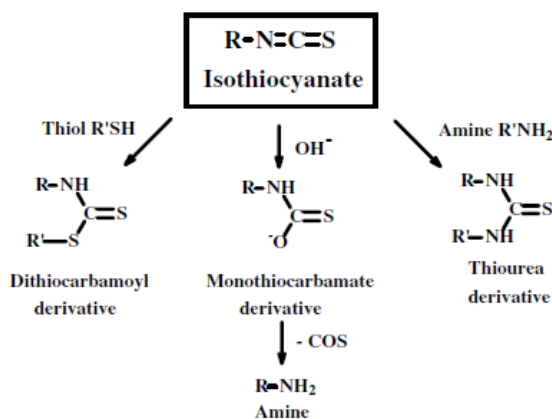


Figura 4- Tiobarbomoilação do isotiocianato. Fonte: Thornalley, 2002

Os glicosinolatos apresentam diversos benefícios para a saúde humana atuando no controle de cânceres, diabetes, aterosclerose e doenças neurodegenerativas (BAHADORAN et al., 2012; TARROZZI et al., 2013; ARES et al., 2014). O efeito

quimioprotetor dos glicosinolatos frente a cânceres de próstata, mama, bexiga, trato gastrointestinal e de pulmão ocorre devido a cinco principais mecanismos: 1- a inibição das isoformas das enzimas citocromo P450 que catalisam a ativação de fatores pró-carcinogênicos; 2 - o potencial antioxidante frente a espécies reativas de oxigênio; 3 - a indução das enzimas de detoxificação que promovem a modulação da sinalização celular; 4 - a indução da apoptose de células tumorais, e 5- a diminuição do dano ao DNA (FAHEY et al., 2001; MUNDAY & MUNDAY, 2002; KRISTAL & LAMP, 2002; THORNALLEY, 2002; TANG et al., 2004; GILL et al., 2004; WISEMAN, 2005; PAPI et al., 2008).

O efeito protetor dos glicosinolatos ocorre devido a sua capacidade de penetrar a barreira hematoencefálica, onde interage com os grupos sulfidrilas da Proteína 1 Associada a ECH Semelhante a Kelch (KEAP1) no citoplasma que promove a ativação do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2). Este Nrf2 migra para o núcleo onde se associa as proteínas sMaff (*small musculoaponeurotic fibrosarcoma*) formando um heterodímero, que se liga aos elementos de resposta antioxidante (ARE) localizados na região promotora dos genes-alvo, induzindo a produção de agentes antioxidantes diminuindo a liberação de citocinas e espécies reativas de oxigênio. Além disso, ocorre um aumento da ativação das enzimas SOD e CAT. Regulam também genes envolvidos na diferenciação celular, proliferação e apoptose, além de modular atividades celulares como inflamação e regeneração tecidual (GANGULY et al., 2005; JAZWA et al., 2011; BODDUPALLI et al., 2012; GUERRERO-BELTRAN et al., 2012; MORRONI et al., 2013; GIACOPPO et al., 2015; MIMURA & ITOH, 2015).

O aumento da transcrição dos genes alvo do Nrf2 leva a uma potente resposta citoprotetora, que promove um aumento da resistência ao processo de desenvolvimento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como cânceres; além disto, promove um aumento da atividade das enzimas de fase II, responsáveis pela eliminação de compostos xenobióticos, sendo considerado o principal mecanismo de proteção dos glicosinolatos frente a DCNT (GUERRERO-BELTRÁN, et al., 2012; MANCHALI et al., 2012; VOMHOF-DEKREY et al., 2012; KENSLER, 2013).

Estudos sugerem que a administração oral de isotiocianatos pode proteger os neurônios dopaminérgicos do efeito neurotóxico, melhorando a memória a curto prazo de ratos acometidos por DA pois podem alterar a produção de dopamina, serotonina e noradrenalina envolvidas no processamento da memória (GANGULY et al., 2005; GANGULY et al., 2008; KIM et al., 2013) (Figura 5).

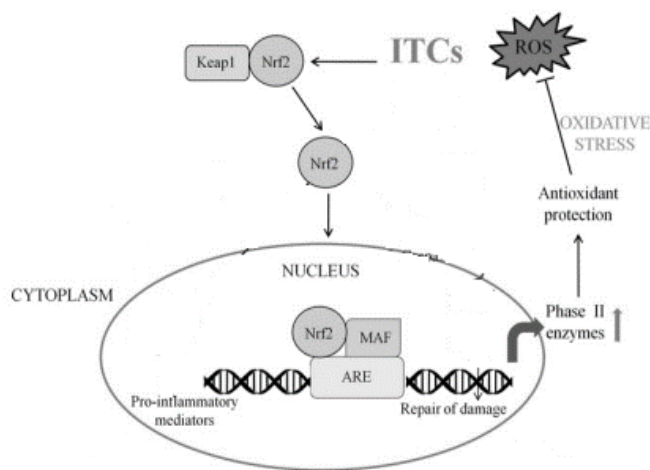


Figura 5 - Proposta do modelo de proteção neuronal por ação de isotiocianatos. Fonte: Giacoppo et al., 2015

O consumo excessivo de alimentos que possuem compostos cianogênicos, como os glicosinolatos, está associado aos distúrbios da tireoide pois, a goitrina, um isotiocianato, possui efeito bociogênico por competir pelo sítio ativo de absorção do

iodo, sendo necessários estudos citotóxicos para a determinação de dosagens máximas de consumo (LAKSHMY et al., 1995; MARWAHA et al., 2003).

Apesar dos diversos benefícios dos glicosinolatos, eles possuem baixa estabilidade a temperaturas elevadas, podendo limitar sua aplicação. Entre as alternativas para a sua preservação destaca-se a encapsulação (WU et al., 2010; WU et al., 2014).

3.6 ENCAPSULAÇÃO

A encapsulação consiste no aprisionamento de um determinado composto com o objetivo de proteção contra condições indesejáveis de luz, umidade, oxigênio e características sensoriais da substância encapsulada, além de permitir uma liberação controlada deste composto no trato gastrointestinal ou no alimento (CHAMPAGNE & FUSTIER, 2007; FAVARO-TRINDADE et al., 2008; FANG & BHANDARI, 2010; NEDOVIC et al., 2011; MAHDAVI et al., 2014).

As cápsulas podem ser classificadas de acordo com seu tamanho em macro ($\geq 5000 \mu\text{m}$); micro (entre $0,2\text{-}5000 \mu\text{m}$) ou nanocápsulas ($\leq 0,2 \mu\text{m}$) ou quanto à disposição do composto encapsulado. São consideradas cápsulas quando o núcleo está claramente fixado no centro da cápsula circulado por um filme contínuo do material de parede ou são esferas quando o núcleo está disperso de forma uniforme em uma matriz (AZEREDO, 2005; REBELLO, 2009).

Existem diversos métodos de encapsulação de compostos, entre os quais se destacam a coacervação (simples ou complexa), o *spray drying*, o *electrospraying* e o *electrospinning* (SUAVE et al., 2006). As técnicas de coacervação e *spray drying* utilizam temperaturas elevadas podendo causar degradação dos compostos bioativos

pelo calor. As técnicas de *electrospraying* e *electrospinning* tem a vantagem de não utilizar temperaturas elevadas e tem sido amplamente utilizado na produção de nanocápsulas e nanofibras para aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica (CHAKRABORTY et al., 2009; BOTREL et al., 2014). Outras vantagens dessas técnicas, incluem a alta eficiência de encapsulação e morfologia nanométrica e regular (LÓPEZ-RUBIO et al., 2012; WEN et al., 2017).

As técnicas de *electrospraying* e *electrospinning* consistem na encapsulação de compostos por meio de diferenças eletrostáticas. O equipamento é composto por uma fonte de alta tensão, uma bomba infusora contendo uma seringa que controla a taxa do fluxo da solução polimérica constante, uma agulha ou capilar de aço inoxidável e um coletor metálico aterrado. Nestes processos, uma seringa contendo uma solução polimérica (material de parede, solvente e solução a ser encapsulada) é acoplada a um injetor com fluxo pré-estabelecido controlado e recebe uma descarga positiva oriunda de fonte de alta tensão, enquanto o coletor recebe uma descarga negativa. Devido às forças eletrostáticas, a superfície da gota na ponta da agulha é distorcida em forma de cone (cone de Taylor), levando à formação de jatos de solução que são então coletados formando cápsulas (*electrospraying*) ou fibras (*electrospinning*) (Figura 6) (COSTA et al., 2012; BHUSHANI & ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014).

As principais diferenças entre as técnicas são a viscosidade das soluções poliméricas e a voltagem da fonte de alta tensão. No *electrospraying* utiliza-se menor voltagem e soluções com menores viscosidades que favorece a formação de gotículas altamente carregadas que se dispersam com a evaporação do solvente, formando cápsulas que são depositadas no coletor metálico (BOCK et al., 2012). No

electrospinning, a voltagem aplicada é maior, bem como a solução polimérica utilizada é mais viscosa, favorecendo a formação de um fio que é projetado ao coletor metálico em um movimento do tipo chicote, produzindo um fio chamado de fibras (JAWOREK & SOBCZYK, 2008).

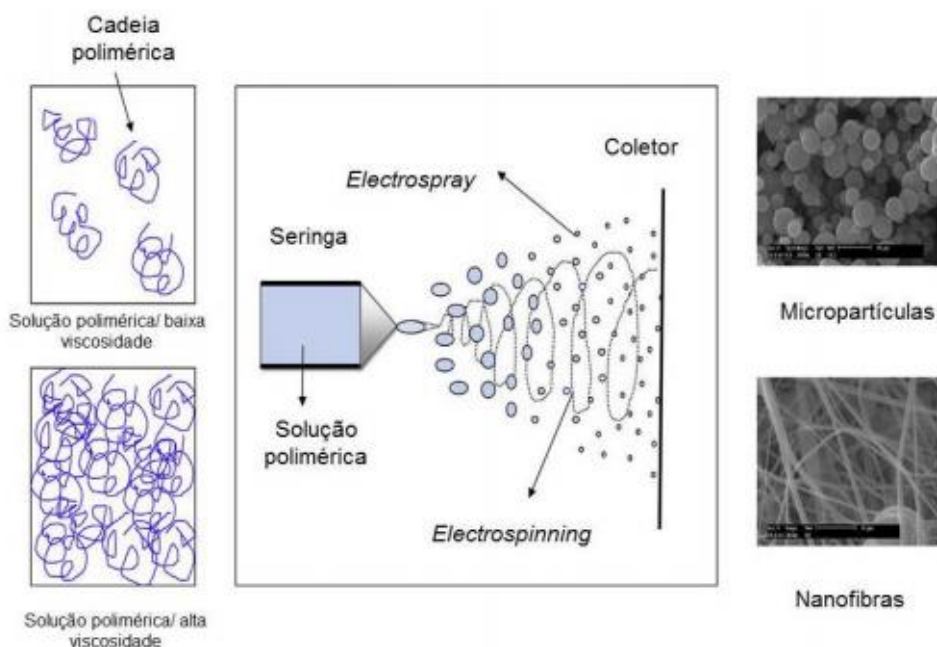


Figura 6 - Esquema básico de encapsulação por *electrospraying* e *electrospinning*. Fonte: Ghorani & Tucker, 2015

O diâmetro e morfologia das cápsulas formadas podem ser afetados por vários parâmetros, incluindo a distância do coletor que afeta a evaporação do solvente, a estabilização do cone de Taylor, a taxa que determina a quantidade de solução de polímero disponível no orifício de saída da agulha, a condutividade da solução, a umidade e a temperatura do ambiente onde o processo está sendo realizado e o material de parede (gomos, carboidratos, lipídios, proteínas, quitosana, entre outras) (NAYAK et al., 2012).

A zeína é uma proteína pertencente a classe das prolaminas (proteínas insolúveis em água, com solubilidade em etanol 70%), sendo a principal proteína no milho e pode ser utilizada como material de parede para encapsular vários tipos de compostos devido a sua estrutura com tendência globular (SHUKLA & CHERYAN, 2001). Essa proteína é constituída por 16 aminoácidos (ácido glutâmico, alanina, arginina, asparagina, cisteína, fenilalanina, glicina, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, prolina, tirosina, treonina e valina), sendo 64% destes apolares. Apesar disto, é nutricionalmente pobre em aminoácidos essenciais, tais como lisina e triptofano o que leva a um balanço negativo de nitrogênio na dieta humana (SHUKLA & CHERYAN, 2001).

Argos et al. (1982) propuseram um modelo estrutural da zeína, contendo nove unidades arranjadas paralelamente estabilizadas por ligações de hidrogênio onde os aminoácidos constituintes se encontram dispostos, sugerindo que a zeína possui uma estrutura globular em soluções não aquosas (Figura 7). Este arranjo estrutural sugere uma potencial utilização da zeína como material de parede na encapsulação de compostos.

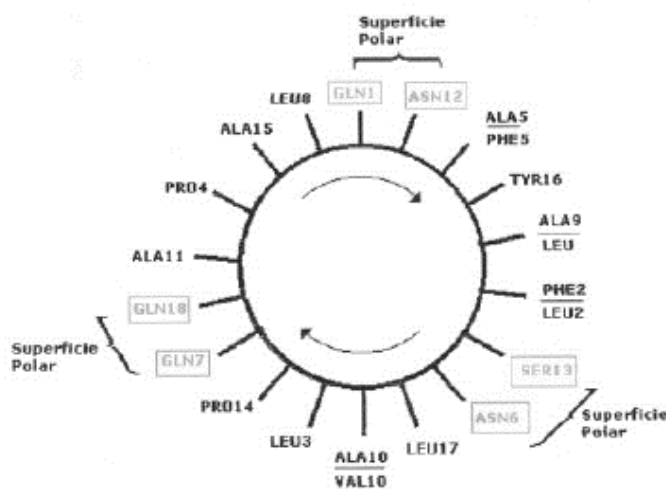


Figura 7- Modelo estrutural da zeína. Fonte: Argos et al., 1982

A reatividade química e a solubilidade de um polímero são determinadas por seus grupos funcionais. Na zeína estão presentes amidas, aminas, carboxilas, hidroxilas e fenóis (Tabela 1). A presença de hidrocarbonetos nas cadeias laterais da zeína, confere insolubilidade em água, mas solubilidade em soluções binárias de água e etanol ou isopropanol (CORRADINI et al., 2004).

Tabela 1- Grupos reativos presentes na zeína

Grupos reativos	Moles/mol de zeína
Amina	1
Amida	53
Carboxila	4
Hidroxila	24
Fenólico	8

Por ser um polímero amorfo, a zeína possui as mais diversas aplicações, como na fabricação de plásticos, adesivos e revestimentos de papel; como revestimento de medicamentos promovendo liberação controlada e inibindo sabores e aromas. Além disso, pode ser utilizado na aplicação em filmes antimicrobianos formando uma barreira de proteção contra umidade, temperatura e oxigênio (SHUKLA & CHERYAN, 2001; CORRADINI et al., 2004).

A encapsulação de compostos isolados de brócolis, como o SFN, utilizando como material de parede um mistura de zeína e quitosana carboximetilada pelo método de coacervação complexa, resultou em cápsulas com morfologia esférica e eficiência de encapsulação variando entre 60 e 70% (LUO et al., 2013).

A encapsulação de SFN pela técnica de spray drying utilizando como materiais de parede misturas de β -ciclodextrina e maltodextrina encontraram eficiência de encapsulação variando entre 12 e 40% (WU et al., 2013). Estes resultados demonstram que os materiais de parede e as técnicas de encapsulação influenciam diretamente os parâmetros dos encapsulados produzidos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

As amostras de brócolis híbrido orgânico (*Brassica oleracea* var. Italica cultivar Legacy) foram adquiridas com um produtor orgânico local do município de Pelotas, RS. Os brócolis foram higienizados com água corrente, retiradas partes machucadas e em seguida foram congelados em ultrafreezer (-76°C) até a sua utilização.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE BRÓCOLIS

A determinação da coloração das amostras de brócolis foi realizada com auxílio de um colorímetro (Minolta), onde foram determinadas a variável L^* (luminosidade), as coordenadas cromáticas a^* (variação de cor entre vermelho e verde) e b^* (variação de cor entre amarelo e azul) e o ângulo Hue (tonalidade).

Para a determinação dos parâmetros de pH, teor de sólidos solúveis e acidez total, 2 g de brócolis liofilizado foi homogeneizado com 45 mL de água destilada. A determinação do pH foi realizada com auxílio de um pHmetro (New Technical Ind. e Com. Brasil). A análise de sólidos solúveis foi realizada com auxílio de um refratômetro digital de mão (modelo PR-32 α , ATAGO®). Por fim, para a determinação da acidez, foi adicionado indicador fenolftaleína na solução de brócolis:água, e em seguida a mistura foi titulada com hidróxido de sódio 0,089 Mol/L até o ponto de viragem do indicador de acordo com a metodologia proposta pela AOAC (1995).

As amostras de brócolis foram também avaliadas quanto à composição centesimal proximal incluindo determinação de umidade, cinzas, fibra bruta, proteína, lipídeos e carboidratos (Instituto Adolfo Lutz, 2008). O valor energético total (VET em kcal/100 g)

foi calculado através da equação $VET = (C \times 4) + (A \times 4) + (B \times 9)$, sendo C: carboidratos, A: proteína total e B: lipídios (USDA, 1963).

4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Para a obtenção do extrato de brócolis, primeiramente, os brócolis foram liofilizados (K108, Liotop, Brasil) por 48 h e, posteriormente, moídos em moinho de bolas (MA305, Marconi, Brasil).

Cinco gramas de brócolis em pó foram homogeneizados com 15 mL de solução hidroalcoólica (etanol:água, 70:30, v/v), e a mistura foi aquecida a 75 °C em banho-maria por 5 min, para inativação enzimática. Embora a mirosinase (enzima) seja importante para a hidrólise de alguns compostos, é necessária a interrupção de sua atividade, após a retirada dos floretes da planta, para a manutenção dos compostos.

A amostra foi então exposta à ultrassom (Quimis, Brasil) por 15 min e centrifugada (Centrifuge 5430R, Eppendorf, Alemanha) a $8232 \times g$ por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e armazenado em tubos de centrífuga, enquanto o pellet foi ressuspenso em 10 mL de solvente, homogeneizado manualmente e submetido a outra etapa de centrifugação nas condições previamente descritas. Os sobrenadantes foram combinados, resultando em um extrato hidroalcoólico de brócolis na concentração de 200 mg/mL, o qual foi armazenado em tubos de centrífuga tipo Falcon a -76 °C até o uso.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

A caracterização do extrato ocorreu com o auxílio de um cromatógrafo líquido (Shimadzu™, Kyoto, Japão) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de vôle (Impact HD, Bruker Daltonics™, Bremen, Alemanha). Para a separação dos compostos foi utilizada uma coluna Bidentate C18 (100 mm × 2,1 mm) (MicroSolv Technology Corporation™, Leland, NC, EUA). Como fases móveis utilizou-se água acidificada com 0,1 % de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila acidificada 0,1 % de ácido fórmico (solvente B).

O gradiente de eluição iniciou com 5% de solvente B e foi aumentado para 75% de B em 20 min e mantido por 5 min, em seguida as condições iniciais foram reestabelecidas em 1 min mantendo-se a 5% de solvente B durante 4 min. O volume de injeção foi de 10 µL com um fluxo de 0,2 mL min⁻¹ a uma temperatura da coluna de 40°C (DE VOS et al., 2007).

O espectrômetro de massas foi calibrado com formiato de sódio (10m Mol/L) e operado no modo de ionização negativa, utilizando-se como faixa de varredura de massas de m/z 50 a 1200. Os parâmetros de aquisição foram: voltagem do capilar em 4 kV, pressão do gás de nebulização (N₂) de 2 bar, fluxo do gás de secagem 8 L min⁻¹, temperatura da fonte de 180°C, colisão de RF de 150 Vpp; transfer 70 mS e armazenamento pré-pulso de 5 mS. Os valores de energia de colisão foram ajustados para m/z 100, 15 eV; m/z 500, 35 eV; m/z 1000, 50 eV, usando nitrogênio como gás de colisão.

4.5 ENCAPSULAÇÃO DOS EXTRATOS

Para a encapsulação utilizou-se uma estação de *electrospinning* horizontal contendo fonte de alta tensão com corrente contínua (INSTOR – Projetos & Robótica, Brasil), bomba de infusão (KD Scientific, EUA) e coletor metálico revestido com alumínio. Foram produzidas cápsulas (*electrospraying*) e fibras (*electrospinning*) utilizando zeína como material de parede.

A produção das cápsulas foi realizada da seguinte maneira: primeiramente foi preparada uma solução polimérica, utilizando zeína 9% (p/v) dissolvida em etanol 70%, em seguida, essa solução foi agitada constantemente por 1 h com o auxílio de um agitador magnético (Fisotom, modelo 752/6, Brasil). O extrato hidroalcóolico de brócolis foi então misturado à solução de zeína em tubos de centrífuga de 2 mL, nas proporções de 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 45:55, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 (extrato:zeína, v:v). Em seguida, cada solução foi transferida para uma seringa de 1 mL acoplada a um injetor com fluxo de 1 mL/h, com uma distância de 10 cm entre a ponta da agulha e o coletor de metal. As tensões utilizadas foram +16 kV (na ponta da agulha) e -8 kV (no coletor metálico). O extrato encapsulado foi coletado em coletor de metal coberto por folha de alumínio. As diferentes concentrações de extrato em relação a zeína foram determinadas por meio de testes preliminares, onde levou-se em consideração a saturação dos sítios ativos.

A produção das fibras foi realizada da seguinte maneira: primeiramente foi preparada uma solução polimérica para compor o material da parede, utilizando zeína 30% (p/v) dissolvida em etanol 70%, em seguida, essa solução foi agitada constantemente por 1 h com o auxílio de um agitador magnético (Fisotom, modelo

752/6, Brasil). O extrato hidroalcolólico de brócolis foi então misturado à solução de zeína em tubos de centrífuga de 2 mL, nas proporções de 20:80, 25:75, 30:70, 35:65, 40:60 e 50:50 (extrato:zeína, v:v). Em seguida, cada solução foi transferida para uma seringa de 1 mL acoplada a um injetor com fluxo de 1,2 mL/h, com uma distância de 25 cm entre a ponta da agulha e o coletor de metal. As tensões utilizadas foram +19 kV (na ponta da agulha) e -3 kV (no coletor metálico). O extrato encapsulado foi coletado em coletor de metal coberto por folha de alumínio. As diferentes concentrações de extrato em relação a zeína foram determinadas por meio de testes preliminares, onde levou-se em consideração a saturação dos sítios ativos.

4.5.1 CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS

A condutividade elétrica das soluções poliméricas com diferentes proporções de extrato de brócolis e zeína foram determinadas com auxílio de um condutivímetro (Medidor COM500) e expressa em $\mu\text{S}/\text{cm}$.

4.5.2 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE)

A eficiência de encapsulação foi determinada pelo conteúdo de compostos fenólicos usando espectrofotometria. Para isto, 1 mg de cada cápsula de extrato de brócolis (10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 45:55, 60:40, 70:30, 80:20 e 90:10, extrato:zeína, v:v) e de cada fibra de extrato de brócolis (20:80, 25:75, 30:70, 35:65, 40:60, 50:50, extrato:zeína, v:v) foi lavado com 200 μL de água ultrapura para remover compostos fenólicos não encapsulados retidos na superfície da cápsula ou fibra, e subsequentemente centrifugado (Centrifuge 5430R, Eppendorf, Alemanha) a 8232 x g e 4 °C por 5 min. Os compostos fenólicos

presentes no extrato de brócolis têm afinidade com a água deionizada, enquanto a zeína (material da parede) é mais hidrofóbica. Por esse motivo, a lavagem da cápsula ou fibra com água permitiu a retirada de compostos retidos na superfície externa da cápsula sem promover seu rompimento, minimizando assim possíveis erros de leitura.

O sedimento foi ressuspenso em 200 µL de etanol:água (70:30, v:v), e a mistura foi centrifugada novamente nas mesmas condições, a fim de determinar a concentração de compostos fenólicos retidos dentro das cápsulas e fibras. Uma alíquota do sobrenadante foi analisada em espectrofotômetro de acordo com o método descrito por Swain e Hills (1959). A EE foi expressa em porcentagem e calculada de acordo com a equação descrita abaixo:

$$\text{Eq. EE (\%)} = \text{CFT} - \text{CFI} / \text{CFT} \times 100$$

Onde:

CFT - Compostos fenólicos totais de extrato de brócolis

CFI - Compostos fenólicos retidos no interior das cápsulas e fibras após remoção dos compostos presentes na superfície

4.5.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A análise de FTIR foi realizada utilizando um espectrômetro FTIR IRAffinity-1, Shimadzu, resolução 400 – 4000 cm⁻¹. Uma quantidade de amostra suficiente para cobrir o cristal do equipamento foi adicionada e 32 varreduras foram realizadas.

4.5.4 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

Para a análise de DSC, 1 mg de amostra foi colocada em cadinhos de alumínio

fechados não herméticos. Posteriormente as amostras foram aquecidas com uma taxa de $0,5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, na faixa de 30 a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob fluxo de nitrogênio (50 mL min^{-1}).

4.5.5 ANÁLISE DE TERMOGRAVIMETRIA (TGA)

As propriedades térmicas das amostras foram avaliadas com auxílio de um equipamento termogravimétrico (TGA, TA-60WS, Shimadzu, Kyoto, Japão). Para isto foram pesadas em cápsula de platina 0,5 a 1 mg das cápsulas de extrato de brócolis/zeína e após submetidas a aquecimento até 600°C com uma taxa de aquecimento de $50^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e fluxo de nitrogênio de 50 mL min^{-1} . Para controle foi utilizada uma cápsula de platina vazia.

4.5.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA ACOPLADA A SISTEMA DE ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (MEV/EDS)

A avaliação da morfologia superficial das cápsulas e fibras de extrato de brócolis ocorreu com auxílio de um microscópio eletrônico de varredura JSM6610LV (Jeol) (MEV). As amostras foram metalizadas com ouro utilizando uma corrente de 20 mA, por 120 s, a voltagem de aceleração utilizada foi de 10 keV e faixa de magnificação variou de 30 a 300.000 vezes, as imagens obtidas foram de 12000 x e 50000 x. A determinação da composição qualitativa e semi quantitativa dos elementos presentes na região atingida pelo feixe de elétrons foi avaliada pelo equipamento de espectroscopia de energia dispersiva de raios-X, JSM6610LV (Jeol).

4.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Após a produção e caracterização das cápsulas e fibras de extrato de brócolis pelas técnicas de *electrospraying* e *electrospinning*, optou-se pela escolha de um dos encapsulados para dar segmento a determinação das atividades biológicas *in vitro*. O encapsulado escolhido foi a cápsula produzida por *electrospraying* na concentração 50:50 (extrato:zeína, v:v) devido a sua maior eficiência de encapsulação, estabilidade térmica e morfologia, quando comparada com os demais tratamentos produzidos pela técnica de *electrospraying*. As fibras não foram utilizadas nestes ensaios, pois, devido a sua característica morfológica, poderiam formar um filme e assim obstruir os poços das placas utilizadas nos ensaios biológicos.

4.6.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.6.1.1 ATIVIDADE DE ELIMINAÇÃO DE RADICAIS DE DPPH

A capacidade de doação de átomos de hidrogênio pelos compostos presentes no extrato de brócolis encapsulado e não encapsulado pelo método de DPPH foi determinada pelo método de Vinholes et al. (2011) adaptado do método de Brand-Williams et al. (1995). Para isto, 25 µL de cada amostra (extrato de brócolis não encapsulado e extrato de brócolis encapsulado na proporção 50:50) foram adicionados a uma microplaca de 96 poços, bem como 250 µL de solução de DPPH 0,6 mM. As placas foram incubadas no escuro por 30 min e posteriormente analisadas em espectrofotômetro de microplacas (SpectraMax 190, Molecular Devices, EUA), no comprimento de onda de 515 nm.

4.6.1.2 ATIVIDADE DE ELIMINAÇÃO DE RADICAIS HIDROXILA

A capacidade de eliminação do radical hidroxila foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Vinholes et al. (2011), com adaptações. Para este propósito, foram adicionados em microplacas de 96 poços, 25 µL de cada amostra (extrato de brócolis não encapsulado e extrato de brócolis encapsulado na proporção 50:50), 110 µL de solução de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (8 mM), 50 µL de solução de H_2O_2 (7,18 mM) e 74,2 µL de solução de ácido salicílico (3 mM). As placas foram agitadas manualmente e incubadas por 30 min a 37°C dentro de um espectrofotômetro (SpectraMax 190, Molecular Devices, EUA). Posteriormente, a leitura foi feita no comprimento de onda de 515 nm.

4.6.1.3 ATIVIDADE DE ELIMINAÇÃO DO RADICAL ÓXIDO NÍTRICO

A capacidade de eliminação do óxido nítrico foi determinada de acordo com o procedimento descrito por Vinholes et al. (2011). Usando uma placa de 96 poços, 50 µL de nitroprussiato de sódio (SNP, 20 mM) foram adicionados a 50 µL da amostra (extrato de brócolis não encapsulado e extrato de brócolis encapsulado na proporção 50:50). A mistura foi incubada a 22 °C sob luz durante 60 min. Em seguida, foram adicionados 50 µL de solução de ácido fosfórico a 2% e 50 µL de reagente de Griess. A microplaca foi incubada por 10 min a 22 °C no abrigo da luz, e então lida em um espectrofotômetro de microplaca (SpectraMax 190, Molecular Devices, EUA), em um comprimento de onda de 562 nm.

4.6.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A determinação do efeito antimicrobiano do extrato de brócolis não encapsulado e do extrato de brócolis encapsulado (50:50, extrato:zeína, v:v) foi realizada por meio de três metodologias: disco difusão, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Foram testados os efeitos antimicrobianos sobre as cepas padrão das espécies de bactérias *Salmonella* Typhimurium (ATCC 13311), *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832).

4.6.2.1 REATIVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

A reativação dos microrganismos utilizados no estudo foi realizada da seguinte maneira: uma alçada de cada bactéria foi transferida para tubos individuais contendo caldo Soja Trypticaseína e incubadas em estufa durante 24 h a 37 °C. Após uma alçada de cada crescimento foi estriada em placas de Petri com meios seletivos, sendo ágar Entérico Hektoen para *S. Typhimurium*, ágar Eosina Azul de Metileno para *E. coli*, ágar Oxford para *L. monocytogenes* e ágar Baird-Parker para *S. aureus*, e incubadas por 24 h a 37 °C, para o isolamento das colônias.

Após o crescimento, foram extraídas uma alçada de cada bactéria e ressuspensas em solução salina (NaCl 0,85%), a qual foi padronizada na concentração 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.6.2.2 DISCO DIFUSÃO

Para a determinação do diâmetro do halo de inibição do extrato de brócolis não encapsulado frente as cepas bacterianas, foi realizada a análise de disco difusão de acordo com protocolo proposto pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (CLSI, 2015). Para isto, a solução salina padronizada contendo o inóculo foi semeada com auxílio de um swab estéril na superfície de placas contendo ágar Muller-Hinton. Em seguida foram adicionados discos de papel filtro esterilizados com diâmetro de 6 mm. Após, 10 µL do extrato de brócolis não encapsulado foram impregnados sobre os discos de papel e as placas incubadas por 24 h a 37 °C. Logo após este período foi efetuada a medição dos halos de inibição, sendo os resultados expressos em centímetros.

4.6.2.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada de acordo com o método descrito por Cabral et al. (2009) com pequenas modificações. Para isto, foram adicionados em uma microplaca de 96 poços: 180 µL de caldo BHI, 20 µL de inóculo bacteriano e amostras de extrato de brócolis não encapsulado e extrato de brócolis encapsulado (50:50, extrato:zeína, v:v) em cinco diferentes concentrações (200, 100, 50, 1 e 0,1 mg/mL). Após as placas foram avaliadas em espectrofômetro (Biochrom EZ Read 400) a 620 nm. Em seguida, procedeu-se a incubação por 24 h a 37 °C, e após, foi realizada nova leitura em espectrofotômetro. A CIM foi considerada como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano no meio de cultura e os resultados foram expressos em mg/mL.

4.6.2.4 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA

Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada de acordo com o método descrito por Cabral et al. (2009) com pequenas modificações. Dos poços que apresentaram inibição de crescimento bacteriano na análise de CIM, foram retirados 15 μ L e estriados em placas de Petri com ágar BHA (*Brain Heart Infusion Agar*) e incubados por 24 h a 37 °C. Foi considerada a mínima concentração bactericida as placas onde não houve crescimento bacteriano. Os resultados foram expressos em mg/mL.

4.6.3 POTENCIAL ANTIHIPERGLICEMIANTE

O potencial antihyperglicemiante do extrato de brócolis não encapsulado e do extrato de brócolis encapsulado (50:50, extrato:zeína, v:v) foi determinado por meio da inibição das enzimas digestivas α -amilase e α -glicosidase. A fim de comparação, foi realizado um controle com acarbose (medicamento usualmente utilizado no controle das enzimas por pacientes portadores de DMII) na mesma concentração dos extratos.

4.6.3.1 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA α -AMILASE

O potencial de inibição da α -amilase foi determinado de acordo com o método proposto por Satoh et al. (2015), com algumas modificações. Foram adicionadas em microplacas de 96 poços, 15 μ L de amostra (extrato de brócolis não encapsulado e extrato de brócolis encapsulado na proporção 50:50), 50 μ L de tampão de fosfato (pH 7,0) e 12,5 μ L da enzima α -amilase pancreática porcina (241,71 U/mL, Sigma Aldrich). A placa foi então incubada em espectrofotômetro de microplaca (SpectraMax 190,

Molecular Devices, EUA) por 5 min a 37 °C. Em seguida, 62,5 µL de amido solúvel foram adicionados como substrato, e a mistura foi incubada por 15 min a 37 °C. Posteriormente, 12,5 µL de HCl 1 M foram adicionados para interromper a reação. Finalmente, 25 µL de solução de iodo (0,005 M) e iodeto de potássio (0,005 M) foram adicionados. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax 190, Molecular Devices, EUA), no comprimento de onda de 690 nm.

4.6.3.2 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA α -GLICOSIDASE

A atividade inibitória da α -glucosidase foi avaliada usando o procedimento descrito por Vinholes et al. (2011), com algumas modificações. Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 10 µL da amostra (extrato de brócolis não encapsulado e extrato de brócolis encapsulado na proporção 50:50) e 50 µL de uma solução de substrato de p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo 3,25 mM (diluída em tampão de fosfato, pH 7.0). Em seguida, foram adicionados 50 µL da enzima α -glucosidase (9,37 U/mL, diluída em tampão fosfato, pH 7,0; Sigma Aldrich) e a placa foi incubada em espectrofotômetro de microplaca (SpectraMax 190, Molecular Devices, EUA) a 37 °C por 10 min. Finalmente, a leitura da absorvância foi realizada a 405 nm.

4.6.4 SIMULAÇÃO DA DIGESTÃO BIOLÓGICA

4.6.4.1 PREPARO DA AMOSTRA

Para realizar a avaliação da digestão biológica *in vitro*, 500 µL de extrato de brócolis não encapsulado foram liofilizados (K108, Liotop, Brasil) por 48 horas para remoção do solvente. Após a liofilização, o extrato de brócolis não encapsulado e 100

mg de extrato de brócolis encapsulado foram homogeneizados com 2 mL de água deionizada, resultando em soluções com concentrações finais de 50 mg/mL. Destas soluções, alíquotas de 600 µL foram removidas para serem usadas como controles não digeridos. As simulações de digestão foram realizadas em condições semelhantes às da boca, estômago e intestino, de acordo com o método proposto por Gião et al. (2012).

4.6.4.2 SIMULAÇÃO DA DIGESTÃO NA BOCA

As amostras foram misturadas com 600 µL de solução de enzima α -amilase de saliva humana (100 U/mL; tipo 105 IX-A, Sigma-Aldrich, CAS 9000-90-2) e manualmente agitadas em um banho de aquecimento (Heidolph, Alemanha) a 37 °C durante 1 min. Em seguida, uma alíquota de 600 µL foi retirada para avaliação da digestão em condições semelhantes às da boca, por meio de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa. O resto da solução foi usado para as próximas etapas da digestão.

4.6.4.3 SIMULAÇÃO DA DIGESTÃO NO ESTÔMAGO

A solução produzida por simulação de digestão na boca teve seu pH ajustado para 2 com HCl (1 M). Depois disso, 750 µL de solução de pepsina de enzima gástrica suína (25 mg/mL em 1 M HCl; Sigma Aldrich, CAS 9001-75-6) foram adicionados e a reação foi agitada manualmente em um banho de aquecimento (Heidolph, Alemanha) a 37 °C durante 60 min. Em seguida, foram retirados 600 µL para avaliação da digestão no

estômago, por meio de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. A solução restante foi reservada para a próxima etapa da digestão.

4.6.4.4 SIMULAÇÃO DA DIGESTÃO NO INTESTINO

O pH da solução produzida pela simulação da digestão no estômago foi ajustado para 6 com NaHCO_3 (1 M). Em seguida, foram adicionados 375 μL de solução enzimática de pancreatina porcina (2 g/L em NaHCO_3 1 M; Sigma Aldrich, CAS 8049-47-6) e solução de sais biliares (12 g/L em NaHCO_3 1 M; Sigma Aldrich), sendo então manualmente agitado em um banho de aquecimento (Heidolph, Alemanha) a 37 °C por 60 min. Em seguida, foram retirados 600 μL para avaliação da digestão no intestino, por meio de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa.

4.6.4.5 AVALIAÇÃO DA DIGESTÃO BIOLÓGICA

Após simular diferentes condições de digestão, todas as frações foram liofilizadas (K108, Liotop, Brasil) por 48 h, a fim de evitar possíveis degradações enzimáticas excessivas. Em seguida, os produtos secos foram ressuspensos em 600 μL de etanol:água, 70:30 (v/v) e avaliados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa nas mesmas condições utilizadas para a caracterização inicial do extrato.

Cada fração (não digerida, boca, estômago e intestino) do extrato de brócolis encapsulado e do extrato de brócolis não encapsulado também foi avaliada quanto a atividade antioxidante (DPPH, hidroxila e óxido nítrico) e antihiperglicemiante (α -amilase e α -glicosidase) de acordo com as metodologias descritas anteriormente.

4.6.5 ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE EM ASTRÓCITOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da instituição, sob o protocolo CEEA 31292-2018. O uso dos animais está de acordo com as Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e Uso de Animais de Pesquisa em Ciências (DBCA) e de acordo com o Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA).

A cultura primária de astrócitos foi realizada conforme descrito por Pedra et al. (2018). Astrócitos coletados do córtex de ratos Wistar neonatos (1-2 dias) foram cultivados em meio de cultura Dulbecco *modification of minimum essential media* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (pH 7,6), mantidos sob condições padrões de cultivo em incubadora de CO₂ (5%), a 37 °C, sob atmosfera umidificada e incubados de 15 a 20 dias para a devida maturação. As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 3x10⁴ células por poço e tratadas com o extrato de brócolis não encapsulado (previamente liofilizado e ressuscitado em DMSO) e com extrato de brócolis encapsulado (50:50, extrato:zeína, v:v) nas concentrações de 300 e 400 µg/mL por 72 h. Para isso, o extrato de brócolis não encapsulado foi liofilizado para a secagem completa do solvente, evitando possíveis interferências, em seguida, tanto o extrato encapsulado quanto o não encapsulado foram ressuscitados em dimetilsulfóxido P.A (DMSO), agitado em vórtex por 1 min e aplicado nas células. Ressalta-se que o DMSO não promoveu o rompimento da cápsula, sendo utilizado apenas como veículo para a aplicação. As células tratadas com DMEM 10% FBS e cápsulas de zeína sem a adição de extrato

foram utilizadas como controle. Transcorrido o tempo, as placas foram submetidas a análise de viabilidade celular.

A análise da viabilidade celular foi realizada segundo o método de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolium (MTT), no qual a solução de MTT (solução estoque estéril de 5 mg/mL) foi acrescentada ao meio DMEM e adicionada nas placas de 96 poços na concentração final de 0,5 mg/mL. As células foram mantidas durante 90 min a 37 °C numa atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. O meio foi então removido e as placas foram agitadas com dimetilsulfóxido. A absorbância foi medida em leitor de microplacas a 492 nm (SILVEIRA et al., 2017).

4.6.6 ATIVIDADE ANTITUMORAL EM GLIOMA

A linhagem de glioma GL261 obtida da ATCC (*American Type Culture Collection* - Rockville, Maryland, USA) foi cultivada em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (pH 7,4) e mantida sob condições padrão de cultivo em incubadora de CO₂ (5%), a 37 °C e atmosfera umidificada. Após atingirem uma confluência de 90%, as células de glioma foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de 5×10^3 células por poço e tratadas com extrato de brócolis não encapsulado e extrato de brócolis encapsulado (50:50, extrato:zeína, v:v) nas concentrações de 50, 100, 200, 300 e 400 mg/mL durante 48 e 72 horas. Assim como na análise de citotoxicidade, o extrato de brócolis não encapsulado foi liofilizado, e após ambos os extratos foram ressuspensos em DMSO. Células tratadas com DMSO e cápsulas de zeína sem adição de extrato de brócolis foram usadas como controle. Após as amostras foram submetidas a teste de viabilidade celular.

A análise da viabilidade celular foi realizada segundo o método de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium (MTT), no qual a solução de MTT (solução estoque estéril de 5 mg/mL) foi acrescentada ao meio DMEM e adicionada nas placas de 96 poços na concentração final de 0,5 mg/mL. As células foram mantidas durante 90 min a 37 °C numa atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. O meio foi então removido e as placas foram agitadas com dimetilsulfóxido. A absorbância foi medida em leitor de microplacas a 492 nm (SILVEIRA et al., 2017).

4.6.7 ATIVIDADE NEUROPROTETORA *IN VITRO*

A avaliação do potencial neuroprotetor do extrato de brócolis não encapsulado e do extrato de brócolis encapsulado (50:50, extrato:zeína, v:v) foi realizada por meio da exposição da cultura primária de astrócitos ao lipopolissacarídeo (LPS) segundo Bellaver et al. (2015).

Para isto, as culturas de astrócitos foram submetidas ao protocolo de prevenção, no qual as células foram pré-incubadas com diferentes concentrações do extrato de brócolis não encapsulado e do extrato de brócolis encapsulado (mesmas concentrações da citotoxicidade e do ensaio antitumoral) e diluídas em DMEM durante 48 h. Após, estas culturas foram expostas ao LPS (1 µg/mL) durante 3 h. As células mantidas apenas em DMEM 10% de SFB foram consideradas como controle. Após a exposição ao LPS foi realizada a análise da viabilidade celular.

4.6.7.1 VIABILIDADE CELULAR

A análise da viabilidade celular foi realizada segundo o método de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolium (MTT), no qual a solução de MTT (solução estoque estéril de 5 mg/mL) foi acrescentada ao meio DMEM e adicionada nas placas de 96 poços na concentração final de 0,5 mg/mL. As células foram mantidas durante 90 min a 37 °C numa atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. O meio foi então removido e as placas foram agitadas com DMSO. A absorbância foi medida em leitor de microplacas a 492 nm (SILVEIRA et al., 2017).

4.6.7.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

A formação de EROS foi determinada de acordo o método de Ali et al. (1992). A geração intracelular de EROS foi determinada usando o ensaio de 2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA), onde este reage com as EROS e, por consequência, emite fluorescência. As células intactas foram incubadas com 1 µM de DCFH-DA em meio sem soro por 30 min a 37 °C. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e a fluorescência foi determinada em um leitor de microplacas a 485 e a 520 nm. A produção de EROS foi relatada como a porcentagem de células não tratadas (controle).

4.6.7.3 DETERMINAÇÃO DE NITRITOS

A produção de ON foi determinada indiretamente medindo o nível acumulado de nitrito (indicador de ON) no sobrenadante após 48 h de tratamento com LPS com ou sem diferentes concentrações de extrato de brócolis encapsulado e não encapsulado, usando uma reação colorimétrica com reagente de Griess (STUEHR & NATHAN,

1989). Para isto, foram adicionados 100 µL de sulfanilamida em ácido fosfórico a 5% foram adicionados a 100 µL de sobrenadantes da cultura de células. Após a mistura dos reagentes, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 10 min para que ocorresse uma reação correta. Posteriormente, as amostras foram misturadas com 100 µL de reagente de Griess (0,1% de dicloridrato de N- [1-naftil] etilenodiamina) e incubadas por 10 min no escuro. A absorbância foi medida a 540 nm usando um leitor de microplacas de 96 poços, e a quantidade de nitrito no sobrenadante foi comparada a uma curva padrão de concentrações conhecidas de nitrato de sódio.

4.6.7.4 ENSAIO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade da SOD foi medida nos lisados celulares de acordo com o método proposto por Misra e Fridovich (1972). Este método é baseado na inibição da auto-oxidação da adrenalina dependente de superóxido em um espectrofotômetro ajustado a 480 nm. A atividade específica da SOD foi relatada em porcentagem do controle.

4.6.7.5 ENSAIO DA CATALASE (CAT)

A atividade de CAT baseada na decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) monitorada a 240 nm à temperatura ambiente foi realizada de acordo com Aebi (1984). A atividade de CAT foi relatada em porcentagem do controle.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A caracterização das amostras de brócolis utilizadas para a preparação dos extratos está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 - Caracterização das amostras de brócolis

Parâmetros	média ± desvio padrão
L*	45,8±3,7
a*	- 14,6±0,9
b*	22,2±0,1
Hue°	123,3±0,0
pH	6±0,0
Acidez total (%)	7,6±0,1
Sólidos solúveis (g/100g)	4,9 ±0,0
Cinzas*	26,1±2,1
Lipídios*	2,7±0,0
Proteínas*	22,4±0,1
Fibras*	9,6±0,7
Carboidratos*	49,1±0,0
VCT (Kcal/100g)	30,4±0,0

*Resultados expressos em base seca (%), umidade da amostra: 89,9%,

Os brócolis avaliados apresentavam coloração esverdeada confirmando a colheita no ponto ideal de maturação, indicando ausência da degradação da clorofila que promove o amarelecimento dos floretes (ARTÉS et al., 2001; ABLE et al., 2002; REIS et al., 2015). Os brócolis apresentaram pH 6, similar a faixa encontrada em outros estudos (4,7 a 6,5). A acidez total foi de 7,6%, confirmando a tendência ácida das amostras, coerente com a literatura (valores próximos a 10%). O teor de sólidos

solúveis foi de 4,9 g/100g, similar aos demais estudos (ARTÉS et al., 2001; REIS et al., 2015; ZAMBELLI et al., 2017).

Os teores de umidade, proteínas, lipídios, carboidratos e valor calórico total encontrados no presente estudo foram similares aos relatados na literatura. O conteúdo de cinzas foi superior (26%, enquanto a literatura apresenta valores próximos a 10%), e o de fibras inferior (9%, enquanto a literatura reporta valores que variam entre 11% e 51%) (CAMPAS-BAYPOLI et al., 2009; STORCK et al., 2013; REIS et al., 2015; ASHOUSH et al., 2017).

Diversos fatores podem afetar a composição das plantas, tais como a disponibilidade de nutrientes no solo, a irrigação, a luminosidade do sol, a temperatura ambiente, estresses, estágio de desenvolvimento da planta e diferenças entre os genótipos que alteram a síntese e o acúmulo dos compostos (ARTES et al., 2001; VALLEJO et al., 2003; CHARRON et al., 2005; FRANCISCO et al., 2011; REIS et al., 2015; ZAMBELLI et al., 2017).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE BRÓCOLIS

Estudos que visam extrair glicosinolatos de brócolis utilizam como solvente metanol ou uma mistura de metanol e água na proporção 70:30 (metanol:água, v:v), pois este solvente promove uma extração mais efetiva destes compostos. Entretanto, como o presente trabalho teve o objetivo de aplicar o extrato de brócolis em um modelo biológico, não seria possível realizar a extração com metanol em razão de seu efeito tóxico no organismo. Por este motivo optou-se pela utilização de solventes não tóxicos como uma mistura de etanol:água na proporção 70:30. Após a avaliação dos

resultados, observa-se que esta mistura de solvente não promove uma extração tão efetiva de glicosinolatos quanto a utilização de metanol.

Este resultado pode ser explicado com base na série eluotrópica, pois o etanol possui polaridade de 0,88 e a água acima de 1, não interagindo totalmente com as porções polares e apolares da estrutura dos glicosinolatos. A mistura de água e etanol altera a polaridade da solução, que fica com valores similares ao do metanol utilizado nos demais estudos (0,95), permitindo uma maior interação com as porções da estrutura, pois esta possui uma polaridade intermediária (TORRES-CONTRERAS et al., 2017; THOMAS et al., 2018).

Os glicosinolatos encontrados no extrato foram glicobrassicina, neoglucobrassicina, 4-methoxiglucobrassicina e 5-methoxiglucobrassicina (Tabela 3). A glicobrassicina é considerada o principal glicosinolato presente nos brócolis, seguido por 4-hidroxiglucobrassicina, gluconasturtiina, glucoerucina, progoitrina e gluconapina que não foram extraídos com os solventes utilizados no nosso estudo. Observa-se também a presença de compostos fenólicos e ácidos orgânicos similares ao encontrados na literatura (VILLARREAL-GARCÍA & JACOBO-VELÁZQUEZ, 2016; TORRES-CONTRERAS et al., 2017; THOMAS et al., 2018).

A concentração de glicosinolatos nos extratos do presente estudo variou de 87,5 a 339,8 µg/g, resultado similar a faixa relatada na literatura de 183 a 577 µg/g. Apesar da concentração de glicosinolatos variar devido a diferenças de fatores climáticos, solo, genótipo e estágio de desenvolvimento das plantas, o solvente utilizado para a extração dos compostos é fator primordial na obtenção de maiores concentrações desses compostos (WANG et al., 2012; BAENAS et al., 2012; THOMAS et al., 2018).

Tabela 3-Identificação dos compostos presentes nos extratos de brócolis por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

Compostos	Fórmula molecular	RT	<i>m/z</i> mensurado	<i>m/z</i> teórico	Erro (ppm)	mSigma	CE (eV)	Fragmento de íon (<i>m/z</i>)	µg/g*
Ácido glucônico	C ₆ H ₁₂ O ₇	1,51	195,0510	195,0513	-1,6	25,8	19,8	195,0510 (100) 87,0077 (91) 99,0086 (76) 129,0196 (42)	9,0±1,5
Ácido málico	C ₄ H ₆ O ₅	1,73	133,0142	133,0143	-0,4	14,2	16,7	115,0035 (100)	58,2±5,8
Ácido ascórbico	C ₆ H ₈ O ₇	1,83	175,0248	175,0246	1,2	20,5	18,8	87,0091 (100) 115,0035 (37)	12,3±1,6
Ácido cítrico/ ácido isocítrico	C ₆ H ₈ O ₇	2,53	191,0187	191,0197	5,2	36,4	15,6	147,0293 (100) 130,9980 (45) 87,0082 (32)	10,7±0,3
Ácido clorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	5,36	353,0865	353,0878	3,40	67,1	27,7	191,0552 (100) 179,0344 (63) 135,0451 (49)	38,2±5,0
Glucobrassicina	C ₁₆ H ₁₉ N ₂ O ₉ S ₂	5,71	447,0532	447,0528	1,0	54,6	32,4	96,9597 (100) 95,9519 (69) 98,9550 (4)	116,8±12,7
Ácido 4-hidroxibenzoico	C ₁₃ H ₁₆ O ₈	5,97	299,0764	299,0772	2,8	53,1	15,0	137,0242 (100) 93,0341 (23)	41,3±4,5
Ácido clorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	6,36	353,0865	353,0878	3,40	67,1	27,7	191,0552 (100) 179,0344 (64) 135,0451 (49)	6,8±0,5
4-methoxy-glucobrassicina	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₁₀ S ₂	6,65	477,0634	477,0634	0,8	62,4	32,4	96,9598 (100) 95,9515 (66)	120,2±13,6
1-O-sinapoil-β-D-glucose	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₀	6,95	385,1130	385,1140	2,8	74,6	29,3	205,0496 (100) 223,0599 (40)	23,1±5,0

Neoglucobrassicina	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₁₀ S ₂	7,16	477,0634	477,0643	2,50	66,1	33,9	96,9598 (100) 95,9515 (35)	87,5±7,7
5-methoxy-glucobrassicina	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₁₀ S ₂	7,70	477,0634	477,0634	0,8	62,4	32,4	96,9598 (100) 95,9515 (66)	339,8±9,5
Ácido cumárico†	C ₉ H ₈ O ₃	8,49	163,0391	163,0401	6,0	58,1		-	0,7±0,0
Ácido sinápico†	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	9,06	223,0597	223,0612	6,50	40,1		-	2,6±0,1
Ácido ferúlico†	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	9,12	193,0491	193,0506	8,0	89,1		-	7,7±0,2

RT, tempo de retenção (minutos); mSigma (ajuste entre o padrão isotópico medido e teórico, quanto menor o valor mSigma, melhor o ajuste isotópico); CE, energia de colisão (eV); † Confirmado com padrão.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS CÁPSULAS E FIBRAS

5.3.1 CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS

A condutividade elétrica das soluções poliméricas é diretamente influenciada pelo solvente, pela concentração do polímero e pela disponibilidade de compostos ionizáveis (BHARDWAJ & KUNDU, 2010). As soluções de extrato de brócolis e de zeína 9% (Tabela 4) apresentaram valores similares entre si, o mesmo ocorreu com os tratamentos utilizando zeína 30% (Tabela 5). O extrato de brócolis apresentou maior condutividade do que a zeína 9% e menor condutividade do que a zeína 30%. As cápsulas apresentaram aumento da condutividade conforme ocorreu aumento da concentração de extrato, enquanto nas fibras, conforme se aumentou a concentração de extrato ocorreu uma diminuição na condutividade.

Tabela 4 - Condutividade elétrica das soluções poliméricas de extrato de brócolis e zeína 9% em diferentes proporções

Solução polimérica (extrato:zeína; v:v)	Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
Extrato de brócolis	645
0:100	591
10:90	601
20:80	607
30:70	610
40:60	612
45:55	614
50:50	614
60:40	620
70:30	625
80:20	630
90:10	637

O aumento nas proporções de extrato em relação à zeína promoveu o aumento da condutividade elétrica das soluções poliméricas em ambas as concentrações de zeína (9 e 30%), entretanto isto não afetou a formação de jatos contínuos durante o processo

de encapsulação, promovendo a formação de cápsulas e fibras com alta incorporação do extrato (EVANGELHO et al., 2018).

Tabela 5 - Condutividade elétrica das soluções poliméricas de extrato de brócolis e zeína 30% em diferentes proporções

Solução polimérica (extrato:zeína; v:v)	Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
Extrato de brócolis	645
0:100	800
20:80	843
25:75	809
30:70	785
35:65	765
40:60	715
50:50	698

5.3.2 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A eficiência de encapsulação é influenciada pelo material de parede e pelo método de encapsulação (WU et al., 2013). Não foram encontrados estudos que objetivaram encapsular extrato de brócolis utilizando as técnicas de *electrospraying* e *electrospinning*. Baseado nisto, a comparação da eficiência de encapsulação foi realizada com estudos que encapsularam extrato de brócolis ou sulforafano (SFN - isotiocianato extraído do brócolis) pelas técnicas de coacervação complexa ou *spray drying* utilizando diversos materiais de parede (LUO et al., 2013; WU et al., 2013; WU et al., 2014; GARCIA-SALDANA et al., 2015; TIAN et al., 2015).

Avaliando a eficiência de encapsulação, observa-se que quanto menor o conteúdo de zeína em relação ao extrato, menor a eficiência de encapsulação das cápsulas e fibras devido a saturação dos sítios ativos da zeína. A eficiência de encapsulação do extrato de brócolis com zeína pela técnica de *electrospraying* variou de 86,9% a 99,3% (Tabela 6) conforme a proporção entre os componentes. A eficiência de encapsulação

de SFN, um isotiocianato derivado dos glicosinalatos, encapsulado pela técnica de *spray drying* utilizando goma arábica, maltodextrina, κ -carragenina; maltodextrina/goma arábica (25:75), goma arábica/ β -ciclodextrina (2:5), proteína de soja isolada; maltodextrina; hidroxipropil/ β -ciclodextrina; soro fetal bovino e quitosana carboximetilada variou de 5,3% a 79,2% (WU et al., 2013; WU et al., 2014; TIAN et al., 2015). Enquanto a encapsulação do composto pela técnica de coacervação simples ou complexa utilizando como material de parede zeína, zeína/quitosana carboximetilada, goma arábica/gelatina, gelatina/pectina apresentou eficiência de encapsulação de 12,2% a 77,8% (LUO et al., 2013; GARCIA-SALDANA et al., 2015).

Tabela 6 - Eficiência de encapsulação por determinação espectrofotométrica de compostos fenólicos do extrato hidroalcoólico de brócolis com zeína (v:v) pela técnica de *electrospraying*

Proporção de extrato:zeína (v:v)	Eficiência de encapsulação (%)
10:90	99,3 ^a
20:80	99,2 ^{ab}
30:70	99,1 ^{ab}
40:60	98,8 ^b
45:55	97,8 ^c
50:50	97,8 ^c
60:40	93,6 ^d
70:30	88,8 ^e
80:30	88,5 ^e
90:10	86,9 ^f

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey com 5% de significância

Para as fibras produzidas por *electrospinning* (Tabela 7), a eficiência de encapsulação também foi maior do que os estudos relatados anteriormente, entretanto foram similares aos encontrados em fibras de outros compostos bioativos

encapsulados usando zeína pela técnica de *electrospinning* (EVANGELHO et al., 2018).

Tabela 7 - Eficiência de encapsulação por determinação espectrofotométrica de compostos fenólicos do extrato hidroalcoólico de brócolis com zeína (v:v) pela técnica de *electrospinning*

Proporção de extrato:zeína (v:v)	Eficiência de encapsulação (%)
20:80	99,9 ^a
25:75	96,8 ^b
30:70	95,8 ^c
35:65	94,9 ^d
40:60	na
50:50	na

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey com 5% de significância, na - Não foi possível realizar a EE% devido à ausência de formação de fibras

Os menores valores de eficiência de encapsulação encontrados na literatura, em comparação com os do presente estudo, sejam possivelmente em razão da elevada temperatura empregada nas encapsulações por *spray drying* e coacervação simples e complexa promovendo a degradação de alguns dos compostos.

5.3.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

A presença de bandas da análise de espectroscopia no infravermelho podem indicar deformações das cadeias também chamadas de deformação angular (δ), que podem ser simétricas (δ_s) ou assimétricas (δ_a) ou ao estiramento das funções, também chamadas de deformações axiais (ν) simétricas (ν_s) ou assimétricas (ν_a).

O brócolis liofilizado apresentou bandas em 3290 cm^{-1} ($\nu_{\text{O-H}}$), $2930\text{-}2860\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{sC-H}}$; $\nu_{\text{aC-H}}$), 1742 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$) presentes em ácidos carboxílicos, 1649 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=N}}$),

juntamente com a banda 1540 cm^{-1} ($\nu_{\text{a}}\text{N-O}$) referentes as vibrações de iminas ou oximas (C=N-O), 1400 cm^{-1} , em conjunto com banda forte em 1051 cm^{-1} ($\nu_{\text{a}}\text{S=O}$; $\nu_{\text{s}}\text{S=O}$), característico de sulfonas, ainda é possível observar a banda em 1235 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O}}$) da cadeia (éster) (Tabela 8).

A cápsula (Tabela 8) e fibra (Tabela 9) de zeína sem inclusão de extrato não apresentaram diferença nos números de onda observados, essas apresentaram bandas em 3290 cm^{-1} ($\nu_{\text{O-H}}$ sobreposto a $\nu_{\text{s}}\text{N-H}$; $\nu_{\text{a}}\text{N-H}$), referentes às amidas A e B, respectivamente. Bandas em $2920 - 2850\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{s}}\text{C-H}$; $\nu_{\text{a}}\text{C-H}$), 1644 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$) dos grupos peptídeos da amida I e, 1540 cm^{-1} ($\delta_{\text{N-H}}$) característicos da das ligações da amida II, banda em 1454 cm^{-1} ($\delta_{\text{s}}\text{CH}_2$) alifático e 1242 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-N}}$ sobreposta a δ_{NH_2}) da amida III.

As cápsulas (Tabela 8) e fibras (Tabela 9) apresentaram bandas nas regiões de $\sim 3000 - 2800\text{ cm}^{-1}$, referentes a $\nu_{\text{O-H}}$ sobreposto a $\nu_{\text{s}}\text{N-H}$; $\nu_{\text{a}}\text{N-H}$ e $\nu_{\text{s}}\text{C-H}$; $\nu_{\text{a}}\text{C-H}$, presentes tanto no pó de brócolis como na zeína. As bandas em $\sim 1600 - 1500\text{ cm}^{-1}$ foram observadas em todas as amostras encapsuladas, sendo referentes aos grupos peptídeos da amida I e amida II da zeína. A banda $\sim 1440\text{ cm}^{-1}$ ($\delta_{\text{s}}\text{CH}_2$) alifático apenas não foi observada na cápsula 70:30 por que ficou sobreposta a banda em $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ que em conjunto com uma banda forte observada em $\sim 1040\text{ cm}^{-1}$ é referente a ($\nu_{\text{a}}\text{S=O}$; $\nu_{\text{s}}\text{S=O}$) de sulfonas. Por fim as bandas em $\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ referentes a cadeia e amida III foram observadas.

Tabela 8 - Espectros no infravermelho com Transformada de Fourier do brócolis liofilizado e das cápsulas de extrato de brócolis e zeína em diferentes proporções produzidas por *electrospraying*

Vibração	Número de onda (cm ⁻¹)										
	Cápsulas (Extrato: zeína; v/v)										
	Brocolis	0:100	10:90	20:80	30:70	40:60	45:55	50:50	60:40	70:30	80:20
ν O-H	3290*	3290	3290	3290	3290	3290	3290	3290	3290	3290	3290
ν_s C-H	2930	2920	2920	2920	2920	2920	2920	2920	2920	2920	2920
ν C=N	1649	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ν C=O/ ν_s N-H; ν_a -H	Nd	1644	1644	1644	1649	1649	1644	1649	1644	1639	1639
ν_a N-O	1540	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
δ N-H	Nd	1540	1540	1540	1535	1541	1535	1541	1535	1535	1535
ν C-N/ δ NH	Nd	nd	nd	nd	nd	1514	nd	1514	nd	nd	nd
δ_s CH ₂	Nd	1454	1454	1454	1454	1454	1449	1454	1449	nd	1449
ν_a S=O	1400	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1405	nd
ν C-O	1253	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ν C-N/ δ NH ₂	Nd	1242	1242	1242	1242	nd	1235	nd	1235	1235	1235
ν S=O	1051	nd	nd	nd	nd	1090	1040	nd	1040	1040	1040

*número de onda; nd – banda não detectada

Tabela 9 - Espectros no infravermelho com Transformada de Fourier do brócolis liofilizado e das fibras de extrato de brócolis e zeína em diferentes proporções produzidas por *electrospinning*

Vibração	Número de onda (cm ⁻¹)								
	Fibras (Extrato:zeína; v/v)								
	Brocolis	0:100	20:80	25:75	30:70	35:65	40:60	50:50	
ν O-H	3290*	3290	3290	3290	3290	3290	3290	3290	
ν_s C-H	2930	2920	2920	2920	2920	2920	2920	2920	
ν C=N	1649	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
ν C=O/ ν_s N-H; ν_a -H	nd	1644	1644	1644	1649	1649	1649	1649	
ν_a N-O	1540	nd	nd	nd	nd	Nd	Nd	nd	
δ N-H	nd	1540	1540	1535	1535	1541	1541	1541	
ν C-N/ δ NH	nd	nd	nd	nd	nd	1514	1514	1514	
δ_s CH ₂	nd	1454	1454	1454	1454	1454	1454	1454	
ν_a S=O	1400	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
ν C-O	1253	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
ν C-N/ δ NH ₂	nd	1242	1242	1242	1242	1242	nd	nd	
ν S=O	1051	nd	nd	nd	nd	1090	1090	nd	

As cápsulas 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 45:55, 50:50 e 60:40 (Tabela 8) e as fibras 20:80, 25:75, 30:70, 35:65, 40:60 e 50:50 (Tabela 9) apresentaram bandas na região *fingerprint* ($800 < \text{cm}^{-1} < 1500$) semelhantes as bandas observadas na zeína pura (II), sendo assim, sugere-se que houve alta eficiência de encapsulação para a cápsula até a concentração de 60:40 extrato:zeína, e 50:50 extrato:zeína para a fibra. No entanto, as cápsulas 70:30 e 80:20 apresentaram padrão de absorção na região *fingerprint* semelhante ao pó de brócolis, o que sugere excesso de extrato e baixa eficiência de encapsulação.

Pequenos deslocamentos são observados nas amostras encapsuladas (cápsulas e fibras) em relação ao brócolis e a zeína e estes sugerem a interação química entre os grupamentos amida II da zeína e os grupamentos sulfonas do extrato durante o processo de encapsulamento.

5.3.4 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

A análise de DSC é um método calorimétrico no qual são medidas diferenças de energia envolvidas nos processos endotérmico ou exotérmico. Baseada nesta análise pode-se determinar o ΔT , que consiste na variação de temperatura, ou seja, a faixa de temperatura que foi necessária para degradar a amostra, quanto maior esta diferença mais estável a amostra é considerada. A temperatura média na qual ocorreu o evento térmico e ΔH que demonstra a entalpia de fusão das amostras.

A análise térmica do extrato hidroalcoólico de brócolis não foi possível de ser realizada pois entre o preparo da amostra e a realização da análise ocorreu a degradação do extrato, não sendo possível observar eventos térmicos na análise. Nas

demais amostras analisadas, pode-se observar a presença de um evento endotérmico (absorção de calor).

A cápsula de extrato de brócolis e zeína na proporção 50:50 (v:v) apresentou a maior temperatura de degradação e, portanto, maior estabilidade. Além disso, ela apresentou menor ΔH , ou seja, necessitou de menor energia para ocorrer a degradação, e menor variação de temperatura (ΔT) (Tabela 10).

Tabela 10 - Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura das cápsulas de extrato hidroalcoólico de brócolis:zeína (v:v) produzidas por *electrospraying*

Amostra	ΔT (°C)	Temperatura (°C)	ΔH (J/g)
Brócolis	31,0	130,0	92,5
Zeína	29,5	140,2	126,0
10:90	4,3	178,1	132,2
20:80	6,1	161,7	138,3
30:70	9,1	165,0	178,3
40:60	5,5	168,1	181,6
45:55	4,1	170,4	131,3
50:50	5,7	181,7	97,4
60:40	6,8	147,2	211,2
70:30	6,2	124,2	132,9
80:20	6,7	125,2	192,0
90:10	6,5	125,0	216,5

ΔT - faixa de temperatura para a degradação; Temperatura - temperatura média da degradação; ΔH - energia necessária para a degradação

O brócolis apresentou evento endotérmico próximo a 160°C característico de desidratação da amostra e um ΔT de 30,99 °C, valor similar aos 30,88 °C e 34,26 °C relatados na literatura, o que demonstra uma estabilidade térmica (SANJUÁN et al., 2004; XIN et al., 2013). A cápsula de zeína sem adição de extrato de brócolis apresentou um único evento endotérmico na temperatura de 140 °C, este evento é

característico do processo de desidratação da amostra. Não foi possível observar outros eventos pois a degradação da estrutura da zeína ocorre em temperaturas superiores a 300 °C (MAGHOSI et al., 1992; DUDHANI et al., 2010; PARVEEN et al., 2010; LUO et al., 2011). As cápsulas de extrato de brócolis e zeína apresentaram eventos endotérmicos únicos na faixa de 120 a 180 °C, característicos da perda de água.

O comportamento das fibras pode ser observado na tabela 11. Os eventos térmicos, assim como nas cápsulas, possivelmente sejam atribuídos à desidratação das amostras.

Tabela 11 - Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura das fibras de extrato hidroalcoólico de brócolis:zeína (v:v) produzidas por *electrospinning*

Amostra	ΔT (°C)	Temperatura (°C)	ΔH (J/g)
Brócolis	31,0	130,0	92,5
Zeína	5,5	197,7	43,3
20:80	9,5	152,4	128,1
25:75	17,0	158,2	140,0
30:70	3,3	156,2	0,5
	6,1	165,6	110,2
35:65	23,0	145,0	142,1
40:60	5,1	160,8	136,7
50:50	13,0	166,37	163,57

ΔT - faixa de temperatura para a degradação; Temperatura - temperatura média da degradação; ΔH - energia necessária para a degradação

Dentre as cápsulas com proporções de extrato de brócolis e zeína testadas, aquelas entre 30% e 50% de extrato, e as fibras com 25 a 35% de extrato, apresentaram maiores valores de ΔT e de temperatura de degradação, ou seja, são mais estáveis termicamente do que as demais. Visto a necessidade de uma futura aplicação das cápsulas em ensaios biológicos, pela análise de DSC todas as cápsulas

e fibras produzidas podem ser aplicadas, pois possuem estabilidade térmica em temperaturas superiores a 120°C.

5.3.5 ANÁLISE DE TERMOGRAVIMETRIA (TGA)

A análise de TGA é uma técnica utilizada para verificar a perda ou o ganho de massa de uma amostra em determinada temperatura e/ou tempo. Baseada na TGA pode-se determinar uma derivada que calcula a variação da massa em relação ao tempo (dm/dt). Uma amostra é considerada estável quando a perda de massa for baixa e a temperatura para que esta perda ocorra for elevada.

Nas cápsulas de extrato hidroalcoólico de brócolis e zeína, pode-se observar que a proporção 45:55 (extrato:zeína; v:v) apresentou apenas um único evento de perda de massa (Δm) em 347,2 °C, sendo considerada a cápsula mais estável termicamente (Tabela 12). As cápsulas com proporções superiores a 60% de extrato em relação a zeína apresentaram várias perdas de massas, iniciando a degradação da amostra em temperaturas inferiores a 200 °C, sendo menos estáveis do que as demais.

A zeína 9% apresentou uma única perda de massa de 52% em 318 °C correspondente à degradação térmica de sua estrutura. A perda de massa devido a degradação térmica da estrutura da zeína se inicia geralmente próxima a 300 °C (MAGHOSI et al., 1992; TORRES-GINER & LAGARON, 2010). Já o brócolis apresentou apenas uma perda de massa de 14% a 300 °C comprovando sua estabilidade frente a temperaturas elevadas. Apesar da relativamente baixa perda de massa e/ou alta estabilidade do brócolis é provável que as perdas observadas sejam

justamente dos compostos de interesse que são sabidamente termolábeis e, portanto, faz-se necessária sua proteção por encapsulação (CISKA et al., 2015).

Tabela 12 -Termograma da perda de massa das cápsulas de extrato de brócolis e zeína (v:v) produzidas por *electrospraying*

Amostra	Δm (mg)	Temperatura (°C)	ΔT (°C)	Perda de massa (%)	Resíduo (%)
Zeína	0,6	318,2	155,8	52,5	47,5
Brócolis	0,2	310,4	91,4	14,7	85,3
10:90	0,3	313,3	107,3	51,8	48,1
20:80	0,3	303,9	93,1	31,4	68,6
30:70	0,5	352,1	158,1	42,1	57,9
40:60	0,5	272,6	144,2	34,2	65,7
45:55	0,6	347,2	152,4	29,6	70,4
50:50	0,2	342,7	145,2	23,1	66,5
	0,1	568,0	112,2	10,4	
60:40	0,1	171,9	50,6	2,1	77,5
	0,6	352,5	169,6	20,5	
70:30	0,1	170,9	52,7	1,5	88,7
	0,2	346,5	168,6	9,7	
80:20	0,1	172,9	43,8	1,4	80,9
	0,1	225,8	65,9	1,1	
	0,5	353,1	133,0	16,6	
90:10	0,1	127,3	62,1	1,7	84,9
	0,1	183,1	56,0	2,1	
	0,1	221,4	55,8	0,5	
	0,6	353,1	128,6	10,8	

Δm – perda de massa em mg; Temperatura – temperatura média onde ocorreu a perda de massa; ΔT – faixa de temperatura onde ocorreu a perda de massa

As cápsulas nas proporções inferiores a 45% de extrato de brócolis em relação a zeína apresentaram uma única perda de massa de até metade do seu conteúdo original em temperaturas próximas a 300 °C referente a degradação das estruturas da zeína e do extrato, demonstrando estabilidade térmica. A cápsula produzida na proporção 50:50 apresentou duas perdas de massa acima de 300 °C, a primeira, referente a degradação da estrutura e a segunda atribuída a degradação de outros compostos, possuindo assim uma melhor estabilidade térmica. Por fim, nas proporções acima de 60% de extrato observam-se as primeiras perdas de massas em temperaturas inferiores a 170 °C, seguidas de outras perdas em temperaturas próximas a 300 °C, sendo, portanto, menos estáveis termicamente do que as demais.

As fibras de brócolis apresentaram eventos únicos de perda de massa (Tabela 13). Assim como a zeína 9% utilizada nas cápsulas, a zeína 30% apresentou evento de degradação da estrutura a 311,8 °C, coerente com o relatados na literatura. Entre as fibras, as com concentrações apresentaram comportamento similares, todos em temperaturas próximas, referentes à degradação do material de parede, possivelmente, tendo preservados os compostos do brócolis.

Tabela 13 - Termograma da perda de massa das fibras de extrato de brócolis e zeína (v:v) produzidas por *electrospinning*

Amostra	Δm (mg)	Temperatura (°C)	ΔT (°C)	Perda de massa (%)	Resíduo (%)
Zeína	0,1	311,8	59,9	17,7	82,3
Brócolis	0,2	310,4	91,4	14,7	85,3
20:80	0,2	350,7	108,7	30,1	69,9
25:75	0,8	353,5	120,7	35,3	64,7
30:70	0,1	305,4	59,7	11,3	88,7
35:65	0,5	346,1	120,1	58,4	41,6
40:60	1,1	355,5	108,1	81,9	18,1
50:50	0,3	345,2	99,7	30,5	69,5

Δm – perda de massa em mg; Temperatura – temperatura média onde ocorreu a perda de massa; ΔT – faixa de temperatura onde ocorreu a perda de massa

5.3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA ACOPLADA A SISTEMA DE ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (MEV/EDS)

A cápsula de zeína sem adição de extrato apresentou formato achatado devido à ausência de recheio (extrato) (Figura 8). As cápsulas nas proporções inferiores a 50:50 de extrato hidroalcoólico de brócolis em relação a zeína apresentaram superfície regular e esférica comprovando a uma boa encapsulação do extrato pela zeína. As cápsulas com proporções superiores de extrato em relação a zeína apresentaram morfologia disforme devido a saturação pelo excesso de extrato não promovendo sua a completa encapsulação.

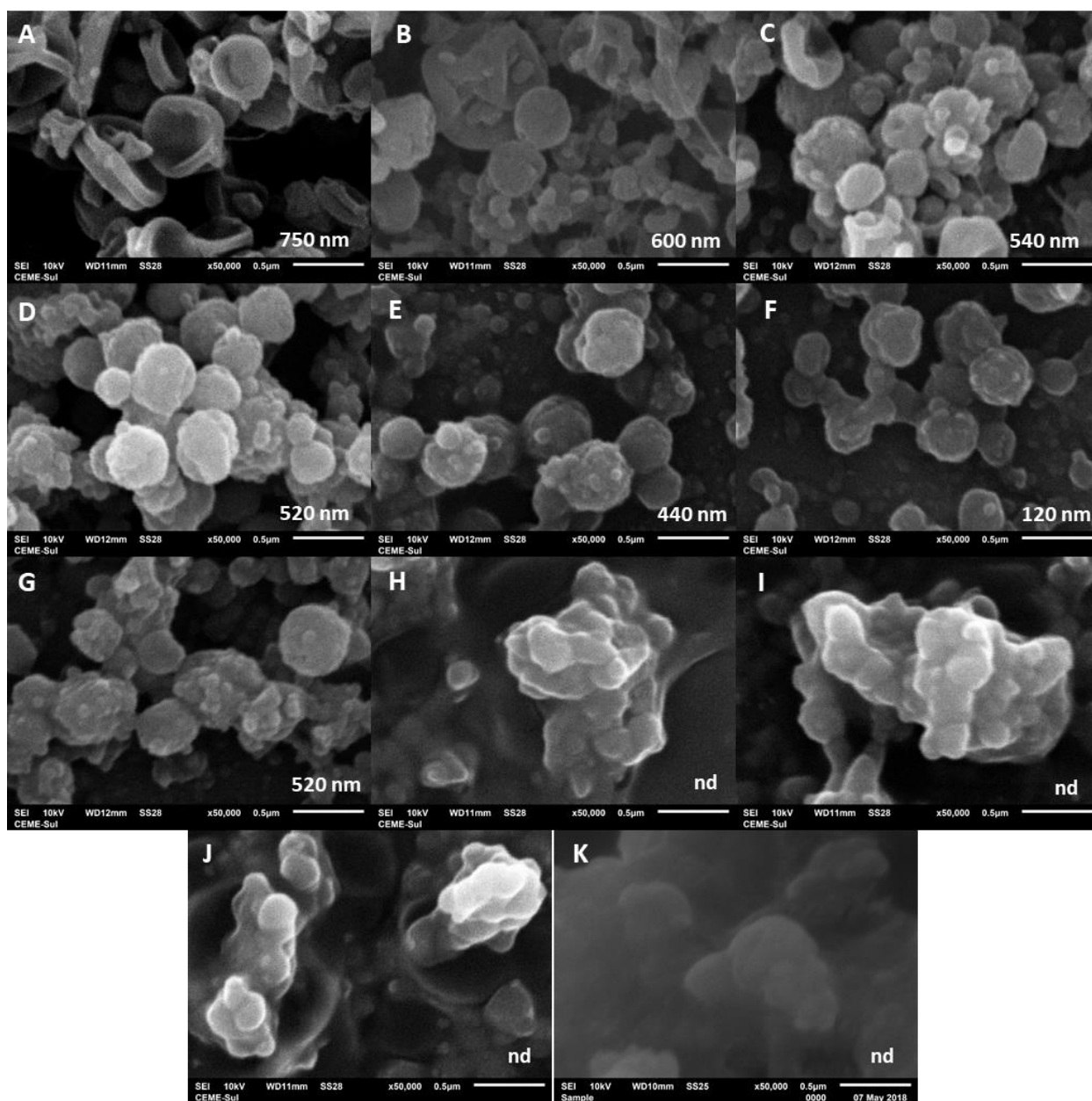


Figura 8 - Morfologia das cápsulas de extrato de brócolis e zeína em diferentes proporções. A: cápsula de zeína sem adição de extrato; B: 10:90 (v:v); C: 20:80 (v:v); D: 30:70 (v:v); E: 40:60 (v:v); F: 45:55 (v:v); G: 50:50 (v:v). H: 60:40 (v:v); I: 70:30 (v:v); J: 80:20 (v:v); K: 90:10 (v:v).

A encapsulação de SFN pelas técnicas de coacervação simples e complexa utilizando como materiais de parede zeína, zeína/quitosana carboximetilada, promoveram a formação de cápsulas de formato esférico e superfície lisa (LUO et al., 2013). As cápsulas de extrato de brócolis formadas por *spray drying* utilizando como

material de parede maltodextrina, goma arábica; κ -carragenina; maltodextrina/goma arábica (25:75), proteína de soja isolada; maltodextrina; hidroxipropil/ β -ciclodextrina; soro fetal bovino, quitosana carboximetilada e goma arábica/ β -ciclodextrina (2:5) apresentaram superfície irregular e rugosa devido à alta temperatura empregada que provoca uma rápida evaporação das gotas (WU et al., 2013; TIAN et al., 2015). A técnica de *electrospinnig* e a utilização de zeína como material de parede promovem a formação de cápsulas de melhor morfologia do que as técnicas de *spray drying* e coacervação complexa por não utilizar temperaturas elevadas durante o processo.

Nas fibras com extrato de brócolis (Figura 9) adicionados em concentrações de até 35%, as fibras apresentam morfologia regular, sem deformidades estruturais; na concentração de 40:60 é observada a presença de beads (deformidades na cadeia estrutural); e na concentração de 50:50 ocorre uma saturação dos locais ativos da zeína, não promovendo a formação de fibras.

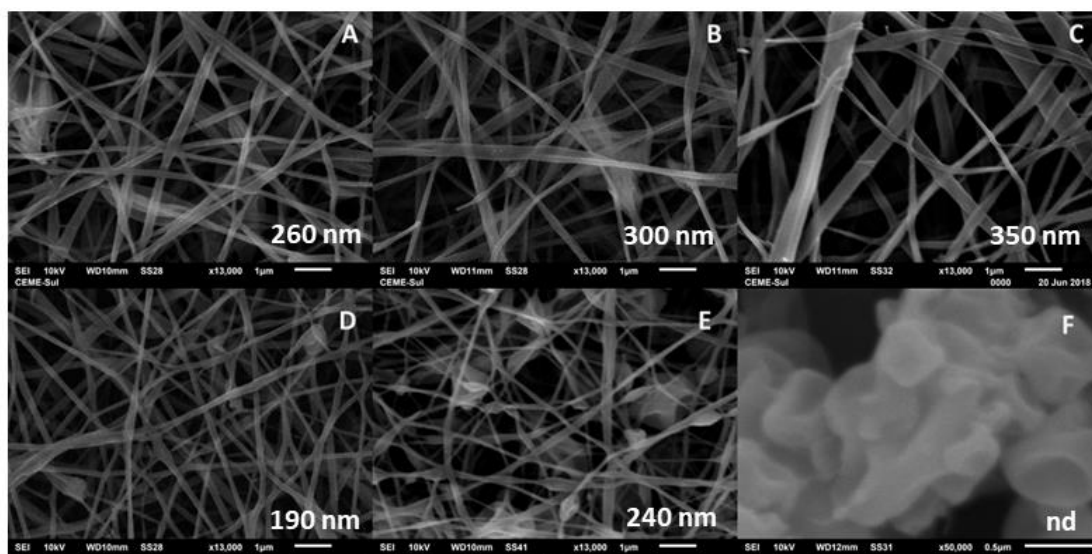


Figura 9 - Morfologia das fibras de extrato de brócolis e zeína em diferentes proporções. A: fibra 20:80 (v:v); B: fibra 25:65 (v:v); C: fibra 30:70 (v:v); D: fibra 35:65 (v:v); E: fibra 40:60 (v:v); F: fibra 50:50 (v:v).

A formação de fibras ultrafinas produzidas por *electrospinning* usando zeína como material de parede já é relatada na literatura, pois, diferentemente de outros métodos, o uso de altas temperaturas não ocorre, não promovendo a formação de sulcos, preservando a estrutura da fibra, que apresentam diâmetros similares ao do presente estudo (WANG & CHEN, 2012; LUO et al., 2013; WU et al., 2013).

A análise de espectroscopia de energia dispersiva da cápsula de zeína sem adição do extrato de brócolis indicou a presença de carbono e nitrogênio em maiores proporções, seguidos por oxigênio, cloro e sódio em menores proporções. As cápsulas de zeína e extrato de brócolis nas proporções inferiores a 40% de extrato hidroalcoólico de brócolis em relação à zeína apresentaram carbono e nitrogênio em maior concentração, seguidos por oxigênio, cloro, sódio e enxofre. Já nas proporções de 45%, 50% e 60% de extrato em relação à zeína estavam presentes em maior quantidade carbono e oxigênio, seguidos por nitrogênio, cloro, sódio e enxofre. Por fim nas proporções acima de 70% de extrato observou-se a presença de carbono e oxigênio em maiores concentrações, seguidos por nitrogênio, enxofre, cloro e sódio. Nas fibras, todas as concentrações apresentaram carbono e nitrogênio em maior concentração, seguidos por oxigênio, cloro, sódio e enxofre. A presença do elemento enxofre nas cápsulas e fibras produzidas com extrato de brócolis e a sua ausência na zeína comprovam a encapsulação dos compostos cuja estrutura possui grupos com nitrogênio e enxofre.

5.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Considerando os resultados da caracterização das cápsulas e fibras, bem como a maior facilidade de aplicação das cápsulas frente as fibras nos ensaios, optou-se por utilizar a cápsula encapsulada por *electrospraying* na concentração de 50:50 (extrato:zeína, v:v). A escolha se deu pelos bons resultados de eficiência de encapsulação, morfologia, estabilidade térmica, e por ser a cápsula com maior concentração de extrato. Deste modo, as atividades biológicas foram realizadas no extrato de brócolis não encapsulado e no encapsulado na forma de cápsula na concentração 50:50.

5.4.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante do extrato de brócolis não encapsulado e do extrato de brócolis encapsulado frente aos três radicais avaliados pode ser observada na tabela 14. A atividade do extrato não encapsulado foi maior do que a do encapsulado para todos os radicais. Possivelmente, a menor atividade antioxidante no extrato de brócolis encapsulado, seja em razão da não total liberação dos compostos que ficam retidos na zeína.

A atividade antioxidante por inibição do radical DPPH, tanto do extrato não encapsulado, quanto do extrato encapsulado, foram superiores ao relatados na literatura, onde os percentuais de inibição variam entre 21,8 a 51,95% em extratos não encapsulados (MELO & FARIA, 2014). Este resultado, demonstra a potencial atividade dos compostos presentes no brócolis de eliminar radicais livres, causadores de diversos danos à saúde (SHAHIDI & AMBIGAIPALAN, 2015).

Tabela 14 - Atividade antioxidante do extrato de brócolis encapsulado e não encapsulado frente aos radicais DPPH, hidroxila e óxido nítrico

Radical	Atividade antioxidante (%)	
	Não encapsulado	Encapsulado
DPPH	75,5aA	62,4bA
Hidroxila	45,3aB	5,4bB
Óxido nítrico	nd	nd

nd – não detectado. Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância.

Não foram encontrados estudos na literatura que visaram observar o efeito de extrato de brócolis, ou de compostos extraídos, frente os radicais $\text{OH}^\bullet$ e ON. Cabe ressaltar que apesar dos valores de inibição destes radicais serem menores do que os frente ao DPPH, estes resultados são importantes, pois o radical $\text{OH}^\bullet$ é a principal ERO produzida pelo organismo humano, predispondo a peroxidação lipídica e outros danos biológicos ao organismo, enquanto o radical ON é responsável pelo processo inflamatório exacerbado (HAZRA et al., 2010).

O principal mecanismo de proteção dos compostos presentes no brócolis, como glicosinolatos, para as doenças que tem como base o estresse oxidativo, dá-se pela via do Nrf2. O Nrf2 é um regulador das respostas de desintoxicação celular e *status* redox no organismo. Em condições fisiológicas normais, o Nrf2 encontra-se armazenado no citoplasma celular ligado a KEAP1. A KEAP1 pode mediar uma rápida ubiquitinação, e em seguida degradação do Nrf2 pelo proteassoma. Quando as células encontram-se em situação de estresse oxidativo, o Nrf2 se desliga da KEAP1 e migra para o núcleo celular, onde liga-se aos ARE nos promotores do gene que codificam enzimas antioxidantes, como a NADPH quinona oxidoreductase (NQO1), heme oxigenase-1 (HO-

1), glutathione S-transferase, SOD, CAT e γ -glutamylcysteine synthetase, para aumentar a expressão desses antioxidantes contra o estresse oxidativo (MCMAHON et al., 2003; SYKIOTIS et al., 2011; BAI et al., 2013).

5.4.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A presença e o diâmetro dos halos de inibição de um extrato frente a bactérias patogênicas indicam a suscetibilidade do microrganismo frente ao composto. Quando os halos apresentarem menos de 0,7 cm são considerados não ativos, entre 0,7 e 1,2 cm são ativos e quando apresentarem mais de 1,2 cm possuem efeito inibitório satisfatório (ARORA & KAUR, 1999). O extrato de brócolis apresentou halos de inibição frente a três das quatro bactérias testadas (Tabela 15) sendo considerados ativos.

Os resultados encontrados foram superiores ao estudo de Sibi et al. (2013) que não observou efeito antimicrobiano de extrato etanólico de brócolis contra as cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *S. Typhimurium*. Não foram encontrados trabalhos que avaliassem a atividade antimicrobiana de extrato de brócolis encapsulado.

Tabela 15 - Halos de inibição do extrato de brócolis não encapsulado frente as bactérias *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Bactérias	Halo de inibição (cm)
<i>Salmonella Typhimurium</i>	0,9
<i>Listeria monocytogenes</i>	nd
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,77
<i>Escherichia coli</i>	0,82

Quando um extrato apresentar um valor de CIM de até 0,5 mg/mL é considerado

um forte agente antimicrobiano; entre 0,6 a 1,5 mg/mL possuiu um efeito moderado e acima de 1,6 mg/mL apresenta uma fraca atividade (DUARTE et al., 2007). O extrato de brócolis encapsulado e o não encapsulado não apresentaram efeito inibitório e nem bactericida frente as bactérias testadas.

A ausência de inibição e morte bacteriana de *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* e *E. coli* por ação de extrato de brócolis também foi observada na literatura, enquanto há relatos de efeito inibitório de *S. aureus* em concentrações de 0,32 mg/mL (SIBI et al., 2013).

5.4.3 ATIVIDADE ANTIHIPERGLICEMIANTE

A atividade antihiperglicemiante do extrato de brócolis encapsulado e do não encapsulado pode ser observada na tabela 16.

O extrato de brócolis não encapsulado inibiu 92,7% da atividade da α -amilase e 44,67% da α -glicosidase, enquanto o extrato encapsulado inibiu 99,15% da α -amilase e 19,72% da α -glicosidase. Quando comparados com o controle acarbose (medicamento utilizado por diabéticos no controle da hiperglicemia) tanto o extrato encapsulado, quanto o não encapsulado promoveram maiores percentuais de inibição da enzima α -amilase, enquanto o extrato de brócolis não encapsulado promoveu maior inibição também da α -glicosidase, quando comparado com o controle. Não foram encontrados outros estudos que visaram aplicar extrato de brócolis, ou compostos isolados, sobre a inibição destas enzimas, entretanto, nossos resultados são importantes para abrir portas para futuros estudos, que podem avaliar os efeitos em modelos *in vivo*, podendo futuramente, serem utilizados como medicamentos naturais no controle de DMII.

Tabela 16 - Inibição de enzimas digestivas α -amilase e α -glicosidase por extrato de brócolis encapsulado e não encapsulado

Enzima	Inibição (%)		
	Não encapsulado	Encapsulado	Acarbose*
α -amilase	92,7bA	99,15aA	73,43cA
α -glicosidase	44,67aB	19,72cB	34,35bB

*Acarbose – medicamento usual no controle de diabetes. Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância.

As enzimas digestivas α -amilase e α -glicosidase estão intimamente ligadas com o processo de hiperglicemia pós-prandial, sendo a inibição parcial destas, uma alternativa para o controle da DMII, pois retardam a digestão dos carboidratos levando a diminuição da absorção de glicose, atenuando a concentração de glicose pós-prandial na corrente sanguínea (RHABASA-LHORET & CHIASSON, 2004; LEE et al., 2007).

Um dos motivos do potencial antihiperglicemiante do brócolis pode estar relacionado com a presença de carboidratos nas inflorescências, o que faz com que o metabolismo especializado desenvolva compostos capazes de proteger a planta contra ações predatórias (EVERTON et al., 2009).

A via de ação antihiperglicemiante de compostos do brócolis, como SFN, é a via de ativação do Nrf2. Um estudo que avaliou o efeito do SNF para tratar o modelo diabético induzido por STZ em camundongos por 4 meses demonstrou a regulação positiva do Nrf2, diminuindo os danos renais causados pela diabetes significativo do dano renal, além disto, observou que o tratamento prévio com SFN em camundongos induzidos a

debates por STZ proporcionou efeito preventivo de danos da nefropatia diabética (ZHENG et al., 2011).

Os resultados encontrados demonstram um potencial do extrato de brócolis encapsulado e não encapsulado no controle da hiperglicemia, podendo auxiliar no tratamento da DMII, bem como podendo não apresentar alguns efeitos adversos, principalmente gastrointestinais, associados a outros medicamentos que atuam inibindo as enzimas digestivas (YIN et al., 2014).

5.4.4 EFEITO DA DIGESTÃO NA BIODISPONIBILIDADE DE COMPOSTOS

No extrato não encapsulado (Tabela 17) submetido a simulação do processo digestório na boca, estômago e intestino observa-se redução de 76,47% no ácido protocatecuico 4-glucosídeo; 98,39% no ácido 5-cafeoilquínico; 78,47% na glucobrassicina; 71,9% no ácido 4-hidroxibenzoico; 86,36% no ácido p-coumaroilquínico; 43,57% no ácido clorogênico; 100% no ácido 4-p-coumaroilquínico; 89,62% na 4-methoxy-glucobrassicina; 97,32% na 1-O-sinapoil- β -D-glicose ; 88,63% na neoglucobrassicina; 100% no ácido 4-p-coumaroilquínico; 72,07% no ácido cumárico; 38,43% no ácido sinápico; 86,76% no 1,2-disinapoilgentiobiose e 84,18% no 1,2,2'-trisinapoilgentiobiose, enquanto o ácido ferúlico aumentou sua concentração em 188,8%. As perdas encontradas em quase todos os compostos possivelmente ocorreram devido as quebras das estruturas por ação das enzimas e do pH ao longo do processo digestório, enquanto o aumento da concentração de ácido ferúlico pode ser em razão da reestruturação desde com outros compostos.

Tabela 17 – Efeito da simulação da digestão *in vitro* frente aos compostos presentes no extrato de brócolis não encapsulado

Composto	Não digerido (µg/g) **	Boca (µg/g)	Estômago (µg/g)	Intestino (µg/g)
Ácido protocatecuico 4-glucosídeo	13,6a	13,3a	2,4c	3,2b
Ácido 5- cafeoilquínico	661,4a	554,7b	34,7c	10,6d
Glucobrassicina	954,0a	769,1b	6,7d	205,4c
Ácido 4-hidroxibenzoico	12,1a	8,7b	5,2c	3,4d
Ácido p-coumaroilquínico	22,0a	15,9b	3,3c	3,0c
Ácido clorogênico	39,7a	31,7b	7,6d	22,4c
Ácido p-cumárico 4-glucosídeo	3,5a	3,1b	nd	nd
4-methoxy-glucobrassicina	307,4a	228,3b	nd	31,9c
1-O-sinapoil-β-D-glicose	119,8a	114,3b	3,1c	3,2c
Neoglucobrassicina	5233,5a	4488,1b	18,9d	594,8c
Ácido 4-p-coumaroilquínico	3,6a	3,3a	nd	nd
Ácido cumárico	11,1a	9,5b	3,2c	3,1c
Ácido sinápico	25,5a	19,0c	24,3b	15,7d
Ácido ferúlico	6,3c	5,3d	9,6b	18,2a
1,2- disinapoilgentiobiose	47,6a	31,8b	3,6d	6,3c
1,2,2'- trisinapoilgentiobiose	17,7a	9,8b	3,0c	2,8c

*Não digerido - fração não digerida dissolvida em água, ** µg / g brócolis; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância. Tabela cromatográfica completa disponível no apêndice 1.

A avaliação da estabilidade dos compostos ao longo do processo digestório é de suma importância, pois, muitos profissionais da saúde, como nutricionistas, prescrevem planos alimentares pautados do perfil de compostos presentes em cada alimento, que pode desempenhar atividades preventivas para o controle de diversas doenças nos indivíduos. Entretanto, como se pode observar, a maioria dos compostos apresenta uma perda muito significativa na sua concentração, o que impacta diretamente nos

seus efeitos biológicos. Por este motivo, sabendo como cada composto se comporta no processo, podem-se desenvolver planos alimentares com concentrações e recomendações alimentares mais corretas, auxiliando na promoção da saúde.

O extrato de brócolis encapsulado (Tabela 18) submetido a simulação do processo digestório na boca, estômago e intestino apresentou redução de 100% no ácido p-cumárico 4-glucosídeo; 96,51% no ácido 5- cafeoilquínico; 93,61% na glucobrassicina; 48% no ácido 4-hidroxibenzoico; 71,77% no ácido 4-p-coumaroilquínico; 48,02% no ácido clorogênico; 77,97% na 4-methoxy-glucobrassicina; 96,46% no 1-O-sinapoil- β -D-glicose; 94,71% na neoglucobrassicina; 60,14% no ácido cumárico; 71,98% no ácido sinápico; 73,55% no ácido ferúlico; 100% no 1,2-disinapoilgentiobiose e 100% no 1,2,2'-trisinapoilgentiobiose.

Apesar de ocorrer perdas significativas no extrato de brócolis encapsulado, observa-se que possivelmente a cápsula não tenha se rompido totalmente, pois quando comparadas as concentrações da cápsula rompida com etanol (controle) com a cápsula não digerida (homogeneizada em água, para simular a saliva) observa-se que as concentrações são muito diferentes, onde reduzem-se em 52,84% o conteúdo de ácido protocatecuico 4-glucosídeo; 52,85% no ácido 5- cafeoilquínico; 36,8% na glucobrassicina; 6,1% no ácido 4-hidroxibenzoico; 21,71% no ácido p-coumaroilquínico; 44,21% no ácido clorogênico; 57,7% na 4-methoxy-glucobrassicina; 42,09% no 1-O-sinapoil- β -D-glicose; 51,74% na neoglucobrassicina; 12,53% no ácido cumárico; 28,52% no ácido sinápico; 13,60% no ácido ferúlico; 56,33% no 1,2-1,2-disinapoilgentiobiose e 49,31% no 1,2,2'-trisinapoilgentiobiose.

Tabela 18 - Efeito da simulação da digestão *in vitro* frente aos compostos presentes no extrato de brócolis encapsulado

Composto	Não digerida E:A* (µg/g) ***	Não digerida água** (µg/g)	Boca (µg/g)	Estômago (µg/g)	Intestino (µg/g)
Ácido protocatecuico 4-glucosídeo	36,9a	17,4b	16,2c	nd	nd
Ácido 5- cafeoilquínico	1267,3a	597,5b	317,4c	56,6d	20,8e
Glucobrassicina	2662,3a	1680,7b	611,8c	27,7e	107,4d
Ácido 4-hidroxibenzoico	18,8b	17,5c	20,3a	8,7d	9,1d
Ácido p-coumaroilquínico	52,5a	41,1b	31,2c	12,9d	11,6e
Ácido clorogênico	90,7a	50,6b	32,2c	20,4e	26,3d
Ácido p-cumárico 4-glucosídeo	nd	nd	nd	nd	nd
4-methoxy-glucobrassicina	301,7a	127,6b	52,6c	nd	28,1d
1-O-sinapoil-β-D-glicose	517,9a	299,9b	230,9c	21,2d	10,6e
Neoglucobrassicina	9578,7a	4621,9b	2115,1c	28,8e	244,1d
Ácido 4-p-coumaroilquínico	nd	nd	nd	nd	nd
Ácido cumárico	32,7a	28,6b	21,2c	13,1d	11,4e
Ácido sinápico	92,9a	66,4b	41,2c	28,4d	18,6e
Ácido ferúlico	77,9a	67,3b	37,3c	17,0d	17,8d
1,2- disinapoilgentiobiose	60,0a	26,2b	18,0c	nd	nd
1,2,2'- trisinapoilgentiobiose	29,2a	14,8b	12,0c	nd	nd

*Não digerido E:A - fração não digerida etanol:água, não digerida Água: fração não digerida dissolvida em água ** µg / g brócolis; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância. Tabela cromatográfica completa disponível no apêndice 1.

Quando comparados as perdas de compostos entre o extrato encapsulado e o não encapsulado observa-se que a cápsula preservou mais os compostos ácido 5-cafeoilquínico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-coumaroilquínico, 4-methoxy-glucobrassicina, 1-O-sinapoil-β-D-glicose e ácido cumárico, enquanto todos os demais compostos apresentaram-se em maior quantidade no intestino no extrato não encapsulado, cabe ressaltar, que como descrito anteriormente, isto pode ser devido a

não total abertura da cápsula de zeína em meio aquoso, devido a sua característica mais hidrofóbica.

Após a realização da simulação da digestão, foram avaliadas as atividades antioxidantes de cada fração da digestão frente aos radicais DPPH, OH[•] e ON (Tabela 19).

Tabela 19 - Atividade antioxidante frente aos radicais DPPH, hidroxila e óxido nítrico das frações de brócolis encapsulado e não encapsulado submetidos a simulação da digestão

Amostra	Inibição (%)		
	DPPH	Hidroxila	Óxido nítrico
Extrato de brócolis não digerido	75,5aC	45,3bA	nd
Extrato de brócolis boca	nd	24,68aC	nd
Extrato de brócolis estômago	80,78aB	23,79bD	80,78aB
Extrato de brócolis intestino	90,23aA	31,78bB	90,23aA
Cápsula de brócolis não digerida	62,4aA	5,4bC	nd
Cápsula de brócolis boca	nd	5,9aC	nd
Cápsula de brócolis estômago	nd	13,38bA	42,37aB
Cápsula de brócolis intestino	nd	8,8bB	74,79aA

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e na mesma amostra diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância.

Após o processo digestivo, o extrato encapsulado e o não encapsulado, comportaram-se de maneiras bem diferentes sobre o perfil de inibição do radical DPPH, onde se observa que o extrato não encapsulado diminuiu 100% de sua atividade na fração boca, enquanto aumentou sua atividade em 7 e 19,5% nas frações

estômago e intestino respectivamente, enquanto no extrato encapsulado não foram detectadas atividades de inibição para esse radical ao longo do processo.

Para o radical $\text{OH}^\cdot$, ERO mais produzida no organismo humano, responsável pela peroxidação lipídica, o extrato não encapsulado apresentou queda da atividade em 45,5, 47,5 e 29,8% na boca, estômago e intestino respectivamente, enquanto no extrato encapsulado ocorreu um incremento na atividade de inibição deste radical em 9,2, 147,7 e 63% nas frações boca, estômago e intestino, respectivamente, demonstrando que possivelmente a zeína protegeu os compostos que atuam na inibição deste radical ao longo da digestão, demonstrando que a cápsula, quando comparada com o extrato não encapsulado, é mais efetiva para a proteção dos compostos que atuam no radical $\text{OH}^\cdot$, apesar de seu conteúdo ser inferior.

Por fim, para o radical ON observou-se tanto para o extrato encapsulado, quanto para o não encapsulado, uma ausência de atividade nas frações da boca, enquanto ocorreu um incremento da atividade nas frações estômago e intestino, onde aumentou no não encapsulado 80,8 e 90,23% e no encapsulado 42,4 e 74,8% o percentual de inibição no estômago e intestino, respectivamente, demonstrando que o processo digestivo melhora a capacidade dos compostos do brócolis de atuar frente a este importante radical livre que atua nas doenças neuroinflamatórias.

A avaliação da atividade antihiperglicemiante também foi realizada para cada fração da digestão (Tabela 20). No extrato de brócolis não encapsulado, observa-se que ocorreu um aumento na atividade de inibição da enzima α -amilase na fração intestinal, quando comparada com a fração não digerida, enquanto no extrato

encapsulado, o percentual de inibição se manteve. Entre o encapsulado e o não encapsulado, a cápsula apresentou leve aumento no percentual de inibição.

Para a α -amilase, no extrato não encapsulado, observa-se um aumento de 5,7% da capacidade de inibição na fração da boca, quando comparada com a fração não digerida, diminuição de 36,3% na fração do estômago e novamente um aumento de 5,91% na fração intestinal.

Tabela 20 - Atividade antihiperglicemiante frente a α -amilase e α -glicosidase das frações de brócolis encapsulado e não encapsulado submetidos a simulação da digestão

Amostra	Inibição (%)	
	α -amilase	α -glicosidase
Extrato de brócolis não digerido	92,7aB	44,67bA
Extrato de brócolis boca	98,02aA	11,52bC
Extrato de brócolis estômago	59,04aC	30,95bB
Extrato de brócolis intestino	98,18aA	7,60bD
Cápsula de brócolis não digerida	99,14aA	19,72bA
Cápsula de brócolis boca	99,74aA	7,29bB
Cápsula de brócolis estômago	99,28aA	5,20bC
Cápsula de brócolis intestino	99,40aA	4,49bD

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e na mesma amostra diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância.

O aumento da inibição na fração boca possivelmente se deva a primeira clivagem das ligações entre a estrutura derivada de carboidratos presentes nos glicosinolatos, o que produz compostos mais reativos. A diminuição na fração estomacal, possivelmente seja em razão das alterações de pH, extremamente ácido neste órgão, que interfere na atividade dos compostos bioativos. Enquanto a neutralização do pH na fração

estomacal, faz com que os compostos possam atuar de maneira mais efetiva, justificando o aumento da inibição nessa fração, que teoricamente, será o conteúdo de compostos que está biodisponível para ser metabolizado no fígado e desempenhar suas funções.

Para o extrato encapsulado, na inibição da α -amilase, observa-se pequenos aumentos de 0,6, 0,14 e 0,26% na atividade ao longo do processo digestório. Diferente do extrato não encapsulado, a manutenção da atividade em todas as frações, possivelmente se deva a proteção dos compostos bioativos pelo material de parede (zeína), permitindo que os compostos que possuem atividade frente a esta enzima digestiva, cheguem intactas ao intestino para serem absorvidos e desempenhem suas atividades no organismo.

Para a α -glicosidase, ao contrário da α -amilase, observa-se um declínio da atividade de inibição da enzima ao longo do processo digestivo, sendo o percentual de inibição do extrato não encapsulado superior aos resultados da cápsula.

A atividade de inibição da enzima α -glicosidase, pelo extrato não encapsulado, diminuiu 74,21%, 30,71% e 83% nas frações da boca, estômago e intestino, respectivamente, possivelmente em razão das clivagens das enzimas, diminuindo os compostos que podem atuar inibindo essa enzima, entretanto, cabe ressaltar, que apesar de inibir apenas 7,6% na fração intestinal, essa inibição pode ser suficiente para auxiliar no processo de diminuição da hiperglicemia, pois não se pode inibir totalmente essas enzimas, para que não se tenha déficit de nutrientes e problemas absorptivos relacionados ao excesso de glicose que não é absorvida.

No extrato encapsulado, a atividade de inibição da α -glicosidase comportou-se de maneira similar ao não encapsulado, observando-se diminuição da atividade em 63%, 73,6% e 77,2% nas frações da boca, estômago e intestino, respectivamente. Da mesma maneira, como relatado no não encapsulado, a queda na atividade ao longo do processo digestivo, não é necessariamente um problema, pois uma parte da glicose deve ser absorvida, sendo que a inibição total pode causar diversos problemas a saúde do mesmo modo que o excesso de absorção.

Não foram encontrados estudos na literatura que avaliaram o efeito da simulação da digestão sobre o perfil antihiperglicemiante de compostos presentes no brócolis, entretanto a alta inibição da atividade da α -amilase ao longo de todo processo digestório, tanto do encapsulado, quanto do não encapsulado demonstra um potencial para controle da hiperglicemia, associado a leve inibição da α -glicosidase. Baseado em nossos resultados, podem-se desenvolver estudos utilizando modelos *in vivo*, para avaliar, de maneira mais fidedigna, os efeitos antihiperglicemiantes dos compostos presentes no brócolis, desenvolvendo futuramente, uma nova alternativa terapêutica para a DMII.

5.4.5 CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL

Células de glioma de camundongo GL261 foram expostas a diferentes concentrações (50, 100, 200, 300 e 400 $\mu\text{g/mL}$) do extrato de brócolis não encapsulado e encapsulado (50:50, extrato:zeína) durante os tempos de 48 e 72 h. Enquanto a zeína não demonstrou nenhum efeito frente as células de glioma (GL261), tanto o extrato não encapsulado como o extrato encapsulado foram capazes de reduzir a

viabilidade celular em 48 h de exposição (Figura 10A). No tempo de 72 h a redução da viabilidade foi dependente da concentração (Figura 10B). A maior concentração testada (400 µg/mL) foi a que promoveu maior redução da viabilidade celular. Além disso, tanto o extrato não encapsulado como o encapsulado demonstraram uma atividade seletiva frente a células tumorais, pois não alteraram a viabilidade de astrócitos (Figura 10C).

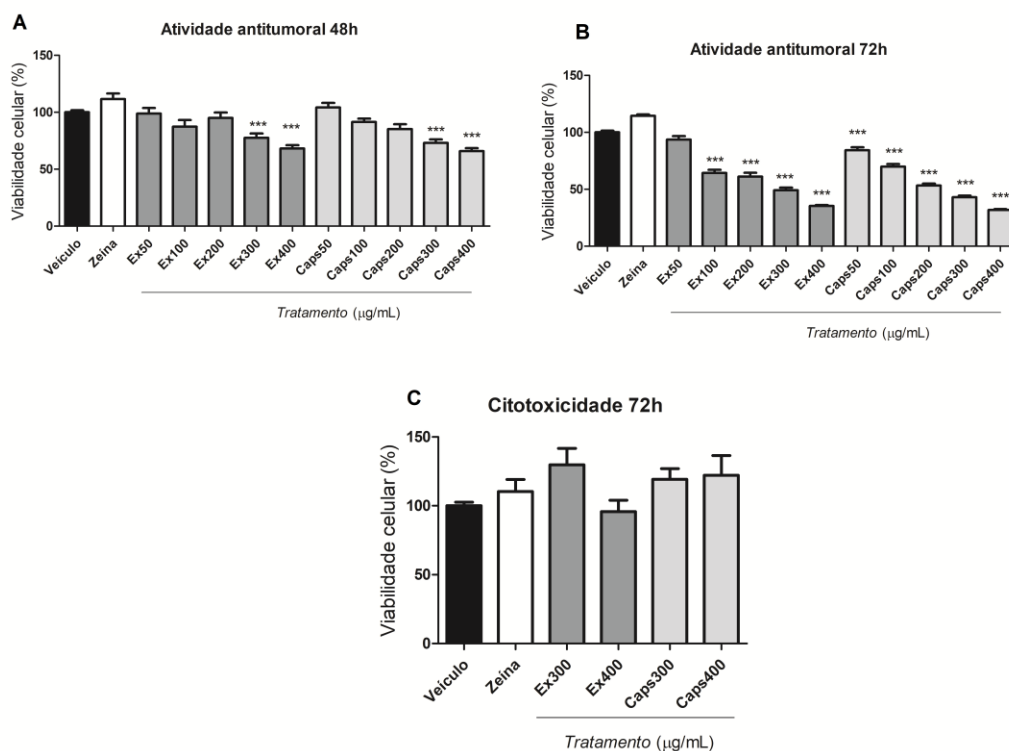


Figura 10 - Atividade antitumoral frente a células de glioma GL261 tratadas com extrato de brócolis encapsulado e não encapsulado nas concentrações de 50, 100, 200, 300 e 400 µg/mL durante 48 (A) e 72 h (B). Citotoxicidade celular (C) frente a astrócitos tratados com extrato de brócolis não encapsulado (Ex) e encapsulado com zeína (Caps) nas concentrações de 300 e 400 µg/mL durante 72 h. Veículo consiste em aplicação de dimetilsulfóxido, Zeína refere-se a cápsula de zeína sem adição de extrato.

*** $P < 0,001$ comparado ao veículo.

Os controles veículo e zeína não apresentaram atividade antiglioma em 48 ou 72 h. O extrato de brócolis não encapsulado e encapsulado na proporção 50:50 (extrato:zeína) apresentaram atividade antitumoral em 48 h nas concentrações de 300 e 400 µg/mL. Em 72 h, o extrato de brócolis encapsulado na proporção 50:50 (extrato:zeína) foi mais efetivo que o extrato não encapsulado, apresentando efeito antiglioma em todas as concentrações testadas. O efeito antitumoral do extrato de brócolis encapsulado e a ausência de efeito da cápsula sem adição de extrato sugere que possivelmente ocorreu a liberação controlada do extrato presente na cápsula com o tempo de exposição.

Alguns estudos demonstraram a eficácia do extrato de brócolis não encapsulado frente a linhagens tumorais de próstata, mama, glioblastoma, carcinoma cervical, hepatocarcinoma e leucemia (PLEDGIE-TRACY et al., 2007; PARK et al., 2007; CHOI et al., 2008; GAWLIK-DZIKI et al., 2012; BEAVER et al., 2017; BIJANGI-VISHEHSARAEJ et al., 2017). Um estudo que visou avaliar o efeito de isotiocianatos de brócolis frente a uma linhagem de glioma de rato C6 observou uma redução da viabilidade celular e morte apoptótica das células (XU et al., 2013).

O efeito citotóxico do extrato encapsulado em linhagem de glioma de camundongo (GL261) e a demonstração que esse efeito é seletivo, através da exposição do tratamento frente à cultivo primário de astrócitos, são resultados promissores e inéditos, demonstrando que a encapsulação por *electrospraying* utilizando zeína como material de parede permite uma liberação controlada do extrato.

O efeito antitumoral do extrato hidroalcoólico de brócolis encapsulado e não encapsulado pode estar relacionado à presença de isotiocianatos derivados de

glicosinolatos e compostos fenólicos, pois esses compostos afetam a sobrevivência das células do glioma e podem modular os estágios de promoção e progressão do processo carcinogênico. Os glicosinolatos podem atuar induzindo apoptose de células malignas através da via intrínseca desencadeada pela perda da função mitocondrial sem afetar a viabilidade de células saudáveis. Além disso, algumas evidências de outros estudos sugerem que esses compostos bioativos podem atuar nas interações epigenéticas de vários tipos de câncer, promovendo a reversão de alterações errôneas na transcrição de genes, bem como inibindo a invasão e migração de células tumorais gliais, bloqueando a expressão de metaloproteinases da matriz tipo 9 (MMP-9), enzimas que possuem atividade proteolítica associada ao desenvolvimento de invasão neoplásica e metástase (HUANG et al., 2012; XU et al., 2013; BACHIEGA et al., 2016; BIJANGI-VISHEHSARAEI et al., 2017).

5.4.6 ATIVIDADE NEUROPROTETORA *IN VITRO*

5.4.6.1 VIABILIDADE CELULAR

A citotoxicidade astrocitária induzida pelo LPS e o efeitos dos tratamentos com extrato de brócolis encapsulado e não encapsulado foram avaliados pelo teste de MTT como demonstrado na figura 11.

Não foi observada alteração da viabilidade celular em 48 h em nenhum dos grupos testados, este resultado corrobora com um estudo que avaliou o efeito do LPS na secreção astrocítica e não observou alteração na viabilidade e integridade celular (GUERRA et al., 2011).

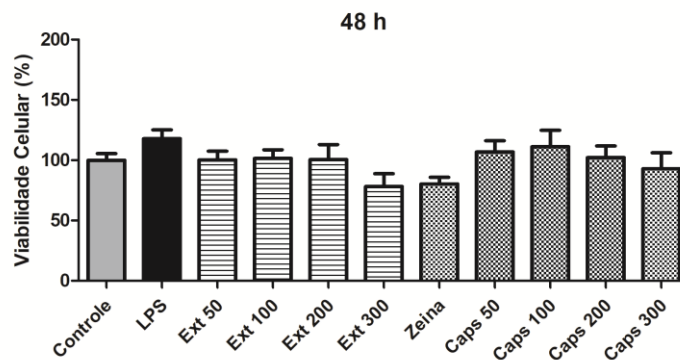


Figura 11 – Viabilidade celular de astrócitos expostos ao lipopolissacarídeo (LPS) e tratados com extrato de brócolis não encapsulado (Ext) e encapsulado (Caps) nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 µg/mL durante 48 h. Controle consiste em aplicação de dimetilsulfóxido, Zeína refere-se à cápsula de zeína sem adição de extrato. ### $P < 0,001$ comparado ao controle. *** $P < 0,001$ comparado ao LPS.

Estudos *in vitro* que visaram avaliar o efeito preventivo do SFN, um isotiocianato derivado dos glicosinolatos, em modelos de inflamação induzida por LPS, observaram uma diminuição do processo inflamatório pois o composto induziu o Nrf2 e HO-1. O Nrf2 é um fator de transcrição que ativa genes que codificam proteínas antioxidantes ativando fatores pró-inflamatórios, além de aumentar a expressão e a atividade da glutathione-S-transferase, enquanto a HO catalisa o grupo heme b que é convertido em biliverdina-IX α , produzindo subprodutos como monóxido de carbono e ferro. A biliverdina, o ferro e o monóxido de carbono desempenham as atividades protetoras frente à inflamação. Estes trabalhos evidenciam que o pré-tratamento com isotiocianato antes de uma exposição a LPS evita danos a membrana celular e diminui a formação de EROS (RYTER et al., 2006; HAN et al., 2007; INNAMORATO et al., 2008; VAUZOUR et al., 2010).

Diversos estudos relatam os efeitos neuroprotetores do SFN, pois pode controlar diversas vias metabólicas em células neuronais, principalmente ativando a via do Nrf2 e dos ARE regulando positivamente as enzimas de fase II. O SFN pode também diminuir a translocação do fator de transcrição kappa B (NF- κ B) do citosol para o núcleo, o que provoca a diminuição da produção de mediadores pró-inflamatórios, citocinas e marcadores oxidativos que estimulam a via apoptótica neuronal (VERGARA et al., 2008; JAZWA et al., 2011; GALUPPO et al., 2013; TARROZI et al., 2013; GIACOPPO et al., 2014; DE FIGUEIREDO et al., 2015).

5.4.6.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NÍVEIS DE NITRITOS

As patologias neuronais têm uma elevada produção de EROS. O LPS causa um processo inflamatório nos astrócitos e promove um aumento dessas espécies. Como pode-se observar na figura 12, todos os tratamentos promoveram um efeito protetor, reduzindo a produção de EROS tanto no encapsulado, quanto no não encapsulado, não havendo diferenças estatísticas entre os tratamentos.

O processo inflamatório exacerbado pode causar diversas doenças no organismo, sendo os macrófagos importantes no início, na manutenção e resolução do processo inflamatório, pois secretam citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), interferon- γ (IFN- γ), interleucina-6 (IL -6) e mediadores do estresse oxidativo, como ON, que é sintetizado pela óxido nítrico sintase induzível (ARIEL et al., 2012).

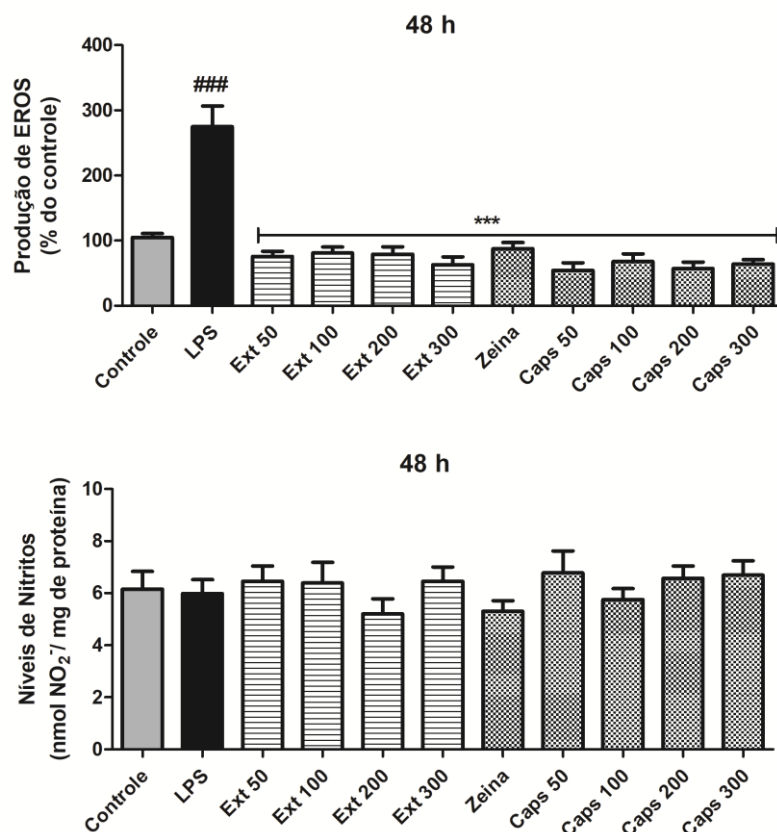


Figura 12 - Produção de espécies reativas de oxigênio e níveis de nitritos em astrócitos expostos ao LPS e tratados com extrato de brócolis não encapsulado (Ext) e encapsulado (Caps) nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 µg/mL durante 48 h. Controle consiste em aplicação de dimetilsulfóxido, Zeína refere-se à cápsula de zeína sem adição de extrato. ### $P < 0,001$ comparado ao controle. *** $P < 0,001$ comparado ao LPS.

Sabe-se que em situações de estresse oxidativo, o NrF2 que normalmente está armazenado no citoplasma por ação da KEAP1, é enviado para o núcleo, onde se heterodimeriza com proteínas Maf, aumentando a ligação aos genes ARE nas regiões promotoras, restaurando a homeostase por meio da regulação das enzimas de fase II (NGUYEN et al., 2005; BAIRD et al., 2011; KUMAR et al., 2014; PALL et al., 2015).

A ativação do Nrf2 resulta na proteção contra o estresse oxidativo induzido por H₂O₂ (JOHNSON et al., 2008). Os isotiocianatos também atuam diminuindo a resposta inflamatória através da inibição da via do fator nuclear kappa B (NFkB), pois quando o NFkB está ativado promove a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Estudos demonstram que o SFN atua inibindo a liberação da NFkB em linhagens celulares de macrófagos e em células da micróglia submetidas a ação do LPS (HEISS et al., 2001; BRANDENBURG et al., 2009).

Resumidamente, o SFN tem efeito protetor sobre os neurônios do SNC, pois é um ativador potente do Nrf2, promovendo efeitos antioxidantes, pois aumenta a regulação dos genes codificados pelas ARE, como glutathione-S-transferase e HO-1, reduzindo a produção intracelular de EROS, aumentando a viabilidade celular e diminuindo a fragmentação do DNA (GUERRERO-BELTRÁN et al., 2012; MORRONI et al., 2013). Desta maneira, o presente estudo demonstra um potencial, tanto do extrato não encapsulado, quanto do encapsulado para o controle das EROS, promovendo um efeito protetor contra a neuroinflamação.

Em relação aos níveis de nitritos (Figura 12), um indicador de produção de ON, a adição de extrato encapsulado e não encapsulado de brócolis não promoveu alteração neste parâmetro, após 48 h de tratamento. Os resultados do presente estudo demonstram que o efeito neuroprotetor do extrato de brócolis encapsulado e não encapsulado provavelmente não está relacionado a regulação dos níveis de ON, uma vez que não foram observadas alterações nesta espécie no tempo de 48 h.

5.4.6.3 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

A CAT é responsável pela defesa antioxidante, promovendo a degradação do H_2O_2 em água. O efeito protetor do extrato de brócolis encapsulado e não encapsulado sobre a atividade da CAT em astrócitos tratados com LPS pode ser observado na figura 13. A endotoxina reduziu significativamente a atividade dessa enzima, porém todos os tratamentos reestabeleceram essa alteração.

A SOD é uma enzima de defesa antioxidante responsável dismutação do radical $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 . O efeito preventivo do extrato encapsulado e não encapsulado de brócolis sobre a atividade da SOD em células expostas ao LPS está demonstrado na figura 13. Nenhum tratamento foi capaz de alterar a atividade da SOD em relação ao grupo controle.

A preservação das enzimas antioxidantes é importante para a manutenção das funções do organismo, combatendo as EROS e minimizando os danos causados por esses, como as doenças neuroinflamatórias. Estudos relatam que o tratamento com SFN em células mioblásticas H9c2 aumentou a atividade da SOD e da CAT, bem como preservou a atividade das enzimas em ratos (PIAO et al., 2010; FERNANDES et al., 2015).

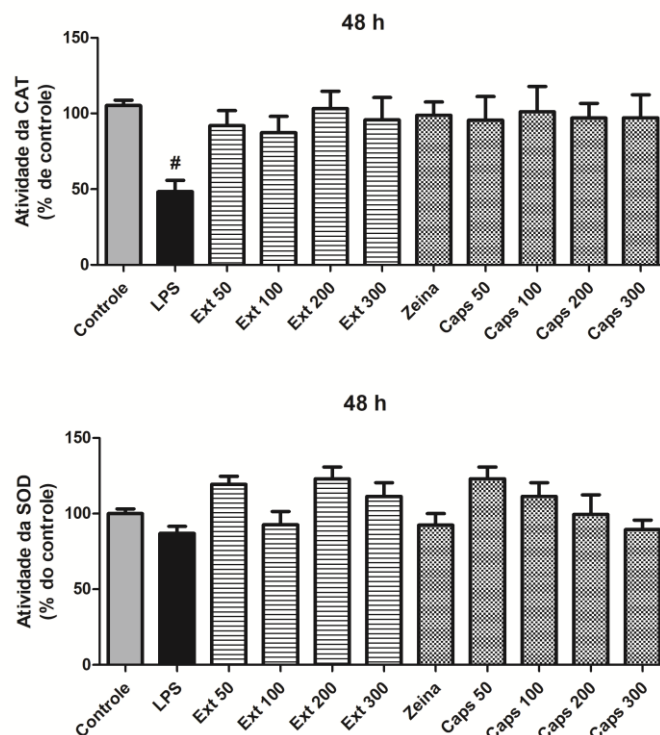


Figura 13 - Atividade da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em astrócitos expostos ao lipopolissacarídeo (LPS) e tratados com extrato de brócolis não encapsulado (Ext) e encapsulado (Caps) nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 µg/mL durante 48 h. Controle consiste em aplicação de dimetilsulfóxido, Zeína refere-se à cápsula de zeína sem adição de extrato. [#]*P*<0,05 comparado ao controle.

O efeito protetor das enzimas antioxidantes pelo SFN também foi relatado na literatura em células inflamadas com acroleína (QIN et al., 2014). Este efeito se deve possivelmente pela inibição do NF-κB e das citocinas inflamatórias pela via do Nrf2, evidenciando que os glicosinolatos presentes no brócolis podem atuar como estratégias para controle dos danos e doenças associadas ao estresse oxidativo (HEISS et al., 2001; ROSE et al., 2005).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato hidroalcólico de brócolis foi efetivo para a extração de glicosinolatos e compostos fenólicos, entretanto menos efetivo que a extração com metanol.

As cápsulas em concentrações inferiores a 50% de extrato hidroalcólico de brócolis em relação à zeína, produzidas pela técnica de *electrospraying*, apresentaram superfície lisa, uniforme e esférica, maior estabilidade térmica e eficiência de encapsulação e menor perda de massa do que as produzidas nas proporções acima de 60% de extrato.

As fibras em concentrações inferiores a 40% de extrato hidroalcólico de brócolis em relação à zeína, produzidas pela técnica de *electrospinning*, apresentaram superfície lisa, fina com boa estabilidade térmica e alta eficiência de encapsulação.

O extrato de brócolis encapsulado e não encapsulado apresentaram inibição dos radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazil e hidroxila, enquanto não foi observado efeito para o óxido nítrico, evidenciando um potencial antioxidante.

As bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *S. Typhimurium* apresentaram leve susceptibilidade ao extrato de brócolis, entretanto, não foram observados efeitos inibitórios e bactericidas.

Os extratos, encapsulado e não encapsulado, de brócolis apresentaram efeito antihiperglicemiante, promovendo a inibição das enzimas digestivas α -amilase e α -glicosidase.

A simulação do processo digestivo demonstrou o comportamento dos compostos a cada fase da digestão, sendo importante para observar onde ocorreu a perda das atividades antioxidantes e antihiperglicemiante.

O extrato de brócolis não encapsulado e o encapsulado na proporção de 50% de extrato não apresentaram efeito tóxico em astrócitos, mas apresentaram efeito antitumoral frente a células de tumores de glia.

O extrato encapsulado e o não encapsulado de brócolis apresentaram ação neuroprotetora demonstrando efeito preventivo nos níveis de espécies reativas de oxigênio em células astrocitárias expostas ao lipopolissacarídeo, bem como preservando a atividade de enzimas antioxidantes.

Os resultados do presente trabalho evidenciam que o extrato de brócolis não encapsulado e encapsulado por *electrospraying* podem ser considerados importantes nutracêuticos, atuando de maneiras distintas sobre o controle das doenças crônicas não transmissíveis.

7. Referências bibliográficas

- ABLE, A.J.; WONG, L.S.; PRASAD, A.; O'HARE, T.J. 1-MCP is more effective on a floral brassica (*Brassica oleracea* var. *italica* L.) than a leafy brassica (*Brassica rapa* var. *chinensis*). **Postharvest Biology and Technology**, v. 26, p.147-155, 2002.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, n. 2-3, p. 141-145, 2001.
- ALI, S. F.; LEBEL, C. P.; BONDY, S. C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 13, n. 3, p. 637-648, 1992.
- ANDRADE-CETTO, A.; BECERRA-JIMÉNEZ, J.; CÁRDENAS-VÁZQUEZ, R. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 27-32, 2008.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.1, p.1-9, 2007.
- 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**, v. 152, p. 66-74, 2014.
- ARGOS, P.; PEDERSEN, K.; MARKS, M.D.; LARKINS, B.A. A structural model for maize zein proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, p. 9984-9990, 1982.

- ARIEL, A.; MARIDONNEAU-PARINI, I.; ROVERE-QUERINI, P.; LEVINE, J. S.; MÜHL, H. Macrophages in inflammation and its resolution. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 324, p. 1-7, 2012.
- ARORA, D.S.; KAUR, J. Antimicrobial activity of spices. **International Journal of Antimicrobials Agents**, v. 12, p. 257-262, 1999.
- ARTÉS, F.; VALLEJO, F.; MARTÍNEZ, J.A. Quality of broccoli as influenced by film wrapping during shipment. **European Food Research and Technology**, v. 213, p.480-483, 2001.
- ASHOUSH, Y.A.M.; ALI, A.M.F.; ABOZID, M.M.; SALAMA, M.S.M. Comparative study between celery leaves and broccoli flowers for their chemical composition and amino acids as well as phenolic and flavonoid compounds. **Menoufia Journal of Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 1-13, 2017.
- AUGUSTINE, R.; ARYA, G.C.; NAMBIAR, D.M.; KUMAR, R.; BISHT, N.C. Translational genomics in Brassica crops: challenges, progress, and future prospects. **Plant Biotechnology Reports**, v. 8, n. 2, p. 65-81, 2014.
- AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: Aplicação à Tecnologia de Alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.
- BACHIEGA, P.; SALGADO, J.M.; CARVALHO, J.E.; RUIZ, A.L.T.G.; SCHWARZ, K.; TEZOTTO, T.; MORZELLE, M.C. Antioxidant and antiproliferative activities in different maturation stages of broccoli (*Brassica oleracea Italica*) biofortified with selenium. **Food Chemistry**, v. 190, p. 771–776, 2016.

- BAENAS, N.; MORENO, D.A.; GARCÍA-VIGUERA, C. Selecting sprouts of Brassicaceae for optimum phytochemical composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 45, p. 11409-11420, 2012.
- BAHADORAN, Z.; TOHIDI, M.; NAZERI, P.; MEHRAN, M.; AZIZI, F.; MIRMIRAN, P. Effect of broccoli sprouts on insulin resistance in type 2 diabetic patients: a randomized double-blind clinical trial. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, p. 767-771, 2012.
- BAI, Y.; CUI, W.; XIN, Y.; MIAO, X.; BARATI, M. T.; ZHANG, C.; CHEN, Q.; TAN, Y.; CUI, T.; ZHENG, Y.; Cai, L. Prevention by sulforaphane of diabetic cardiomyopathy is associated with up-regulation of Nrf2 expression and transcription activation. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 57, p. 82–95, 2013.
- BAIRD, L.; DINKOVA-KOSTOVA, A.T. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. **Archives of Toxicology**, v. 85, p. 241–272, 2011.
- BARONE, F.C.; FEUERSTEIN, G.Z. Inflammatory Mediators and Stroke: New Opportunities for Novel Therapeutics. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 19, p. 819–834, 1999.
- BEAVER, L.M.; LÖHR, C.V.; CLARKE, J.D.; GLASSER, S.T.; WATSON, G.W.; WONG, C.P.; ZHANG, Z.; WILLIAMS, D.E.; DASHWOOD, R.H.; SHANNON, J.; THUILLIER, F.; HO, E. Broccoli sprouts delay prostate cancer formation and decrease prostate cancer severity with a concurrent decrease in HDAC3 protein expression in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) mice. **Current Developments in Nutrition**, v. 2, n. 3, p. 1–12, 2017.

- BECKER, C.; BROBERT, G.P.; JOHANSSON, S.; JICK, S.S.; MEIER, C.R. Cancer risk in association with Parkinson disease: a population-based study. **Parkinson & related disorders**, v. 16, n. 3, p. 186-190, 2016.
- BEKTAŞOĞLU, B.; ESİN ÇELİK, S.; ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K.; APAK, R. Novel hydroxyl radical scavenging antioxidant activity assay for water-soluble antioxidants using a modified CUPRAC method. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, n. 3, p.1194–1200, 2006.
- BELLAVER, B.; SOUZA, D. G.; BOBERMIN, L. D.; SOUZA, D. O.; GONÇALVES, C. A.; QUINCOZES-SANTOS, A. Resveratrol protects hippocampal astrocytes against LPS-induced neurotoxicity through HO-1, p38, and ERK pathways. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 8, p. 1600-1608, 2015.
- BHUSHANI, J.A.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food-based applications. **Food Science & Technology**, v. 38, n.1, p. 1-13, 2014.
- BIJANGI-VISHEHSARAEI, K.; SAADATZADEH, M.R.; WANG, H.; NGUYEN, A.; KAMOCKA, M.M.; CAI, W.; COHEN-GADOL, A.A.; HALUM, S.L.; SARKARIA, J.N.; POLLOK, K.E.; SAFA, A.R. Sulforaphane suppresses the growth of glioblastoma cells, glioblastoma stem cell-like spheroids, and tumor xenografts through multiple cell signaling pathways. **Journal of Neurosurgery**, v. 127, p. 1219–1230, 2017.
- BLANDINI, F. Neural and immune mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 8, n.1, p. 189-201, 2013.
- BODDUPALLI, S.; MEIN, J.R.; LAKKANNA, S.; JAMES, D.R. Induction of phase 2 antioxidant enzymes by broccoli sulforaphane: perspectives in maintaining the

- antioxidant activity of vitamins A, C, and E. **Frontiers in Genetics**, v. 3, n. 7, p. 7, 2012.
- BOTREL, D.A.; BORGES, S.V.; FERNANDES, R.V.D.B.; DO CARMO, E.L. Optimization of fish oil spray drying using a protein: Inulin system. **Drying Technology**, v. 32, n. 3, p. 279-290, 2014.
- BRANDENBURG, L.-O.; KIPP, M.; LUCIUS, R.; PUFE, T.; WRUCK, C.J. Sulforaphane suppresses LPS-induced inflammation in primary rat microglia. **Inflammation Research**, v. 59, p. 443–450, 2009.
- BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n.1, p. 25–30, 1995.
- BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. **Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil, 2011-2022.** Disponível em: <
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_acoes_enfrent_dcnt_2011.pdf>
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil- Informe 2018.** Disponível em:
 <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta----o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf>>. Acesso em: 02 de janeiro de 2020.
- BUCHANAN, R.; LINDQVIST, R.; ROSS, T.; SMITH, M.; TODD, E.; WHITING, R. **Risk assessment of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods.** Microbiological Risk Assessment Series, 2004, 267p.

- CABRAL, I.S.R.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, p. 1523-1527, 2009.
- CAMPAS-BAYPOLI, O.N.; MACHADO, D.S.; BUENO-SOLANO, C.; NÚÑEZ-GASTÉLUM, J.A.; REYES-MORENO, C.; LÓPEZ-CERVANTES, J. Biochemical composition and physicochemical properties of broccoli flours. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, n. S4, p. 163-173, 2009.
- CHAKRABORTY, S.; LIAO, I.C.; ADLER, A.; LEONG, K.W. Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 12, p.1043-1054, 2009.
- CHAMPAGNE, C. P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 184-190, 2007.
- CHARRIER, J. G.; ANASTASIO, C. Impacts of antioxidants on hydroxyl radical production from individual and mixed transition metals in a surrogate lung fluid. **Atmospheric Environment**, v. 45, n. 40, p. 7555–7562, 2011.
- CHARRON, C.S.; SAXTON, A.M.; SAMS, C.E. Relationship of climate and genotype to seasonal variation in the glucosinolate–myrosinase system. I. Glucosinolate content in ten cultivars of *Brassica oleracea* grown in fall and spring seasons. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 671-681, 2005.
- CHEN, S.; OYARZABAL, E.A.; SUNG, Y.; CHU, C.; WANG, Q.; CHEN, S.; LU, R.; HONG, J. Microglial Regulation of Immunological and Neuroprotective Functions of Astroglia. **Glia**, v. 63, p. 118-131, 2014.

- CHEW, B.P.; PARK, J.S. Carotenoid action on the immune response. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 257-261, 2004.
- CHIANG, C.-J.; KADOUH, H.; ZHOU, K. Phenolic compounds and antioxidant properties of gooseberry as affected by in vitro digestion. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 2, p. 417-422, 2013.
- CHOI, W.Y.; CHOI, B.T.; LEE, W.H.; CHOI, Y.H. Sulforaphane generates reactive oxygen species leading to mitochondrial perturbation for apoptosis in human leukemia U937 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, p. 637–644, 2008.
- CILLA, A.; ALEGRÍA, A.; BARBERÁ, R.; LAGARDA, M. J. (2013). **Foods or Bioactive Constituents of Foods as Chemopreventives in Cell Lines After Simulated Gastrointestinal Digestion: A Review**. In J. A. Morales-González, Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants (pp. 131-151). México: InTech.
- CISKA, E.; DRABINSKA, N.; NARWOJSZ, A.; HONKE, J. Stability of glucosinolates and glucosinolate degradation products during storage of boiled white cabbage. **Food Chemistry**, v. 203, p. 340–347, 2016.
- CLARKE, D.B. Glucosinolate, structures and analysis in food. **Analytical Methods**, v. 2, p. 310-325, 2010.
- CLSI – Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (2015). Padronização dos **Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada**, 23, 1. http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf. Accessed 29/01/2019.

- CORRADINI, E.; MATTOSO, L. H. C.; GUEDES, C. G. F.; ROSA, D. S. Mechanical, thermal and morphological properties of poly(ϵ -caprolactone)/zein blends. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 15, n.6, p. 340-345, 2004.
- COSTA, R. G. F.; OLIVEIRA, J. E.; PAULA, G. F.; PICCIANI, P. H. S.; MEDEIROS, E. S.; RIBEIRO, C.; MATTOSO, L. H. C. Eletrofiação de polímeros em solução. Parte I: Fundamentação teórica. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 70-177, 2012.
- CROWE, K. M.; FRANCIS, C. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Functional Foods. **Journal of the academy of nutrition and dietetics**, v. 113, n. 8, p. 1096-1103, 2013.
- DE FIGUEIREDO, S. M.; BINDA, N. S.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; VIEIRA-FILHO, S. A.; CALIGIORNE, R. B. The antioxidant properties of organosulfur compounds (sulforaphane). **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, v. 9, p. 24–39, 2015.
- DE VOS, R.C.H.; MOCO, S.; LOMMEN, A.; KEURENTJES, J.J.B.; BINO, R.J.; HALL, R.D. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 778–791, 2007.
- DEIGHTON, R. F.; MCGREGOR, R.; KEMP, J.; MCCULLOCH, J.; WHITTLE, I.R. Glioma Pathophysiology: insights emerging from proteomics. **Brain Pathology**, v. 20, p. 691–703, 2010.
- DINARELLO, C.A. Immunological and inflammatory functions of the Interleukin-1 family. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 519-550, 2009.
- DOMÍNGUEZ-PERLES, R.; MARTÍNEZ-BALLESTA, M.C.; CARVAJAL, M.; GARCÍA-VIGUERA, C.; MORENO, D.A. Broccoli-derived by-products - A promising

- source of bioactive ingredients. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 4, p. C383-C392, 2010.
- DUARTE, M.C.T.; LEME, C.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G. Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec Escherichia coli. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 8, p. 139-143, 2006.
- DUDHANI, A.R.; KOSARAJU, S.L. Bioadhesive chitosan nanoparticles: preparation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 243-251, 2010.
- DWYER, J.H.; PAUL-LABRADOR, M.J.; FAN, J.; SHIRCORE, A.M.; MERZ, C.N.B.; DWYER, K.M. Progression of carotid intima-media thickness and plasma antioxidants: The Los Angeles Atherosclerosis Study. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, p. 313-319, 2004.
- EDER, C. Mechanisms of interleukin-1 b release. **Immunobiology**, v. 214, p. 543-553, 2009.
- EVANGELHO, J.A.; CRIZEL, R.L.; CHAVES, F.C.; PRIETTO, L.; PINTO, V.Z.; MIRANDA, M.Z.; DIAS, A.R.G.; ZAVAREZE, E.R. Thermal and irradiation resistance of folic acid encapsulated in zein ultrafine fibers or nanocapsules produced by electrospinning and electrospraying. **Food Research International**, v. 124, p. 137-146, 2018.
- EVERTON.; M. S.; ARNUBIO, V.; MARIA, F. G.; THALES, L. R.; ERIKA, F.; JOSE, E.; LAILA, S. E. Inhibitory action of Cerrado plants against mammalian and insect α amylases. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 95, p. 141-146, 2009.

- FAHEY, J.W.; ZALCMANN, A.T.; TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 5-51, 2001.
- FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 10, p. 510-523, 2010.
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations – Statistics Division). Production/ crops: Cabbages and other brassicas. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 30 de julho de 2018.
- FAVARO-TRINDADE, C.S.; PINHO, S.C.; ROCHA, G.A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.
- FERNANDES, R. O.; BONETTO, J. H. P.; BAREGZAY, B.; DE CASTRO, A. L.; PUUKILA, S.; FORSYTH, H.; SCHENKEL, P. C.; LLESUY, S. F.; BRUM, I. S.; ARAUJO, A. S.; KHAPER, N.; BELLÓ-KLEIN, A. Modulation of apoptosis by sulforaphane is associated with PGC-1 α stimulation and decreased oxidative stress in cardiac myoblasts. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 401, n. 1-2, p. 61–70, 2015.
- FRANCISCO, M.; CARTEA, M.E.; SOENGAS, P.; VELASCO, P. Effect of genotype and environmental conditions on health-promoting compounds in *Brassica rapa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2421-2431, 2011.
- FREIRE, J.M.; CARDOSO, M.G.; BATISTA, L.R.; ANDRADE, M.A. Essential oil of *Origanum majorana* L., *Illicium verum* Hook. f. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume:

- chemical and antimicrobial characterization. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.2, p.209-214, 2011.
- GALUPPO, M.; GIACOPPO, S.; DE NICOLA, G. R.; IORI, R.; MAZZON, E.; BRAMANTI, P. RS-Glucoraphanin bioactivated with myrosinase treatment counteracts proinflammatory cascade and apoptosis associated to spinal cord injury in an experimental mouse model. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 334, p. 88–96, 2013.
- GANGULY, R.; GUHA, D. Alteration of brain monoamines & EEG wave pattern in rat model of Alzheimer's disease & protection by *Moringa oleifera*, **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, p. 744-751, 2008.
- GANGULY, R.; RAY, K.; GUHA, D. Effect of *Moringa oleifera* in experimental model of Alzheimer's disease: role of antioxidants. **Annals of Neurosciences**, v. 12, p. 36-39, 2005.
- GARCÍA-SALDAÑA, J.S.; CAMPAS-BAYPOLI, O.N.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; SÁNCHEZ-MACHADO, D.I.; CANTÚ-SOTO, E.U.; RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, R. Microencapsulation of sulforaphane from broccoli seed extracts by gelatin/gum Arabic and gelatin/pectin complexes. **Food Chemistry**, v. 201, p. 94-100, 2016.
- GAWLIK-DZIKI, U.; JEŻYNA, M.; ŚWIECA, M.; DZIKI, D.; BARANIAK, B.; CZYŻ, J. Effect of bioaccessibility of phenolic compounds on in vitro anticancer activity of broccoli sprouts. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 469–476, 2012.
- GHORANI, B.; TUCKER, N. Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 227-240, 2015.

- GIACOPPO, S.; GALUPPO, M.; IORI, R.; DE NICOLA, G.; BRAMANTI, P.; MAZZON, E. The protective effects of bioactive (RS)-glucoraphanin on the permeability of the mice blood-brain barrier following experimental autoimmune encephalomyelitis. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 18, p. 194–204, 2014.
- GIACOPPO, S.; GALUPPO, M.; MONTAUT, S.; IORI, R.; ROLLIN, P.; BRAMANTI, P.; MAZZON, E. An overview on neuroprotective effects of isothiocyanates for the treatment of neurodegenerative diseases. **Fitoterapia**, v. 106, p. 12-21, 2015.
- GIÃO, M. S.; GOMES, S.; MADUREIRA, A. R.; FARIA, A.; PESTANA, D.; CALHAU, C.; PINTADO, M. E.; AZEVEDO, I.; MALCATA, F. X. Effect of in vitro digestion upon the antioxidant capacity of aqueous extracts of Agrimonia eupatoria, Rubus idaeus, Salvia sp. and Satureja montana. **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 761-767, 2012.
- GILL, C. I. R.; HALDAR, S.; PORTER, S.; MATTHEWS, S.; SULLIVAN, S.; COULTER, J.; McGLYNN, H.; ROWLNAD, I. The effect of cruciferous and leguminous sprouts on geno-toxicity, *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v. 13, p. 1199-1205, 2004.
- GONZÁLEZ-ARIAS, C.; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. Mycotoxin bioaccessibility/absorption assessment using in vitro digestion models: a review. **World Mycotoxin Journal**, v. 6, n. 2, p. 167-184, 2013.
- GUERRA, M.C.; TORTORELLI, L.S.; GALLAND, F.; DA RÉ, C.; NEGRI, E.; ENGELKE, D.S.; RODRIGUES, L.; LEITE, M.C.; GONÇALVES, C.A. Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, n. 128, p. 1-11, 2011.

- GUERRERO-BELTRAN, C.E.; CALDERON-OLIVER, M.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; CHIRINO, Y.I. Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, p. 503-508, 2012.
- HAN, J. M.; LEE, Y. J.; LEE, S. Y.; KIM, E. M.; MOON, Y.; KIM, H. W.; HWANG, O. Protective effect of sulforaphane against dopaminergic cell death. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 321, p. 249-256, 2007.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- HASS, C.; Take five-BACE and gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. **EMBO Journal**, v. 23, n.3, p. 483-488, 2004.
- HAZRA, B.; SARKAR, R.; BISWAS, S.; MANDAL, N. Comparative study of the antioxidant and reactive oxygen species scavenging properties in the extracts of the fruits of Terminalia chebula, Terminalia belerica and Emblica officinalis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, n. 1, p. 20, 2010.
- HE, Q.; ZHU, Z.P.; DONG, H.; XIAO, K.J. A sulfonated polymer membrane with Agbased graft: morphology, characterization, antimicrobial activity and interception ability. **RSC Advances**, v. 7, p. 37000-37006, 2017.
- HEISS, E.; HERHAUS, C.; KLIMO, K.; BARTSCH, H.; GERHAUSER, C. Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 32008-32015, 2001.
- HEISS, E.; HERHAUS, C.; KLIMO, K.; BARTSCH, H.; GERHÄUSER, C. Nuclear factor κ B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 32008–32015, 2011.

HERRERO, M.T.; ESTRADA, C.; MAATOUK, L.; VYAS, S. Inflammation in Parkinson's disease: role of glucocorticoids. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 9, p. 32-36, 2015.

HUANG, T.; CHANG, W.; WANG, M.; YANG, Y.; HSU, Y. Effect of sulforaphane on growth inhibition in human brain malignant glioma GBM 8401 cells by means of mitochondrial and MEK/ERK-mediated apoptosis pathway. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 63, p. 247–259, 2012.

HUNOT, S.; HIRSCH, E.C. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. **Annals of neurology**, v. 53, p. 49-60, 2003.

HUR, S. J.; LIM, B. O.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. In vitro human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 1-12, 2011.

IDRISS, H.; NAISMITH, J.H. TNF α and the TNF Receptor Superfamily: Structure Function Relationship (s). **Microscopy Research and Technique**, v. 195, p. 184-195, 2000.

INNAMORATO, N. G.; ROJO, A. I.; GARCIA-YAGÜE, A. J.; YAMAMOTO, M.; DE CEBALLOS, M. L.; CUADRADO, A. The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation. **Journal of Immunology**, v. 181, p. 680-689, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA (IBGE)- **Censo Agropecuário 2017**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6619>>. Acesso em: 30 de julho de 2018.

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas [Internet]. 6th ed. Brussels: **International Diabetes Federation**; 2014. Disponível em: <http://www.idf.org/diabetesatlas>.

- JAIN, S.; SARAF, S. Type 2 diabetes mellitus – its global prevalence and therapeutic strategies. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 4, p. 48–56, 2010.
- JAZWA, A.; ROJO, A.I.; INNAMORATO, N.G.; HESSE, M.; FERNANDEZ-RUIZ, J.; CUADRADO, A. Pharmacological targeting of the transcription factor Nrf2 at the basal ganglia provides disease modifying therapy for experimental parkinsonism. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, p. 2347-2360, 2011.
- JELLINGER, K.A. Recent advances in our understanding of neurodegeneration, **Journal of Neural Transmission**, v. 116, p. 1111-1162, 2009.
- JOHNSON, J.A.; JOHNSON, D.A.; KRAFT, A.D.; CALKINS, M.J.; JAKEL, R.J.; VARGAS, M.R.; CHEN, P.-C. The Nrf2-ARE pathway: An indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1147, p. 61–69, 2008.
- KENSLER, T. W.; EGNER, P. A.; AGYEMAN, A. S.; VISVANATHAN, K.; GROOPMAN, J. D.; CHEN, J.-G.; FAHEY, J. W.; TALALAY, P. Keap1–Nrf2 Signaling: A Target for Cancer Prevention by Sulforaphane. **Topics in Current Chemistry**, 163–177, 2013.
- KIM, J.K.; SHIN, E.C.; KIM, C.R.; PARK, G.G.; CHOI, S.J.; PARK, C.S.; SHIN, D. Effects of Brussels sprouts and their phytochemical components on oxidative stress-induced neuronal damages in PC12 cells and ICR mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, p. 1057-1061, 2013.
- KIM, J.M.; ARAKI, S.; KIM, D.J.; PARK, C.B.; TAKASUKA, N.; BABA-TORIYAMA, H.; OTA, T.; NIR, Z.; KHACHIK, F.; SHIMIDZU, N.; TANAKA, Y.; OSAWA, T.; URAJI, T.; MURAKOSHI, M.; NISHINO, H.; TSUDA, H. Chemopreventive effects of

- carotenoids and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,2 dimethylhydrazine initiation. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 81-85, 1998.
- KRISTAL, A.R.; LAMPE, J.W. Brassica vegetables and prostate cancer risk: a review of the epidemiological evidence. **Nutrition and Cancer**, v. 42, p.1-9, 2002.
- KUMAR, H.; KIM, I.-S.; MORE, S.V.; KIM, B.-W.; CHOI, D.-K. Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. **Natural Product Reports**, v. 31, p. 109–139, 2014.
- LAKSHMY, R.; RAO, P.S.; SESIKERAN, B.; SURYAPRAKASH, P. Iodine metabolism in response to goitrogen induced altered thyroid status under conditions of moderate and high intake of iodine. **Hormone and Metabolic Research**, v. 27, p. 450-454, 1995.
- LATHIA, J. D.; MACK, S. C.; MULKEARNS-HUBERT, E. E.; VALENTIM, C. L. L.; RICH, J. N. Cancer stem cells in glioblastoma. **Genes & Development**, v. 29, p. 1203–1217, 2015.
- LEE, Y. A.; CHO, E. J.; TANAKA, T.; YOKOZAWA, T. Inhibitory activities of proanthocyanidins from persimmon against oxidative stress and digestive enzyme related to diabetes. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 53, p. 287-292, 2007.
- LELARIO, F.; BIANCO, G.; BUFO, S.A.; CATALDI, T.R. Establishing the occurrence of major and minor glucosinolates in Brassicaceae by LC-ESI-hybrid linear ion-trap and Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Phytochemistry**, v. 73, n.1, p. 74-83, 2012.

- LIPINSKI, B. Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1–9, 2011.
- LONG-SMITH, C.M.; SULLIVAN, A.M.; NOLAN, Y.M. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. **Progress in neurobiology**, v. 89, p. 277-287, 2009.
- LÓPEZ-RUBIO, A.; SANCHES, E.; WILKANOWICZ, S.; SANZ, Y.; LAGARON, J.M. Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living bifidobacteria in food hydrocolloids. **Food Hydrocolloids**, v. 28, n. 1, p. 159-167, 2012.
- LUIKING, Y. C.; DEUTZ, N. E. P. Isotopic investigation of nitric oxide metabolism in disease. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 6, n. 1, p.103–108, 2003.
- LUO, Y.; WANG, T.T.Y.; TENG, Z.; CHEN, P.; SUN, J.; WANG, Q. Encapsulation of indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane in zein/carboxymethyl chitosan nanoparticles with controlled release property and improved stability. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 224-230, 2013.
- LUO, Y.; ZHANG, B.; WHENT, M.; YU, L.; WANG, Q. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of-tocopherol, and its in vitro controlled release study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 145-152, 2011.
- MAHDAVI, S.A.; JAFARI, S.M.; GHORBANI, M.; ASSADPOOR, E. Spray-drying microencapsulation of anthocyanins by natural biopolymers: A review. **Drying Technology**, v. 32, n. 5, p. 509-518, 2014.

- MALTA, D.C.; MORAIS NETO, O.L.; SILVA JÚNIOR, J.B. Apresentação do plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis no Brasil, 2011 a 2022. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 4, p. 425-438, 2011.
- MANCHALI, S.; CHIDAMBARA MURTHY, K. N.; PATIL, B. S. Crucial facts about health benefits of popular cruciferous vegetables. **Journal of Functional Foods**, 4(1), 94–106, 2012.
- MARWAHA, R.K.; TANDON, N.; GUPTA, N.; KARAK, A.K.; VERMA, K.; KOCHUPILLAI, N. Residual goitre in the postiodization phase: iodine status, thiocyanate exposure and autoimmunity. **Clinical Endocrinology**, v. 59, p. 672-681, 2003.
- MCCOY, M.K.; TANSEY, M.G. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. **Journal Neuroinflammation**, v. 5, n. 45, p. 1-13, 2008.
- MCCMAHON, M.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M.; HAYES, J. D. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 21592-21600, 2003.
- MELO, C. M. T.; FARIA, J. V. Composição centesimal, compostos fenólicos e atividade antioxidante em partes comestíveis não convencionais de seis olerícolas. **Bioscience Journal**, v. 30, n.1, p. 93-100, 2014.
- MÉNARD, O.; CATTENOZ, T.; GUILLEMIN, H.; SOUCHON, I.; DEGLAIRE, A.; DUPONT, D.; PICQUE, D. Validation of a new in vitro dynamic system to simulate infant digestion. **Food Chemistry**, v. 145, p. 1039-1045, 2014.

- MILATOVIC, D.; MONTINE, T.J.; ASCHNER, M. Prostanoid signaling: Dual role for prostaglandin E₂ in neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 32, p. 312-319, 2011.
- MIMURA, J.; ITOH, K. Role of Nrf2 in the pathogenesis of atherosclerosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 88, p. 221-32, 2015.
- MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALANCE, S.; BOHN, T.; BOURLIEU, C.; CARRIÈRE, F.; BOUTROU, R.; CORREDIG, M.; DUPONT, D.; DUFOUR, C.; EGGER, L.; GOLDING, M.; KARAKAYA, S.; KIRKHUS, B.; FEUNTEUN, S. LE; LESMES, U.; MACIERZANKA, A.; MACKIE, A.; MARZE, S.; MCCLEMENTS, D. J.; MENARD, O; RECIO, I.; SANTOS, C. N.; SINGH, R. P.; VEGARUD, G. E.; WICKHAM, M. S. J.; WEITSCHIES, W.; BRODKORB, A. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. **The Royal Society of Chemistry**, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.
- MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.
- MORALES, I.; FARÍAS, G.; MACCIONI, R.B. La neuroinflamación como factor detonante del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. **Revista Chilena de Neuro-Psiquiatría**, v. 48, n.1, p. 49-57, 2010.
- MORE, S.V.; KUMAR, H.; KIM, I.S.; SONG, S.Y.; CHOI, D.K. Cellular and molecular mediators of neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1-12, 2013.
- MORRONI, F.; TAROZZI, A.; SITA, G.; BOLONDI, C.; MORAGA, J.M.Z.; CANTELLI-FORTI, G.; HRELIA, P. Neuroprotective effect of sulforaphane in 6-

- hydroxydopamine-lesioned mouse model of Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, v. 36, p. 63-71, 2013.
- MUNDAY, R.; MUNDAY, C.M. Selective induction of phase II enzymes in the urinary bladder of rats by allyl isothiocyanate, a compound derived from Brassica vegetables. **Nutrition and Cancer**, v. 44, p. 52-59, 2002.
- 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**, v. 81, n. 4, p. 322-328, 2013.
- NAYAK, R.; PADHYE, R.; KYRATZIS, I.L.; TRUONG, Y.B.; ARNOLD, L. Effect of viscosity and electrical conductivity on the morphology and fiber diameter in melt electrospinning of polypropylene. **Textile Research Journal**, v. 83, n. 6, 2013.
- NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; BUGARSKI, B. An Overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1806-1815, 2011.
- NEWMANN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–691, 2016.
- NGUYEN, T.; SHERRATT, P.J.; NIOI, P.; YANG, C.S.; PICKETT, C.B. Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 32485–32492, 2005
- NIMALARATNE, C.; SCHIEBER, A.; WU, J. Effects of storage and cooking on the antioxidant capacity of laying hen eggs. **Food Chemistry**, v. 194, p. 111–116, 2016.

- OBOH, G.; ADEMILUYI, A. O.; FALOYE, Y. M. Effect of Combination on the Antioxidant and Inhibitory Properties of Tropical Pepper Varieties Against α -Amylase and α -Glucosidase Activities *In Vitro*. *Journal of Medicinal Food*, v. 14, n. 10, p. 1152–1158, 2011.
- OLIVEIRA, A.B.A.; PAULA, C.M.D.; CAPALONGA, R.; CARDOSO, M.R.I.; TONDO, E.C. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista HCPA**, v.30, n.3, p. 279-285, 2010.
- OLMOS, G.; LLADÓ, J. Tumor necrosis factor Alpha: A link between neuroinflammation and excitotoxicity. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1-12, 2014.
- PADAYATTY, S.J.; KATZ, A.; WANG, Y.; ECK, P.; KWON, O. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 22, p. 18-35, 2003.
- PADILLA, G.; CARTEA, M.E.; VELASCO, P.; DE HARO, A.; ORDAS, A. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa*. **Phytochemistry**, v. 68, n. 4, p. 536-545, 2007.
- PALL, M.L.; LEVINE, S. Nrf2, a master regulator of detoxification and also antioxidant, anti-inflammatory and other cytoprotective mechanisms, is raised by health promoting factors. **Sheng Li Xue Bao**, v. 67, p. 1–18, 2015.
- PAPI, A.; ORLANDI, M.; BARTOLINI, G.; BARILLARI, J.; IORI, R.; PAOLINI, M.; FERRONI, F.; GRAZIA FUMO, M.; PEDULLI, G.F.; VALGIMIGLI, L. Cytotoxic and Antioxidant Activity of 4-Methylthio-3-butenyl Isothiocyanate from *Raphanus sativus* L. (Kaiware Daikon) Sprouts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 875–883, 2008.

- PARK, S.Y.; KIM, G.Y.; BAE, S.; YOO, Y.H.; CHO, Y.H. Induction of apoptosis by isothiocyanate sulforaphane in human cervical carcinoma HeLa and hepatocarcinoma HepG2 cells through activation of caspase 3. **Oncology Reports**, v. 18, p. 181–187, 2007.
- PARVEEN, S.; MITRA, M.; KRISHNAKUMAR, S.; SAHOO, S.K. Enhanced antiproliferative activity of carboplatin-loaded chitosan-alginate nanoparticles in a retinoblastoma cell line. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 3120-3131, 2010.
- PAULA, V.J.R.; SCHAEFFER, E.L.; TALIB, L.L.; GATTAZ, W.F.; FORLENZA, O.V. Inhibition of phospholipase A2 increased Tau phosphorylation at Ser 214 in embryonic rat hippocampal neurons. **Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids**, v. 82, n.1, p. 57-60, 2010.
- PETERSON, L.J.; FLOOD, P.M. Oxidative stress and microglial cells in Parkinson's disease. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, p. 1-12, 2012.
- PIAO, C. S.; GAO, S.; LEE, G. H.; KIM, DO S.; PARK, B. H.; CHAE, S. W.; KIM, S. H. Sulforaphane protects ischemic injury of hearts through antioxidant pathway and mitochondrial KATP channels. **Pharmacological Research**, v. 61, n. 4, p. 342–348. 2010.
- PLEDGIE-TRACY, A.; SOBOLEWSKI, M.D.; DAVIDSON, N.E. Sulforaphane induces cell type–specific apoptosis in human breast cancer cell lines. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 6, n. 3, p. 1203–1217, 2007.
- QIN, W-S.; DENG, Y-H.; CUI, F-C. Sulforaphane protects against acrolein-induced oxidative stress and inflammatory responses: modulation of Nrf-2 and COX-2 expression. **Archives of Medical Science**, v. 12, n. 4, p. 871-880, 2014.

- RADI, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 23, p. 5839–5848, 2018.
- RADI, R. Peroxynitrite, a Stealthy Biological Oxidant. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 37, p. 26464–26472, 2013.
- RAMOS, E.; MACHADO, A.; LOPES, J.G.; COSTA, S.H.M. **Antimicrobianos em ginecologia e obstetrícia**. Porto Alegre: Artmed, 2007, 373 p.
- RASK, L.; ANDREASSON, E.; EKBOM, B.; ERIKSSON, S.; PONTOPPIDAN, B.; MEIJER, J. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. **Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 93-113, 2000.
- REBELLO, F.F.P. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Revista Agrogeoambiental**, v. 1, n.3, p. 134-144, 2009.
- REIS, L.C.R.; OLIVEIRA, V.R.; HAGEN, M.E.K.; JABLONSKI, A.; FLORES, S.H.; RIOS, A.O. Carotenoids, flavonoids, chlorophylls, phenolic compounds and antioxidant activity in fresh and cooked broccoli (*Brassica oleracea* var. Avenger) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. Alphina F1). **LWT – Food Science and Technology**, p. 1-7, 2015.
- RHABASA-LHORET, R.; CHIASSON, J. L. **Alpha-glucosidase Inhibitors**. In: International Textbook of Diabetes mellitus, Vol. 1. DeFronzo RA, Ferrannini E, Keen H & Zimmet P (eds). John Wiley, UK, 2004.
- ROCHA, N. P.; DE MIRANDA, A. S.; TEIXEIRA, A. L. Insights into neuroinflammation in Parkinson's Disease: from biomarkers to anti-inflammatory based therapies. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-12, 2015.

- ROCHA, P.N.; PLUMB, T.J.; COFFMAN, T.M. Eicosanoids: lipid mediators of inflammation in transplantation. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 25, n. 2, p. 215-227, 2003.
- ROESLER, R.; MALTA, L.M.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p. 53-60, 2007.
- ROSE, P.; WON, Y. K.; ONG, C. N.; WHITEMAN, M. Beta-phenylethyl and 8-methylsulphinyloctyl isothiocyanates, constituents of watercress, suppress LPS induced production of nitric oxide and prostaglandin E2 in RAW 264.7 macrophages. **Nitric Oxide**, v. 12, p. 237-243, 2005.
- RYTER, S. W.; ALAN, J.; CHOI, A. M. K. Heme oxygenase 1/carbon monoxide: from basic science to the therapeutic application. **Physiological Reviews**, v. 86, p. 583-560, 2006.
- SANJUÁN, N.; BON, J.; CLEMENTE, G.; MULET, A. Changes in the quality of dehydrated broccoli florets during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 62, p. 15-21, 2004.
- SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina Do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308–313, 2004.
- SELKOE, D.J. Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. **Annals of Internal Medicine**, v. 140, n. 8, p. 627-638, 2004.

- SHAFTEL, S.S.; GRIFFIN, W.S.T.; BANION, M.K.O. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. **Journal Neuroinflammation**, v. 12, p. 1-12, 2008.
- SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820–897, 2015.
- SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, v; 13, p. 171-192, 2001.
- SILVA, N. C. C.; FERNANDES JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 3, p. 402-413, 2010.
- SILVEIRA, E.F.; AZAMBUJA, J.H.; CARVALHO, T.R.; KUNZLER, A.; SILVA, D.S.; TEIXEIRA, F.C.; RODRIGUES, R.; BEIRA, F.T.; ALVES, R.C.S.; SPANEVELLO, R.M.; CUNICO, W.; STEFANELLO, F.M.; HORN, A.P.; BRAGANHOL, E. Synthetic 2-aryl-3-((piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidin-4-ones exhibit selective *in vitro* antitumoral activity and inhibit cancer cell growth in a preclinical model of glioblastoma multiforme. **Chemico-Biological Interactions**, v. 25, n. 266, p.1-9, 2017.
- SIMI, A.; LEROUET, D.; PINTEAUX, E.; BROUGH, D. Mechanisms of regulation for interleukin-1 b in neurodegenerative disease. **Neuropharmacology**, v. 52, p. 1563-1569, 2007.
- SONDERBY, I. E.; GEU-FLORES, F.; HALKIER, B. A. Biosynthesis of glucosinolates—gene discovery and beyond. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 5, p. 283–290, 2010.

- STORCK, C.R.; NUNES, G.L.; OLIVEIRA, B.B.; BASSO, C. Folhas, talos, cascas e sementes de vegetais: composição nutricional, aproveitamento na alimentação e análise sensorial de preparações. **Ciência Rural**, v. 43, p. 537-543, 2013.
- STUEHR, D. J.; NATHAN, C. F. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 169, n. 5, p. 1543-1555, 1989.
- SUAVE, J.; DALL'GNOL, E.C.; PEZZIN, A.P.T.; SILVA, D.A.K.; MEIER, M.M.; SOLDI, V. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v.7, n.2, p.12-20, 2006.
- SWAIN, T.; HILLIS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L.- The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.10, p. 63-68, 1959.
- SYKIOTIS, G. P.; HABEOS, I. G.; SAMUELSON, A. V.; BOHMANN, D. The role of the antioxidante and longevity promoting Nrf2 pathway in metabolic regulation. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 14, p. 41-48, 2011.
- TANG, L.; ZHANG, Y. Dietary isothiocyanates inhibit the growth of human bladder carcinoma cells. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 2004-2010, 2004.
- TARROZZI, A.; ANGELONI, C.; MALAGUTI, M.; MORRONI, F.; HRELIA, S.; HRELIA, P. Sulforaphane as a potential protective phytochemical against neurodegenerative diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 1-10, 2013.
- THOMAS, M.; BADR, A.; DESJARDINS, Y.; GOSSELIN, A.; ANGERS, P. Characterization of industrial broccoli discards (*Brassica oleracea* var. italica) for their

- glucosinolate, polyphenol and flavonoid contents using UPLC MS/ MS and spectrophotometric methods. **Food Chemistry**, v. 245, p. 1204-1211, 2018.
- THORNALLEY, P.J. Isothiocyanates: mechanism of cancer chemopreventive action. **Anti-Cancer Drugs**, v.13, n.4, p.331-338, 2002.
- TIAN, G.; LI, Y.; YUAN, Q.; CHENG, L.; KUANG, P.; TANG, P. The stability and degradation kinetics of Sulforaphane in microcapsules based on several biopolymers via spray drying. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 5-10, 2015.
- TORRES-CONTRERAS, A.M.; NAIR, V.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; JACOBO-VELÁZQUEZ, D.A. Stability of bioactive compounds in broccoli as affected by cutting styles and storage time. **Molecules**, v. 22, n.636, p.1-15, 2017.
- TORRES-GINER, S.; LAGARON, J.M. Zein-based ultrathin fibers containing ceramic nanofillers obtained by electrospinning. I. Morphology and thermal properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 118, p. 778-789, 2010.
- TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Principles of anatomy and physiology**, Twelfth Edition, John Wiley & Sons, Inc. 922-59, 2009.
- VALLEJO, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; GARCÍA-VIGGUERA, C. Effect of climatic and sulphur fertilisation conditions, on phenolic compounds and vitamin C, in the inflorescences of eight broccoli cultivars. **European Food Research and Technology**, v. 216, p. 395-401, 2003.
- VAUZOUR, D.; BUONFIGLIO, M.; CORONA, G.; CHIRAFISI, J.; VAFEIADOU, K.; ANGELONI, C.; HRELIA, S.; HRELIA, P.; SPENCER, J. P. Sulforaphane protects cortical neurons against 5-S-cysteinyl-dopamine-induced toxicity through the

- activation of ERK1/2 Nrf-2 and the upregulation of detoxification enzymes. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, p. 532-542, 2010.
- VENDRAMINI-COSTA, D.B.; CARVALHO, J.E. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 26, p. 3831-3852, 2012.
- VERGARA, F.; WENZLER, M.; HANSEN, B.G.; KLIEBENSTEIN, D.J.; HALKIER, B.A.; GERSHENZON, J.; SCHNEIDER, B. Determination of the absolute configuration of the glucosinolate methyl sulfoxide group reveals a stereospecific biosynthesis of the side chain. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2737–2742, 2008.
- VERSANTVOORT, C. H.; VAN DE KAMP, E.; ROMPELBERG, C. J. RIVM report: Development and applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food. **Bilthoven**, p. 1-87, 2004.
- VILLARREAL-GARCÍA, D.; JACOBO-VELÁZQUEZ, D.A. Glucosinolates from broccoli: Nutraceutical properties and their purification. **Current Trends Nutraceuticals**, v. 1, p. 1-5, 2016.
- VINHOLES, J.; GROSSO, C.; ANDRADE, P.B.; GIL-IZQUIERDO, A.; VALENTÃO, P.; DE PINHO, P.G.; FERRERES, F. In vitro studies to assess the antidiabetic, anti-cholinesterase and antioxidant potential of *Spergularia rubra*. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 454-462, 2011.
- VOMHOF-DEKREY, E. E.; PICKLO, M. J. The Nrf2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 23(10), 1201–1206, 2012.

- WANG, J.; GU, H.; YU, H.; ZHAO, Z.; SHENG, X.; ZHANG, X. Genotypic variation of glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) florets from China. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 735-741, 2012.
- WEN, P.; WEN, Y.; ZONG, M.; LINHARDT, R.J.; WU, H. Encapsulation of bioactive compound in electrospun fibers and its potential application. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 9161-9179, 2017.
- WILLIAMSON, G. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, n. 1, p. 48-57, 2013.
- WISEMAN, A. D. dietary anticancer isothiocyanates (ITC) in Brassica raise the reduced-glutathione barrier to DNA-damage in the colon? **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 215-216, 2005.
- WU, H.; LIANG, H.; YUAN, Q.; WANG, T.; YAN, X. Preparation and stability investigation of the inclusion complex of sulforaphane with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 613-617, 2010.
- WU, T.; ZHOU, X.; DENG, Y.; JING, Q.; LI, M.; YUAN, L. In vitro studies of *Gynura divaricata* (L.) DC extracts as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 2, p. 305–308, 2011.
- WU, X.; ZHOU, Q.; XU, K. Are isothiocyanates potential anti-cancer drugs? **Acta Pharmacologica Sinica**, v.30, n.5, p. 501-512, 2009.
- WU, Y.; MAO, J.; MEI, L.; LIU, S. Kinetic studies of the thermal degradation of sulforaphane and its hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. **Food Research International**, v. 53, p. 529-533, 2013.

- WU, Y.; ZOU, L.; MAO, J.; HUANG, J.; LIU, S. Stability and encapsulation efficiency of sulforaphane microencapsulated by spray drying. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 497-503, 2014.
- XIN, Y.; ZHANG, M.; ADHIKARI, B. Effect of trehalose and ultrasound-assisted osmotic dehydration on the state of water and glass transition temperature of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.). **Journal of Food Engineering**, v. 119, n.3, p. 640-647, 2013.
- XU, J.J.; YU, H.Q.; ZHAO, W.; JIN, H.; HEN, N.; QI, L.; LIU, X.J. Induction of broccoli polypeptide on apoptosis of C6 glioma cells. **Journal of Jilin University Medicine Edition**, v. 39, n.1, p. 8–11, 2013.
- YAMAGISHI, S.; MATSUI, T.; UEDA, S.; FUKAMI, K.; OKUDA, S. Clinical utility of acarbose, an alpha-glucosidase inhibitor in cardiometabolic disorders. **Current Drug Metabolism**, v. 10, p. 159–163, 2009.
- YIN, Z.; ZHANG, W.; FENG, F.; ZHANG, Y.; KANG, W. α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. **Food Science and Human Wellness**, v. 3, n. 3, p. 136-174, 2014.
- ZAMBELLI, R.A.; PONTES, B.C.V.; PONTES, E.R.; SILVA, M.L.; SANTOS JÚNIOR, E.C.; PINTO, L.I.F.; MELO, C.A.L.; FARIAS, M.M.; COSTA, C.S.; SILVA, A.C. Broccoli and carrot industrial solid waste characterization and application in the bread food matrix. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 6, n. 6-1, p. 9-15, 2017.
- ZHANG, Z.; CUI, W.; LI, G.; YUAN, S.; XU, D.; HOI, M.P.M.; LIN, Z.; DOU, J.; HAN, Y.; LEE, S.M.Y. Baicalein protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity through

activation of Keap1/Nrf2/HO-1 and involving PKC α and PI3K/AKT signaling pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 8171–8182, 2012.

ZHENG, H.; WHITMAN, S. A.; WU, W.; WONDRAK, G. T.; WONG, P. K.; FANG, D.; ZHANG, D. D. Therapeutic potential of Nrf2 activators in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 60, n. 11, p. 3055–3066, 2011.

APÊNDICES

8.1 Apêndice 1 – Perfil de compostos encontrados no extrato de brócolis encapsulado e não encapsulado após análise da simulação da digestão.

Compostos	RT	<i>m/z</i> mensurado	<i>m/z</i> teórico	Erro (ppm)	MSigma	CE (eV)	<i>m/z</i> fragmentação de íon
Ácido protocatecuico 4-glucosídeo	4,75	315,0717	315,0722	1,5	59,4	25,8	108,0218 (100) 152,0107 (87.6) 109,0292 (25.0) 95,0140 (11.5)
Ácido 5- cafeoilquínico	5,53	353,0865	353,0878	3,40	67,1	27,7	191,0552 (100) 179,0344 (63) 135,0451 (49)
Glucobrassicina	5,82	447,0532	447,0528	1,0	54,6	32,4	96,9597 (100) 95,9519 (69) 98,9550 (4)
Ácido 4-hidroxibenzoico	6,11	299,0764	299,0772	2,8	53,1	15,0	137,0242 (100) 93,0341 (3)
Ácido p-coumaroilquínico	6,26	337,0927	337,0929	0,5	69,5	26,9	163,0411 (100) 119,0499 (43) 191,0552 (10)
Ácido clorogênico	6,45	353,0865	353,0878	3,40	67,1	27,7	191,0552 (100) 179,0344 (64) 135,0451 (49)
Ácido p-cumárico 4-glucosídeo	6,64	325,0926	325,0929	0,9	38,2	26,3	145,0294 (100) 119,0461 (12) 163,0395 (6)
4-methoxy-glucobrassicina	6,68	477,0634	477,0634	0,8	62,4	32,4	96,9598 (100) 95,9515 (66)
1-O-sinapoil-β-D-glicose	7,03	385,1130	385,1140	2,8	74,6	29,3	205,0496 (100) 223,0599 (40)
Neoglucobrassicina	7,51	477,0634	477,0643	2,50	66,1	33,9	96,9598 (100) 95,9515 (35)

Ácido 4-p-coumaroilquínico	6,84	337,0922	337,0929	2,2	78,5	26,9	191,0560 (100) 173,0454 (46) 163,0409 (32) 119,0490 (18)
Ácido cumárico	6,21	163,0391	163,0401	6,0	58,1	-	-
Ácido sinápico	8,97	223,0597	223,0612	6,50	40,1	-	-
Ácido ferúlico	9,12	193,0491	193,0506	8,0	89,1	-	-
1,2- disinapoilgentiobiose	9,79	753,2234	753,2248	1,8	99,8	42,6	205,0505 (100) 223,0609 (34) 529,1580 (6)
1,2,2'- trisinapoilgentiobiose	10,72	959,2773	959,2768	-0,5	12,7	48,8	205,0510 (100) 223,0609 (23) 735,2124 (6)

RT – Tempo de retenção em minutos; mSigma- ajuste entre padrão isotópico medido e teórico; CE, energia de colisão (eV)

[†]Confirmado com padrão.

^βLi et al. 2018. *Molecules* 2018, 23(5), 1139; <https://doi.org/10.3390/molecules2305113>

8.2 Apêndice 2 – Artigo publicado na Revista Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 192 (2020) 111020



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb



Glucosinolates and phenolic compounds rich broccoli extract: Encapsulation by electrospraying and antitumor activity against glial tumor cells

Marjana Radünz^{a,*}, Helen Cristina Dos Santos Hackbart^a, Natália Pontes Bona^b, Nathalia Stark Pedra^b, Jessica Fernanda Hoffmann^a, Francieli Moro Stefanello^b, Eleessandra Da Rosa Zavareze^a

^aPrograma de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil

^bPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção - Laboratório de Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Brassica oleraceae

Bioactive compounds

Antitumor

Zein

ABSTRACT

Gliomas, intracranial malignant tumors, are aggressive, asymptomatic and difficult to treat due to their degree of infiltration, alternatives are needed to treat the disease. In this sense, natural compounds from the specialized metabolism of plants can act to control the disease. Glucosinolates and phenolic compounds, present in broccoli, have a potential to promote tumor cell death, however due to the low stability of these compounds, encapsulation becomes an alternative for their preservation. The objective was to encapsulate the broccoli extract by electrospraying and to evaluate its cytotoxicity in the primary cell culture of astrocytes and gliomas. The capsules were produced and characterized by encapsulation efficiency, functional groups, thermal stability and morphology, the capsule that presented the best parameters was used for the evaluation of cell cytotoxicity and antitumor activity. Capsules with equal or less than 50 % extract showed high encapsulation efficiency, high thermal stability and uniform morphology due to non-saturation of the active zein sites, which allowed a complete encapsulation of the added extract, as well as a greater protection of the compounds. The capsule with 50 % of the extract showed good results of the efficiency, morphology and thermal stability and was used to evaluate the antitumor activity, since the addition of extract in proportions greater than 60 % promoted saturation of the active sites and lower encapsulation efficiency, and directly affects the morphology and thermal stability. The encapsulated and unencapsulated extracts showed strong selective antitumor effect against glial tumor cells without toxicity to non-tumor cells.

8.3 Apêndice 3 – Artigo publicado na revista Food Chemistry

Food Chemistry 339 (2021) 128075



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Encapsulation of broccoli extract by electrospraying: Influence of *in vitro* simulated digestion on phenolic and glucosinolate contents, and on antioxidant and antihyperglycemic activities



Marjana Radünz^{a,*}, Taiane Mota Camargo^a, Helen Cristina dos Santos Hackbart^a, João Pedro Blank^a, Jessica Fernanda Hoffmann^b, Francieli Moro Stefanello^c, Eleessandra da Rosa Zavareze^a

^a Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Caixa Postal 354, CEP 96010-900 Pelotas, RS, Brazil

^b Instituto Tecnológico em Alimentos para a Saúde – it Nutrifor, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, CEP 93022-750 São Leopoldo, RS, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção – Laboratório de 12 Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, CEP 96010-900 Pelotas, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Digestibility
Brassica oleracea
Hydroxyl
Nitric oxide
 α -Amylase
 α -Glucosidase

ABSTRACT

Compounds present in broccoli are vulnerable to the digestive process, and encapsulation becomes an alternative for their preservation. The encapsulation of broccoli extract, by electrospraying, was performed with the purpose of evaluating the effect of *in vitro* simulated digestion on individual compounds and antioxidant and antihyperglycemic potentials. Each digestion fraction was evaluated by chromatography, as well as for antioxidant activity and antihyperglycemic potential. The encapsulated extract showed high encapsulation efficiency and spherical morphology. Losses in the levels of phenolic compounds and glucosinolates were found in both extracts, considering the fractions submitted to digestion. The digestion promoted an increase in the inhibition of hydroxyl, nitric oxide and α -amylase, as well as a decrease in the inhibition of α -glucosidase in both extracts, when compared to undigested fractions. Thus, the digestion affects the compounds content in both encapsulated and unencapsulated extracts. However, they still promote the control of oxidative processes and hyperglycemia.