

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM AGROECOLOGIA

OLGA OLIVEIRA DOS ANJOS

**SUBSTÂNCIAS HÚMICAS NO METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM PLANTAS
DE RÚCULA (*Eruca sativa* Miller)**

São Luís
2010

OLGA OLIVEIRA DOS ANJOS

**SUBSTÂNCIAS HÚMICAS NO METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM PLANTAS
DE RÚCULA (*Eruca sativa* Miller)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Agroecologia.

Orientador: Prof. Dr. Cristoph Gehring

Co-Orientador: Prof. Dr. Altamiro Souza
de Lima Ferraz Júnior

São Luís

2010

Anjos, Olga Oliveira dos

Substâncias húmicas no metabolismo de nitrogênio em plantas de rúcula (*Eruca sativa* Miller) / Olga Oliveira dos Anjos. - São Luis, 2010.

54f.

Dissertação (Mestrado) - Curso de Agroecologia, Universidade Estadual do Maranhão, 2010.

Orientador: Prof. Cristoph Gehring

1.Substancias humicas 2.Nitrogênio 3.Rúcula I.Titulo

CDU: 631.81: 582.683.2

OLGA OLIVEIRA DOS ANJOS

**SUBSTÂNCIAS HÚMICAS NO METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM PLANTAS
DE RÚCULA (*Eruca sativa* Miller)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Agroecologia.

Aprovada em: _____ / _____ / _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cristoph Gehring (Orientador)

Prof. Dr. Altamiro Souza de Lima Ferraz Júnior – UEMA

Prof. Dr. Eduardo Ferreira Rodrigues – UEMA

Aos meus amados pais, Antonio José e Raimunda de Jesus, pela dedicação e pela força que alicerçam a minha existência. A minha filha Maryana pelo amor incondicional. Obrigada por conduzirem meus passos a caminho de mais uma conquista. Sem vocês jamais teria conseguido. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Eis aqui a concretização de um sonho. Sonho este construído com ajuda de muitos, tantos que se tornaria difícil mencionar o nome de todos que presenciaram essa trajetória tão importante e tão árdua.

Primeiramente agradeço a Deus Pai, criador de todas as coisas que me deu a vida, força, ânimo e coragem para não desistir mesmo quando o fardo parecia tão pesado a ponto de não poder carregar sozinha.

A FAPEMA, Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão, pela concessão da bolsa de estudo.

A UEMA, Universidade Estadual do Maranhão, pela concessão do Laboratório de Nutrição de Plantas para realização das análises.

Aos professores Dr. Altamiro Souza de Lima Ferraz Junior e Cristoph Gehring por terem me recebido como orientada e conduzido a execução dos trabalhos com competência e paciência até o fim desta caminhada.

Ao prof^o Dr. Eduardo Rodrigues pela orientação na condução do experimento e participação na banca examinadora desse trabalho.

A prof^a Ana Maria Araujo, que partilhou com ética e amizade os momentos de angústia e aflição experimentados no laboratório.

Ao prof^o Eneidas que com muita paciência acompanhou as análises químicas, sempre orientando e contribuindo no que fosse preciso para melhor realização dos trabalhos.

A prof^a Antonia Alice Costa Rodrigues, coordenadora do Mestrado em Agroecologia, que com muita compreensão conduziu-me para concretização desse sonho.

Ao Departamento de Análise de Qualidade da Água/FUNASA, Fundação Nacional de Saúde, pelo empréstimo de materiais para as análises laboratoriais.

Aos funcionários do Núcleo Tecnológico de Engenharia Rural (NTER)/UEMA em especial Renato pelo dedicação e auxílio na condução do experimento em casa de vegetação.

Aos técnicos do Laboratório de Bromatologia/UEMA pelo empréstimo do equipamento para extração das Substâncias Humicas.

Ao Msc. João Reis coordenador do Laboratório de Solos pelo auxílio na determinação de carbono.

Ao graduando Pedro Ivo Bitu pela colaboração nas análises laboratoriais e principalmente pela amizade e compreensão.

Aos colegas de mestrado Marlon Gomes e Paulo Monroe que auxiliaram nas análises estatísticas e preparo dos gráficos, muitas vezes sacrificando o seu tempo livre para ajudar a concluir este trabalho.

Aos amigos Ana Carolina, Augusto Cesar, Jackson Boueres, Cristina Gomes e Mônica Arouche pela força e companhia nos momentos difíceis.

As minhas queridas irmãs Nayra, Nadya e Gildete pelo incentivo. E ao meu lindo sobrinho Túlio Gabriel que tornou mais alegre os meus dias.

RESUMO

O efeito da adição de substâncias húmicas presentes na matéria orgânica do solo sobre o crescimento e metabolismo das plantas, tem sido comprovado em diversas pesquisas. Há a comprovação da presença destas substâncias em elevadas concentrações no vermicomposto, utilizado na adubação orgânica no cultivo de hortaliças. O presente trabalho avalia o efeito de diferentes doses de ácido húmico e fúlvico extraídos de vermicomposto vegetal, no metabolismo de nitrogênio em plantas de rúcula cultivadas em casa de vegetação. A pesquisa foi desenvolvida na Universidade Estadual do Maranhão, no período de Agosto a Outubro de 2009. O experimento foi conduzido em vasos com capacidade de 2,0 dm³ tendo como substrato areia lavada, irrigada a cada três dias com uma solução nutritiva. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em um esquema fatorial 2 x 5 (dois ácidos e cinco dosagens) com cinco repetições. As substâncias húmicas foram extraídas de amostras de aproximadamente 500g de vermicomposto com base na solubilidade em meio ácido-base. As doses aplicadas foram: 0 (sem Ácido Húmico e Ácido Fúlvico), 50, 100, 150 e 200 mg de C.L⁻¹ sendo aplicadas aos 10, 20 e 30 dias após o transplântio das mudas. Foram avaliadas a massa seca da parte aérea, massa seca e volume de raiz, atividade da Nitrato Redutase nas folhas, N-amino livre, N-NO₃, N-NH₄, N-protéico nas folhas. O AF afetou o crescimento vegetativo radicular, ao contrário do AH que não exerceu efeitos significativos. A dose de 100 mg de C.L⁻¹ de AF contribuiu para o aumento da quantidade de MS nas raízes de rúcula. Essa dose proporcionou aumento na razão raiz/parte aérea e na MS total. Para o metabolismo do nitrogênio as substâncias húmicas em especial o AF proporcionou maior atividade da enzima NR e a redução de aminoácidos livres. Tais efeitos sugerem que o ácido fúlvico aplicado em diferentes doses proporcionaram uma melhor aquisição do N pela planta e diminuíram o efeito do estresse hídrico e salino.

Palavras Chave: Substâncias Húmicas. Nitrogênio. Rúcula

ABSTRACT

Abundant research has demonstrated significant effects of humic substances of soil organic matter on plant growth and metabolism. Vermicompost, utilized for vegetable cultivation, has elevated concentrations of these substances. This research evaluates the effects of different doses of humic and fulvic acids extracted from vermicompost on the nitrogen metabolism of rucola plants grown in a greenhouse. Research was executed in Maranhão State University between August and October 2009. The experiment used 2,0 dm³ sized pots with washed sand as substrate, with the addition of nutritive solution every three days. Experimental layout was a bi-factorial completely randomized block design with 2 acids in 5 doses and 5 replications each. The humic substances were extracted from approximately 500g of vermicompost based on their solubility in acids and bases, with doses of 0 (without HA and FA), 50, 100, 150 and 200 mg of C.L⁻¹, applied at 10, 20 and 30 days after transplanting. I evaluated the aboveground dry weight, dry weight and volume of the roots, Nitrate Reductase activity, free amino-N, NO₃-N, NH₄-N, and protein-N in the leaves. Fulvic acids affected plant growth, whereas HA didn't. 100 mg of C.L⁻¹ as FA caused maximum increment of root mass, of root:shoot ratio and of total plant dry mass. Humic substances, especially the FA affected the nitrogen metabolism, especially by increasing nitrate reductase activity. These results suggest that small doses of fulvic acids are beneficial for an improved plant N uptake.

Keywords: Humic Substance. Nitrogen. Rucula.

LISTA DE QUADROS

	Página
Tabela 1. Caracterização química do vermicomposto (TEDESCO, et al., 1985). ..	26
Tabela 2. Acompanhamento da condutividade elétrica da solução nutritiva aplicada a plantas de rúcula cultivadas em vaso com areia lavada.....	29

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Soluções de AH e AF extraídos de vermicomposto pelo método ácido/base com NaOH 0,1 mol. L ⁻¹ e H ₂ SO ₄ 20%.....	27
Figura 2.	Preparo do extrato alcoólico para determinação das frações de nitrogênio. (A) – Filtragem do material fresco; (B) Separação da parte polar e apolar do filtrado com clorofórmio; (C) Fração apolar utilizada para o fracionamento de nitrogênio.....	31
Figura 3.	Massa seca da parte aérea (g.vaso ⁻¹) em plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF.....	35
Figura 4.	Plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e adição de AH/AF. (A) e (B) Folhas apresentando encarquilhamento do limbo provocados por estresse salino e hídrico.....	36
Figura 5.	Massa seca de raiz (g.vaso ⁻¹) acumulada em plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF.....	37
Figura 6.	Massa seca total (g) acumulada em plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF.	38
Figura 7.	Relação raiz/parte aérea em plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF.....	39
Figura 8.	Volume de raiz (cm ³) de plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF.....	40
Figura 9.	Densidade de raiz (g.cm ⁻³) de plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF.....	41
Figura 10.	Atividade enzimática da Nitrato Redutase (μmoles/g.p.f.hora) na parte aérea de plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF.....	42
Figura 11.	Concentração de N-NH ₄ ⁺ (μmoles/g.p.f) na parte aérea de plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF.....	44
Figura 12.	Concentração de N-Amino (μmoles/g.p.f) na parte aérea de plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF.....	45
Figura 13.	Corelação N-amino (μmols/g.p.f) e Amônio (μmols/g.p.f) avaliadas na parte aérea de plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF.....	45

- Figura 14.** Quantidade de N-protéico (g.Kg^{-1}) presente na parte aérea **46**
de plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução
nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF.....
- Figura 15.** Quantidade de N-total (g.Kg^{-1}) presente na parte aérea de **47**
plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução
nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF.....

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1	Matéria orgânica.....	13
2.2	Substâncias húmicas.....	16
2.2.1	Conceitos e aspectos gerais.....	16
2.2.2	Substâncias húmicas e o metabolismo das plantas.....	20
2.2.3	Substâncias húmicas e metabolismo de nitrogênio.....	23
2.3	Cultura da rúcula (<i>Eruca sativa</i>): considerações gerais.....	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1	Área de estudo e fonte das substâncias húmicas.....	26
3.2	Extração das substâncias húmicas.....	27
3.3	Determinação de C orgânico nas substâncias húmicas.....	27
3.4	Obtenção das mudas.....	28
3.5	Solução nutritiva.....	28
3.6	Delineamento experimental e aplicação dos tratamentos.....	29
3.7	Variáveis analisadas.....	30
3.7.1	Variáveis relacionadas ao crescimento.....	30
3.7.2	Fracionamento de nitrogênio.....	30
3.8	Análises estatísticas.....	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1	Efeitos da aplicação das Substâncias Húmicas.....	34
4.1.1	Variáveis relacionadas ao crescimento.....	34
4.1.2	Variáveis do metabolismo de nitrogênio.....	41
5	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49
	LISTA DE TABELAS.....	05
	LISTA DE FIGURAS.....	06

1 INTRODUÇÃO

A matéria orgânica do solo é um dos fatores responsáveis pela sustentabilidade dos sistemas agrícolas. O manejo adequado da matéria orgânica é importante para a segurança alimentar, pois um solo bem estruturado é imprescindível para a produção sustentável de alimentos e para atender às necessidades da população (MACHADO, 2001).

O uso intensivo do solo para implantação de diferentes sistemas de produção tem proporcionado perdas significativas nos níveis desse componente, sendo necessária a utilização de práticas agrícolas que possam manter o equilíbrio entre as taxas de entrada e saída desse componente no solo.

Uma das alternativas capazes de repor a matéria orgânica do solo tem sido a utilização de adubos orgânicos obtidos por meio dos processos de vermicompostagem. A decomposição dos resíduos orgânicos através da ação das minhocas ocorre em um curto intervalo de tempo, resultando em um produto final estabilizado apresentando diversos benefícios para as propriedades químicas e físicas do solo e para nutrição das plantas (CANELLAS; SANTOS, 2005).

As substâncias húmicas, constituintes não vivos da matéria orgânica do solo podem ser isoladas de diversas fontes, inclusive de vermicompostos. Os efeitos dessas substâncias no metabolismo das plantas tem sido verificado em diversas pesquisas que indicam o aumento do crescimento vegetal e incrementos na absorção de nutrientes como resultados da bioatividade dessas substâncias.

A produção de hortaliças folhosas sempre teve expressivo reconhecimento no cenário agrícola nacional. No entanto, a obtenção de um produto final de elevada qualidade depende de diversos fatores tais como a manutenção dos bons níveis de fertilidade do solo, de suas propriedades físico-químicas e da presença de nutrientes prontamente disponíveis para as plantas.

Um dos elementos químicos mais importantes para o crescimento vegetal é o nitrogênio. Evidências experimentais tem demonstrado que as SHs exercem efeitos sobre o NO_3^- aumentando a absorção desse íon pelas raízes de diferentes espécies vegetais (PINTON et al., 1999).

Apesar da grande quantidade de pesquisas envolvendo os efeitos das SHs no metabolismo das plantas muitos questionamentos ainda persistem passíveis de respostas, entre eles a forma como essas substâncias atuam no interior da célula

vegetal, assim como a definição concreta de um modelo estrutural que possa classificar quimicamente essas substâncias (NARDI et al., 2002).

Grande parte das pesquisas indica a fração de baixo peso molecular (denominada pelo método operacional de Ácido Fúlvico - AF) presente nas substâncias húmicas como responsável pelos efeitos já mencionados (RAUTHAN; SCHNITZER, 1981). No entanto, essa consideração pode ser reavaliada já que a presença de substâncias húmicas de elevado peso molecular como os Ácidos Húmicos (AH) também tem sido responsável pelo aumento na absorção de nutrientes em raízes de milho, o que sugere a necessidade de outros trabalhos que possam comparar a bioatividade das duas frações sobre as mesmas condições experimentais (CANELLAS; FAÇANHA, 2004).

O presente trabalho tem como objetivo extrair e avaliar, em condições controladas, os efeitos do Ácido Húmico (AH) e Ácido Fúlvico (AF), obtidos a partir de vermicomposto, sobre o metabolismo de nitrogênio em plantas de Rúcula (*Eruca Sativa* Miller).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Matéria orgânica

A matéria orgânica presente no solo ou incorporada através de resíduos orgânicos é de vital importância para a manutenção do equilíbrio do sistema solo-planta. É considerada como fonte de energia e nutrientes, mantendo o solo em estado dinâmico e exercendo importante papel na qualidade química, física e biológica do solo (LANDGRAF, 2005).

O termo Matéria Orgânica é bem amplo podendo apresentar-se como um complexo sistema de substâncias carbônicas, cuja dinâmica é mantida pela contínua renovação de resíduos orgânicos de natureza variada e em constante transformação, sob ação de fatores edáficos, climáticos, biológicos, químicos e físicos (SILVA et al., 2002).

A matéria orgânica é constituída por componentes vivos e não vivos em interação constante. Os componentes vivos correspondem às raízes, fauna do solo e microorganismos. Após atingirem os estágios de decomposição e mineralização, estes componentes proporcionam aporte de nutrientes ao solo e conseqüentemente aos sistemas agrícolas. Somando-se as porcentagens de carbono presentes nos três constituintes a matéria orgânica viva raramente ultrapassa 4% do carbono orgânico total do solo (MENDONÇA et al., 2007).

Quanto aos componentes não vivos, estes representam a parte mais importante da matéria orgânica por contribuírem em média com 98% do carbono orgânico total do solo. Esta fração é representada pela matéria macrogânica composta por restos vegetais em vários estágios de alteração, e pelo Húmus constituído por material humificado: ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e húmica; e material não humificado: carboidratos, lipídios, ácidos orgânicos, polifenóis, ácidos nucléicos, pigmentos e proteínas (STEVENSON, 1994; MENDONÇA et al., 2007).

A matéria orgânica não viva é resultante dos processos de degradação química e biológica de resíduos orgânicos e das diversas interações com os microorganismos presentes no solo. Por apresentar alto grau de estabilidade é a fração mais importante e também a mais pesquisada.

Dentre os diversos benefícios que a MO proporciona ao solo destacam-se: 1. O suprimento de minerais – atuando como fonte principal de nitrogênio,

fósforo e enxofre, por meio dos processos de decomposição e mineralização para as raízes; 2. Estabilidade de agregados de partículas do solo – solos com maiores quantidades de MO apresentam estrutura leve e descompactada; 3. Melhoria da aeração do solo – maior quantidade de poros para a circulação do ar e penetração das raízes; 4. Aumento da capacidade de troca de cátions; 5. Aumento da população microbiana, incluindo microrganismos benéficos; 6. Retenção da umidade; 7. Complexação de metais pesados; 8. Suprimento de substâncias húmicas que funcionam como carregadores de micro e macronutrientes ou fatores de crescimento. (CRASWELL et al., 2001).

Santos et al. (2001) trabalhando com a cultura da alface observaram o efeito residual da aplicação de diferentes doses de composto orgânico aumentando também os teores de fósforo e CTC do solo.

Pesquisa realizada com cultivo de sorgo em solos tropicais da Venezuela demonstrou que a incorporação de resíduos de mata nativa e de leguminosa utilizados como fonte de adubo orgânico aumentaram as taxas de mineralização de nitrogênio e carbono, e conseqüentemente a atividade microbiana (ESPINOZA, 2004).

A perda de matéria orgânica resulta em diversos danos ao solo, tanto na composição física quanto na composição química. Nos solos tropicais, em especial, onde a MO existente é decomposta com maior facilidade devido às condições climáticas locais, a presença de matéria orgânica torna-se fator indispensável para os sistemas agrícolas.

Marchiori et al. (1999) avaliaram as alterações na matéria orgânica de um LATOSSOLO ROXO sob diferentes formas de manejo, podendo observar que o cultivo com cana-de-açúcar quando comparado a uma área com mata natural apresentou menores valores de C orgânico no solo e na fração húmica.

Nos solos brasileiros as taxas de MO em média não ultrapassam 4% sendo necessária a utilização de estratégias que possam contribuir para elevação ou ao menos manutenção destes níveis (PILLON, 2005). A utilização de práticas conservacionistas capazes de permitir o aporte de MO devem ser realizadas para que se possa garantir a sustentabilidade ambiental e produtiva do solo.

A utilização de adubos e compostos para melhorar o compartimento orgânico do solo tem sido uma prática comum em pequenas e médias propriedades. O costume de utilizar adubos como esterco bovino ou de aves e compostos

produzidos a partir de restos vegetais, permite o aproveitamento de resíduos orgânicos produzidos na propriedade familiar, disponibilizam nutrientes para os vegetais, e afetam decisivamente a constituição estrutural do solo (CANELLAS, 2005).

A adubação orgânica tem representado uma alternativa viável para o acréscimo ou manutenção das taxas de MO presente no solo. Ela permite a absorção lenta de nutrientes, proporcionando também aumento na população de microrganismos responsáveis pela decomposição da MO e melhoria das propriedades físicas do solo - o que garante melhor crescimento radicular e conseqüentemente melhor desenvolvimento vegetal (CANELLAS, 2005; YURI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2009).

Silva et al. (2004) avaliando o efeito da aplicação de diferentes doses de esterco bovino observaram aumento na retenção da umidade e disponibilidade de água no solo, aumento dos teores de fósforo, potássio e sódio na camada de 20-30 cm, bem como o aumento do rendimento das espigas verdes e dos grãos de milho proporcionalmente a elevação da dose de esterco aplicada.

Outra forma viável para a reposição da MO ao solo, utilizada principalmente em sistemas agrícolas de baixa escala é a vermicompostagem. Durante o processo de decomposição aeróbica a ação física, química e biológica exercida pelas minhocas e os microrganismos existentes em seu trato digestivo acelera a decomposição dos resíduos orgânicos resultando em um material de coloração escura, altamente estável denominado húmus de minhoca, coprólitos ou vermicomposto (GLIESMAN, 2005).

O processo de compostagem através do metabolismo das minhocas ocorre em curto período, levando a matéria orgânica recente a um estado de estabilização semelhante ao que ocorre na natureza, porém as frações orgânicas originadas apresentam estruturas diferentes das de um ácido húmico de turfa ou de solo (LANDGRAF, 1999).

O vermicomposto auxilia na reestruturação de solos degradados e disponibiliza de maneira prontamente assimilável os nutrientes necessários para o desenvolvimento das plantas, em especial o nitrogênio, que pode ser encontrado em concentrações cinco vezes maior que no material orgânico inicial (HARRIS et al., 1990).

As características do vermicomposto estão relacionadas ao tipo e a qualidade do material do qual foi originado. Castilhos et al. (2007) avaliaram a distribuição de substâncias húmicas presentes em vermicomposto originados de diferentes fontes. Os resultados indicaram um decréscimo de ácidos húmicos e ácido fulvicos na sequência: borra de café> esterco ovino>borra de erva mate> esterco bovino>esterco suíno>esterco de codorna. Nesta mesma pesquisa foi observado aumento na quantidade de COT de 232 g.kg⁻¹ para 457 g.kg⁻¹, sendo os valores mais baixos encontrados nos vermicomposto de origem animal.

De maneira geral o vermicomposto é considerado como excelente condicionador do solo, melhorando as características químicas, físicas e biológicas. Sousa et al. (2006) avaliaram o efeito de diferentes vermicompostos sobre a biomassa microbiana do solo demonstrando que a aplicação do vermicomposto oriundo do esterco de codorna aumentou os teores de carbono orgânico total e promoveu maior atividade microbiana evidenciados pelo aumento na taxa de respiração basal e no quociente metabólico do solo.

A adição de vermicomposto ao solo possibilita a diminuição da acidez comum a maioria dos solos brasileiros. Avaliações no pH de um Latossolo Amarelo Vermelho Distrófico após a adubação com vermicomposto demonstraram elevação do pH em todas as parcelas com este tratamento independente da fonte, sendo o pH elevado de 5,2 a 6,1 (OLIVEIRA, 2009).

2.2 Substâncias húmicas

2.2.1 Conceitos e aspectos gerais

As Substâncias Húmicas (SH) apresentam-se na natureza como parte integrante da matéria orgânica do solo, águas naturais, sedimentos, turfas, vermicomposto e produtos da compostagem. Constituem um material altamente estabilizado responsável pelo fornecimento da maior parte de carbono ao solo (80 a 90%), podendo afetar diretamente o metabolismo e o crescimento das plantas.

As SHs apresentam características físicas e químicas variáveis, dependendo diretamente do material de origem, da qualidade desse material, dos diferentes mecanismos de formação dessas substâncias, assim como das condições

climáticas e da ação de microrganismos responsáveis pela produção de enzimas capazes de condicionar a qualidade dessas substâncias (LANDGRAF, 1999).

Dada a natureza complexa e bastante heterogênea das SHs é comum serem encontradas na literatura diferentes definições para esse termo. No entanto, apesar da quantidade expressiva de trabalhos publicados sobre o assunto, pouco são as informações precisas que comprovem a origem, síntese, estrutura química e funções dessas substâncias (MACCARTH, 2001).

Comumente as SHs são definidas como produtos da degradação oxidativa e subsequente polimerização da matéria orgânica animal e vegetal. Sendo constituídas por uma mistura de compostos de elevada massa molar com uma grande variedade de grupos funcionais (RAUEN, 2002).

Para Stevesson (1994) as SHs podem ser definidas como uma série de polímeros amorfos de coloração amarelo-marrom a preta, com peso molecular relativamente alto, formados por reações de síntese secundária e através da ação de fatores bióticos e abióticos.

Segundo MacCarthy (2001), as definições dadas às SHs são vagas e pouco indicam sobre a natureza química dos materiais húmicos, o que sugere a necessidade de avaliações mais criteriosas. Esse autor examinando criticamente uma extensa gama de informações e estudos publicados a respeito das SHs propôs que a natureza química e o papel ecológico dessas substâncias podem está relacionado com base em dois princípios fundamentais:

- 1- As SH abrangem uma extraordinária e complexa mistura de moléculas altamente heterogêneas, quimicamente reativas e refratárias, resultantes da degradação da matéria orgânica, formadas por processos que envolvem reações químicas entre diversas moléculas.
- 2- A heterogeneidade molecular inerente às SH torna possível o material húmico altamente refratário, desempenhando, desse modo, um papel chave no sistema ecológico do solo.

A revisão apresentada por Hayes (2001) afirma que as definições em torno das SH são imprecisas e bastante generalizadas. No caso especial da Humina parte integrante das SH, as definições a apresentam como um material insolúvel em sistemas aquosos, no entanto, nesta definição poderiam ser incluídos outros materiais de natureza diferentes das SH, tais como hidrocarbonetos de cadeia longa, ésteres e ácidos.

De acordo com Benites et al. (2003) a definição de SH não é simples em razão da complexidade do material orgânico de origem e do grande número de caminhos reacionais possíveis para a formação do húmus.

Dada a dificuldade em obter uma definição precisa para as SH é também comum definir esses materiais operacionalmente em termos de procedimentos laboratoriais usados para extraí-los do solo, sedimentos e águas (SIQUEIRA, 2008).

A partir desse procedimento é possível o conhecimento de três frações presentes nesses materiais: os Ácidos Húmicos (AH) que constituem a fração solúvel em meio alcalino que precipita após acidificação; os Ácidos Fúlvicos (AF) que permanecem em solução quando o meio é acidificado; e a Humina (HU) fração insolúvel tanto em meio ácido quanto em meio alcalino diluído.

A divisão operacional leva em conta apenas o grau de solubilidade em meio aquoso em função do pH da solução extratora sem considerar as propriedades individuais das substâncias extraídas.

O estabelecimento de um modelo estrutural para as SH é um tema tão controverso quanto às definições apresentadas anteriormente. Avanços nas tecnologias de cromatografia e espectroscopia de ressonância magnética nuclear têm permitido maior precisão nos resultados alcançados.

Atualmente são consideradas ao menos quatro rotas responsáveis pela formação das SH durante o processo de decomposição de resíduos no solo. Esses mecanismos podem ocorrer simultaneamente ou predominar um mecanismo sobre o outro dependendo, principalmente do tipo de substrato e das condições ambientais (MENDONÇA et al., 2007).

Os mecanismos baseados na condensação polimérica de polifenóis e quinonas têm sido os mais aceitos por pesquisadores e pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (STEVENSON, 1994).

Recentemente Picollo (2002) propôs a teoria de que as substâncias húmicas são formadas por arranjo supraestrutural de pequenas moléculas orgânicas através de forças de interação fraca. Esse modelo também denominado supramolecular define as substâncias húmicas como provenientes de produtos de degradação enzimática de plantas e complexos de ligninas.

A partir desses estudos este autor redefine os constituintes das SH como:

Os ácidos fúlvicos são uma associação de pequenas moléculas hidrofílicas com um quantidade de grupamentos funcionais ácidos suficientemente grande para manter os agrupamentos de ácidos fúlvicos dispersos em

qualquer valor de pH. Os ácidos húmicos, por sua vez, são compostos por associações de material humificado onde predominam compostos hidrofóbicos (cadeias polimetilênicas, ácidos graxos, esteróides), que são estabilizados em pH neutro por forças hidrofílicas dispersivas.

Este modelo é bastante útil para descrever o comportamento ambiental das substâncias húmicas, bem como os efeitos que elas têm sobre o metabolismo das plantas. A interação planta-microrganismos pode alterar a estrutura e a conformação das substâncias húmicas, e pequenas unidades portadoras de bioatividade podem estimular o crescimento e o metabolismo dos organismos (ROSA et al., 2009).

Apesar das contradições existentes nas definições e da dificuldade na obtenção de um modelo estrutural para as SH, diversos conhecimentos foram proporcionados em termos de importância e características dessas substâncias.

Entre as características definidas destacam-se: 1. A polifuncionalidade: apresentam vários grupos funcionais, com diferentes reatividades, capazes de representar uma mistura heterogênea de polímeros que reagem entre si; 2. Carga macromolecular: apresentam caráter aniônico cujos efeitos refletem na reatividade dos grupos funcionais e na conformação molecular; 3. Hidrofilicidade: tendem a formar ligações de hidrogênio com as moléculas de água do meio, solvatando grupos funcionais como COOH e OH; 4. Labilidade estrutural: são capazes de realizar associações intermoleculares e de mudanças conformacionais em resposta a mudanças de pH, condições redox, concentração iônica e ligações químicas (LANDGRAF, 2005).

As características apresentadas confirmam a participação das substâncias húmicas em diversos efeitos benéficos para o solo e para o crescimento vegetal. Para Canellas et al., (1999, p. 45):

Existe uma série muito grande de evidências experimentais que asseguram que as substâncias húmicas (SHs) participam de reações importantes que ocorrem na interface solução-parte sólida do solo, influenciando a fertilidade por meio da liberação de nutrientes, da detoxificação de elementos químicos, na formação de estrutura, ou seja, da melhoria das condições químicas, físicas e biológicas do solo.

2.2.2 Substâncias húmicas e o metabolismo das plantas

As substâncias húmicas podem exercer efeitos diretos ou indiretos sobre as plantas através de mecanismos ainda não muito claros. Os efeitos indiretos estão relacionados com o condicionamento das propriedades físico-químicas do solo enquanto que os efeitos diretos podem ser visualizados por meio da influência no metabolismo das plantas.

Devido à natureza complexa ainda pouco conhecida dessas substâncias grande parte das pesquisas realizadas com SH apontam para a influência dessas sobre o metabolismo das plantas, no entanto, os alvos moleculares primariamente envolvidos nessas respostas não foram ainda elucidados, pois, os resultados dependem da origem das substâncias húmicas, do método de extração, da espécie vegetal e dos diferentes estádios de desenvolvimento da espécie (NARDI et al., 2002; SANTOS; CAMARGO, 1999).

De maneira resumida os efeitos das SH sobre o metabolismo das plantas podem ser resultados dos seguintes processos: Influência positiva no transporte de íons facilitando a absorção (AYUSO, 1996); Aumento da respiração e da velocidade das reações enzimáticas do ciclo de Krebs, resultando na maior produção de ATP; Aumento no conteúdo de clorofila; Aumento na síntese de ácidos nucleicos; Efeitos sobre a síntese protéica; Aumento ou inibição da atividade de várias enzimas (NANNIPIERI et al., 1993).

Estudos realizados com SHs provenientes de diferentes fontes, aplicadas a diversas espécies vegetais têm demonstrado efeito positivo no crescimento vegetal, assim como aumento na absorção de macro e micronutrientes (ESCOBAR et al., 1996; RAUTHAN; SCHNITZER, 1981).

Uma hipótese que conduz a elucidação do incremento da absorção de nutrientes pelas SHs tem sido relacionado ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática graças a ação surfactante e ativação das H⁺-ATPases da membrana plasmática por essas substâncias, principalmente as de baixo peso molecular como os ácidos fulvicos (RAUTHAN & SCHNITZER, 1981). No entanto, essa hipótese é contraposta, pois, apesar dos agentes surfatantes apresentarem superfícies ativas, capazes de aumentar a permeabilidade de membranas biológicas é improvável que o aumento da permeabilidade da membrana plasmática assim como a dissipação do potencial transmembranar pudessem induzir qualquer efeito

benéfico sobre as plantas, já que o controle da permeabilidade está intimamente relacionado à manutenção da seletividade da membrana plasmática, e esta com a manutenção da homeostase celular (CANELLAS, et al., (2005). A perda da seletividade provocaria aumento do fluxo de íons através da membrana provocando à perda do equilíbrio químico da célula assim como da sua funcionalidade.

Apesar da inconsistência dessa hipótese várias pesquisas comprovam que a bioatividade das SHs pode está relacionada com a atividade das H⁺-ATPases da membrana plasmática e do vacúolo .

As H⁺-ATPases (bombas de H⁺) são enzimas transmembranares capazes de hidrolisar ATP, gerando energia e um gradiente eletroquímico que está diretamente envolvido em dois mecanismos fundamentais para o desenvolvimento vegetal que seriam: a) energização de sistemas secundários de translocação de íons fundamentais para a absorção de macro e micronutrientes, e b) aumento da plasticidade da parede celular para possibilitar o processo de crescimento e divisão da célula vegetal (RODDA et al., 2006).

Esse último mecanismo está relacionado com a “teoria do crescimento ácido”, que postula que o aumento da extrusão de prótons mediado pela H⁺-ATPase promove a acidificação do apoplasto, que, por sua vez, ativa enzimas específicas que atuam sobre a parede celular, aumentando sua plasticidade e, conseqüentemente, permitindo o alongamento da célula (RAYLE; CLELAND, 1992).

Nardi et. al. (1991) verificaram aumento na hidrólise de ATP pela H⁺-ATPase da fração microsomal obtida de raízes de milho através da ativação das bombas de H⁺ por substâncias húmicas isoladas de vermicomposto.

Trabalhos realizados com substâncias húmicas de elevado peso molecular como os Ácidos Húmicos (AHs) demonstraram efeito significativo sobre o crescimento radicular de plântulas de milho. Neste mesmo trabalho uma solução de 20 mg. L⁻¹ de AHs promoveu o estímulo na produção de matéria seca, na área superficial e no número de sítios de mitose e de raízes laterais emergidas, quando comparados com o tratamento controle no qual não foram aplicadas as doses dos AHs, sendo possível observar incrementos entre 237 e 395% para a produção de matéria seca radicular, de 89 a 378% para área superficial, de 35 a 162% para o número de sítios de mitose e entre 14 e 108% para o número de raízes emergidas (CANELLAS; FAÇANHA, 2004).

O uso de diferentes doses de SHs extraídas de vermicomposto promoveram o desenvolvimento do sistema radicular de plântulas de alface, observando-se forte estímulo na atividade de hidrólise da H⁺-ATPase de membrana plasmática com o uso de uma dose de 25 mg. L⁻¹ de C (RODDA, et al., 2006).

Atualmente a teoria mais utilizada para justificar a bioatividade das SHs sobre o metabolismo das plantas foi sugerida a partir de trabalhos realizados por Canellas et al., (2002) e comprovados por Quaggiotti et al., (2004, p. 53) que relatam o processo da seguinte forma:

Grupamentos com atividade auxínica, presentes na composição estrutural das SHs, sensibilizariam receptores específicos na membrana plasmática, desencadeando cascatas de sinalização que culminariam com a ativação da transcrição dos genes que codificam para isoformas específicas da H⁺-ATPase de membrana plasmática as quais seriam superexpressas na superfície das células radiculares. O que promove aumento do gradiente eletroquímico de H⁺ através da membrana, ativando os sistemas secundários de transporte de íons e a acidificação e conseqüentemente aumento da plasticidade da parede celular, tais condições dariam suporte à profusão de pêlos radiculares e à indução de raízes laterais.

Pesquisa realizada com AHs isolados de lodo da estação de tratamento de esgoto e de vermicomposto avaliando o efeito da bioatividade dessa substância humica sobre o transporte de prótons através da membrana plasmática de células de raízes de milho e de café evidenciou estímulo da área superficial radicular em ambas as espécies cultivadas com os dois AHs, assim como o estímulo das H⁺-ATPases da membrana plasmática. Nesse trabalho a análise estrutural dos AHs detectou a presença de grupamentos de auxina (FAÇANHA et al., 2002).

A aplicação de diferentes doses de SHs isolados de vermicomposto de suínos e de restos alimentares ao cultivo de tomate e pepino proporcionaram aumento no crescimento de ambas as espécies assim como aumento da área foliar, da parte aérea e peso seco da raiz, sendo este efeito relacionado às doses mais baixas de SHs e a provável presença de hormônio de crescimento adsorvido as SHs avaliadas (ATIYEH et al., 2002).

Estudos conduzidos em sistema hidropônico com a cultura da cevada demonstraram a influencia de substâncias humicas extraídas a partir de resíduos orgânicos de diferentes origens, sobre o crescimento e a absorção de macro e micronutrientes (AYUSO, et al., 1996). O efeito de ambos os grupos de SHs foram similares tanto para o crescimento da planta como para absorção de nutrientes, no entanto, esses efeitos foram diferentes para cada macronutriente (nitrogênio e fósforo) e para os micronutrientes. Para o nitrogênio a absorção foi estimulada a

doses mais baixas o oposto ocorreu para absorção de fósforo. As doses acima de 10 mg de C. L⁻¹ de SHs inibiram a absorção de micronutrientes e provavelmente causaram depressão do crescimento vegetal.

2.2.3 Substâncias húmicas e metabolismo de nitrogênio

O nitrogênio (N) é um dos elementos minerais requeridos em maior quantidade pelas plantas e o que mais limita o crescimento. Ele faz parte de proteínas, ácidos nucléicos e muitos outros importantes constituintes celulares, incluindo membranas e diversos hormônios vegetais (SOUZA; FERNANDES, 2006).

Em muitos sistemas de produção, a disponibilidade de nitrogênio é quase sempre um fator limitante. Sua deficiência resulta em clorose gradual das folhas mais velhas e redução do crescimento da planta (SOUZA; FERNANDES, 2006).

Dada a sua importância e a alta mobilidade no solo, o nitrogênio tem sido intensamente estudado, no sentido de maximizar a eficiência do seu uso. Para tanto, tem-se procurado diminuir as perdas do nitrogênio no solo, bem como melhorar a absorção e a metabolização do N no interior da planta (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000). A eficiência na utilização do N pela planta considera os aspectos de absorção e metabolização deste elemento.

A absorção de N é modulada pela presença dos carregadores específicos; pela afinidade desses carregadores em relação ao nitrato ou amônio e pela quantidade de N presente no solo (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

A principal via para o transporte desse nutriente é um processo ativo que envolve o co-transporte com íons H⁺. Sabe-se também que altas taxas de absorção de nitrato freqüentemente ocorrem paralelamente à elevação dos níveis de expressão da H⁺-ATPase na membrana plasmática e de sua atividade (CANELLAS et al., 2006).

O transporte de NO₃⁻ da rizosfera para o interior celular é termodinamicamente desfavorável em termos de gradiente de potencial elétrico e químico, assim a absorção de nitrato requer energia com uma força próton motriz que é proporcionada por bombas eletrogenicas (H⁺-ATPases) (PALMGREN, et al., 2001)

Várias pesquisas têm confirmado a hipótese que as bombas de prótons da membrana plasmática podem ser um dos principais alvos da ação de substâncias húmicas. O papel dessas substâncias na modulação da absorção de nitrato através de uma interação com as H⁺-ATPase da membrana plasmática, poderiam pelo menos em parte, explicar o efeito dessas moléculas no solo e no metabolismo vegetal (PINTON et al., 1999).

A avaliação dos efeitos de substâncias húmicas de baixo peso molecular tem demonstrado resultados significativos na absorção de nitrato.

Pinton et al. (1999), trabalhando com a influencia das SHs na absorção de NO₃⁻¹ e aumento na expressão das H⁺-ATPase membranares em raízes de milho, observaram que a aplicação dessas substâncias em associação a solução nutritiva para condução das raízes de milho por um período de 24 horas induziram um aumento considerável na expressão da H⁺-ATPase, sendo este efeito observado logo após 4 horas da aplicação do tratamento solução nutritiva com fontes de nitrato + SHs. Tal efeito representou 57% de aumento na expressão da enzima quando comparados aos tratamentos solução nutritiva com nitrato e 135% com solução nutritiva sem nitrato.

Substâncias húmicas isoladas de diferentes fontes foram utilizadas no tratamento de plântulas de cevada. Os resultados obtidos demonstraram que SHs de baixo peso molecular foram responsáveis pelo aumento na absorção de NO₃⁻ em plântulas dessas espécies. A presença de 200 µg de C.L⁻¹ de extrato húmico aumentou em cerca de 30% a absorção desse íon em comparação ao controle, correspondendo a uma absorção de 1,87 nM de NO₃⁻.mg de peso fresco. hora (PICCOLO, et al., 1992).

Estudos recentes conduzidos por Quaggiotti et al. (2004) avaliaram o efeitos das substâncias húmicas de baixo peso molecular sobre raízes de milho e observaram aumento na capacidade de absorção de nitrato associada a um aumento na expressão da H⁺-ATPase da membrana Plasmática.

2.3 Cultura da rúcula (*Eruca sativa*): considerações gerais

A rúcula (*Eruca sativa*) é uma hortaliça folhosa com crescente aumento de produção no Brasil nas últimas décadas, em razão da facilidade de cultivo e aceitação popular (HENZ; MATTOS, 2008).

A origem dessa hortaliça é a região mediterrânea, mas precisamente no sul da Europa, tendo sido introduzida no Brasil pelos imigrantes italianos. Pertence à família das Brassicáceas, a mesma da couve, repolho e brócolis. É uma planta de porte baixo, altura entre 15 e 20 cm, com folhas espessas e subdivididas, geralmente é consumida crua em saladas ou como ingredientes na culinária.

A espécie mais cultivada e consumida no país é a *Eruca sativa* Miller representada principalmente pelas cultivares Folha Larga e Cultivada.

No Brasil é mais cultivada nas regiões de colonização italiana nos estados do Sul e sudeste, devido às condições climáticas existentes nessas localidades, já que, para produção de folhas grandes e tenras são necessárias temperaturas amenas entre 15 a 18 °C para (TRANI et al., 1992).

Pesquisas realizadas nas condições do trópico úmido apontaram para a possibilidade promissora de realizar o cultivo da rúcula em condições climáticas desfavoráveis, como a incidência de altas temperaturas, sendo possível obter plantas com desenvolvimento normal se comparadas aquela produzidas em temperatura amenas (GUSMÃO et al., 2003).

A avaliação das respostas agrônômicas da rúcula a aplicação de diferentes tipos de vermicomposto apresentou diferenças significativas em relação ao controle, sendo recomendada a utilização de quaisquer dos vermicompostos testados como forma de garantir o pleno desenvolvimento da planta (KROLOW et al., 2006).

O ciclo da rúcula e a forma de condução assemelham-se ao da alface e coentro, sendo possível a colheita a partir dos 45 a 50 dias após o plantio. Quando a colheita é realizada mais tardiamente as folhas tendem a ficar fibrosas e impróprias para o consumo (LINHARES, 2007).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo e fonte das substâncias húmicas

O experimento foi conduzido em vasos com capacidade de 2dm³ em condições controladas em casa de vegetação não climatizada, localizada no Núcleo Tecnológico de Engenharia Rural da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), em São Luis, no período de Agosto a Outubro de 2009.

Para as avaliações experimentais foi utilizada uma amostra de aproximadamente 500g de vermicomposto, adquirido em propriedade particular na zona rural de São Luis. A amostra de vermicomposto foi pesada, peneirada e posta para secar ao ar, sendo posteriormente homogeneizada em gral para as determinações do C orgânico, pH em água, macronutrientes e extração das substâncias húmicas. Os teores totais dos macronutrientes foram determinados por digestão sulfúrica e digestão nitroperclórica de acordo com TEDESCO, et al., (1985). A análise química do vermicomposto está apresentada na Tabela 1.

C	N	Na	K	Umidade	pH
-----g. kg ⁻¹ -----					
54,14	32,7	5,5	4,5	27,7	6,1

Tabela 1. Caracterização química do vermicomposto (TEDESCO, et al., 1985).

As plantas foram conduzidas em areia lavada, irrigada a cada três dias com solução nutritiva, intercalando-se a irrigação com água destilada.

Para as avaliações com material fresco foi realizada uma amostragem aos 45 dias após o transplântio para a qual foi colhida a terceira folha de cada planta. Aos 50 dias após o transplântio foi realizada a colheita separando-se parte aérea da raiz. As raízes foram lavadas com água corrente retirando-se o excesso de areia, sendo posteriormente utilizadas para quantificação do volume. Decorrida essa etapa as raízes foram pesadas para obtenção do peso fresco sendo transferidas para sacos de papel e postas para secar em estufa de circulação de ar forçado a 65^o C até atingirem peso constante. Procedimento semelhante foi realizado com a parte aérea coletada, sendo após a secagem realizada a determinação de N-Total.

3.2 Extração das substâncias húmicas

As soluções avaliadas no experimento foram obtidas por meio da extração e fracionamento de substâncias húmicas isoladas a partir de vermicomposto, utilizando-se para tal a metodologia apresentada por Benites, et al., (2003) adaptada da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas.

Inicialmente pesou-se uma amostra de vermicomposto de 0,25g, sendo transferida para tubo de centrífuga com adição de 20 ml de NaOH 0,1 mol. L⁻¹, permanecendo em repouso por um período de 24 horas. Para a separação das substâncias húmicas (Ácido Húmico e Ácido Fúlvico) contidas na solução a amostra foi submetida à centrifugação a 3308 g (4300 rpm) por 45 minutos. A solução sobrenadante foi recolhida e reservada, sendo feita a adição de 20 ml de NaOH 0,1 mol. L⁻¹ à amostra restante ficando em repouso por 1 hora. A solução foi novamente centrifugada a 3308 g (4300 rpm) por 45 minutos e a solução sobrenadante foi adicionada à solução reservada e o precipitado (Fração Humina) foi descartado. A solução reservada teve seu pH ajustado de 13,0 para 1,0 pela adição de H₂SO₄ 20% ficando em repouso por um período de 18 horas. Posteriormente, com o uso de bomba a vácuo, a solução foi filtrada para separação do precipitado (AH) da fração solúvel, (AF), sendo os volumes de cada amostra aferidos com água destilada para 50 ml (Figura 1).



Figura 1. Soluções de AH e AF extraídos de vermicomposto pelo método ácido/base com NaOH 0,1 mol. L⁻¹ e H₂SO₄ 20%.

3.3 Determinação de C orgânico nas substâncias húmicas

Para a determinação quantitativa de C orgânico presentes nas frações AH e AF foi retirada uma alíquota de 0,1 ml da solução (AH/AF) com adição de 1,0 ml de dicromato de potássio 0,042 mol. L⁻¹ e 5 ml de H₂SO₄ concentrado deixando as amostras em bloco digestor a 150°C por 30 min. e posteriormente efetuando-se a titulação com sulfato ferroso amoniacal 0,0125 mol. L⁻¹ com indicador ferroin (BENITES et al., 2003).

3.4 Obtenção das mudas

As mudas utilizadas no experimento foram oriundas de sementes de Rúcula cultivada (*Eruca Sativa*), variedade de folha larga plantadas em bandejas de isopor com 128 células com o substrato plantmax hortaliças. O transplântio das mudas foi feito 15 dias após a semeadura, deixando até quatro mudas por vaso para posterior desbaste permanecendo duas plantas por vaso.

3.5 Solução nutritiva

O preparo e manejo da solução nutritiva foram efetuados conforme recomendação de Furlani et al. (1999), com monitoramento diário da condutividade elétrica (CE).

A análise da solução nutritiva inicial preparada apresentou as seguintes concentrações dos nutrientes em g/36 L da solução:

Solução A (macronutrientes): 2520 g de nitrato de potássio, 864 g de fosfato monopotássico, 2160 g de sulfato de magnésio.

Solução B (micronutrientes): 4536 g de nitrato de cálcio, 3,6 g de sulfato de zinco, 1,8 g de sulfato de cobre, 1,8 g de molibdato de sódio, 18 g de ácido bórico, 10,8 g de sulfato de manganês, 216 g de tenso iron (ferro).

A condutividade da solução nutritiva foi medida com o auxílio de um condutivímetro portátil (Tabela 2). A concentração da solução foi aumentada gradativamente levando-se em consideração o desenvolvimento das plantas e a necessidade nutricional, tomando-se o cuidado para não exceder a concentração adequada para o cultivo da rúcula.

No entanto, entre o 18^o e o 20^o dia após o transplântio das mudas a condutividade elétrica da solução aumentou resultando em estresses hídrico e salino observados pelo encarquilhamento das folhas. Essa situação foi corrigida com irrigação das plantas somente com água destilada, até que a condutividade elétrica da solução nutritiva estive em 1,0 S.m⁻¹.

Dias após o transplântio (DAT)	Condutividade Elétrica da Solução Nutritiva S. m⁻¹
1-13	0,3
13-17	0,8
18-20	2,0
22-32	1,0
32-50	1,5

TABELA 2. Acompanhamento da condutividade elétrica da solução nutritiva aplicada a plantas de rúcula cultivadas em vaso com areia lavada.

3.6 Delineamento experimental e aplicação dos tratamentos

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com dez tratamentos e cinco repetições, dispostos em arranjo fatorial do tipo 2 (AH/AF) x 5 (doses).

As doses dos extratos a serem avaliados foram definidas com base na quantidade de C orgânico presente em cada uma das frações (ácido húmico e ácido fúlvico), sendo distribuídas nos seguintes tratamentos: T0: D1- 0 mg de C.L⁻¹ AH (Controle) ; T1: D2- 50 mg de C.L⁻¹ de AH; T3: D3- 100 mg de C.L⁻¹ AH; T4: D4- 150 mg de C.L⁻¹ AH; T5: D5- 200 mg de C.L⁻¹ AH; T6: D1-0 mg de C.L⁻¹ AF; T7: D2-50 mg de C.L⁻¹; T8: D3- 100 mg de C.L⁻¹ AF; T9: D4- 150 mg de C.L⁻¹ AF; T10: D5- 200 mg de C.L⁻¹ AH.

Foram realizadas três aplicações das substâncias húmicas, aos 10, 20 e 30 dias após o transplântio das mudas. As soluções foram aplicadas diretamente nos vasos preenchidos com areia lavada, sendo os vasos anteriormente fechados com jornal para evitar a perda de nutrientes e das substâncias húmicas.

3.7 Variáveis analisadas

3.7.1 Variáveis relacionadas ao crescimento

- **Massa Seca Parte Aérea (MSPA) e Massa Seca Raiz (MSR)**

Após a colheita realizada aos 50 dias após o transplântio, a parte aérea foi pesada separadamente da raiz, sendo o material posteriormente transferido para sacos de papel de 1 kg e colocado para secar em estufa de circulação de ar forçada a 65° C por três dias. Decorrida esta etapa as folhas e raízes foram novamente pesadas separadamente em balança analítica obtendo-se o peso seco. A massa seca presente foi obtida por meio da diferença entre peso fresco e peso seco.

- **Massa Seca Total (MST)**

Essa variável foi obtida a partir do somatório da massa seca da parte aérea com a massa seca da raiz.

- **Volume de Raiz (VR)**

O volume de raiz foi determinado utilizando uma proveta graduada contendo um volume conhecido de água. Obtendo-se pela diferença entre volume inicial e volume final o volume conhecido da raiz (1ml=1cm³).

- **Densidade**

A densidade foi determinada a partir do cálculo: massa seca da raiz x volume da raiz.

- **Relação Raiz:Parte Aérea**

Esta relação foi determinada a partir do cálculo: massa seca da raiz/massa seca da parte aérea.

3.7.2 Fracionamento de nitrogênio

- **Atividade da enzima Nitrato Redutase (NR)**

A atividade da enzima nitrato redutase (NR) foi medida aos 45 dias após o transplântio, através da concentração de NO₂ (µmols/g de peso fresco por hora) presente nas folhas de acordo com a metodologia proposta por Javrosky, (1973). Para esta análise foi coletada a terceira folha de cada planta existente no vaso, sendo posteriormente pesado e colocado 0,2 g de folha em meio de incubação com

n-propanol 2% e KNO_3 0,02M por 30 minutos em banho-maria a 30°C. Seguida da adição da solução de Sulfanilamida 1% em HCL 0,02% e *N*-naftil-etileno-di-amino 0,02% por 20 minutos. Posteriormente foi realizada leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda igual a 540nm contra curva de NaNO_3 .

- **Extração Alcoólica**

Para as determinações analíticas do material fresco foi realizada a extração alcoólica. Para tal pesou-se 1g de amostra fresca (3ª folha) transferido posteriormente para recipiente plástico contendo 30 ml de etanol 80% acondicionado em geladeira a 05°C para extração com clorofórmio.

Para o preparo dos extratos as amostras em etanol foram homogeneizadas e trituradas com auxílio de um triturador elétrico. Este material foi passado em quatro camadas de gaze e em filtros de papel até obtenção de um líquido esverdeado que foi transferido posteriormente para funil de vidro com adição de 30 ml de clorofórmio. Este material foi deixado em repouso por 40 min. até completa separação da fase polar e apolar, sendo descartada a fase apolar e recolhida a fase polar (Figura 1). À fase polar, contendo as frações de nitrogênio a serem avaliadas, foi adicionado um volume de 25 ml de etanol 80% sendo acondicionada em recipiente plástico colocado em geladeira até a hora das determinações.

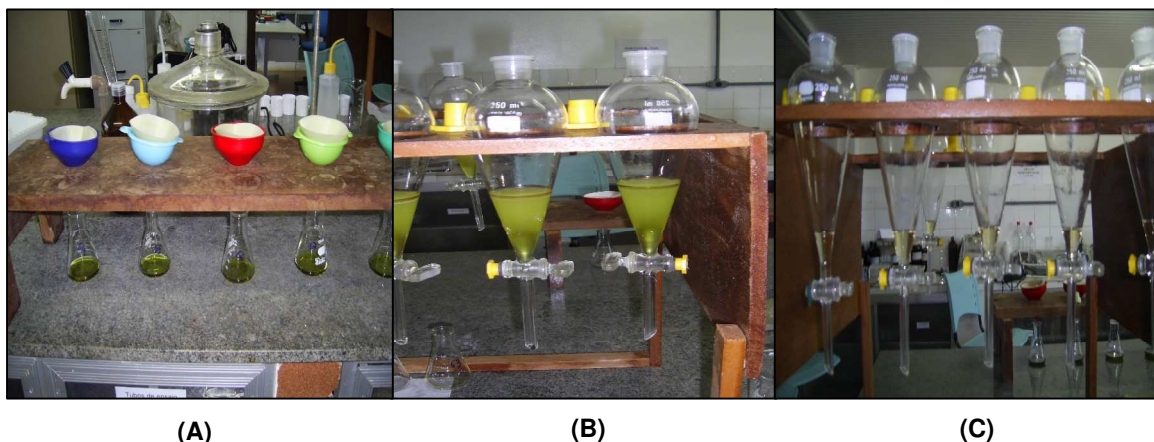


Figura 2. Preparo do extrato alcoólico para determinação das frações de nitrogênio. **(A)** – Filtragem do material fresco; **(B)** Separação da parte polar e apolar do filtrado com clorofórmio; **(C)** Fração apolar utilizada para o fracionamento de nitrogênio.

- **N-Total (Método Kjeldahl)**

Para a análise de N-total as folhas foram trituradas em moinho tipo Willey para passar em peneira de 40 mesh e submetidas à Digestão Sulfúrica e posterior titulação com ácido sulfúrico 0,05N e indicador de ácido bórico. Esta análise foi realizada com o uso de destilador de nitrogênio pelo método de Kjeldåhl.

- **N-Protéico**

A quantidade de N-protéico foi determinada com o material restante na gaze após o procedimento de extração alcoólica. Este material foi posto a secar ao ar livre, separado da gaze, pesado e digerido em ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio (Digestão Sulfúrica). Após esta etapa a amostra foi submetida à análise de N-Protéico pelo método Kjeldåhl. Os dados foram expressos em g.Kg^{-1} .

- **Determinação de Nitrato (N-NO_3^+)**

Esta determinação foi realizada de acordo com o método colorimétrico proposto por Cataldo et al., (1975). Para a determinação das concentrações de nitrato foi utilizada uma alíquota de 0,05 ml do extrato alcoólico. Esta alíquota foi transferida para tubos de ensaio com adição de 0,2 ml de solução de ácido salicílico 5% em H_2SO_4 concentrado. Decorridos 20 min. da adição do ácido foram acrescentados 4,75 ml de NaOH 2N. Posteriormente foi efetuada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 410 nm contra a curva padrão de KNO_3 .

- **Determinação de Amônio (N-NH_4^+)**

Para esta determinação foi utilizado o método colorimétrico apresentado por Mitchell, (1972). As concentrações de amônio foram determinadas utilizando uma alíquota de 0,5 ml dos extratos alcoólico, com adição de 2,5 ml da Solução A (Fenol + Nitroprussiato de sódio) e 2,5 ml da Solução B (NaOH + Dicloroisocianurato de sódio). Após a adição das soluções as amostras foram agitadas manualmente e decorridos 30 min. foi efetuada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 630nm contra curva padrão de NH_4Cl .

- **Determinação de N-Amino livre**

A determinação desta variável foi realizada pelo método da Ninidrina proposto por Yem e Cocking (1955). As concentrações de N-amino livre foram determinadas a partir de uma alíquota de 0,5 ml do extrato alcoólico transferidos para tubo de ensaio com adição de mais 0,5 ml do Tampão Citrato 0,2M pH 5,0. Aos tubos foram adicionados 1,2 ml do reagente Metil Celossolve + KCN + Ninidrina, sendo fechados com papel alumínio e agitados manualmente. Posteriormente os

tubos foram transferidos para banho Maria submetidos ao aquecimento a uma temperatura de 100°C por 15 minutos. Retirados do aquecimento as amostras foram esfriadas em água corrente por 5 min., sendo acrescentados aos tubos mais 3ml de etanol 60%. As amostras foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570nm contra curva padrão de l-Leucina.

3.8 Análises estatísticas

A normalidade dos dados foi testada com os testes Kolmogorov-Smirnov e Lilliefors. Os dados rejeitados foram transformados por logaritmo natural, se encontrada a normalidade os dados foram submetidos a análise de variância e ao teste de Tukey ($p > 0,05$). Para os dados não normais foi realizada a análise não paramétrica pelo teste Kruskal-wallis.

A análise dos dados foi realizada com o uso do programa STATISTICA 7. (StatSoft). Posteriormente os dados foram transferidos para o programa SigmaPlot 11.0 para construção dos gráficos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeitos da aplicação das Substâncias Húmicas (AH/AF)

4.1.1 Efeitos nas variáveis de crescimento.

Nem todas as variáveis de crescimento analisadas nesse trabalho foram afetadas pela aplicação das SHs. Os ácidos húmico e fúlvico expressaram um comportamento diferente para cada variável analisada.

- **Massa Seca da parte aérea e raiz.**

A massa seca da parte aérea não foi afetada pela presença das SHs. As diferenças observadas para esta variável não foram significativas (Figura 3).

Esse resultado assemelha-se ao encontrado por Gonçalves et al., (2004) cultivando alface em solução nutritiva com adição de substâncias húmicas extraídas de diferentes tipos de vermicomposto. A presença das substâncias húmicas não resultou em diferenças significativas no peso fresco e peso seco das plantas. No entanto, a dose aplicada corresponde a 15 mg de C. L⁻¹ para todas as SHs testadas.

Silva (2001) observou que a aplicação de 30 mg de C. L⁻¹ de ácidos húmicos aumentou a produção de matéria seca da parte aérea da alface cultivada em sistema hidropônico.

De acordo com AYUSO, et al., (1996) a resposta da parte aérea a aplicação das SHs depende não somente da presença dessas substâncias na solução nutritiva, mas de outras variáveis, tais como a espécie vegetal, a variedade da planta, a matéria-prima utilizada para extrair as substâncias húmicas, a origem dessas substâncias, dos grupos funcionais presentes nas substâncias húmicas, a reatividade desses grupos.

No presente trabalho o fato da massa seca da parte aérea não ter sido influenciada pela presença das substâncias húmicas pode estar relacionado a problemas de salinidade e estresse hídrico observados a partir do 18º dia após o transplante (Figura 4) evidenciados pelos altos valores de condutividade elétrica observados neste período.

Nesse período a CE foi medida obtendo-se um valor de 2,0 dS.m⁻¹, valor considerado alto para o estágio de desenvolvimento da planta. De acordo com Furlani et al., (1999) em cultivos de rúcula esse valor deve ser mantido na faixa entre

1 e 1,2 dS.m⁻¹ na fase inicial de crescimento e entre 1,4 e 1,6 dS m⁻¹, na fase de produção, para favorecer o crescimento da parte aérea.

Observa-se que quanto maior a quantidade de sais na solução, tanto maior será a restrição à absorção de água pelas raízes e, portanto, de nutrientes.

Tanto a deficiência hídrica como a nutrição mineral insuficiente ou uma provisão desbalanceada provocam uma diminuição no rendimento da produção. O crescimento da folha é limitado mais cedo e de forma mais intensa que as trocas de CO₂ sob crescente deficiência hídrica e, sobretudo, sob crescente deficiência mineral (LARCHER, 2006).

Silva, et al. (2008) avaliaram as respostas de diferentes variáveis de crescimento em plantas de rúcula sob condições salinas e diferentes tipos de adubos orgânicos. Os resultados obtidos demonstraram que a salinidade foi o fator responsável pelo decréscimo da massa seca da parte aérea. No entanto, a adubação com o esterco bovino foi capaz de diminuir as perdas provocadas pelo estresse salino.

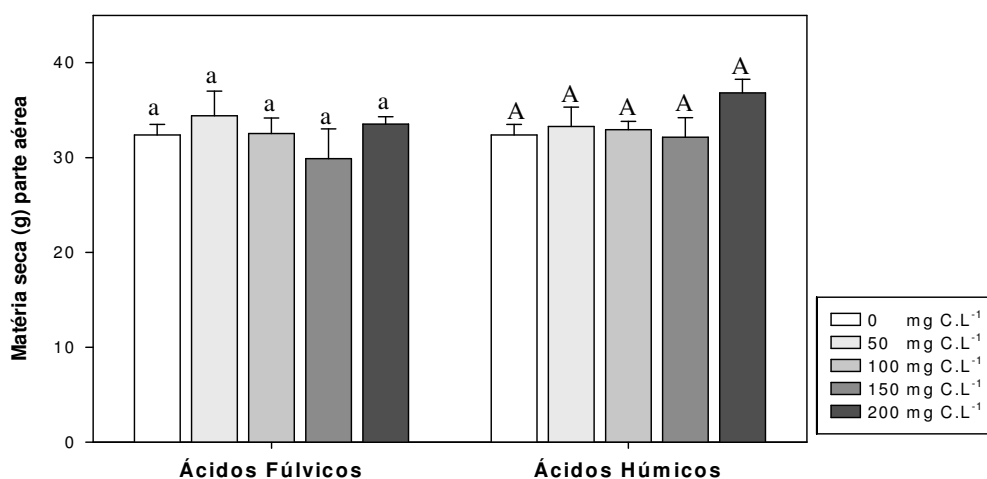


Figura 3. Massa seca da parte aérea (g.vaso⁻¹) (média ± erro padrão) em plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF. Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P>0,05). Letras minúsculas foram atribuídas para comparação entre as doses de AF e as maiúsculas para as doses dos AH.



Figura 4. Plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e adição de AH/AF. (A) e (B) Folhas apresentando encarquilhamento do limbo provocados por estresse salino e hídrico.

O acúmulo diferenciado da massa seca de raiz foi observado com a aplicação do AF, não ocorrendo o mesmo para o AH no qual as doses aumentaram o acúmulo da massa seca da raiz, mas não diferiram entre si quando submetidas ao teste de Tukey ($P > 0,05$) (Figura 5).

Em relação ao AF, o maior acúmulo foi verificado com a aplicação de 100 mg de C.L⁻¹ que resultou na produção de 5,51 g de massa seca de raiz por vaso, diferindo significativamente das demais doses e do controle. Observa-se que as doses mais altas 150 e 200 mg de C. L⁻¹ provocaram a diminuição da massa seca de raiz (Figura 5).

Observações semelhantes podem ser vistas no trabalho de Silva et al., (2001) com o cultivo de alface em solução hidropônica com adição de diferentes doses de SHs extraídas de turfa. O autor verificou a diferença significativa para o acúmulo de massa seca de raiz proporcionada pela aplicação da dose 30 mg de C. L⁻¹. Essa dose proporcionou um aumento na massa seca da raiz de até 171,5% em relação ao controle.

De acordo com os resultados obtidos por esse autor a variação na produção de massa seca da raiz depende da SH e da dose utilizada. Após certa dose específica para cada espécie e para cada variedade as substâncias húmicas presentes na solução apresentam uma carga de grupamentos carboxílicos e hidroxilas fenólicas superior à dos nutrientes presentes na solução nutritiva, tornando os nutrientes menos disponíveis das raízes, inibindo o desenvolvimento das mesmas. (SILVA, et al. 2001).

O crescimento verificado nas raízes quando da adição de substâncias húmicas está relacionado com a ativação das H⁺-ATPases da membrana plasmática por possíveis grupamentos de atividade auxínica presentes na estrutura das substâncias húmicas e disponíveis a solução dos solo por meio de uma variação no pH da rizosfera. As H⁺-ATPases mediam o aumento na extrusão de prótons, promovem a acidificação do apoplasto, ativam enzimas específicas sobre a parede celulósica, aumentam a plasticidade desta e promovem o alongamento da célula permitindo o crescimento de raízes laterais (CANELLAS; FAÇANHA, 2004).

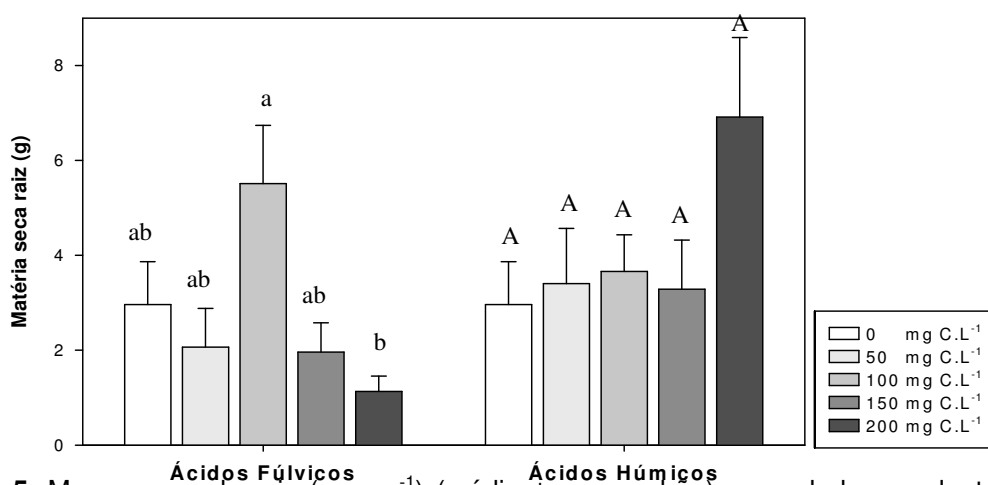


Figura 5. Massa seca de raiz (g.vaso⁻¹) (média ± erro padrão) acumulada em plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF. Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P>0,05). Letras minúsculas foram atribuídas para comparação entre as doses de AF e as maiúsculas para as doses dos AH.

• Massa Seca Total

O acúmulo de massa seca total não foi influenciado pela presença das substâncias húmicas. A comparação entre as médias não apresentaram diferenças significativas para ambos os ácidos (Figura 6). No entanto, observa-se que a presença dos ácidos nas diferentes doses não resultou em diminuição do acúmulo de massa seca total.

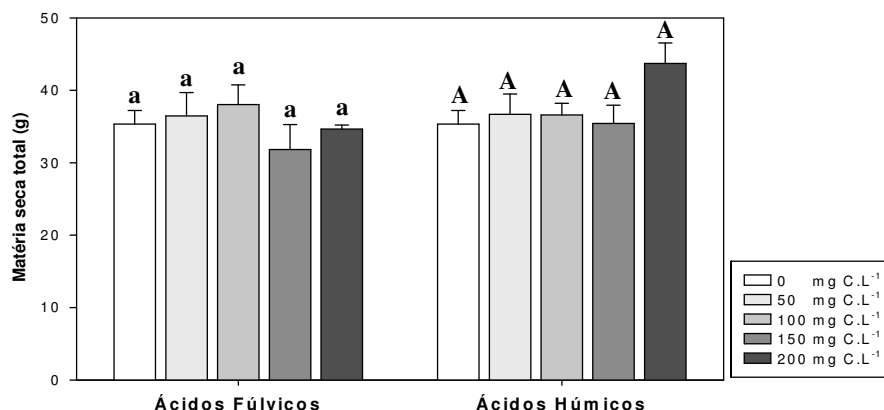


Figura 6. Massa seca total (g) (média \pm erro padrão) acumulada em plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF. Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). Letras minúsculas foram atribuídas para comparação entre as doses de AF e as maiúsculas para as doses dos AH.

• Relação raiz/parte aérea

A relação raiz/parte aérea foi influenciada somente pelas doses do AF. Verificou-se que na dose 100 mg de C.L⁻¹ esta relação foi mais alta em comparação às demais doses e ao controle. As demais doses aumentaram essa relação mais, não o suficiente para diferir do controle. A aplicação da dose 200 mg de C. L⁻¹ reduziu a relação raiz/parte aérea, quando comparada às outras doses. Provavelmente em função da redução da massa da raiz (Figura 7).

Como o objetivo do cultivo da rúcula é a comercialização das folhas o resultado de uma alta razão raiz/parte aérea acarretará em prejuízos produtivos, pois verifica-se dessa forma que a planta está investindo mais no sistema radicular do que na parte aérea. Nesse trabalho o melhor comportamento das substâncias húmicas para essa variável, foi observado na aplicação do AF na dose 200 mg de C. L⁻¹ e do AH, apesar de não haver diferenças significativas, nas doses 50, 100 e 200 mg de C. L⁻¹, no entanto, é necessário observar o efeito dessas doses sobre as demais variáveis de crescimento e sobre o metabolismo do nitrogênio.

É possível que o efeito do estresse hídrico e salino, citados anteriormente tenham contribuído para aumento dessa razão, observado pelo comportamento do AF na dose 100 mg de C. L⁻¹.

De forma geral o estresse causa desordem no aparato estrutural e na coordenação de vários processos ao nível molecular, celular e ao organismo. A

retomada da estabilização e as reações reparadoras exigem um custo adicional de metabólitos. O aumento da resistência necessária à sobrevivência em condições desfavoráveis representa frequentemente também um aumento no custo de produção de biomassa e crescimento (LARCHER, 2006).

A alta relação raiz:parte aérea observada no experimento (Figura 7) pode está relacionada com a ação do ácido abscísico em resposta ao stress hídrico, que acarretou o enrolamento das folhas, menor acúmulo de massa seca na parte aérea e maior massa seca na raiz (Figura 4) .

Mesmo em situações de estresse moderado, como o observado neste trabalho, é possível o desencadeamento da síntese de ácido abscísico (ABA), a partir dos carotenóides da raiz. Esse ácido é transportado da raiz para diferentes partes da planta induzindo uma diversidade de efeitos. Nas folhas, o ABA induz o fechamento estomático. A relação em termos de crescimento entre a parte aérea e raiz é alterada (LARCHER, 2006).

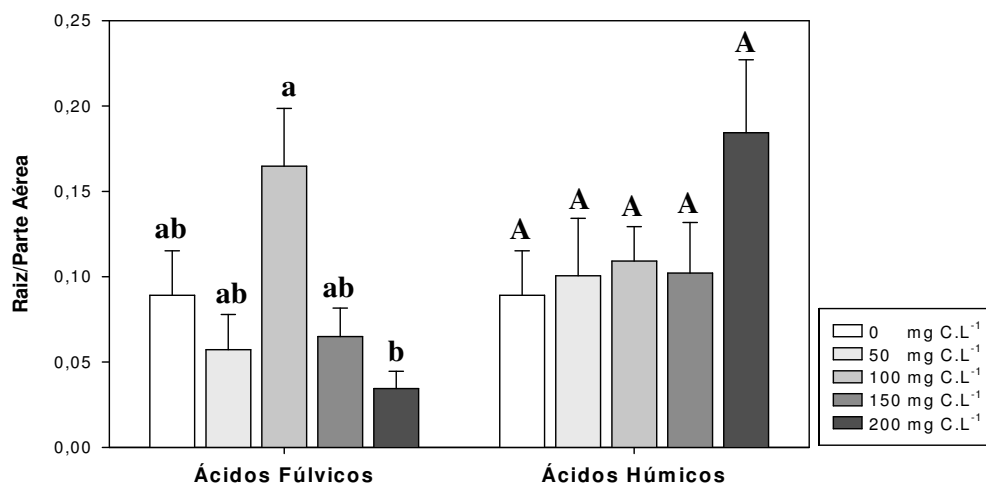


Figura 7. Relação raiz/parte aérea (média \pm erro padrão) em plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF. Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). Letras minúsculas foram atribuídas para comparação entre as doses de AF e as maiúsculas para as doses dos AH.

- **Volume de raiz**

O volume de raiz não foi afetado pela presença das substâncias húmicas. Na presença de AF o volume das raízes teve um aumento pouco expressivo se comparado ao controle. A dose 200 mg de C.L⁻¹ de AF proporcionou um volume de raízes semelhantes a dose 0 mg de C.L⁻¹ (Figura 8). As doses de AH não apresentaram diferenças para essa variável.

Na literatura tem sido verificado o efeito das substâncias húmicas de baixo peso molecular (AF) no crescimento e desenvolvimento de raízes laterais de várias espécies. No entanto, os resultados obtidos estão relacionados à aplicação de doses abaixo de 50 mg de C. L⁻¹ (NARDI, et al., 2000).

Rodda, (2003) pesquisando o efeito de humatos de diferentes fontes de vermicomposto em mudas de alface observou que a dose de 25 mg de C.L⁻¹ de humatos extraídos de vermicomposto de esterco de curral foi responsável pelo maior incremento na área e comprimento radicular. À medida que as concentrações das doses de humatos se elevam os incrementos e estímulos decaem, pois elevadas concentrações de humatos reduzem o crescimento e a hidrólise de ATP das raízes.

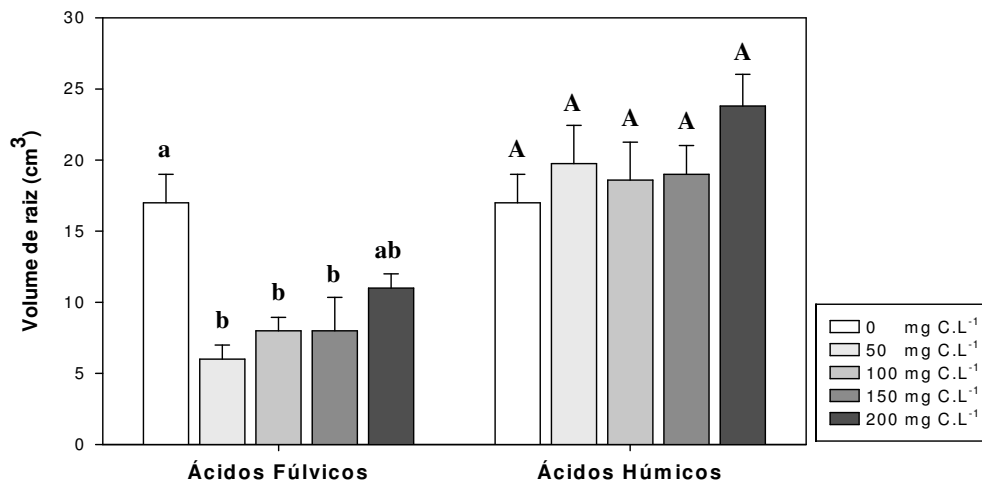


Figura 8. Volume de raiz (cm³) (média ± erro padrão) de plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF. Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P>0,05). Letras minúsculas foram atribuídas para comparação entre as doses de AF e as maiúsculas para as doses dos AH.

• Densidade de raiz

Observa-se que o AF proporcionou aumento na densidade radicular, não sendo observado o mesmo efeito para o AH. Apesar de ter sido verificado aumento na densidade das raízes na presença de AH, o efeito entre doses não demonstrou diferenças quando submetido ao teste de Tukey ($P>0,05$) (Figura 9).

A aplicação do AF na dose 100 mg de $C.L^{-1}$ foi responsável pela maior densidade quando comparada as demais doses, incluindo o controle. As raízes tratadas com a dose 200 mg de $C.L^{-1}$ de AF apresentaram a menor densidade em comparação as demais doses.

Essa hipótese pode ser confirmada por resultados encontrados na literatura de que doses crescentes de substâncias húmicas tendem a diminuir os incrementos proporcionados pelas doses mais baixas. RODDA, et al., (2006), avaliou o efeito de diferentes doses de humatos extraídos de esterco de curral sob o desenvolvimento e metabolismo de ATP em plântulas de alface. Os resultados obtidos demonstraram que houve um incremento na massa fresca e seca da raiz bem como na área e no comprimento radicular com o uso de humato na dose de 25 mg de $C.L^{-1}$, sendo observado também nessa concentração aumento significativo na hidrólise de ATP pelas bombas de H^+ responsáveis pela geração de energia necessária à absorção de íons e pelo crescimento celular.

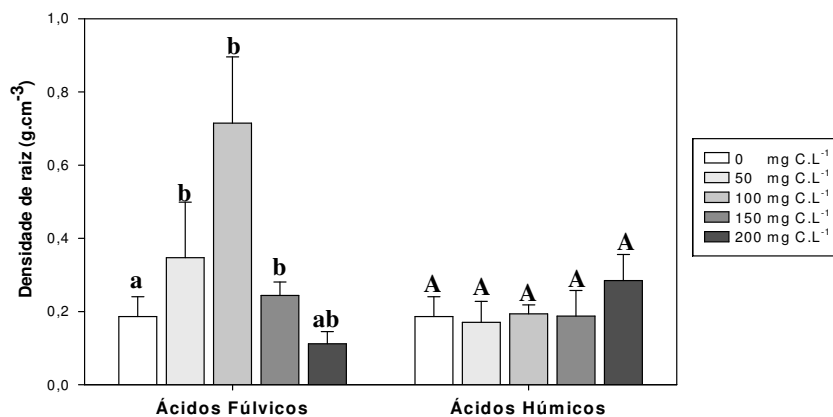


Figura 9. Densidade de raiz ($g.cm^{-3}$) (média \pm erro padrão) de plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF. Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P>0,05$). Letras minúsculas foram atribuídas para comparação entre as doses de AF e as maiúsculas para as doses dos AH.

4.1.2 Efeitos no metabolismo do nitrogênio

• Nitrato Redutase (NR)

A atividade da enzima nitrato redutase foi influenciada pelas doses de AF, exceto a dose de 200 mg de C.L⁻¹. As doses do AH não afetaram a atividade enzimática (Figura 10).

Diferentes pesquisas relatam o efeito das SHs sobre muitas enzimas tanto para a ativação como para inibição destas (VAUGAN e ORDE, 1980 apud CANELLAS, 2005). No entanto, as informações não reportam o efeito específico sobre a ativação ou inibição da nitrato redutase, mas sim sobre o NO₃⁻. Portanto, é possível que o efeito proporcionado pelas SHs sobre a atividade da NR seja um efeito indireto provocado pelo aumento na absorção de NO₃⁻ pela ação das SHs, já que esta enzima é passível de indução pelo substrato (NO₃⁻).

Pelos resultados obtidos neste trabalho é possível observar que na presença das diferentes doses de AF ocorreu maior atividade da NR quando comparada ao controle. Entretanto, não foi observado acúmulo de N-NO₃ nas folhas, pois os teores ficaram abaixo do limite a ser detectado pelo método utilizado.

Lima (2008) observou que raízes de manjeriço tratadas com duas doses de AH foram responsáveis por proporcionar aumento na atividade da NR, proporcionando ainda maiores teores de NH₄⁺.

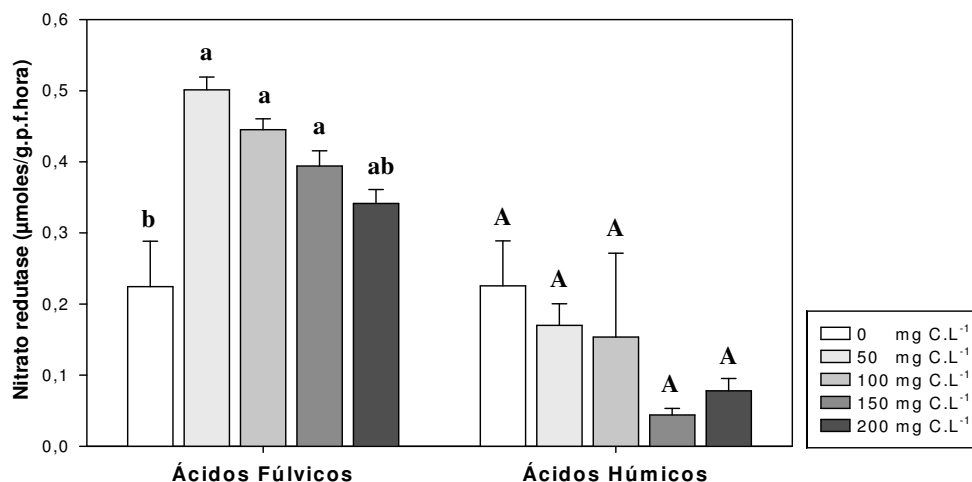


Figura 10. Atividade enzimática da Nitrato Redutase ($\mu\text{moles/g.p.f.hora}$) (média \pm erro padrão) na parte aérea de plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF. Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P>0,05$). Letras minúsculas foram atribuídas para comparação entre as doses de AF e as maiúsculas para as doses dos AH.

- **N-NO₃**

Não foi observado efeito das SHs sobre o acúmulo de nitrato na parte aérea das plantas de rúcula.

Esses resultados diferem daqueles observados por Quaggiotti et al., (2004) que ao avaliarem o efeito das substâncias húmicas de baixo peso molecular sobre raízes de milho obtiveram aumento na capacidade de absorção do nitrato. Esse aumento pode ser atribuído a elevação na extrusão de prótons das células de raízes estimulado pelas substâncias húmicas que por sua vez facilita a absorção de N-NO₃ via cotransporte com H⁺. (NARDI, et al., 2000).

- **N-Amônio**

A quantidade de N-NH₄ presente nas plantas de rúcula foi afetada pela presença das SHs nas diferentes doses aplicadas no cultivo. A presença de AF nas doses 50, 100, 150 e 200 mg de C. L⁻¹ proporcionou um decréscimo nas quantidades de N-NH₄. Enquanto que as doses de AH mantiveram quantidades de N-NH₄ semelhante ao controle, com exceção da dose 200 mg de C. L⁻¹ que provocou decréscimo dessa quantidade (Figura 11).

A baixa quantidade de amônio observada nos tratamentos com AF indica que as plantas incorporaram o N-NH₄ em aminoácidos e em proteínas, uma vez que os níveis de aminoácidos livres foram reduzidos e os teores de N-protéico foram elevados (Figuras 12 e 14). É provável que essas substâncias tenham estimulado as demais rotas do metabolismo de N, tais como o sistema GS-GOGAT (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

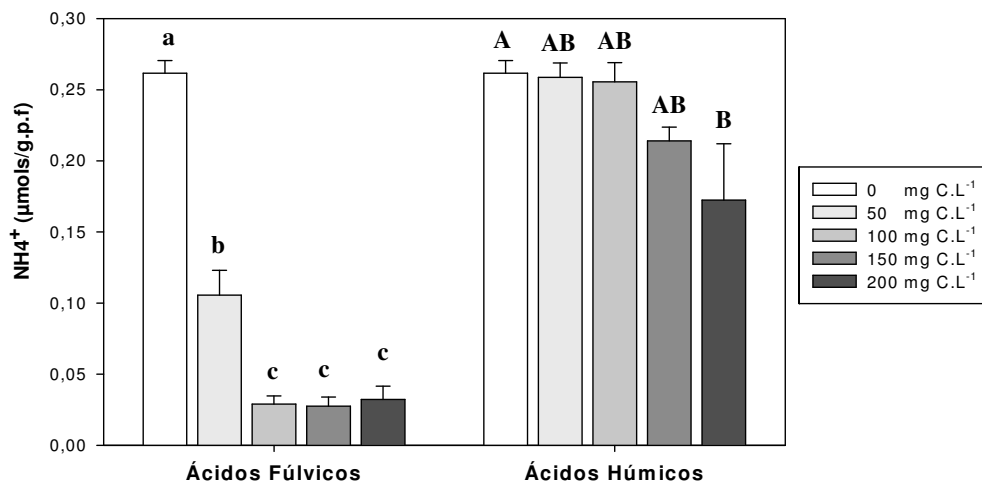


Figura 11. Concentração de N-NH₄⁺ (μmols/g.p.f) (média ± erro padrão) na parte aérea de plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF. Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P>0,05). Letras minúsculas foram atribuídas para comparação entre as doses de AF e as maiúsculas para as doses dos AH.

• N-Amino

O efeito das SHs sobre essa variável pode ser observado apenas nas doses do AF. A presença de AH não produziu efeito sobre a quantidade de N-amino livre existente na parte aérea das plantas.

Quando comparadas as doses de AF é possível observar que a presença desse ácido foi responsável pelo decréscimo de N-amino livre, não importando a dose aplicada (Figura 12).

As quantidades de N-amino e N-protéico provavelmente foram influenciados pelas SHs dada ativação do sistema metabólico GS-GOGAT que a partir da assimilação do amônio diminuiu a quantidade de aminoácidos livres e elevou os teores de N-protéico.

Essa hipótese pode ser confirmada pela correlação observada entre a quantidade de Amônio (μmols/g.p.f) e a quantidade de N-amino (mmols /g. p. f) encontradas na parte aérea das plantas de rúcula. (Figura 13)

Teores de N-amino elevados, normalmente, indicam situação de estresse nutricional ou ambiental para as plantas, entretanto nesse experimento observou-se decréscimo de aminoácidos livres com a aplicação das doses de AF. Observa-se

portanto, que os AF podem ter contribuído para reduzir o estresse salino hídrico observados no 18º dia após o transplante.

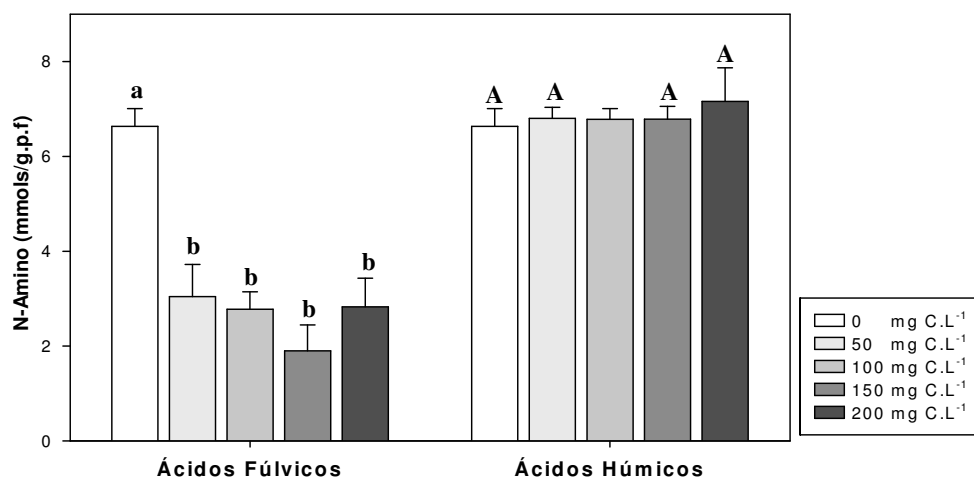


Figura 12. Concentração de N-Amino (mmols/g.p.f) (média \pm erro padrão) na parte aérea de plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF. Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). Letras minúsculas foram atribuídas para comparação entre as doses de AF e as maiúsculas para as doses dos AH.

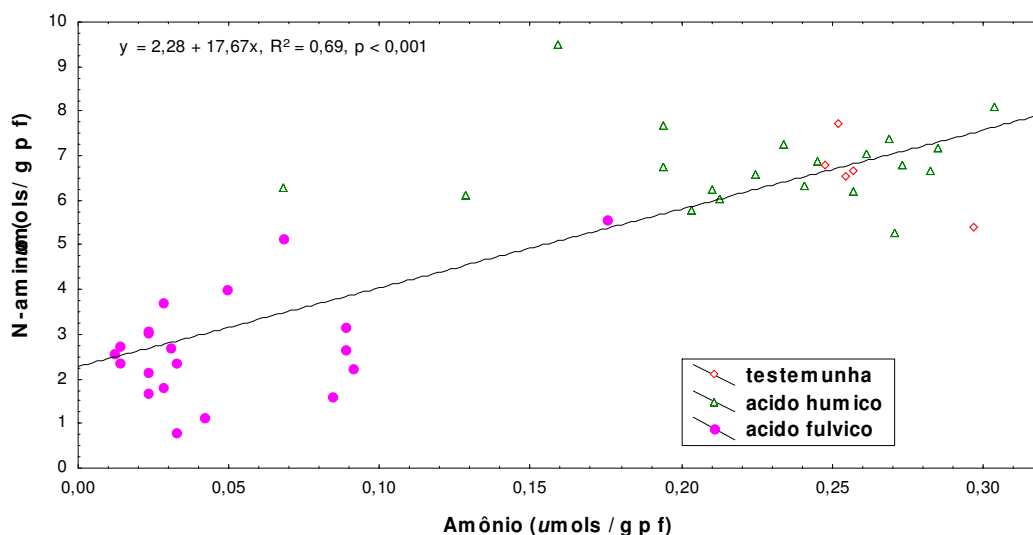


Figura. 13. Corelação N-amino ($\mu\text{mols/g.p.f}$) e Amônio ($\mu\text{mols/g.p.f}$) avaliadas na parte aérea de plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF.

• N-protéico

No N-protéico ambos os ácidos não apresentaram efeitos significativos. Sendo que o AF nas doses 150 e 200 mg de C.L⁻¹ proporcionou aumento dessa variável, mas não a ponto de diferir das demais doses (Figura 14).

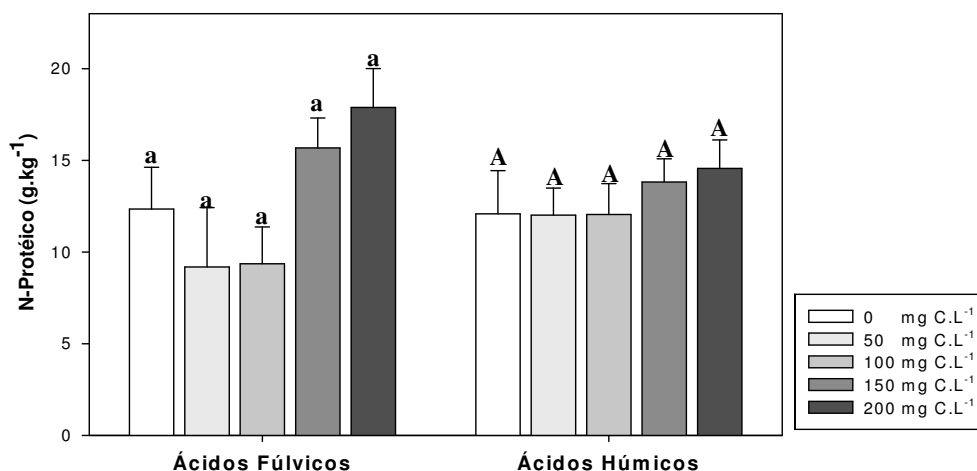


Figura 14. Quantidade de N-protéico (g.Kg⁻¹) (média ± erro padrão) presente na parte aérea de plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF. Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P>0,05). Letras minúsculas foram atribuídas para comparação entre as doses de AF e as maiúsculas para as doses dos AH.

• N-total

As SHs apresentaram comportamento diferente em relação aos teores de N-total presentes na parte aérea da rúcula. A dose 100 mg de C.L⁻¹ de AF apresentou o maior teor de N-total em comparação às demais doses, mas não ao ponto de diferir do controle e das doses 50 e 150 mg de C.L⁻¹. Sendo a dose 200 mg de C.L⁻¹ de AF responsável por um decréscimo na quantidade de N-total. O AH, no entanto, não produziu efeito sobre essa variável (Figura 16).

Neste trabalho observa-se que a presença do AH/AF apesar de não ter influenciado o aumento de N-total na parte aérea das plantas, não contribuíram para o decréscimo dessa variável quando comparado ao controle com exceção da dose 200 mg de C. L⁻¹ que proporcionou o decréscimo desse nutriente em relação ao controle.

O fato das SHs contribuírem para o aumento da quantidade de nitrogênio na parte aérea da planta pode ser atribuído a formação de complexos com a amônia, reduzindo a perda de N por volatilização. Como as SHs interferem na absorção do Fe pelas plantas, ocorre à ligação dos complexos de Fe ao plasmalema seguida pela quebra dos complexos, e a absorção do Fe permitindo maior concentração desse elemento nas folhas o que contribui para a síntese de clorofila e para um maior teor de N nos tecidos vegetais (SILVA, 2001).

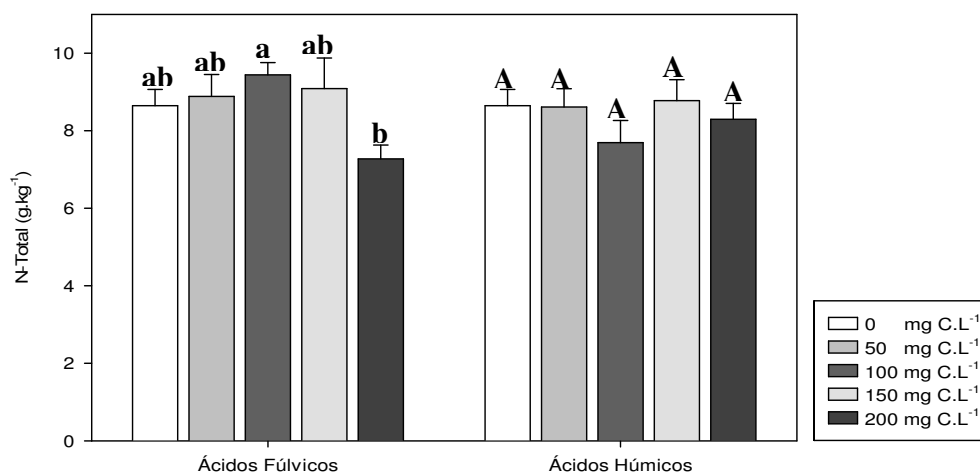


Figura 15. Quantidade de N-total (g.Kg^{-1}) (média \pm erro padrão) presente na parte aérea de plantas de rúcula cultivadas em areia lavada com solução nutritiva e aplicação de diferentes doses de AH/AF. Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). Letras minúsculas foram atribuídas para comparação entre as doses de AF e as maiúsculas para as doses dos AH.

CONCLUSÃO

As substâncias húmicas avaliadas neste trabalho em especial o Ácido Fúlvico contribuíram para melhorar o crescimento radicular das plantas de rúcula (*Eruca sativa*). Influenciaram o metabolismo de nitrogênio no aumento da atividade da enzima nitrato redutase e por meio da redução de aminoácidos livres. Além de diminuir o efeito do estresse salino e hídrico proporcionados por alta condutividade elétrica da solução nutritiva.

Tais efeitos sugerem um melhor aproveitamento do nitrogênio pela planta e possivelmente propiciam um melhor desenvolvimento vegetal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATIYEH , R.M.; LEE S.; EDWARDS, C.A.; ARANCON, N.Q.; METZGEJ. D. R.; The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. **Bioresource Technology**. v. 84. pp: 7–14, 2002.

AYUSO, M.; HERNÁNDEZ, T.; GARCIA, C. PASCUAL, J. A. Stimulation of barley growth and nutrient absorption by humic substances originating from various organic materials. **Bioresource Technology**, 1996.

BREDEMEIER, C; MUNDSTOCK, M.C. Regulação da absorção e assimilação de nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**. Santa Maria. v. 30. nº 2. pp. 365-372. 2000.

BENITES, V. M.; MADÁRI, B.; MACHADO, P. L. O. A. Extração e fracionamento quantitativo de substâncias húmicas do solo: um procedimento simplificado de baixo custo. **Embrapa solos. Comunicado Técnico**, n.16, Rio de Janeiro, 2003.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; FAÇANHA, A. L. O.; FAÇANHA, A.R.; Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPases activity in maize roots. **Plant Physiology**, v. 130. pp: 1951-1957. 2002.

CANELLAS, L.P.; ZANDONADI, D. B.; OLIVARES, F. L.; FAÇANHA, A. R. Efeitos fisiológicos de substâncias húmicas: o estímulo às H⁺-ATPases. In: FERNANDES, M. S. pp 175 – 200. In: **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 2006.

CANELLAS, L.P.; ZANDONADI, D. B.; MÉDICE, L. O.; PERES, L. E. P.; OLIVARES, F. L.; FAÇANHA, A. R. Bioatividade de substâncias húmicas: ação sobre o desenvolvimento e metabolismo das plantas. pp:220-263. In: CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. A. **Humosfera: Tratador preliminar sobre a química das substâncias húmicas**.. Campos dos Goytacases. 2005.

CANELLAS, L.P.; SANTOS, G. A.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B. Reações da matéria orgânica. In: SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. (Ed) In: **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. pp 69-86. Porto Alegre: Gênese, 1999.

CANELLAS, L. P.; FAÇANHA, A. R. Relationship between natures of soil humified fractions and their bioactivity. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira** n. 39: 233-240, 2004.

CASTILHOS, R. M.V.; DICK, D. P.; CASTILHOS, D. D.; MORSELLI, T. B. A. G.; COSTA, P. F. P.; CASAGRANDE, W. B.; ROSA, C. M. Distribuição e caracterização de substâncias húmicas em vermicompostos de origem animal e vegetal. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n.32, p.2669-2675, 2007.

CRASWELL, E.T; LEFROY, R.D.B. The role and function of organic matter in tropical soils. In: MARTIUS, C.; TIESEN, H.; VLEK, P. L. G (Eds). In: **Managing Organic Matter in Tropical Soils: Scope and Limitations**. Kluwer Academic Publishers. pp: 7-18. USA: Kluwer Academic Publishers. 2001. 235 p.

CATALDO, D. A.; MAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, n. 6, p 71-80, 1975.

ESCOBAR, R. Fernandez.; BENLLOCH, M.; BARRANCO, D.; DUEÑAS, A.; GAÑÁN, J. A. G. Response of olive trees to folk application of humic substances extracted from leonardite. **Scientia Horticulturae**, n 66, p 61-200, 1996.

ESPINOZA. Quality of soil organic mater under different management pratices in a tropical acid soil. **Revista de la Facultad de Agroomía**. Caracas n. 21 v.2. 2004.

FAÇANHA, A. R.; FAÇANHA, A. L. O.; OLIVARES, F. L.; GURIDI, F.; SANTOS, G. A.; VELLOSO, A. C. X.; RUMJANEK, V. M.; BRASIL, F. ; SCHRIPSEMA, J.; FILHO, R. B.; OLIVEIRA, M. A.; CANELLAS, L.P. Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira, Brasília**. v. 37, n. 9, p. 1301-1310. 2002.

FURLANI, P. R. **Cultivo hidropônico de plantas**. Campinas: Instituto Agronômico, 1999.

GLIESMAN, R. Stephen. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**. 3. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005.

GONÇALVES, C. M.; COSTA, P. F. P.; CASTILHOS, R. M. V.; MORSELLI, T. B. G. A.; SANTOS, D. C.; FRANCO, A. M. P. **Produção de alface em solução nutritiva com adição de substâncias húmicas de vermicompostos**. 2004. Disponível em: < [http:// www.ufpel.edu.br/cic/2004/arquivos/CA_01020.rtf](http://www.ufpel.edu.br/cic/2004/arquivos/CA_01020.rtf)>. Acesso em: 15 Out. 2009.

GUSMÃO, S. A. L.; LOPES, P. R. A.; SILVESTRE, W. V. D.; OLIVEIRA, N. C. F.O.; PEGADO, D. S.; SILVA, C. L. P.; SANTOS, L. F. S.; FERREIRA, S. G. Cultivo de rúcula nas condições do trópico úmido em Belém. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.21, n.2, jul. 2003. Suplemento. CD-ROM. (Trabalho apresentado no 43º CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 2003).

HARRIS, G. D. et al. Vermicomposting in a rural community. **Biocycle**. v. 10, n.2, p. 48-51, 1990.

HAYES, B. H. M. Humic substances: considerations of compositions, aspects of structure, and environmental influences. **Soil Science**. v. 166, n.1. p. 723-737, 2001.

HENZ, Gilmar P.; MATTOS, L. M. Manuseio pós-colheita de rúcula. **Comunicado Técnico**, n. 64. Embrapa, Brasília, 2008.

JAVROSKY, E. G. Nitrate Reductase Assay in intact plant tissues. **Biochemical Biophysical Research Communications**, 43. p. 1274-1279. 1973.

KROLOW, I. FILHO, L. O.; SILVEIRA, G.; MORSELLI, T.; TEIXEIRA, C.; VITORIA, D. Resposta da rúcula em ambiente protegido submetida a diferentes adubos orgânicos. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v. 1. n. 1. 2006.

LANDGRAF, Diva Maria; MESSIAS, Amorim Rossine; REZENDE, Oliveira Olímpia Maria. **A importância ambiental da vermicompostagem: vantagens e aplicações**. São Carlos: Rima, 2005.

LANDGRAF, D. M.; ALVES, R. M.; SILVA, S. C.; REZENDE, M. O. Caracterização de ácidos húmicos de vermicompostos de esterco compostado durante 3 e 6 meses. **Química Nova**. v. 22, n 04, 1999. p. 483 a 486.

LARCHER, W. O Balanço de Carbono nas plantas. In: **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos. Rima. 2006. 530 p.

LINHARES, F. C. P. **Produção de rúcula em função de diferentes quantidades e tempos de decomposição de jitrana**. (Dissertação Mestrado). Mossoró. 2007.]

LIMA, W. L. **Metabolismo do nitrogênio e atividade de Bombas de Prótons em Raízes Transgênicas com Ácido Húmico e Simbiose Micorrízica Arbuscular**. (Tese Doutorado). UFRRJ. Rio de Janeiro. 2008.

MACCARTHY, P. The principles of humic substances. **Soil Science**, v. 166, n. 11, p. 738- 751, 2001.

MACHADO, Pedro Luiz Oliveira de Almeida. **Manejo da matéria orgânica de solos tropicais**. Embrapa Solos. Rio de Janeiro, n.24, 2001.

MARCHIORI JR, M.; MELO, J. W. Alterações na matéria orgânica e na biomassa microbiana em solo de mata natural submetido a diferentes manejos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n 6, p. 1177-1182, 1999.

MENDONÇA, E. S.; SILVA, I. R. Matéria orgânica do solo. p. 275- 374. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L (Ed). **Fertilidade do solo**. Viçosa: SBCS, 2007.

MITCHELL, H. T. Microdetermination of nitrogen in plant tissue. **Journal of Association Official Agriculture**, Gaithersburg, v. 55, p. 1-3, 1972.

NANNIPIERI, P.; GRECO, S.; DELL'AGNOLA, G.; NARDI, S. **Proprietá biochimiche e fisiologiche della sostanza orgânica**. In: NANNIPIERI, P.; (ed): Ciclo della sostanza organica nel suolo: aspecti agronomici, chimici, ecologici & selvicolturali. Bologna: Patron.p.67-78. 1993.

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, V. A..Physiological effects of humic substances on higher plants. **Soil Biology & Biochemistry**, 2002.

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; GESSA, G.; FERRARESE, L.; TRAINOTTI, L; CASADORO, G. A low molecular weight humic fraction on nitrate uptake and protein synthesis in maize seedlings. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 32, p. 415-419. 2000.

NARDI, S.; CONCHERI, G. ; DELL' AGNOLA, G. Release of the hormone-like activities form activity in oat seedilings in the presence of two humic fractions. **Soil Biology and Biochemistry**, n 23, p 833-836,1991.

OLIVEIRA, E. M.; SANTOS, M. J. Influência das minhocas sobre as características químicas de composto, vermicomposto e solo. **Engenharia Ambiental**. Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 1, p. 074-081, 2009.

PALMGREN, M.G. Plant plasma membrane H⁺-ATPases: Powerhouses for nutrition uptake. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.52, p.817-845, 2001.

PICOLLO, A. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. **Advances in Agronomy** v. 75, p.57-134, 2002.

PICOLLO, A; NARDI, S.; CONCHERI, G. Structural Characteristics of humic substances as related to nitrate uptake and growth regulation in plant systems. **Soil Biology and Biochemistry** v. 24. n.04. p. 373-380. 1992

PILLON, Clênio Nailton. **Manejo da matéria orgânica em agroecossistemas**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005.

PINTON, R.; CESCO, S.; IACOLETTIG, G.; ASTOLFI, S.; VARANINI, Z. Modulation of NO₂ uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane HCATPase. **Plant and Soil**. 1999.

QUAGGIOTTI, S.; RUPERTI, B.; PIZZEGHELLO, D.; FRANCIOSO, O.; TUGNOLI, V.; NARDI, S. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Experimental Botany**. v. 55, 2004.

RAUEN, G. T. Tensoatividade de ácidos húmicos de procedências distintas. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 909-913, 2002.

RAUTHAN, B. S., SCHNITZER, M. Effects of a soil fulvic acid on the growth and nutrient content of cucumber (*Cucumis sativus*) plants. **Plant and Soil**. v. 63. p. 491-495. 1981.

RAYLE, D. L.; CLELAND, R. E. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. **Plant Physiology** v 99, p 1271-1274,1992.

RODDA, Maria Rita Cardoso. **Caracterização e avaliação do uso agrícola de humatos de vermicomposto**. (Dissertação Mestrado). Serópedica: RJ. 2003. 60 p.

RODDA, M. R. C.; CANELLAS, L.P.; FAÇANHA, A. R.; ZANDONADI, D. B.; GUERRA, J. G. M.; ALMEIDA, D. L.; SANTOS, G. A. Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto. I - Efeito da concentração. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, 2006.

ROSA, C. M.; CASTILHOS, R. M. V.; VAHL, L.C.; CASTILHOS, D. D.; PINTO, L. F. S.; OLIVEIRA, E.S.; LEAL, O. A. Efeito de substâncias húmicas na cinética de absorção de potássio, crescimento de plantas e concentração de nutrientes em *Phaseolus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 33. p. 959-967, 2009.

SANTOS, R. H. S.; SILVA, F.; CASALI, V. W. D.; CONDE, A. R. Efeito residual da adubação com composto orgânico sobre o crescimento e produção de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 36. n. 11. p. 1395-1398. 2001.

SILVA, J.; SILVA, P. S. L.; OLIVEIRA, M.; SILVA, K. M. B. Efeito de esterco bovino sobre os rendimentos de espigas verdes e de grãos de milho. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.326-331. 2004.

SILVA, V. I. M.; FILHO, S. V. A. Importância das substâncias húmicas para a agricultura. 2002. Disponível em: <<http://www.emepa.org.br/anais/volume2/av209.pdf>>. Acesso em: 8 Set. 2008.

SILVA, R. M. **Produção e qualidade da alface hidropônica cultivada com adição de substâncias húmicas.** (Tese Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2001. 186 p.

SILVA, M. K. J. Efeito da salinidade e adubos orgânicos no desenvolvimento da rúcula. **Revista Caatinga**. Mossoró - RN: UFERSA. vol. 21. n 5. p. 30-35. 2008.

SIQUEIRA, S. D. H. **Substâncias húmicas do solo e alelopatia de leguminosas arbóreas na germinação e no crescimento do milho (*Zea mays* L.).** Dissertação (Mestrado em Agroecologia) – Universidade Estadual do Maranhão, 2008. Curso em Agroecologia, UEMA, 2008.

SOUSA, L. M. Influência da aplicação de diferentes vermicompostos na biomassa microbiana do solo após cultivo de alface. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 4, p. 429-434, 2006.

SOUZA, R. S.; FERNANDES, S. M. Nitrogênio. pp 215.-252. In: FERNANDES, M. S (Ed). **Nutrição Mineral de Plantas**. SBCS, Viçosa, 2006. 432 p.

STEVENSON, F.J. **Humus chemistry: genesis, composition, reactions.** New York: John Wiley. 1994.

TEDESCO, M. J. **Análise de solo, plantas e outros materiais.** 2. ed. n. 5. Porto Alegre: Departamento de Solos, UFRGS. Boletim Técnico nº5. 1985.

TRANI, P. E.; FORNASIER, J. B.; LISBÃO, R. S. Cultura da rúcula. **Boletim técnico do Instituto Agrônomo**. Campinas, Instituto Agrônomo, n. 146, 1992.

YEM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino acids with ninhydrin. **Analist**, London, v. 80, p. 209-213, 1955.

YURI, J. E.; RESENDE, G. M.; RODRIGES, Jr. J. C. MOTA, J. H.; SOUZA, R. J. Efeito de composto orgânico sobre a produção e características comerciais de alface americana. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.1, p. 127-130, 2004.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.