

ACÚMULO DE COMPOSTOS NITROGENADOS E ATIVIDADE DA REDUTASE DO NITRATO EM ALFACE PRODUZIDA SOB DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO¹

Juliana Domingues Lima², Wilson da Silva Moraes³, Sílvia Helena Modenese Gorla da Silva²,
Fernanda Nunes Ibrahim², Antônio Carlos da Silva Júnior²

ABSTRACT

ACCUMULATION OF NITROGEN COMPOUNDS AND NITRATE REDUCTASE ACTIVITY IN LETTUCE CULTIVATED IN DIFFERENT CROPPING SYSTEMS

Nitrate content determination is important for food quality evaluation, since nitrate when ingested is reduced the nitrite, which can generate harmful compounds to the human organism. Therefore, this research had as objective to study the accumulation of nitrogen compounds and nitrate reductase activity in lettuce cultivar 'Vera' grown under different cropping systems, in Registro, São Paulo State, Brazil. Sap samples of the xylem, stems, and roots were collected for quantification of nitrogen compounds and reductase activity *in vivo*. The nitrate concentration in the xylem sap, the nitrate and amino acids contents, and the nitrate reductase activity were more expressive in plants cultivated under hydroponic solution, followed by the conventional system, and last, by the organic system. The highest nitrate and amino acids levels were found in the stems, for the three cropping systems. The nitrate reductase activity in roots is higher than in leaves. The nitrate content, independently of the cropping system, varied from 24.32 mg kg⁻¹ to 800.06 mg kg⁻¹ of fresh weight in the different parts of the plant. However, it does not exceed the maximum limits recommended by literature.

KEY-WORDS: Vegetables; nitrite; quality; nitrogen metabolism.

RESUMO

O teor de nitrato é um importante índice da qualidade dos alimentos, pois o nitrato, quando ingerido, é reduzido a nitrito, o qual pode gerar compostos prejudiciais ao organismo humano. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo estudar o acúmulo de compostos nitrogenados e a atividade da enzima reductase do nitrato em alface cultivar 'Vera', produzida no município de Registro-SP, em diferentes sistemas de cultivo. Foram coletadas amostras da seiva do xilema, da parte aérea e da raiz das plantas para quantificação de compostos nitrogenados e atividade da reductase do nitrato *in vivo*. A concentração de nitrato na seiva do xilema, os teores de nitrato e aminoácidos, bem como a atividade da reductase do nitrato, foram mais expressivos em plantas cultivadas em hidroponia, seguida das cultivadas no sistema convencional e, por último, do orgânico. Os maiores teores de nitrato e aminoácidos foram observados no caule, nos três sistemas de cultivo. A atividade da reductase do nitrato da raiz é superior à da folha. O teor de nitrato, independentemente do sistema de cultivo, variou de 24,32 mg kg⁻¹ a 800,06 mg kg⁻¹ de matéria fresca (MF), nas diferentes partes da planta, não excedendo, contudo, os limites máximos recomendados pela literatura.

PALAVRAS-CHAVE: Hortaliça; nitrito; qualidade; metabolismo do nitrogênio.

INTRODUÇÃO

A concentração de nitrato é um importante índice da qualidade dos alimentos (Mantovani et al. 2005). Quando ingerido pelo homem, o nitrato sofre ação microbiana na saliva e é reduzido a nitrito, o qual reage com aminas, produzindo compostos nitrosos como as nitrosaminas, que são potencialmente carcinogênicas (Cassens 1997). Em crianças, o nitrito pode provocar a metemoglobinemia, doença que causa o impedimento do transporte de oxigênio dos alvéolos

pulmonares para os tecidos, o que pode levar à morte (Wolff & Wasserman 1972, Swann 1975).

Os vegetais são a principal fonte de nitrato e nitrito na dieta humana (Amr & Hadidi 2001). Vários estudos têm sido feitos na tentativa de identificar fatores que determinam o acúmulo de nitrato em vegetais, tais como tipo, forma e quantidade de fertilizante nitrogenado (Elia et al. 1998); estação de cultivo (Walters 1991); e fatores ambientais como luz, temperatura, umidade e estrutura do solo, bem

1. Trabalho recebido em jun./2007 e aceito para publicação em set./2008 (nº registro: PAT 3325).

2. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp), Campus Experimental de Registro.

E-mails: judlima@registro.unesp.br; silvia@registro.unesp.br; feldinunes@registro.unesp.br; tomsilvajr@registro.unesp.br

3. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento, Regional Vale do Ribeira.

Av. Wild José de Souza, n.454, Centro. CEP 11.900-000 - Registro, SP. E-mail: wilson@apta.sp.gov.br

como agentes de proteção de plantas (Takebe et al. 1995, Biemond et al. 1996, Grevsen & Kaack 1996).

A alface (*Lactuca sativa* L.), que é a hortaliça folhosa mais consumida no país, utilizada normalmente *in natura* (Faquin et al. 1996), possui grande predisposição ao acúmulo de nitrato, quando comparada a outras hortaliças (Corré & Breimer 1979). Por outro lado, apresenta grande resposta à adubação nitrogenada (Kiehl 1985, Smith & Hadley 1989). Assim, devido ao fato de o nitrogênio influenciar positivamente na produção da alface, o seu uso é, na maioria das vezes, excessivo e pode acarretar efeitos negativos na qualidade química da alface.

No processo de redução e assimilação do nitrato em plantas, a redutase do nitrato (NR, EC 1.6.6.1) é a primeira e mais importante enzima deste processo. Sua atividade depende, principalmente, da luz e do contínuo suprimento de nitrato, através do xilema (Kawachi et al. 2002). Evidências sugerem que é a principal enzima que limita a assimilação do nitrogênio em muitas plantas (Lea et al. 1997), e que é regulada em nível de transcrição ou pós-tradução, tornando-se um marcador potencial do nível de nitrogênio interno da planta, por refletir o regime de nitrogênio a ela imposto (Genenger et al. 2003). Torna-se então, um alvo interessante para estudos que visem ao aumento da eficiência da adubação nitrogenada e à prevenção do acúmulo do nitrato.

O presente trabalho teve como objetivo estudar o acúmulo de compostos nitrogenados e a atividade da enzima redutase do nitrato, em alface produzida em Registro (SP), sob diferentes sistemas de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no município de Registro, SP (24°29'22"S, 47°50'10"W e 11,99 m de altitude), em três propriedades rurais. Foram avaliados três diferentes sistemas de cultivo de alface: convencional, orgânico e hidropônico. Em todos os cultivos foi utilizada a cultivar Vera (Sakata).

No sistema orgânico, a adubação foi feita com uma mistura de casca de arroz carbonizada, bokashi, esterco de galinha e termofosfato Yoorin. No sistema convencional, foram aplicados 60 kg ha⁻¹ de N e, no sistema hidropônico – NFT (técnica do filme de nutrientes), a concentração inicial de N na solução nutritiva foi de 14 mmol (22% na forma amoniacal e 78% na forma nítrica).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três tratamentos (sistemas de cultivo) e cinco repetições (plantas). O experimento foi repetido três vezes (triplicata), sendo cada um realizado em três dias consecutivos. No primeiro experimento, as amostragens foram assim realizadas: no primeiro dia, sistema convencional; no segundo, sistema orgânico; e, no terceiro, sistema hidropônico. No segundo experimento, a seqüência de coleta nos três respectivos dias foi: sistema orgânico, sistema convencional e sistema hidropônico. No terceiro, a seqüência de coleta nos sistema foi: hidropônico, orgânico e convencional.

As coletas foram realizadas no período de janeiro a fevereiro de 2007, em dias com alta luminosidade. Para tal, às 11:00 horas, plantas em ponto de colheita nos três sistemas de cultivo, com bom suprimento de água, foram decapitadas, próximo ao colo, com estilete. Em seguida, a região do corte foi lavada com água destilada, seca com papel absorvente, sendo a seiva do xilema coletada ininterruptamente por 30 min., por meio de um capilar de vidro, e guardada em frascos mantidos no gelo. Após o corte, a parte aérea das referidas plantas foi lavada com água corrente, acondicionada em saco plástico e mantida em caixa de isopor com gelo. Após a coleta da seiva do xilema, as raízes foram processadas da mesma maneira, assim como outras plantas, para a determinação da matéria fresca e seca. Todo o material coletado foi imediatamente transportado ao laboratório (Campus de Registro, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Unesp).

No laboratório, a seiva do xilema foi guardada em freezer a -20°C. Parte das raízes, caules e folhas foi utilizada para determinação de nitrato e aminoácidos totais. Outra parte, para a determinação da matéria fresca e seca, respectivamente, após a pesagem do material coletado e a pesagem do material seco em estufa, a 70°C.

Para as determinações feitas em tecido foliar, as folhas foram separadas, em função da idade do tecido, em folha velha, considerada a primeira folha produzida pela planta, ou seja, a mais externa, localizada na base da planta e sem sinal de senescência; e folha nova, a última folha completamente expandida. Na seqüência, estas foram seccionadas, separando-se a nervura mediana e o limbo foliar.

Para a extração de nitrato e aminoácidos totais, amostras de raízes, caules e folhas foram maceradas

em almofariz, na presença MCA (metanol: clorofórmio: água) 12:5:3 (v/v) (Bielecki & Turner 1966). Em seguida, foram feitas três extrações, intercaladas por centrifugações de 20 min., a 4.000 x g, sendo os sobrenadantes de cada uma das centrifugações reunidos. Para cada 4,0 mL do sobrenadante, adicionou-se 1,0 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água deionizada. Após intensa agitação, fez-se a centrifugação da mistura, a 2.000 x g, por 10 min., para acelerar a separação das fases. A fase hidro-alcoólica foi removida e submetida a banho-maria, a 40°C, durante duas horas, para a completa eliminação do resíduo de clorofórmio, e o volume final determinado em proveta.

A determinação da concentração de aminoácidos livres totais seguiu o método proposto por Yemm & Cocking (1955), usando como padrão leucina, e a determinação do nitrato, o método proposto por Cataldo et al. (1975).

A determinação da atividade da redutase do nitrato *in vivo* foi realizada segundo a metodologia descrita por Jaworski (1971), com pequenas modificações. Essa determinação foi iniciada sempre às 14h30min., a partir da coleta de discos foliares do limbo foliar da última folha, completamente expandida, e seções da porção mediana das raízes, que foram infiltradas com 2,0 mL de meio de incubação, contendo 0,1 M tampão de fosfato de potássio pH 7,5 e 1% de propanol (v/v). A incubação foi conduzida a 30°C, por uma hora, no escuro. Foram retiradas alíquotas do meio de incubação, sendo a reação enzimática paralisada pela adição de sulfanilamida 1% em HCl 3 N e 1,0 mL de naftil-etileno-diamino 0,02% e agitação. Após cinco minutos de repouso, foi feita a filtragem, seguida da leitura de absorbância, a 540 nm, para a determinação da concentração de nitrito. A atividade da enzima foi expressa em mmoles de $\text{NO}_2^- \text{g}^{-1}$ de matéria fresca, por hora.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância, sendo a diferença significativa entre tratamentos determinada pelo teste F. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A matéria seca total das plantas cultivadas em sistema hidropônico e convencional não diferiram entre si e foram superiores às obtidas para plantas

cultivadas no sistema orgânico (Tabela 1), apresentando a mesma tendência da matéria fresca total. Apesar disso, não houve diferenças no número de folhas entre plantas cultivadas nos três sistemas de cultivo avaliados.

Plantas cultivadas em sistema hidropônico apresentaram maior acúmulo de matéria fresca no limbo foliar e, concomitantemente, menor acúmulo de matéria fresca nas nervuras e caule, quando comparadas com plantas cultivadas nos sistemas orgânico e convencional, que não diferiram entre si (Figura 1). O menor investimento em caule e nervuras pode ser uma consequência da maior disponibilidade de água e nutrientes no sistema hidropônico, se comparado com os demais sistemas de cultivo.

Independentemente da parte da planta que foi analisada, houve sempre maior acúmulo de nitrato no sistema hidropônico, seguido do sistema convencional e, por último, do sistema orgânico (Figura 2a). Ou seja, a tendência de acúmulo foi proporcional à disponibilidade de nitrato nos sistemas de cultivo, conforme também verificaram Beninni et al. (2002).

Em hidroponia, as soluções usadas são ricas em nitrato, na forma prontamente disponível e em condições favoráveis à absorção pelas raízes. No sistema convencional, é possível utilizar as duas fontes de nitrogênio, a amoniacal e a nítrica, havendo sempre a tendência da forma amoniacal se transformar na forma nítrica, com o decorrer do tempo, após a adubação, pela ação das bactérias nitrificantes. Já no sistema orgânico, o produtor tende a usar fertilizantes de origem orgânica, que, em geral, possuem maior disponibilidade de nitrogênio na forma amoniacal. Assim, os teores de nitrato nos produtos hidropônicos tendem a ser superiores aos observados em plantas cultivadas noutros sistemas, primeiramente pelo uso em maior quantidade e, em segundo lugar,

Tabela 1. Matéria fresca total, matéria seca total e número de folhas de plantas de alface cv. Vera, em função dos sistemas de cultivo, no ciclo primavera/verão (Registro, SP).

Sistemas de cultivo	Matéria fresca total g planta ⁻¹	Matéria seca total g planta ⁻¹	Número de folhas
Orgânico	216,45 ^{b1}	8,27 ^b	15,06 ^a
Convencional	301,18 ^a	12,63 ^a	16,75 ^a
Hidropônico	369,45 ^a	14,36 ^a	18,03 ^a
CV (%)	11,26	9,74	16,74

¹- Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

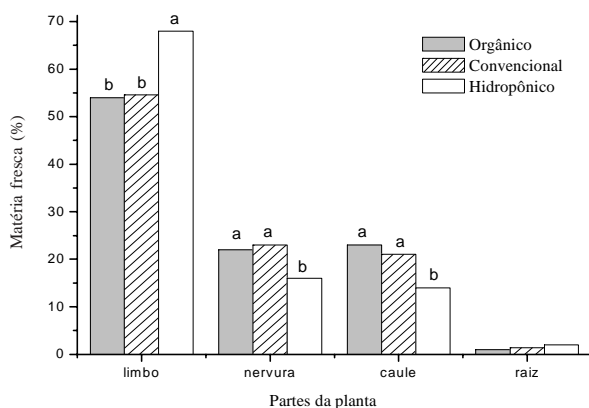


Figura 1. Matéria fresca alocada nas diferentes partes da planta de alface cv. Vera, em função dos sistemas de cultivo, no ciclo primavera/verão, em Registro, SP (médias seguidas da mesma letra, para cada parte da planta, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade).

pela maior disponibilidade desse nutriente no sistema de cultivo. Mondin (1996) observou o contrário, trabalhando com as cultivares de alface Lucy Brow, Tainá, Elisa, Verônica e Marisa.

Houve maior acúmulo de nitrato nos tecidos do caule, seguido da raiz e do limbo foliar, provavelmente por fluxo de nitrato para outros sítios de redução (Figura 2a). O maior acúmulo no caule, que normalmente não é órgão de consumo, seguido pela raiz, provavelmente se deve ao fato de o caule e a raiz serem órgãos de fluxo de nitrato, por meio do xilema, para sítios de redução. Segundo Santamaria et al. (1999), os órgãos da planta de maior acúmulo são pecíolo, seguido de folha e, posteriormente, caule, diferentemente do observado neste trabalho, onde, depois do caule, a seqüência decrescente de acúmulo foi raiz, nervura e limbo foliar.

Por outro lado, Pavlou et al. (2007) obtiveram resultados similares à presente pesquisa, ou seja, teores bem mais baixos de nitrato, em folhas de alface cultivadas com fertilizantes orgânicos, que variaram de 253-435 mg kg⁻¹ de matéria fresca (MF), comparativamente a plantas cultivadas com fertilizantes inorgânicos, que variaram de 572-664 mg kg⁻¹ MF. A influência do sistema de cultivo na acumulação do nitrato nas folhas também foi verificada por Beninni et al. (2002). Além do papel nutricional, outro benefício do acúmulo do nitrato no tecido é a manutenção da turgescência celular (Blom-Zandstra & Lampe 1985), pela sua atuação como regulador osmótico.

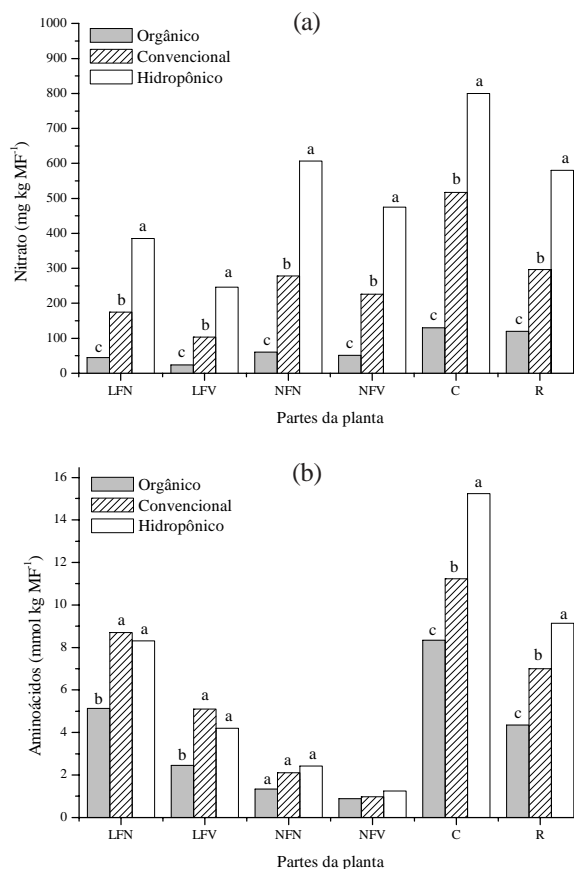


Figura 2. Teor nitrato (a) e aminoácidos livres totais (b), em diferentes partes da planta de alface cv. Vera, em função dos sistemas de cultivo, no ciclo primavera/verão, em Registro, SP (LNF, limbo foliar de folha nova; LFV, limbo foliar de folha velha; NFN, nervura mediana de folha nova; NFV, nervura mediana de folha velha; C, caule; R, raiz). Médias seguidas da mesma letra para cada parte da planta não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

O fato de as plantas cultivadas em hidroponia apresentaram menor matéria fresca acumulada no caule e nas nervuras (Figura 1) pode ter contribuído para o maior acúmulo de nitrato nestas partes da planta, como efeito de concentração (Figura 2a). Esse fato, entretanto, não explica o maior acúmulo de nitrato nas raízes das plantas sob o mesmo sistema de cultivo.

O teor de nitrato variou de 24,32 mg kg⁻¹ MF a 800,06 mg kg⁻¹ MF, independentemente do sistema de cultivo e/ ou parte da planta, para os diferentes sistemas de cultivo (Figura 2a). Contudo, não excedeu os limites estabelecidos pela Comunidade Européia, de 3.500 mg kg⁻¹ MF a 4.500 mg kg⁻¹ MF, para vegetais em cultivo protegido, especialmente alface

(Shoroeder & Bero 2001). Segundo estes autores, o limite para o cultivo em campo aberto é de 2.500 mg kg⁻¹.

O método de quantificação de nitrato utilizado no presente trabalho, segundo as informações de Mantovani et al. (2005), tende a superestimar o teor real, relativamente a outros métodos de quantificação. Porém, esse método apresenta baixo coeficiente de variação, o que indica maior precisão. Sendo assim, considera-se que os valores obtidos neste estudo são, de fato, ainda mais baixos que os limites máximos estabelecidos na literatura, o que indica boa qualidade da hortaliça produzida nos três sistemas de cultivo.

Os valores mínimos e máximos para os teores de aminoácidos, nas diferentes partes da planta, foram, respectivamente: 0,89 mmol kg⁻¹ MF e 8,34 mmol kg⁻¹ MF, no sistema orgânico; 0,97 mmol kg⁻¹ MF e 11,24 mmol kg⁻¹ MF, no sistema convencional; e 1,25 mmol kg⁻¹ MF a 15,24 mmol kg⁻¹ e 8,34 mmol kg⁻¹ MF, no sistema hidropônico, ultrapassando, neste caso, o valor máximo de 9,0 mmol kg⁻¹ MF obtido por Pereira et al. (1989), também em alface.

No limbo foliar de folhas novas e velhas, os teores de aminoácidos foram mais altos em plantas cultivadas em sistema convencional e hidropônico, os quais não diferiram entre si (Figura 2b). Nas nervuras de folha nova e folha velha, não houve diferenças nos teores de aminoácidos entre os sistemas de cultivo. No caule e na raiz, os maiores teores foram observados em plantas produzidas no sistema hidropônico, seguido do sistema convencional e, por último, do sistema orgânico. A mesma tendência de acúmulo de aminoácidos no caule e na raiz foi observada também para o acúmulo de nitrato (Figura 2), demonstrando que teores mais elevados de N, na forma de aminoácidos, em tecidos do caule e da raiz, são decorrentes do acúmulo mais intenso de N, na forma de nitrato, nestes órgãos.

A quantidade de N transportada pela seiva do xilema, na forma de aminoácidos, em relação ao nitrato, segundo Atkins et al. (1980), reflete a taxa de assimilação de nitrato na raiz, em relação à parte aérea. No presente estudo, a concentração de nitrato e aminoácidos na seiva do xilema (Figura 3), além dos teores de aminoácidos na raiz (Figura 2b) e dos valores de atividade da redutase do nitrato, também na raiz, apóia esta hipótese (Figura 4a). A atividade da redutase na raiz foi ligeiramente superior à do limbo foliar (Figura 4b), em todos os sistemas de cultivo.

Esses resultados contrariam o perfil de formas de transporte de N no xilema, nas plantas sob os sistemas hidropônico e convencional, cujas concentrações de nitrato foram, pelo menos, duas vezes mais altas, em relação às concentrações de aminoácidos, porém, diferentes das plantas sob sistema orgânico, onde predominou o transporte de aminoácidos (Figura 3). A redução de parte do nitrato na raiz contribui para o seu menor acúmulo na parte aérea. Por outro lado, em termos energéticos, quando o nitrato é reduzido e assimilado na folha, isso é mais vantajoso para a planta, pois grande parte do poder redutor requerido neste processo é gerado pela luz, via ferredoxina. Em contrapartida, quando o nitrato é reduzido e assimilado na raiz, grandes quantidades de fotoassimilados têm que ser importadas e oxidadas

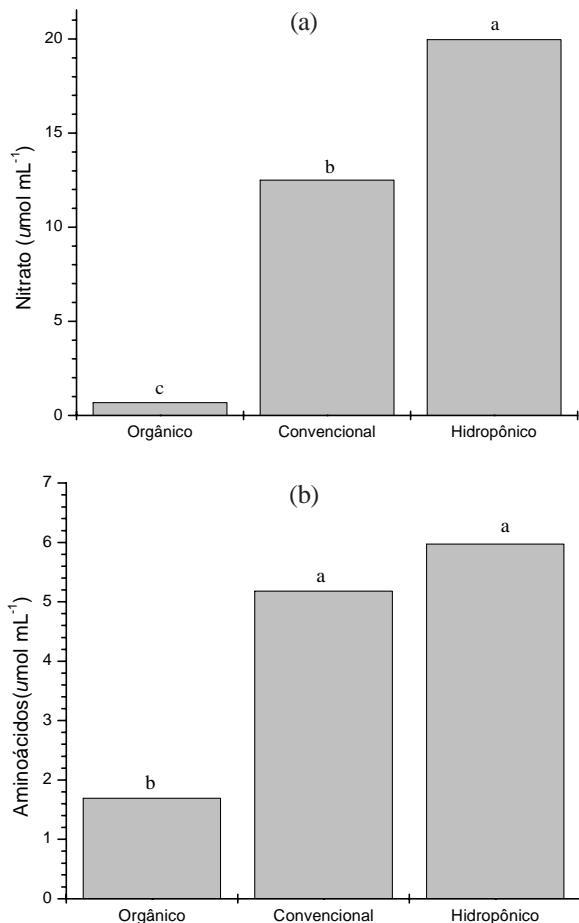


Figura 3. Concentração de nitrato (a) e aminoácidos livres totais (b), na seiva do xilema de plantas de alface cv. Vera, em função dos sistemas de cultivo, no ciclo primavera/verão, em Registro, SP (médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey).

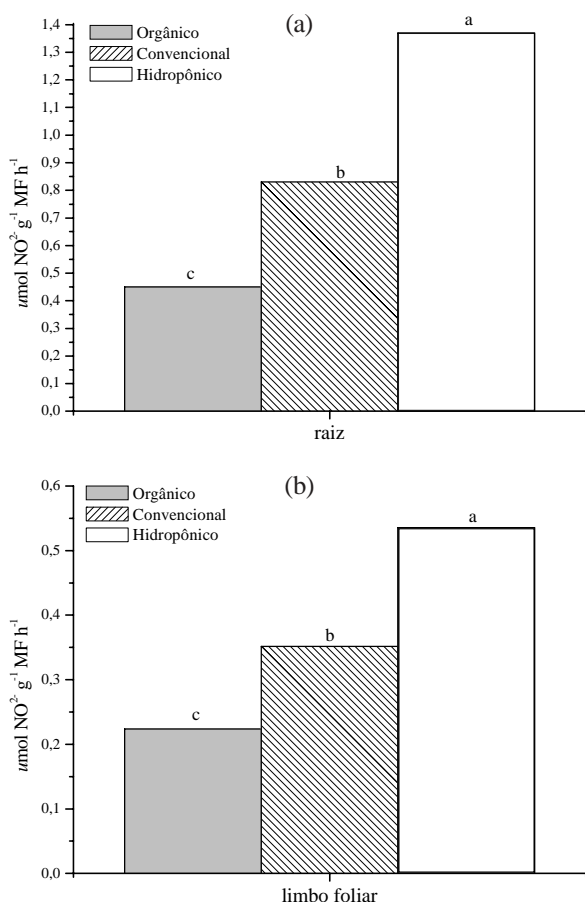


Figura 4. Atividade da redutase do nitrato *in vivo*, na raiz (a) e no limbo foliar (b) de plantas de alface cv. Vera, em função dos sistemas de cultivo, no ciclo primavera/verão, em Registro, SP (médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey).

pela raiz, por meio da glicólise, ou via pentoses-fosfato, para prover o poder redutor, a energia e os esqueletos carbônicos para a assimilação. Considerando-se que 25% da energia produzida pela fotossíntese é gasta na assimilação do nitrato (Solomonson & Barber 1990), as plantas crescem mais rápido quando reduzem o nitrato na folha (Beevers & Hageman 1980, Scheurwater 2002).

Os valores obtidos de atividade da redutase do nitrato *in vivo* estiveram relacionados com a disponibilidade de nitrato, nos diferentes sistemas de cultivo a que as plantas foram submetidas (Figura 4). O nitrato, além de regular a atividade da redutase do nitrato, por indução de sua síntese, tem forte influência sobre as proteínas de transporte de nitrato relacionadas à absorção e acúmulo no vacúolo, bem como sobre as enzimas redutase do nitrito (RNi),

sintetase do glutamato (GS) e amidatransferase da glutamina:2-oxoglutarato (GOGAT), dependente de ferredoxina (Sodek 2004). No caso da folha, é importante frisar que não é o teor de nitrato pré-existente neste órgão que induz a síntese da enzima, mas a quantidade de nitrato trazida pelo fluxo transpiratório via xilema (Sodek 2004).

Os altos teores de nitrato nos tecidos do caule e das nervuras podem indicar que esses tecidos, além de ajudarem na distribuição do nitrato absorvido pela raiz, podem atuar como sítios de acúmulo. Resultados similares foram obtidos por Cometti et al. (2004). No presente estudo, observou-se, ainda, que os teores de aminoácidos livres totais também foram altos no caule. No entanto, o mesmo comportamento não foi observado nas nervuras (Figura 2), provavelmente em decorrência da transformação mais rápida destes aminoácidos em outros compostos nitrogenados, em regiões próximas às nervuras.

CONCLUSÃO

Os sistemas de cultivo promovem diferenças no acúmulo de compostos nitrogenados e na atividade da redutase do nitrato, em alface, com resultados mais expressivos em plantas cultivadas no sistema hidropônico, seguidas das plantas cultivadas em sistema convencional e, por último, daquelas sob sistema orgânico de cultivo. Contudo, nas condições avaliadas, em nenhum dos sistemas os teores de nitrato excedem os limites máximos de referência recomendados na literatura.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação para o Desenvolvimento da Unesp (Fundunesp), pelo auxílio financeiro, e aos produtores de alface de Registro, SP, pela doação de plantas para a realização deste estudo.

REFERÊNCIAS

AMR, A.; HADIDI, N. Effect of cultivar and harvest date on nitrate (NO_3^-) and nitrite (NO_2^-) content of selected vegetables grown under open field and greenhouse conditions in Jordan. *Journal of Food Composition and Analysis*, San Diego, v. 14, n. 1, p. 59-67, 2001.

- ATKINS, C. A. et al. Economy of carbon and nitrogen in nodulated and non-nodulated (NO³⁻ grown) cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Plant Physiology*, Washington, v. 66, n.5, p. 978-983, 1980.
- BEEVERS, L.; HAGEMAN, R. H. Nitrate and nitrite reduction. In: STUMPF, P. K.; CONN, E. E. (Ed.). *The biochemistry of plants*. New York: Academic Press, 1980. p. 115-168.
- BENINNI, E. R. Y. et al. Teor de nitrato em alface cultivada em sistemas hidropônico e convencional. *Horticultura Brasileira*, Brasília, DF, v. 20, n. 2, p. 183-186, 2002.
- BIELESKI, R. I., TURNER, N. A. Separation and estimation of aminoacids in crude plants extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 17, n. 2, p. 278-293, 1966.
- BIEMOND, H. J. V.; STRUIK, P. C. Effects of nitrogen on accumulation and partitioning of dry matter and nitrogen of vegetables. 3. Spinach. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, Wageningen, v. 44, n. 3, p. 227-239, 1996.
- BLOM-ZANDSTRA, M.; LAMPE, J. E. M. The role of nitrate in the osmoregulation of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown at different light intensities. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 36, n. 7, p. 1043-1052, 1985.
- CASSENS, R. Residual nitrite in cured meats. *Food Technology*, Chicago, v. 51, n. 2, p. 53-55, 1997.
- CATALDO, D. A. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communication in Soil Science and Plant Analysis*, New York, v. 6, n. 1, p. 71-90, 1975.
- COMETTI, N. N. et al. Compostos nitrogenados e açúcares solúveis em tecidos de alface orgânica, hidropônica e convencional. *Horticultura Brasileira*, Brasília, DF, v. 22, n. 4, p. 748-753, 2004.
- CORRÉ, W. J.; BREIMER, T. *Nitrate and nitrite in vegetables*. Wageningen: Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1979.
- ELIA, A.; SANTAMARIA, P.; SERIO, F. Nitrogen nutrition, yield and quality of spinach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, San Diego, v. 76, n. 3, p. 341-346, 1998.
- FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; VILELA, L. A. A. *Produção de alface em hidroponia*. Lavras: UFLA, 1996.
- GENENGER, M. et al. The effects of fertilizer or wood ash on nitrate reductase activity in Norway spruce fine roots. *Forest Ecology and Management*, Amsterdam, v. 175, n.1-3, p. 413-426, 2003.
- GREVSEN, K.; KAACK, K. Quality attributes and morphological characteristics of spinach (*Spinacia oleracea* L.) cultivars for industrial processing. *Journal of Vegetable Crop Production*, Binghamton, v. 2, n. 2, p. 15-29, 1996.
- JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Orlando, v. 43, n. 6, p. 1274-1279, 1971.
- KAWACHI, T. Y. et al. Role of xylem sap nitrate in regulation of nitrate reductase gene expression in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Soil Science and Plant Nutrition*, Tokyo, v. 48, n. 1, p. 79-85, 2002.
- KIEHL, E. J. *Fertilizantes orgânicos*. Piracicaba: Agronômica Ceres, 1985.
- LEA, P. J. Primary nitrogen metabolism. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Ed.). *Plant biochemistry*. New York: Academic Press, 1997. p. 273-313.
- MANTOVANI, J. R. et al. Comparação de procedimentos de quantificação de nitrato em tecido vegetal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v. 40, n. 1, p. 53-59, 2005.
- MONDIN, M. *Efeito de sistema de cultivo na produtividade e acúmulo de nitrato em cultivares de alface*. 1996. 88 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1996.
- PAVLOU G. C. et al. Effect of organic and inorganic fertilizers applied during successive crop seasons on growth and nitrate accumulation in lettuce. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 111, n. 4, p. 319-325, 2007.
- PEREIRA, N. N. C.; FERNANDES, M. S.; ALMEIDA, D. L. de. Adubação nitrogenada na cultura da alface: fontes de N e inibidos da nitrificação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v. 24, n. 6, p. 647-654, 1989.
- SANTAMARIA, P. et al. A survey of nitrate and oxalate content in retail fresh vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, San Diego, v. 79, n.13, p. 1832-1888, 1999.
- SCHEURWATER, I. et al. The contribution of roots and shoots to whole plant nitrate reduction in fast- and slow-growing grass species. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 53, n. 374, p. 1635-1642, 2002.
- SMITH, S. R.; HADLEY, P. A comparison of organic and inorganic nitrogen fertilizers: their nitrate-N and ammonium-N release characteristics and effects on the growth response of lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Fortune). *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 115, n. 1, p. 135-144, 1989.

- SODEK, L. Metabolismo do nitrogênio. In: KERBAUY, G. B. (Ed.). *Fisiologia vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 94-113.
- SOLOMONSON, L. P.; BARBER, M. J. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology*, Palo Alto, v. 41, p. 225-253, 1990.
- SWANN, P. F. The toxicology of nitrate, nitrite and N-nitrous compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v. 26, n. 11, p. 1761-1770, 1975.
- TAKEBE, M. et al. Effect of nitrogen application on the content of sugars, ascorbic acid, nitrate and oxalic acid in spinach (*Spinacia oleracea* L.) and komatsuna (*Brassica campestris* L.). *Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, Tokyo, v. 66, n. 3, p. 238-246, 1995.
- WALTERS, C. L. Nitrate and nitrite in foods. In: HILL, M. J. (Ed.). *Nitrates and nitrites in food and water*. New York: CRC Press, 1991. p. 93-107.
- WOLFF, I. A.; WASSERMAN, A. E. Nitrates, nitrites, and nitrosamines. *Science*, Alexandria, v. 177, n. 43, p. 15-19, 1972.
- YEMM, D. G.; COCKING, E. C. Estimation of amino acids by ninhidrin. *The Analyst*, v. 80, n.2, p. 203-213, 1955.