

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BACHARELADO

Brassica oleracea var. capitata:
**INFLUÊNCIA DE NITROGÊNIO E BORO NA
ATIVIDADE ANTIRRADICALAR (DPPH, OH[•], O₂^{•-})**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Marcella Emília Petra Schmidt

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Brassica oleracea var. capitata:
**INFLUÊNCIA DE NITROGÊNIO E BORO NA ATIVIDADE
ANTIRRADICALAR (DPPH, OH[•], O₂^{•-})**

Marcella Emília Petra Schmidt

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação
Química Bacharelado, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,
RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Bacharel em Química

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Barcellos da Rosa

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Universidade Federal de Santa Maria

**Centro de Ciências Naturais e Exatas
Curso de Graduação em Química Bacharelado**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova o trabalho de conclusão de curso

Brassica oleracea var. capitata:

**INFLUÊNCIA DE NITROGÊNIO E BORO NA ATIVIDADE
ANTIRRADICALAR (DPPH, OH[•], O₂^{•-})**

elaborado por

Marcella Emília Petra Schmidt

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Bacharel em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Marcelo Barcellos da Rosa

(Presidente/Orientador)

Ms. Valéria Dal Prá (UFMS)

Santa Maria, 2 de julho de 2014

AGRADECIMENTOS

À prof^a Dr. Denise Bohrer pela orientação durante a iniciação científica, por ter aceitado minhas ideias mirabolantes, pelas conversas e ensinamentos que sempre foram muito além da química.

Ao prof^o Dr. Marcelo Barcellos da Rosa, por ter me orientado neste trabalho, apesar do pouco tempo sob a sua orientação já pude aprender muito com os seus ensinamentos e questionamentos.

Aos meus pais, Denise e Alex Schmidt, por terem me apoiado desde pequena nesta vontade de “ser uma cientista”, com os microscópios, tubos de ensaio e kits de química. Obrigada por terem me escutado nas horas de estresse e também nas horas eufóricas porque, eu sei como falo quando estou eufórica.

À minha irmã Júlia Elisa Jordana, por ter sido minha melhor amiga, por ter brigado comigo e depois ter escrito bilhetes de desculpas ou saído para ir ao cinema, por ter sempre acreditado que eu seria a melhor farmacêutica apesar de não ter seguido nessa profissão.

Aos meus colegas do LACHEM, por esses 4 anos de convivência, companheirismo, cafés, debates de quarta-feira, festas de final de ano e até pelos vôleis que eu nunca joguei. Em especial à Débora Monego, Larissa Sabo Muller e Roberta Loose por serem muito mais que meras colegas nesses anos, por terem me ajudado de alguma forma seja ela afetiva e/ou profissional, muito obrigada.

À Valéria dal Prá, não só pela participação como banca examinadora deste trabalho, mas também pela ajuda durante a execução deste trabalho, sempre me incentivando e me acalmando quando as coisas pareciam não dar certo.

Ao Henrique Faccin, por ser meu colega e amigo desde o início desta “faculdade montanha-russa” que nos junta, separa, junta de novo e nos proporciona momentos de tensão.

À família Paines & Bressan, por terem me acolhido nesses 5 anos como uma filha e terem feito desse último ano mais fácil, mais rápido e (bem ou mal) mais nostálgico.

Por último e não menos importante, ao Lucas Paines Bressan pela amizade, amor, cumplicidade e paciência nesses 5 anos de faculdade. Sem a tua presença, as tuas palavras e o teu conforto eu não estaria fazendo química. Obrigada por ter permitido que eu fosse “eu”.

Sem cada um de vocês eu não estaria hoje defendendo meu TCC em vias de iniciar o mestrado, com sonhos de me tornar doutora em Química.

“estamos todos na sarjeta, mas alguns estão olhando para as estrelas”

Oscar Wilde

RESUMO

Trabalho de conclusão de curso
Curso de Química Bacharelado
Universidade Federal de Santa Maria

Brassica oleracea var. capitata:

INFLUÊNCIA DE NITROGÊNIO E BORO NA ATIVIDADE ANTIRRADICALAR (DPPH, OH[•], O₂^{•-})

AUTORA: Marcella Emília Petra Schmidt
ORIENTADOR: Marcelo Barcellos da Rosa
Data e Local Da Defesa: Santa Maria, 2 de julho de 2014

No Brasil, a hortaliça da família Brassicaceae mais consumida é *Brassica oleracea var. capitata* (repolho branco) e no Espírito Santo é a terceira cultura de maior expressão. A adubação correta favorece a qualidade do produto final, proporcionando respostas positivas na produtividade. A ingestão de plantas medicinais com propriedades antioxidantes como, por exemplo, o repolho, contribuem para o combate do estresse oxidativo causado pela produção excessiva de espécies reativas ou pela ineficiência do metabolismo antioxidante no organismo. Sabe-se que entre os metabólitos secundários presentes nas Brassicas destacam-se os glicosinolatos, os ácidos fenólicos e flavonoides que conferem a esta família grande atividade antioxidante. O objetivo deste trabalho foi verificar a influência da adubação nitrogenada e boratada na atividade antirradicalar de metabólitos secundários frente aos radicais hidroxil, superóxido e DPPH em amostras de *Brassica oleracea var. capitata* cultivadas no Espírito Santo. Os tratamentos consistiram em concentrações de 0; 75; 150; 225 e 300 kg.ha⁻¹ e 0; 2; 4; 6 e 8 kg.ha⁻¹ de nitrogênio e boro respectivamente. Frente ao radical DPPH e hidroxil observou-se um aumento na atividade antirradicalar nas duas partes da planta estudadas, em ambos os tratamentos. Nos testes com o radical O₂^{•-}, não foram obtidos resultados positivos para a nutrição com boro e nitrogênio.

Palavras-chave: *Brassica oleracea var. capitata*, atividade antirradicalar, nitrogênio e boro

ABSTRACT

Course Conclusion Work
Bachelor's degree in Chemistry
Federal University of Santa Maria

Brassica oleracea var. capitata:
**THE INFLUENCE OF NITROGEN AND BORON IN THE ANTI-
RADICAL ACTIVITY (DPPH, OH[•], O₂^{•-})**

AUTHOR: Marcella Emília Petra Schmidt
ADVISER: Marcelo Barcellos da Rosa
Date e Place of Defense: July 2, Santa Maria, 2014

In Brazil, the most consumed greenery of the family Brassicaceae is *Brassica oleracea var. capitata* (white cabbage) and in Espírito Santo it is the third major cultivation. The correct fertilization enhances the quality of the final product, resulting in positive responses for the productivity. Ingesting medicinal plants with antioxidant properties such as cabbage contributes for the fight against the oxidative stress caused by the excessive production of reactive species or for the inefficiency of the antioxidant metabolism in the organism. It is known that amongst the secondary metabolites present in the brassicas stand out the glucosinolates, the phenolic acids and the flavonoids which proportionate this family great antioxidant activity. The purpose of this work is to verify the influence of the nitrogenated and borated fertilization in the anti-radical activity of the secondary metabolites against the hydroxyl, superoxide and DPPH radicals in *Brassica oleracea var. capitata* samples harvested at Espírito Santo. The treatments consisted in 0, 75, 150, 225 and 300 kg.ha⁻¹ and 0, 2, 4, 6 and 8 kg.ha⁻¹ of nitrogen and boron respectively. For DPPH and hydroxyl were observed an increase in antiradical activity in both of studied parts of the plant and treatments. In tests with O₂^{•-} radical, no positive results for nutrition with boron and nitrogen were obtained.

Keywords: *Brassica oleracea var. capitata*, antiradical activity, nitrogen and boron

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Repolho (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>)	18
Figura 2 – Fontes e respostas celulares às ERs	22
Figura 3 – Formação de radical superóxido meio HPX/XOD	27
Figura 4 – Formação do formazan a partir da redução do NBT	27
Figura 5 – Formação do cromógeno fluorescente entre o malondialdeído (MDA) e o ácido tiobarbitúrico	28
Figura 6 – Formas radicalar (1) e não – radicalar (2) do DPPH	29
Figura 7 – Atividade antirradicalar na folha tratamento com boro	35
Figura 8 - Atividade antirradicalar na cabeça tratamento com boro	36
Figura 9 - Atividade antirradicalar na folha tratamento com nitrogênio	38
Figura 10 - Atividade antirradicalar na cabeça tratamento com nitrogênio	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade biológica de diferentes espécies de <i>Brassica</i>	18
Tabela 2 – Tipos de espécies reativas presentes no sistema biológico	23
Tabela 3 – Tratamento das amostras de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	31
Tabela 4 – Taxa de variação da atividade antirradicalar	40
Tabela 1 anexo – Equações das regressões lineares para cada nutriente/parte da planta/radical	52

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Reação de peróxido de hidrogênio com metais de transição	24
Equação 2 – Homólise da água por exposição à radiação ionizante	24
Equação 3 – Reação de redução do O ₂	25
Equação 4 – Dismutação do radical superóxido	25
Equação 5 - Formação do radical hidroperóxido	25
Equação 6 – Redução do Fe (III) a Fe (II) e produção de radicais hidroxil	25
Equação 7 - Reação de Haber-Weiss	25
Equação 8 – Formação do peróxido de hidrogênio	26
Equação 9 – Formação do radical hidroxila	26
Equação 10 – Cálculo da atividade antioxidante frente radical DPPH	32
Equação 11 – Cálculo da atividade antioxidante frente radical superóxido	32
Equação 12 – Cálculo da atividade antioxidante frente ao radical hidroxil	33
Equação 13 – Taxa de variação da influência de um nutriente	40

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: atividade antirradicalar

ANCOMROS: Atividade antioxidante medida pela determinação de espécies reativas de oxigênio, do inglês, Antioxidant Competence mensured by ROS determination.

AO: antioxidante

CAT: catalase

CoQ: coenzima Q

DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

ER's: espécies reativa

ERC: espécie reativa de carbono

ERCl: espécie reativa de cloro

ERN: espécie reativa de nitrogênio

EROs: espécies reativas de oxigênio, do inglês, ROS - Reactive oxygen species.

ERS: espécie reativa de enxofre

GP_x: glutationa peroxidase

GR: glutationa redutase

GSH: glutationa

H₂O: água

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HPX: hipoxantina

M⁽ⁿ⁺⁾: metal

NO₂[•]: dióxido de nitrogênio

NO^\bullet : óxido nítrico

$\text{O}_2^{\bullet-}$: radical superóxido

$^1\text{O}_2$: oxigênio em estado simpleto

O_3 : ozônio

OH^\bullet : radical hidroxil ou hidroxila

ONOO^\bullet : peroxinitrito

RS^\bullet : espécie reativa de enxofre

SOD: superóxido desmutase

URH_3 : ácido úrico

XOD: xantina oxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Brassica	17
2.1.1 <i>Brassica oleracea var. capitata</i>	17
2.2 Atividade biológica da Brassica	18
2.3 Nutrição e plantio	19
2.4 Radicais livres e defesas antioxidantes	20
2.5 Espécies reativas	22
2.5.1 Radical hidroxila (OH^\bullet)	24
2.5.2 Radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)	24
2.5.3 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	25
2.5.4 Radical hidroperoxila (HO_2^\bullet)	25
2.6 Métodos de avaliação da atividade antioxidante	26
2.6.1 Radical superóxido (O_2^\bullet)	27
2.6.2 Radical Hidroxil	28
2.6.3 Método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)	28
2.7 Métodos de Extração	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Instrumentação	30
3.2 Preparo de amostras	30
3.2.1 Preparo dos extratos	31
3.3 Procedimentos analíticos e preparo de soluções	31
3.3.1 Capacidade antioxidante frente ao radical DPPH	31
3.3.2 Capacidade antioxidante frente ao ânion radical superóxido, O_2^\bullet	32
3.3.3 Capacidade antioxidante frente ao radical hidroxil	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
4.1 Avaliações da influência de boro na folha frente aos radicais DPPH, OH^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$	34
4.2 Avaliações da influência de boro na cabeça frente aos radicais DPPH, OH^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$	36

4.3 Avaliações da influência de nitrogênio na folha frente aos radicais DPPH, OH[•] e O₂^{•-}	37
4.4 Avaliações da influência de nitrogênio na cabeça frente aos radicais DPPH, OH[•] e O₂^{•-}	38
5 CONCLUSÃO	42
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
7 ANEXOS	51

INTRODUÇÃO

A crescente procura e uso de fitoterápicos como alternativa no tratamento de patologias ou na prevenção dessas, tem despertado um grande interesse em setores da indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética. Desta forma, a demanda de plantas medicinais aumentou significativamente na última década forçando a busca de alternativas para otimizar e melhorar a produção desses cultivares (DAL PRÁ 2013, CASTELUBER 2014).

A técnica de adubação é reconhecida como benéfica ao crescimento das plantas a mais de 2000 anos, entretanto, apenas no início do século XIX foram realizados os primeiros estudos a cerca da nutrição mineral de plantas por JUST von LIEBIG. Von LIEBIG concluiu que nitrogênio (N), enxofre (S), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), silício (Si) , sódio (Na) e ferro (Fe) eram elementos essenciais, embora hoje saiba-se que o Si e Na não são considerados essenciais (MENGEL & KIRKBY, 1978).

Segundo AVALHÃES e colaboradores (2009) a omissão de macronutrientes influenciou negativamente a produtividade da couve-flor, reduzindo consideravelmente a altura, o número de folhas, área foliar, assim como massa seca da parte aérea, raízes e planta inteira. Resultados semelhantes foram encontrados para a deficiência de nitrogênio e fósforo para couve da Malásia, onde as plantas produzidas apresentaram menor desenvolvimento e produção. Já a deficiência de boro, levou à morte das plantas entre 30 e 37 dias após a semeadura, mostrando a importância deste nutriente no cultivo das brássicas (MOTA *et al.*, 2009).

Dentre as inúmeras espécies com grande interesse farmacológico da família *Brassicaceae*, destaca-se a *Brassica oleracea* var. *capitata*, popularmente conhecida como repolho branco. Sabe-se que antes de ser usado como alimento, o repolho era empregado no tratamento de úlceras, gota, diarreia, dores de cabeça e como cicatrizante (SINGH *et al.*, 2006, CARVALHO *et al.* 2008). A *Brassica oleracea* vem sendo amplamente estudada devido a sua atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicótica, anti-hiperglicemiante, anticarcinogênica, e antibacteriana (BROOKS,

PATON; VIDANES, 2001; KATAYA; HAMZA, 2007; LIN; LI; HWANG, 2008; FARAG; MOTAAL, 2010; BAJPAI, KANG; BAEK, 2012; JAISWAL, ABU-GHANNHAM; GUPTA, 2012).

A ingestão de plantas medicinais com propriedades antioxidantes como, por exemplo o repolho, contribuem para o combate do estresse oxidativo causado pela produção excessiva de espécies reativas ou pela ineficiência do metabolismo antioxidante no organismo. Sabe-se que entre os metabólitos secundários presentes nas brássicas destacam-se os glicosinolatos, os ácido fenólicos e flavonoides que conferem a esta família grande atividade antioxidante. Não podemos medir a atividade antioxidante *in vitro* de forma direta, mas sim pelos efeitos dos antioxidantes frente a espécies reativas (ANTOLOVICH *et al.*, 2002). Os diversos testes propostos na literatura variam quanto ao tipo de radicais gerados, ao indicador de oxidação escolhido e ao método usado para sua detecção e quantificação (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Com o objetivo de avaliar a influência na atividade antioxidante da *Brassica oleracea* var. *capitata* cultivada com diferentes concentrações de nitrogênio e boro, foram escolhidos três métodos de baseados em diferentes radicais livres (DPPH, superóxido e hidroxila) para mensurar a atividade antioxidante dos

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Brassica*

A família Brassicaceae apresenta cerca de 400 gêneros e 4.000 espécies. No Brasil ocorrem 7 gêneros e aproximadamente 50 espécies (SOUZA & LORENZI, 2005). Através do melhoramento genético são encontradas diversas variedades hortícolas, com destaque para a *B. oleracea* var. *acephala* (couve-mantiega), *B. oleracea* var. *capitata* (repolho), *B. oleracea* var. *gemmifera* (couve-de-bruxelas), *B. oleracea* var. *borytis* (couve-flor) e *B. oleracea* var. *italica* (brócolis) (SOUZA & LORENZI, 2005).

O estudo da família Brassicaceae tem crescido devido às propriedades farmacológicas de seus principais metabólitos, os glicosinolatos (GLS). Esses metabólitos, bem como seus produtos de hidrólise (isotiocianatos, nitrilas e tiocianatos) são considerados potentes antioxidantes, anticarcinogênicos, antibacterianos e previnem doenças cardiovasculares (MÁRTON, *et al.* 2013). Outros estudos atribuem a ação protetora dos vegetais crucíferos a compostos antioxidantes, como ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, flavonóides, isoflavonas, flavonas, antocianinas e catequinas (SINGH *et al.* 2006).

2.1.1 *Brassica oleracea* var. *capitata*

O repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) (Figura 2) é uma hortaliça herbácea folhosa da família das Brassicaceae, com folhas arredondadas e cerosas (FILGUEIRA *et al.*, 2008). Esta pode apresentar folhas lisas verdes ou arroxeadas, ou folhas crespas de cor verde. As cabeças devem ser compactas, firmes e sem rachaduras e as folhas não devem apresentar manchas escuras ou perfurações (PRADO *et al.*, 2008).

Segundo Balbach e Boarim (1993), os romanos já empregavam a *Brassica* sp., como abstergente (produto utilizado para limpar ferimentos) e na forma de cataplasmas no tratamento das feridas. Relatos informam ainda o uso da *Brassica* sp. a mais de um milênio em processos de cicatrização de abscessos, cefalalgias idiopáticas (dores de cabeça de causas desconhecidas), dores, tumores, prevenção de tuberculose, anemia, enfermidades do estômago, úlceras internas, hemorróidas, alcoolismo e gota (CARVALHO *et al.* 2008).



Figura 1 - Repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*)

Fonte: retirado do site http://fr.wikipedia.org/wiki/Chou_cabus acesso 04 de mai. 2014

2.2 Atividade biológica da *Brassica*

O gênero *Brassica* tem sido amplamente estudado, devido a ampla atividade biológica dos metabólitos secundários presentes em suas espécies. A tabela 2 apresenta alguns estudos científicos a respeito dessas atividades biológicas.

Tabela 1 – Atividade biológica de diferentes espécies de *Brassica*

Planta	Atividade biológica	Referência
<i>Brassica</i> sp	Quimioprevenção, supressão no	(LAMY et al. 2013)

	crescimento e indução de apoptose de células cancerígenas	
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Antimicótica	(BAJPAI, KANG & BAEK, 2012)
<i>Brassica oleracea</i> (brócolis, repolho branco e couve-de-bruxelas)	Antibacteriana e antioxidante	(JAISWAL, ABU-GHANNHAM & GUPTA, 2012)
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i> DC	Antiulcerogênica	(LEMOS <i>et al.</i> 2011)
<i>Brassica oleracea</i> L. (repolho roxo)	Toxicidade aguda e subcrônica negativa	(THOUNAOJAM <i>et al.</i> 2011)
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Anticarcinogênica	(FARAG & MOTAAL, 2010)
<i>Brassica oleracea</i> L. var. (repolho roxo)	Anti-inflamatória	(LIN, LI, & HWANG, 2008)
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Fotoproteção	(ROSA <i>et al.</i> 2008)
<i>Brassica oleracea</i> (repolho roxo)	Antioxidante e anti-hiperglicemiante	(KATAYA & HAMZA, 2007)

Fonte: retirado de DAL PRÁA, Valéria et al. A review of influence of environment and process parameters on glucosinolate-myrosinase system from Brassica. **Journal of Applied Pharmaceutical Science** Vol, v. 3, n. 08, p. 121-128, 2013.

2.3 Nutrição e plantio

No Brasil, o repolho é a brássica mais consumida e sua produção se concentra próxima às capitais e nas regiões serranas, sendo o cultivo realizado tanto por meio da agricultura familiar quanto pelos grandes produtores de hortaliças (ABCSEM, 2013). No Espírito Santo é a terceira cultura olerícola de maior expressão, sendo precedida pelo tomate e taro, ocupando uma área de 1.389 ha (IBGE, 2010).

Visando a ampliação da produção e melhora na qualidade desta hortaliça há a necessidade de controle dos fatores de produção como, por exemplo, o fornecimento de macro e micronutrientes necessários para o desenvolvimento nutricional da planta (TAIZ & ZEIGER, 2004). Os efeitos desses no crescimento e na produção são usualmente estudados em termos das suas funções no metabolismo das plantas. Além disso, a nutrição mineral pode influenciar o crescimento e a produção das plantas cultivadas de forma secundária, causando modificações na forma de crescimento, na morfologia, na anatomia e na sua composição química (AVALHÃES *et al.* 2009).

Moreira e colaboradores (2011) avaliaram o efeito da fertilização com nitrogênio sob a produção e a qualidade do repolho, evidenciando que pequenas doses de nitrogênio podem resultar na baixa produtividade e cabeças menores, devido à reduzida área foliar (CARDOSO & HIRAKI, 2001; TORRES *et al.*, 2003). Por outro lado, dose muito alta de nitrogênio favorece o crescimento excessivo das folhas, reduz os teores de açúcares e de vitamina C e a massa da matéria seca da cabeça (DIN *et al.*, 2007; KANO *et al.*, 2007).

Segundo Filgueira, 2008 a deficiência de boro nas brássicas (repolho, couve-flor e brócolis) resulta em coloração escura na parte central do caule, cabeças pequenas, pouco compactas e com partes escuras no caso da couve-flor, coloração bronzeada na inflorescência.

2.4 Radicais livres e defesas antioxidantes

No transcorrer dos últimos dois bilhões de anos os organismos vivos se adaptaram a uma crescente concentração de oxigênio atmosférico (BERGAMINI *et al.*, 2004; WINTER, 1994). Desta forma o processo de oxidação tornou-se parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo (BARREIROS *et al.*, 2006) uma vez que a transferência de elétrons é um dos processos químicos mais importantes para a sobrevivência celular (ALVES *et al.*, 2010).

O processo de oxidação, essencial para a sobrevivência dos organismos aeróbicos, forma espécies reativas (de oxigênio, nitrogênio, cloro, carbono, radicais de enxofre, intermediários neutros (H_2O_2), carregados ($ONOO^-$), etc.) que tem o papel de reagir com outras espécies e formar radicais livres (VASCONCELOS *et al.* 2006). Radicais livres são átomos ou moléculas produzidos continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas. Esses possuem diferentes papéis no organismo e encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. (ALVES *et al.*, 2010).

Organismos aeróbicos, por meio de um eficiente sistema antioxidante, conseguem controlar e restabelecer o equilíbrio biológico quando a produção de espécies antioxidantes é exacerbada (VASCONCELOS *et al.*, 2007), porém quando este equilíbrio não consegue ser reestabelecido, devido a grande produção de ER's ou a uma falha no sistema antioxidante, instala-se a condição denominada estresse oxidativo (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Estudos a cerca do envelhecimento, de doenças degenerativas, cardiovasculares, asma, acidente vascular cerebral, diabetes, hipertensão, infarto do miocárdio, pneumonia (VASCONCELOS *et al.*, 2006) entre outras relacionam todas essas patologias a uma única causa, o estresse oxidativo. Na figura 2 pode-se visualizar de uma forma mais sistemática as fontes e respostas do organismo aos radicais livre e espécies reativas.

Uma forma de auxiliar no combate de radicais livres em excesso no organismo é a ingestão de compostos ricos em polifenóis, flavonoides, flavonas, ácido fenólicos (BARREIROS *et al.* 2006) que são antioxidantes naturais.

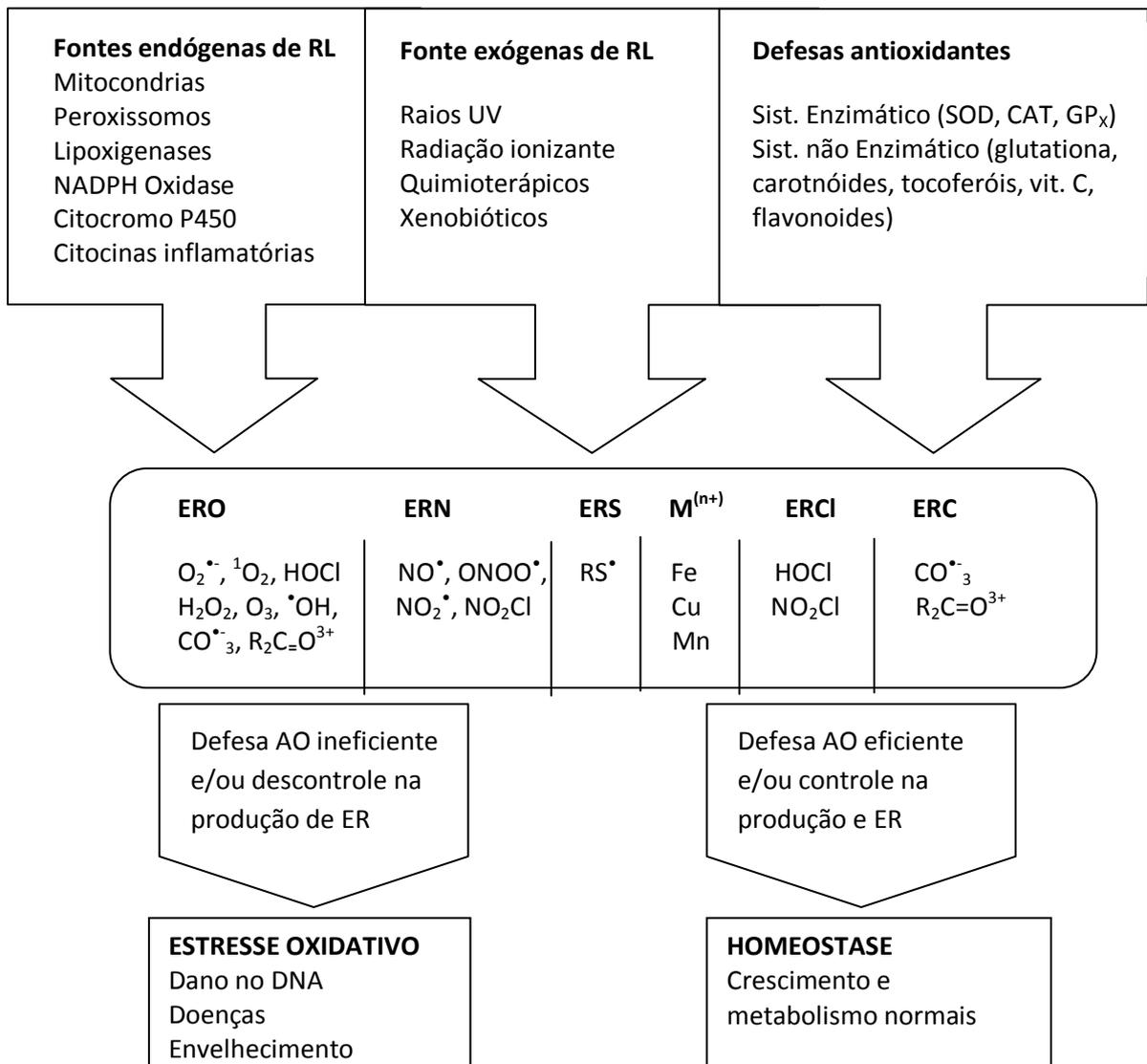


Figura 2 - Fontes e respostas celulares às ERs

Fonte: adaptado de VASCONCELOS *et al.*, 2006

2.5 Espécies reativas

Radicais livres podem ser definidos como moléculas ou fragmentos moleculares contendo um ou mais elétrons desemparelhados em um orbital atômico ou molecular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Porém o conceito de radical livre

exclui espécies que não possuam elétrons desemparelhados, sendo assim usamos o termo “espécie reativa” para toda e qualquer molécula que possua a capacidade de oxidar ou ser convertida em radical. Existem diversos tipos de espécies reativas presentes no sistema biológico, a seguir podemos ver alguns exemplos (tabela 2).

Tabela 2 – Tipos de espécies reativas presentes no sistema biológico

Espécies reativas radicalares	Espécies reativas não radicalares
Espécies reativas de oxigênio (ERO)	
Superóxido, $O_2^{\cdot-}$ Hidroxil, HO^{\cdot} Peroxil, RO_2^{\cdot} Alcoxil, RO^{\cdot} Hidroperoxil, HO_2^{\cdot}	Peróxido de hidrogênio, H_2O_2 Peróxidos orgânicos, $ROOH$ Peroxinitrato, $O_2NOO^{\cdot-}$ Ozônio, O_3
Espécies reativas de nitrogênio (ERN)	
Óxido nítrico, NO^{\cdot} Dióxido de nitrogênio, NO_2^{\cdot} Nitrato, NO_3^{\cdot}	Ácido nitroso, HNO_2 Cátion nitroxil, NO^+ Ânion nitroxil, $NO^{\cdot-}$ Peroxinitrito, $ONOO^{\cdot-}$
Espécies reativas de bromo (ERBr)	
Bromo atômico, Br^{\cdot}	Gás bromo, Br_2
Espécies reativas de cloro (ERCl)	
Cloro atômico, Cl^{\cdot}	Gás cloro, Cl_2 Dióxido de cloro, ClO_2
Espécies reativas de enxofre (ERS)	
Radical tiíla, RS^{\cdot}	

A molécula de O_2 , possui dois elétrons desemparelhados na sua última camada eletrônica, o que possibilita a ocorrência de uma redução, gerando diferentes metabólitos, que são conhecidos como “Espécies reativas de oxigênio (EROs)” (VASCONCELOS *et al.*2006).



Ao contrário da maioria dos radicais livres o radical superóxido é pouco reativo. Em meio aquoso, sua reação principal é a dismutação, na qual se produz uma molécula de peróxido de hidrogênio e uma molécula de oxigênio (equação 4 e 5) (BARREIROS *et al.* 2006).



O radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$) participa de certos processos químicos importantes no contexto biológico. O principal deles é auxiliar na produção de radicais hidroxila (HO^{\cdot}), através da redução de Fe (III) a Fe (II) (Equação 6), seguida da reação do radical superóxido com peróxido de hidrogênio, catalisada pelo Fe(II), reação de Haber-Weiss (Equação 7) (BABIOR *et al.* 1997; BARREIROS *et al.* 2006; VASCONCELLOS *et al.* 2007).



2.5.3 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), apesar de não ser considerado um radical livre é um metabólito de oxigênio extremamente nocivo ao organismo, que contribui para o estresse oxidativo. A formação *in vivo* deste metabólito ocorre pela dismutação espontânea do ânion-radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$) por enzimas oxidases ou pela β -oxidação de ácidos graxos (equações 8 e 9). O H_2O_2 é mais estável do que o radical OH^{\cdot} e tem a capacidade de atravessar camadas lipídicas induzindo danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (ANDERSON, 1996; FERREIRA & MATSUBARA, 1997); BARREIROS *et al.* 2006; VASCONCELLOS *et al.* 2007).



2.5.4 Radical hidroperoxila (HO_2^\cdot)

O radical hidroperoxila (HO_2^\cdot) é a forma protonada do radical superóxido (O_2^-) (HALLIWELL, 2007). Evidências indicam que este radical é mais reativo que o radical O_2^- por sua maior facilidade em iniciar a peroxidação lipídica *in vivo* (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VALKO *et al.*2007).

2.6 Métodos de avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante não pode ser medida diretamente, mas sim pelos efeitos dos antioxidantes em controlar a amplitude da oxidação (ANTOLOVICH *et al.*, 2002). Diversas metodologias para mensurar a atividade antioxidante são propostas na literatura. Essas variam quanto ao tipo de radicais gerados, ao indicador de oxidação escolhido e ao método usado para sua detecção e quantificação (VASCONCELOS *et al.*,2007).

Nos ensaios baseados na captação (“trap assays”), um radical é gerado e reage com moléculas-alvo, para produzir cor, fluorescência, quimioluminescência, perda ou ganho de sinais de ESR (Ressonância do Spin Eletrônico) ou outra mudança mensurável. A presença de antioxidantes altera esses sinais, o que permite sua análise quantitativa (VASCONCELOS *et al.*,2007).

Pode-se também avaliar a atividade antioxidante de uma determinada enzima (SOD, CAT, GP_x,GR) ou de uma determinada substância (GSH,CoQ, URH₃, α -tocoferol, β -caroteno), porém para isso é necessário saber quais tipos de radicais são gerados, como e onde eles ocorrem (ALVES *et al.*, 2010).

Segue abaixo a descrição dos métodos utilizados neste trabalho para mensurar a atividade antioxidante na *Brassica oleracea var. capitata*.

2.6.1 Radical Superóxido

A produção do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é essencial para a defesa dos organismos vivos, pois esse radical atua na transferência de sinais entre células vivas. Porém, a superprodução deste pode causar estresse oxidativo e estar envolvida em diversas patologias (ALVES *et al.*, 2010).

A xantina Oxidase (XOD) é a enzima responsável pela transformação tanto da hipoxantina em xantina, quanto desta em ácido úrico, tendo como consequência a produção de peróxido de hidrogênio e radical superóxido (figura 3).

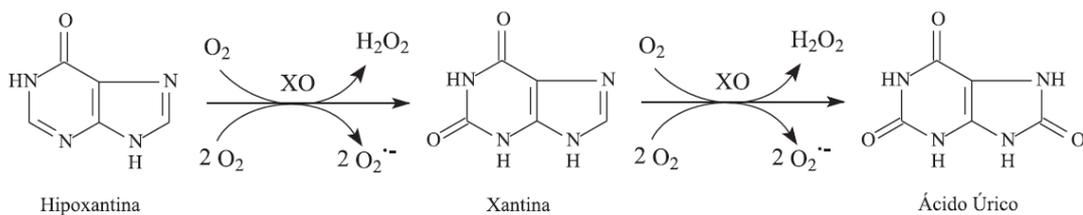


Figura 3 - Formação de radical superóxido meio HPX/XOD

Existem diversos métodos para mensurar a capacidade de um antioxidante sequestrar um radical superóxido, um exemplo é o método de Zhao *et al.*, 2006 que monitora a redução do NBT (nitroblue tetrazolium) a formazan em pH 7,4 e temperatura ambiente (figura 4) (ALVES *et al.*, 2010).

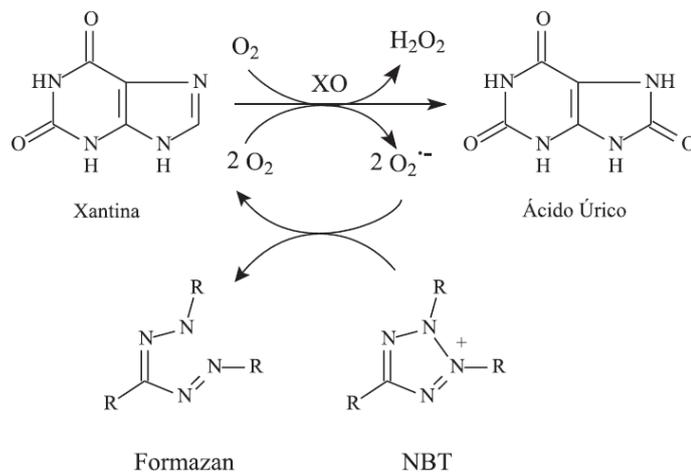


Figura 4 - Formação do formazan a partir da redução do NBT

Em seguida a geração do formazan é acompanhada por espectrofotometria através da mudança na coloração amarelo pálido do NBT para uma coloração púrpura do formazan no comprimento de onda de 560 nm (ALVES *et al.*, 2010). Alimentos, substâncias que atuam como antioxidantes reagem com o radical superóxido inibindo a formação de formazan o que resulta em decaimento na cor púrpura.

2.6.2 Radical Hidroxil

Sabe-se que a exposição do DNA a radicais hidroxila pode gerar uma série de subprodutos devido a alta reatividade deste (ANGELO *et al.*, 2007). Este é considerado muito danoso ao organismo, porque sua meia-vida é muito curta e dificilmente pode ser sequestrado *in vivo* (ALVES *et al.* 2010).

Um dos métodos específicos para determinar o sequestro do radical hidroxil é o ensaio empregando-se a 2-deoxirribose. Neste ensaio, $\cdot\text{OH}$ é gerado pela reação do cloreto férrico (FeCl_3) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) na presença de ascorbato, que reage para formar Ferro(II)-EDTA juntamente com ascorbato oxidado. O H_2O_2 reage com Ferro(II)-EDTA para formar Ferro(III)-EDTA e $\cdot\text{OH}$ através da reação de Fenton. O radical formado pode então reagir com 2-deoxirribose para formar o malondialdeído que sob aquecimento com ácido tiobarbitúrico (ATB) em pH baixo, apresentam coloração rosada, sendo monitorado por espectrofotometria na região do visível (532 nm) (ALVES *et al.* 2010).

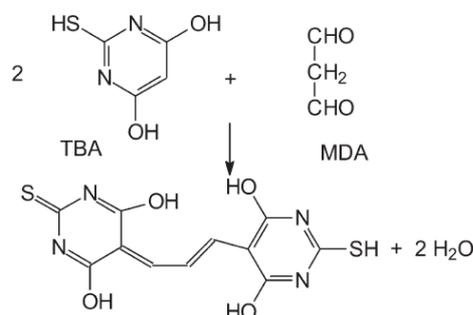


Figura 5 – Formação do cromógeno fluorescente entre o malondialdeído (MDA) e o ácido tiobarbitúrico

2.6.3 Método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere a esta molécula uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520 nm (MOLYNEUX, 2004). Este ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH (Figura 6) e reduzindo-o a hidrazina. Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido (ALVES *et al.* 2010).

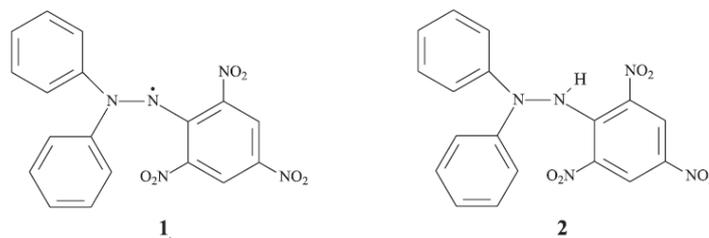


Figura 6 – Formas radicalar (1) e não – radicalar (2) do DPPH

2.7 Métodos de Extração

A avaliação da capacidade antioxidante de plantas e alimentos pode ocorrer a partir de extratos. Estes têm por objetivo separar substâncias potencialmente ativas ou inativas por meio de processos químicos, físicos ou mecânicos.

Dal Prá e colaboradores (2014) otimizaram um método de extração por ultrassom para amostras de *Brassica oleracea* var. *capitata*. Para a obtenção dos extratos a serem utilizados para a atividade antioxidante verificou-se que a melhor proporção para extração dos compostos foi de 60:40 etanol/água.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

Todas as medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro Lambda 16 da Perkin Elmer utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

- Balança analítica Shimadzu AU Y220
- Banho ultrassônico Unique USC 2800A
- Purificador de água, Milli-Q Synergy UV, resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$
- Banho-maria Novatecnica modelo NT268
- pHmetro 827 pHlab da Methrom

3.2 Preparo das amostras

As amostras de *Brassica oleracea* var. *capitata* utilizadas neste trabalho foram obtidas como massa seca em parceria com a UFES recebendo os tratamentos citados na tabela 3. As mudas de repolho foram divididas em dois grandes grupos, tratamento com boro nas concentrações de 0, 2, 4, 6 e $8 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ e tratamento com nitrogênio nas concentrações de 0, 75, 150, 225 e $300 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$.

As mudas foram produzidas sob ambiente protegido e após 30 dias com o desenvolvimento de 4 a 5 folhas definitivas, as mudas foram transplantadas para o campo e dispostas em canteiros de $2,1 \times 2,1 \text{ m}$ com distância de 0,5 m entre eles. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso com 4 repetições, sendo cada parcela representada por um canteiro. Na colheita, que ocorreu aos 83 após o transplante das mudas, foram retiradas 04 plantas centrais de cada parcela.

Tabela 3 - Tratamento das amostras de *Brassica oleracea* var. *capitata*

Tratamento	Parte da planta
Boro	Folha
0, 2, 4, 6 e 8 kg.ha ⁻¹	Cabeça
Nitrogênio	Folha
0, 75, 150, 225 e 300 kg.ha ⁻¹	Cabeça

3.2.1 Preparo dos extratos

Para a obtenção dos extratos metanólicos pesou-se um grama de matéria seca e extraiu-se por duas horas com 10 mL de metanol em banho ultrassônico equipado com transdutor de vibrações longitudinais e área superficial de 282,2 cm².

Após a extração as amostras foram filtradas em filtros Chromafil[®] com poro de 0,20 µm e 25 mm de diâmetro, acondicionadas sob refrigeração e ao abrigo da luz.

3.3 Procedimentos analíticos e preparo de soluções

3.3.1 Capacidade Antioxidante frente ao radical DPPH

O radical DPPH foi obtido comercialmente (Aldrich Chemistry[®]). Preparou-se uma solução de trabalho de DPPH 10⁻⁴ mol.L⁻¹ em metanol.

Para análise dos extratos de *Brassica* frente ao radical DPPH procedeu-se da seguinte maneira: 1500 µL do extrato a 1480 µL da solução de DPPH e 20 µL do solvente utilizado para a extração (metanol, neste caso) Um branco foi realizado para cada amostra (1500 µL do extrato e 1500 µL do solvente), bem como um branco para o DPPH (1480 µL de DPPH e 1520 µL de metanol). Após decorridos 30 minutos de reação sob abrigo da luz as absorvâncias foram medidas em 522 nm e a porcentagem da atividade antioxidante frente ao radical DPPH foi calculada conforme equação 10 (DAL PRÁ *et al.*,2013).

Equação 10: Atividade antioxidante frente radical DPPH

Onde:

A_{DPPH} = Absorvância do DPPH

$A_{amostra}$ = Absorvância da amostra

A_{branco} = Absorvância do branco da amostra

3.3.2 Capacidade Antioxidante frente ao ânion radical superóxido, $O_2^{\cdot-}$

A atividade antirradicalar dos extratos foi realizada utilizando o sistema enzimático HPX/XOD. Os reagentes utilizados no método enzimático HPX/XOD foram preparados nas seguintes concentrações xantina oxidase (XOD) $0,75 \text{ U.mL}^{-1}$, hipoxantina (HPX) 3 mM, cloreto de azul de nitrotetrazólio (NBT) $1,42 \text{ mmol.L}^{-1}$, EDTA 30 mmol.L^{-1} e tampão fosfato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 7,4).

Para a montagem sistema enzimático utilizou-se 100 μL de EDTA, 100 μL de HPX, 200 μL de NBT, 50 μL do extrato e 50 μL de água. Após 3 minutos e adicionou-se 100 μL da enzima XOD e o volume foi completado a 3 mL com tampão fosfato. O branco das amostras foi preparado com todos os reagentes exceto o NBT. Conduziu-se um controle contendo todos os reagentes exceto o extrato, e um branco do controle sem extrato e NBT. Após o tempo reacional de 40 minutos a leitura espectrofotométrica foi feita em 560 nm. A atividade antioxidante frente ao radical superóxido foi calculada conforme equação 11 (DAL PRÁ *et al.*, 2013).

Equação 11: Atividade antioxidante frente radical superóxido

Onde:

S = absorvância da amostra

S_b = absorvância do branco da amostra

C = absorvância do controle

C_b = absorvância do branco do controle

3.3.3 Capacidade antioxidante frente ao radical hidroxil

O ensaio para medir a atividade antioxidante frente ao radical hidroxil pelo método da deoxirribose foi conduzido conforme Zhao *et al.* (2006) com algumas modificações.

Todas as soluções de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1%, ácido tricloroacético (TCA) 10%, cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 1 mM, EDTA 1 mM, ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) 1 mM e 2 deoxi-D-ribose ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_4$) 36 mM foram preparadas em tampão fosfato $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,4.

No tubo reacional foram adicionados 50 μL do extrato, 50 μL de água, 100 μL de EDTA, 100 μL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 100 μL de 2 deoxi-D-ribose, 100 μL de H_2O_2 e 100 μL de ácido ascórbico, sendo o volume final ajustado para 1 mL com tampão fosfato. Após incubação durante 1 hora à 37 °C, parou-se a reação através da adição de 1 mL de TCA 10% e 1 mL de TBA 1%. A mistura foi então aquecida em banho de água durante 15 minutos. Após o resfriamento das amostras o volume foi aferido para 5 mL e a absorvância medida em 532 nm. Através da equação 4 foi possível calcular a atividade antioxidante das infusões frente ao radical hidroxil (DAL PRÁ *et al.*, 2013).

Equação 12: Atividade antioxidante frente radical hidroxil

Onde

S= absorvância da amostra

S_B = absorvância do branco

C= absorvância do controle

C_B = absorvância do branco controle

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A atividade antirradicalar foi realizada separadamente para cada radical (DPPH, OH^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$) e os resultados obtidos foram avaliados de forma separada para cada conjunto nutriente/parte da planta, sendo eles, boro cabeça, boro folha, nitrogênio cabeça, nitrogênio folha. Todos os resultados apresentados a seguir são baseados na média dos valores encontrados para cada radical em cada um dos quatro conjuntos.

4.1 Avaliações da influência de boro na folha frente aos radicais DPPH, OH^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$

Na figura a seguir podemos observar a influência de boro na folha frente aos radicais DPPH, OH^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$. Primeiramente avaliando a influência do aumento das concentrações de boro, em $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$, frente ao radical DPPH observa-se um pequeno aumento da atividade antirradicalar. Fazendo a regressão linear dos valores de AA% para as diferentes concentrações de boro, obtemos a reta $y = 0,0183x + 1,9669$, avaliando o coeficiente angular desta reta (o “a” da reta $y = ax + b$) comprovamos o pequeno aumento antes visualizado no gráfico, visto que o valor de “a” é pequeno, 0,0183. Apesar de um pequeno crescimento da atividade antirradical DPPH, temos valores significativamente altos para a %AA, isto pode ser explicado pela natureza sintética do radical DPPH

Ao avaliarmos a % AA frente ao radical hidroxil, também observamos uma pequena influência positiva para concentrações crescentes de boro. Se analisarmos o coeficiente angular da reta de regressão linear para o radical hidroxil temos; $y = 0,0189x + 1,7239$ o valor de “a” é 0,0189 bem próximo do valor de “a” encontrado na regressão linear frente ao radical DPPH. Os valores encontrados para a média da atividade antirradicalar porcentual frente ao radical hidroxil (em média 70%) são menores que os encontrados frente ao radical DPPH (em média 90%).

Quando analisamos os dados obtidos frente ao radical superóxido vemos uma influência negativa do aumento da concentração de boro na folha. Isto pode ser evidenciado pelo coeficiente angular negativo da reta de regressão linear, $y = -0,0188x + 1,3341$, cujo “a” é igual a $-0,0188$. A seguir pode-se observar uma figura com as três curvas de regressão linear, para a atividade antirradicalar frente ao DPPH, OH^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$.

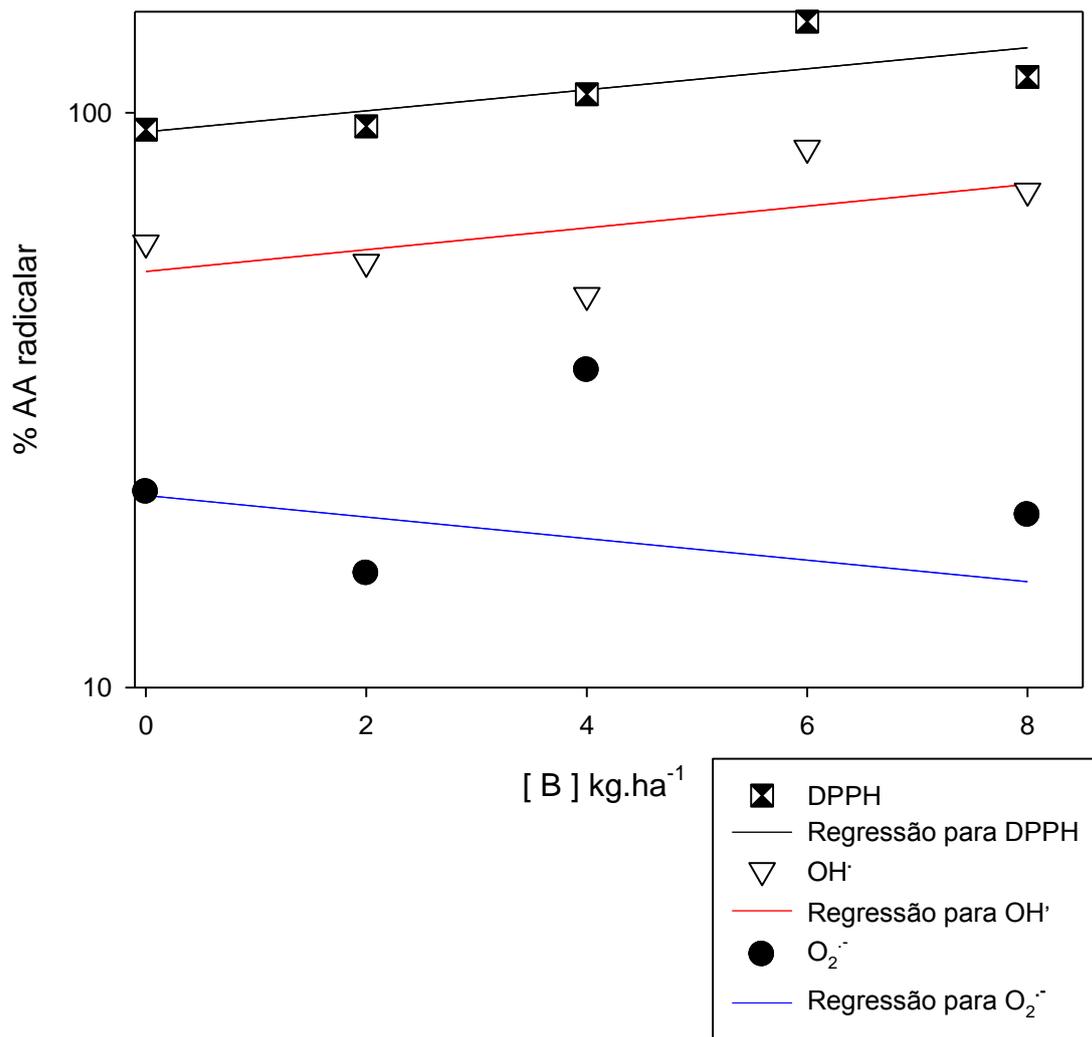


Figura 7 – Atividade antirradicalar na folha (tratamento com boro) frente aos radicais DPPH, OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$

4.2 Avaliações da influência de boro na cabeça frente aos radicais DPPH, OH[•] e O₂^{•-}

Em relação a influência na cabeça do repolho tratado com diferentes concentrações de boro, a atividade antirradicalar aumentou para todos os três radicais testados neste trabalho. Se avaliarmos cada coeficiente angular separadamente temos; 0,0423 para DPPH, 0,1519 para OH[•] e 1,9013 para O₂^{•-}. Porém como podemos observar na figura abaixo os extratos metanólicos testados frente ao radical superóxido (O₂^{•-}) apresentaram um efeito pró-oxidante apesar deste efeito diminuir com o aumento da concentração de boro.

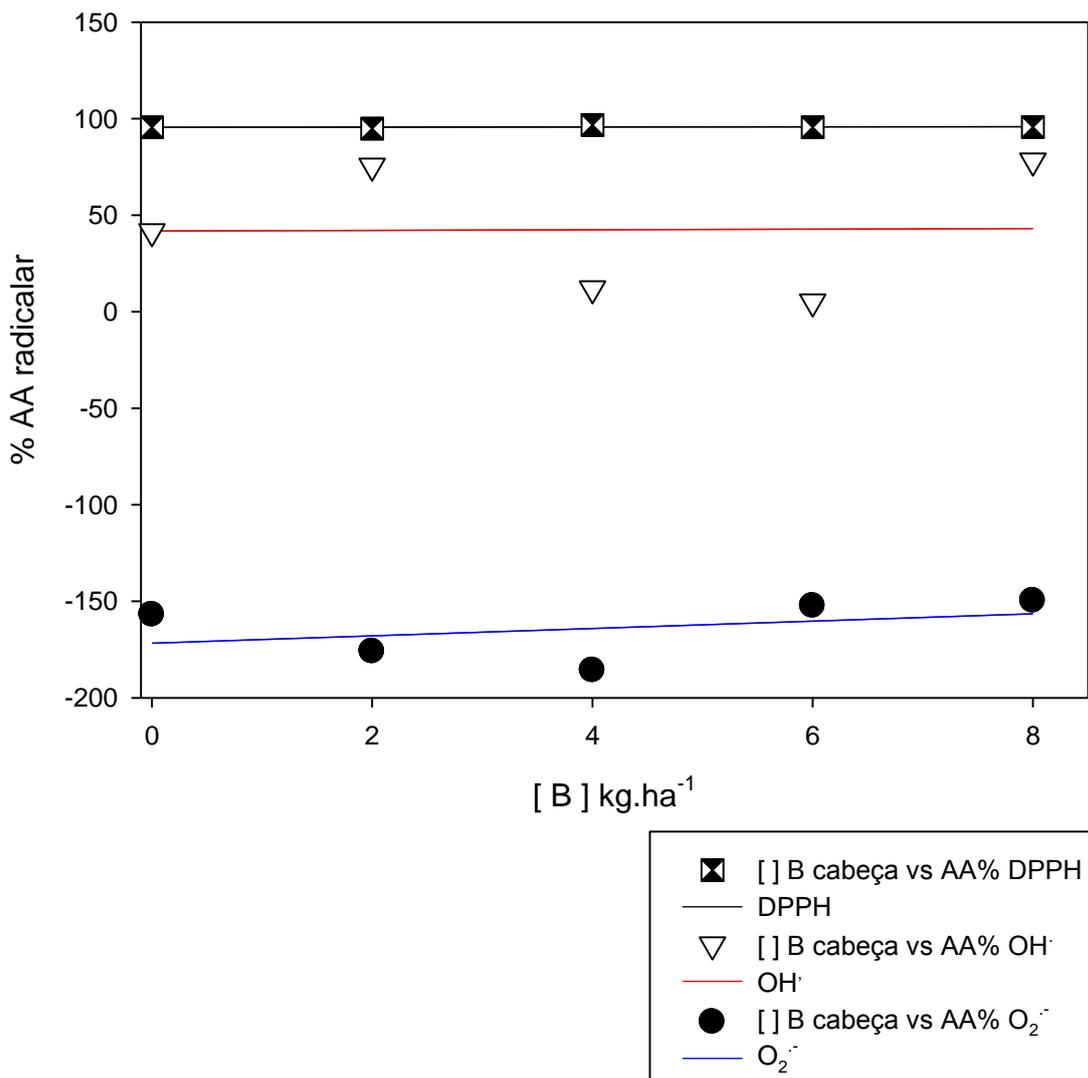


Figura 8 – Atividade antirradicalar na cabeça (tratamento com boro) frente aos radicais DPPH, OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$

4.3 Avaliações da influência de nitrogênio na folha frente aos radicais DPPH, OH^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$

A influência de concentrações crescentes de nitrogênio na atividade antirradicalar frente aos radicais estudados se mostrou positiva para os radicais DPPH e hidroxil e negativa para o radical superóxido, seguindo o mesmo perfil observado para a influência de boro na folha. Este efeito antioxidante pode ser evidenciado pelos coeficientes angulares das retas de regressão linear, 0,7009; 0,0139 e -0,0467 para os radicais DPPH, hidroxila e superóxido respectivamente. Nota-se que o coeficiente angular do método DPPH é bem maior que os demais o que mostra uma grande influência do aumento da concentração de nitrogênio para a atividade antirradicalar do extrato. Ao analisarmos os valores de “a” dos métodos hidroxil e superóxido, notamos que esses não possuem em módulo valores muito distintos, o que torna a influência positiva ou negativa de nitrogênio sobre a folha pequena frente a esses dois radicais.

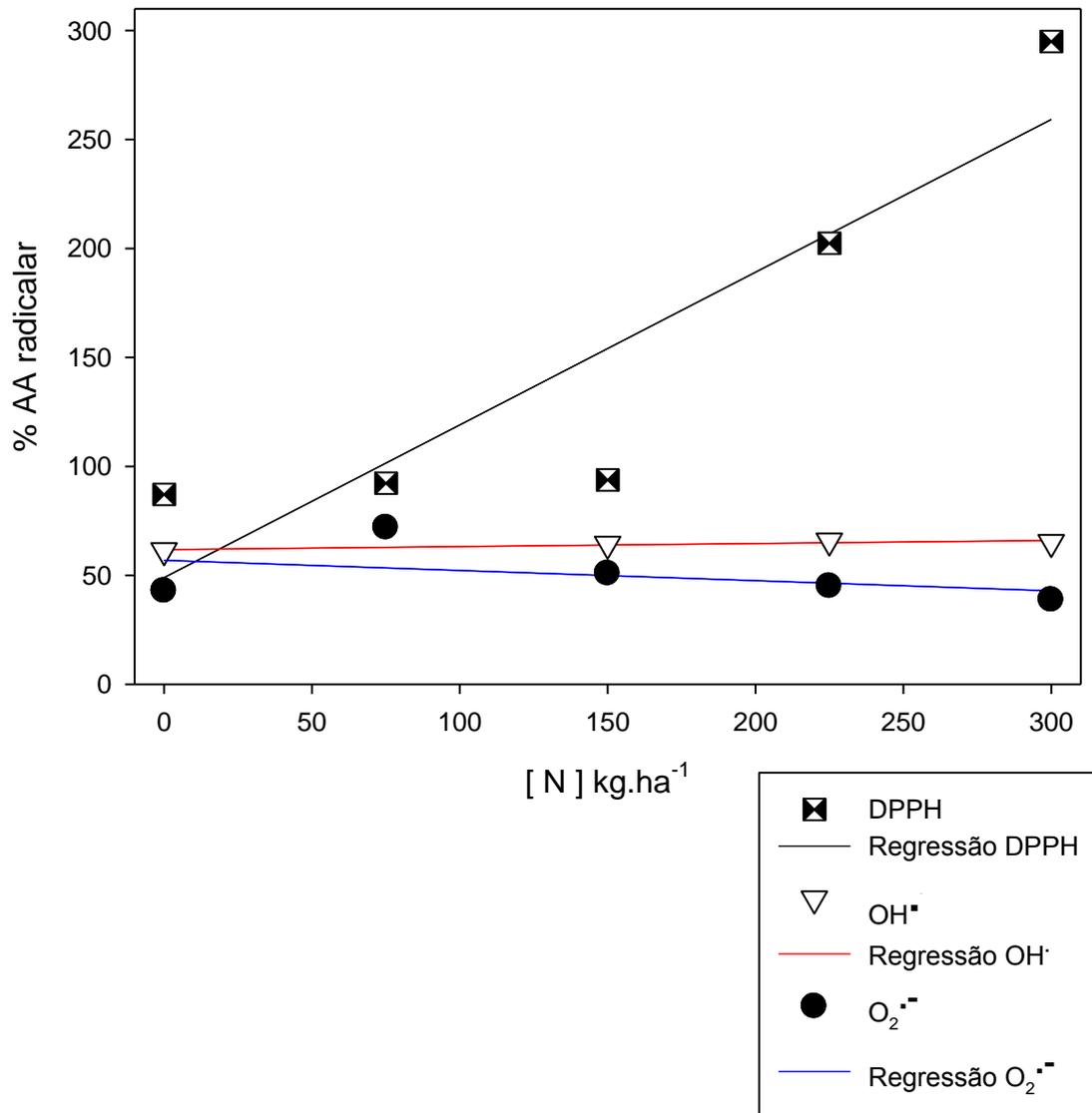


Figura 9 – Atividade antirradicalar na folha (tratamento com nitrogênio) frente aos radicais DPPH, OH•, O₂•⁻

4.4 Avaliações da influência de nitrogênio na cabeça frente aos radicais DPPH, OH• e O₂•⁻

Avaliando a influência de nitrogênio sobre a cabeça do repolho pode-se observar que para os radicais DPPH e hidroxila houve um aumento da atividade antirradicalar, já para o radical superóxido houve um decréscimo nesta atividade. Os

coeficientes angulares são para DPPH, OH^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$ respectivamente, $6,40\text{E-}04$, $9,26\text{E-}03$ e $-0,0142$. Esses valores são muito pequenos e próximos em módulo, indicando que a influência do aumento da concentração de nitrogênio não é significativa para a cabeça da *Brassica oleracea* var. *capitata* em extratos metanólicos.

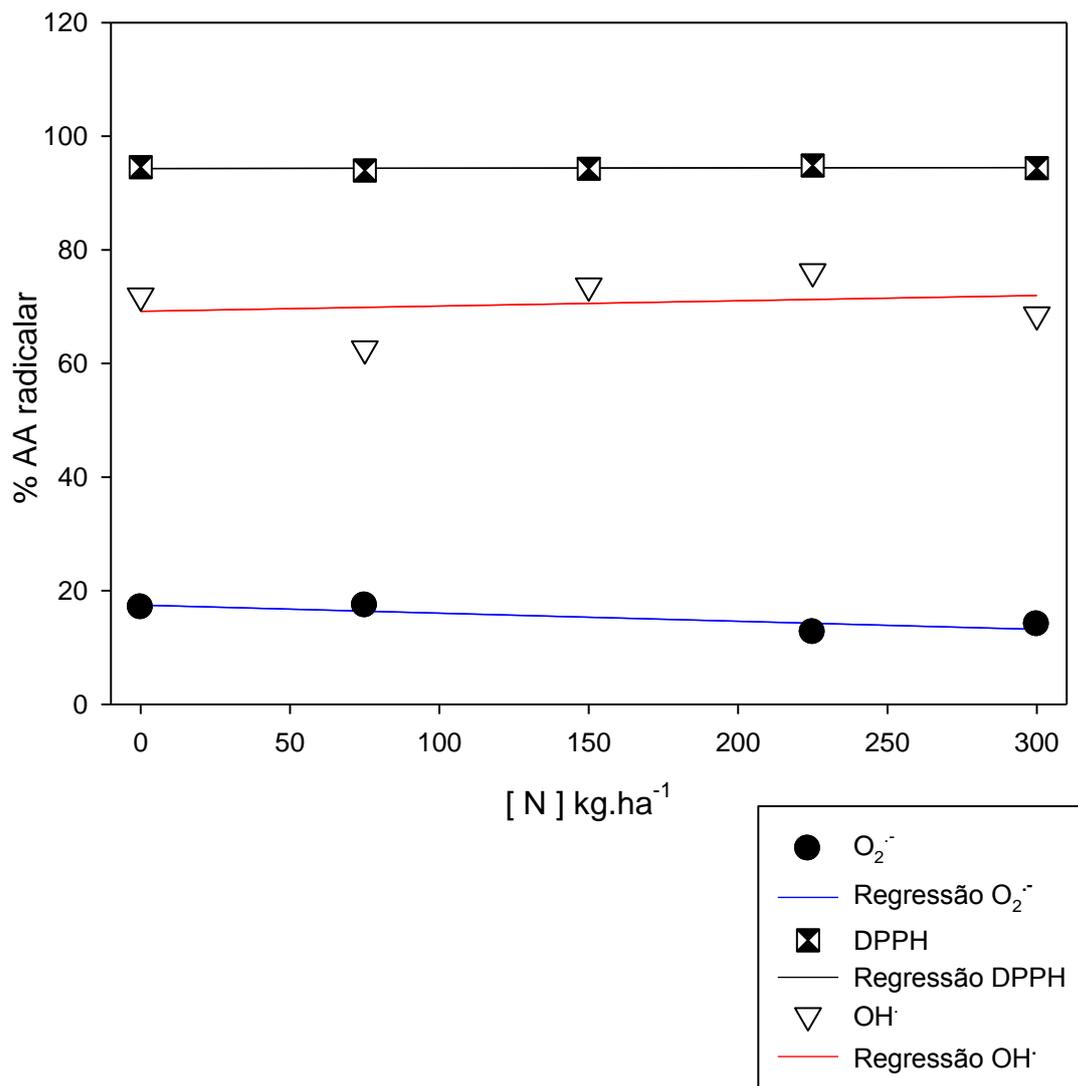


Figura 10 – Atividade antirradicalar na cabeça (tratamento com nitrogênio) frente aos radicais DPPH, OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$

A influência do aumento da concentração de um nutriente pode ser avaliada pela taxa de variação percentual entre dois pontos. Neste trabalho calculamos esta influência entre o primeiro tratamento de adubação (0 kg.ha^{-1}) e o quinto tratamento

de adubação (8 kg.ha⁻¹ para boro e 300 kg.ha⁻¹ de nitrogênio), seguindo a equação 13.

(13)

A tabela a seguir apresenta os resultados da taxa de variação para cada grupo de amostras (nutriente/ parte da planta/ radical analisado).

Tabela 4 – Taxa de variação da atividade antirradicalar

Nutriente/parte/radical	Taxa de variação com o aumento da concentração do nutriente
Boro folha - DPPH	6,9255 %
Boro folha - OH[•]	8,0776 %
Boro folha - O₂[•]	-12,6807 %
Boro cabeça - DPPH	0,3531 %
Boro cabeça - OH[•]	2,8227 %
Boro cabeça - O₂[•]	-9,7170 %
Nitrogênio folha – DPPH	81,1251 %
Nitrogênio folha - OH[•]	6,3529 %
Nitrogênio folha - O₂[•]	-32,6975 %
Nitrogênio cabeça – DPPH	0,2033 %
Nitrogênio cabeça - OH[•]	3,8584 %
Nitrogênio cabeça – O₂[•]	-32,2629 %

Analisando os resultados da tabela 4 ressaltam-se algumas taxas de variação, frente ao radical superóxido nenhum tratamento (nutriente/parte da planta) apresentou taxas de variação positivas, frente os radical hidroxila as taxas de variação foram todas positivas sendo a mais significativa no tratamento com boro para a folha, que foi de 8,0776%. Para as taxas de variação frente ao radical DPPH destaca-se a influência de 81,1251% no tratamento com nitrogênio na folha.

Sabe-se que o método com o radical DPPH é amplamente utilizado por ser preciso e reprodutível na avaliação da atividade antioxidante frente a diversos

extratos incluindo os de Brassica sp (FERRERES *et al.*, 2007). Este radical é de natureza sintética e tem alta estabilidade devido a deslocalização de elétrons desemparelhados por toda a molécula do radical (Alves *et al.*, 2010). Segundo Soengas (2012) a atividade antioxidante das folhas jovens colhidas três meses após o plantio é significativamente mais elevada do que o resto da fase de crescimento de planta para DPPH e hidroxil e de modo geral, há um aumento da atividade antioxidante de culturas de Brassica com o tempo. Considerando que as amostras deste trabalho foram coletadas 90 dias após os plantio pode-se atribuir os altos valores percentuais encontrado nos tratamentos a idade das amostras.

5 CONCLUSÃO

- As plantas tratadas com boro apresentaram um aumento na atividade antirradicalar frente ao radical DPPH e hidroxil nas duas partes da planta estudadas, cabeça e folha.
- A concentração de 6 kg.ha⁻¹ de boro apresentou os maiores valores percentuais de atividade antioxidante para o DPPH e hidroxil na folha.
- Para os tratamentos com nitrogênio o melhor resultado foi encontrado na folha para o radical DPPH.
- A atividade frente ao radical superóxido não aumentou com os tratamentos de boro e nitrogênio para folha e cabeça.
- Avalia-se como positivo o tratamento com boro e nitrogênio na cabeça e folha da *Brassica oleracea* var. *capitata* sendo a taxa de variação mais significativa nas folhas para ambos os nutrientes.

REFERÊNCIAS

ABCSEM – Associação Brasileira de Comércio de Sementes e Mudas. Disponível em: <http://www.revistacampoenegocios.com.br/anteriores/201301/index.php?referencia=Especial02>. Acesso em: 04 dez. 2013.

ALVES, Clayton Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

AMADO, Lílian Lund et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the total environment**, v. 407, n. 6, p. 2115-2123, 2009.

ANDERSON, Diana. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 350, n. 1, p. 103-108, 1996.

ANGELO, Priscila Milene; JORGE, Neuza. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ANTOLOVICH, Michael et al. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, n. 1, p. 183-198, 2002.

AVALHÃES, C.C.; PRADO, R.M.; ROMUALDO, L.M.; ROZANE, D.E.; CORREIA, M.A.R. Omissão de macronutrientes no crescimento e no estado nutricional de plantas de repolho cultivado em solução nutritiva. **Bioscience Journal**, v. 25, n. 5, p. 21-28, 2009.

BABIOR, M. B.; Superoxide: a two-edged sword. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, v. 30, p. 141-155, 1997

BAJPAI, V. K.; KANG, S. C.; BAEK, K. H. Microbial fermentation of cabbage by a bacterial strain of *Pectobacterium atrosepticum* for the production of bioactive material against *Candida* species. **Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology**, v. 22, n. 1, p. 21-29, 2012.

BALBACH, A; BOARIM, D. As Hortaliças na Medicina Natural. 2ª Ed. **Itaquacetuba: Vida Plena**, 1993. 2880p.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 113, 2006.

BERGAMINI, Carlo M. et al. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. **Current pharmaceutical design**, v. 10, n. 14, p. 1611-1626, 2004.

BROOKS, James D.; PATON, Vincent G.; VIDANES, Genevieve. Potent induction of phase 2 enzymes in human prostate cells by sulforaphane. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 10, n. 9, p. 949-954, 2001.

CARDOSO, Antonio Ismael Inácio; HIRAKI, Hisato. Avaliação de doses e épocas de aplicação de nitrato de cálcio em cobertura na cultura do rabanete. **Horticultura Brasileira**, v. 19, n. 3, p. 328-331, 2001.

CARVALHO, Camilo Amaro de et al. Estudo espectrométrico de diferentes estágios fenológicos da *Brassica oleracea* var. *capitata*. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, p. 249-257, 2008.

CASTELUBER, IVANA PERINI. **Influência da nutrição mineral com nitrogênio e boro na produtividade e presença de compostos secundários polares em *Brassica oleracea* var. *Capitata***. 2014, 50f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) – Universidade Federal do Espírito Santo, São Matheus, 2014

DAL PRÁA, Valéria et al. A review of influence of environment and process parameters on glucosinolate-myrosinase system from *Brassica*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol**, v. 3, n. 08, p. 121-128, 2013.

DAL PRÁ, Valéria et al. Supercritical CO₂ extraction, chemical characterisation and antioxidant potential of *Brassica oleracea* var *capitata* against HO, and ROO. **Food chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3954-3959, 2013.

DAL PRÁ, VALÉRIA. ***Brassica oleracea* var. *capitata*: extração, caracterização química e atividade biológica de metabólitos secundários**. 2013. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013

DIN M; QASIM M; ALAM M.. Effect of different levels of N, P and K on the growth and yield of cabbage. **Journal of Agriculture Research**, v.45, n.1, p.171-176, 2007.

FARAG, Mohamed A.; MOTAAL, Amira A. Abdel. Sulforaphane composition, cytotoxic and antioxidant activity of crucifer vegetables. **Journal of Advanced Research**, v. 1, n. 1, p. 65-70, 2010.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERRERES, Federico et al. Tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) seeds: Phytochemical characterization and antioxidant potential. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 549-558, 2007.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3ed. Vicosa: UFV.p.421, 2008

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C., Free radicals in biology and medicine. **Oxford University Press**, 4ª edição, Nova York, 2007.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010. Disponível em: http://www.incaper.es.gov.br/proater/municipios/Noroeste/Santa_Teresa.pdf. Acesso em: 04 dez. 2013.

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

KANO Y; NAKAGAWA H; SEKINE M; GOTO H; SUGIURA A. Effect of nitrogen fertilizer on cell size and sugar accumulation in the leaves of cabbage (*Brassica oleracea* L.). **HortScience**, v.42, n.3, p.1490-1492, 2007.

KATAYA, Hazem AH; HAMZA, AlaaEldin A. Red cabbage (*Brassica oleracea*) ameliorates diabetic nephropathy in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 3, p. 281-287, 2008.

LAMY, Evelyn et al. The MAPK pathway signals telomerase modulation in response to isothiocyanate-induced DNA damage of human liver cancer cells. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e53240, 2013.

LEMOS, Marivane et al. Gastroprotective activity of hydroalcoholic extract obtained from the leaves of *Brassica oleracea* var. *acephala* DC in different animal models. **Journal of ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 503-507, 2011.

LIN, Jin-Yuarn et al. Characterisation of the pigment components in red cabbage (*Brassica oleracea* L. var.) juice and their anti-inflammatory effects on LPS-stimulated murine splenocytes. **Food chemistry**, v. 109, n. 4, p. 771-781, 2008.

MÁRTON, Melinda-Rita et al. Determination of bioactive, free isothiocyanates from a glucosinolate-containing phytotherapeutic agent: A pilot study with in vitro models and human intervention. **Fitoterapia**, v. 85, p. 25-34, 2013.

MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. **Principles of Plant Nutrition**. Bern. International Potash Institute, 1978

MOLYNEUX, Philip. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J Sci Technol**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MOREIRA, Marialva A. et al. Crescimento e produção de repolho em função de doses de nitrogênio. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 117-121, 2011.

MOTA, G.M.F.; SOUSA, E.R.; RANAL, M.A. Resposta da couve-da-Malásia (*Brassica chinensis* L. var. *parachinensis* (Bailey) Sinskaja) à deficiência nutricional. **Acta Scientiarum Agronomy Maringa**, v. 31, n. 2, p. 321-329, 2009.

NACZK, Marian; SHAHIDI, Fereidoon. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1, p. 95-111, 2004.

PRADO, R.M. **Nutrição de Plantas**. São Paulo: Editora Unesp. p.407, 2008.

ROSA, Marcelo B. et al. ESTUDO ESPECTROFOTOMÉTRICO DA ATIVIDADE FOTO-PROTETORA DE EXTRATOS AQUOSOS DE ACHILLEA MILLEFOLIUM, BRASSICA OLERACEA VAR. CAPITATA, CYPERUS ROTUNDUS, PLECTRANTHUS BARBATUS, POROPHYLLUM RUDERALE (JACQ.). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 1, 2008.

SINGH, Jagdish et al. Antioxidant phytochemicals in cabbage (< i> Brassica oleracea</i> L. var. capitata). **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 3, p. 233-237, 2006.

SOENGAS, P. et al. New insights into antioxidant activity of Brassica crops. **Food chemistry**, v. 134, n. 2, p. 725-733, 2012.

SOUZA, Vinicius; LORENZI, Harri. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2008.

TAIZ L.; ZEIGER E. **Plant Physiology**. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. p. 391-395, 2004

THOUNAOJAM, Menaka C. et al. Safety evaluations on ethanolic extract of red cabbage (*Brassica oleracea* L.) in mice. **Journal of food science**, v. 76, n. 1, p. T35-T39, 2011.

VALKO, M., RHODES, C. J., MONCOL, J., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VASCONCELOS, Sandra Mary Lima et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-38, 2007.

VASCONCELOS, Sandra Mary Lima; SILVA, Maria Alayde Mendonça da; GOULART, Marília Oliveira Fonseca. Pró-antioxidantes e antioxidantes de baixo peso molecular oriundos da dieta: estrutura e função. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr**, v. 31, n. 3, p. 95-118, 2006.

VRCHOVSKÁ, Vendula et al. Antioxidative properties of tronchuda cabbage (< i> Brassica oleracea</i> L. var.< i> costata</i> DC) external leaves against DPPH, superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. **Food Chemistry**, v. 98, n. 3, p. 416-425, 2006.

WINTER M. J. Chemical bonding. In: *Diatomic molecules*. Oxford Chemistry Primers: Oxford: **Oxford Science Publications**, 1994.

YU, Liangli et al. Free radical scavenging properties of wheat extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1619-1624, 2002.

ZHAO, Haifeng et al. Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 19, p. 7277-7286, 2006.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela 1 – Retas de regressão linear para cada grupo de amostras

Nutriente/parte/radical	Equação da reta	r²
Boro folha – DPPH	$y = 0,0183x + 1,9669$	$r^2 = 0,5686$
Boro folha - OH[•]	$y = 0,0189x + 1,7239$	$r^2 = 0,3467$
Boro folha - O₂[•]	$y = -0,0188x + 1,3341$	$r^2 = 0,0629$
Boro cabeça – DPPH	$y = 0,0423 x + 95,4836$	$r^2 = 0,0388$
Boro cabeça - OH[•]	$y = 0,1519x + 41,8268$	$r^2 = 1,97E-04$
Boro cabeça - O₂[•]	$y = 1,9013x -171,7428$	$r^2 = 0,1438$
Nitrogênio folha – DPPH	$y = 0,7009x + 48,9248$	$r^2 = 0,8102$
Nitrogênio folha - OH[•]	$y = 0,0139x + 61,8099$	$r^2 = 0,8259$
Nitrogênio folha - O₂[•]	$y = -0,0467x + 56,9458$	$r^2 = 0,1797$
Nitrogênio cabeça – DPPH	$y = 6,40E-04x + 94,3023$	$r^2 = 0,0553$
Nitrogênio cabeça - OH[•]	$y = 9,26E-03x + 69,1837$	$r^2 = 0,0437$
Nitrogênio cabeça – O₂[•]	$y = -0,0142 x + 17,4597$	$r^2 = 0,7223$