

UFRRJ

INSTITUTO DE AGRONOMIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIAS DO SOLO**

TESE

**Frações Sólidas Humificadas de
Vermicomposto: seus Efeitos em Plantas e
Capacidade para a Retenção de Metais Pesados**

Andrés Calderín García

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**FRAÇÕES SÓLIDAS HUMIFICADAS DE VERMICOMPOSTO:
SEUS EFEITOS EM PLANTAS E CAPACIDADE PARA A
RETENÇÃO DE METAIS PESADOS**

ANDRÉS CALDERÍN GARCÍA

Sob a Orientação do Professor
Ricardo Luis Louro Berbara

e Co-orientação dos Professores
Fernando Guridi Izquierdo

e

Leandro Azevedo Santos

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo

Seropédica, RJ
Novembro de 2013

631.42

G216f

T

García, Andrés Calderín, 1981-

Frações sólidas humificadas de vermicomposto: seus efeitos em plantas e capacidade para a retenção de metais pesados / Andrés Calderín García – 2013.

130 f. : il.

Orientador: Ricardo Luis Louro Berbara.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo.

Bibliografia: f. 101-117.

1. Solos – Acidez – Teses. 2. Solos – Teor de ácido húmico – Teses. 3. Solos – Teor de metal pesado – Teses. 4. Substâncias húmicas – Teses. 5. Plantas – Efeito dos ácidos – Teses. I. Berbara, Ricardo Luis Louro, 1957-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta tese, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO**

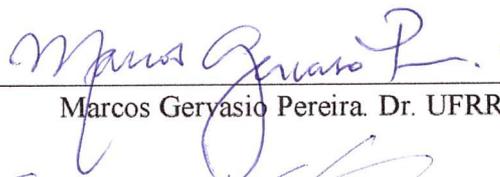
ANDRÉS CALDERÍN GARCÍA

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências,
no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

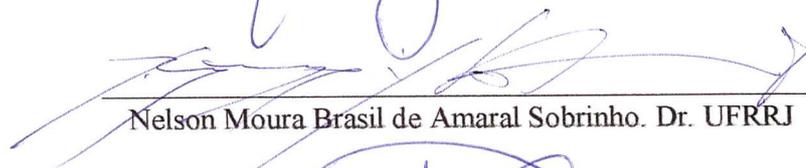
TESE APROVADA EM 26/11/2013



Ricardo Luis Louro Berbara. PhD. UFRRJ (Orientador)



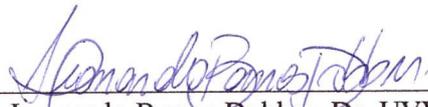
Marcos Geryasio Pereira. Dr. UFRRJ



Nelson Moura Brasil de Amaral Sobrinho. Dr. UFRRJ



Marco Antônio de Almeida Leal. Dr. Embrapa Agrobiologia



Leonardo Barros Dobbss. Dr. UVV

*A Deus pela sua presença na minha vida.
A minha família que sempre esteve comigo mesmo longe.
A minha esposa pela força e companhia.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença na vida, força para continuar, sabedoria para enfrentar os momentos mais difíceis e estreitar a distancia com minha família.

Aos meus Pais, Raquel García Perez e Andrés Calderín Nardo. Por permitirem a realização de meus sonhos e pelos ensinamentos em todo momento, inclusive pelo sacrifício de tê-los privado de minha presença durante todo este tempo.

A minha Irmã, Ariadni Calderín García. Por ser cúmplice das minhas escolhas e pelos conselhos jovens.

A meus Avós, Julio Calderín e Carlos García (*In memoriam*) e a Paula Nardo e Amparo Pérez. Pelo carinho, ternura e os aprendizados sobre a honradez com que se precisa enfrentar a vida.

A minha Esposa, Patricia Barizon Cepeda García. Por que sem sua presença e amor na minha vida, muitas coisas teriam sido impossíveis.

A Maria Antônia. Que sempre está comigo e tenta, mesmo sendo uma tarefa difícil, limpar meus sentimentos.

A TWAS (Academia Mundial da Ciência para os países em vias de desenvolvimento) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico) pelos convênios que me permitiram obter a bolsa de Doutorado.

Ao professor Ricardo L. Louro Berbara. Pela amizade e oportunidade de fazer parte do Lab. de Biologia do Solo desde a minha primeira estância no solo.

Aos Professores do Departamento de Solos, pela oportunidade de contar com seus ensinamentos para realizar minhas pesquisas.

A UFRRJ, por ter me recebido e colocado à disposição todos os seus recursos e facilidade para eu fazer meu trabalho.

A todos os professores do Dpto de Química da UNAH-Cuba. Por ter sabido segurar a carga de trabalho que representou minha ausência para que eu pudesse realizar meus estudos.

Ao professor Leandro Azevedo Santos, por ter aceitado co-orientar esta tese e confiado nas propostas iniciais da pesquisa.

A meu co-orientador/orientador Fernando Guridi Izquierdo, por que sempre teve a paciência e a sabedoria para manter nossa amizade acima de todo, pelos seus ensinamento e cumplicidade.

Ao CPGA-CS e todos seus funcionários, pelo acolhimento, paciência e ajuda a cada solicitação.

A meus amigos do Lab. de Biologia do Solos, Sael Sanchez, Orlando Huertas, Camila Pinheiro, Francly Lisboa e Beto. Por terem feito de um local de trabalho, um ambiente familiar.

A todos os que fizeram possível a realização desta tese, que ajudaram com análises, determinações, escrita e todas as formas de colaboração e parceria.

Muito Obrigado...

BIOGRAFIA

Andrés Calderín García, cubano, nascido em 12 de Dezembro de 1981, na cidade de Artemisa, Pijirigua, Havana-Cuba, filho de Andrés Calderín Nardo (sapateiro) e Raquel García Pérez (operária agrícola). Concluiu o ensino pre-universitário em 1999 na Instituição Mártires de Humboldt-7, obtendo o título de bacharel em Ciências Exatas. No ano 2005 se formou em Licenciatura em Química, na Universidade da Havana-Cuba (UH), Cidade da Havana. Nesse mesmo ano ingressou como professor na Universidade Agrária da Havana (UNAH) onde obteve a categoria de professor Assistente em 2009 que ostenta até a atualidade, lecionando nas disciplinas de Química Analítica e Orgânica para as especialidades de Agronomia e Medicina Veterinária. No ano 2010 obteve o título de *Máster* em Ciências da Química Agrária na UNAH-Cuba. Ingressou no Curso de Pós-graduação em Agronomia - Ciência do Solo-Brasil, no ano 2011 através de uma bolsa outorgada pelo convênio TWAS-CNPq.

RESUMO GERAL

García, Andrés Calderín. **Frações sólidas humificadas de vermicomposto: seus efeitos em plantas e capacidade para a retenção de metais pesados.** 2013. 117f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Esta tese teve como objetivo estudar duas frações sólidas presentes em um vermicomposto (**VC**) de esterco bovino, avaliando os efeitos da aplicação da fração de ácidos húmicos (**AH**) na regulação do metabolismo antioxidativo em plantas de arroz, assim como a capacidade do sólido residual (**RH**) que fica depois da extração das SH solúveis ao VC, para reter cátions de metais pesados em efluentes industriais. No capítulo I se apresenta o estudo das características estruturais das frações mediante técnicas de elucidação estrutural. Os AH mostraram maior caráter aromático que RH, justificado por uma baixa relação H/C e E_4/E_6 , bandas bem resolvidas entre 1500 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} no espectro IV, uma aromaticidade de um 28%, com picos entre 90-142 ppm pertencentes a $C_{Ar-H,R}$ e C_{Ar-O} no espectro ^{13}C RMN. A Py-CG/MS também mostrou maiores conteúdos de substâncias aromáticas (ligninas) nos AH. O capítulo II teve como objetivo estudar a capacidade do material residual RH para reter cátions dos metais pesados (**MP**) Ni^{2+} e Pb^{2+} . Uma massa de 5 g, pH 7 e 150 minutos de agitação, foram condições suficientes para reter elevadas quantidades de Ni^{2+} e Pb^{2+} . O estudo cinético se descreveu melhor mediante um comportamento de pseudo 2ª ordem e mostrou os melhores ajustes para o modelo de adsorção da isoterma de Freundlich. A microscopia MEV demonstrou visualmente a retenção destes metais em RH e a espectroscopia mostrou possível formação de ligações químicas entre os metais e os grupos funcionais ionizáveis. RH, quando testado com águas residuais industriais, mostrou uma efetividade de contenção de Ni^{2+} e Pb^{2+} superior a 98% e 96%. O capítulo III contém o estudo dos efeitos dos AH em componentes do metabolismo antioxidativo em plantas de arroz. Os AH mostraram exercer uma regulação da homeostase redox, estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio (**ERO**) e controlando seus níveis por meio do estímulo da atividade das enzimas do metabolismo antioxidativo. Nas plantas em estresse hídrico induzido, onde foram afetados os processos de emissão de raízes laterais, quando aplicados os AH, foi preservado o crescimento e desenvolvimento radicular, comprovados mediante a emissão de raízes laterais superiores ao tratamento controle sem AH. No capítulo IV aparece a caracterização da interação entre os AH e as raízes de plantas adultas, avaliando a percepção desta interação através do metabolismo antioxidativo e as aquoporinas do tonoplasto. Os AH estimularam o sistema antioxidativo e mostraram efeitos protetores em plantas submetidas a estresse hídrico. A espectroscopia demonstrou que nos AH aglomerados nas raízes predominam estruturas alquílicas e alquílicas oxigenadas (0-110 ppm), carboxílicas (156-186 ppm) e carbonílicas (186-230 ppm) e apresentam diminuição de estruturas arílicas (110-142 ppm) e O-arílicas (142-156 ppm). Nos modos de ação dos AH, se encontram também envolvidas as aquoporinas do tonoplasto.

Palavras-chave: Substâncias húmicas. Retenção de cátions metálicos. Espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

García, Andrés Calderín. **Humified solid fractions from vermicompost: effects on plants and capacity to retain heavy metals.** 2013. 117p. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

This thesis aimed to study two solid fractions present in a vermicompost (**VC**) obtained from manure evaluating effects of humic acids (**HA**) in the regulation of antioxidative metabolism in rice plants as well as in the ability of the solid waste (**RH**) to retain heavy metals cations in industrial effluents. Chapter I discusses these fractions after structural elucidation. The AH showed higher aromatic properties than HR, justified by a low H/C ratio and E_4/E_6 , clear bands between 1500 cm^{-1} and 1650 cm^{-1} in the IR spectrum, aromaticity of 28 %, with peaks between 90-142 ppm belonging to C_{Ar-H} , and $R-C_{Ar}$ the ^{13}C RMN spectrum. The Py-CG/MS also showed higher contents of aromatic substances (lignin) in AH. Chapter II showed the ability of the material to retain residual RH cations of heavy metals (MP) Ni^{2+} and Pb^{2+} . A mass of 5 g, pH 7 and 150 minutes of stirring conditions were sufficient to retain high amounts of Ni^{2+} and Pb^{2+} . The kinetic study is best described by behavior of pseudo second order and showed the best settings for the adsorption model of Freundlich isotherm. The SEM microscopy confirmed the retention of these metals and spectroscopy showed possible formation of chemical bonds between the metal and the ionizable functional groups. RH when tested with industrial waste water, showed an efficacy of containing Ni^{2+} and Pb^{2+} than 98% and 96%. Chapter III discuss the effects of HA on the antioxidative metabolism in rice. The AH showed exert regulation of redox homeostasis, stimulates the production of radical oxygen species (**ROS**) and controls its levels by stimulating the activity of antioxidative enzymes. In plants under induced water stress, it was found the development of lateral roots when applied AH. In Chapter IV it is discussed the interaction between HA and the roots by evaluating the perception of this interaction through metabolism and antioxidative aquaporinas at the tonoplast. The AH stimulated antioxidative system and showed protective effects in plants subjected to drought stress. Spectroscopy showed that from HA clusters, found at root surface dominate structures like alkyl and alkyl oxygen (0-110 ppm), carboxylic (156-186 ppm) and carbonyls (186-230 ppm) and have decreased structures aryls (110-142 ppm). Modes of action of AH were also found to be involved in the aquaporinas at tonoplasto levels.

Keywords: Humic substances. Retention of metal cations. Oxygen radical species.

LISTA DE SÍMBOLOS

ABA	Ácido absícico.
AH	Ácidos húmicos
AIA	Ácido Indol-acético.
APCI-MS	Espectrometria de massas mediante ionização química a pressão atmosférica.
CAT	Catalase.
CP MAS ¹³C RMN	Ressonância magnética nuclear do isótopo do ¹³ C em polarização cruzada e rotação no ângulo mágico.
FTIR	Espectroscopia Infravermelha com Transformada de Fourier.
EDX	Espectroscopia de energia dispersiva de raios X.
ERO	Espécies reativas de oxigênio
RH	Sólido residual do processo de extração de SH ao VC
MEV	Microscopia eletrônica de varredura.
MDA	Malondialdeído
MP	Metais pesados
NO	Monóxido de nitrogênio
Py-CG/MS	Pirólises acoplada a cromatografia gasosa e espectrometria de massas.
SH	Substâncias húmicas
SOD	Superoxidodismutase.
TIP	Proteínas intrínsecas do tonoplasto.
TIC	Total ions chromatogram -siglas em inglês-
VC	Vermicomposto
EPR	Espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica-siglas em inglês-
PEG	Polietilenglicol
POX	Peroxidases
PBS	Tampão fosfato salino
PVP	Polivinilpirrolidona
MPK3	Mitogen-activated protein kinase 3-siglas em inglês-

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	A Vermicompostagem, os Vermicompostos e sua Aplicação em Solos e Plantas.....	3
2.2	Definição de Substâncias Húmicas (SH) e Algumas Características Estruturais.....	4
2.3	Interações entre SH e as Plantas	6
2.4	Geração de ERO pela Aplicação de SH em Plantas.....	9
2.5	Relação das ERO com outras Rotas Metabólicas que Respondem a SH	10
2.6	Outras Respostas Induzidas pelas SH no Metabolismo das Plantas.....	11
2.7	Estudo da Ação das SH por meio de Técnicas de Expressão Gênica.....	12
2.8	Evidências de Efeitos Protetores das SH nas Plantas em Condições de Estresse	14
2.9	Evidências de Efeitos Protetores Antiestresse das SH em Plantas.....	14
2.10	Relação Estrutura-Função na Interação das SH com Elementos Metálicos.....	15
3.	CAPÍTULO I OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICO-ESPECTROSCÓPICA DAS FRAÇÕES HÚMICAS OBTIDAS A PARTIR DE UM VERMICOMPOSTO DE ESTERCO BOVINO.....	17
3.1	RESUMO	18
3.2	ABSTRACT.....	19
3.3	INTRODUÇÃO	20
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.4.1	Origem do vermicompost de esterco bovino como material de partida.....	21
3.4.2	Obtenção de RH a partir do VC de esterco bovino.....	21
3.4.4	Caracterização químico-física e espectroscópica dos materiais humificados...21	
3.4.5	Caracterização mediante espectrometria de massas APCI-MS de RH	23
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
3.5.1	Composição elementar e relação E ₄ /E ₆ (UV-vis) do VC, AH e RH.....	24
3.5.2	Caracterização mediante espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR).....	24
3.5.3	Ressonância magnética nuclear do isótopo de carbono de massa treze com rotação no ângulo mágico e polarização cruzada (13C RMN CP/MAS).....	26
3.5.4	Caracterização molecular das frações AH e RH mediante Off line Py-TMAH-CG-MS	28
3.5.5	Caracterização mediante Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia por difração de Raios X com energia dispersiva (EDX) qualitativa	31
3.5.6	Espectrometria de massa mediante ionização química a pressão atmosférica (APCI-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry), aplicado à fração RH.....	33
3.6	CONCLUSÕES	37
4.	CAPÍTULO II RETENÇÃO DE METAIS PESADOS (Pb²⁺ E Ni²⁺) EM SISTEMAS MONO-ELEMENTARES E BI-ELEMENTARES DO SÓLIDO RESIDUAL HUMIFICADO DO VERMICOMPOSTO	38
4.1	RESUMO	39
4.2	ABSTRACT.....	40

4.3	INTRODUÇÃO	41
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.4.1	Experimentos de retenção em sistemas monoelementares de Ni ²⁺ e Pb ²⁺ em RH	42
4.4.2	Efeito da massa de RH na retenção de Ni ²⁺ e Pb ²⁺	42
4.4.3	Dependência da retenção de Ni ²⁺ e Pb ²⁺ com o pH	42
4.4.4	Cinética da Retenção de Ni ²⁺ e Pb ²⁺ em RH.....	42
4.4.5	Isotermas de adsorção de Ni ²⁺ e Pb ²⁺ em RH	43
4.4.6	Determinação do parâmetro termodinâmico de Energia livre (ΔG°)	43
4.4.7	Experimentos de retenção em sistemas bi-elementares de Ni ²⁺ e Pb ²⁺ em RH	43
4.4.8	Testes de efetividade de RH em águas residuais industriais.....	44
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.5.1	Efeito da massa e o pH na retenção de Ni ²⁺ e Pb ²⁺ em RH.....	45
4.5.2	Estudo Cinético da retenção de Ni ²⁺ e Pb ²⁺ em RH.....	46
4.5.3	Modelagem de retenção de Ni ²⁺ e Pb ²⁺ em RH. Modelos de isotermas de Langmuir e Freundlich	47
4.5.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) para RH e RH com metais retidos	48
4.5.5	Caracterização mediante espectroscopia FTIR de RH e RH com os metais retidos	50
4.5.6	Experimentos de retenção de Ni ²⁺ e Pb ²⁺ em RH em sistemas bi-elementares aquosos	50
4.5.7	Efetividade de RH para a contenção de Ni ²⁺ e Pb ²⁺ em residuais líquidos industriais	52
4.6	CONCLUSÕES	54
5.	CAPÍTULO III BIOATIVIDADE DOS AH: EFEITOS SOBRE A MORFOLOGIA RADICULAR E MECANISMOS DE PROTEÇÃO AO ESTRESSE OXIDATIVO E HÍDRICO.....	55
5.1	RESUMO	56
5.2	ABSTRACT.....	57
5.3	INTRODUÇÃO	58
5.4	MATERIAL E MÉTODOS	59
5.4.1	Material vegetal, crescimento das plantas e condições gerais de experimentação	59
5.4.2	Aplicações dos tratamentos de AH no experimento de dose vs. resposta	59
5.4.3	Aplicações dos tratamentos no experimento com estresse hídrico induzido nas plantas com PEG-6000 (15%)	59
5.4.4	Avaliações de indicadores morfológicos: comprimento radicular (CRP), número de raízes laterais (NRL), massa seca radicular (MR), massa seca folhar (MF), área radicular específica (ARE) e área folhar específica (AFE)	59
5.4.5	Quantificação do conteúdo de carboidratos redutores foliares	60
5.4.6	Quantificação simultânea de ABA e AIA mediante cromatografia líquida de alta resolução (high performance liquid chromatographic- HPLC).....	60
5.4.7	Quantificação e histoquímica das ERO superóxido (O ₂ ⁻) e Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)	60
5.4.8	Determinação das atividades enzimáticas das POX (EC 1.11.1.7) e SOD (EC 1.15.1.1) totais	61
5.4.9	Atividade enzimática da pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS) e a quantificação de prolina	62

5.4.10	Quantificação do conteúdo de prolina.....	62
5.4.11	Peroxidação lipídica e teste de permeabilidade de membrana nas raízes das plantas de arroz	62
5.4.12	Quantificação de proteínas	62
5.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.5.1	Relação entre a dose dos AH e os efeitos radiculares em plantas de arroz.....	63
5.5.2	Conteúdos dos fito-hormônios ABA e AIA nas raízes das plantas	65
5.5.3	Quantificação e histoquímica das ERO superóxido (O_2^-), Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) e atividade enzimática das peroxidases (POX, EC: 1.11.1.7) totais e Superoxido dismutase (SOD, EC: 1.15.1.1).....	67
5.5.4	Avaliação da permeabilidade da membrana e peroxidação lipídica nas raízes das plantas de arroz	69
5.5.5	Atividade enzimática da P5CS e a quantificação de prolina.....	71
5.5.6	Experimentos da ação dos AH em plantas de arroz em condições de estresse hídrico induzido com PEG	72
5.5.7	Quantificação e histoquímica das ERO superóxido (O_2^-), Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) e atividade enzimática das peroxidases (POX, EC: 1.11.1.7) totais e Superoxido dismutase (SOD, EC: 1.15.1.1).....	73
5.5.8	Teste de permeabilidade de membrana e peroxidação lipídica de membrana nas raízes das plantas de arroz.....	74
5.5.9	Quantificação de ABA e prolina	75
5.6	CONCLUSÕES	77
6	CAPÍTULO IV AÇÃO DOS AH NO METABOLISMO ANTIOXIDATIVO DE PLANTAS DE ARROZ ADULTAS COM E SEM ESTRESSE HÍDRICO. INTERAÇÃO DOS AH COM O SISTEMA RADICULAR DAS PLANTAS.....	78
6.1	RESUMO	79
6.2	ABSTRACT.....	80
6.3	INTRODUÇÃO	81
6.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	83
6.4.1	Material vegetal, crescimento das plantas e condições gerais de experimentação	83
6.4.2	Aplicações dos tratamentos de AH no experimento sem estresse hídrico.	83
6.4.3	Aplicações dos tratamentos no experimento com estresse hídrico induzido com PEG-6000	83
6.4.4	Determinação da atividade enzimática POX (EC 1.11.1.7) e SOD (EC 1.15.1.1)	83
6.4.5	Quantificação das ERO superóxido (O_2^-) e Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) ..	84
6.4.6	Peroxidação lipídica nas raízes das plantas de arroz.....	85
6.4.7	Quantificação simultânea de ABA e AIA mediante cromatografia líquida de alta resolução (high-performance liquid chromatography-HPLC)	85
6.4.8	Expressão gênica das aquaporinas do tonoplasto (OsTIPs) nas plantas de arroz.....	85
6.4.9	Visualização da interação entre os AH e o sistema radicular	86
6.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
6.5.1	Atividade das enzimas POX, SOD e metabólitos do sistema de defesa antioxidativo em folhas e raízes.....	87
6.5.2	Expressão gênica das aquaporinas do tonoplasto (OsTIPs) nas plantas de arroz pelas ação dos AH.....	89

6.5.3	Interação dos AH com sistema radicular das plantas. Caracterização CP-MAS ¹³ C RMN.....	91
6.5.4	Efeito da ação dos AH em plantas de arroz em condições de estresse hídrico induzido com PEG	92
6.5.5	Conteúdo de ABA nos tecidos vegetais	94
6.5.6	Expressão gênica de aquaporinas do tonoplasto em plantas de arroz (OsTIPs)	95
6.5.7	Caracterização CP-MAS ¹³ C RMN das interações dos AH com o sistema radicular das plantas	96
6.6	CONCLUSÕES	98
7.	CONCLUSÕES GERAIS	99
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
9.	REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

1 INTRODUÇÃO GERAL

Várias têm sido as definições enunciadas para explicar a estrutura das substâncias húmicas (**SH**). Segundo Schaumann e Thiele-Bruhn (2011), as SH podem ser descritas como (i): associações entre moléculas de elevado tamanho, (ii): associações de subunidades moleculares de estrutura definida e (iii): associações entre estruturas mediante interações intermoleculares que estabilizam uma estrutura superior primária. Nebiosso e Piccolo (2012) afirmam que as SH são supramoleculas que estão formadas mediante associações entre moléculas de menor complexidade que interagem e se estabilizam através da sua afinidade química.

Esta complexidade estrutural tem motivado às pesquisas sobre as vias de ação pelas quais as SH exercem seus efeitos nas plantas, no entanto, ainda não se estabeleceu uma rota única que integre e explique estes efeitos. Nardi et al. (2007), mostraram que ácidos húmicos (**AH**) isolados de solos regulam a atividade das enzimas relacionadas com a via glicolítica e de respiração em plantas de milho (*Zea mays* L.) e esta ação depende do tamanho molecular destas substâncias. Por outro lado, Canellas et al. (2011), relataram que os AH isolados de vermicomposto (**VC**) apresentaram ação tipo auxina em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) e seu modo de ação acontece por meio de uma liberação das estruturas bioativas na supraestrutura dos AH após ruptura, as quais podem interagir com os receptores hormonais nas células vegetais. Neste sentido, Zandonadi et al. (2010), concluíram que os modos de ação das SH em plantas de milho (*Zea mays* L.) acontecem através de um mecanismo onde o monóxido de nitrogênio (NO) atua como intermediário nas vias de sinalização para a emergência das raízes laterais.

Ao mesmo tempo, as SH têm sido utilizadas para reter cátions de metais pesados em sistemas aquosos. Schnitzer (1978) mostraram que as SH apresentam uma elevada capacidade para reter cátions em solução, devido à considerável quantidade de grupos funcionais oxigenados (CO_2H , OH de fenóis, $\text{C}=\text{O}$). Piccolo e Stevenson (1982) relataram que os grupos funcionais COOH , OH e $\text{C}=\text{O}$ favorecem as ligações com os elementos Cu^{2+} , Pb^{2+} e Ca^{2+} . Os AH, por exemplo, tem mostrado uma elevada capacidade de retenção de Pb^{2+} (Filella e Town, 2001; Jerzykiewicz, 2004). Neste sentido, fontes de SH como os VC têm sido utilizados como descontaminantes de metais pesados. O VC tem sido utilizado para reter cátions de metais Pb^{2+} , Ni^{2+} , V^{4+} e Cr^{3+} em residuais líquidos (Urdaneta et al., 2008).

Apesar destes conhecimentos, ainda é insuficientemente estudada a utilização do VC e as suas frações humificadas na sua forma íntegra para a agricultura orgânica. É conhecido que na agricultura se utilizam como alternativa ao consumo de fertilizantes químicos o húmus líquido e/ou o VC, como reguladores do crescimento vegetal. Alguns efeitos de proteção antiestresse têm sido observados quando estas substâncias são aplicadas nas plantas, mas ainda são necessários maiores estudos para esclarecer essas ações. Ao mesmo tempo, se desconhece hoje um uso eficiente para o subproduto obtido após a extração das SH (húmus líquido) do VC, o que resulta na maioria das ocasiões em um dejetos do próprio processo de utilização desses VC como produto orgânico.

Diante destas evidências, esta tese pretende dar resposta ao seguinte **problema científico**:

Será possível utilizar os AH isolados do VC de esterco bovino bem como compostos com ação antiestresse oxidativo em plantas e que o sólido residual deste

processo preserve a capacidade de reter cátions de metais pesados presentes em efluentes industriais aquosos?

O **objetivo geral** proposto por esse trabalho foi:

Avaliar os efeitos da aplicação radicular de AH isolados de VC na regulação das vias do metabolismo antioxidativo em plantas de arroz submetidas ou não a estresse hídrico, assim como a capacidade do sólido residual que fica depois de extraídas as SH solúveis do VC de esterco bovino, para reter cátions de metais pesados presentes em efluentes industriais aquosos.

Os **objetivos específicos** que direcionaram a pesquisa da presente tese foram estabelecidos de maneira que fossem respondidos em cada capítulo: eles foram os seguintes:

- a. Caracterizar através de técnicas químico-físicas e espectroscópicas (Composição elementar, UV-vis, FTIR, CP-MAS ^{13}C RMN, MEV, Py-CG/MS e APCI-MS) as frações humificadas que constituem objeto de estudo.
- b. Determinar a capacidade de retenção de cátions de metais pesados (Ni^{2+} e Pb^{2+}) em sistemas aquosos monoelementares e bielementares em nível de laboratório e em efluentes industriais.
- c. Caracterizar a retenção dos metais pesados (Ni^{2+} e Pb^{2+}) através de técnicas químico-físicas e espectroscópicas.
- d. Avaliar os efeitos da aplicação radicular dos AH isolados do VC no desenvolvimento e crescimento de plantas de arroz submetidas ou não a estresse hídrico, e sua relação com os mecanismos de defesa do metabolismo antioxidativo.
- e. Comprovar a interação entre o sistema radicular em plantas de arroz e os AH aplicados via radicular mediante caracterização espectroscópica e sua percepção no sistema de defesa antioxidativo em plantas submetidas ou não a estresse hídrico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Vermicompostagem, os Vermicompostos e sua Aplicação em Solos e Plantas

A vermicompostagem é um processo que envolve transformações químicas, físicas e biológicas de materiais orgânicos em fase sólida (residuais agropecuários de origem vegetal e animal), na presença de minhocas e micro-organismos (Garg e Gupta, 2009). A utilização de minhocas neste processo também nomeado como vermiestabilização, contribui para a fragmentação da matéria orgânica fresca e isto faz com que aumente a área superficial disponível para a colonização microbiana (Dominguez et al., 2010).

A utilização de VC nas atividades agrícolas e ambientais está relacionada com a capacidade deste material para melhorar atributos químicos, físicos e biológicos do solo, e de forma direta e indireta os rendimentos biológicos e agrícolas das plantas (Garcia et al., 2013). Dentre outras utilizações conhecidas, o VC tem sido utilizado como adubo orgânico para melhorar a fertilidade do solo e como promotor da regulação das plantas e estimulante do crescimento vegetal.

Na utilização de VC para melhorar atributos do solo, uma alternativa interessante pode ser a combinação de seu uso com os já existentes e que estão baseados em fertilizantes químicos. Uma combinação entre o VC e fertilizantes químicos na cultura da cebola foi uma alternativa eficiente para aumentar a fertilidade do solo e os rendimentos vegetais, além de uma diminuição de 50% do custo de produção (Srivatava et al., 2012). Neste mesmo sentido, estudos executados aplicando VC e fertilizantes químicos ao solo, de forma independente ou combinados em um período de doze anos, mostrou que o VC aplicado de forma independente aumenta o pH do solo (6,3) quando comparado com os outros tratamentos (5,7-5,8), além de aumentar o conteúdo de carbono orgânico, fósforo e nitrogênio (Sujatha e Bhat, 2012).

Têm-se obtido também resultados atributos físicos, químicos e biológicos dos solos quando aplicados os VC de forma direta. O uso de compostos de resíduos de vinhaça e vermicomposto de restos vegetais aplicados ao solo permitiu um decréscimo nas perdas de solo de 31,2% e um incremento na cobertura vegetal de 68,7% (Tejada et al., 2009). Resultados benéficos também são obtidos quando aplicado VC inoculado com micro-organismo ao solo. Esse consórcio VC e micro-organismo é capaz de melhorar atributos físicos do solo como a densidade e a capacidade de retenção de água, assim como as propriedades químicas como pH, carbono orgânico, N, P e K (Singh et al., 2013).

Embora sejam satisfatórios os resultados obtidos com o uso do VC para fins agrícolas, a associação com os fertilizantes químicos e micro-organismos nas técnicas já existentes, parece ser a via mais interessante para implementação dos VC como alternativa fitotécnica agrícola. Isto porque é conhecido que os processos agrícolas e fito-tecnológicos que tentaram aplicar uma agricultura orgânica em substituição total dos químicos sintéticos utilizados tradicionalmente apresentam prejuízos nos rendimentos agrícolas, sendo hoje uma desvantagem (Lazcano et al., 2010). Autores como Doan et al. (2013), comprovaram em experimentos feitos em casa de vegetação que a substituição total de fertilizantes minerais pelo uso do VC pode ocasionar uma redução do rendimento das culturas.

No entanto, alguns trabalhos mostram que o VC obtido a partir de lodo de esgoto, quando aplicado no cultivo de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), produz um melhor desenvolvimento das plantas quando comparado às tratadas com fertilizantes inorgânicos (Valdez-Pérez et al., 2011). Também para plântulas de tomate

(*Lycopersicon esculentum* Mill.), o VC influenciou positivamente algumas características como o alongamento das plantas. Outras características morfológicas e químicas do fruto foram também positivamente influenciadas (circunferência, matéria seca, firmeza da casca, conteúdo de ácido L-ascórbico, glicose etc.), no entanto, os resultados foram diferentes para cada variedade utilizada (Zaller, 2007).

Como mostram os estudos, a vermicompostagem de diferentes resíduos pode constituir uma alternativa ecológica para ser introduzida como prática agrícola habitual. No entanto, existem várias questões que devem ser esclarecidas antes de estabelecer cartilhas fitotecnológicas, pois, como relatado neste item, os seus efeitos benéficos dependem do tipo de matéria prima que deu origem ao VC, tipo de solo a ser aplicada e espécie de planta (Figura 1).

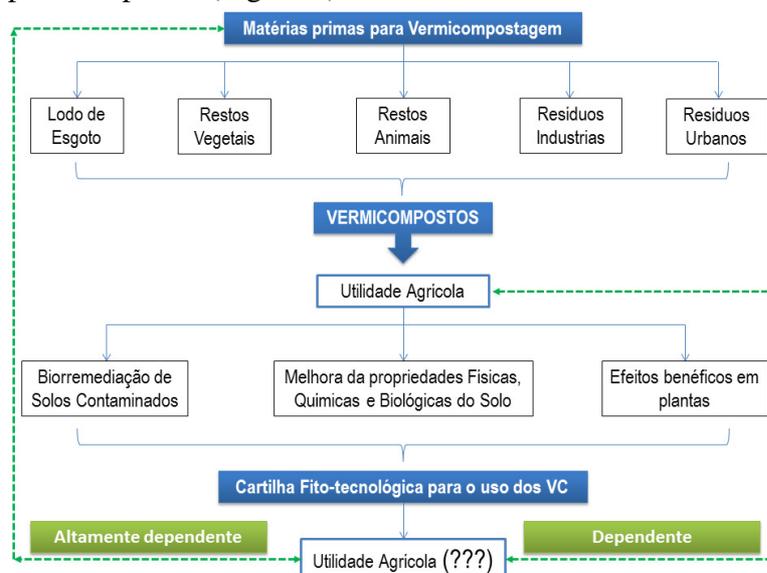


Figura 1. Esquema resumo sobre alguns dos principais aspectos atuais no estudo dos vermicompostos a sua utilização.

2.2 Definição de Substâncias Húmicas (SH) e Algumas Características Estruturais

As SH têm sido reconhecidas durante muito tempo como o componente orgânico mais amplamente distribuído no planeta, presentes tanto em ambientes terrestres quanto aquáticos, são formadas a partir da degradação química e biológica de resíduos de plantas, animais e da atividade microbiana (Schnitzer, 1978).

Segundo o próprio Schnitzer, (1978) as teorias para a formação das SH podiam se resumir em quatro enunciados hipotéticos: (a) Hipótese da transformação das plantas, (b) Hipótese da polimerização química, (c) Hipótese da autólise celular e (d) Hipótese da síntese microbiana. O fundamento destas hipóteses pode ser estudado nas obras originais destes autores, no entanto, nelas se explica que é difícil identificar qual resulta mais válida, sendo o mais provável que aconteçam de forma simultânea as quatro, estando em predominância aquela que as condições do solo mais a favoreça. Tendo como sequência na formação das SH primeiramente as de maior peso molecular e posteriormente mediante degradação as de menor, assim, seria formado primeiramente os AH e a seguir ácidos fúlvicos (AF).

Em Ghabbour e Davies (2001), é relatado que o primeiro enunciado das SH expressa que: as SH envolvem uma extraordinária quantidade de moléculas complexas, amorfas, heterogêneas e quimicamente reativas que se produzem pela

decomposição da biomateria, devido a reações químicas que acontecem aleatoriamente no grande *pool* de fragmentos e moléculas da própria biomateria.

Em 2012, mediante um procedimento denominado por Nebbioso e Piccolo (2012) como *Humeômica*, os autores enunciaram que as SH são formadas por moléculas heterogêneas que se associam em função de sua forma, tamanho, afinidade química, hidrofobicidade e sua caracterização estrutural esta limitada pela força das interações que estabilizam suas associações numa estrutura supramolecular.

Independente de existir ou não uma definição única para as SH, os estudos coincidem em que elas são formadas no ambiente terrestre pela decomposição do material de origem vegetal ou animal depositado no solo. Segundo as evidências é possível entender a heterogeneidade químico-estrutural dos materiais humificados. A Figura 2 mostra a diversidade de estruturas presentes em um vermicomposto de esterco bovino. Podem-se observar fragmentos lignínicos, ácidos graxos, compostos nitrogenados entre outros, provenientes dos materiais vegetais e animais que os originaram (Balmori et al., 2013).

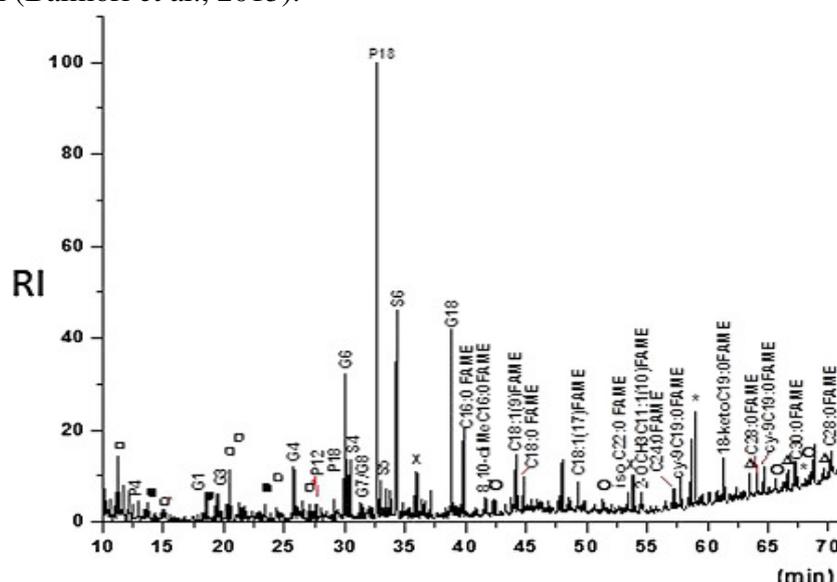


Figura 2. TIC(cromatograma de íons totais) de uma fração residual sólida de um vermicomposto de esterco bovino. Derivados de carboidratos (□), compostos nitrogenados (O), derivados de ligninas, ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), álcoois graxos (FA), hidrocarbonetos (H), compostos terpênicos (Tp) (Modificado de Balmori et al., 2013)

2.2.1 Características estruturais das SH, suas frações e efeitos

Embora seja possível isolar a partir do solo as três frações fundamentais de SH, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e huminas, as duas primeiras tem sido alvo de estudo na maioria das publicações científicas para avaliar suas funções. As características estruturais destas frações variam de acordo com sua fonte de origem e o tempo de transformação ou formação que a matéria orgânica tem tido nessa fonte.

Canellas et al. (2012), trabalhando com frações húmicas isoladas de diferentes tipos de solos do Brasil, de vermicompostos e seus derivados sintéticos, mostram mediante análise de ¹³C-MNR, como varia a presença das estruturas de acordo com a fonte de origem da fração. Os autores relatam que um maior conteúdo de estruturas polares e alquílicas estão presentes nas frações de vermicompostos quando comparados com seus derivados, com conteúdos semelhantes às frações isoladas de solos. Assim, frações isoladas de solos, foram os mais hidrofóbicos e aromáticos

quando comparados com os restantes analisados. Por outro lado, estas frações húmicas estudadas estimularam a emissão de raízes laterais em plantas de milho (*Zea mays* L.) e a atividade das H⁺-ATPase independente da sua fonte de origem, sendo as estruturas do tipo *O*-alquil, metoxilas/*N*-alquil e índice de hidrofobicidade (**HB/HI**) as que explicaram em 88% este tipo de efeito.

As características estruturais de AH isolados de diferentes vermicompostos e em diferentes estados de maturação e seus efeitos nas plantas foram também estudados. Os AH de diferentes vermicompostos mostraram diminuição dos conteúdos de estruturas tipo carboidratos e uma preservação de estruturas alquílicas e arílicas durante o processo de vermicompostagem. Foi também mostrado que não se evidenciam mudanças no peso molecular, no entanto, se manifestaram aumentos das estruturas hidrofóbicas com o aumento do tempo de maturação do vermicomposto. Assim, os AH isolados a partir dos 60 dias de vermicompostagem mostraram exercer efeitos na emergência de raízes laterais e indução na bomba de prótons independente das suas particularidades estruturais (Aguiar et al., 2012).

Tabela 1. Alguns estudos que mostram o isolamento de frações húmicas a partir de diferentes fontes de origem, sua caracterização mediante diferentes técnicas químico-físicas e as principais informações que foram obtidas a partir da análise estrutural.

SH	Fonte	Técnica de caracterização	Principais observações	Referencias
AH, FA	Solos	¹ H-RMN ¹³ C-RMN	AH são + aromáticos, contem - quantidade de C-carboidratos e H alifáticos que os FA.	Zu-Yi et al., 1999
AH, FA	Solos	Composição Elemental. UV-vis FTIR ¹³ C-RMN	↑ Condensação aromática quando ↑ a profundidade no solo. ↓ de <i>O</i> -alquil-C quando ↑ a profundidade no solo.	Gondar et al., 2005
AH, FA	Solos	Composição Elemental. UV-vis FTIR ¹ H-RMN	FA com ↓ teor de C, ↑ teor de O, ↓ relação E ₄ /E ₆ , ↓ grau de aromaticidade que os AH	Dobbss et al., 2009
SH	Solos	DRIFT ¹ H-RMN	Mudanças em grupos funcionais com o uso de adubos. ↑ de aminoácidos aromáticos, ligninas e ácidos graxos/ésteres em solo adubados com estrume de fazenda	Ferrari et al., 2011

2.3 Interações entre SH e as Plantas

Entender as interações que ocorrem entre as SH e o sistema radicular das plantas é de grande importância para uma melhor compreensão de seus modos de ação. Duas questões fundamentais tornam importantes os estudos da relação SH-raízes. A primeira, esta relacionada com o fato de compreender o que acontece no meio natural de crescimento das plantas onde estas substâncias se encontram; a segunda esta relacionada ao fato de que a maioria dos experimentos feitos para estudar os efeitos das SH nas plantas, se utiliza as vias de aplicação radicular.

Embora os estudos de interação SH-raízes não tenham sido o centro das pesquisas, no século passado foi mostrado que os fragmentos de SH interagem de forma direta com a estrutura dos sistemas radiculares. Os estudos mostraram como os AH e AF marcados com isótopos de ^{14}C e nos primeiros momentos de interação raiz-SH (3h), se associam em maior quantidade à parede celular e posteriormente (18h), passam a formar parte de componentes solúveis das células. Dentre todas as frações, os AH são os que se associam em maior quantidade à parede celular nas raízes e os AF os mais incorporados (Vaughan e Ord, 1981). O entendimento desta interação SH-raiz, faz compreender como são assimiladas estas substâncias e como exercem seus efeitos em nível foliar, pois é conhecido, a partir de experimentos realizados com plantas de trigo, que do total de ^{14}C associado às SH e absorvidos pelas plantas através das raízes, somente 5% foi translocado até os tecidos foliares (Vaughan e Lineham, 1976).

Sobre a interação SH-raiz, na literatura se relatam interações de natureza física, especificamente para os AH, que modificam a funcionalidade das membranas celulares. Os aglomerados supramoleculares coloidais de AH em solução podem migrar até a superfície das raízes e causar entupimentos de poros e sítios de transpiração radicular. Estas interações AH-raiz e formações de camadas de aglomerados podem ser na sua maioria interações eletrostáticas e de Van der Waals. Estes fenômenos causam reduções na condutividade hidráulica, crescimento de órgãos foliares, transpiração e resistência ao estresse hídrico; este tipo de mecanismo de ação foi denominado estresse coloidal (Asli e Neumann, 2010).

Recentemente foi mostrado mediante microscopia eletrônica que existe uma forte interação entre os AH e o interior das raízes das plantas (Figura 3). Em trabalhos onde se estudaram as regiões de maior interação entre o sistema radicular nas plantas e os AH, foi visualizado que existe um transporte preferencial dos SH através do apoplasto. Não foram encontradas quantidades significativas de AH nas células epidérmica sendo a endoderme o principal ponto de controle para o seu transporte (Kulikova et al., 2013).

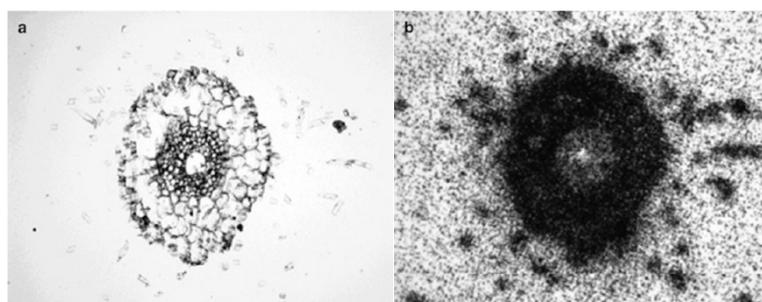


Figura 3. Corte transversal de uma região de um pelo radicular (a) e seu radiograma (b), 100x (modificado de Kulikova et al., 2013).

2.3.1 Resposta antioxidativa em plantas pela aplicação de SH

As ERO ($^1\text{O}_2$, O_2^- , OH^- e H_2O_2) foram inicialmente reconhecidas nas plantas como espécies químicas tóxicas produzidas a partir do metabolismo aeróbico (Mittler et al., 2011), porém, além de subprodutos gerados pelo metabolismo antiestresse, elas também desempenham funções como moléculas sinalizadoras (Miller et al., 2010). As ERO têm um papel importante nos mecanismos de transdução de sinais, envolvendo processos metabólicos como a regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas, resposta a estresses bióticos e abióticos e morte celular (Suzuki et al., 2012).

Em condições de homeostase e de estresse, as ERO apresentam diferentes teores nos tecidos vegetais. Em processos normais de crescimento, os conteúdos de ERO nas células são baixos, sendo entorno de $240 \mu\text{M s}^{-1}$ de $\text{O}_2^{\cdot -}$ e $0,5 \mu\text{M}$ de H_2O_2 , no entanto, em plantas sob estresse o conteúdo de $\text{O}_2^{\cdot -}$ aumenta para $240\text{-}270 \mu\text{M s}^{-1}$ e o H_2O_2 aumenta para $5\text{-}15 \mu\text{M}$ (Polle, 2001). O ânion $\text{O}_2^{\cdot -}$ é produzido nos tilacóides e é produto da respiração aeróbica, onde cerca do 1 - 2% do O_2 consumido pelas plantas se transformam em $\text{O}_2^{\cdot -}$. O $\text{O}_2^{\cdot -}$ pode ser uma das primeiras ERO que se formam nas plantas, com um tempo de vida médio de aproximadamente 2-4 μs . O H_2O_2 é formado pela redução e dismutação do $\text{O}_2^{\cdot -}$. O H_2O_2 está começando a ser aceito como o mensageiro mais importante na sinalização gerada por ERO devido a sua possibilidade de atravessar as membranas celulares e seu tempo de vida médio (~1ms) (Gill e Tuteja, 2010; Mittler, 2002).

As vantagens das plantas utilizarem as ERO como moléculas sinalizadoras se deve à elevada capacidade das células vegetais para produzir e controlar seus níveis internos. Para isto é utilizado um complexo sistema de enzimas presentes na maioria dos compartimentos celulares. Nos mecanismos de ação e produção das ERO, foi recentemente conhecido que as *Rbohs*, um grupo de proteínas de membrana codificadas por uma multifamília de 10 genes em *Arabidopsis* (*AtRboh*), tem um papel fundamental (Mittler, 2002; Mittler, 2004; Suzuki et al., 2011). Estas informações são de grande importância, pois as *Rbohs* apresentam variadas funções nas plantas e se conhece que regulam os mecanismos de sinalização em resposta a estresses abióticos (Kwak et al., 2003; Miller et al., 2010). Além disso, as funções nos mecanismos de regulação *Rboh*-ERO nos processos de alongamento celular no crescimento de pelos radiculares têm sido comprovadas (Takeda et al., 2008).

2.3.2 As ERO e sua relação com os processos de crescimento e desenvolvimento do sistema radicular nas plantas

Nos últimos anos, tem-se relatado a participação das ERO em processos metabólicos associados a crescimento e desenvolvimento em plantas. Contrariamente ao conhecido há alguns anos, as ERO podem regular os processos de crescimento radicular por vias independentes aos fitohormônios como as auxinas. Em estudos realizados com raízes de plantas de *Arabidopsis*, foi identificado um fator de transcrição UPBEAT1 (**UPB1**), que regula o balanço entre a proliferação e diferenciação celular. Foi encontrado que o fator UPB1 regula diretamente uma série de POX que modulam a quantidade de ERO nas regiões de proliferação e alongamento celular quando os processos de diferenciação são iniciados. A perturbação de UPB1 em plantas mutantes traz como consequência uma alteração no balanço de ERO e um retardo nos processos de diferenciação radicular (Tsukagoshi et al., 2010).

Da mesma forma, já é conhecido que enzimas de sinalização como as NADHP oxidases e as fosfolipases D são de grande importância nos processos de emissão de pelos radiculares, isto porque, as ERO produzidas pelas NADHP oxidases ativam os canais de Ca^{2+} na membrana plasmática da região apical radicular, estimulando os influxos de Ca^{2+} , processos característicos do crescimento de raízes laterais (Šamaj et al., 2010).

A participação das ERO nos processos de permeabilidade e polarização de membrana abre novos caminhos para o entendimento dos mecanismos de adaptação das plantas diante ambientes adversos. Têm-se relatos de que as ERO podem atuar mecanismos de sinalização por meio da ativação dos canais de Ca^{2+} nas membranas celulares, sendo isto um dos passos mais importantes mediados pelas ERO na regulação das plantas a estresses, sinalização hormonal, crescimento polar e

desenvolvimento (Mori e Schoroeder, 2004). Dentre as ERO que participam nestes processos, se conhece que baixas concentrações de OH^\cdot induz o bombeamento de Ca^{2+} , enquanto altas concentrações de OH^\cdot induz à incorporação de Ca^{2+} por mecanismos passivos (Zepeda-Jazo et al., 2011). Em termos de desenvolvimento dos meristemas apicais, sua manutenção e estabelecimento dependem dos mecanismos para manter a homeostase das ERO. Assim, ambientes mais oxidantes, propiciam redução da proliferação celular, enquanto que, ambientes menos oxidantes ou redutores propiciam a mitoses e diferenciação celular (De Tullio et al., 2010)

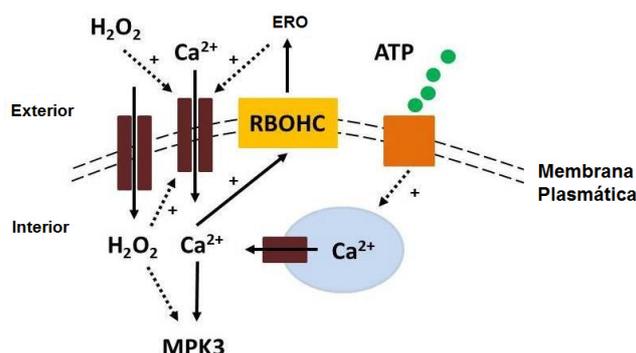


Figura 4. Esquema que relaciona uma possível via para a indução de MPK3 através da ação das ATP extracelulares e as ERO. Tomado e modificado de Demidchik et al. (2009).

2.4 Geração de ERO pela Aplicação de SH em Plantas

Como já abordado anteriormente, não é difícil entender por que a produção de ERO nas plantas em resposta a estímulos constitui um mecanismo eficiente para regular as várias rotas metabólicas.

Os estudos das respostas na geração de ERO exercidas nas plantas pela ação das SH não são muito abundantes, porém, as preocupações pela relação SH-ERO se iniciaram há algumas décadas. As SH isoladas de solo em suas frações (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e frações solúveis em água) têm mostrado estimular a produção *in vitro* de ânions $\text{O}_2^{\cdot -}$. O estudo realizado utilizando o sistema xanthine/xanthine-oxidase, mostrou que o grau de geração de $\text{O}_2^{\cdot -}$ depende do tipo de fração húmica. Os ácidos fúlvicos e a fração solúvel em água mostraram a menor efetividade para estimular a xantina/xantina-oxidase e com isto a geração de $\text{O}_2^{\cdot -}$, ao mesmo tempo, os ácidos húmicos exerceram o maior estímulo na produção de $\text{O}_2^{\cdot -}$ (Vaughan e Ord, 1982). O fato das SH estimularem a produção de $\text{O}_2^{\cdot -}$ através da regulação do sistema xantina/xantina-oxidase ganha importância, atendendo fundamentalmente ao papel chave que desempenha este sistema nos mecanismos de defesa contra estresse biótico (Berner e der Westhuizen 2010), assim como também diante estresses abióticos por metais pesados (Corpas et al., 2008).

A geração de ERO pela aplicação de ácidos húmicos foi também observada em plantas milho (*Zea mays* L). AH isolados de solo foram aplicados via radicular em plantas de milho submetidas a altas e baixas concentrações de N-NO_3^- . Estes estudos mostraram mediante técnicas de fluorescência a presença de ERO nas raízes das plantas para as três condições de crescimento (baixo N-NO_3^- , alto N-NO_3^- e sem N-NO_3^-). Ao mesmo tempo, a geração de ERO pela aplicação de ácidos húmicos nestas plantas e diante estas condições não impediu o estímulo no crescimento das raízes laterais e o aumento da biomassa radicular, indicando que as ERO geradas pelos ácidos húmicos podem participar como intermediários nos processos de ação destas

SH nas plantas (Cordeiro et al., 2011). As implicações destes resultados levam a reconsiderar as vias de ações das SH nas plantas conhecidas até hoje. É conhecido que durante o crescimento do coleóptilo de plantas de milho (*Zea mays* L) são liberadas ERO nas paredes celulares, especificamente o OH⁻ formado a partir do O₂⁻ na parede celular, podendo causar aumentos na extensibilidade da parede e substituir as auxinas na indução do crescimento (Schopfer et al., 2002).

Neste sentido, a ação das SH em plantas poderia passar por uma geração de ERO onde também seu controle no interior da célula envolve a regulação das TIPs, assim como também uma relação com o metabolismo do nitrogênio. A Figura 6 mostra que especificamente para a isoforma *OsTIP2;1*, tanto em folhas como em raízes, a maior concentração de AH exerceu efeito repressor na expressão deste gene.

Embora não se tenham conhecimentos sobre o papel das SH na regulação das TIPs e as suas funções, sabe-se que estas isoformas *TIP2;1* estão relacionadas ao transporte de N-NH₄⁺. Alguns estudos relatam que as *AtTIP2;1*, por exemplo, são induzidas em plantas em condições de longos períodos de deficiência de nitrogênio e curtos períodos de suplemento de N-NH₄⁺ (Lopez et al., 2003), assim como seu papel no transporte de amônio (Loque et al., 2005). Estes resultados de ação das SH na regulação das aquaporinas, especificamente as do tonoplasto, são de grande importância. Isto porque as aquaporinas desempenham várias funções de transporte de metabólitos em nível celular e são reguladas quando as plantas estão em condições de estresse abiótico como o hídrico e a salinidade (Guo-Wei et al., 2008).

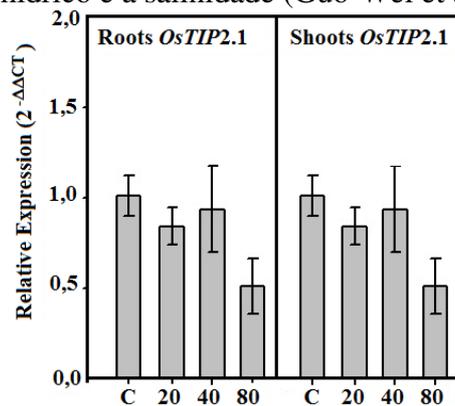


Figura 5. Comportamento da expressão gênica de genes *OsTIP2.1* em folhas e raízes de plantas de arroz após oito horas da aplicação radicular de ácidos húmicos em condições de hidropônica (Berbara e Garcia, 2014).

2.5 Relação das ERO com outras Rotas Metabólicas que respondem a SH

A geração de ERO nas plantas pela aplicação de SH impõe um entendimento dos conceitos mais atuais sobre seus mecanismos oxidativos. Dadas as evidências de que ocorre uma produção de ERO após aplicação radicular de SH, as funções destas nas respostas fisiológicas exercidas pelas SH nas plantas também devem ser explicadas.

Um dos modos de ação das SH nas plantas mais pesquisado em nível bioquímico é a sua ação semelhante às auxinas. Atualmente é reconhecido por um importante número de pesquisadores que fragmentos de SH podem entrar através do sistema radicular em plantas e exercer um efeito mimético às auxinas e serem reconhecidos pelo seu mesmo receptor hormonal nas células. Outros trabalhos relatam que nas SH existem fragmentos semelhantes estruturalmente às auxinas e que entram nas plantas exercendo também um efeito tipo auxina (Nardi et al., 2002). Em nível fisiológico e como resultado destes efeitos tipo auxina, o crescimento radicular e o

aumento na quantidade de raízes secundárias são os efeitos morfológicos mais visíveis das SH. Sendo assim, onde entrariam então as ERO nos mecanismos bioquímico-fisiológicos que explicam os modos de ação das SH em plantas?

Apesar de se ter como elemento fundamental o papel das auxinas na regulação do crescimento e desenvolvimento radicular, também a regulação redox tem um papel importante. A formação e preservação dos meristemas apicais radiculares dependem da homeostase das ERO nos tecidos vegetais. A regulação redox pode controlar processos bioquímicos ao longo da raiz e inclusive, regular a atividade das auxinas no crescimento radicular (De Tullio et al., 2010). Estudos de transcriptoma em plantas de *Arabidopsis* mostraram que a sinalização e homeostase das auxinas são modificadas pelas ERO no apoplasto. As ERO no apoplasto podem regular os transcripts de receptores auxínicos e repressores transcripcionais auxina/ácido 3-indol acético (Aux/IAA) mediante mecanismos ainda desconhecidos (Blomster et al., 2011).

Outros efeitos bioquímicos que tem sido relatados pela ação das SH nas plantas estão relacionados com os estímulos em nível de membrana, vários trabalhos relatam estímulos na atividade das H^+ -ATPase (Canellas et al., 2010; Mora et al., 2010). No entanto, as ERO têm mostrado desempenhar funções como moléculas sinalizadoras, funcionando por meio de mecanismos que envolvem a hiperpolarização da membrana, ativação dos canais de Ca^{2+} e sinalização intracelular, resultando em aumentos do crescimento das raízes secundárias. É conhecido que os ânions $O_2^{\cdot-}$ que se produzem no exterior das células pode ser transformado para H_2O_2 e radicais OH^{\cdot} . O H_2O_2 , por exemplo, é capaz de atravessar a membrana e se acumular intracelularmente. Mediante mecanismos que ainda se desconhece, o H_2O_2 poderia estimular os canais de Ca^{2+} intra ou extracelularmente, este estímulo na abertura dos canais de Ca^{2+} aumentaria o Ca^{2+} no citosol, conduzindo a estímulos das NADPH oxidase e indução de MPK3 (Demidchik et al., 2009). Esse tipo de respostas é encontrado também em diferentes regiões da raiz. Na região de alongamento e na epiderme madura das raízes, elevadas concentrações de H_2O_2 no apoplasto e no citosol respectivamente, poderiam ativar os canais de Ca^{2+} mediante hiperpolarização da membrana (Demidchik et al., 2007) (Figure 6).

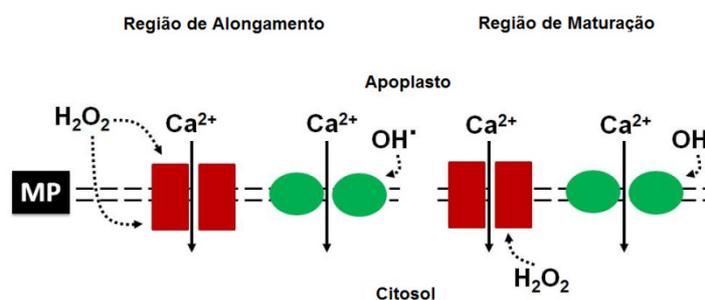


Figura 6. Efeitos das ERO nos canais de Ca^{2+} da membrana plasmática na região de alongamento e epiderme madura em raízes de plantas de *Arabidopsis*. Tomado e modificado de (Demidchik et al., 2007).

2.6 Outras Respostas Induzidas pelas SH no Metabolismo das Plantas

A maior vantagem que as SH apresentam nas suas ações em plantas, é a capacidade para exercer estímulos em várias rotas metabólicas. A fotossíntese é o processo metabólico fundamental de produção de O_2 e matéria orgânica no planeta, pelo que, seria de grande importância os estudos da influência das SH na regulação da fotossíntese nas plantas. Para estudar os efeitos das SH na fotossíntese, três frações húmicas (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e huminas) foram isoladas a partir de

amostras de solos e testadas em plantas de *Pachira macrocarpa*. As três frações de SH estimularam a atividade das clorofilases (a) e (b). Os ácidos fúlvicos mostram uma ação mais estimuladora sob a atividade das clorofilases (a), enquanto que os AH estimulam mais as clorofilases (b) (Yang et al., 2004). A influência das SH sobre os processos fotossintéticos foi também mostrada na aplicação de ácidos húmicos em plantas de alface (*Lactuca sativa* L.). AH isolados de solos de floresta, em concentrações de 100 e 1000 mg.L⁻¹ foram aplicados via radicular em solução nutritiva e estimularam a atividade fotossintética, os conteúdos de clorofilas e a condutância das células do mesófilo (Haghighi et al., 2012).

Considerando este tipo de ação das SH na fotossíntese, os efeitos no metabolismo do carbono (C) devem ser esperados como consequência na alteração da atividade fotossintética e conteúdos de pigmentos. Quatro frações de AH isolados de solos mostraram estimular a atividade de enzimas relacionadas com o metabolismo do C em plantas de milho (*Zea mays* L.). As enzimas testadas pertencentes ao metabolismo da via glicolítica (Glicoquinase (GK), fosfoglicose isomerase (PGI), PPI-dependente fosfofructoquinase (PFK), piruvatoquinase (PK) e do ciclo de Krebs (Citrato sintase (CS), malato desidrogenase (MDH), e isocitrato NADP⁺-isocitrato desidrogenase (NADP⁺-IDH), foram estimuladas pelas quatro frações húmicas (Nardi et al., 2007). Porém, as SH tem mostrado em alguns estudos, capacidade de modificar a atividade de enzimas do metabolismo do C e N dependendo da sua fonte de origem. Em estudos de avaliação da atividade de enzimas destes processos metabólicos em callus de *Pinus nigra* com AH isolados de solos de floresta e pasto, foi relatado que, para os AH de floresta, houve uma forte inibição da atividade de fosfoglicoisomerase (PGI), provocando inibição também da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), glutamato desidrogenase (GDH), malato desidrogenase (MDH) e glutamina sintetase (GS). No entanto, para os AH isolados de solos de pasto, houve um estímulo destas enzimas (Muscolo et al., 2007).

Por outro lado, qualquer ação no metabolismo primário das plantas pode ter repercussões no metabolismo secundário. O metabolismo primário fornece precursores e induz a atividade de enzimas do metabolismo secundário. A via metabólica de síntese de compostos fenilpropanoides constitui um dos enlaces mais especializados do funcionamento metabólicos em plantas. As enzimas Fenilalanina-Amonio-Liase (PAL) e a Tirosina-Amonio-Liase (TAL), duas enzimas que iniciam a biossíntese dos Fenilpropanoides, tomam como substratos a fenilalanina e a tirosina provenientes do metabolismo primário (Ferrer et al., 2008).

Os AH isolados de vermicomposto também tem mostrado exercer efeitos na via de síntese de Fenilpropanoides mediante a regulação das enzimas PAL/TAL. Concentrações de AH de 0,5; 1,0 e 2 mg (C).L⁻¹ estimularam a expressão dos genes que codificam para a PAL e a atividade enzimática da PAL e TAL em plantas de milho. Após 48 horas de tratamento, os conteúdos de fenóis e flavonóides nas plantas aumentaram como consequência do estímulo exercido na rota metabólica (Schiavon et al., 2010).

2.7 Estudo da Ação das SH por meio de Técnicas de Expressão Gênica

Pela diversidade de efeitos que as SH podem exercer nas plantas modificando seu funcionamento e adaptação, alguns trabalhos mostraram esta complexidade estudando-os mediante aplicação de técnicas de análises de expressão gênica em larga escala. As técnicas utilizadas no estudo de efeitos das SH em plantas até o presente tem sido cDNA-AFLP e Microarrays.

Trevisan et al.(2011), aplicaram a técnica de cDNA-AFLP em plantas de *Arabidopsis* sob tratamentos com SH. Para estes estudos foi usada uma combinação de 160 primers e foi detectado um total de 133 genes envolvidos nos efeitos exercidos pelas SH nas plantas. A técnica de cDNA-AFLP permitiu conhecer que do total do genes envolvidos na interação SH-plantas, um grande número está relacionado com processos metabólicos e de desenvolvimento, nos processos metabólicos do RNA ou de transcrição. Estes autores mostraram que como resultado da aplicação de SH nas plantas, do total de transcritos induzidos, 34 % pertence a processos metabólicos e 9 % a processos de estímulos a estresse. Os autores explicam que a técnica permitiu afirmar que as SH exercem seus efeitos nas plantas através de complexos mecanismos de ação que envolve em parte uma ação tipo auxínica, mas que também estão envolvidos outros mecanismos de sinalização independentes às auxinas (Figura 7A).

Os efeitos da aplicação de AH em plantas de *Brassica napus*, foram também estudados por técnicas de microarranjo. Alguns resultados quanto à função do grupo de genes diferencialmente expressos foram semelhantes aos relatados no trabalho com cDNA-AFLP (Trevisan et al., 2011). Os resultados neste trabalho relataram que quatro vias metabólicas fundamentais foram representadas por um baixo número de genes diferencialmente expressos, estes processos foram os de o metabolismo de ácidos graxos, fito-hormônios, senescência, desenvolvimento e transporte iônico. No entanto, outras vias metabólicas foram mais especificamente afetadas pela ação dos AH tanto em folhas quanto em raízes. Do total dos genes diferencialmente expressos, 10,6% pertence a processos gerais do metabolismo celular, 6,6% pertencem a processos do metabolismo do nitrogênio e enxofre, 6,1% ao metabolismo do carbono e a fotossíntese e 6,1% pertence à resposta a estresse (Jannin et al., 2012) (Figura 7B).

As técnicas de expressão em larga escala, são técnicas de elevadorendimentos e altamente precisas. Nos estudos relatados, foram usadas duas técnicas diferentes, SH de diferente procedência e plantas também diferentes. No entanto, em ambos os casos foram detectados que na aplicação de SH nas plantas não são exercidos efeitos somente pela via tradicional conhecida como tipo auxina, senão que também, existem outras vias independentes das auxinas que respondem à aplicação de SH. Genes envolvidos no funcionamento de outras vias de elevada importância nas plantas como a captação de nitrogênio e a fotossíntese são expressos pela aplicação de SH nas plantas. Assim, em ambas as técnicas foram encontradas que um número importante dos genes ou transcritos que respondem às SH estão relacionados com a resposta ao estresse. Estes resultados em conjunto, unificam e enlaçam os recentes relatos sobre a geração de ERO nas plantas quanto aplicados SH.

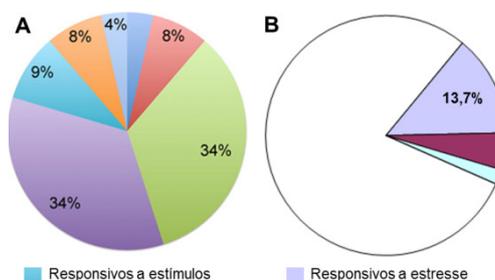


Figura 7. Gráficos que representam a percentagem de genes expressos pela aplicação de AH em dois estudos diferentes. **(A):** estudos com *Arabidopsis*, tomado de Trevisan et al. (2011). **(B):** estudos com *Brassica napus*, tomado de Jannin et al.(2012).

2.8 Evidências de Efeitos Protetores das SH nas Plantas em Condições de Estresse

A diversidade de efeitos exercidos pelas SH nas plantas parece indicar que dois eventos metabólicos conduzem seus modos de ação. A regulação na homeostase REDOX e sua relação com os processos de sinalização celular e controle hormonal, são os eventos mais visíveis quando se aplica SH nas plantas. No entanto, os mecanismos que explicam a relação entre as ERO e auxina na regulação antiestresse ainda não são bem compreendidos (Tognetti et al., 2012).

Neste sentido, compostos como o óxido nítrico (NO) tem mostrado ter um papel intermediário na ação das SH em plantas. Autores como Zandonadi et al. (2010), tem relatado que AH isolados de vermicomposto estimulam a biossíntese de NO em plantas de milho. Os autores mostraram que os AH estimularam a produção de NO nos sítios de emergência das raízes laterais. O estímulo na biossíntese de NO pelas SH pode indicar envolvimento deste modo de ação na regulação homeostática em plantas. Isto porque, o NO possui propriedades antioxidantes, atuando como molécula sinalizadora na síntese de enzimas relacionadas a catalises das ERO. O NO tem mostrado ter um papel importante na resistência das plantas a estresse abiótico (Siddiqui et al., 2011).

O NO tem mostrado também ser um intermediário importante nas vias de ação de ácido abscísico (ABA) na regulação dos estômatos. Assim mesmo, duas frações de SH de diferentes massas moleculares tem também mostrado regular a abertura dos estômatos. Estas SH mostraram exercer efeitos na abertura dos estômatos em plantas de *Pisum sativum* L. mediados por uma ação tipo auxina e através de um estímulo da Fosfolipase A₂ (Russell et al., 2006).

2.9 Evidências de Efeitos Protetores Antiestresse das SH em Plantas

Vistos os efeitos das SH na regulação tanto do metabolismo primário quanto do secundário nas plantas, alguns trabalhos estudaram a possibilidade de mitigar efeitos de alguns estresses abióticos como o estresse salino, hídrico e por metais pesados.

Plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) que se desenvolveram em solos salinizados artificialmente com várias fontes de sais, foram tratadas com doses de 0,05 e 0,1 % w:w aplicados no solo. As altas doses de sais no solo sem aplicação de AH ocasionou a morte das plantas, no entanto, nessas condições, os autores mostraram que não houve morte das plantas quando aplicados os AH. A aplicação de AH melhorou as condições de crescimento e desenvolvimento das plantas, assim como a assimilação de nitrogênio e fósforo (Aydin et al., 2011). Aplicações foliares de SH em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L) foram também testadas em condições de salinidade natural em solos. As SH aplicadas via foliar em dois momentos fisiológicos diferentes (10 e 15 dias após transplante), melhoraram as condições e qualidades internas dos frutos, quando comparadas às plantas crescidas em solos salino e sem aplicação de SH. Os resultados mostraram condições de pH interna nos frutos, graus BRUX, ácido málico, vitamina C e sais solúveis totais superiores às plantas sem aplicação de SH (Pérez et al., 2011).

AH isolados de Vermicomposto de esterco bovino, foram aplicados via radicular a plantas arroz sometidas a estresse. Os resultados mostraram que nestas condições, os AH estimulavam a atividade enzimática das peroxidases (POX), diminuindo a quantidade de H₂O₂ nos tecidos foliares e radiculares. Estes trabalhos mostraram inibição da peroxidação de lipídeos que se produz pelo efeito do estresse quando nas plantas foram aplicados os AH, assim, foi observada uma preservação na permeabilidade da membrana (Garcia et al., 2012). Estes mesmos AH foram também

testados aplicando-os via foliar a plantas de arroz plantadas em solo em condições de seca. A aplicação foliar de ácidos aumentou a atividade das enzimas POX, o que promoveu a proteção nas plantas que desencadeou na manutenção do seu crescimento e desenvolvimento, mesmo em condições de seca (Hernandez et al., 2012).

2.10 Relação Estrutura-Função na Interação das SH com elementos metálicos

Outra propriedade importante das SH e também relacionada às características estruturais é sua capacidade para interagir com íons metálicos. Esta capacidade influencia as características e qualidade dos solos, repercutindo de forma direta nas plantas. As SH podem estabelecer compostos complexos com íons metálicos, com diferentes estabilidades e características químicas. Este tipo de interações interfere nas propriedades do solo porque vários processos de disponibilidade e forma química dos elementos metálicos estão dominados pelas SH, assim, processos importantes para o desenvolvimento das plantas como precipitação-dissolução, troca iônica, mobilidade, transporte e acumulação, atividade química e bioquímica dos metais entre outros, são em grande parte determinados pelas SH (Senesi et al., 1986).

Uma característica estrutural importante das SH que lhes permite interagir com os íons metálicos é sua elevada quantidade de grupos funcionais oxigenados (CO_2H , OH de fenóis, $\text{C}=\text{O}$) através dos quais as SH podem estabelecer ligações complexas mais estáveis que os presentes no solo e disponibilizar os elementos metálicos (Schnitzer, 1978). Vários estudos na literatura científica relatam a capacidade das diferentes frações húmicas para interagir com elementos metálicos. AH isolados de solos tem provado ter capacidade para formar compostos complexos com íons Al^{3+} (Gerke et al., 1994). Os FA também têm elevada capacidade para formar ligações com os elementos Cu^{2+} e Ca^{2+} (Iglesias et al., 2003). Alguns destes estudos têm conduzido a propor mecanismos para a interação das SH com os íons metálicos (Figure 8).

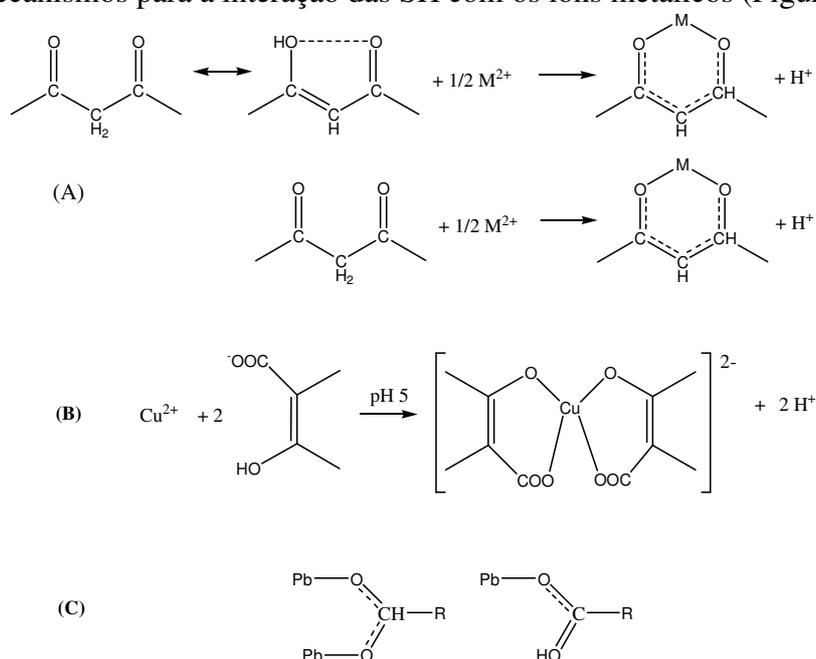


Figura 8. Mecanismos e compostos propostos para a interação de alguns grupos funcionais das SH com íons metálicos de Pb^{2+} e Cu^{2+} . (A): tomado de Piccolo e Stevenson, (1982); (B): tomado de Schnitzer, (1978) e (C): tomado de Jerzykiewicz (2004).

Os estudos da retenção entre as SH e os metais são também complexos e em ocasiões, aproximações têm de ser feitas. Em trabalhos realizados por Plaza et al. (2005), foram isolados os AH de dois tipos de solos diferentes para estudar o processo de formação de complexos utilizando o Cu^{2+} . No estudo foi assumida uma relação estequiométrica entre o metal e o ligante de 1:1, onde cada metal se liga somente a um sítio de ligação e não incluindo nas análises, interações de outras naturezas.

Pela complexidade estrutural dos AH, em muitos dos estudos há dificuldade para modelar matematicamente os dados de retenção e ajustá-los a alguma isoterma conhecida. No entanto, segundo Alvarez-Puebla et al. (2004), é possível fazer aproximações nos fenômenos de retenção que permitam modelar os processos de ligações químicas entre o metal e as SH, onde o cátion metálico se encontra como átomo central ou o aquocomplexo formando ligações de coordenação com oxigênios presentes na estrutura húmica (Figura 9).

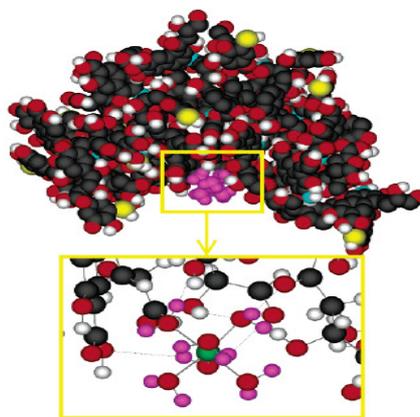


Figura 9. Modelação do mecanismo de formação de complexo entre os AH e a espécie metálica. Verde: cátion metálico (Alvarez-Puebla et al., 2004).

Neste sentido, na maioria dos trabalhos onde se estuda a possibilidade de aplicar um modelo para explicar as interações entre metais e SH, houve necessidade de realizar aproximações. Em um estudo de formação de complexos entre Urânio e AH e AF, foi possível obter informações sobre as características da retenção quando se assume que as reações entre metal e SH acontecem sem uma estereoquímica definida. Isto reafirma que este tipo de interação acontece nas SH por meio de ligações de diferentes naturezas e com diferentes tipos de grupamentos funcionais (Lenhart et al., 2000).

Os relatos na literatura sobre a interação SH-metal, indicam que o entorno químico influencia as características da retenção. Tem sido mostrado que nestas interações, três aspectos devem ser observados, (i) a elevada diversidade de sítios de ligação disponíveis nos materiais humificados, (ii) a variabilidade na estereoquímica das reações e (iii) a presença de interações de tipo eletrostáticas (Koopal et al., 2001).

3. CAPÍTULO I

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICO- ESPECTROSCÓPICA DAS FRAÇÕES HÚMICAS OBTIDAS A PARTIR DE UM VERMICOMPOSTO DE ESTERCO BOVINO

3.1 RESUMO

A caracterização das substâncias húmicas (**SH**) constitui um passo necessário para entender as diferentes funções e propriedades destes compostos. Estudos mais recentes confirmam que as SH apresentam uma conformação supramolecular com arranjos estruturais que dependem das características químicas de suas subunidades húmicas. Atualmente, os estudos sobre as SH e as suas funções requerem tanto de uma caracterização estrutural inicial quanto do uso destas técnicas para justificar seus efeitos. Por estes motivos, este capítulo teve como objetivo estudar as características estruturais de duas frações húmicas isoladas de vermicomposto de esterco bovino (**VC**) mediante aplicação de diferentes técnicas de elucidação estrutural (composição elementar, FTIR, CP MAS¹³C RMN, Py-CG/MS, MEV, EDX e APCI-MS). A partir do VC de esterco bovino, foram isoladas e purificadas duas frações humificadas, uma é proveniente da fração solúvel, constituída pelos ácidos húmicos (**AH**), e a fração residual do processo de extração das SH ao VC: (**RH**). Embora a conhecida complexidade dos materiais humificados para ser elucidados estruturalmente, neste capítulo foi possível realizar uma caracterização suficientemente exaustiva, mediante técnicas químico-físicas, espectroscópicas e espectrométricas que forneceram informações sobre a composição elementar, grupamentos funcionais, tipo de estrutura de acordo à configuração do carbono, tipo de fragmento mediante duas técnicas diferentes e a sua morfologia, o que permitiu obter informação química-estrutural suficiente para justificar as propriedades e funções futuramente estudadas. Ambas as frações AH e RH apresentaram uma distribuição estrutural semelhante às relatadas na literatura. Quando comparadas as duas frações, AH mostrou maior caráter aromático, justificado por baixos valores das relações H/C e E₄/E₆, bandas no espectro IV entre 1500 cm⁻¹ e 1650 cm⁻¹ e uma aromaticidade de 28% com picos entre 90-142 ppm no espectro ¹³C RMN, pertencentes a C_{Ar-H,R} e C_{Ar-O}. A Py-CG/MS também mostrou maiores conteúdos em AH de substâncias com características aromáticas (ligninas) do que em RH. A fração RH mostrou características estruturais mais alifáticas e oxigenadas. Isto foi justificado por uma maior relação O/C em RH, bandas intensas entre 1100 cm⁻¹ e 1259 cm⁻¹ (ésteres e C-O) e uma alifaticidade igual a 89% com picos entre 0-46 ppm (C_{Alq-H,R}), 50-91 ppm (C_{Alq-O}) e 156-186 ppm (C_{COO-H,R}). A Py-CG/MS mostrou maior quantidade de hidrocarboneto, álcoois e ésteres de ácidos graxos em RH do que em AH. A técnica APCI-MS foi eficiente para mostrar a distribuição na formação de íons positivos e negativos em RH. Tanto os íons negativos quanto os positivos apresentam na sua estrutura elevada quantidade de grupos ionizáveis e também maior diversidade de íons negativos do que positivos.

Palavras-chave: Substâncias húmicas. Espectroscopia. Grupos funcionais

3.2 ABSTRACT

Characterization of humic substances (HS) is a mandatory step to understand different functions and properties of these compounds. According to the latest studies it has been confirmed that these materials have a supramolecular conformation with structural rearrangements that depend on their chemical subunits characteristics. Currently, studies on SH and its functions require an initial structural characterization. Thus this work aimed to study the structural characteristics of two humic fractions isolated from cattle manure vermicompost (VC) by different structural elucidation techniques (elemental composition, FTIR, ^{13}C CP MAS RMN, Py-GC/MS, SEM, EDX and APCI-MS). From the manure VC were isolated and purified two humidified fractions, one corresponding to the soluble fraction, consisting of humic acids: AH, and the residual fraction of the isolation process of the AH from VC: RH. Although the known structural complexity of the humified materials an exhaustive characterization was possible with physical-chemical spectroscopic and spectrometric techniques, provided information on the elemental composition, functional groups, structure type according to the configuration of carbon fragment type using two different techniques and morphology, which allowed obtaining the structural basis capable to justify properties and functions. Both fractions AH and RH showed a distribution similar to the structure reported in the literature. When comparing fractions, AH showed higher aromatic character than RH, justified by a low H/C ratio and E_4/E_6 , resolved bands between 1500 cm^{-1} and 1650 cm^{-1} , an aromaticity equal to a 28% with peaks between 90 -142 ppm belonging to $C_{\text{Ar-H,R}}$ and $C_{\text{Ar-O}}$. The Py-CG/MS also showed higher contents of substances AH aromatic characteristics (lignin) than in RH. The RH fraction showed structural features more aliphatic and oxygenated than AH. This was justified by a higher O/C ratio RH, intense band between 1100 cm^{-1} and 1259 cm^{-1} (ester and C-O) and an aliphaticity equal to 89% with a peak between 0-46 ppm ($C_{\text{Alq-H,R}}$), 50-91 ppm ($C_{\text{Alq-O}}$) and 156-186 ppm ($C_{\text{COO-H,R}}$). The Py-CG/MS showed higher amounts of hydrocarbons, alcohols and esters of fatty acids RH than AH. The APCI-MS technique was effective to show the distribution in the formation of positive and negative ions in RH. Both negative ions as positive ones present in its structure high amount of ionizable groups, it was also detected a greater diversity of negative ions than positive ones.

Keywords: Humic Substances. Spectroscopy. Functional groups.

3.3 INTRODUÇÃO

Para melhor entender as propriedades e funções das SH é importante conhecer as suas características estruturais. Segundo os estudos em “*Humeomica*”, introduzidos por Nebbioso e Piccolo (2011) e (2012), as SH apresentam uma organização estrutural supramolecular, distribuídos em estruturas hidrofóbicas de maior tamanho e outras hidrofílicas menores. As frações hidrofóbicas estão compostas fundamentalmente por frações húmicas de cadeias alifáticas lineares e anéis aromáticos condensados, enquanto as frações hidrofílicas estão compostas por frações húmicas mais irregulares. Desta forma, é entendido que o arranjo estrutural supramolecular das SH é o resultado de uma associação não uniforme de moléculas húmicas heterogêneas, interagindo em função de seu tamanho, forma, afinidade química e hidrofobicidade.

A diversidade e complexidade estrutural fazem com que na caracterização das SH sejam utilizadas as mais variadas técnicas de caracterização estrutural. De forma geral, as técnicas buscam tanto elucidar as estruturas húmicas como também justificar as diversas propriedades que elas apresentam. Dentre as técnicas mais utilizadas e só para citar algumas, se encontram as espectrofotométricas (UV-vis e Fluorescência), as espectroscópicas (FTIR, RMN¹³C e ¹H), as espectrométricas (espectrometria de massas), as cromatográficas (HPSEC-cromatografia de exclusão por tamanho de alta resolução) e as microscópicas (MEV), assim como as diferentes combinações destas.

Na interpretação estrutural das SH, as técnicas são utilizadas de forma simultânea. Combinando técnicas de FTIR e ¹³C RMN, foi possível monitorar a persistência de componentes estruturais da matéria orgânica humificada nos solos (Ferrari et al., 2011; Pérez et al., 2008). Uma combinação de técnicas de composição elementar, FTIR, ¹³C RMN e Py-GC/MS foram usadas para estudar a influência da temperatura na estrutura de SH aquáticas (Lu et al., 2001). Também Nebbioso e Piccolo (2012) utilizaram a técnica de HPSEC para estudar a conformação estrutural e distribuição espacial do rearranjo supramolecular das SH. A evolução do estado de maturidade de compostos e VC têm sido também estudadas usando combinações de técnicas de ¹³C RMN e Py-GC/MS (Balmori et al., 2013; Spaccini e Piccolo, 2007).

No estudo da relação estrutura-função das SH se utilizam as técnicas de caracterização. A relação entre o crescimento radicular em plantas e a hidrofobicidade nas estruturas dos AH, foi caracterizada mediante CP MAS¹³RMN, ¹H-RMN (2D DOSY) e HPSEC (Canellas et al., 2009). Utilizando DRIFT e CP MAS¹³RMN, foi relatado que as estruturas *O*-CH₃, aromáticas, *O*-aromática e -COOH nos AH são positivamente correlacionada com a bioatividade (Aguiar et al., 2013). Por outro lado, em estudos de interações de materiais humificados com metais, Nebbioso e Piccolo, (2009) mostraram mediante CP MAS¹³RMN, ¹H-RMN (2D DOSY) que os ácidos carboxílicos são os grupos funcionais mais envolvidos na interação entre AH e os cátions Al³⁺ e Ca²⁺. Jerzykiewicz (2004), mostrou mediante espectroscopia de ressonância paramagnética (EPR), que na interação entre AH e o íon Pb (II), são formados novos radicais livres orgânicos. Urdaneta et al. (2008), estudaram a interação entre VC e Pb, Ni, V e Cr utilizando energia dispersiva de raios X (EDX).

Devido à importância da caracterização estrutural das SH, o presente capítulo tem como objetivo, caracterizar as frações húmicas isoladas do VC mediante diferentes técnicas químico-físicas que forneçam as informações suficientes para justificar as propriedades e funções futuramente estudadas em AH e RH.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Origem do vermicompost de esterco bovino como material de partida

As frações humificadas usadas no estudo foram obtidas a partir de vermicomposto de esterco bovino processado com minhocas vermelhas africanas (*Eudrilus eugeneae* spp.) em pilhas sobre solo durante três meses (90 dias). O esterco bovino usado como matéria prima foi proveniente das vacarias da Finca “El Guayaval”, localizado em San José de Las Lajas, Província de Mayabaque, Cuba, Latitude: 22°59'55.95"N e Longitude: 82°10'10.27"O. O processo de compostagem seguiu os procedimentos estabelecidos nos manuais técnicos de Reine, (1998).

3.4.2 Obtenção dos AH A partir do VC de esterco bovino

Os AH foram isolados e purificados a partir do VC segundo as recomendações da Sociedade Internacional de Sustâncias Húmicas (IHSS, 2010). Resumidamente, uma solução de NaOH (0,1 mol L⁻¹) foi adicionada a uma massa de VC sob atmosfera de N₂ (g) em uma relação 1:10 (m:v) durante 24 horas. A seguir a suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm durante 30 minutos e o sobrenadante coletado e filtrado com papel de filtro. A este sobrenadante ajustou-se o pH até 1,5 mediante adição de HCl (6 mol L⁻¹) para a precipitação dos AH. Após 10 horas, a fração de ácidos fúlvicos na fase líquida foi eliminada mediante procedimentos de centrifugação. Os AH precipitados foram novamente redissolvidos em NaOH (0,1 mol L⁻¹) e precipitados com HCl (6 mol L⁻¹). Esse processo foi repetido três vezes. Após reprecipitação, os AH foram agitados por 24 horas em contato com uma solução de HCl:HF:H₂O em proporção 1:1:98 (v/v) para aproximadamente 100 mL g (AH) para a remoção de elementos minerais. A suspensão foi novamente centrifugada para eliminação da solução ácida e os AH lavados com água destilada. Posteriormente os AH foram transferidos para uma membrana de diálises (14 kDa cut-off) e o processo realizado em água destilada até o teste negativo para íons Cl⁻ usando AgNO₃ (0,1 mol L⁻¹). A seguir os AH são liofilizados e guardados em dessecador.

3.4.3 Obtenção de RH a partir do VC de esterco bovino

O sólido residual que ficou após a extração das SH do VC (item 3.2.2), foi lavado em meio ácido (HCl 0,1 mol.L⁻¹) até pH próximo à neutralidade. A seguir, o sólido foi lavado abundantemente com (H₂O)_d para total eliminação dos íons Cl⁻ até teste negativo com AgNO₃ (0,1 mol L⁻¹) das águas do lavado. As partículas menos densas (fração não humificada) foram eliminadas por centrifugação a 10.000 rpm e o sólido foi secado a 103 °C (García, 2007).

3.4.4 Caracterização químico-física e espectroscópica dos materiais humificados

3.4.4.1 Composição elementar e espectroscopia UV-vis

A composição elementar (C, H, N) foi determinada utilizando um aparelho LECO Trupec® CHN e o oxigênio foi determinado por diferença. Foi utilizada uma massa de 15 mg de cada material (AH, RH e VC) e as avaliações foram realizadas por triplicata.

A espectroscopia na região UV-vis foi realizada segundo a metodologia de Santos e Camargo (1999). Uma massa de 2 mg de AH foram dissolvidos em 10 mL de uma solução de NaHCO₃ (0,05 mol.L⁻¹) em um aparelho Raylight 2100 com medições automáticas dos valores de absorbâncias entre 220-680 nm. Foram medidas especificamente as absorbâncias nas regiões entre 465 nm e 665 nm para determinar a relação E₄₆₅/E₆₆₅ (E₄/E₆).

3.4.4.2 Caracterização mediante espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear em estado sólido (CP MAS ¹³C- RMN)

Os espectros FTIR foram obtidos na faixa de 4.000 -400 cm⁻¹, a preparação da amostra foi mediante pastilhas de KBr (200 mg)/ AH (5 mg) (VERTEX 70 FTIR Series Spectrometer Bruker)

A espectroscopia de polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico CP MAS ¹³C- RMN foi realizada no aparelho Bruker AVANCE II RMN a 400 MHz, equipado com probe de 4 mm Narrow MAS e operando em sequência de ressonância de ¹³C a 100.163 MHz. Para a obtenção dos espectros, as amostras dos materiais humificados foram colocadas em um rotor (porta-amostra) de Dióxido de zircônio (ZrO₂) com tampas de Kel-F sendo a frequência de giro de 8±1 kHz. Os espectros foram obtidos pela coleta de 2048 data points para igual número de scans a um tempo de aquisição de 34 ms e com recycle delay de 5 s. O tempo de contato para a sequência em rampa de ¹H ramp foi de 2 ms. A coleta e elaboração espectral foi realizada utilizando o Software Bruker Topspin 2.1. Os decaimentos livres de indução (FID) foram transformados aplicando um zero filling igual a 4 k e posteriormente um ajuste por função exponencial (line broadening) de 70 Hz. A relação entre o índice de hidrofobicidade e índice de hidrofiliidade (**HB/HI**) foi calculado como segue: HB/HI= (0 ppm-46 ppm) + (110 ppm-156 ppm)/ (46 ppm-110 ppm)+(156 ppm-186 ppm).

3.4.4.3 Caracterização mediante Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de Raios X (EDX)

A caracterização morfológica do VC e as frações AH e RH foi realizada mediante a obtenção das imagens microscópicas por *scanning* superficial. As amostras foram cobertas com uma fina camada de ouro, com tempo de deposição do ouro de 120 segundos e cobertura de 5 nm de espessura. Posteriormente, foi analisado em microscópio eletrônico de varredura Carl Zeiss, modelo EVO MA10, em alto vácuo, utilizando voltagem de 10KV.

A identificação dos elementos inorgânicos em ambas as frações foi realizada mediante análises nas regiões mais luminosa, e onde foram obtidos os difratogramas de energia dispersiva de raios X. Para RH foi utilizada uma escala máxima de 342 c.t.s e uma energia de 6,796 keV (1 c.t.s). No HA a escala máxima utilizada foi de 304 c.t.s e uma energia de 6,830 keV (4 c.t.s).

3.4.4.4 Caracterização mediante Pirólise off-line com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH), *Off line* Py-TMAH-CG-MS

A pirólise das amostras de vermicomposto foi conduzida segundo protocolo de Spaccini e Piccolo, (2007) com algumas modificações. Amostras de materiais humificados (200 mg) foi colocada em um recipiente de quartzo e misturada com 1 mL de uma solução de TMAH em 25% de metanol. A mistura foi seca em um dessecador com P₂O₅ durante 24 h aproximadamente. A amostra foi introduzida dentro do reator tubular Pyrex (50 cm x 3,5 cm) e aquecida a 400 °C durante 30 minutos em um forno “Barnstead Thermolyne 21100 Furnace”. Os produtos liberados na termoquímica foram continuamente transferidos por um fluxo de gás hélio (10 mL min⁻¹) para dois recipientes contendo cada um 50 mL de clorofórmio. Os recipientes com o clorofórmio estavam conectados em série e mantidos em banho de gelo. As soluções de clorofórmio foram combinadas e concentradas por rotoevaporação. O resíduo foi redissolvido com 1 mL de clorofórmio e transferido

para um frasco de vidro que foi estocado no freezer para posterior análise por CG-EM. Para todas as amostras de vermicompostos foram conduzidas três repetições. Para a análise quantitativa, foram construídas curvas de calibração externa, desenvolvendo a pirólise nas mesmas condições de uma mistura dos seguintes padrões: ácido cinâmico, ácido 16-hidroxi hexanodecanoico, ácido docosanoico e β -sitosterol.

A cromatografia a gás acoplada à Espectrometria de Massas foi conduzida em um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu GCMS-QP 2010 plus equipado com uma coluna capilar RTX-5MS WCOT (Restek, 30 m x 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 μ m) acoplada através de uma linha de transferência de calor (310 °C) com o espectrômetro de massa quadrupolo. A separação cromatográfica foi feita com a seguinte programação de temperatura: 60 °C (1 min isotérmico), elevando a 7 °C/min até 100 °C (10 min isotérmico) e logo a 4 °C/min até 320 °C. Hélio foi o gás carreador (1,90 mL. min⁻¹), a temperatura do injetor foi de 250 °C e o modo de injeção split foi de 10 mL. min⁻¹. O espectro de massa foi obtido com modo de ionização de impacto de elétrons (70 eV) em uma faixa de m/z de 45-650 com um ciclo de tempo de 1 s. A identificação dos compostos baseou-se na comparação com espectros de massa registrados na livreria NIST08, espectros publicados e padrões empregados.

3.4.5 Caracterização mediante espectrometria de massas APCI-MS de RH

A espectrometria de massa para foi realizada mediante a utilização da técnica APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionizations*). Os tempos de experimentação foram de 0,187 minutos, sendo para os positivos de 0,1 minutos até 0,287 e para os negativos, de 0,146 até 0,333 minutos. Os espectros foram obtidos em uma faixa de 1300 a.m.u até 100 a.m.u de relação massa/carga. A faixa de intensidade máxima selecionada foi de 0,0 c.p.s até 8,0 c.p.s. Os espectros foram obtidos no equipamento (Finnigan TSQ-7000) com temperatura do capilar de 222 °C.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Composição elementar e relação E_4/E_6 (UV-vis) do VC, AH e RH

Os valores de cada elemento obtido nas frações se encontram na faixa dos apresentados como padrões pela IHSS (Tabela 2). As frações apresentaram valores H/C menores que o apresentado pelo VC de partida, indicando que durante o processo de vermicompostagem houve enriquecimento aromático das SH. A fração RH teve o maior valor H/C quando comparada com AH, possivelmente devido a um predomínio de estruturas não humificadas ou em um estágio inicial de humificação. Uma relação H/C, maior que 1 (um), indica um relativo baixo grau de condensação aromática e pouca substituição nos anéis aromáticos (Chai et al., 2007). Segundo Amir et al. (2010), no processo de compostagem, ocorre uma diminuição da relação H/C, o que indica um aumento na incorporação de estruturas aromáticas nas frações húmicas. Segundo o obtido nestas relações, a fração AH apresenta maior aromaticidade que RH.

A relação O/C das frações AH e RH permaneceu ligeiramente semelhante ao VC, embora, o ligeiro aumento encontrado em RH pode significar maior presença de estruturas alifáticas oxigenadas nesta fração quando comparado com o valor de AH. Autores como Chai et al. (2007) e Lu et al. (2000), relatam que um aumento desta relação indica presença de estruturas *O*-alquila na composição estrutural.

A relação C/N da fração RH foi maior quando comparada com o VC de partida. Segundo Chai et al. (2007) e Campitelli e Ceppi (2008), a relação C/N entre 10-20 podem ser considerados como elevados e indica presença de fragmentos vegetais na estrutura do material. Tanto para o VC quanto para as frações húmicas, estes valores são semelhantes aos relatados na literatura (Campitelli e Ceppi, 2008). No entanto, a maior relação em RH pode também justificar a presença de estruturas pouco humificadas ou ênfases iniciais do processo.

A relação E_4/E_6 da fração AH (Tabela 2) apresentou um valor semelhante aos AH de compostos e vermicompostos obtidos na literatura. Romero et al. (2007) relatou valores de AH isolados de diferentes vermicompostos entre 4,7-5,1. Entretanto, Senesi et al. (2007) reportaram valores de 8,5 para AH de VC de esterco bovino, assim como Campitelli e Ceppi (2008), relataram que AH de VC apresentam valores entre 8,34-8,77.

Tabela 2. Composição elementar, relações atômicas e relação E_4/E_6 (UV-vis) do VC, AH e RH.

	Composição Elementar						UV-vis		
	C	H	N	S	O*	H/C	O/C	C/N	E_4/E_6
			% m:m						
VC	48,3	6,1	2,8	3,8	38,2	1,51	0,59	20,1	---
AH	51,0	5,0	3,6	0,7	39,1	1,18	0,57	16,5	4.22
RH	50,2	6,2	2,0	1,8	39,8	1,48	0,59	29,4	---

*Oxigênio: Obtido por diferença

3.5.2 Caracterização mediante espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros FTIR do VC e as duas frações húmicas, mostram características semelhantes aos padrões relatados pela IHSS (Figura 10). Nos espectros se evidencia um predomínio de bandas centralizadas entre 3402,33-3429,33 cm^{-1} pertencentes a vibrações de estiramentos de O-H (carboxilas, álcoois, fenóis) e/ou N-H (amino, amida). As bandas entre 2920-2850 cm^{-1} foram assinaladas a vibrações de

estiramentos de grupos alifáticos C-H, assimétricos e simétricos (CH₂ e CH₃). As bandas presentes em 1721-1714 cm⁻¹ pertencem a vibrações de estiramentos de grupos C=O (carboxilas, carbonilas e cetonas). Houve também predomínio de bandas entre 1649-1604 cm⁻¹ que pertencem a vibrações de estiramentos C=C (aromáticos e olefínicos) e C=O (amidas I, cetonas e quinonas). Bandas entre 1512-1548 cm⁻¹ correspondem a estiramento C=C (aromático, estruturas lignínicas), deformações N-H e estiramento C-N (amidas II). O espectro mostrou bandas entre 1402-1460 cm⁻¹ pertencentes a estiramentos assimétricos CH₂, estiramentos simétricos de COO⁻ (carboxilatos), estiramentos C-O e deformação O-H (fenóis) e estiramentos C-H (CH₃). As bandas presentes entre 1330-1384 cm⁻¹ são assinaladas a deformações de ligações C-H de CH₂ e CH₃ e vibrações de estiramentos assimétricos de COO⁻. Bandas também presentes entre 2220-1259 cm⁻¹ foram assinaladas a estiramentos C-O (ésteres arílicos e fenóis) e C=O (ésteres arílicos). Entre 1033-1099 cm⁻¹, as bandas no espectro se correspondem com estiramentos C-O (carboidratos e polissacarídeos) (Shirshova et al., 2006; Muscolo et al., 2007; Droussi et al., 2009; Amir et al., 2010; Li et al., 2011; Russell et al., 2006).

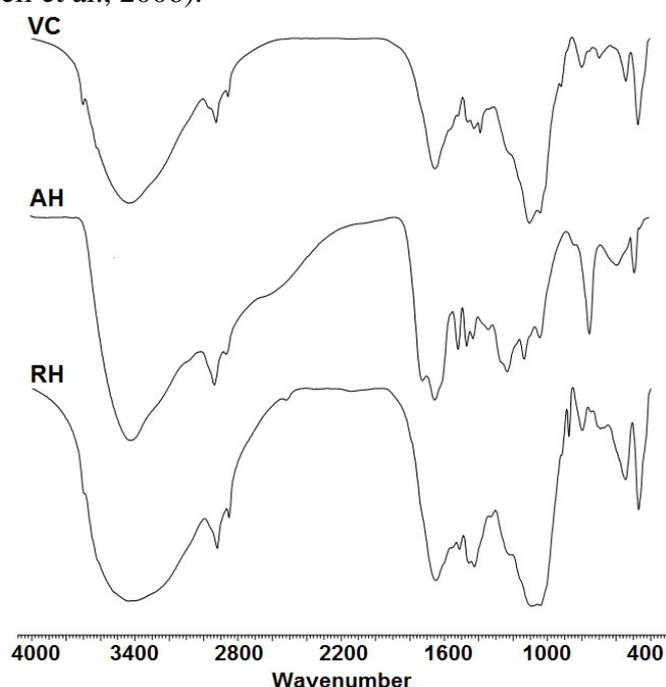


Figura 10. Espectros FTIR do VC e as frações húmicas isoladas.

Algumas particularidades nas estruturas das frações húmicas podem ser detectadas nos espectros FTIR. No caso do AH, existiu presença da banda em 1714,66 cm⁻¹ melhor resolvida que nos espectros de VC e RH, isto pode ser indicativo de que os grupamentos carboxilas em AH podem estar menos envolvidos com os entornos químicos da supraestrutura húmica. As bandas em 1604,72 cm⁻¹, e entorno a 1510,21 cm⁻¹, assinaladas a estiramentos C=C aromáticos e de esqueletos estruturais de lignina, mais resolvidas em AH, indicam maior caráter aromático desta fração quando comparada com RH e VC. Características como as encontradas neste trabalho, têm sido também relatadas na literatura. Mediante a técnica de FTIR foi detectada bandas em 1720 cm⁻¹ pertencentes a vibrações C=O de -COOH, assim como bandas entorno de 1610 cm⁻¹ correspondentes a vibrações C-O de COO⁻ (Terghi et al., 2008, Xiaoli et al., 2007).

3.5.3 Ressonância magnética nuclear do isótopo de carbono de massa treze com rotação no ângulo mágico e polarização cruzada (^{13}C RMN CP/MAS)

Os espectros correspondentes ao VC de partida e suas frações extraídas são mostradas na Figura 11. Estes espectros mostraram semelhanças na “assinatura” espectral aos obtidos na literatura por Nebbioso e Piccolo, (2011) para compostos, suas frações humificadas solúveis e AH isolados de solo. A distribuição relativa do carbono em cada região do espectro mostra um predomínio de estruturas $\text{C}_{\text{Alq-H,R}}$, $\text{C}_{\text{Alq-O,N}}$ e $\text{C}_{\text{Alq-O}}$ nos três materiais (Tabela 2). A respeito das duas frações isoladas de VC, a fração RH mostrou maior quantidade de estruturas com características alifáticas e alifáticas oxigenadas ($\text{C}_{\text{Alq-H,R}}$ e $\text{C}_{\text{Alq-O}}$) quando comparada com a fração AH. Nesta última, as estruturas mais predominantes foram as de características aromáticas ($\text{C}_{\text{Ar-H,R}}$ e $\text{C}_{\text{Ar-O}}$) quando comparada com RH. Estas características estruturais mostram que AH apresenta um valor de aromaticidade superior ao apresentado por RH (28,7% e 10,52%) respectivamente (Tabela 2).

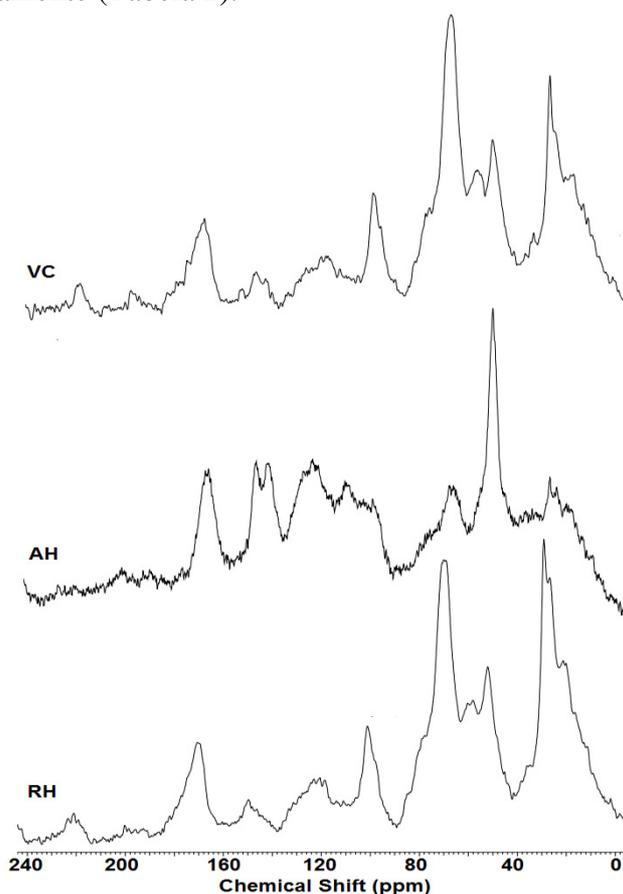
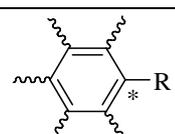
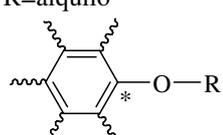
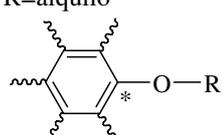
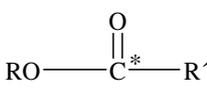
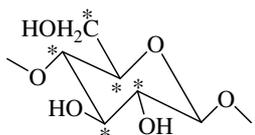
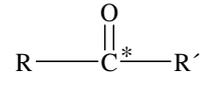
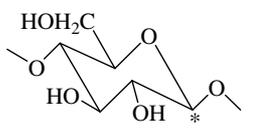


Figura 11. Espectros ^{13}C -CP MASRMN dos materiais humificados VC, AH e RH.

Comparando as características espectrais das frações, a presença de uma maior alifaticidade em RH, confirma o observado nas avaliações de composição elementar, onde foi relatado um maior valor de H/C em RH do que em AH. Predomínio de estruturas alifáticas $\text{C}_{\text{Alq-H,R}}$ e $\text{C}_{\text{Alq-O}}$ em RH, também indica que esta fração pode estar composta por substâncias no estágio inicial de humificação. Este resultado pode ser confirmado através dos encontrados por Spaccini e Piccolo, (2007). Estes autores relatam que em um material compostado (composto) menos maduro, as estruturas mais dominantes são as de características alifáticas ($\text{C}_{\text{Alq-H,R}}$ e $\text{C}_{\text{Alq-O}}$).

Tabela 3. Distribuição relativa (% da área total) das regiões de deslocamento químico (ppm) nos espectros ^{13}C CP MAS RMN do VC, AH e RH. Assinalamento dos picos no espectro segundo o deslocamento químico (ppm) (Keeler et al., 2006).

Distribuição relativa (% da área total) do espectro ^{13}C -CP/MAS MNR							
	$\text{C}_{\text{Alq-H,R}}$ 0-46	$\text{C}_{\text{Alq-O,N}}$ 46-59	$\text{C}_{\text{Alq-O}}$ 59-91	$\text{C}_{\text{Alq-di-O}}$ 91-110	$\text{C}_{\text{Ar-H,R}}$ 110-142	$\text{C}_{\text{Ar-O}}$ 142-156	$\text{C}_{\text{COO-H,R}}$ 156-186
	-----%						
VC	28,57	12,24	28,57	8,16	8,16	3,06	8,16
AH	22,44	16,33	11,22	9,18	21,42	7,14	8,16
RH	33,68	11,57	26,31	7,36	8,42	2,10	8,42
Assinalamento dos picos predominantes no espectro ^{13}C -CP/MAS MNR							
AH ^{13}C (ppm)	RH ^{13}C (ppm)	Estruturas		AH ^{13}C (ppm)	RH ^{13}C (ppm)	Estruturas	
		* $\text{CH}_3\text{---R}$					
15,86	16,51	R=arilo					
20,91	20,12						
		$\text{CH}_3\text{---}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}\text{---R}$		129,25	128,96	R=H	
		R=alquilo		142,82	141,09	R=arilo	
28,35	26,76					147,81	146,29
31,10	29,15	R=arilo					
		R---O---CH_3^*					
57,68	57,17	R=alquilo, arilo		168,46	160,45	R=alquilo	
					169,20	R=M ⁿ⁺	
							
65,84	69,09			168,46	170,56	R, R'=alquilo	
75,51	77,82			178,14	179,44	R=M ⁿ⁺ , R'=arilo	
82,81	84,90			188,90	188,32	R=M ⁿ⁺ , R'=alquilo	
78,11	78,69						
72,25	70,03						
				175,32	176,05	Polipeptídios	
				191,50	191,72	R=H, R'=arilo	
104,47	101,08			196,63	196,41	R, R'=arilo	
107,00	105,05			203,92	204,43	R=H, R'=alquilo	
				209,20	210,79	R, R'=alquilo	
				AH	RH		
Aromaticidade				28,57	10,52		
Alifaticidade				71,42	89,47		
HB/HI				1,14	0,82		

A assinalação dos espectros ^{13}C CP MASRMN de ambas as frações obtidas, RH e AH (Tabela 3), torna possível conhecer o tipo de estrutura que se corresponde com alguns dos picos presentes. A região compreendida entre 0-59 ppm, assinalada a $\text{C}_{\text{Alq-H,R}}$ e $\text{C}_{\text{Alq-O}}$ pertence a estruturas de tipo $(\text{CH}_2)_n$ com grupos CH_3 terminais que fazem parte de fragmentos de estruturas lipídicas provenientes de tecidos vegetais e poliésteres alifáticos. Grupamentos metoxilas ligados a anéis aromáticos pertencentes a unidades estruturais (Guaiacil e Siringila) de ligninas, poderiam ser os responsáveis

pelos picos presentes entorno de 57 ppm. As estruturas C_{Alq-O} pertencem às cadeias de unidades monoméricas de oligo e polissacarídeos de tecidos vegetais. Nesta região, o pico por volta a 72 ppm pertence à superposição dos carbonos C_2 , C_3 e C_5 nas estruturas piranósicas de celulose e hemicelulose, enquanto que o sinal do carbono anomérico $C1$ aparece entorno de 105-107 ppm e o sinal dos carbonos $C4$ e $C6$ aparecem entorno de 65-69 ppm e 82-84 ppm respectivamente. Os sinais entorno de 172 ppm podem ser assinalados a grupos carboxilas. Estas assinalações descritas até aqui e as mostradas na Tabela 2 foram feitas segundo os descritos na literatura em Spaccini e Piccolo, (2007); Aguiar et al.(2013); Keeler et al.(2006).

3.5.4 Caracterização molecular das frações AH e RH mediante off line Py-TMAH-CG-MS

Os cromatogramas de íons totais (TIC -*total ions chromatogram*- siglas em inglês) para o VC e as frações AH e RH são apresentados na Figura 12. A fragmentação térmica do VC e das suas frações liberou uma elevada quantidade de moléculas nas formas químicas de éteres e ésteres metílicos pertencentes a substâncias naturais. As substâncias identificadas pela biblioteca NIST, quando o índice de similaridade foi superior a 60%, foram agrupadas de acordo a sua funcionalidade química, isto é, derivados de carboidratos, compostos nitrogenados, álcoois, hidrocarbonetos e terpenóides.

De maneira geral é possível observar que a maior quantidade de fragmentos identificados nos três materiais foi no VC. No cromatograma dos três materiais é possível observar o predomínio de substâncias com estrutura lignínicas e de ácidos graxos, sendo que, nos três TIC aparecem como o maior pico e conseqüentemente como substância mais abundante o identificado como *4-metoxi fenil prop-2-enóico* (P18), o que pode ser o resultado da oxidação de componentes lignínicos provenientes de gramíneas (Balmori et al., 2013).

Baseados nas identificações feitas dos picos presentes nos TIC pelas bases de dados “bibliotecas” NIST e NIST08, foi possível encontrar as substâncias mais abundantes para cada um dos materiais. No caso dos carboidratos, tanto para o VC como para RH, o composto de maior abundância foi o identificado como: 2,5-dimetil-4-metoxi-3(H)-furanona (m/z :142,TR:11.33min, abundância relativa (AR):19-21% respectivamente), no caso de AH o composto mais abundante foi o 2,6-dimetoxi-fenol (m/z :154,TR:19.30min, AR:20.90%). O composto nitrogenado tipo uracila foi mais abundante em AH (tempo de retenção (TR):21.16min, AR:17.71%), enquanto que, um composto nitrogenado com características aromáticas foi o identificado como mais abundante em VC e RH (TR:11.33min, AR:9-15% respectivamente). De características lignínicas, como dito anteriormente, a substância mais abundante nos três materiais foi o 4-metoxi fenil prop-2-enóico (m/z :161,TR:32.75min, AR:78-153%). No caso das moléculas de tipo FAME/ácidos graxos, a mais abundante nos três materiais foi o ácido hexadecanoico (palmítico) (m/z :74,TR:39.87min, AR:14-27%). Dentre os hidrocarbonetos, na fração AH o mais abundante foi um alcano C54 (m/z :57,TR:69.61min, AR:5%), no VC e na fração RH o hidrocarboneto mais abundante foi um alcano C26 (m/z :57,TR:66.67min, AR:5-9%). Com características terpénicas, a substância mais abundante para a fração AH foi o 3,7-diona-8-ene-lanost (m/z :207,TR:69.99min, AR:7%), para a fração RH a mais abundante foi o 3-ol-18-ene-olean (m/z :207,TR:66.57min, AR:8%), no VC o mais abundante foi o Tetrahidropiranil de Citronelol (m/z :85,TR:43.37min, AR:52%).

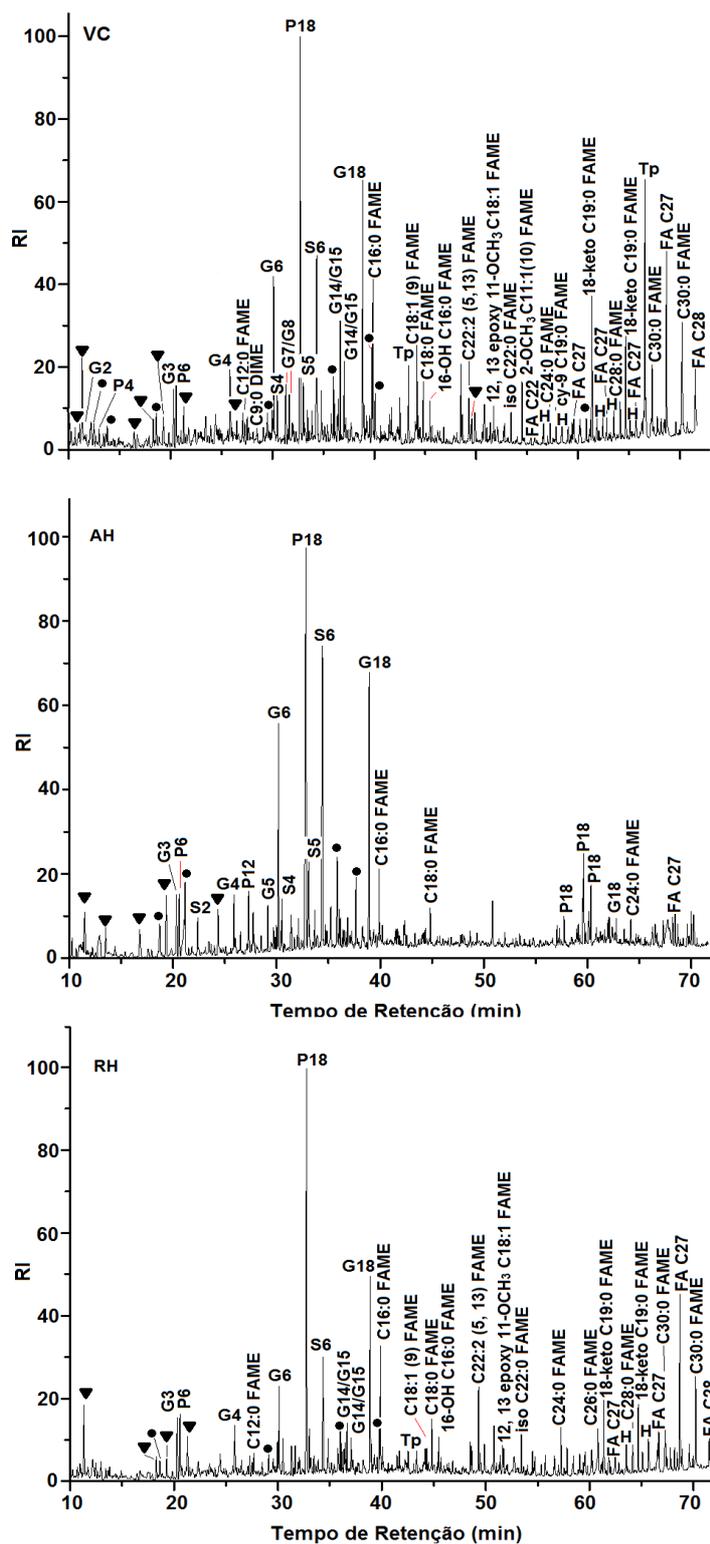


Figura 12. TIC do VC e das frações húmicas. Derivados de carboidratos (∇), compostos nitrogenados (o), derivados de ligninas, ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), álcoois graxos (FA), hidrocarbonetos (H), compostos terpênicos (Tp).

A quantidade total de cada grupo de substância nas frações RH e AH são apresentadas na Figura 13. A figura mostra quantidades semelhantes de compostos

provenientes de carboidratos e compostos nitrogenados em ambas as frações RH e AH. Na fração RH houve maior quantidade de substâncias de tipo FAMES, Álcoois/Epoxy, Hidrocarbonetos e Terpenos que na fração AH. No entanto, na fração AH houve maior quantidade de substâncias lignínicas do que na fração RH.

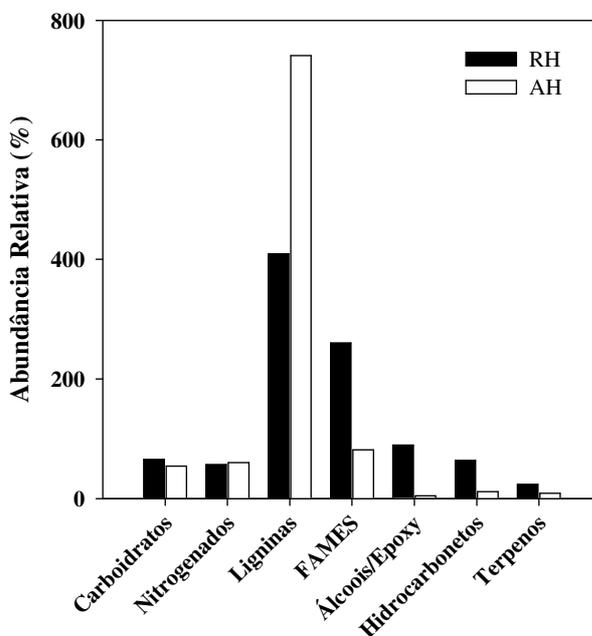


Figura 13. Abundância relativa (%) de cada tipo de substâncias nas frações AH e RH, quantificada através da integração da área de cada sinal nos TIC.

Os resultados obtidos mediante esta técnica confirmam o encontrado na caracterização mediante ^{13}C CPMAS RMN. O elevado conteúdo de substâncias com características lignínicas na fração AH pode confirmar o maior caráter aromático mostrado por esta fração em comparação com RH. Isto indica que a aromaticidade em AH pode provir da preservação de estruturas com estas características durante o processo de humificação do carbono na vermicompostagem. Além disso, o alto conteúdo de estruturas tipo lignina, justifica os sinais encontrados no espectro RMN em 57 ppm.

A alta presença de estruturas provenientes de carboidratos justifica os sinais encontrados nos espectros ^{13}C RMN entre 101-105 ppm e entre 65-72 ppm, assinalados para carbonos que pertencem unidade de celulose e hemicelulose. Da mesma forma, o maior conteúdo de substâncias tipo FAMES e epóxidos, encontradas em RH, superiores a AH, justificaria o conteúdo de carbonos pertencentes a estas estruturas mediante ^{13}C RMN, isto porque, nos espectros RMN foi obtido 15.11% de estruturas $\text{C}_{\text{Alq-O}}$ a mais do que em AH. A maior quantidade de estruturas alifáticas seria também justificada pelo fato de ter-se mostrado nos espectros RMN, um 11.24% de estruturas do carbono $\text{C}_{\text{Alq-H,R}}$ a mais em RH do que em AH.

De maneira geral, as técnicas empregadas aqui de elucidação estrutural, permitem a obtenção de informações detalhadas sobre as características estruturais das frações humificadas isoladas do VC (RH e AH). A composição elementar indicou através das relações atômicas H/C (em RH maior que em AH), um menor grau de aromaticidade em RH. Isto foi confirmado pela presença de bandas pertencentes a

vibrações C=C bem resolvidas nos espectros FTIR entre 1500 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} , uma baixa relação E_4/E_6 em AH e a maior aromaticidade em AH observada através dos sinais intensos na região de $C_{Ar-H,R}$ e C_{Ar-O} (110-156ppm). Da mesma forma, a elevada relação O/C encontrada tanto em RH como em AH, que indicou uma importante presença de estruturas O-alquil, foi confirmada nos espectros FTIR pelas bandas intensas entre 1000 cm^{-1} e 2200 cm^{-1} e pelos sinais C_{Alq-O} e $C_{di-Alq-O}$.

Tem sido relatada recentemente na literatura mediante Py-CG/MS, a obtenção deste tipo de distribuição molecular em materiais humificados, especificamente em diferentes tipos de VC. Autores como Balmori et al. (2013), aplicando esta técnica de fragmentação, relataram resultados semelhantes com os obtidos neste trabalho enquanto a presença de moléculas e predomínio de fragmentos lignínicos (P18). Outros autores encontraram uma distribuição molecular e origem dos compostos aromáticos, semelhante à obtida neste trabalho, estudando frações húmicas isoladas de materiais de aterros em decomposição. Os autores obtiveram uma abundante presença de compostos provenientes de ligninas e moléculas aromáticas oxigenadas como produto da oxidação lignínica, dando origem a substâncias húmicas que aumentam seu grau de aromaticidade com o tempo de maturação do material de origem (Xiaoli et al., 2008). Também mediante Py-CG/MS, Lu et al. (2000), encontram que os conteúdos de substâncias lignínicas e carboidratos, apresentam uma dependência com o grau de humificação do material, onde, substâncias húmicas isoladas de turfa são menos humificadas e mais alifáticas quando comparadas às isoladas do solo.

3.5.6 Caracterização mediante Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia por difração de Raios X com energia dispersiva (EDX) qualitativa

As análises correspondentes à morfologia dos materiais humificados, VC e as frações isoladas RH e AH são apresentadas na Figura 14. A microscopia MEV mostrou uma morfologia da fração AH de aglomerados estruturais em forma laminada (AH10). Observar-se uma superfície compactada que termina em formas irregulares alongadas formando estruturas terminais mais afinadas e superfícies expandidas com pequenas proeminências onde pode se observar alguns eventos de colapso estrutural (AH2). As micrografias mostradas por Senesi et al. (1996) mostraram este tipo de morfologia em AH isolados de turfa e Li et al. (2011) também encontraram estes padrões morfológicos em AH isolados de VC.

As micrografias MEV da fração RH apresentaram uma morfologia superficial onde predomina uma aglomeração rugosa de partículas de tamanho igual ou menor a $2\text{ }\mu\text{m}$. É possível descrever uma superfície compactada para esta fração, mas, existe um predomínio de uma morfologia superficial com elevada irregularidade. Segundo as informações visuais nas imagens a $10\text{ }\mu\text{m}$ e a $2\text{ }\mu\text{m}$, a fração RH parece se organizar mediante agrupamentos de partículas pequenas até formar partículas ou agregados de maior tamanho.

Fazendo uma relação entre as características estruturais espectroscópicas das frações RH e AH com a morfologia visualizada na microscopia MEV, esta aparente baixa compactação da superfície de RH pode ser o resultado do seu relativamente baixo caráter aromático já explicado e registrado anteriormente mediante as análises espectroscópicas. Contrariamente, é possível explicar que esta superfície mais compacta em AH quando comparada com RH, pode ser o resultado do elevado caráter aromático nesta fração.

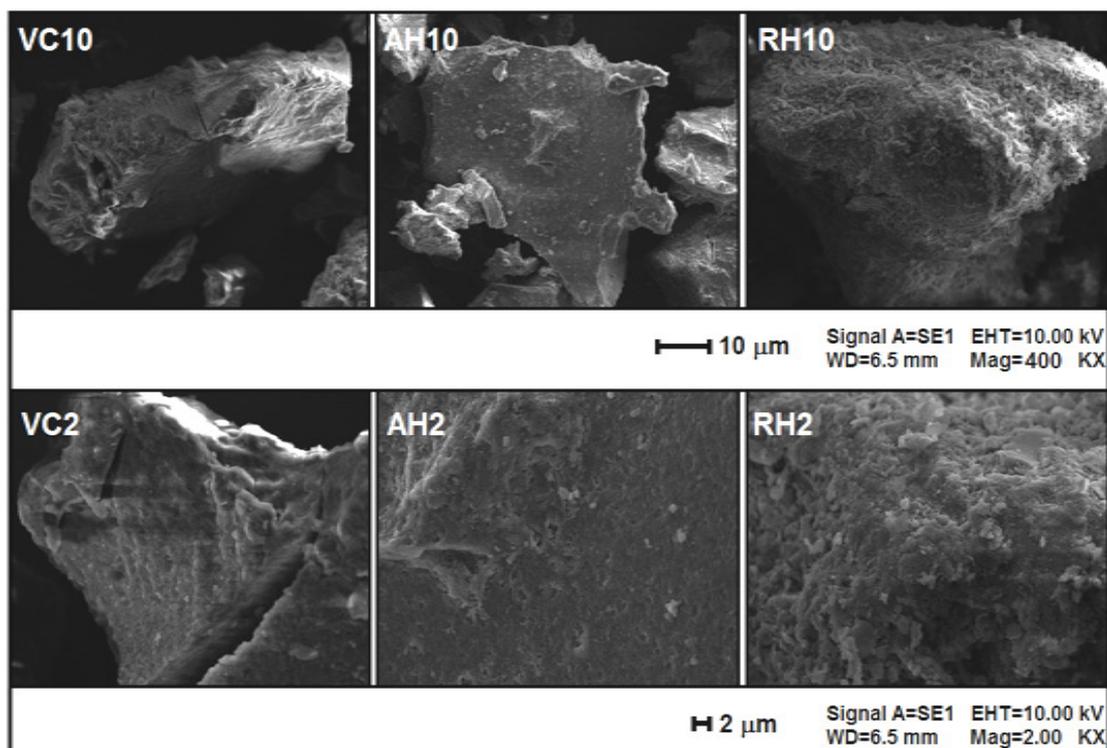


Figura 14. Micrografias obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do VC de partida e das frações humificadas isoladas (AH e RH). São mostradas as micrografias obtidas a 10 µm e magnificação de 400 KX (VC10, AH10 e RH10) e as obtidas a 2 µm e magnificação de 2.00 KX (VC2, AH2 e RH2).

A Figura 15 mostra os espectros para a identificação dos elementos minerais obtidos mediante microscopia eletrônica com detecção de energia dispersiva de raios X (EDX). Da análise dos dois espectros, é possível observar que a exceção do K^+ e Ca^{2+} , os elementos restantes estiveram presentes em ambas as frações (Fe, Mg, Al, Si, P e S). Foi comum também em ambos os espectros, a elevada intensidade dos sinais identificados como oxigênio e carbono.

Em ambas as frações, estão presentes compostos inorgânicos de tipo carbonatos (CO_x^{2-}), silicatos (SiO_x^{2-}), fosfatos (PO_x^{3-}) e silicatos (SO_x^{4-}). Observa-se, por exemplo, elementos minerais como o Fe presentes em ambas as amostras, que podem provir das características do solo onde foi feito o VC, de tipo “*Ferralítico Rojo*”-segundo a classificação cubana do solo (Cárdenas et al., 1978; Pérez et al., 2012), assim como também os níveis de Si, com maiores conteúdos em RH que em AH, confirmado pela elevada intensidade da banda em entre 1000 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} no espectro FTIR de RH.

Este tipo de análise (EDX), feito em outros AH, tem encontrado resultados semelhantes aos mostrados para as frações RH e AH. Autores como Baldotto et al. (2007), relataram em AH isolados de adubos orgânicos, presença dos elementos C, O, Fe, Al, Si e S, também encontrados nas frações estudadas nesta tese. Rupiasih e Vidyasagar (2009), aplicando análise EDS em AH isolados de VC de diferentes origens, mostraram presença dos elementos Ca, K, Mg, Al, S e P. Em estudos realizados com AH isolados de diferentes fontes (solos e materiais humificados), foi também mostrado presença dos elementos Ca, K, S, P e Si (Hladký et al., 2013).

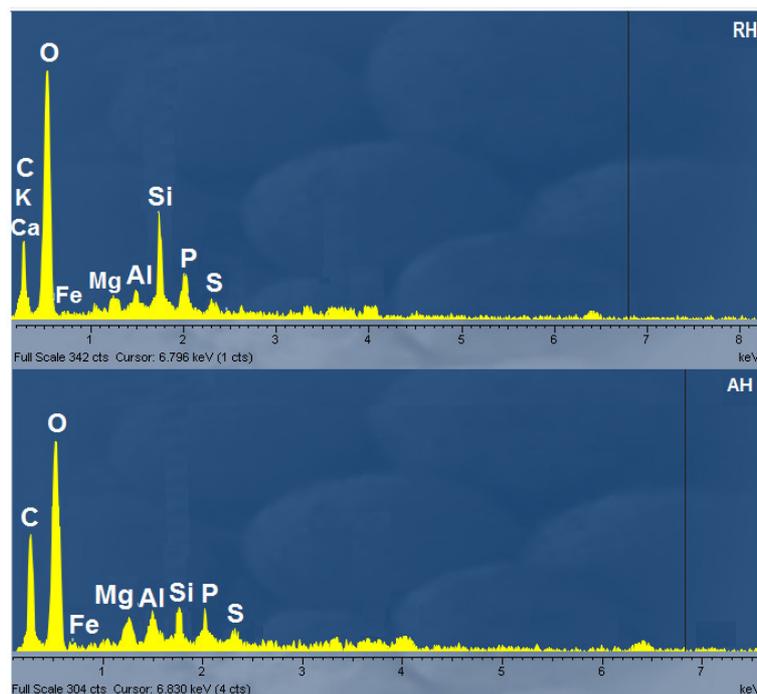


Figura 15. Espectros EDX qualitativo (energia dispersiva de raios X) obtidos a partir dos materiais RH e AH.

3.5.7 Espectrometria de massa mediante ionização química a pressão atmosférica (APCI-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry), aplicado à fração RH

Os espectros APCI-MS da fração RH em modo de íons positivos e negativos são mostrados na Figura 16. A análise da intensidade dos sinais em ambos os espectros mostra uma maior intensidade nos fragmentos positivos (m/z : 281.0, $I=7.5 \times 10^5$) dos picos mais abundantes do que os fragmentos negativos também mais abundantes (m/z : 223.0, $I=6.0 \times 10^4$). Isto pode estar influenciado pelo pH neutro ajustado para esta fração no processo de purificação. No entanto, o espectro em modo negativo mostrou uma abundância maior de sinais de fragmentos negativos quando comparado à abundância nos fragmentos positivos.

Tanto nos espectros em modo positivo como em modo negativo, foram identificados mediante as bases de dados disponíveis, aqueles fragmentos de maior abundância. No modo positivo foram identificados: Ipriflavona, F.G: $C_{18}H_{16}O_3$ ($M_w=280$), $m/z=281$ $[M+H]^+$; Asarinina, F.G: $C_{20}H_{18}O_6$ ($M_w=354$), $m/z=355$ $[M+H]^+$; 2', 3'-di-deoxiadenosina, F.G: $C_{10}H_{13}N_5O_2$ ($M_w=235$), $m/z=236$ $[M+H]^+$. No modo negativo foram identificados: 2-hidroxi-9,10-antracenediona, F.G: $C_{14}H_{12}O_4$ ($M_w=224$), $m/z=223$ $[M-H]^-$; 2', 6-di-hidroxi-9,10-antracenediona, F.G: $C_{15}H_{12}O_4$ ($M_w=256$), $m/z=255$ $[M-H]^-$; ácido risínico, F.G: $C_7H_6N_2O_2$ ($M_w=150$), $m/z=149$ $[M-H]^-$.

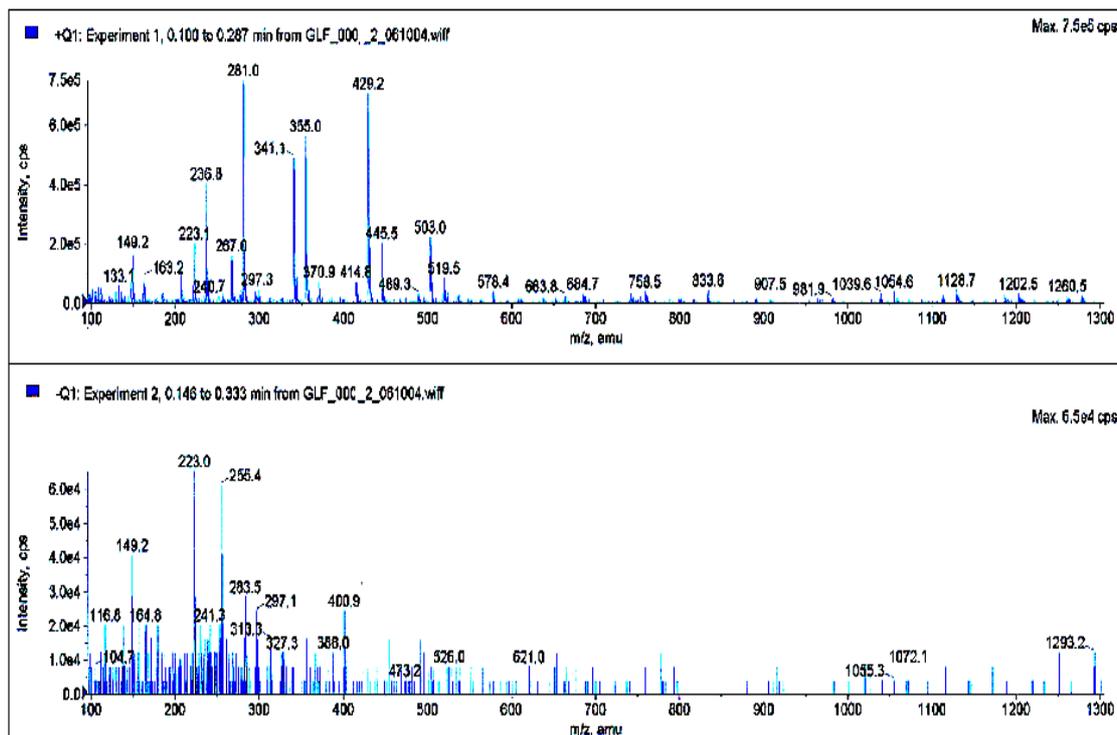


Figura 16. Espectro de espectrometria de massa mediante ionização química a pressão atmosférica (APCI-MS) da fração RH. Separação de íons, +Q1: íons positivos e -Q1: íons negativos.

Nas Figuras 17 e 18 são mostrados alguns dos fragmentos e seus precursores mais abundantes na fração RH identificados mediante APCI-MS. Tanto nos fragmentos positivos quanto nos negativos é possível observar um predomínio do caráter aromático, assim como de fragmentos nitrogenados. Ambas as características foram também encontradas nos fragmentos mais abundantes mediante a técnica Py-GC/MS.

Embora exista a possibilidade de que estes fragmentos sejam formados a partir de rearranjos estruturais ocasionados pela aplicação da própria técnica, a origem vegetal de algumas destas substâncias pode ser identificada. Dentre os fragmentos positivos, o composto Asarinina, por exemplo, pertence a uma família de compostos vegetais conhecidos como lignanos, originados pela síntese de metabolitos secundários nas plantas (Li et al., 2005). O composto 2',3'-dideoxiadenosina também de origem vegetal, constitui um nucleossídeo derivado da adenosina, a enzima adenosina deaminase catalisa a formação de deoxiadenosina (Petolino et al., 2000) (Figuras 17).

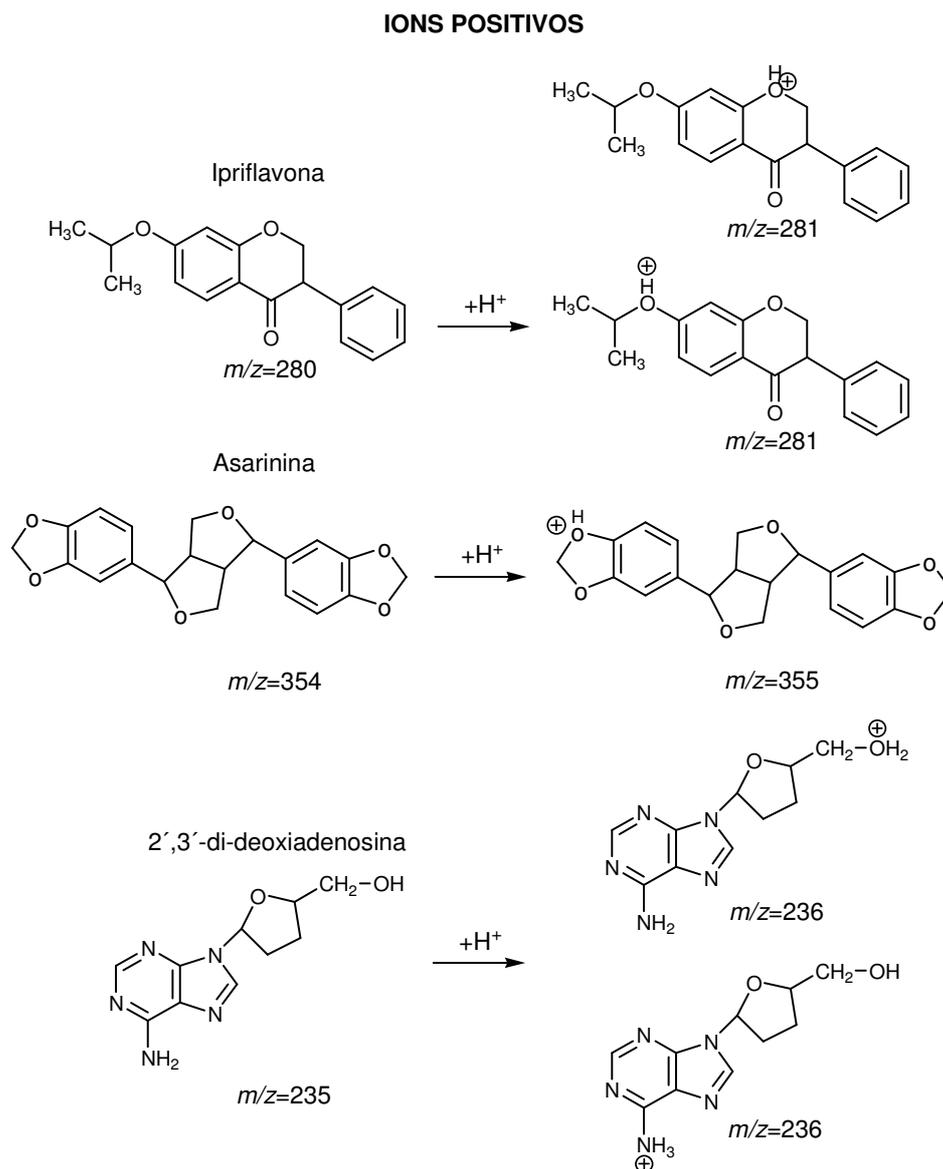


Figura 17. Mecanismos propostos para a fragmentação dos íons positivos identificados no espectro APCI-MS em modo positivo.

Dentre os fragmentos negativos, o composto 2-hidroxi-9,10-antracenodiona parece ser um derivado da 9,10-antracenodiona também de origem vegetal, pertencente à família das antraquinonas; alguns estudos relatam a presença deste composto em frações isoladas e caracterizadas de plantas de *Aloe vera* (Ramos, 2013). A substância 2', 6-di-hidroxi-flavona, constitui também um derivado da família de compostos conhecidos como flavonas; são substâncias amplamente distribuídas entre as plantas superiores e um produto das rotas de produção de metabólitos secundários com conhecida função antioxidante (Agati et al., 2012) (Figura 18).

IONS NEGATIVOS

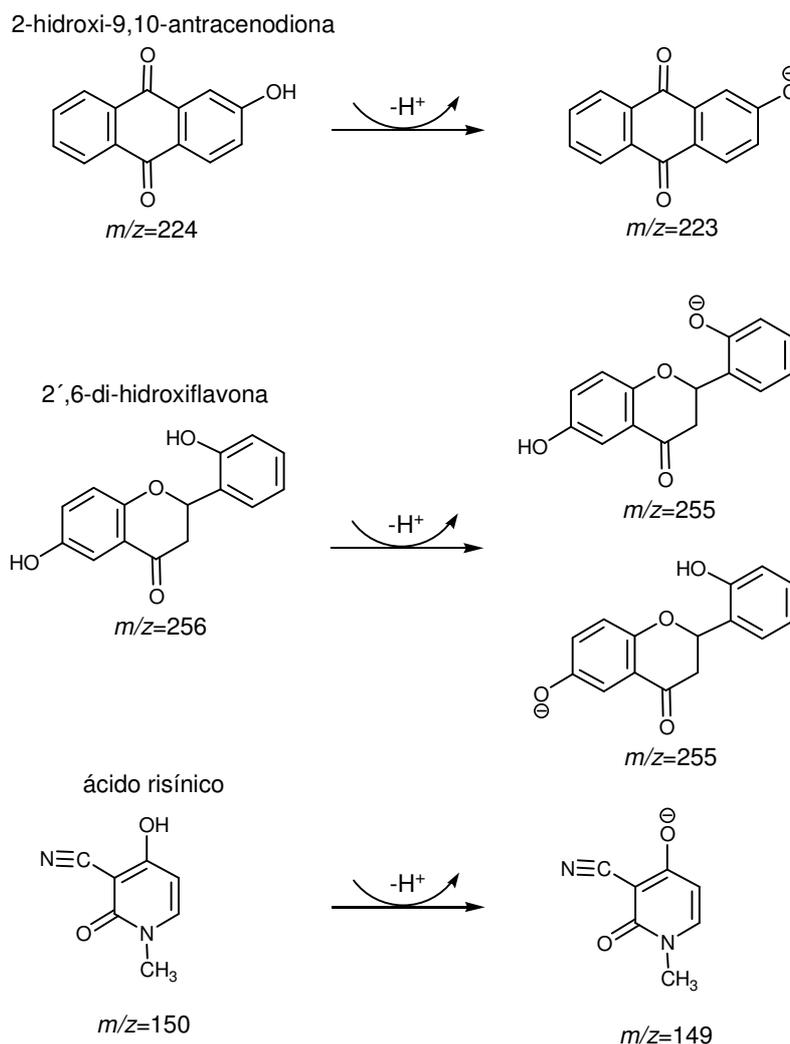


Figura 18. Mecanismos propostos para a fragmentação dos íons negativos identificados no espectro APCI-MS em modo negativo.

A aplicação da técnica de APCI em modo de ionização positivo e negativo permitiu conhecer substâncias abundantes em RH com elevada presença de grupamentos funcionais oxigenados e nitrogenados, na sua maioria, associados a estruturas aromáticas. A maior massa molar detectada nos fragmentos +Q foi de 1260,5 Da, enquanto que nos fragmentos -Q foi de 1293,2 Da.

Embora não sejam muito abundantes os trabalhos de caracterização de substâncias húmicas aplicando a técnica APCI, alguns trabalhos têm sido desenvolvidos para estudar a sua distribuição molecular. Piccolo et al. (2010), utilizaram as técnicas de fragmentação APCI e ESI para estudar a massa molar de AH isolados de solo, os autores relataram que mediante APCI é possível obter uma fragmentação que produz substâncias com massa molecular maior às obtidas por ESI, confirmando um dos objetivos do uso desta técnica para esta fração no nosso trabalho. No entanto, em estudos onde foram utilizadas estas técnicas em AH e fúlvicos isolados de lagos, foi demonstrado que a técnica de APCI reduz a relação m/z em até 5 vezes quando comparada à obtida por ESI e nesta última, existe formação de íons moleculares multicarregados (Pfeifer et al., 2001).

3.6 CONCLUSÕES

A partir do VC de esterco bovino, foram isoladas e purificadas duas frações humificadas, uma correspondente à fração solúvel, constituída pelos AH: AH, e a fração residual do processo de isolamento de AH ao VC: RH.

Ambas as frações AH e RH apresentaram uma distribuição estrutural semelhante às relatadas na literatura. Quando comparadas as frações, AH mostrou maior caráter aromático que RH, justificado por uma baixa relação H/C e E_4/E_6 , bandas resolvidas entre 1500 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} , uma aromaticidade igual a 28% com picos entre 90-142 ppm pertencentes a $C_{Ar-H,R}$ e C_{Ar-O} . A Py-CG/MS também mostrou maiores conteúdos em AH de substâncias com características aromáticas (ligninas) do que em RH.

A fração RH mostrou características estruturais mais alifáticas e oxigenadas do que AH. Isto foi justificado por uma maior relação O/C em RH, bandas intensas entre 1100 cm^{-1} e 1259 cm^{-1} (ésteres e C-O) e uma alifaticidade igual a 89% com picos entre 0-46 ppm ($C_{Alq-H,R}$), 50-91 ppm (C_{Alq-O}) e 156-186 ppm ($C_{COO-H,R}$). A Py-CG/MS mostrou maior quantidade de hidrocarboneto, álcoois e ésteres de ácidos graxos em RH que em AH.

A técnica APCI-MS foi eficiente para mostrar a distribuição na formação de íons positivos e negativos em RH. Tanto os íons negativos quanto os positivos apresentam na sua estrutura elevada quantidade de grupos ionizáveis. Foi também detectado maior diversidade de íons negativos do que positivos.

4. CAPÍTULO II

RETENÇÃO DE METAIS PESADOS (Pb^2 E Ni^{2+}) EM SISTEMAS MONO-ELEMENTARES E BI-ELEMENTARES DO SÓLIDO RESIDUAL HUMIFICADO DO VERMICOMPOSTO

4.1 RESUMO

Este capítulo teve como objetivo estudar a capacidade para reter cátions dos metais pesados (MP) Ni^{2+} e Pb^{2+} do material residual que fica depois de isoladas as SH de um vermicomposto (VC) e sua efetividade em águas residuais industriais. Foram estudados os parâmetros massa de RH, pH da solução e tempo de contato (cinética de retenção), assim como a adsorção mediante tratamentos dos dados segundo as equações de Langmuir e Freundlich. Foi testada a efetividade de RH mediante experimentos de retenção com águas residuais industriais coletadas no sistema de tratamento de residuais de uma usina de cerâmica branca. A caracterização espectroscópica mostrou em RH grupos funcionais ionizáveis (-OH, -NH, -COO⁻, -CO) e tipos de carbonos pertencentes a estruturas oxigenadas (O-alquil-C, di-O-Alquil-C, O-Aro, -COOH, -C=O). RH mostrou que com uma massa de 5 g, um pH 7 e um tempo de agitação de 150 minutos se propiciam os maiores valores de retenção. O estudo cinético mostrou um comportamento padrão de *pseudo* 2^{da} ordem da retenção e a adsorção foi descrita melhor quando os dados foram tratados mediante a isoterma de Freundlich. A $Q_{\text{máx}}$ para Ni^{2+} e Pb^{2+} foi de 34,1 mg.g⁻¹ (RH) e 151,1 mg.g⁻¹ (RH) respectivamente, o ΔG da retenção teve valores de -33,56 KJ.mol⁻¹ e -28,57 KJ.mol⁻¹, mostrando a espontaneidade da adsorção dos MP em RH. A microscopia MEV permitiu visualizar e comprovar a retenção dos MP na superfície de RH, assim como os espectros de RH com os metais retidos indicaram participação de grupos oxigenados na interação com os metais. Os testes feitos com as águas residuais industriais mostraram que com uma massa de RH de 20 g para 1 L de água residual, a retenção de Ni^{2+} e Pb^{2+} em RH foi de um 98 e 96% respectivamente. RH pode constituir um agromaterial eficiente na produção de um dispositivo para a remoção ecológica de metais pesados em águas residuais.

Palavras-chave: Metais pesados. Retenção. Isotermas de adsorção.

4.2 ABSTRACT

This chapter aimed to discuss the ability to retain cations of heavy metals (HM) Ni^{2+} and Pb^{2+} from residual material which is isolated after the HS of a vermicompost (VC) and its effectiveness in industrial wastewater. Parameters like RH mass, solution pH and contact time (retention kinetics) as well as by the adsorption treatments data according to the Langmuir and Freundlich, were studied. We tested the effectiveness of RH through retention experiments with industrial wastewater collected in the wastewater treatment system of a plant white ceramic plant. The spectroscopic characterization showed ionizable RH functional groups (-OH, -NH, -COO, -CO) and carbon types of structures belonging to oxygen (C-O-alkyl, di-alkyl-O-C, O-Aromatic, -COOH, -C=O). RH showed that with a mass of 5 g, pH 7, stirring time of 150 minutes provided the highest retention values. The kinetic study showed the behavior of pseudo 2nd order of retention and adsorption was best described when the data were treated by the Freundlich isotherm. The Q_{max} for Ni^{2+} , and Pb^{2+} was 34,1 mg g⁻¹ (RH) and 151,1 mg g⁻¹ (RH), respectively, the retention ΔG had values of -33,56 kJ.mol⁻¹ and -28,57 kJ.mol⁻¹, showing the spontaneity of the adsorption of HM in RH. SEM microscopy allowed visualization and proved that the retention of HM on the surface of RH, as well as the spectra of RH with metals retained indicated participation of oxygenated groups in the interaction with metals. Tests were done with industrial wastewater showed a mass of 20 g RH for 1 L of residual water retention Ni^{2+} , and Pb^{2+} RH was a 98 and 96% respectively. RH may be a agromaterial efficient in producing a device for ecological disposal of heavy metals in the waste water.

Keywords: Heavy metals. Retention. Adsorption isotherms.

4.3 INTRODUÇÃO

A contaminação por metais pesados (**MP**) é dos principais problemas que afetam o meio ambiente. O agravamento da situação devido ao crescimento industrial compromete a saúde do planeta e dos que nela habitam. De forma geral, a quantidade e forma química dos MP no ambiente são determinadas hoje pela ação antropogênica (www.worstpolluted.org). Uma tecnologia ecológica para eliminar a deposição dos MP no ambiente é a sua retenção na saída dos efluentes industriais.

Os produtos residuais provenientes da agricultura constituem uma alternativa que vem sendo utilizada a partir das tecnologias sustentáveis aplicadas aos processos agrícolas. A serragem, por exemplo, tem sido estudada como um material com capacidade para a retenção de cátions Cu^{2+} em soluções aquosas (Larous et al., 2005). Restos de casca de manga tem sido também um material usado para reter cátions de Cd^{2+} e Pb^{2+} em solução aquosa, acontecendo a retenção através dos grupos carboxilas e hidroxilas (Iqbal et al., 2009). Também, madeira obtida a partir de *Carica papaya*, removeu cátions de Cd^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} com uma eficiência entre o 66% e o 97% (Saeed et al., 2005).

Na busca de materiais eficientes para reter metais pesados, os materiais que provem de processos de humificação (compostos e vermicompostos) são atualmente muito utilizados. Os AH tem sido utilizados para potencializar a capacidade de reter Pb (II) e Cu (II) em zeolitas (Wang et al., 2008). As substâncias húmicas (**SH**) têm sido estudadas com fins da modelagem da retenção de Arsênico no solo (Gustafsson, 2006). O vermicomposto resultou um material eficiente para a remoção de Cd de biocombustíveis baseados em álcool, alcançando níveis de recuperação de 94-100% (Bianchin et al., 2009).

Os materiais humificados como o composto e vermicomposto, constituem alternativas tecnológicas sustentáveis a serem utilizados como materiais descontaminadores (Christian et al., 2010; Jordão et al., 2011). Esses materiais possuem elevada quantidade de grupamentos funcionais (-COOH, -OH, -NH_n, -C=O, entre outros) que potencializam a interação com MP (Nebbioso e Piccolo, 2012). No entanto, eles apresentam na sua composição substâncias húmicas (**HS**) que são solúveis em meio aquoso com elevada capacidade para reter metais, isto constitui uma desvantagem para serem usados em uma escala maior (Faur-Brasquet et al., 2002; Alvarez-Puebla et al., 2004).

O uso de tecnologias limpas na agricultura propõe como variante a utilização de húmus líquido obtido de fontes como o VC, como regulador do crescimento vegetal. No processo de obtenção de húmus líquido podem ser utilizadas diferentes soluções extratoras, principalmente em meio alcalino. A associação internacional de SH sugere como extrator, uma dissolução de NaOH 0,5 mol L⁻¹. No entanto, qualquer que sejam os extratores utilizados sempre ficará uma fração sólida residual (Calderin et al., 2007).

Um material eficiente para reter cátions de MP em efluentes industriais tem que ser de baixo custo, disponibilidade, de origem natural e com características estruturais que lhe permitam reter elevados conteúdos de MP. Neste capítulo se estudam as potencialidades de um material humificado, obtido a partir de um VC de esterco bovino e previamente caracterizado por técnicas espectroscópicas, para reter Ni^{2+} e Pb^{2+} em sistemas aquosos e sua efetividade para descontaminar águas residuais industriais com elevados teores Ni^{2+} e Pb^{2+} .

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Experimentos de retenção em sistemas monoelementares de Ni²⁺ e Pb²⁺ em RH

Os experimentos para avaliar os parâmetros da capacidade de sorção, influência da massa, cinética de sorção e dependência da sorção com o pH de Ni²⁺ e Pb²⁺ em RH, foram conduzidos em sistemas monoelementares. As soluções foram preparadas a partir de soluções padrões de Ni(NO₃)₂·6H₂O e Pb(NO₃) (50 mg.L⁻¹) em água destilada. As concentrações iniciais e finais dos metais em todos os experimentos foram determinadas mediante espectrofotometria de absorção atômica (VARIAN 55B Atomic Absorption Spectrometer).

4.4.2 Efeito da massa de RH na retenção de Ni²⁺ e Pb²⁺

A avaliação da massa na retenção foi conduzida como segue: massas diferentes de RH na faixa de 1-7 g foram colocadas em agitação com três concentrações de Ni²⁺ e Pb²⁺ (2,5 mg.L⁻¹; 4,0 mg.L⁻¹; 5,0 mg.L⁻¹) em um volume total de solução de 50 mL. O tempo de agitação foi mantido durante 4 horas, todas as concentrações foram preparadas em triplicata. A remoção dos metais em RH foi expressa em porcentagem (% Ret):

$$\% \text{ Ret} = \frac{C_{\text{Ret}}}{C_i} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde C_i é a concentração inicial adicionada (mg.L⁻¹); C_{Ret} é a concentração retida em RH (mg.L⁻¹).

4.4.3 Dependência da retenção de Ni²⁺ e Pb²⁺ com o pH

A influencia do pH na retenção foi avaliada como se segue: massas de 5 g de RH foram colocadas em contacto com 11 concentrações crescentes de Ni²⁺ e Pb²⁺ (0,5 mg.L⁻¹ até 5,5 mg.L⁻¹) em um volume final de 50 mL. A retenção foi avaliada em valores de pH=2, pH=7 e pH=8, os quais foram fixados nas soluções mediante ajuste com NaOH e HNO₃ e medições potenciométricas (pH metro). O tempo de agitação foi mantido por 4 horas, todas as concentrações foram preparadas em triplicata e a retenção dos metais em RH foi expressa em %Ret segundo a equação (1).

4.4.4 Cinética da retenção de Ni²⁺ e Pb²⁺ em RH

O estudo da cinética de retenção foi conduzido como segue: Massas de 5 g de RH foram colocadas em contato com soluções de 30 mg.L⁻¹ de Ni²⁺ e Pb²⁺ em um volume final de 50 mL. As suspensões foram agitadas e a retenção dos metais avaliada em diferentes intervalos de tempos desde os 10 min até 240 min, todas as concentrações foram preparadas por triplicata. Os dados cinéticos foram tratados com os modelos de pseudo primeira ordem, segundo Kalavathy et al. (2005) e Dahiya et al. (2008) e pseudo segunda ordem, segundo Kalavathy et al. (2005), ambos na suas formas lineares, como seguem:

Modelo de pseudo primeira ordem:

$$\ln (Q_e - Q_t) = \ln Q_e - \ln k_1 t \quad (2)$$

Em que: Q_t é o valor de Q_e no tempo t. k₁ é a constante de velocidade de pseudo primeira ordem (min⁻¹). A representação gráfica de log (Q_e-Q_t) em função de t é uma reta com interseção igual à log Q_e e inclinação igual a -k₁/2,303.

Modelo de pseudo segunda ordem:

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{k_2 Q_e^2} + \frac{1}{Q_e} t \quad (3)$$

Em que: k_2 é a constante de velocidade de pseudo segunda-ordem ($\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). O gráfico de t/Q_t em função de t é uma reta com inclinação $1/Q_e$ e interseção $1/(k_2 \cdot Q_e^2)$.

4.4.5 Isotermas de adsorção de Ni^{2+} e Pb^{2+} em RH

O estudo das isotermas de adsorção foi conduzido como segue: Massas de 5 g de RH foram colocadas em contato com 11 concentrações crescentes de Ni^{2+} e Pb^{2+} ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ até $5.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) em um volume final de 50 mL, o tempo de agitação foi de 150 min. As suspensões foram filtradas e avaliadas as concentrações dos metais na solução. Aos dados experimentais obtidos foram aplicados os modelos de isotermas de adsorção de Freundlich e Langmuir.

O modelo da isoterma de Langmuir foi usado na sua forma linear que é expresso como segue:

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{1}{bQ_{\text{máx}}} + \frac{C_e}{Q_{\text{máx}}} \quad (4)$$

Em que: C_e é a concentração do metal no equilíbrio ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), Q_e é a quantidade de metal adsorvida por grama de RH ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), b é a constante de adsorção de Langmuir a uma temperatura dada ($\text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$) e $Q_{\text{máx}}$ é a capacidade máxima de adsorção ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$). Da isoterma de Langmuir pode-se obter também o parâmetro R_L que indica se a adsorção é favorável ou desfavorável, onde C_0 é a concentração inicial e pode ser expressa como segue:

$$R_L = \frac{1}{1 + bC_0} \quad (5)$$

O modelo da isoterma de Freundlich foi usado na sua forma linear e sua equação é expressa como segue:

$$\log(Q) = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (6)$$

Em que: K_F ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) e n são os parâmetros relacionados à capacidade e afinidade respectivamente.

4.4.6 Determinação do parâmetro termodinâmico de Energia livre (ΔG^0)

O parâmetro b obtido da isoterma de Langmuir foi usado para calcular ΔG^0 ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) dos processos de adsorção dos metais em RH segundo a equação a seguir:

$$\Delta G^0 = -RT \ln b \quad (7)$$

Em que: R é a constante universal dos gases ($8.314 \times 10^{-3} \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) e T é a temperatura experimental em kelvin.

4.4.7 Experimentos de retenção em sistemas bi-elementares de Ni^{2+} e Pb^{2+} em RH

O experimento de retenção em sistema bielementar foi conduzido de acordo com os parâmetros obtidos para a maior retenção no sistema monoelementar. Uma quantidade de onze soluções de concentrações crescentes de Ni^{2+} e Pb^{2+} ($0,5-5,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

¹⁾ foram preparadas a partir de uma dissolução padrão de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (50 mg.L^{-1}) em água destilada. As soluções de concentrações crescentes dos metais foram colocadas em contato com massas de 5 g de RH e mantidas em agitação durante 150 minutos a pH 7 previamente ajustado. Foi utilizado em total de 10 réplicas para cada concentração testada. As concentrações dos metais foram determinadas mediante espectrofotometria de absorção atômica (VARIAN 55B Atomic Absorption Spectrometer).

4.4.8 Testes de efetividade de RH em águas residuais industriais

A usina de cerâmica Branca localiza-se na atual Província de Mayabeque, no município de San José de las Lajas, localidade Jamaica, Cuba. As caracterizações das águas residuais desta fonte contaminante foram realizadas em estudos de Nieblas et al. (2008), e foram identificados os sítios de captura e acúmulo destes resíduos. Apoiados nestes estudos foram coletados em três pontos diferentes dos sistemas de tratamentos, águas residuais industriais. O ponto 1: (latitude: $22^\circ 58' 29.83''\text{N}$; longitude: $82^\circ 10' 6.91''\text{O}$), corresponde-se ao primeiro sistema da usina para descontaminação de sólidos em suspensão, ponto 2: (latitude: $22^\circ 58' 30.41''\text{N}$; longitude: $82^\circ 10' 6.30''\text{O}$), sítio de despejo dos líquidos residuais por vazamento, ponto 3: (latitude: $22^\circ 58' 35.12''\text{N}$, longitude: $82^\circ 10' 0.34''\text{O}$), sítio de acúmulo natural dos resíduos.

Um volume de 5 L de águas residuais foi coletado de cada ponto de estudo durante uma semana com a usina em produção regular, estas águas foram misturadas e avaliada a quantidade de Ni^{2+} e Pb^{2+} mediante espectrofotometria de absorção atômica (VARIAN 55B Atomic Absorption Spectrometer), o pH da água nos três pontos oscilou entre os valores 6,2 a 7,3. Para avaliar a retenção dos metais presentes nas águas residuais, três massas de RH (5 g, 10 g e 20 g) foram postas em contato com 1 L dos resíduos aquosos coletados em cada ponto como explicado no Item 6.2.5: experimentos para as isotermas de adsorção. As condições experimentais foram: tempo de agitação 150 minutos, $\text{pH} \sim 7$ e $T \pm 25^\circ\text{C}$.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Efeito da massa e o pH na retenção de Ni^{2+} e Pb^{2+} em RH

A retenção de Ni^{2+} e Pb^{2+} em função da massa de RH são mostradas na Figura 19A. A maior porcentagem de retenção foi obtida para uma massa de RH de cinco gramas, a partir deste valor, as quantidades retidas mantiveram-se semelhantes. A utilização de materiais humificados para a retenção de MP não mostra um critério unificado para uma massa única, o comportamento da massa do adsorvente depende das suas características químicas e da espécie metálica em questão. Alguns trabalhos relatam que a massa ótima para a retenção de Pb, Ni, V e Cr é de 2 g de VC (Urdaneta et al., 2008), noutros, uma relação de massa e volume adsorvente/adsorvato (1g:10 mL) propicia as melhores condições para a maior retenção (Jordão et al., 2009).

As Figuras 19B e 19C mostram a dependência da retenção dos metais com o valor de pH. Para ambos os metais, o valor de pH 7 foi o mais eficiente para uma maior retenção. Valores ácidos de pH 2 e básicos pH 8 não mostraram valores de retenção superiores ao 60% em ambos os metais. Valores de pH 2 mostraram as menores percentagem de retenção, tanto para Ni^{2+} quanto para Pb^{2+} , no entanto, valores de pH 8 mostraram porcentagem de retenção de até 60%. As possíveis causas dos diferentes níveis de retenção podem ser explicadas tanto pela variabilidade estrutural de RH quanto pelos comportamentos destas espécies em solução. Alguns estudos relatam a alta dependência da estrutura dos materiais humificados com o valor de pH. Senesi et al. (1996) mostraram mediante estudos de MEV, que a pH baixos, os AH apresentavam características morfológicas compactas pela formação de ligações de hidrogênio, no entanto, a pH básico, a estrutura sofria rearranjos pela desprotonação das ligações e repulsões internas. Por outro lado, a pH neutros coexistem em solução espécies de positivas de Pb^{2+} , $[\text{Pb}(\text{OH})]^+$, Ni^{2+} . A valores de pH 8, a concentração de espécies Ni^{2+} começa a diminuir e $[\text{Ni}(\text{OH})]^+$ se encontra em baixas concentrações (Veliz et al., 2011).

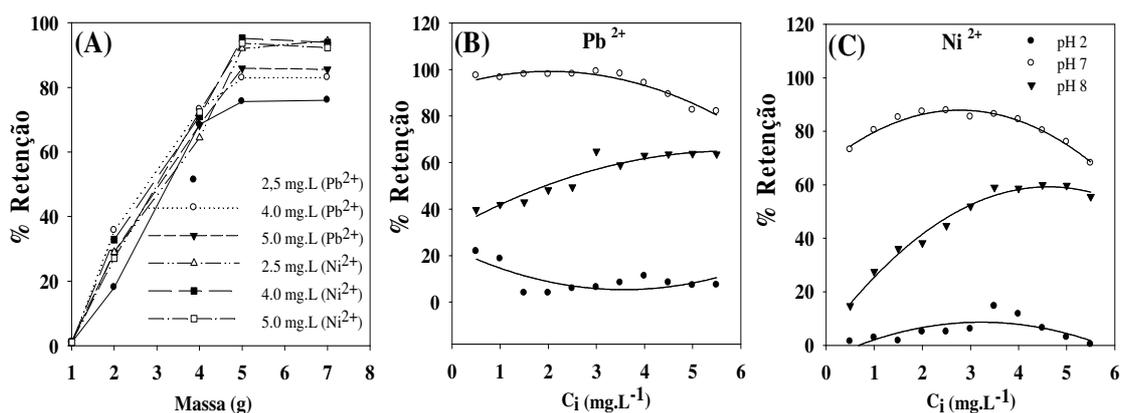


Figura 19. (A): Influência da massa de RH na retenção de Ni^{2+} e Pb^{2+} . **(B e C):** Influência do valor de pH na retenção de Pb^{2+} e Ni^{2+} respectivamente. Tempo de agitação para cada massa de RH igual a 24 horas, T=25°C.

Equações de regressão para Pb^{2+} :

$$\text{pH } 2: y = -5.19 + 8.59x - 1.33x^2 \quad R^2 = 0.75$$

$$\text{pH } 7: y = 67.8 + 14.4x - 2.60x^2 \quad R^2 = 0.98$$

$$\text{pH } 8: y = 4.25 + 23.7x - 2.57x^2 \quad R^2 = 0.99$$

Equações de regressão para Ni^{2+} :

$$\text{pH } 2: y = 23.13 - 9.94x + 1.39x^2 \quad R^2 = 0.72$$

$$\text{pH } 7: y = 92.80 + 6.29x + 1.55x^2 \quad R^2 = 0.96$$

$$\text{pH } 8: y = 31.30 + 11.5x + 0.99x^2 \quad R^2 = 0.94$$

4.5.2 Estudo cinético da retenção de Ni²⁺ e Pb²⁺ em RH

A Figura 20 mostra o estudo da cinética de retenção de Ni²⁺ e Pb²⁺ em RH. A cinética de retenção de ambos os metais ajustou-se tanto para o comportamento de *pseudo* 1^a quanto para a *pseudo* 2^a ordem (Figuras 20A e 20B). A retenção de ambos os metais mostrou dependência com o aumento do tempo de contato até atingir a retenção máxima a partir dos 150 minutos (2 horas e 30 minutos) (Figura 20C).

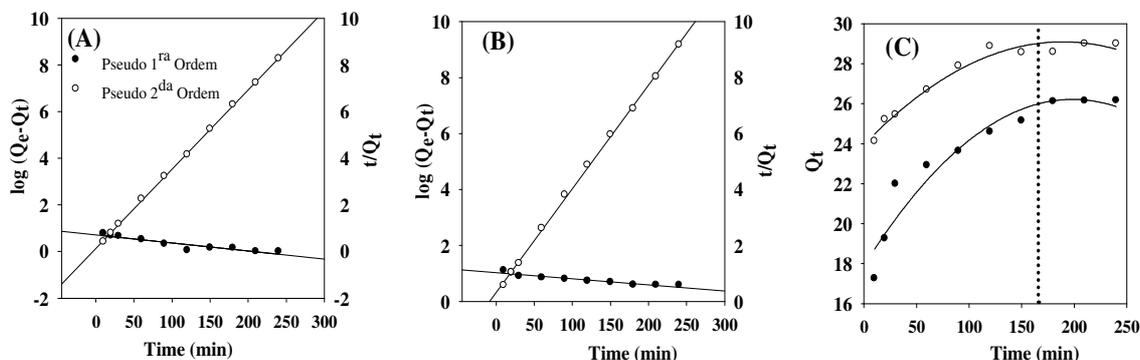


Figura 20. Estudo da cinética de retenção de Ni²⁺ e Pb²⁺ em RH segundo os modelos de *pseudo* 1^a ordem e *pseudo* 2^a ordem. **(A):** Estudo cinético para Ni²⁺; **(B):** Estudo cinético para Pb²⁺. Q_t (Pb²⁺): $y=17,90+0,0837x+0,0002x^2$ $R^2=0,9613$; Q_t (Ni²⁺): $y=23,94+0,0545x+0,0001x^2$ $R^2=0,9854$. T=25°C.

Os valores de R² na Tabela 4 confirmam que ambos os modelos cinéticos se ajustaram aos dados experimentais, no entanto, o modelo cinético de *pseudo* 2^a ordem mostrou o melhor ajuste para ambos os metais. O valor da constante de velocidade de adsorção k_2 para o Pb²⁺ foi superior ao valor de k_2 do Ni²⁺.

Tabela 4. Parâmetros obtidos a partir da aplicação dos modelos cinéticos para a retenção de Ni²⁺ e Pb²⁺ em RH. k_1 e k_2 : constantes de velocidade para os modelos cinéticos de pseudo 1^a e pseudo 2^a ordem, respectivamente.

Modelo Cinético	Metal	k_1 e k_2 ($\times 10^{-3}$)	$Q_{e(max)}(mg.g^{-1})$	R^2	Equação
<i>pseudo</i> 1 ^{era}	Ni ²⁺	7,8 min ⁻¹	0,3957	0,93	$y = 0,7121 - 0,0034x$
<i>pseudo</i> 2 ^{da}		3,6 g. mg ⁻¹ . min ⁻¹	29,411	0,99	$y = 0,3160 + 0,034x$
<i>pseudo</i> 1 ^{era}	Pb ²⁺	5,0 min ⁻¹	2,8056	0,90	$y = 1,0272 - 0,0022x$
<i>pseudo</i> 2 ^{da}		4,1 g. mg ⁻¹ . min ⁻¹	27,027	0,99	$y = 0,3160 + 0,034x$

O modelo cinético de pseudo 1^a ordem estabelece que a sorção depende proporcionalmente dos sítios ativos disponíveis no adsorvente, enquanto que, no modelo de pseudo 2^a ordem a sorção é dominada por interações adsorvente/adsorvato envolvendo troca e/ou compartilhamento de elétrons (Saeed et al., 2009).

O fato da sorção dos metais Ni²⁺ e Pb²⁺ responderem melhor ao modelo de pseudo 2^a ordem, pode se sustentar nas características estruturais de RH, nas quais predominam grupamentos funcionais e fragmentos que atuam como doadores de elétrons, propiciando interações de tipo eletrostáticas e por formação de complexos com os metais. Na literatura há estudos de cinética de sorção aplicando estes modelos com materiais de complexidade estrutural elevada. Materiais variados como casca de feijão, dolomita e AH mostraram uma cinética de retenção com comportamento de pseudo 2^{da} ordem na sorção de Cd²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Co²⁺, Cu²⁺ e Cr³⁺ (Al-Degs et al., 2006; Saeed et al., 2009; Wu et al., 2011).

4.5.3 Modelagem de retenção de Ni^{2+} e Pb^{2+} em RH. Modelos de isothermas de Langmuir e Freundlich

Na Figura 21 são apresentados os gráficos das isothermas de sorção para Ni^{2+} e Pb^{2+} (21A, 21A1) e a modelagem da sorção segundo Langmuir e Freundlich (21B, 21B1, 21C e 21C1).

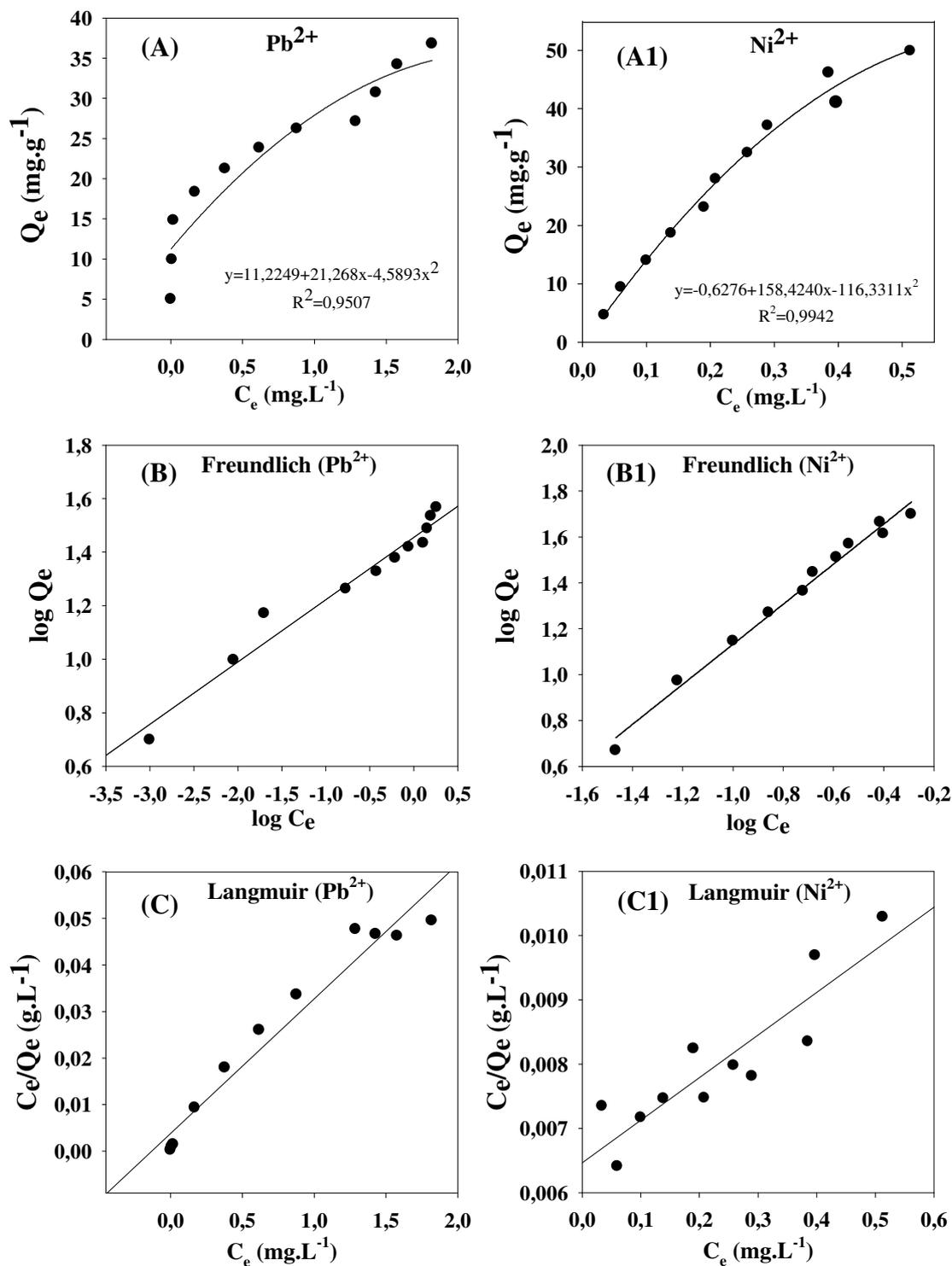


Figura 21. Isothermas de adsorção de Ni^{2+} e Pb^{2+} em RH.

Segundo a classificação de Giles et al. (1970), as isotermas de sorção para Ni²⁺ e Pb²⁺ em RH podem ser classificadas no grupo das tipo L e subgrupo 4. Segundo esta classificação, o fato da retenção de Ni²⁺ e Pb²⁺ apresentarem este comportamento pode indicar a ocorrência de diminuição dos sítios ativos indicando a formação de camadas múltiplas de metal retido em RH.

Embora a retenção destes metais tenha se ajustado favoravelmente nas isotermas de adsorção de Langmuir e Freundlich, a retenção teve como melhor ajuste a isoterma de Freundlich (ver R² na Tabela 5). O parâmetro *b* (L.mg⁻¹), relacionado com a energia de adsorção, mostrou baixos valores para ambos os metais, o menor valor de *b* foi expresso para a retenção de Ni²⁺ em RH, baixos valores de *b* estão associados a ligações mais fortes entre adsorvente-adsorvato (Jordão et al., 2009; Tunali e Akar, 2006). As quantidades máximas retidas *Q*_{máx} (mg.g⁻¹) obtidas para a isoterma de Langmuir mostraram uma maior retenção para Ni²⁺ em comparação com Pb²⁺, ao mesmo tempo o parâmetro *R*_L, que indica se um processo de sorção em um sistema é favorável ou não (0 < *R*_L < 1): sorção favorável segundo Hall et al. (1996), mostrou valores que demonstram uma sorção favorável para ambos os metais, sendo para o Ni²⁺ o valor mais próximo à unidade, indicando um processo de sorção mais favorecido para este metal em RH.

O parâmetro *k*_F relacionado à capacidade de adsorção e o parâmetro *n* (para 1 < *n* < 10: adsorção favorável), relacionado à intensidade de adsorção (Bhattacharya et al., 2006; Kadirvelu e Namasivayam 2000), obtidos através da isoterma de Freundlich mostraram os maiores valores para o Ni²⁺ quando comparados aos obtidos para o Pb²⁺. Isto reafirma que em RH a adsorção de Ni²⁺ e Pb²⁺ são favorecidas quanto à quantidade e força da retenção.

A energia livre de Gibbs (ΔG , kJ.mol⁻¹) representa a espontaneidade dos processos de adsorção, onde quanto mais negativa maior a espontaneidade do processo. Para ambos os metais em estudo, a energia calculada foi negativa, indicando processos espontâneos de adsorção em RH. Alguns autores relatam que processos com valores de ΔG até -20 kJ.mol⁻¹ correspondem a processos de interações mediados por adsorção física, no entanto, valores de ΔG mais negativos a -40 kJ.mol⁻¹, correspondem a processos de interações mediados por ligações químicas (ligações de coordenação) (Khan e Singh, 2009). Os valores de ΔG obtidos neste trabalho oscilam entre os citados na literatura, indicando maior tendência a interações de tipo químicas, as que podem ser predominantes diante as físicas.

Tabela 5. Parâmetros termodinâmicos e de retenção obtidos a partir das isotermas de Langmuir e Freundlich.

	Parâmetros Langmuir				Parâmetros Freundlich			Parâmetro Termodinâmico
	<i>b</i> (L.mg ⁻¹)	<i>Q</i> _{máx} (mg.g ⁻¹)	<i>R</i> ²	<i>R</i> _L	<i>k</i> _F	<i>n</i>	<i>R</i> ²	ΔG° (kJ.mol ⁻¹)
Pb ²⁺	0,76	34,602	0,95	0,0037	1,4553	1,23	0,96	-33.5645
Ni ²⁺	0,10	151,51	0,80	0,0064	2,2776	1,13	0,98	-28.5763

4.5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) para RH e RH com metais retidos

A micrografia do material RH é apresentada na Figura 22, as características morfológicas superficiais de RH mostraram-se heterogêneas com relevo irregular e um aspecto rugoso. Observa-se repetições de partículas de tamanho aproximado a 200 μm assim como presença de partículas de tamanho menor, indicando que RH estabilizado

a pH neutro, é formado unidades morfológicas ou agregados de pequeno tamanho, na ordem de 200 μm ou menores. A homogeneidade da cor escura mostrada em RH é típica de compostos orgânicos, não mostrando regiões de maior intensidade luminosa que indicaria presença de estruturas inorgânicas.

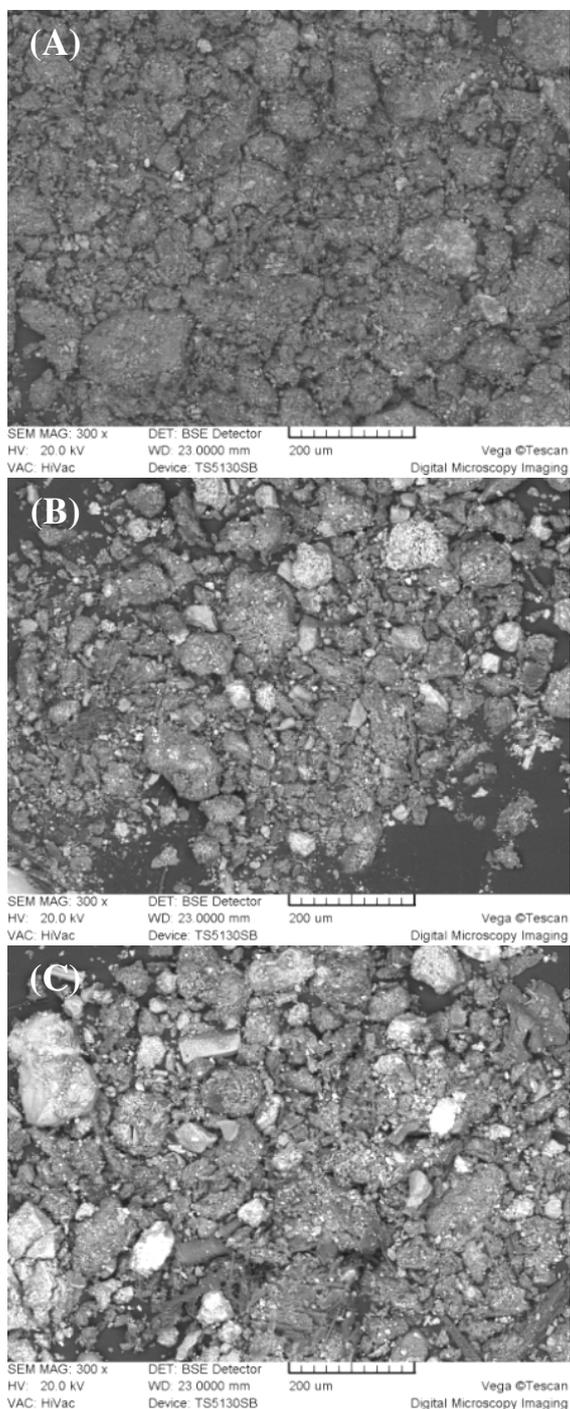


Figura 22. Imagens de microscopia eletrônica do material (A): RH, (B): RH-Ni e (C): RH-Pb.

As micrografias de RH com os metais retidos (Figura 22B e 22C) mostram presença de regiões brilhantes na superfície, estas regiões não eram visíveis em RH antes da interação com os metais. Esta é uma evidência visual da adsorção dos metais estudados na estrutura superficial de RH.

Alguns estudos relatam estas características morfológicas observadas em RH quanto à coloração e relevo para compostos humificados como os AH (Chen et al., 2008; Saha et al., 2001). Em outros trabalhos foram visualizadas estas evidências de retenção de metais em compostos humificados e materiais do solo utilizando MEV (Wei et al., 2004; Bardy et al., 2008; Laribis et al., 2008).

4.5.5 Caracterização mediante espectroscopia FTIR de RH e RH com os metais retidos

Os espectros FTIR do material humificado RH e RH com os metais retidos são mostrados na Figura 23. Observou-se que houve uma diminuição das intensidades correspondentes a bandas principalmente associadas a grupos funcionais oxigenados. Isto é, as bandas localizadas em aproximadamente 3441 cm^{-1} ($\nu\text{O-H}$ de fenóis, carboxilas e alcoóis, secundariamente vibrações $\nu\text{N-H}$) foram encontradas com menor intensidade para RH-Ni e RH-Pb. Da mesma forma foi encontrado diminuição da intensidade das bandas entre $1649\text{-}1037,5\text{ cm}^{-1}$ ($\nu\text{C=O}$ de quinonas, carboxilas e amidas I, vibrações assimétricas νCOO^- de íons carboxilatos, vibrações assimétricas $\gamma\text{C-H}$ de CH_3 , $\delta\text{O-H}$ e $\nu\text{C-O}$ de fenóis e simétricas νCOO^- de íons carboxilatos e vibrações $\nu\text{C-O}$ de estruturas de polissacarídeos e semelhantes).

Estes resultados podem indicar um envolvimento destes grupos funcionais ionizáveis em RH na interação com os metais em solução mediante ligações químicas. Vários autores relatam comportamentos semelhantes em estudos de retenção de metais pesados em materiais humificados aos encontrados neste trabalho. Quando estudados os mecanismo de retenção de metais como Cu, Cd, Cr, Fe, Pb entre outros, em substâncias húmicas como AH, huminas e vermicompostos, são encontradas mudanças nas intensidades e padrões espectrais após acontecer os fenômenos de retenção (Vinkler et al., 1976; Piccolo e Stevenson, 1982; Senesi et al., 1986; Alvarez-Puebla et al., 2004; Jerzykiewicz, 2004; Bardy et al., 2008; Wu et al., 2011).

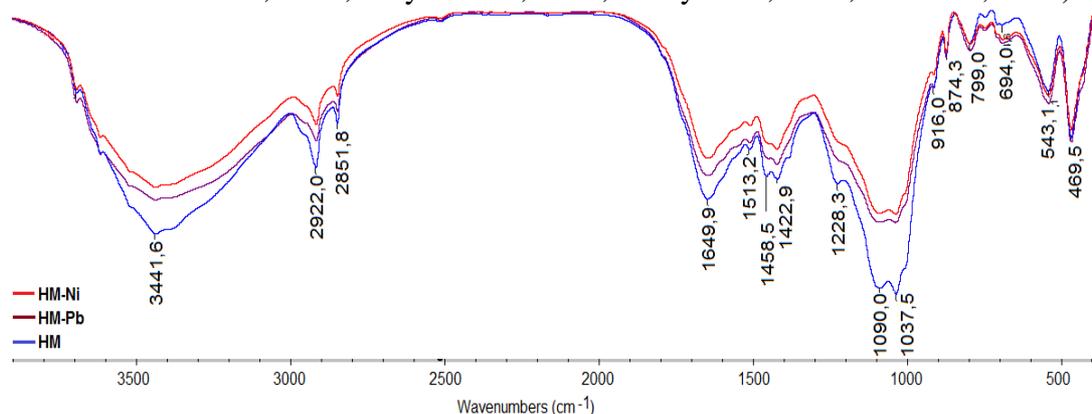


Figura 23. Espectros FTIR do material RH, RH-Ni e RH-Pb.

4.5.6 Experimentos de retenção de Ni^{2+} e Pb^{2+} em RH em sistemas bi-elementares aquosos

Neste experimento foi avaliado o comportamento da retenção dos metais Ni^{2+} e Pb^{2+} em RH em um sistema bi-elementar. A Tabela 6 mostra que nas concentrações mais baixas ($0,5\text{-}2,0\text{ mg.L}^{-1}$) existiu uma maior porcentagem de retenção para Pb^{2+} ($60,2\%\text{-}74,8\%$) quando comparada com o Ni^{2+} ($46,2\%\text{-}50,1\%$). Quando as concentrações iniciais de partida aumentaram de $2,5\%$ a $5,5\%$, houve uma inversão da retenção, sendo o Ni^{2+} o cátion que apresentou os maiores valores ($91,5\%\text{-}98,3\%$) quando comparado com o Pb^{2+} ($40,4\%\text{-}70,0\%$), e por fim, nas maiores concentrações

o cátion Ni^{2+} apresentou a maior quantidade retida em RH (98,3%) comparada com Pb^{2+} (40,4%).

Tabela 6. Valores de retenção dos metais Ni^{2+} e Pb^{2+} em sistemas aquosos bi-elementares e com agitação. Massa de RH: 5g, Tempo de agitação: 150 minutos, pH 7, T=25°C.

Ci (mg.L ⁻¹)	C retida (mg.L ⁻¹)	Ni ²⁺		Pb ²⁺		
		Qe(mg.Kg ⁻¹)	% Ret	C retida (mg.L ⁻¹)	Qe (mg.Kg ⁻¹)	% Ret
0,5	0,23±0,06	2,31	46,2	0,30±0,02	3,01	60,2
1	0,49±0,09	4,91	49,1	0,71±0,04	7,11	71,1
1,5	0,89±0,14	8,92	59,4	1,12±0,12	11,22	74,8
2	1,00±0,34	10,02	50,1	1,38±0,27	13,86	69,3
2,5	2,33±1,01	23,38	93,5	1,56±0,12	15,63	62,5
3	2,83±1,02	28,3	94,3	2,10±0,44	21,02	70,0
3,5	3,29±0,75	32,95	94,1	2,17±0,30	21,71	62,0
4	3,68±0,50	36,81	92,0	2,11±0,11	21,11	52,7
4,5	4,11±1,00	41,19	91,5	2,18±0,51	21,81	48,4
5	4,78±1,03	47,84	95,6	2,21±0,06	22,11	44,2
5,5	5,41±1,00	54,1	98,3	2,22±0,07	22,23	40,4

A Figura 24 mostra a isoterma de sorção construída para estes cátions no sistema bi-elementar. É possível observar (ver a seta no gráfico), que até uma contração de 1,0 mg.L⁻¹ de ambos os metais, acontece um compartilhamento dos sítios de retenção, embora com uma maior retenção para o Pb^{2+} . Nas concentrações superiores a 1,0 mg.L⁻¹ a isoterma reafirma uma maior retenção para o Ni^{2+} .

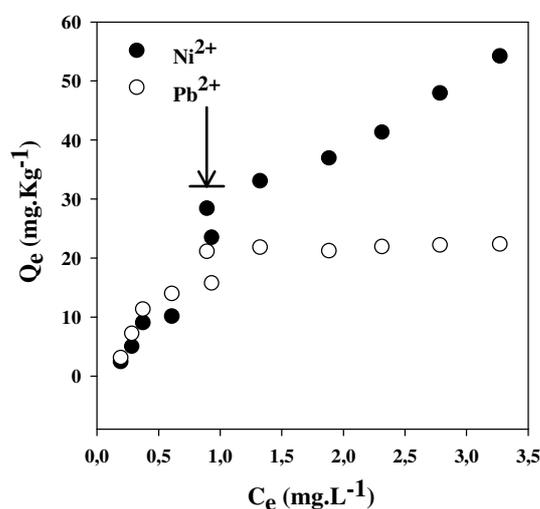


Figura 24. Isoterma de sorção dos metais Ni^{2+} e Pb^{2+} em sistemas aquosos bi-elementares e com agitação. Massa de RH: 5g, Tempo de agitação: 150 minutos, pH 7, T=25°C.

As possíveis explicações para este comportamento podem ser encontradas nas características estruturais de RH. Primeiramente, a pH 7, as espécies predominantes de ambos os metais são Ni^{2+} , Pb^{2+} e $\text{Pb}(\text{OH})^+$. É possível então, que nas interações destas espécies de Pb com os sítios mais superficiais em RH (primeiro contato entre RH e os metais), com o seu maior tamanho (raio iônico: 0,97 Å) em comparação com o Ni^{2+}

(0,70 A°), se produzam alterações e reorganizações estruturais na superfície, ou até mesmos efeitos estéricos que comprometam as interações entre o Ni²⁺ e RH. Esta reestruturação poderia disponibilizar maior quantidade de grupos funcionais em concentrações maiores para o Ni²⁺ ou abrir interstícios na estrutura do material que o Ni²⁺, pelo seu menor tamanho poderia ocupar e aumentar sua retenção, pois além dos sítios superficiais, este metal exploraria melhor os sítios internos de RH. Estas são evidências da provável existência de outros fenômenos de retenção entre RH e os metais além da formação de ligações covalentes de coordenação, como podem ser as interações eletrostáticas tanto em nível superficial como intraestrutural.

Os resultados encontrados aqui sobre o comportamento dos metais Ni²⁺ e Pb²⁺ em dissolução aquosa, foram também observados nos trabalhos de McBride (1989), onde foi relatada a seguinte ordem de afinidade entre cátions metálicos e a matéria orgânica do solo: Cu²⁺>Ni²⁺>Pb²⁺>Co²⁺>Ca²⁺>Zn²⁺. No entanto, segundo Irving-Williams, as SH formam compostos complexos na seguinte ordem de estabilidade: Pb²⁺>Cu²⁺>Ni²⁺>Co²⁺ >Zn²⁺>Cd²⁺>Fe²⁺>Mn²⁺>Mg²⁺. Estas duas ordens foram observadas nesse estudo, o que mostra a heterogeneidade nas interações entre RH e os metais, dependente das características estruturais de RH.

Outros autores como Urdaneta et al. (2008), estudaram a retenção de metais em SH e relataram que para o vermicomposto, a remoção dos metais pesados de Ni, Pb, V e Cr, utilizando um sistema multielemental, constatou um nível de retenção para Ni, Pb e Cr superou o 95%, no entanto, para V foi superior ao 50%.

4.5.7 Efetividade de RH para a contenção de Ni²⁺ e Pb²⁺ em residuais líquidos industriais

Neste estudo foi avaliada a efetividade de contenção de Ni²⁺ e Pb²⁺ em RH em águas residuais coletadas diretamente da fonte contaminante sem tratamentos prévios. As coletas de três pontos diferentes tiveram como objetivo buscar reprodutibilidade dos resultados e a efetividade da retenção de RH em relação à distância da fonte contaminante. A carga contaminante de Ni²⁺ e Pb²⁺ nos residuais líquidos desta usina nos três pontos coletados oscilou de 21,2-34,1 mg.L⁻¹ para Ni²⁺ e de 41-61,3 mg.L⁻¹ para Pb²⁺ (Tabela 7). A efetividade de RH na recuperação dos metais independe do ponto de coleta e foi superior quando utilizada a maior massa de RH (20 g) para 1L de água residual.

Tabela 7. Contenção de Ni²⁺ e Pb²⁺ em águas residuais industriais de três pontos diferentes da usina de cerâmica branca.

Inicial (mg.L ⁻¹)	Massa de RH (5 g)		Massa de RH (10 g)		Massa de RH (20 g)			
	Retido (mg.L ⁻¹)		Retido (mg.L ⁻¹)		Retido (mg.L ⁻¹)			
	±s.e.m		±s.e.m		±s.e.m			
Ni	Pb	Ni	Pb	Ni	Pb	Ni	Pb	
1	21,2	41	16,5±0,64	12,2±0,55	19,1±1,99	28,7±3,55	21,0±2,89	40,7±4,74
2	25,2	52,1	17,1±0,58	13,5±0,49	21,8±2,01	40,2±4,74	24,9±2,55	50,2±4,96
3	34,1	61,3	17,9±0,66	14,1±0,61	25,4±1,88	45,1±4,08	33,6±3,04	59,9±4,21
Médias de recuperação			17,1±0,40	13,5±0,56	21,8±1,82	40,2±4,86	24,9±3,72	50,2±5,54
% de recuperação			52,6-78,5	23,1-29,7	74,7-90,9	70-73,9	>98	>96
1,2,3:Pontos de coleta dos residuais líquidos da usina de Cerâmica Branca								

A maior efetividade de retenção encontrada para uma massa quatro vezes superior à massa testada nos estudos de laboratório pode ser devido a interferências

presentes nas águas residuais, como a presença de outras formas químicas destes cátions, sólidos em suspensão ou outras substâncias de características químicas diferentes. A utilização futura e efetiva deste material depende dos estudos de características mais aprofundadas dos constituintes das águas residuais, no entanto, nas condições estudadas, RH mostrou recuperação de quantidades superiores a 98 e 96% para Ni^{2+} e Pb^{2+} respectivamente para 20 g por cada litro de água residual.

Vários estudos no uso de materiais humificados para a contenção de metais pesados relatam a efetividade destes compostos. Na contenção de Cd usando vermicomposto como biosorbente, este material mostrou uma efetividade de 94-100% de contenção (Bianchin et al., 2009). Outros estudos usando AH e zeolitas naturais mostraram uma elevada efetividade para contenção de Ni^{2+} e Pb^{2+} em sistemas mono e bielementares (Wang et al., 2008). Jordão et al. (2007), usando vermicomposto para a contenção de Ni^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} de efluentes líquidos, relataram uma eficiência deste material de aproximadamente 100%.

4.6 CONCLUSÕES

Após a extração das SH de um vermicomposto de esterco bovino, foi possível obter um material com características químicas semelhantes às encontradas em materiais humificados.

Os experimentos de laboratório mostraram que uma massa de 5 g, pH 7 e 150 minutos de agitação, foram condições suficientes para reter elevadas quantidades dos cátions Ni^{2+} e Pb^{2+} . O estudo cinético da retenção para Ni^{2+} e Pb^{2+} em RH se descreveu melhor mediante um comportamento de pseudo 2ª ordem e mostrou os melhores ajustes para o modelo de adsorção da isoterma de Freundlich.

A microscopia MEV demonstrou visualmente a retenção destes metais em RH a nível superficial e a espectroscopia mostrou possível formação de ligações químicas entre os metais e os grupos funcionais ionizáveis em RH.

Os experimentos de retenção em laboratórios e em sistemas bi-elementares mostraram uma maior retenção para o Pb^{2+} nas menores concentrações adicionadas e a maior retenção para Ni^{2+} nas maiores concentrações adicionadas.

O material RH, quando testado com águas residuais da indústria de cerâmica branca, mostrou uma efetividade de contenção de Ni^{2+} e Pb^{2+} superior a 98% e 96% respectivamente para uma massa de 20 g de RH por cada litro de água residual. RH pode constituir um agromaterial eficiente na produção de um dispositivo para a remoção ecológica de metais pesados em águas residuais.

5. CAPÍTULO III

BIOATIVIDADE DOS AH: EFEITOS SOBRE A MORFOLOGIA RADICULAR E MECANISMOS DE PROTEÇÃO AO ESTRESSE OXIDATIVO E HÍDRICO

5.1 RESUMO

Os efeitos das SH em plantas são diversos e complexos devido à quantidade de variáveis que influenciam seus modos de ação. Alguns autores mostram uma relação dependente entre o crescimento radicular e a concentração de carbono, noutros trabalhos se mostra que as características estruturais são os parâmetros mais determinantes. Dada esta variedade de evidências sobre os modos de ação dos AH no metabolismo das plantas, neste capítulo se recolhem os resultados obtidos desde a pesquisa inicial sobre os efeitos de dose de AH vs. respostas, até chegar a vias mais complexas de respostas. Este capítulo objetiva estudar a relação entre os efeitos conhecidos dos AH e alguns componentes do metabolismo antioxidativo em plantas de arroz, utilizados pelos AH para exercer seus efeitos em plantas assim como, a ação protetora antioxidativa dos AH em plantas de arroz em condições de estresse hídrico induzido. Em experimento inicial foram estudadas as doses mais promissoras no crescimento radicular (raízes laterais, comprimento radicular, massa seca, área radicular) e a relação destes efeitos com alguns componentes do metabolismo antioxidativo. Em um segundo experimento, foi estudado a ação protetora da dose mais promissora ($40 \text{ mg (C-AH).L}^{-1}$) em plantas submetidas a estresse hídrico induzido com PEG-6000 (15%). Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os AH exerceram uma regulação da homeostase redox, estimulando a produção de ERO e controlando seus níveis por meio de um estímulo da atividade das enzimas do metabolismo antioxidativo (SOD e POX). Esta via de ação parece utilizar além dos mecanismos de sinalização das próprias ERO, as vias de sinalização do ABA e não através de uma ação que provoque aumentos da biossíntese de AIA endógeno, criando uma condição nas plantas semelhante à condição de estresses, no entanto, esta condição promovida pelos AH não causa danos por peroxidação lipídica de membrana que provoquem efeitos negativos no crescimento e desenvolvimento radicular. A eficiência no controle das ERO quando aumentadas pela ação dos AH fica comprovado pelo aumento na permeabilidade da membrana sem afetar a funcionalidade radicular. Foi comprovado que nas plantas em estresse hídrico induzido por PEG-6000 foram afetados os processos de emissão de raízes laterais, no entanto, quando as plantas receberam como tratamento os AH, houve uma preservação dos processos de crescimento e desenvolvimento radicular, comprovados mediante uma emissão de raízes laterais superiores ao tratamento controle sem AH. A ação protetora dos AH favorece uma maior eficiência no controle das ERO mediante o funcionamento acelerado das enzimas do metabolismo antioxidativo, preservando a integridade da membrana celular radicular mediante a inibição da peroxidação lipídica. Nesta ação protetora não foi evidenciado uma participação de ABA nem de prolina como metabólito antioxidante no controle redox, embora, essas vias metabólicas podem haver funcionado com anterioridade.

Palavras-chave: Espécies reativas de oxigênio. Estresse hídrico. ABA. AIA.

5.2 ABSTRACT

This chapter aims to study the relationship between the known effects of HA and some components of antioxidative metabolism in rice plants used by HA to exert their effects on plants as well as the antioxidative protective action of HA in rice plants under conditions of induced water stress. After determining the best HA levels by monitoring lateral roots, root length, dry weight and root surface area we studied the protective action of the most promising dose (40 mg C-HA. L⁻¹) in plants subjected to induced drought stress by PEG-6000 (15%). The results of this study showed exert redox homeostasis by stimulating the production of ROS and controlling their levels through a stimulation of the activity of antioxidative enzymes of metabolism (SOD and POX). This course of action seems to be used beyond the signaling mechanisms of ROS themselves and the signaling pathways of ABA and not through an action that causes increases in endogenous biosynthesis of IAA. Thus, this condition promoted by AH does not cause damage by lipid peroxidation of membrane causing negative effects on root growth and development. The efficient control of ROS when augmented by the action of HA is evidenced by the increase in membrane permeability without affecting the functionality root. It has been proven that plants in induced water stress by PEG-6000 were affected the processes of issuing lateral roots, however, when the plants received treatment with HA there was a preservation of the processes of growth and root development, proven by an increase in the emission of lateral roots greater than the control treatment without HA. The protective action of HA promotes greater efficiency in the control of ROS by the operation of the accelerated metabolism of antioxidative enzymes preserving the integrity of the root cell membrane by inhibition of lipid peroxidation.

Keywords: Oxygen radical species. Water stress. ABA. AIA. Oxidative stress.

5.3 INTRODUÇÃO

A relação estrutura-atividade biológica das substâncias húmicas (**SH**) constitui uma questão importante para entender seus modos de ação nas plantas. Alguns trabalhos mostram a possibilidade das SH para terem compostos na sua estrutura que atuam como substratos na síntese de compostos bioativos (Muscolo et al., 2007). Outros autores indicam que as SH com baixo peso molecular e uma elevada presença de estruturas hidrofílicas apresentam alta eficiência para regular o metabolismo das plantas (Nardi et al., 2007). No entanto, Dobbss et al. (2010) não encontraram relação entre o peso molecular com a bioatividades de ácido húmicos (**AH**) e mostraram que um maior índice de hidrofobicidade define o crescimento radicular. Canellas et al. (2012) indicam que os AH podem ter estruturas aromáticas protegidas à degradação por domínios químicos hidrofóbicos o que permite maior interação com receptores hormonais nas células.

Não menos diversos são os efeitos que os AH exercem nas plantas, porém, os relacionados aos sistemas de defesa tem tido especial atenção. AH de alta massa molecular tem mostrado potencialidades para exercer efeitos no metabolismo secundário associado à síntese de fenóis (Schiavon et al., 2010), assim como, aplicações de AH em plantas de milho tem causado efeitos na geração de espécies reativas de oxigênio (**ERO**) e aumento na atividade das enzimas catalases (**CAT**) (Cordeiro et al., 2011). Tem se comprovado ainda o efeito protetor dos AH quando aplicados a plantas de feijão em condições de estresse salino (Aydin et al., 2012).

A produção de ERO nas plantas apresenta uma dualidade funcional, inicialmente reconhecida como efetoras de processos prejudiciais, as ERO exercem também funções de sinalização diante mudanças ambientais (Jubany-Marí et al., 2010; Suzuki et al., 2012). As ERO podem regular a atividade de componentes essenciais nos mecanismos celulares de sinalização como as MAP kinases (Rentel et al., 2004). Estas funções celulares dependem de fatores chaves como a localização celular destas espécies e o tempo de formação de antioxidantes (Foyer e Noctor, 2009). O H_2O_2 é uma das ROS que possuem funções como a sinalização, crescimento e desenvolvimento das plantas, resposta de defesa e regulação no crescimento radicular (Lei et al., 2006). Existem relatos que mostram que em termos de resistência, o H_2O_2 pode atuar mais como moléculas sinalizadoras do que como indutoras de danos oxidativos, porém, estas funções dependem dos níveis de antioxidantes, hormônios e localização do H_2O_2 nas células (Jubany-Marí et al., 2010). A resposta das plantas submetidas à condição de estresse hídrico é em grande parte controlado por hormônios, particularmente o ácido absícico (**ABA**), quem desenvolve funções de sinalização desde a raiz até a parte aérea (Mahajan e Tuteja, 2005). Os conteúdos endógenos de ABA nas plantas são aumentados sob diferentes condições de estresse, entre os quais está o estresse hídrico e osmótico (Chen et al., 2002).

Dada a variedade de evidências sobre os modos de ação dos AH no metabolismo das plantas, neste capítulo se recolhem os resultados obtidos desde a pesquisa inicial sobre os efeitos de dose de AH vs. respostas, até chegar a vias mais complexas de respostas. Este capítulo objetiva estudar a relação entre os efeitos conhecidos dos AH e alguns componentes do metabolismo antioxidativo em plantas de arroz, utilizados pelos AH para exercer seus efeitos em plantas assim como, a ação protetora antioxidativa dos AH em plantas de arroz em condições de estresse hídrico induzido.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Material vegetal, crescimento das plantas e condições gerais de experimentação

O experimento de bioatividade dos AH em plantas de arroz, foi conduzido utilizando a variedade de arroz Nipponbare sp japonica. As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento no Departamento de Solos da UFRRJ com as seguintes condições de crescimento: (ciclo de luminosidade: 12/12 h (luz/escuro), fluxo fotossintético de fótons: $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, umidade relativa: 70% e temperatura: 28 °C/24 °C (dia/noite). As sementes de arroz foram desinfestadas previamente com hipoclorito de sodio (2%) por 10 minutos e posteriormente lavadas com água destilada. Posteriormente as sementes foram transferidas a potes com gaze que continham somente água destilada. Quatro dias após a germinação das sementes, as plântulas receberam uma solução de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950) modificada a $\frac{1}{4}$ da força iônica total. Depois de três dias foi trocada a solução de Hoagland para $\frac{1}{2}$ da força iônica total, esta mesma solução foi repostada durante todo o experimento. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, utilizando um total de cinco plantas por pote com oito repetições por tratamento. As análises estatísticas foram realizadas no programa Statgraphic plus v.5.5 e os gráficos forma feitos no programa Sigmaplot 10.0 ou Microsoft Excel 2010 quando conveniente.

5.4.2 Aplicações dos tratamentos de AH no experimento de dose vs. resposta

Para estudar o efeito AH em plantas de arroz, foram preparadas sete concentrações de AH, além do controle (sem AH), equivalentes a 0,41; 0,83; 1,25; 1,66; 3,33; 6,66 e 8,33 mM (C). L^{-1} ou (5, 10, 15, 20, 40, 80 e 100 mg C-AH. L^{-1}) de acordo com o volume total da solução nutritiva. Os AH foram dissolvidos na própria solução nutritiva, o pH ajustado a 5,8 e adicionados junto a esta, dois dias após a aclimatação das plantas na solução nutritiva de $\frac{1}{2}$ da força iônica. Estas mesmas soluções foram repostada antes de cada momento de avaliação.

5.4.3 Aplicações dos tratamentos no experimento com estresse hídrico induzido nas plantas com PEG-6000 (15%)

Para as avaliações das plantas em estresse hídrico, foi realizado o mesmo desenho experimental descrito no item 5.2.1. Neste experimento foram usados quatro tratamentos que consistiram em plantas controle (sem AH), plantas tratadas com AH 40 mg C-AH. L^{-1} (AH40), plantas sometidas a estresse induzido com PEG-6000 e plantas sometidas a estresse induzido com PEG-6000 e com aplicação de AH a 40 mg C-AH. L^{-1} . Dois dias após contato das plantas com a solução nutritiva a $\frac{1}{2}$ da força iônica, um grupo de plantas foitransferido a potes onde receberam os AH (AH40) e outro grupo receberam a solução nutritiva com PEG-6000 aos 15%, após 24 horas de contato com PEG-6000, um grupo de plantas receberam os AH (AH40) e dois dias após foram iniciadas a avaliações.

5.4.4 Avaliações de indicadores morfológicos: comprimento radicular (CRP), número de raízes laterais (NRL), massa seca radicular (MR), massa seca folhar (MF), área radicular específica (ARE) e área folhar específica (AFE)

Para avaliar os indicadores morfológicos de NRL e CRP, foram coletadas plântulas a cada dois dias após aplicação de AH. Foi denominando como a primeira colheita: 4 dias após transplantio(2 DAT), segunda colheita: 6 dias após transplantio(4 DAT) e oito dias após transplantio(6 DAT). A cada momento de colheita, as plantas correspondentes a dois potes foram retiradas para a contagem do NRL, posteriormente

foi mesurado o comprimento da radícula e em seguida as raízes foram levadas para determinação da área radicular mediante escaneamento digital do órgão no programa (software DT[®]-scan), posteriormente as raízes foram levadas a estufa para secagem em condições de temperatura igual a 105 °C durante 24 horas. A área radicular específica foi expressa como a relação entre a área radicular e a massa das raízes (ARE).

5.4.5 Quantificação do conteúdo de carboidratos redutores foliares

A quantificação dos carboidratos redutores foliares foi feita nos tecidos foliares das plantas coletadas aos 8 DAT e pertencentes aos tratamentos de 20, 40 e 80 mg (C-AH).L⁻¹, segundo a metodologia descrita por Noelting e Bernfeld, (1948). Resumidamente, 2,0 g de tecido foliar foram macerados e em seguida acrescentados 20 mL de H₂O destilada quente. No extrato decantado foram acrescentados 0,5 g de carvão ativado e levado para aquecimento da mescla até descoloração, o líquido foi filtrado e a quantificação feita por adição do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) e a leitura feita no espectrofotômetro a um comprimento de onda $\lambda=530$ nm. Foi usada uma curva padrão com padrões de concentração conhecida de glicose.

5.4.6 Quantificação simultânea de ABA e AIA mediante cromatografia líquida de alta resolução (high performance liquid chromatographic- HPLC)

Para a quantificação de ABA e AIA nos tecidos radiculares das plantas foi utilizada a metodologia proposta por Kelen et al.(2004), com algumas modificações. Resumidamente, uma massa de 2,5 g de tecido foram homogeneizadas “*over night*” a 4 °C com metanol (70% v:v) e a fase orgânica roto-evaporada a vácuo. A fase aquosa com pH ajustada a 8,5 foi sometida a extrações com Acetato de etilo e a fase orgânica roto-evaporada a vácuo. A fase aquosa foi novamente ajustada a pH 2,5 e sometida a extrações como Dietil éter e em seguida passado através de sulfato de sódio anidro. A fase dietil éter foi roto-evaporada e o resíduo seco que continha os hormônios foi redissolvido em metanol e conservados a 4 °C. A quantificação foi feita em um aparelho de HPLC Shimadzu LC-20AT (Bomba 20 ATProminence, Forno CTO-20A, injetor manual Rheodyne com loop de 20 μ L) equipado com um detector de arranjo de díodos (PDA; SPD-M20A, Shimadzu, Japan) e sistema controlado por computador utilizando um programa LCSolution ChemStation da Shimadzu. Utilizou-se uma coluna analítica de fase reversa Betasil- Thermo C18 (25 cm x 4,5 mm d.i. x 5 micrometro de partícula) sendo a temperatura da coluna de 35 °C. Como fase móvel utilizou-se uma mistura de: A: H₂O:AcOH (pH=3,9)-57%, B: MeOH:ACN (90:10)-43%. Os cromatograma foram monitorados a 265 nm e 280 nm para ABA e AIA respectivamente, o volume de injeção utilizado foi de 20 μ L. A identificação dos hormônios nas amostras foi feita mediante comparação dos espectros UV e os tempos de retenção com os padrões puros de ABA e AIA. A quantificação foi feita pela relação entre a área dos picos no cromatograma e a concentração da curva padrão.

5.4.7 Quantificação e histoquímica das ERO superóxido (O₂⁻) e Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

5.4.7.1 Histoquímica e quantificação de H₂O₂

A histoquímica foi feita segundo a metodologia descrita em Ramel et al. (2009). O 3,3 'diaminobenzidina (DAB-D5637, Sigma-Aldrich), foi dissolvido em H₂O e ajustado a pH 3,8 com KOH. As raízes foram imersas e infiltrados sob vácuo com a solução de coloração 1,25 mg. mL⁻¹ de DAB. As raízes coradas foram então branqueadas em solução de ácido acético-glicerol-etanol (1:1:3) (v:v:v) em 100 °C durante 5 min, e em seguida armazenado em solução de glicerol-etanol (1:4) (v:v), até que foram tomadas as fotografias. O H₂O₂ foi visualizado como uma cor marrom,

devido à polimerização do DAB. Quantificação de conteúdo de H₂O₂ foi determinada utilizando o método de Kotchoni et al. (2006). As raízes coloridas com DAB foram moídas em N₂ líquido. O pó resultante foi homogeneizada em 0,2 M (HClO₄), e depois centrifugada durante 10 min a 12.000 g. A absorbância foi imediatamente lida a $\lambda=450$ nm e comparado com uma curva padrão contendo quantidades conhecidas de H₂O₂ em 0,2 M (HClO₄-DAB).

5.4.7.2 Histoquímica e quantificação de O₂⁻

A histoquímica foi feita segundo a metodologia de Rao e David, (1999) e descrita em Ramel et al. (2009). As raízes foram imersas e infiltradas a vácuo em uma solução de azul de p-nitro tetrazólio (NBT-N6876, Sigma-Aldrich) a uma concentração de 3,5 mg.mL⁻¹ em Tampão de Fosfato: 10 mM e NaN₃: 10 mM. Após a infiltração, as raízes foram clarificadas em uma solução de ácido acético-Glicerol-etanol (1:1:3 v:v:v) a 100 °C durante 5 minutos em banho Maria. As raízes foram armazenadas em uma solução glicerol-etanol (1:4 v:v) até que as fotografias foram tomadas. As raízes coradas em NBT foram maceradas em N₂ líquido. O conteúdo de formazano no pó obtido foi solubilizado em KOH/DMSO (1:1,16 v:v), posteriormente é centrifugado durante 10 minutos a 12.000 g. No sobrenadante foi lida a absorbância $\lambda=450$ nm e determinado mediante curva padrão de NBT em KOH/DMSO. O conteúdo de O₂⁻ é expresso como nmoles de NBT g⁻¹ (massa seca).

5.4.8 Determinação das atividades enzimáticas das POX (EC 1.11.1.7) e SOD (EC 1.15.1.1) totais

O extrato enzimático que permite a determinação das atividades enzimáticas de SOD e POX foi obtido a partir da maceração de uma massa igual 0,5 g de tecido radicular em N₂ líquido. Em seguida foi adicionado um meio de homogeneização consistente em: Tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 6,8), EDTA (0,1 mM), fluoreto de fenilmetilsulfônico (1 mM) e polivinilpirrolidona (1% p:v). Posteriormente este extrato foi filtrado a través em gaze e centrifugado a 12.000 xg durante 15 minutos a 4 °C (Peixoto et al., 1999).

A atividade das POX (EC 1.11.1.7) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Kar e Mishra, (1976). Alíquotas de 100 μ L do extrato enzimático de raízes foram adicionadas a 2,9 mL de uma mistura de reação constituída por: Tampão fosfato de potássio (25 mM, pH 6,8), pirogalol (20 mM), e H₂O₂ (20 mM). Foi medido o acréscimo da absorbância a 420 nm, 25 °C, durante o primeiro minuto da reação pela produção da purpurogalina. A atividade das POX foi determinada de acordo a inclinação da reta após início da reação (0,2-0,4 minutos) e utilizado o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ e o resultado expresso em μ mol min⁻¹ mg⁻¹ proteína (Chance e Maehley, 1955).

Para determinar a atividade da SOD, um volume de 30 μ L do extrato enzimático radicular foi adicionado a um volume de 3 mL de uma mistura de reação composta por: tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,8), azul de p-nitro tetrazólio (NBT) (75 μ M), metionina (13 mM), e riboflavina (2 μ M). A reação foi conduzida em uma câmara fechada com iluminação de uma lâmpada de 15 W. Após 15 minutos de exposição a iluminação foi interrompida e lida a absorbância a $\lambda=560$ nm (fotorredução do NBT a formazana azul). Paralelamente, outra reação igual à anterior, mas, sem ser submetida a iluminação foi tomada como branco. A quantidade de enzima necessária para inibir 50% da fotorredução de NBT foi considerada como uma unidade de SOD (Del Longo et al., 1993; Giannopolitis e Reis, 1977, Beauchamp e Fridovich, 1971).

5.4.9 Atividade enzimática da pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS) e a quantificação de prolina

Para a determinação da atividade da P5CS foi preparado um extrato enzimático mediante a homogeneização de uma massa de 0,5 g de tecido radicular em um tampão de Tris-HCl (100 mM), MgCl₂ (10 mM), EDTA (1 mM), β-mercaptoetanol (10 mM), ditioneitol (4 mM), fenilmetilsulfonil fluoreto (2 mM) e polivinilpirrolidona (2%). O homogenato foi centrifugado a 4 °C durante 20 minutos a 20.000 *xg* e o extrato guardado para avaliação da atividade enzimática (Chilson et al., 1992). A um volume final de 0,5 mL de uma mistura composta por um tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,0), L-glutamato (50 mM), MgCl₂ (20 mM), Hidroxamato-HCl (100 mM), ATP (10 mM) foi adicionado 50 µL do extrato enzimático, a reação foi encubada a 37 °C durante 15 minutos. A reação é paralisada pela adição de 1 mL de um tampão consistente em: FeCl₃ (2,5 g), Ácido tricloroacético (6 g) em um volume de 100 mL de HCl (2,5 M). A proteína precipitada durante a reação foi eliminada por centrifugação e no sobrenadante foi lida a absorbância em uma λ=535 nm. A atividade é expressa como U mg⁻¹ (proteínas).

5.4.10 Quantificação do conteúdo de prolina

O conteúdo de Prolina foi avaliado segundo a metodologia de Bates et al.(1973). O tecido vegetal foi homogeneizado em ácido Sulfosalicílico (3%, w/v) e centrifugado a 14.000 g durante 20 minutos. A seguir foi acrescentada uma mistura de reação que contém 2 mL de ácido acético glacial, 2 mL do reagente ninhidrina e 2 mL do sobrenadante e mantida em incubação durante 1 hora a 90 °C. A absorbância foi lida na fase de Tolueno em λ=250 nm e o conteúdo determinado na curva usando prolina como padrão.

5.4.11 Peroxidação lipídica e teste de permeabilidade de membrana nas raízes das plantas de arroz

O conteúdo de MDA foi obtido pelo método de Dhindsa et al. (1981). Uma massa de 0,5 g de tecido vegetal foi homogeneizada em 6 mL (10%) de ácido Tricloroacético e centrifugado a 10.000 g durante 15 minutos. 2 mL de ácido Tiobarbitúrico foi acrescentado ao sobrenadante e aquecida a mescla (100 °C, 20 minutos) e a seguir rapidamente esfriada e centrifugada a 10.000 g durante 10 minutos. A absorbância foi lida a 450, 532 e 600 nm e calculada Segundo a fórmula: MDA= 6.45×(A₅₃₂-A₆₀₀)-0.56×A₄₅₀. O teste de permeabilidade da membrana foi feito empregando a mensuração da condutividade elétrica. Raízes frescas e pesadas foram colocadas de forma que permitissem serem cortadas homogeneamente em fragmentos de aproximadamente 3 mm. Cada uma das raízes cortadas e pertencentes a cada tratamento foi depositada em recipientes separados que continha água deionizada e um condutímetro para leitura da condutividade elétrica. A primeira leitura foi marcada a partir do contato inicial do tecido com a água e foram feitas leituras a cada mudança da condutividade durante 30 minutos. A condutividade foi expressa como µS cm⁻¹ g⁻¹ (tecido radicular) (Gui-Lian et al., 2009).

5.4.12 Quantificação de proteínas

A dosagem do conteúdo de proteínas em todos os experimentos e para fins de expressão dos resultados das atividades enzimáticas foi realizado como descrito por Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.5.1 Relação entre a dose dos AH e os efeitos radiculares em plantas de arroz

5.5.1.1 Comportamento da emissão de raízes laterais, comprimento da raiz principal, massa seca das raízes, área das raízes, área radicular específica e carboidratos redutores das plantas de arroz

No estudo da ação das SH em plantas, é imprescindível avaliar a concentração ou concentrações que proporcionam a resposta mais promissora. De acordo com a complexidade dos AH, já explicada no capítulo anterior, foi estudada uma ampla faixa de concentrações de AH e três tempos de exposição diferentes.

A Figura 25 mostra a emissão de raízes laterais e o comprimento radicular nas plantas de arroz a diferentes concentrações de AH. A relação entre a concentração de AH e a emissão de raízes responde a um comportamento polinomial de segundo grau ($R^2 > 0,84$). Este comportamento se manteve nos três momentos de avaliação, sendo a concentração de 100 mg (C-AH).L⁻¹ a de menores efeitos e a concentração de 40 mg (C-AH).L⁻¹ como a de maiores efeitos. O comportamento do comprimento radicular também respondeu como uma curva polinomial de segundo grau ($R^2 > 0,74$) (Figura 19). De forma semelhante à emissão de raízes secundárias, no comprimento radicular a concentração de 100 mg (C-AH).L⁻¹ exerceu os menores efeitos, enquanto que, a concentração de 20 mg (C-AH).L⁻¹ foi a mais promissora.

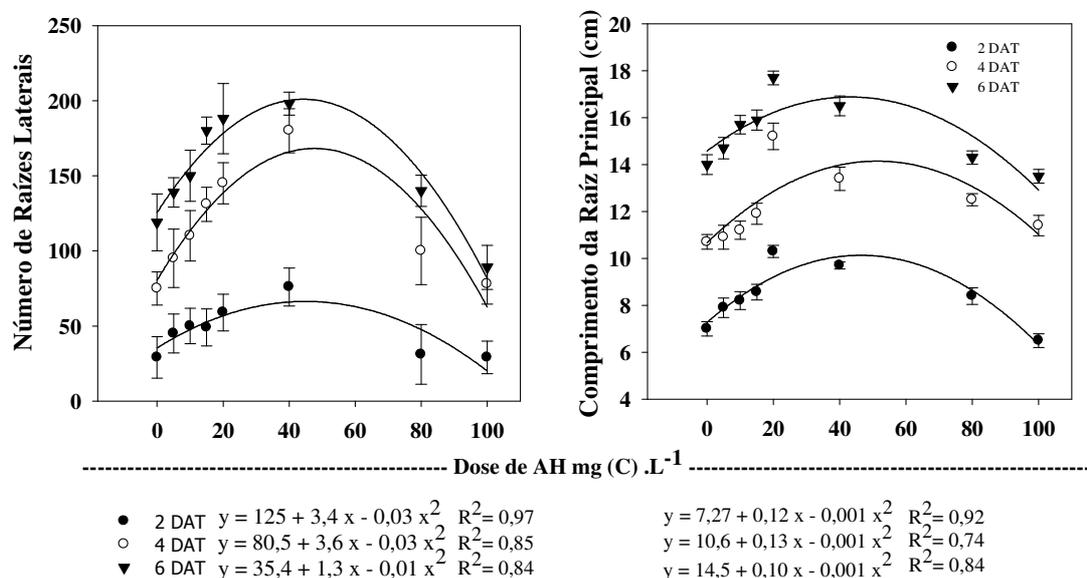


Figura 25. Número de raízes de laterais e comprimento da raiz principal nas plantas de arroz aos 2, 4 e 6 DAT. Barras representam o valor médio \pm ES (erro padrão) para cinco réplicas, segundo o test de Tukey, ($p < 0,05$).

De acordo com estes resultados, a aplicação via radicular dos AH isolados de VC utilizados neste trabalho, estimulam o crescimento e o número de raízes nas plantas de arroz. Uma concentração radicular de 40 mg (C-AH).L⁻¹ exerce um estímulo na emissão de raízes laterais superior a 66% quando comparados ao controle e 20 mg (C-AH).L⁻¹, exerce um aumento no crescimento da radícula superior a 26% comparado com o controle. Por estes motivos foram selecionados para as avaliações

seguintes além da concentração de máximo estímulo, a imediatamente inferior (20 mg (C-AH).L⁻¹) e a imediatamente superior (80 mg (C-AH).L⁻¹).

A Figura 26 mostra a produção de biomassa radicular, o desenvolvimento da área radicular e a relação entre elas. No caso da produção de biomassa, as concentrações de 20 mg (C-AH).L⁻¹ e 40 mg (C-AH).L⁻¹ de AH exerceram as maiores produções com valores superiores a 79% quando comparados com o controle. No caso na área radicular, também as concentrações de AH iguais a 20 mg (C-AH).L⁻¹ e 40 mg (C-AH).L⁻¹ exerceram efeitos de desenvolvimento radicular superior a 100% quando comparados com o controle. Estes resultados mostram que estes tratamentos, resultam em aumento da área radicular e da biomassa radicular. Por outro lado, a área desenvolvida nas raízes por unidade de massa (ARE) mostra que parece existir, embora sem diferenças estatísticas, um efeito estimulador dos AH na multiplicação celular radicular.

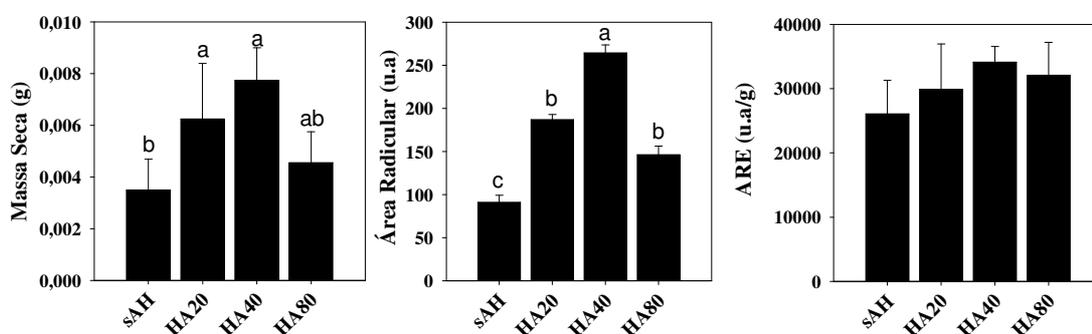


Figura 26. Massa seca das raízes, área radicular e área radicular específica das plantas de arroz aos 6 DAT. (a...c) Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre as médias, segundo o test de Tukey, ($p < 0,05$) e gráficos sem letras significa ausência de diferencias estatísticas entre os tratamentos. Barras representam o valor médio \pm ES (erro padrão) para cinco repetições.

A quantificação dos carboidratos redutores foliares na Figura 27 mostra uma diminuição do conteúdo destes metabólitos nas plantas tratadas com as três concentrações de AH, embora, sem diferenças estatísticas significativas para a concentração de 80 mg (C-AH).L⁻¹. Por outro lado, as concentrações de 20 mg (C-AH).L⁻¹ e 40 mg (C-AH).L⁻¹ que foram as de maiores efeitos na estimulação radicular, experimentaram a maior redução do conteúdo de carboidratos redutores.

Neste sentido é possível que estes estímulos dos processos de divisão e alongamento celular nas raízes das plantas de arroz provocado pela aplicação dos AH, tenham demandado um elevado consumo de carboidratos como fonte de energia. É conhecido que durante o crescimento radicular, grandes quantidades de carboidratos redutores, são transportadas via floema dos órgãos foliares para as raízes, especificamente até as zonas apicais onde o crescimento é rápido, estes carboidratos servem como fonte de energia para a síntese de outros compostos orgânicos (Taiz e Zeiger, 2005).

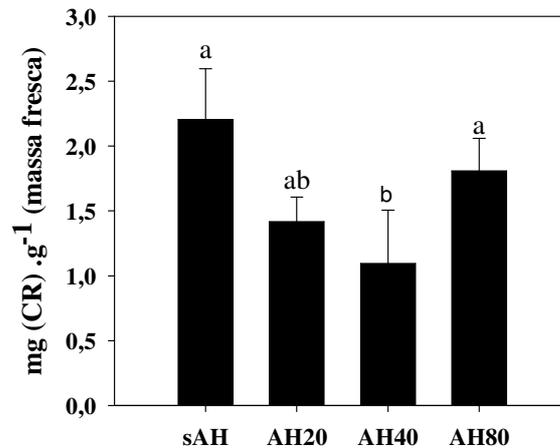


Figura 27. Conteúdo de carboidratos redutores foliares aos 6 DAT. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre as médias, segundo o test de Tukey, ($p < 0,05$). Barras representam o valor médio \pm ES (erro padrão) de cinco repetições.

Uma das questões amplamente discutidas na literatura é precisamente a concentração de SH que exerce o efeito mais promissor nas plantas. Além disso, é impossível às vezes fazer uma generalização e comparação dos resultados pelo fato da variabilidade no modelo experimental utilizado assim como a espécie de planta. Em estudos realizados por Haghghi et al. (2012), foi utilizado Alface (*Lactuca sativa* L.) como material vegetal e foram aplicadas concentrações de AH iguais a $100 \text{ mg (C).L}^{-1}$ e $1000 \text{ mg (C).L}^{-1}$, sendo que esta última concentração estimulou nas plantas a síntese de proteínas, a atividade da Nitrato redutase, a respiração e a taxa fotossintética líquida. Elena et al. (2009), realizaram os estudos dos efeitos da aplicação de AH isolados de leonardita em plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.), a faixa de concentrações aplicadas esteve entre $2\text{-}250 \text{ mg (C).L}^{-1}$. Outros autores estudaram a aplicação de AH isolados de turfa no metabolismo de plantas de *Brassica napus*, a concentração utilizada foi de $100 \text{ mg (C).L}^{-1}$ e estimulou a massa seca das raízes em 88%, assim como também estimulou a expressão de genes relacionados a respostas a estresse (Jannin et al., 2012).

A redução na concentração de carboidratos redutores ocasionado pelo estímulo de processos metabólicos como o ciclo do carbono e nitrogênio quando aplicadas as SH em plantas, foi também observada por Muscolo et al. (2007). Estes autores estudaram os efeitos de SH isoladas de solos e aplicadas a tecidos de plantas de *Pinus nigra* em concentrações entre $0,1\text{-}5,0 \text{ mg (C).L}^{-1}$ e relataram um consumo de glucose e frutose. Balmori (2006), trabalhando com o extrato húmico obtido do mesmo VC que serviu como fonte de obtenção dos AH no presente trabalho, relatou que em plantas de milho (*Zea mays*), quando aplicados estes extratos húmicos, os carboidratos redutores sofreram queda da concentração devido ao estímulo ocasionado no crescimento radicular e biomassa das plantas.

5.5.2 Conteúdos dos fito-hormônios ABA e AIA nas raízes das plantas

A ação tipo hormonal “like hormone”- em inglês, e especificamente a ação tipo auxina “like auxine”- em inglês, das SH em plantas tem sido amplamente relatadas na literatura. No entanto, Muscolo et al. (2013), expõe alguns resultados que comprovam que a presença de estruturas auxínicas nas SH não é suficiente para

explicar este tipo de efeitos nas plantas. Dobbss et al. (2010), relataram que a ação tipo auxina das SH em plantas segue um mecanismo que começa pela exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes das plantas que, em contato com as SH, libera moléculas semelhantes estruturalmente às auxinas da supraestrutura das SH e estas podem ser reconhecidas pelos receptores celulares nas plantas. Canellas et al. (2011), reforçam a ação tipo auxina das SH mediante um estímulo da atividade DR5::GUS em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) pela aplicação de AH.

Os resultados da quantificação do fitohormônio AIA nas raízes das plantas de arroz são mostrados na Figura 28. Neste trabalho não foram encontrados estímulos na biossíntese de AIA nas raízes das plantas tratadas com AH quando comparadas com as plantas no tratamento controle. No entanto, estes resultados não significam que não possa existir um efeito tipo auxinas dos AH, mas indica que não parece ser uma ação exercida através de um estímulo na biossíntese de AIA. Segundo os estímulos discutidos dos AH nas plantas de arroz neste trabalho, como são o comprimento radicular e a emissão de raízes laterais, efeitos típicos da ação de auxina, é possível que este tipo de efeito possa ser exercido mediante um mecanismo semelhante ao descrito por Canellas et al. (2011). Porém, nenhum relato na literatura, encontrado até o presente, comprova que estruturas carbonadas semelhantes estruturalmente a auxinas, são reconhecidas pelos receptores hormonais nas plantas. Neste sentido, é possível considerar outros mecanismos como os responsáveis por estes efeitos. Schmidt et al. (2007), concluiu que as SH solúveis em meio aquoso, isoladas de turfa, não exercem seus efeitos de expansão radicular e aumento da área radicular em plantas de *Arabidopsis*, mediante um efeito tipo auxina.

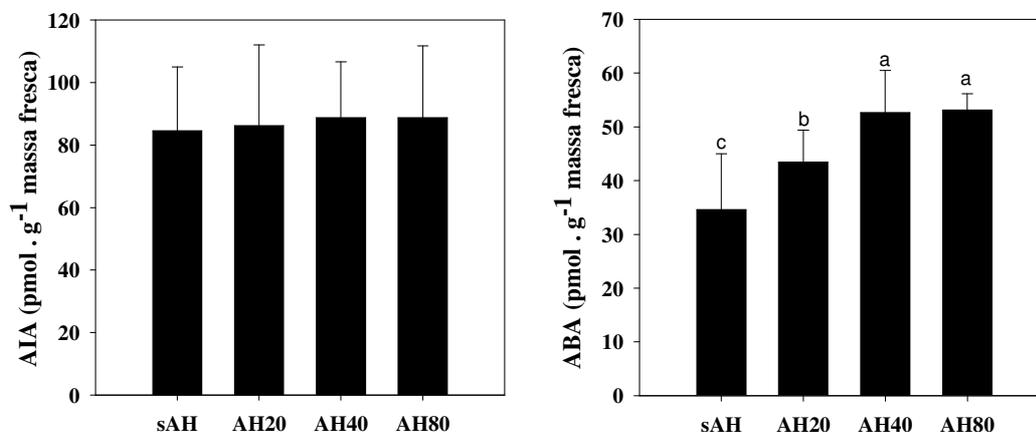


Figura 28. Conteúdos de ABA e AIA nas raízes das plantas de arroz aos 6 DAT. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre as médias, segundo o test de Tukey, ($p < 0,05$). Barras representam o valor médio \pm ES (erro padrão) para cinco repetições.

Os resultados da quantificação de ABA nas raízes são mostrados na Figura 28. A aplicação de AH nas concentrações de 20, 40 e 80 mg (C-AH).L⁻¹ estimularam a biossíntese de ABA nas plantas com conteúdos superiores e estatisticamente diferentes às plantas controle. Este resultado faz então considerar o envolvimento do ABA nos processos de ação dos AH em plantas. Embora estes resultados não sejam inéditos na literatura, os estudos sobre a ação dos AH na biossíntese de ABA em plantas não são muito abundantes. Mora et al. (2010), encontraram que em plantas de *Cucumis sativa* L, tratadas com 100 mg (C).L⁻¹ de AH, houve após 72 horas, um aumento no conteúdo de ABA radicular.

O aumento de ABA nas raízes das plantas pela ação de AH abre portas para novas interpretações dos modos de ação das SH. Isto porque o ABA é reconhecido comohormônio que media processos de sinalização dos mecanismos antiestresse em plantas. Processos como a regulação REDOX e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) estão envolvidos nos processos de sinalização via ABA e através dos canais de Ca^{2+} , assim, as CDPKs estão também relacionadas com a transdução de sinais mediada por ABA (Popko et al., 2010). Neste sentido, já se tem evidências que a aplicação de AH em plantas de milho (*Zea mays*) pode estimular a produção de ERO e a atividade de enzimas catalase (Cordeiro et al., 2011). O ABA pode induzir a produção de ERO mediante as NADPH oxidases localizadas na membrana, o que provoca um influxo de Ca^{2+} nas células (Hirayama e Shinozaki, 2007).

Outra questão importante é o balanço hormonal entre ABA e AIA nas raízes das plantas, diante as evidências do estímulo na produção de raízes pela ação dos AH. Na atualidade não se tem fortes evidências da participação direta do ABA no crescimento das raízes laterais, mas é sugerido que a relação entre ABA e AIA durante o crescimento das raízes laterais é uma função repressora por parte do ABA e promotora por parte do AIA. Também é sugerido que o ABA funcione como um controlador da multiplicação celular meristemática, iniciada por AIA durante o crescimento das raízes, fundamentalmente no primórdio (Smet et al., 2006).

Esta interpretação do modo de ação das SH em plantas é inédita, ao menos a interpretação que avalia o balanço hormonal como uma ação via ERO para o crescimento radicular nas plantas. Alguns componentes do metabolismo antioxidativo serão avaliados com o objetivo de esclarecer a possível participação de ERO nos mecanismos de ação dos AH em plantas de arroz.

5.5.3 Quantificação e histoquímica das ERO superóxido (O_2^-), Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) e atividade enzimática das peroxidases (POX, EC: 1.11.1.7) totais e Superoxido dismutase (SOD, EC: 1.15.1.1)

A Tabela 8 mostra os conteúdos radiculares de ERO e a atividade enzimática de enzimas do metabolismo antioxidativo. Os resultados mostram um aumento na produção radicular de ânions O_2^- dependente da concentração de AH aplicada. Igual comportamento teve a produção radicular de H_2O_2 também dependente da concentração de AH aplicada. No caso das atividades enzimáticas radiculares de SOD e POX, também houve um aumento dependente da concentração de AH.

Tabela 8. Conteúdos das ERO O_2^- e H_2O_2 ; atividade enzimática SOD e POX nas raízes de plantas de arroz aos 6 DAT. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre as medias, segundo o test de Tukey, ($p < 0,05$). Barras representam o valor médio \pm ES (erro padrão) para cinco repetições.

	Conteúdos de metabólitos de ERO		Atividades enzimáticas	
	O_2^-	H_2O_2	SOD	POX
sAH	0,0843 \pm 0,023 ^b	0,061 \pm 0,010 ^b	2,68 \pm 0,341 ^b	14,57 \pm 6,341 ^c
AH20	0,1206 \pm 0,028 ^a	0,075 \pm 0,021 ^{ab}	5,89 \pm 0,891 ^a	20,19 \pm 5,891 ^b
AH40	0,1244 \pm 0,038 ^a	0,090 \pm 0,012 ^a	7,25 \pm 0,812 ^a	24,05 \pm 9,812 ^b
AH80	0,1287 \pm 0,040 ^a	0,094 \pm 0,019 ^a	7,14 \pm 1,012 ^a	31,35 \pm 4,012 ^a

O_2^- : nmol (NBT).g⁻¹ massa fresca; H_2O_2 : $\mu\text{mol. g}^{-1}$ massa fresca
SOD: unidades.mg⁻¹ (proteínas); POX: $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ (proteínas)

Estes resultados indicam que a aplicação de AH em plantas de arroz estimula o funcionamento dos mecanismos antioxidativos. Não são abundantes os trabalhos publicados na literatura que estudem a ação das SH nos mecanismos antioxidativo. No

entanto, as preocupações por estes modos de ação das SH começaram pelos estudos de Vaughan e Ord (1982), onde relataram um estímulo da produção *in vitro* de ânions $O_2^{\cdot -}$ através do sistema xanthine/xanthine-oxidase por SH isoladas de solo em suas frações (AH, ácidos fúlvicos e frações solúveis em água). Os autores comprovaram que os AH exerceram o maior estímulo na produção de $O_2^{\cdot -}$ quando comparado com o resto das frações.

As técnicas histoquímicas realizadas nas raízes das plantas detectaram e confirmaram a presença destas ERO (Figura 29). Segundo a informação visual que permite a técnica, foi possível detectar uma maior presença de $O_2^{\cdot -}$ nas regiões radiculares onde predominam os processos de alongamento celular para as três concentrações de AH aplicadas, sendo que, para a concentração de 80 mg (C-AH) $.L^{-1}$, também foi visualizado $O_2^{\cdot -}$ na região meristemática. No caso do H_2O_2 houve uma detecção desta ERO em toda a extensão da raiz.

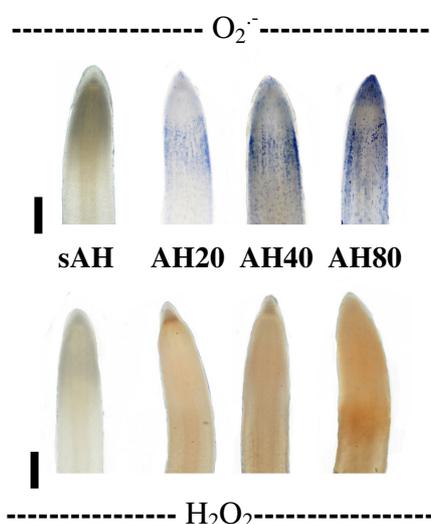


Figura 29. Detecção histoquímica *in vivo* das ERO $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 nas raízes das plantas de arroz aos 6 DAT. Barra 1 mm.

Como não foi possível encontrar na literatura até o presente, relatos deste tipo de resultados, com nível de profundidade sobre o funcionamento do sistema oxidativo em plantas tratadas com SH, as explicações para essas respostas serão interpretadas a partir dos estudos mais atuais sobre as funções das ERO em plantas, assim como a sua relação com o proposto até o presente nos modos de ação das SH. A primeira questão é que as ERO, que foram inicialmente reconhecidas nas plantas como espécies químicas tóxicas produzidas a partir do metabolismo aeróbico (Mittler et al., 2011), atualmente se conhece que também desempenham funções como moléculas sinalizadoras (Miller et al., 2010).

Embora seja conhecido o papel das auxinas na regulação do crescimento e desenvolvimento radicular e por este motivo se relacione a ação das SH com um efeito mimético com as auxinas nas plantas, também a regulação redox tem um papel importante. A formação e preservação dos meristemas apicais radiculares dependem da homeostase das ERO nos tecidos vegetais. A regulação redox pode controlar processos bioquímicos ao longo da raiz e inclusive, regular a atividade das auxinas no crescimento radicular (De Tullio et al., 2010). Estudos de transcriptoma em plantas de *Arabidopsis* mostraram que a sinalização e homeostase das auxinas são modificadas pelas ERO no apoplasto. As ERO no apoplasto podem regular os transcritos de

receptores auxínicos e repressores transcricionais auxina/ácido 3-indol acético (Aux/IAA) mediante mecanismos ainda desconhecidos (Blomster et al., 2011).

Neste sentido, é conhecido que os ânions O_2^- que se produzem no exterior das células podem ser transformados para H_2O_2 e radicais OH^- . O H_2O_2 , por exemplo, é capaz de atravessar a membrana e ser acumuladono interior da célula. Mediante mecanismos que ainda se desconhece, o H_2O_2 estimula os canais de Ca^{2+} intra ou extracelularmente, aumentando o Ca^{2+} no citosol e conduzindo a estímulos das NADPH oxidase e das MPK3 (Demidchik et al., 2009). Esse tipo de respostas é encontrado na região de alongamento e na epiderme matura das raízes (como visualizado neste trabalho nas técnicas histoquímicas), elevadas concentrações de H_2O_2 no apoplasto e no citosol respetivamente, poderiam ativar os canais de Ca^{2+} mediante hiperpolarização da membrana (Demidchik et al., 2007). Isto pode explicar, por exemplo, porque durante o crescimento do coleótilo de plantas de milho (*Zea mays* L) são liberadas ERO nas paredes celulares, especificamente o OH^- que se forma a partir do O_2^- na parede celular, pode causar incrementos na extensibilidade da parede e substituir as auxinas na indução do crescimento (Schopfer et al., 2002).

Estas evidências poderiam justificar como uma ação dos AH nas plantas de arroz poderia ocorrer através da produção de ERO e os mecanismos antioxidativos. O uso de ERO nos mecanismos de sinalização celular no crescimento radicular é eficiente em plantas porque existe uma rede de enzimas localizadas em quase todos os compartimentos celulares que permitem seu o controle (Suzuki et al., 2012). Duas destas enzimas que participam no controle foram avaliadas neste trabalho, a SOD que dismuta o O_2^- até H_2O_2 e as POX que transformam o H_2O_2 até H_2O e O_2 (Gill e Tuteja, 2010). O estímulo destas enzimas pela aplicação de AH indica que os sistemas de limpeza e controle das ERO estão funcionando.

5.5.4 Avaliação da permeabilidade da membrana e peroxidação lipídica nas raízes das plantas de arroz

Um fato importante a ser considerado na produção de ERO estimulada pela aplicação de SH nas raízes é se estes níveis podem afetar a homeostase Redox nas células ao ponto de causar danos na integridade celular. Uma das formas de avaliar os danos causados pelas ERO é através da peroxidação dos lipídeos de membrana. Este processo de peroxidação da membrana causa danos na funcionalidade das células e o processo se agrava a medida que níveis de ERO se elevam. Durante a peroxidação, são formadas entre outras substâncias as MDA, as que podem ser quantificadas e são um indicador do nível de peroxidação que acontece em um tecido específico (Montillet et al., 2005).

A Figura 30 mostra os níveis de MDA detectado nos tecidos radiculares das plantas de arroz sometidas às aplicações de AH. Os níveis de MDA mostraram aumentos nas raízes das plantas sometidas a 20 e 80 mg (C-AH) $.L^{-1}$, enquanto que para 40 mg (C-AH) $.L^{-1}$ os níveis foram mais semelhantes às plantas em tratamento controle. Embora possam ser visíveis os níveis aumentados de MDA nos tratamentos mais diluídos e nos mais concentrados, estes não apresentaram diferenças estatísticas quando comparado com o controle.

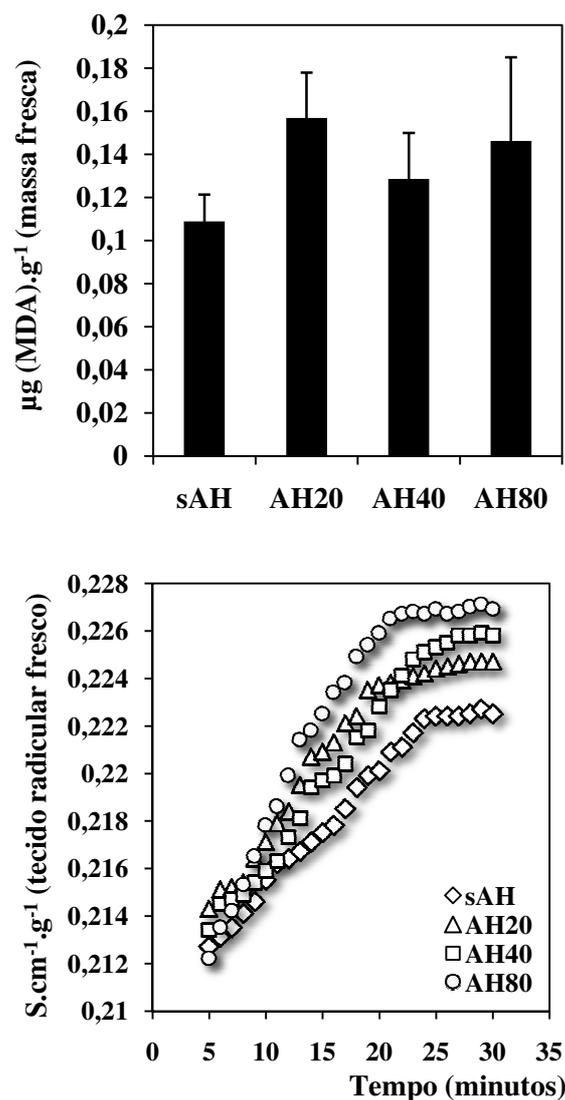


Figura 30. Níveis de MDA como indicador da peroxidação lipídica e ensaios de estabilidade da membrana como indicador de permeabilidade nas raízes das plantas de arroz. Barras representam o valor médio \pm ES (erro padrão) para cinco repetições.

Embora aumente a produção de ERO, como detectado e quantificado neste trabalho, e conhecendo que estas espécies ($O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2) são iniciantes da peroxidação lipídica, estes níveis não parecem exercer danos na funcionalidade células. Estas concentrações de AH estimulam o crescimento e número de raízes, assim como a massa e a área radicular. Contrário à possibilidade existente de danos por peroxidação lipídica, é possível associar estes níveis de MDA com os efeitos positivos exercidos pelos AH nas plantas. É sabido que estes processos de peroxidação nas plantas pode também acontecer naturalmente e o seu controle eficiente beneficia à planta. Uma peroxidação controlada na membrana lipídica das plantas pode diminuir a rigidez e aumentar sua fluidez, isto aumenta a possibilidade de troca entre camadas dos fosfolipídios aumentando a permeabilidade, como consequência, aumenta o influxo de substâncias que naturalmente encontram resistência para penetrar na célula, propiciando também processos de inativação de receptores e aumentar a possibilidade de passo de canais iônicos entre outros (Gill e Tuteja, 2010). Estes processos em nível de membrana e sua relação com as ERO já foram discutidas no item anterior.

O teste da permeabilidade de membrana mostrado na Figura 30 reafirma o discutido até aqui. Os resultados do teste mostram que nas raízes das plantas tratadas com as três concentrações de AH existe um aumento da saída de eletrólitos, superior ao mostrado pelas raízes das plantas no tratamento controle. Os resultados indicam um efeito dos AH na permeabilidade das membranas de células da raiz e estes efeitos parecem acontecer a partir da geração de ERO nas plantas e a regulação da homeostase Redox na planta.

5.5.5 Atividade enzimática da P5CS e a quantificação de prolina

Além do funcionamento dos mecanismos antioxidativos nas plantas diante uma condição de estresse, existem outros que produzem metabólitos que contribuem para o controle das ERO e para manter a homeostase redox nos tecidos vegetais. Um exemplo destes metabólitos é a prolina, que se acumula em plantas em condições de estresse, apresentando funções como controladores das ERO e especificamente como supressores dos singletos de oxigênio. A síntese de prolina é iniciada usando glutamato como substrato pela enzima pirrolina-5-carboxilato sintase (P5CS) (Szabados e Savoure, 2009).

A atividade da enzima P5CS e o conteúdo de prolina nas raízes das plantas de arroz são mostrados na Figura 31. Houve estímulo da atividade P5CS nas raízes das plantas tratadas com as três concentrações de AH. Um comportamento semelhante teve o conteúdo de prolina. Tanto para a atividade da P5CS quanto para o conteúdo de prolina, o aumento teve uma relação positiva com o aumento da concentração de AH.

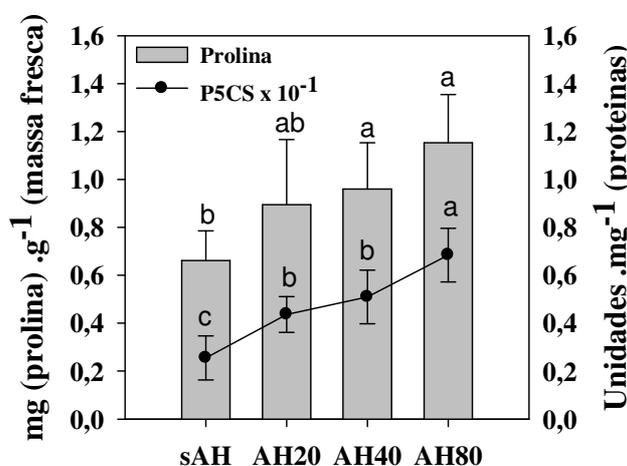


Figura 31. Atividade da enzima P5CS e conteúdo de prolina nas raízes das plantas de arroz aos 6 DAT. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre as médias, segundo o teste de Tukey, ($p < 0,05$). Barras representam o valor médio \pm ES (erro padrão) para cinco repetições.

O comportamento das enzimas da síntese de prolina quando aplicados AH nas plantas não tem sido estudado até o presente. Um aumento no conteúdo de prolina pode também vir a contribuir com o controle das ERO produzidas nas raízes. O maior conteúdo de prolina foi encontrado nas raízes das plantas onde foi aplicada a maior concentração de AH, também coincidente com o tratamento que provocou os maiores conteúdos de ERO. Estes resultados foram também relatados por autores como Anjum et al. (2011), que encontraram que ácidos fúlvicos aplicados por aplicação foliar em milho (*Zea mays*) estimularam as atividades das enzimas do sistema antioxidativo e o

acúmulo de prolina, propiciando uma maior proteção das plantas frente às condições de estresse hídrico. AH aplicados a plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) em condições de estresse salino, também mostraram induzir efeitos protetores mediante o aumento do conteúdo de prolina melhorando a assimilação de nutrientes como Fósforo e Nitrogênio (Aydin et al., 2012).

Vários processos metabólicos de defesas estimulados pelos AH podem ser regulados de forma parcialmente semelhantes. A própria percepção de estresse desencadeia a síntese de ERO. O H_2O_2 induz à biosíntese de ABA e aumenta a atividade das POX, que tem como função, catalisar a redução do H_2O_2 até H_2O . As POX podem também oxidar hormônios do crescimento como as auxinas (Passardi et al., 2004; Dunand et al., 2006). Os aumentos nos conteúdos de ABA como os encontrados neste trabalho, podem induzir o acúmulo de prolina mediante indução da P5CS1, como reportado também para *A. Taliana* (Strizhov et al., 1997; Savoure et al., 1997; Abraham et al., 2003). Essa análise pode começar pelo fato de não ter-se obtido produção de MDA nas células mesmo havendo uma produção de H_2O_2 o que provoca peroxidação de lipídeos de membrana. Os níveis de H_2O_2 podem ser controlados pela prolina que apresenta uma forte atividade antioxidante (Matysik et al., 2002) assim como também pelas POX.

Uma nova homeostase redox após a percepção do estresse pode ter como resultado final o aumento da emissão de raízes e do número de raízes totais. Um dos responsáveis por este tipo de efeitos pode ser o H_2O_2 , já que essa ERO tem um papel fundamental nos mecanismos de sinalização celular e molecular. O H_2O_2 tem a vantagem de atravessar as membranas passivamente mediante canais de água e há relatos que essa sinalização entre células por meio das ERO pode ser de até 8,4 cm/min (Mittler et al., 2011). Outros trabalhos mostram que H_2O_2 exerce efeitos sobre o desenvolvimento dos pelos radiculares nas raízes das plantas (Pitzschke et al., 2006).

5.5.6 Experimentos da ação dos AH em plantas de arroz em condições de estresse hídrico induzido com PEG

5.5.6.1 Crescimento radicular das plantas de arroz submetidas a estresse hídrico e com aplicação de AH

A Figura 32 mostra o NRL das plantas de arroz em condições de estresse e com aplicação da dose de maiores efeitos ($40 \text{ mg C-AH.L}^{-1}$). A indução de estresse nas plantas de arroz provocou um aumento do NRL nos dois primeiros dias de avaliação, ocorrendo uma posterior diminuição aos quatro dias de avaliação e um retardo da emissão de raízes laterais aos seis dias quando comparado às plantas no tratamento controle. Este comportamento na emissão de raízes nas plantas tratadas com PEG-6000 (20%) é um indicativo que uma condição de estresse, no caso hídrico, pode alterar o desenvolvimento e crescimento das raízes nas plantas de arroz. A incorporação de AH na concentração de $40 \text{ mg C-AH.L}^{-1}$ a plantas em condições de estresse hídrico (+AH+PEG), permitiu uma continuidade da emissão de raízes laterais, com um maior número de raízes emitidas nas plantas que receberam os AH quando comparadas às plantas que continuaram estressadas no tratamento com PEG e inclusive, levemente superior às plantas do tratamento controle, mas inferior às plantas tratadas com somente com AH (Figura 32).

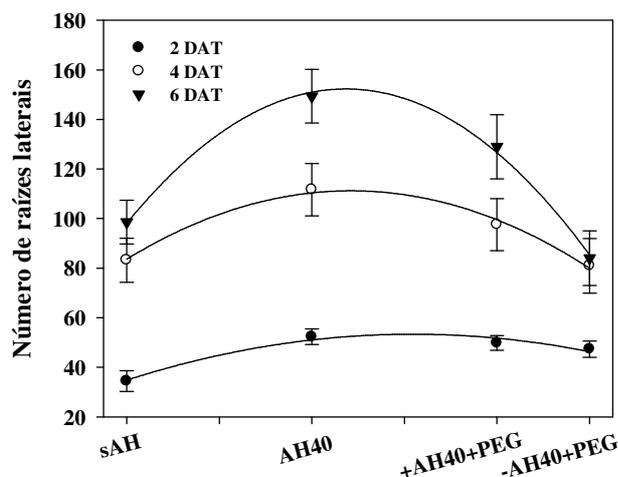


Figura 32. Número de raízes de laterais nas plantas de arroz aos 2, 4 e 6 DAT. Barras representam o valor médio \pm ES (erro padrão) para cinco repetições, segundo o test de Tukey, ($p < 0,05$).

Estes resultados são evidências de uma ação protetora antiestresse do AH em plantas de arroz. Na literatura existem poucos estudos que demonstrem os mecanismos pelos quais as SH exercem uma ação protetora em plantas sob estresse. No entanto, é conhecido que o estresse hídrico causa aumentos na produção de ERO nos tecidos vegetais, provocando peroxidação de lipídeos de membrana, afetando sua funcionalidade e desenvolvimento (Jaleel et al., 2009; Sharma et al., 2012; Aroca et al., 2012). O retardo observado na emissão de raízes das plantas estressadas neste experimento pode ser produto da ação deste mecanismo afetando o desenvolvimento radicular e a aplicação dos AH, pode ter resultado no aumento da eficiência do mecanismo de controle destas ERO.

5.5.7 Quantificação e histoquímica das ERO superóxido ($O_2^{\cdot-}$), Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) e atividade enzimática das peroxidases (POX, EC: 1.11.1.7) totais e Superoxido dismutase (SOD, EC: 1.15.1.1)

De forma semelhante ao experimento anterior, neste experimento foram também avaliadas as espécies $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 além da atividade SOD e POX (Tabela 9). Como esperado, nas raízes das plantas estressadas com PEG-6000 e sem AH foram quantificados os maiores conteúdos das ERO $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 quando comparados com o resto dos tratamentos, assim como as menores atividades SOD e POX. Nas plantas neste tratamento, as atividades de SOD e POX foram superiores ao tratamento controle, mas inferiores às plantas em estresse e com AH, e inclusive, superiores às plantas tratadas somente com AH.

Foi observado um aumento das atividades SOD e POX em plantas estressadas e que receberam os AH, isto produz uma diminuição de ERO nas raízes das plantas neste tratamento, o que pode ser interpretado como uma ação protetora. O funcionamento deste mecanismo nas plantas tratadas só com AH40, faz entender que os AH podem exercer efeitos de aumentos na eficiência do funcionamento do mecanismo antioxidativo e ou um aumento da atividade destas enzimas.

Tabela 9. Conteúdos das ERO $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 ; atividade enzimática SOD e POX nas raízes de plantas de arroz aos 6 DAT. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre as medias, segundo o test de Tukey, ($p < 0,05$). Barras representam o valor médio \pm ES (erro padrão) para cinco repetições.

	Conteúdos de metabólitos de ERO		Atividades enzimáticas	
	$O_2^{\cdot-}$	H_2O_2	SOD	POX
sAH	0,093 \pm 0,033 ^c	0,064 \pm 0,021 ^c	2,986 \pm 0,541 ^c	13,019 \pm 1,341 ^c
AH40	0,130 \pm 0,038 ^b	0,074 \pm 0,020 ^b	7,071 \pm 0,712 ^a	21,467 \pm 1,891 ^a
+AH40+PEG	0,122 \pm 0,048 ^{bc}	0,080 \pm 0,015 ^b	6,615 \pm 0,912 ^a	23,209 \pm 1,112 ^a
-AH40+PEG	0,199 \pm 0,010 ^a	0,105 \pm 0,011 ^a	5,053 \pm 0,512 ^b	17,652 \pm 0,952 ^b

$O_2^{\cdot-}$: nmol (NBT).g⁻¹ massa fresca; H_2O_2 : μ mol. g⁻¹ massa fresca
SOD: unidades.mg⁻¹ (proteínas); POX: μ mol.min⁻¹.mg⁻¹ (proteínas)

A Figura 33 mostra a presença *in-vivo* das ERO nas raízes das plantas. É possível visualizar um elevado conteúdo das ERO nas raízes das plantas submetidas a estresse hídrico com PEG-6000, como confirmado na quantificação. Nas raízes das plantas em estresse e que receberam os AH se visualiza uma diminuição da presença das ERO quando comparada com as raízes das plantas estressadas. Em todos os tratamentos se visualiza presença de ERO comparada com o tratamento controle.

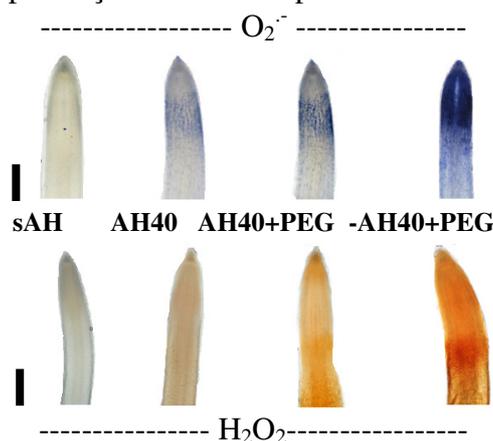


Figura 33. Detecção histoquímica *in vivo* das ERO $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 nas raízes das plantas de arroz aos 6 DAT. Barra 1 mm.

O efeito protetor dos AH em plantas e seus mecanismos de funcionamento não tem sido estudado em profundidade até o presente. No entanto, em estudos com plantas infestadas de nematoides (*Meloidogyne incognita* e *Rotylenchulus reniformis*), as que receberam aplicações de AH, foi mostrada que houve uma melhora do rendimento através de um aumento do conteúdo de compostos antioxidantes e da atividade de enzimas do metabolismo antioxidativo como SOD, APX e CAT (Kesba e El-Beltagi, 2012). Outros estudos têm relatado que bioestimulantes baseados em AH e aplicados a plantas de milho e feijão regularam a atividade das SOD e APX (Vasconcelos et al., 2009).

5.5.8 Teste de permeabilidade de membrana e peroxidação lipídica de membrana nas raízes das plantas de arroz

Os conteúdos de MDA, que são indicadores da peroxidação lipídica, mostraram-se elevados nas raízes das plantas submetidas a estresse hídrico e superior aos demais tratamentos. As raízes das plantas em estresse e que receberam os AH, mostraram conteúdos de MDA semelhantes aos das plantas tratadas somente com AH (AH40) e ao controle. Estes resultados indicam eficiência no funcionamento do

mecanismo antioxidativo de respostas nas plantas estressadas e que receberam os AH, evitando a peroxidação lipídica como ocorrida nas plantas estressadas (Figura 34).

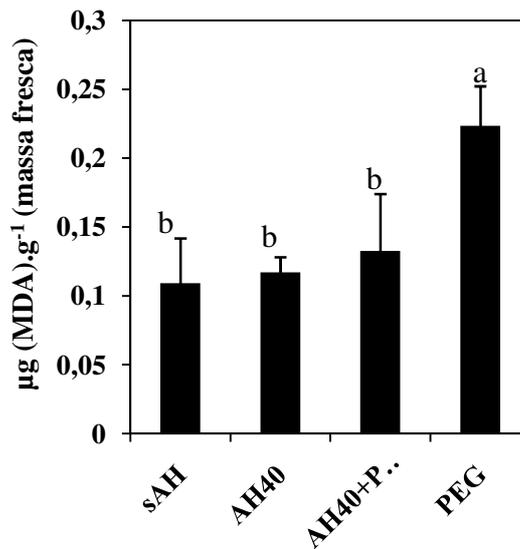
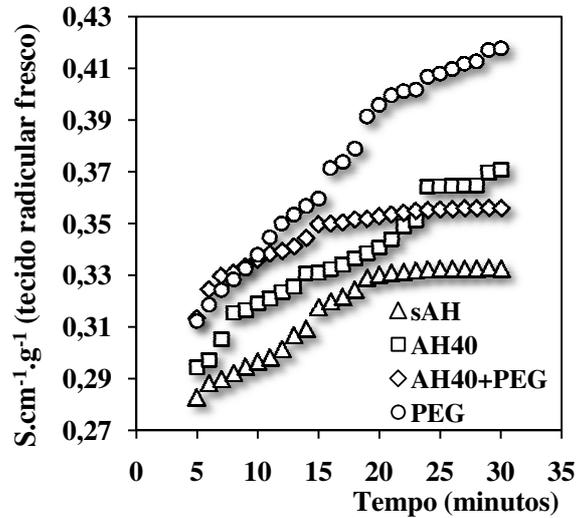


Figura 34. Níveis de MDA como indicador da peroxidação lipídica e ensaios de estabilidade da membrana como indicador de permeabilidade nas raízes das plantas de arroz. Barras representam o valor médio \pm ES (erro padrão) para cinco repetições.

O teste de permeabilidade da membrana reafirma o encontrado na peroxidação lipídica. A permeabilidade da membrana nas raízes foi visivelmente afetada pela presença do estresse. Nas plantas em estresse e que receberam os AH, a permeabilidade da membrana se mostrou menos afetada. Estes resultados constituem também uma evidência da eficiência dos mecanismos de proteção nas plantas tratadas com AH e vem reafirmando o observado na emissão de raízes. Desta forma, pode ser interpretado que uma emissão de raízes nas plantas submetidas a estresse e com AH, superior às plantas estressadas é o resultado da ação dos AH, onde, os aumentos nas atividades das enzimas antioxidantes provocam maior controle da concentração das

espécies ERO (homeostase redox), evitando a peroxidação lipídica e protegendo a integridade funcional das membranas celulares.

Estes resultados são ainda mais importantes porque a regulação redox nas células vegetais constitui um processo chave para a manutenção funcional da planta. É conhecido que um desbalanço redox pelo acúmulo de ERO nas plantas provoca além da peroxidação de lipídeos, a desnaturalização de DNA, proteínas e oxidação de organelas de forma geral (Suzuki et al., 2012).

5.5.9 Quantificação de ABA e prolina

A Figura 35 mostra o conteúdo de ABA nas raízes das plantas. Como era esperado, nas raízes das plantas em condições de estresse houve um acúmulo de ABA, o que também pode confirmar a condição de estresse nas plantas, pois é conhecido que um aumento da biossíntese de ABA acontece em plantas quando submetidas a diferentes estresses abióticos, entre eles o hídrico (Popko et al., 2010).

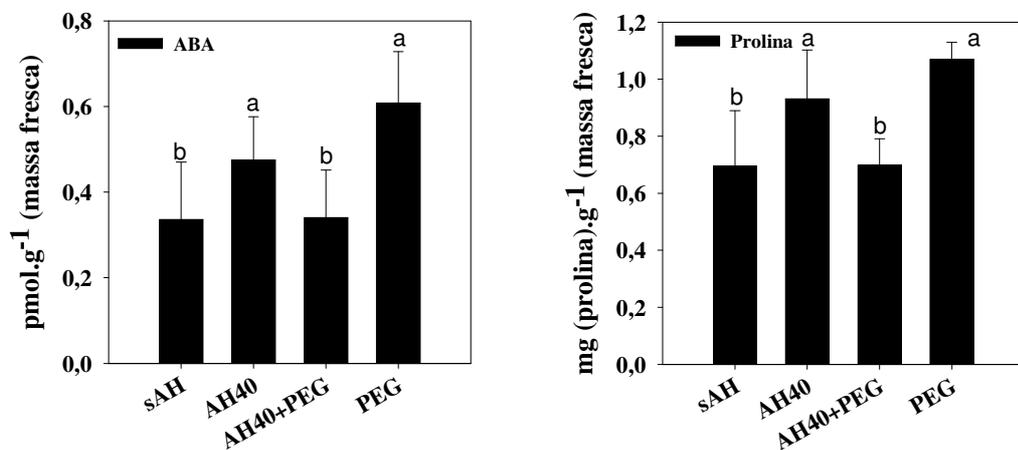


Figura 35. Conteúdos de ABA e prolina nas raízes das plantas de arroz aos 6 DAT. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre as médias, segundo o teste de Tukey, ($p < 0,05$). Barras representam o valor médio \pm ES (erro padrão) para cinco repetições.

Neste experimento não foram obtidos níveis de ABA elevados nas plantas submetidas a estresse e com AH, no entanto, nas plantas onde foi aplicado somente AH, foi confirmado mais uma vez um aumento na biossíntese de ABA. Diante este resultado é possível verificar que a aplicação de AH em plantas submetidas a estresse hídrico provoca uma diminuição ou inibição na biossíntese de ABA. Em termos de compostos indicadores de uma condição de estresse, estes resultados poderiam ser interpretados como outra evidência de um efeito protetor dos AH em plantas estressadas. A ausência de um aumento na biossíntese de ABA pode ser devido a uma reestruturação da homeostase redox nas plantas antes do momento de avaliação, onde os mecanismos de sinalização pelo ABA podem ter-se iniciado com anterioridade a este momento e induzidos pelo próprio aumento de compostos como o H_2O_2 .

É possível encontrar evidências que reafirmam esta ação antiestresse nas plantas, indicado pela ausência de um elevado conteúdo de prolina nas raízes de plantas em estresse e tratadas com AH (Figura 35). Desta forma, é possível que um eficiente controle redox nas plantas antes da avaliação pode ter feito desnecessária a biossíntese de prolina.

5.6 CONCLUSÕES

Os AH isolados do VC de esterco bovino, mostraram aumentar a emissão de raízes laterais e o comprimento radicular em plantas de arroz. Os efeitos foram mais intensos nas concentrações de 40 mg (C-AH).L⁻¹ e 20 mg (C-AH).L⁻¹. A área radicular específica se mostrou mais favorecida para os processos de alongamento que para os de multiplicação de células radiculares e isto acontece através de um consumo de energia proveniente dos carboidratos redutores foliares.

Os AH mostraram exercer uma regulação da homeostase redox, estimulando a produção de ERO e controlando seus níveis por meio do estímulo da atividade das enzimas do metabolismo antioxidativo (SOD e POX). Esta via de ação parece utilizar além dos mecanismos de sinalização das próprias ERO, as vias de sinalização do ABA e não através de uma ação que provoque aumentos da biossíntese de AIA endógeno.

Nas plantas em estresse hídrico induzido por PEG-6000 foram afetados negativamente os processos de emissão de raízes laterais, no entanto, quando as plantas receberam como tratamento os AH, houve uma preservação dos processos de crescimento e desenvolvimento radicular, comprovados mediante uma emissão de raízes laterais superiores ao tratamento controle sem AH. A ação protetora dos AH favorece uma maior eficiência no controle das ERO mediante o funcionamento acelerado das enzimas do metabolismo antioxidativo, preservando a integridade da membrana celular radicular mediante a inibição da peroxidação lipídica.

6 CAPÍTULO IV

**AÇÃO DOS AH NO METABOLISMO ANTIOXIDATIVO DE
PLANTAS DE ARROZ ADULTAS COM E SEM ESTRESSE
HÍDRICO. INTERAÇÃO DOS AH COM O SISTEMA
RADICULAR DAS PLANTAS.**

6.1 RESUMO

Atualmente existem diferentes teorias para explicar os efeitos das SH nas plantas, sendo a relação entre a estrutura e a atividade biológica o ponto em comum para estes estudos. A relação existente entre os AH e a geração de ERO é fundamental para o entendimento dos modos de ação dos AH, isto porque as ERO participam na maioria dos processos bioquímicos existentes nas plantas. As aquoporinas, especificamente as *TIPs*, apresentam um papel importante por serem responsáveis no fluxo de água e regulação do H_2O_2 intracelular. Não existem hoje estudos na literatura sobre os efeitos dos AH em plantas através do metabolismo antioxidativo, iniciado pela interação AH-raíz e chegando até a expressão de aquaporinas do tonoplasto. Este capítulo teve como objetivo: (i) caracterizar a interação entre os AH e as raízes de plantas adultas, (ii) avaliar a percepção desta interação através do metabolismo de defesa antioxidativo e as aquoporinas do tonoplasto e sua ação protetora em plantas adultas em condições de estresse hídrico. Os AH isolados do VC de esterco bovino, estimularam os sistemas de defesa antioxidativo e mostraram efeitos protetores em plantas submetidas a estresse hídrico também em plantas adultas. Neste capítulo se comprovou que existem interações entre os AH e o sistema radicular das plantas e que as frações de AH que interagem com as raízes são menos complexas estruturalmente que os AH adicionados, tanto em condições normais de crescimento quanto em condições de estresse. De forma geral, a espectroscopia demonstrou que nos AH aglomerados nas raízes predominam estruturas alquílicas e alquílicas oxigenadas (0-110 ppm), carboxílicas (156-186 ppm) e carbonílicas (186-230 ppm) e apresentam diminuição de estruturas arílicas (110-142 ppm) e O-arílicas (142-156 ppm). As diferentes concentrações dos AH mostraram exercer efeitos na atividade de algumas das enzimas (POX e SOD) do sistema de defesa antioxidativo, controlando os conteúdos de ERO e os efeitos na peroxidação de lipídeos. Nos modos de ação dos AH, se encontram também envolvidas as aquoporinas do tonoplasto. Nas plantas de arroz em estresse hídrico, a aplicação radicular de diferentes concentrações de AH manteve baixa a atividade das POX e os níveis de H_2O_2 quando comparados com os níveis encontrados nas plantas estressadas e sem AH. Nas raízes os tratamentos de AH a 40 e 80 mg C L⁻¹ não mostraram diminuição dos níveis de H_2O_2 , porém, a peroxidação de lipídeos em folhas e raízes foi menor nos três tratamentos de AH quando comparados às plantas estressadas e sem AH. A adição de AH em plantas submetidas ao estresse hídrico, reestabelece os níveis de ABA de plantas não submetidas ao estresse hídrico, indicando um alívio do estresse pelo AH por vias independentes de ABA, assim como reduz os níveis de expressão das *OsTIPs* em folhas e raízes na concentração de 80 mg L⁻¹ de C. Estes efeitos parecem ser iniciados através de fenômenos de interações químicas e físicas entre os AH e o sistema radicular nas plantas.

Palavras-chave: Aquoporinas. Estresse hídrico. CP-MAS ¹³C RMN. ERO.

6.2 ABSTRACT

Currently there are different theories to explain the effects of HS plants and the relationship between the structure and biological activity. The relationship between the HA and the generation of ROS is essential for understanding the modes of action of HA as ROS is involved in most biochemical processes in plants. The aquaporins specifically the *TIPs*, have an important role being responsible for the flow of water and regulation of intracellular H₂O₂. This chapter aimed to (i) characterize the interaction between HA and the roots of mature plants, (ii) assess the perception of this interaction through metabolism and antioxidative defense aquaporins, the tonoplast and its protective action in plants grown under conditions of water stress. The HA isolated from the VC stimulated the antioxidant defense systems and showed protective effects in plants to water stress. This chapter has shown that there are interactions between the AH and the rice root system and that the fractions of HA that interact with the roots are less structurally complex than HA, both in normal and in stress conditions. Spectroscopy showed that at HA cluster structures found at root surface predominate oxygen alkyl and alkyl (0-110 ppm) , carboxylic (156-186 ppm) and carbonyl (186-230 ppm) and exhibit decreased aryl structures (110-142 ppm) and O-aryl (142-156ppm). The different concentrations of HA exert effects on activity of some enzymes (SOD and POX) of the antioxidative defense system controlling the contents of ROS and effects on lipid peroxidation. Modes of action of AH are also involved in the aquaporins from tonoplast. In the rice plants under water stress HA activity remained even at low levels of POX and H₂O₂ as compared to the levels found in stressed plants without AH. Treatments with HA 40 and 80 mg C L⁻¹ did not show decreased levels of H₂O₂, however, lipid peroxidation in leaves and roots was lower in all three treatments when compared to HA stress plants without HA. The addition of HA in plants subjected to drought stress restores the levels of ABA in plants not subjected to water stress, suggesting a relief of stress by HA by independent pathways in relation to ABA as well as reduced levels of expression in leaves and roots *OsTIPs* at a concentration of 80 mg L⁻¹ of C. These effects appear to be initiated by chemical and physical interactions between the HA and the root system in plants.

Keywords: Aquaporins. Water stress. CP-MAS ¹³C RMN. ROS.

6.3 INTRODUÇÃO

Existem hoje diferentes critérios para explicar os efeitos das SH nas plantas, no entanto, a relação entre a estrutura e a atividade biológica constitui um ponto em comum nos estudos sobre esta temática. Nardi et al.(2007), explicam que as frações húmicas de menor tamanho apresentam maior flexibilidade estrutural e por isso são mais efetivas em seus efeitos no ciclo de Krebs em plantas de milho (*Zea mays*). Muscolo et al.(2007) relatam que o efeito das SH se encontra mais relacionado com as características estruturais do que com o peso molecular ao mesmo tempo que Canellas et al.(2010), comprovam que o tamanho molecular dos AH não é fator primário na emissão das raízes de plantas de milho (*Zea mays*). Dobbssset al.(2010) reafirmam que a ação dos AH está relacionada com as suas características estruturais e em correlação com seus índices de hidrofobicidade, justificando o reconhecimento de fragmentos estruturais nos AH pelos receptores auxínicos nas células das plantas.

Por outro lado, novos trabalhos mostram que os AH exercem efeitos no metabolismo dos compostos fenil-propanoide, induzindo a atividade PAL/TAL (EC 4.3.1.5) (Schiavon et al., 2010). Tem sido proposta também como modo de ação, a distribuição de NO_3^- desde a raiz até o resto da planta, envolvendo uma distribuição dos conteúdos de citosinas e no transporte de nutrientes, o que se encontra vinculado com a atividade das H^+ -ATPase exercidas pelos AH (Mora et al., 2010). Neste sentido, tem sido comprovado que o NO funciona como mediador na atividade tipo auxina dos AH, induzindo a atividade H^+ -ATPase e reafirmando os mecanismo de crescimento mediante a extrusão de prótons pela raiz (Zandonadi et al., 2010).

Recentemente foi proposto um novo modo de ação dos AH nas plantas através da sua interação com as raízes, afetando sua transpiração e sua condutividade hidráulica mediante uma condição denominada estresse coloidal (Asli e Neumann, 2010). Outros autores têm encontrado efeitos dos AH nos mecanismos de defesa antioxidativos, exercendo estímulos nas enzimas CAT e na geração de ERO, as que atuam como intermediários no crescimento das plantas (Cordeiro et al., 2011). Tem-se relatado também que, bioprodutos baseados em SH estimulam a atividade da SOD e APOX em plantas em condições de estresse hídrico (Vasconcelos et al., 2009).

A relação existente entre os AH, a geração de ERO e o metabolismo de defesa antioxidativo é fundamental para o entendimento dos modos de ação dos AH, isto porque as ERO participam na maioria dos processos bioquímicos existentes nas plantas. As ERO, assim como as auxinas, são capazes de liderar eventos de hiperpolarização de membrana em nível celular, induzindo a entrada do Ca^{2+} no citosol (Pei et al., 2000; Kramer, 2009). O H_2O_2 é uma das ERO mais estáveis nas plantas e tem a capacidade para difundir através das membranas, em baixas concentrações participa como molécula sinalizadora nos processos de adaptação a vários estresses bióticos e abióticos assim como no desenvolvimento e crescimento radicular em plantas (Henzler e Steudle, 2000; Quan et al., 2008; Foreman et al., 2003).

Na regulação redox e intracelular em plantas, as aquoporinas apresentam um papel importante por serem responsáveis pela pressão osmótica, a permeabilidade da membrana e o equilíbrio osmótico celular (Tyreman et al., 2002; Hohmann et al., 2000). Especificamente as TIPs lideram o fluxo de água e solutos entre o citoplasma e os compartimentos vacuolares e tem sido demonstrado que seu papel no transporte e regulação no fluxo de H_2O_2 intracelular (Kaldenhoff e Fischer, 2006; Bienert et al., 2007). No entanto, ainda não existem na literatura relatos sobre os efeitos dos AH na regulação das aquaporinas em nível molecular.

Embora se tenham estes conhecimentos, não existem hoje relatos na literatura de estudos dos efeitos dos AH em plantas com este tipo de foco, atendendo à percepção nas plantas através do metabolismo antioxidativo da interação AH-raíz e chegando até a expressão de aquaporinas do tonoplasto. Este capítulo teve como objetivo: (i) caracterizar a interação entre os AH e as raízes de plantas adultas, (ii) avaliar a percepção desta interação através do metabolismo de defesa antioxidativo e as aquaporinas do tonoplasto e sua ação protetora em plantas adultas em condições de estresse hídrico.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

6.4.1 Material vegetal, crescimento das plantas e condições gerais de experimentação

O experimento de bioatividade dos AH em plantas de arroz, foi conduzido utilizando a variedade de arroz Nipponbare sp japonica. As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento no Departamento de Solos da UFRRJ com as seguintes condições de crescimento: (ciclo de luminosidade: 12/12 h (luz/escuro), fluxo fotossintético de fótons: $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, umidade relativa: 70% e temperatura: 28 °C/24 °C (dia/noite). As sementes de arroz foram desinfestadas previamente com hipoclorito de sodio (2%) por 10 minutos e posteriormente lavadas com água destilada. Posteriormente as sementes foram transferidas a vasos com gaze que continham somente água destilada. Quatro dias após a germinação das sementes, as plântulas receberam uma solução de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950) modificada a $\frac{1}{4}$ da força iônica total. Depois de três dias foi trocada a solução de Hoagland para $\frac{1}{2}$ da força iônica total, onde esta mesma solução foi repostada durante todo o experimento a cada três dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, utilizando um total de seis plantas por pote com seis repetições por tratamento. As análises estatísticas foram realizadas no programa Statgraphic plus v.5.5 e os gráficos foram feitos no programa Sigmaplot 10.0 ou Microsoft Excel 2010 quando conveniente.

6.4.2 Aplicações dos tratamentos de AH no experimento sem estresse hídrico

Para estudar o efeito da aplicação de AH em plantas de arroz, foram preparadas três concentrações de AH, além do controle (sem AH), equivalentes a 1,66; 3,33 e 6,66 mM (C). L^{-1} (20, 40, 80 mg C-AH. L^{-1}) de acordo com o volume total da solução nutritiva. Os AH foram dissolvidos na própria solução nutritiva, o pH ajustado a 5,8 e adicionados junto a esta, dois dias após a aclimação das plantas na solução nutritiva de $\frac{1}{2}$ da força iônica. Esta mesma solução foi repostada antes de cada momento de avaliação.

6.4.3 Aplicações dos tratamentos no experimento com estresse hídrico induzido com PEG-6000

Para as avaliações das plantas em estresse hídrico, foi realizado o mesmo desenho experimental descrito no item 2.1. O estresse hídrico nas plantas foi aplicado como descrito por Li et al. (2008). Após três dias das plantas estarem em contato com a solução nutritiva a $\frac{1}{2}$ da força iônica e vinte oito após germinação, um grupo de plantas receberam a solução nutritiva contendo PEG-6000 a 15% (aproximadamente -0.82 mPa de pressão osmótica). Vinte quatro horas após exposição a estresse, cada grupo de plantas recebeu três concentrações diferentes de AH (20 mg C-AH L^{-1} , 40 mg C-AH L^{-1} e 80 mg C-AH L^{-1}). Assim, as plantas foram tratadas com cinco tratamentos diferentes: (T1)-P-AH: sem aplicação de PEG-6000 nem AH (controle); (T2) +P-AH: PEG-6000 e sem AH; (T3) +P+AH20: PEG-6000 e 20 mg C-AH L^{-1} ; (T4)+P+AH40: PEG-6000 e 40 mg C-AH L^{-1} ; (T5)+P+AH80: PEG-6000 e 80 mg C-AH L^{-1} .

6.4.4 Determinação da atividade enzimática POX (EC 1.11.1.7) e SOD (EC 1.15.1.1)

No experimento de aplicação dos AH nas plantas de arroz sem estresse, a atividade das enzimas SOD e POX foram avaliadas as oito e 24 horas após aplicação

dos AH. No experimento de aplicação de AH as plantas com estresse hídrico, a atividade das POX foi avaliadas desde as quatro horas até às 24 horas em intervalos de quatro horas entre avaliações.

6.4.4.1 Atividade da enzima POX

A atividade POX foi determinada segundo a metodologia de Li, (2000). Folhas e raízes (1 g) foram maceradas em N₂(l) com PBS (0,05 M pH 5.8) e PVP (5% m:v). O homogenato foi filtrado através de camadas de gaze e então centrifugado a 10.000 xg durante 15 minutos a 4°C. A reação foi feita mediante a adição de 0,1 mL do extrato enzimático a uma mistura de 3,0 mL de PBS (0,05 M pH 5.5), 1,0 mL de Guaiacol (0,05 M), 1 mL de H₂O₂ (2% v:v). Foi medida a variação da absorbância a $\lambda=470$ nm durante quatro minutos a intervalos de vinte segundo e o valor calculado por minuto. Os resultados são expressos em $\Delta_{470} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (proteína).

6.4.4.2 Atividade da enzima SOD

O extrato enzimático para a determinação das atividades enzimáticas de SOD foi obtido a partir da maceração de 0,5 g de tecido radicular em N₂(l). Em seguida foi adicionado um meio de homogeneização composto por: Tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 6,8), EDTA (0,1 mM), fluoreto de fenilmetilsulfônico (1 mM) e polivinilpirrolidona (1% p:v). Posteriormente este extrato foi filtrado a través de gaze e centrifugado a 12.000 xg durante 15 minutos a 4 °C (Peixoto et al., 1999).

Para determinar a atividade da SOD, um volume de 30 μL do extrato enzimático radicular foi adicionado a um volume de 3 mL de uma mistura de reação composto por: tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,8), azul de p-nitro tetrazólio (NBT) (75 μM), metionina (13 mM), e riboflavina (2 μM). A reação foi conduzida em uma câmara fechada com iluminação de uma lâmpada de 15 W. Após 15 minutos de exposição a iluminação foi interrompida e lida a absorbância a $\lambda=560$ nm (fotorredução do NBT a formazana azul). Paralelamente, outra reação igual à anterior, mas sem ser sometida a iluminação foi tomada como branco. A quantidade de enzima necessária para inibir o 50% da fotorredução de NBT foi considerada como uma unidade de SOD (Becana et al., 1998, Del Longo et al., 1993, Giannopolitis e Reis, 1977, Beauchamp e Fridovich, 1971).

6.4.4.3 Quantificação de proteínas

A dosagem do conteúdo de proteínas em todos os experimentos e para fins de expressão dos resultados das atividades enzimáticas foi realizado como descrito por Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão.

6.4.5 Quantificação das ERO superóxido (O₂⁻) e Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

O conteúdo de H₂O₂ foi medido em folhas e raízes como descrito em (Junior, 2007). Os tecidos vegetais foram homogeneizados em N₂ (l) com 2.0 mL de buffer de fosfato (50 mM, pH 6.5) e Hidroxilamina (1 mM). O homogenato foi centrifugado a 10.000 xg durante 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado. Alíquotas 20 μL do sobrenadante foram adicionados a uma reação consistente em: 100 μM FeNH₄(SO₄), 25 mM ácido sulfúrico, 250 μM xylenol laranja e 100 mM sorbitol. As amostras foram incubadas no escuro e a absorbância lida a $\lambda=560$ nm. A concentração de H₂O₂ foi calculada segundo a curva padrão onde foi utilizado H₂O₂ como padrão (Kuo e Kao, 2003; Gay e Gebicki, 2000).

O conteúdo de O_2^- foi medido em folhas e raízes como descrito em Junior(2007). Raízes e folhas foram incubadas em tubos fechados e herméticos com uma reação composta de Na_2EDTA (100 μM), $NADH$ (20 μM) e tampão de Fosfato de Sódio (20 mM, pH 7,8). O início da reação foi feito pela adição de 100 μL de epinefrina (25,2 mM) em HCl (0,1 N). A reação foi incubada durante 5 minutos a 28 °C e em agitação durante 5 minutos. O tecido vegetal foi eliminado e após sete minutos foi lida a absorbância à $\lambda=480$ nm durante 5 minutos. A determinação de O_2^- foi avaliada pela determinação de adenocromo formado utilizando um branco nas mesmas condições sem os tecidos vegetais. O coeficiente de absorvidade molar utilizado foi $4,0 \times 10^3$ mol. L^{-1} (Mohammadi e Karr, 2001; Misra e Fridoovich, 1971; Boveris 1984).

6.4.6 Peroxidação lipídica nas raízes das plantas de arroz

O conteúdo de MDA foi obtido pelo método de Dhindsa et al. (1981). Uma massa de 0,5 g de tecido vegetal foi homogeneizada em 6 mL (10%) de ácido Tricloroacético e centrifugado a 10.000 g durante 15 minutos. 2 mL de ácido Tiobarbitúrico foi acrescentado ao sobrenadante e aquecida a 100 °C, 20 minutos e a seguir rapidamente esfriada e centrifugada a 10.000 g durante 10 minutos. A absorbância foi lida a 450, 532 e 600 nm e calculada segundo a fórmula: $MDA = 6.45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0.56 \times A_{450}$.

6.4.7 Quantificação simultânea de ABA e AIA mediante cromatografia líquida de alta resolução (high-performance liquid chromatography-HPLC)

Para a quantificação de ABA e AIA nos tecidos radiculares das plantas foi utilizada a metodologia proposta por Kelen et al., 2004, com algumas modificações. Resumidamente, uma massa de 2,5 g de tecido foram homogeneizadas “*over night*” a 4 °C com metanol (70% v:v) e a fase orgânica roto-evaporada a vácuo. A fase aquosa com pH ajustada a 8,5 foi submetida a extrações com Acetato de etilo e a fase orgânica roto-evaporada a vácuo. A fase aquosa foi novamente ajustada a pH 2,5 e submetida a extrações como Dietil éter e em seguida passado através de sulfato de sódio anidro. A fase dietil éter foi roto-evaporada e o resíduo seco que continha os hormônios foi redissolvido em metanol e conservados a 4 °C.

A quantificação foi feita em um aparelho de HPLC Shimadzu LC-20AT equipado com um detector de arranjo de díodos (PDA; SPD-M20A, Shimadzu, Japan) e sistema controlado por computador utilizando um programa LC-Solution Chem Station da Shimadzu. Utilizou-se uma coluna analítica Shim-pak octadesil-C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm de partícula, da Shimadzu) sendo a temperatura da coluna de 35 °C. Como fase móvel utilizou-se uma mistura de: aceto nitrila-água (30:70% ; v/v). Os cromatograma foram monitorados a 265 nm e 280 nm para ABA e AIA respectivamente, o volume de injeção utilizado foi de 20 μL . A identificação dos hormônios nas amostras foi feita mediante comparação dos espectros UV e os tempos de retenção com os padrões puros de ABA e AIA. A quantificação foi feita pela relação entre a área dos picos no cromatograma e a concentração da curva padrão.

6.4.8 Expressão gênica das aquaporinas do tonoplasto (*OsTIPs*) nas plantas de arroz

O RNA total foi extraído segundo a metodologia de Gao et al. (2001). O RNA foi tratado com DNAase I (*Life Technologies*) seguindo as instruções do fabricante. Amostra de 1 μg do RNA tratado foi usado para a síntese de cDNA usando "High Capacity RNA to cDNA Master Kit" (*Life Technologies*) seguindo as instruções do

fabricante. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata usando “SYBR[®] Green PCR Master Mix” kit (Applied Biosystems, Inc.) de acordo com as recomendações do fabricante. O gene da actina (NM_001057621.1) foi usado como controle endógeno (Jain et al., 2006). Os primers para *OsTIP1;1* (LOC_Os03g05290), *OsTIP1;2* (LOC_Os01g74450), *OsTIP2;1* (LOC_Os02g44080) e *OsTIP4;1* (LOC_Os05g14240), foram os mesmos usados por Li et al. (2008).

As condições da reação de PCR em tempo real foram: 10 min a 95 °C, 40 ciclos de amplificação a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto (anelamento, extensão e detecção da fluorescência) e finalmente uma curva de dissociação com aumento de temperatura de 0,3 °C a cada ciclo, iniciando em 60 °C até 95 °C, para verificar a especificidade da reação.

6.4.9 Visualização da interação entre os AH e o sistema radicular

O registro de imagens foi feito mediante visualização das raízes em um microscópio (Olympus HX-200) operando com uma câmera fotográfica acoplada.

6.4.9.1 Caracterização CP-MAS ¹³C RMN dos AH em interação com o sistema radicular das plantas

Para a obtenção e caracterização destes fragmentos de AH, foram feitos experimentos independentes nas mesmas condições experimentais aos realizados para as determinações bioquímicas em plantas. As raízes das plantas na sua forma íntegra em cada tratamento e no final do experimento foram retiradas da solução nutritivas e colocadas em estufa até secagem. Posteriormente, estas raízes foram submersas em uma solução aquosa de NaOH (10^{-3} mol.L⁻¹) até coloração da solução. Este procedimento foi feito para cada raiz de cada planta dos diferentes tratamentos, sendo que foram recuperados os AH de cada tratamento em uma mesma solução. Posteriormente os AH recuperados foram novamente precipitados de acordo com a metodologia da IHSS. A espectroscopia CP MAS¹³C- RMN foi realizada em um aparelho Bruker spectrometer UltraShield RMN a 500 MHz, sequência de pulso cp.av, temperatura de 30 °C e frequência de obtenção de 100.61 MHz. A relação entre o índice de hidrofobicidade e índice de hidrofiliidade (**HB/HI**) foi calculado como segue: $HB/HI = (0 \text{ ppm}-46 \text{ ppm}) + (110 \text{ ppm}-156 \text{ ppm}) / (46 \text{ ppm}-110 \text{ ppm}) + (156 \text{ ppm}-186 \text{ ppm})$.

6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.5.1 Atividade das enzimas POX, SOD e metabólitos do sistema de defesa antioxidativo em folhas e raízes

A Figura 36 mostra a atividade das enzimas POX e SOD do sistema de defesa antioxidativo. A atividade POX foi estimulada após 8 horas da adição das três concentrações de AH e em ambos os órgãos quando comparadas com o tratamento sAH. Às 24 horas, a atividade POX mostrou que somente para as folhas o tratamento AH80 apresentou estímulo da atividade.

A atividade SOD não foi estimulada pelos AH nas folhas às 8 horas, entretanto, nas raízes, a atividade foi superior nas três concentrações de AH quando comparadas a plantas AH. Às 24 horas, tanto em folhas quanto em raízes, a atividade SOD foi superior nos tratamentos com AH quando comparados aos AH.

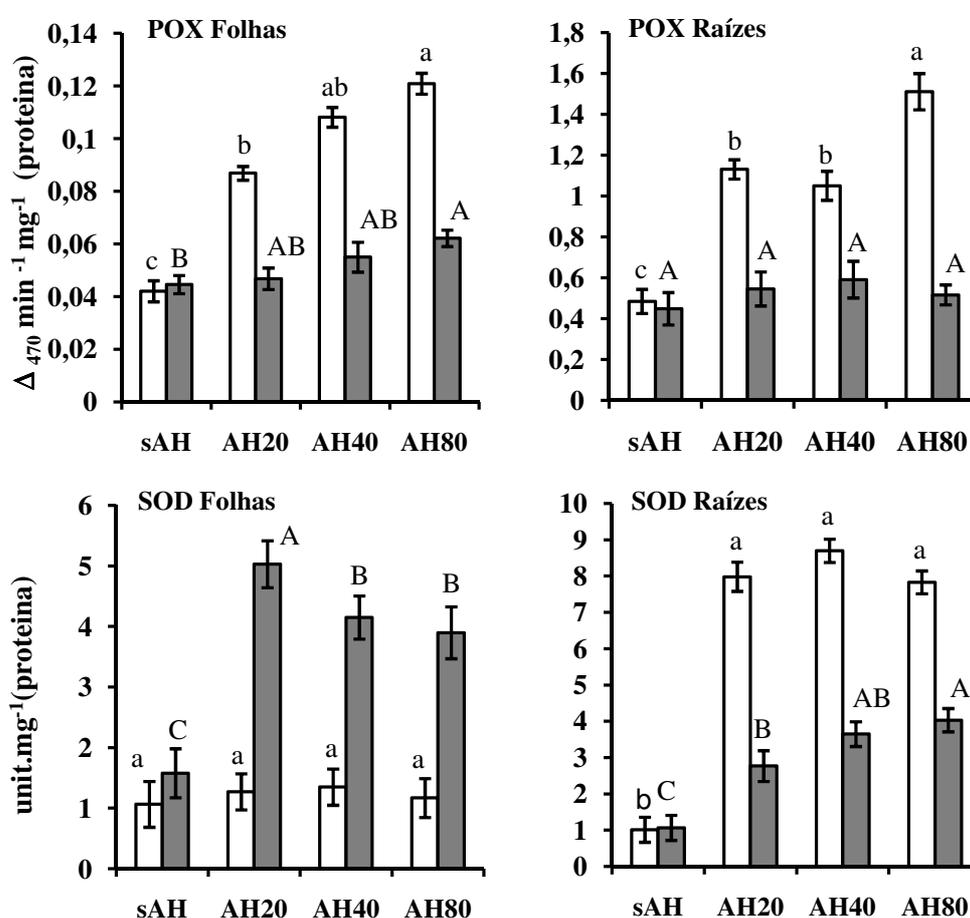


Figura 36. Atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidativo: POX e SOD, em folhas e raízes as 8 h (barras em branco) e 24 h (barras em cinza) após a última aplicação. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre as médias. Letras minúsculas para a avaliações 8h e maiúsculas as 24 h. (Teste de Tukey, $p < 0,05$). Barras representam o valor médio \pm ES (error padrão) para tres repetições.

O conteúdo de $O_2^{\cdot-}$ foi estimulado pelos AH tanto nas folhas quanto nas raízes (Figura 37). Nas folhas, às 8 horas, o tratamento AH40 apresentou o menor valor de $O_2^{\cdot-}$, enquanto às 24 horas houve uma diminuição do conteúdo de $O_2^{\cdot-}$ dependente do

aumento da concentração dos AH. Nas raízes, tanto às 8 horas quanto às 24 horas houve um aumento na produção de O_2^- nos três tratamentos com AH quando comparados ao sAH.

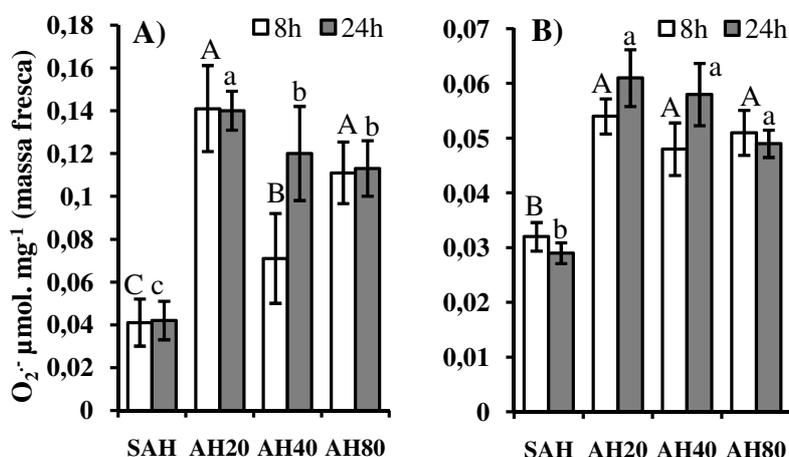


Figura 37. Conteúdo de O_2^- em folhas (A) e raízes (B) às 8 h e 24 h após a última aplicação. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre as médias. (Teste de Tukey, $p < 0.05$). Barras representam o valor médio \pm ES (error padrão) para três repetições.

A Tabela 10 mostra os conteúdos de H_2O_2 e MDA às 8 horas e 24 horas em folhas e raízes. Às 8 horas, o tratamento AH40 e AH20 apresentaram os maiores conteúdos de H_2O_2 em folhas e raízes respectivamente e diferentes estatisticamente do tratamentos AH. No entanto, às 24 horas, somente o tratamento AH40 apresentou os maiores conteúdos de H_2O_2 em folhas, enquanto que, nas raízes os três tratamentos apresentaram valores superiores ao tratamento AH. O conteúdo de MDA às 8 horas mostrou os menores valores nos tratamentos AH80 e AH40 nas folhas e raízes, respectivamente. Às 24 horas, somente o tratamento AH20 superou os AH em ambos os órgãos.

Tabela 10. Conteúdo de H_2O_2 e MDA em folhas e raízes às 8h e 24h após a última aplicação. Letras diferentes nas linhas significam diferenças estatísticas entre as médias. (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Tempo/Orgão		H_2O_2 ($\mu\text{mol.mg}^{-1}$ massa fresca)			
		sAH	AH20	AH40	AH80
8 horas	Folhas	0,0141 ^c	0,0184 ^b	0,0228 ^a	0,0144 ^c
	Raízes	0,0182 ^c	0,0395 ^a	0,0215 ^b	0,0184 ^c
24 horas	Folhas	0,0187 ^b	0,0189 ^b	0,0341 ^a	0,0185 ^b
	Raízes	0,0188 ^d	0,0739 ^a	0,0312 ^b	0,0275 ^c
Tempo/Orgão		MDA ($\mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca)			
		sAH	AH20	AH40	AH80
8 horas	Folhas	0,1523 ^c	0,3848 ^a	0,1593 ^c	0,1743 ^b
	Raízes	0,5564 ^b	1,3673 ^a	0,5615 ^b	0,5633 ^b
24 horas	Folhas	0,1678 ^c	0,3513 ^a	0,1776 ^b	0,1729 ^b
	Raízes	0,1992 ^b	0,2014 ^a	0,1998 ^b	0,1993 ^b

O cenário metabólico nas folhas às 8 horas foi de baixa atividade da enzima SOD, elevado conteúdo de O_2^- , elevada atividade das POX e baixo conteúdo de H_2O_2 e MDA (este último exceto para AH20). Neste órgão, às 24 horas a atividade SOD foi

elevada assim como o conteúdo de O_2^- , a atividade das POX foi moderada e o conteúdo de H_2O_2 foi baixo exceto para o tratamento AH40. O cenário metabólico nas raízes indica o funcionamento das SOD às 8 horas de aplicação dos AH, neste momento o conteúdo de O_2^- ainda foi elevado, assim mesmo, as POX neste momento estavam estimuladas enquanto o conteúdo de H_2O_2 foi também elevado exceto para AH80 embora não existam valores de MDA elevado, exceto para AH20. Às 24 horas, as SOD ainda estão estimuladas enquanto o conteúdo de O_2^- continua elevado, no entanto, as POX neste momento se encontram estimuladas e o conteúdo de H_2O_2 é elevado, porém sem existência de conteúdos elevados de MDA.

Este comportamento do sistema antioxidativo das plantas de arroz em uma fase mais jovem, já foi observado e discutido no capítulo 2 também pela aplicação desta mesmas concentrações de AH, indicando que estes tipo de ação dos AH também acontece em plantas mais adultas. Um aumento na produção de O_2^- é o primeiro passo para o desencadeamento do sistema de defesa antioxidativo nas células (Gill e Tuteja, 2010). Foram observadas particularidades na relação funcional entre o conteúdo de O_2^- e a atividade SOD, enzimas responsável pela conversão destas ERO até H_2O_2 (Asada, 1999; Mittler et al., 2004; Gill e Tuteja, 2010).

É possível então que nas plantas tratadas com AH, além de se propiciar uma condição fisiológica semelhante a estresse, elas respondem através de um mecanismo de adaptação, utilizando as ERO produzidas como moléculas sinalizadoras no próprio processo de crescimento e desenvolvimento celular (Pitzschke et al., 2006; Bhattacharjee, 2005). Já têm sido discutidos os processos que podem estar se relacionando nas plantas pela ação do AH no sistema antioxidativo. No entanto, é conhecido que as ERO constituem moléculas chaves para a transdução de sinais em nível celular de várias formas, uma é a percepção por meio de receptores de membrana ainda desconhecidos, mas que estão envolvidos nos mecanismos de transdução do Ca^{2+} e Cadmodulina (Mittler et al., 2004; Ślesak et al., 2007).

Embora os estudos sobre os efeitos das SH no metabolismo antioxidativo em plantas não sejam abundantes, estudos feitos utilizando técnicas de expressão gênica em larga escala tem mostrado que esta via de ação é utilizada nas plantas quando aplicados AH. Trevisan et al. (2011), aplicaram a técnica de cDNA-AFLP em plantas de *Arabidopsis* sob tratamentos com SH. Estes autores mostraram que como resultado da aplicação de HS nas plantas, do total de transcritos induzidos, 34 % pertence a processos metabólicos e 9 % a processos de estímulos a estresse.

6.5.2 Expressão gênica das aquaporinas do tonoplasto (*OsTIPs*) nas plantas de arroz pela ação dos AH

A Figura 38 mostra a expressão dos genes de aquaporinas *OsTIPs* nas folhas e raízes. Nas folhas, os genes *OsTIP1;1* mostraram uma supressão da expressão para os três tratamentos quando comparadas com o controle. De forma semelhante se mostrou a expressão dos genes *OsTIP1;2* nos três tratamentos com AH. A expressão dos genes *OsTIP4;1* mostrou uma supressão da expressão comparada ao controle para os tratamentos AH40 e AH80. O tratamento AH20 mostrou uma expressão gênica semelhante e sem diferenças estatísticas quando comparada com o controle.

Nas raízes, os genes *OsTIP1;1* mostraram uma supressão na expressão dos tratamentos AH40 e AH80 quando comparado ao controle, no entanto o tratamento AH20 mostrou expressão gênica equivalente ao controle. Os genes *OsTIP1;2* mostraram uma supressão da expressão gênica para o tratamento AH40, entanto que para AH20, a expressão foi semelhante ao controle. Além disso, o tratamento AH80, provocou uma expressão gênica superior ao controle. Os genes *OsTIP 4;1* mostraram

supressão na expressão, entanto que o tratamento AH80 não mostrou diferenças quando comparado ao controle.

O papel das aquoporinas é importante nas vias de ação e os efeitos metabólicos que têm sido obtidos neste capítulo, especialmente as aquaporinas do tonoplasto (*TIPs*) localizadas nas membranas vacuolares e prevacuolares. As *TIPs* funcionam como canais de H₂O₂, água e outros metabólitos no interior das células (Maurel et al., 2008). Alguns estudos mostraram que existe um aumento na expressão dos *OsTIPs* em plantas de arroz pela influencia de estresses abióticos (Liu et al., 1994). Trabalhos recentes mostram que os genes *OsTIP 1;1*, *OsTIP 1;2* e *OsTIP 4;1* são superexpressos em órgãos folhares e radiculares em plantas de arroz sob condições de estresse por PEG-6000 (15%) (Li et al., 2008).

Neste experimento, a resposta da expressão gênica nas raízes foi uma supressão dos genes *OsTIPs* dependente do aumento da concentração dos AH aplicados. Nas folhas, o efeito foi variado, a supressão dos *OsTIPs* é maior no tratamento AH40. Somente para AH80 foi encontrada uma superexpressão do *OsTIP 2;1*. Estes resultados são contrários aos relatados para os *OsTIPs* em resposta a estresses clássicos, sugerindo que os AH não exercem ação de estresse nas plantas, embora exerça efeitos sobre a produção de ERO, indicativo da utilização dos mecanismos antioxidativo em suas vias de ação.

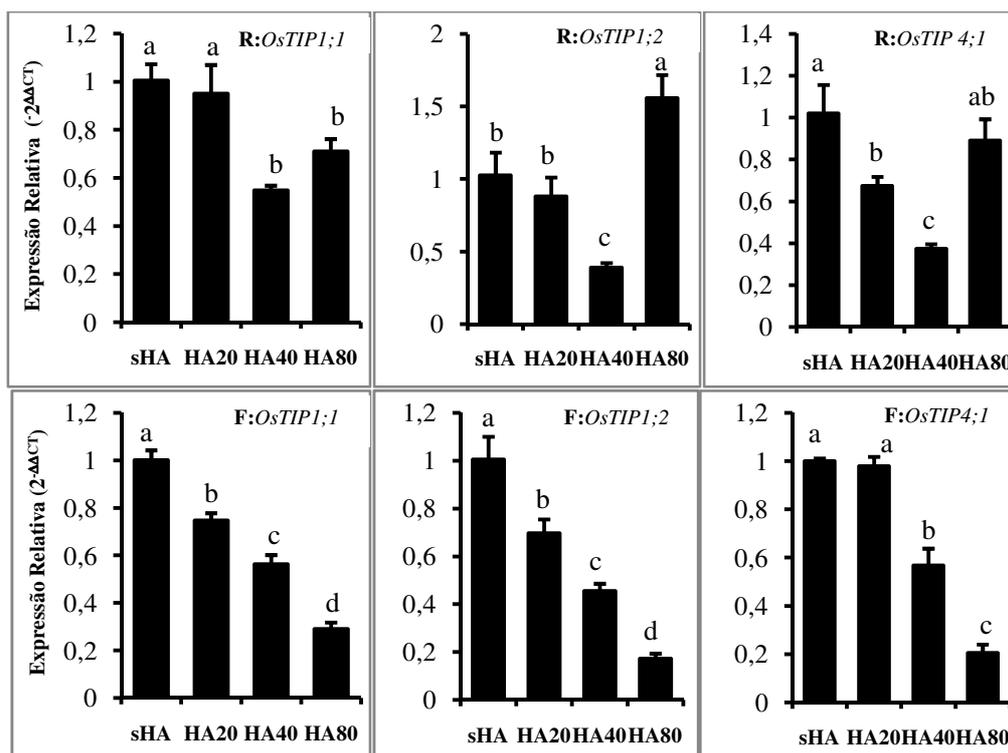


Figura 38. Expressão relativa dos genes de aquoporinas *OsTIPs* as 8 h depois da última aplicação. **R:*OsTIPs***: Expressão relativa em raízes; **F:*OsTIPs***: expressão relativa em folhas. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre as medias. (Teste de Tukey, $p < 0,05$). Barras representam o valor medio \pm ES (error padrão) para tres repetições.

As funções das aquaporinas nas células, sua abundância e atividade são especificamente reguladas segundo as condições no interior das células (Suga et al., 2001; Hachez et al., 2006). Alguns trabalhos relatam que a abundância de aquaporinas

é regulada por fatores ambientais e do próprio desenvolvimento da planta (Maurel et al., 2002; Hachez et al., 2006; Kaldenhoff e Fischer, 2006). Outros trabalhos mostram que a expressão gênica de aquoporinas esta relacionada com eventos citológicos no interior da célula (Uehlein et al., 2007), ao mesmo tempo que, genes da família TIPs foram identificados como canais de H_2O_2 (Bienert et al., 2007).

Os resultados deste experimento mostram que a ação dos AH nas plantas de arroz acontece em nível celular e relaciona o sistema de defesa antioxidativo com o mecanismo de regulação da expressão gênica das aquoporinas do tonoplasto.

6.5.3 Interação dos AH com sistema radicular das plantas. Caracterização CP-MAS ^{13}C RMN

Uma ação dos AH nas plantas de arroz através dos mecanismos antioxidativos supõe que exista uma percepção desse sistema de defesa nas plantas pela interação entre a raiz e os AH. Neste experimento foi encontrada mediante observação visual ao microscópio, uma abundante interação entre o sistema radicular e os AH. Em alguns casos é possível observar um recobrimento quase total em raízes e/ou pelos radiculares jovens, noutros casos, é possível observar uma penetração dos AH até o interior da epiderme radicular (Figura 39).



Figura 39. Imagens dos AH em interação com as raízes das plantas de arroz. Imagens tomadas a 40X. As setas indicam pontos alguns pontos de intensa aglomeração.

Esta interação pode provocar nas raízes das plantas modificações no seu funcionamento e ser percebido através do sistema defesa antioxidativo. A Figura 40 mostra a caracterização mediante CP-MAS ^{13}C RMN dos AH que ficaram aglomerados nas raízes das plantas. Os AH em interação com as raízes mostraram ter, no caso das três concentrações, diferenças estruturais marcantes quando comparados com os AH exógenos. Na interação dos AH com as raízes houve um enriquecimento das estruturas presentes entre 0-110 ppm, pertencente a $C_{Alq-H,R}$, $C_{Alq-O,N}$, C_{Alq-O} , $C_{Alq-di-O}$, assim como também houve uma preservação das estruturas entre 156-186 ppm pertencente a $C_{COO-H,R}$. No entanto as estruturas nas regiões entre 110-156 ppm que pertencem a $C_{Ar-H,R}$, C_{Ar-O} não foram registradas nos espectros (Figura 40).

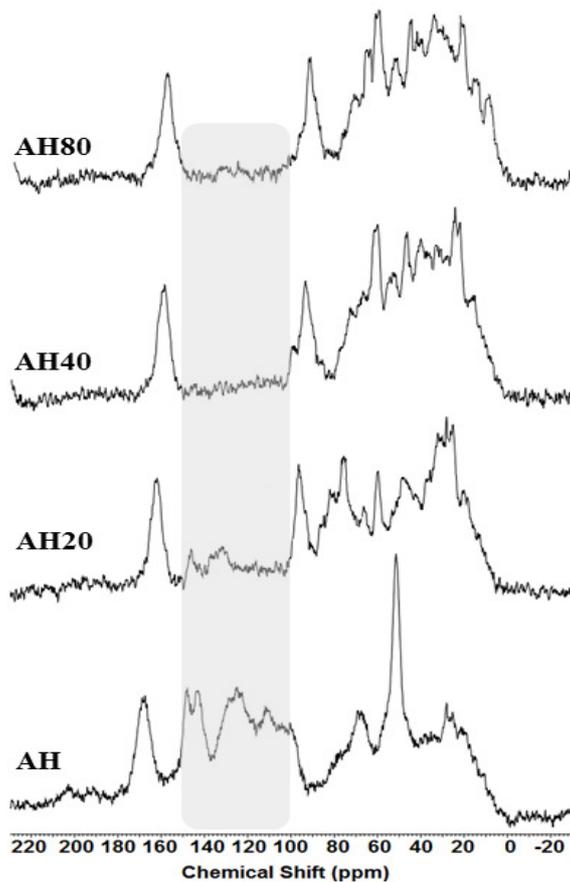


Figura 40. Caracterização CP-MAS ^{13}C RMN dos AH adicionados e os AH em interação com o sistema radicular. Região com sombreado cinza sinaliza a região característica de estruturas aromáticas.

As evidências estruturais constituem provas que reafirmam o observado na microscopia sobre a interação entre os AH e o sistema radicular das plantas. Os AH em interação com as raízes apresentam estruturas menos condensadas e menos complexas, onde predominam características alifáticas e alifáticas substituídas oxigenadas. A interação dos AH com as raízes pode ser através de ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas, propiciadas pelas características químicas das paredes celulares. Neste sentido, a hipótese sobre um estresse coloidal, enunciada por Asli e Neumann (2010), poderia se justificar com estes resultados. O estresse coloidal proposto por estes autores poderia ser uma das explicações das respostas antioxidativas nas plantas quando aplicados os AH.

6.5.4 Efeito da ação dos AH em plantas de arroz em condições de estresse hídrico induzido com PEG

6.5.4.1 Atividade das POX, conteúdos de H_2O_2 e peroxidação de lipídeos (MDA)

A Figura 41 mostra a atividade das enzimas POX, conteúdo de H_2O_2 e MDA nos tecidos das plantas. A atividade das enzimas POX mostrou um comportamento semelhante nos órgãos foliares e radiculares. Em ambos os órgãos, a partir das duas horas de indução do estresse e adição dos AH, a atividade POX nos tratamentos foi superior ao tratamento controle, indicando a presença de estresse oxidativo nas plantas. A atividade POX foi inferior nos três tratamentos com AH a partir das 8 horas e até as 24 horas, comparados com o tratamento +P-AH. Às oito horas, foi observada

maior atividade POX em todos os tratamentos e posterior manutenção ou queda da atividade constante ou diminuição até às 24 horas. A aplicação de AH a plantas com estresse hídrico induzido provocou uma atenuação da atividade POX em ambos os órgãos vegetais.

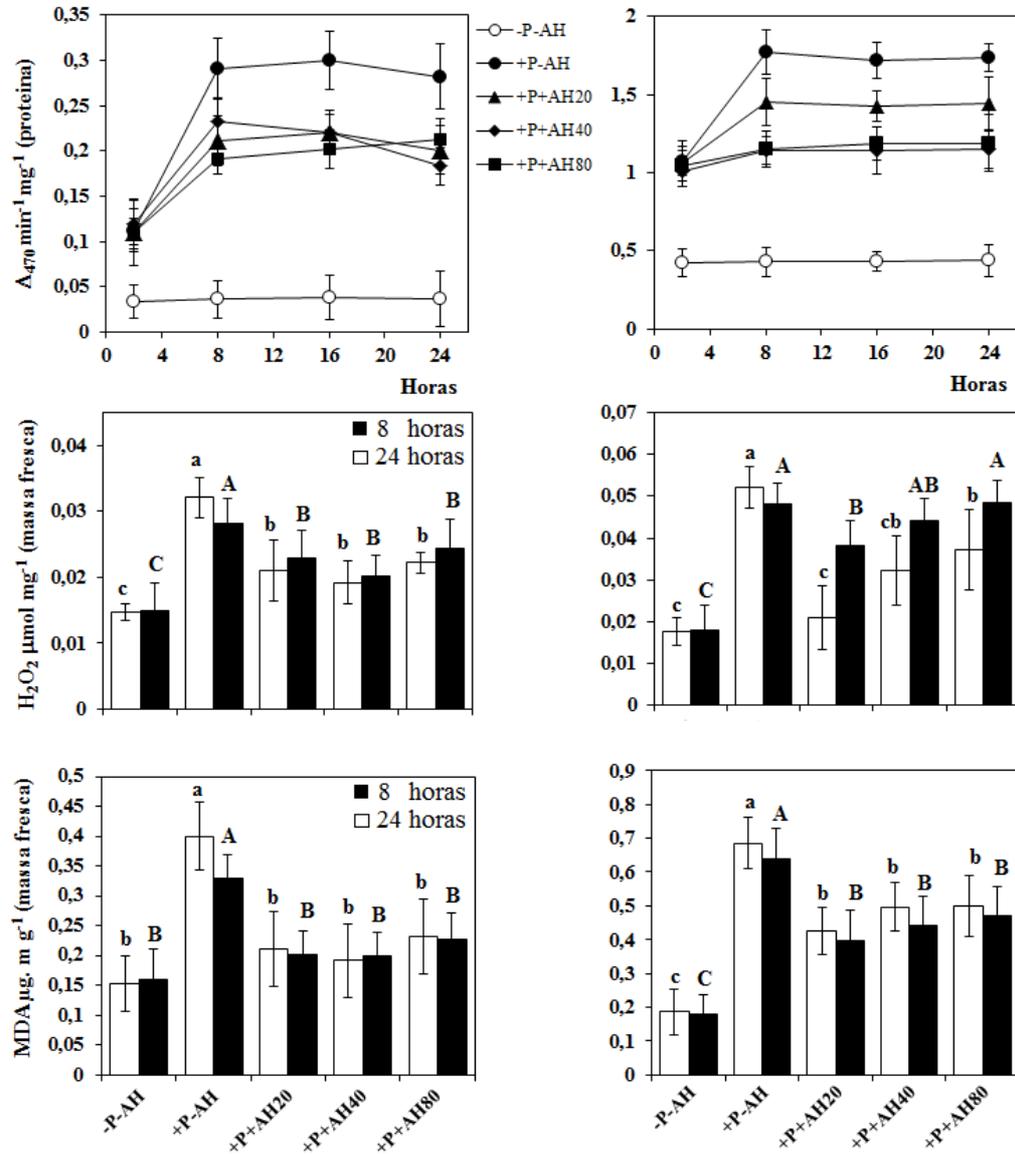


Figura 41. Atividade das POX, conteúdo de H_2O_2 e peroxidação de lipídeos medidos pelo conteúdo de MDA. (A), (C) e (E): análises em folhas. (B), (D) e (F): análises em raízes. Letras maiúsculas para as oito horas e minúsculas para as 24 horas. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre as medias dos tratamentos segundo o teste de Tukey, $p < 0,05$. A barra de erro representa o valor da media \pm erro padrão (s.e.m) para três repetições.

O conteúdo de H_2O_2 às 8 e 24 horas foram maiores em ambos os órgãos de plantas tratadas quando comparados ao tratamento controle, indicando o funcionamento dos mecanismos oxidativos pela indução do estresse com PEG-6000. O conteúdo de H_2O_2 em folhas e raízes nos tratamentos +P-AH foi maior às 8 horas que às 24 horas, o que pode ser resultado da eliminação deste H_2O_2 pela constante atividade POX nesses momentos. Nos três tratamentos +P-AH e nas folhas, houve

uma diminuição do conteúdo de H₂O₂ comparado a +P-AH às 8 e 24 horas. Nas raízes houve também diminuição do conteúdo de H₂O₂ às oito horas comparado com +P-AH, no entanto, às 24 horas o conteúdo de H₂O₂ diminuiu só no tratamento +P+AH20.

A peroxidação de lipídeos em folhas e raízes das plantas estressadas foi superior ao restante dos tratamentos tanto às 8 quanto às 24 horas, sendo que, às 8 horas esta peroxidação teve o maior valor. Os tratamentos com +P+AH apresentaram os menores valores de peroxidação de lipídeos comparados com +P-AH. Nas folhas, a peroxidação de lipídeos não teve diferenças estatísticas com o tratamento controle.

Os resultados indicam que embora a atividade das POX nos tratamentos +P+AH seja menor que a encontrada para +P-AH, os conteúdos de H₂O₂ nas plantas com indução de estresse com PEG e tratadas com AH foram menores em folhas e raízes as oito e 24 horas (exceto para +P+AH40 e +P+AH80 às 24 horas). Encontraram-se menores níveis de peroxidação de lipídeos nos tecidos das plantas em estresse e tratadas com AH. Estas são evidências que indicam uma atenuação da intensidade do estresse produzido nas plantas por PEG mediante a adição de AH.

Alguns trabalhos relatam os efeitos dos AH nos mecanismos antioxidativos em plantas de milho, indicando um aumento na atividade de CAT e geração de ROS (Cordeiro et al., 2011). Tem-se, entretanto, mostrada a capacidade protetora de AH de vermicompostos em plantas de arroz sob estresse hídrico, resultando em diminuições dos conteúdos de H₂O₂, peroxidação lipídica, proteção da permeabilidade da membrana e do crescimento quando comparado com plantas estressadas (Hernández et al., 2012).

6.5.5 Conteúdo de ABA nos tecidos vegetais

Os conteúdos de ABA nos tecidos foliares e radiculares de plantas de arroz tratadas ou não com PEG e AH são mostrados na Figura 42. Às oito horas (momento de maior atividade POX), há um claro incremento nos teores de ABA nas raízes e folhas de plantas de arroz submetidas ao estresse hídrico na ausência de AH (+PEG-AH). Por outro lado, quando o estresse hídrico está associado ao tratamento com AH, observam-se níveis de ABA semelhantes ao tratamento controle sem estresse hídrico e sem AH (-P-AH).

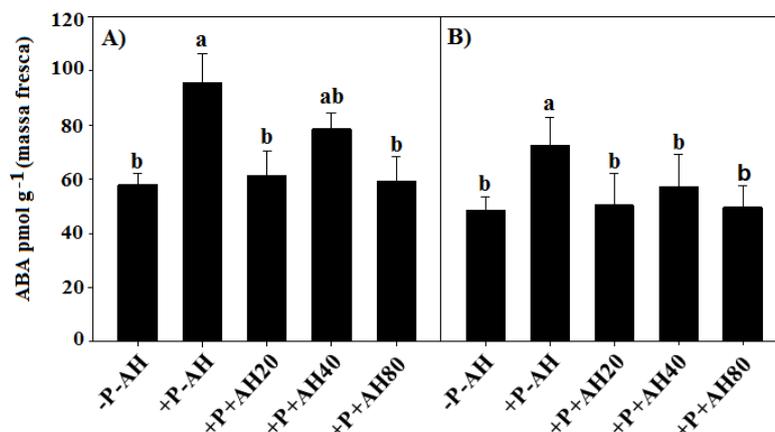


Figura 42. Conteúdos de ABA em raízes e fohas. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre as medias dos tratamentos segundo o teste de Tukey, $p < 0.05$. A barra de erro representa o valor da media \pm erro padrão para três repetições.

Esses resultados mostram que a adição de AH à solução nutritiva de plantas de arroz submetidas ao estresse hídrico, reduz os níveis internos de ABA ou simplesmente não permite uma elevação dos níveis endógenos ABA. Dessa forma, pode-se inferir que a adição de AH tenha resultado no alívio do estresse por vias independentes de ABA, já que a adição de AH não resultou em incremento dos níveis de ABA na planta. Há, entretanto, relatos de que aplicações radiculares de AH em baixas (5 mg C L⁻¹) e altas (100 mg C L⁻¹) concentrações, estimularam a biosíntese de ABA em plantas de pepino após 4 horas e 72 horas respectivamente (Mora et al., 2010). Contudo, ainda são escassos os trabalhos que estudam a aplicação de AH em plantas sob condições de estresse hídrico e seus efeitos na biossíntese de ABA. Neste trabalho, observamos que em arroz, o alívio do estresse hídrico ocasionado pela adição de AH aparentemente se dá por uma via independente de ABA.

6.5.6 Expressão gênica de aquaporinas do tonoplasto em plantas de arroz (*OsTIPs*)

A expressão dos genes *OsTIPs* nos tecidos radiculares e foliares das plantas de arroz tratados ou não com PEG e AH é mostradas nas Figuras 43B e 43C. Em ambos os tecidos, a expressão dos genes avaliados nos tratamentos +P+AH20 e +P+AH40, foi estatisticamente semelhante ao tratamento -P-AH. O tratamento +P+AH80 causou uma repressão na expressão gênica de todos os genes *OsTIPs* analisados tanto nos tecidos radiculares quanto foliares. Tem sido mostrado que elevadas concentrações de AH reprime o crescimento radicular e a atividade das H⁺-ATPases de forma semelhante ao que ocorre com a auxina. As H⁺-ATPases e as aquaporinas são importantes para o acúmulo de solutos e água no vacúolo necessários para o crescimento celular (Rayle e Cleland, 1992). Dessa forma, a repressão dos genes *OsTIPs* no tratamento +P+AH80 pode ter ocorrido devido a elevada dose de AH (80 mg C L⁻¹) aplicada.

Alguns estudos já mostram importantes papéis das TIPs no metabolismo das plantas. Em *Arabidopsis*, as *AtTIP1;1*, *AtTIP1;2*, *AtTIP2;1* e *AtTIP4;1* foram identificadas como facilitadoras do transporte de uréia até o citosol (Liu et al., 2003). Também em *Arabidopsis*, o silenciamento de *AtTIP1;1* provocou a morte celular e da planta (Ma et al., 2004). A atividade das TIPs é regulada por vários fatores ambientais como o estresse hídrico por vias transcricional e post-transcricional (Kaldenhoff e Fischer 2006), assim como é conhecido que o ABA pode regular a função das aquaporinas mediante duas vias, ABA-dependente e ABA-independente (Mahajan e Tuteja, 2005).

Em plantas de arroz, as *OsTIP1s* foram induzidas pela ação do ABA e PEG em folhas e raízes, e os padrões de expressão dos genes *OsTIP2;2* e *OsTIP4;2* em resposta a ABA e PEG foram semelhantes (Li et al., 2008). No presente estudo, apenas o gene *OsTIP1;2* apresentou pequeno aumento de expressão no tratamento onde houve elevação dos teores internos de ABA nas plantas (+P-AH), indicando um possível efeito do ABA sobre a regulação da expressão desse gene (Figura 2B e C). Com a adição de AH nas doses de 20 e 40 mg C L⁻¹, o conteúdo de ABA e a expressão da *OsTIP1;2* voltam a níveis semelhantes ao tratamento controle, indicando que o alívio do estresse provocado pelo AH pode se dá por uma via independente de ABA.

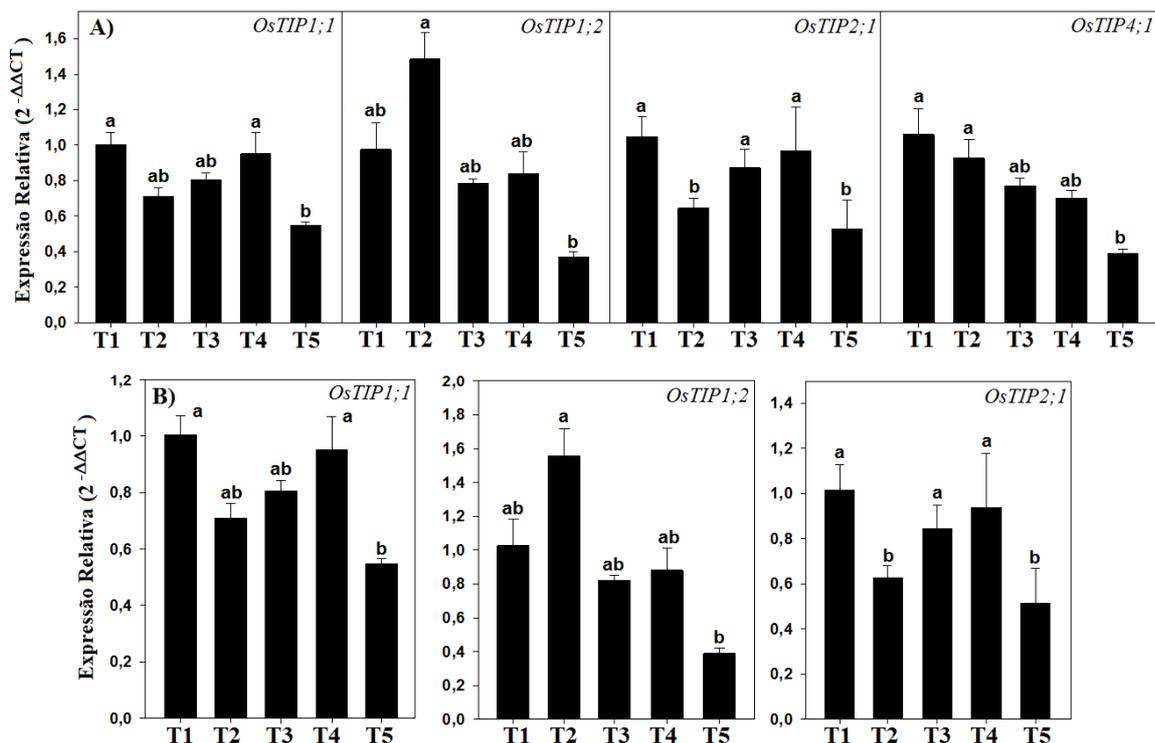


Figura 43. Expressão gênica dos *OsTIPs* em plantas de arroz. (A): Expressão gênica dos *OsTIPs* nas Raízes, (B): Expressão gênica dos *OsTIPs* nas Folhas. T1:-P-AH, T2:+P-AH, T3:+P+AH20, T4:+P+AH40, T5:+P+AH80

6.5.7 Caracterização CP-MAS ^{13}C RMN das interações dos AH com o sistema radicular das plantas

Como já discutido, existem relatos que mostram a capacidade dos AH para formar capas de aglomerados na superfície radicular nas plantas, produzindo uma diminuição da condutividade elétrica das raízes e a resistência a estresses hídricos (Asli e Neumann, 2010). Neste trabalho, nós confirmamos a interação dos AH com as raízes e se observou a aglomeração dos AH ao longo do sistema radicular (Figura 44B-a), observou-se também esta aglomeração na epiderme do sistema radicular e pelos radiculares mais jovens (Figura 44B-b).

A caracterização espectroscópica dos AH aglomerados nos sistemas radiculares das plantas mostrou assinaturas espectrais diferentes às encontradas nos AH adicionados (Figura 44A). Os AH aglomerados nas raízes mostram uma menor complexidade estrutural quando comparados com os adicionados. É possível observar nos espectros uma diminuição na presença de picos principalmente na região assinalada a carbonos aromáticos e aromáticos oxigenados (110-156 ppm).

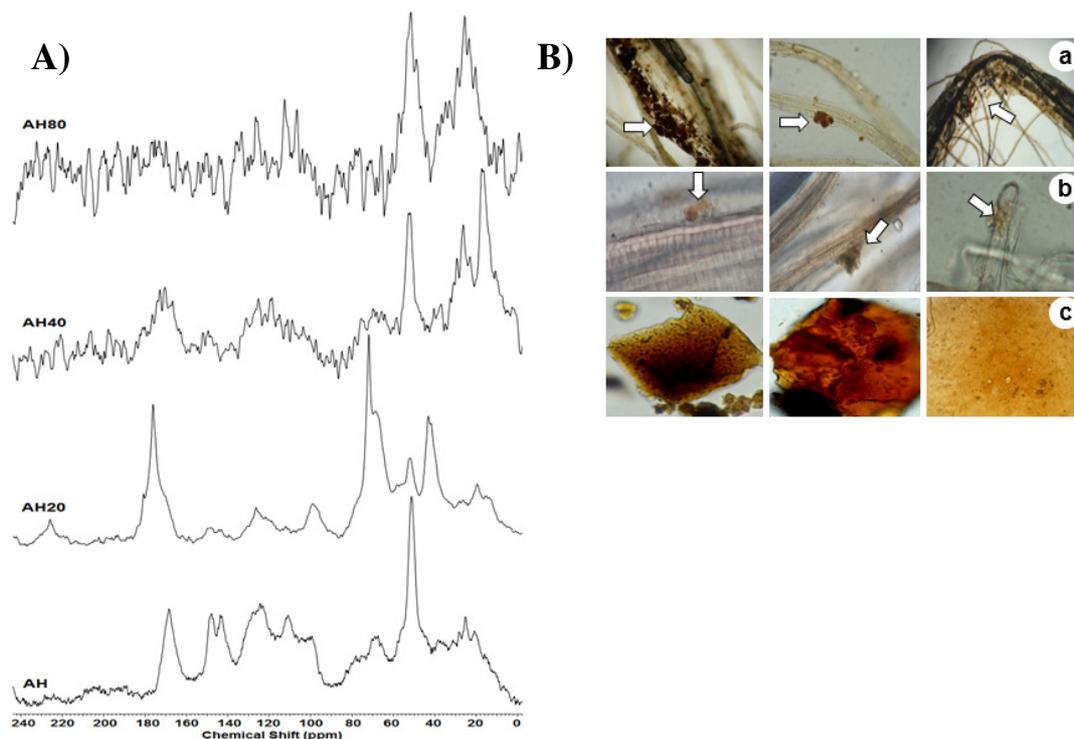


Figura 44. (A) Espectros CP-MAS ¹³C RMN dos AH adicionados e os precipitados nas raízes das plantas. (B) Imagens fotográficas das raízes das plantas com AH aglomerados, **a**: AH grudados ao longo da superfície do sistema radicular (40X) **b**: AH aglomerados na epiderme das raízes e pelos radiculares jovens (100X), **c**: imagens obtidas por microscopia óptica dos AH adicionados (100X). As setas indicam pontos de aglomeração dos AH nas raízes.

Os AH que interagem diretamente com as raízes apresentam predominância de estruturas alquílicas (0-46 ppm), carboxílicas (156-186 ppm) e carbonílicas (186-230 ppm). Os AH aglomerados apresentam diminuição de estruturas di-O-Alquílicas (91-110 ppm), arílicas (110-142 ppm) e O-arílicas (142-156 ppm) quando comparados aos adicionados. Recentes estudos têm mostrado que em AH de vermicomposto, as estruturas que participam positivamente no crescimento radicular em plantas de milho são as metoxilas, as arílicas, O-arílicas e carboxílicas, indicando a capacidade dos AH para exercer efeitos como promotores do crescimento radicular, encontram-se relacionados com bio-fragmentos moleculares polares conservadas pelos agregados hidrofóbicos nas associações supramoleculares húmicas (Aguiar et al., 2012; Canellas et al., 2012).

Pela liberação de ácidos orgânicos pelas raízes das plantas, a supra-estrutura dos AH é rompida (Aguiar et al., 2012; Canellas et al., 2012) e fragmentos polares precipitam na superfície das raízes pela diminuição do pH através de interações eletrostáticas ou de Van der Waal (Asli e Neumann 2010), causando a liberação de fragmentos hidrofóbicos. Estes fenômenos de interações AH-raízes contribuem para uma modificação na funcionalidade das raízes e são perceptíveis pelos mecanismos de respostas antiestresse. Estes processos de adaptação por meio destas interações e recuperação de novos estados de homeostase contribuem para os efeitos positivos, negativos e imperceptíveis das substâncias húmicas nas plantas.

6.6 CONCLUSÕES

Os AH isolados do VC de esterco bovino, estimularam os sistema de defesa antioxidativo e mostraram efeitos protetores em plantas submetidas a estresse hídrico também em plantas adultas.

Existem interações entre os AH e o sistema radicular das plantas e as frações de AH que interagem com as raízes são menos complexas estruturalmente que os AH adicionados.

Os AH exercem efeitos na atividade das enzimas POX e SOD do sistema de defesa antioxidativo, controlando os conteúdos de ERO e os efeitos na peroxidação de lipídeos. Nos modos de ação dos AH, se encontram também envolvidas as aquoporinas do tonoplasto.

Nas plantas de arroz em estresse hídrico, a aplicação radicular de diferentes concentrações de AH mostrou efeitos de proteção antiestresse. Isto foi comprovado através da baixa atividade das POX, baixos níveis de H_2O_2 e MDA quando comparados às plantas estressadas e sem AH.

A espectroscopia demonstrou que nos AH aglomerados nas raízes predominam estruturas alquílicas (0-46 ppm), carboxílicas (156-186 ppm) e carbonílicas (186-230 ppm) e apresentam diminuição de estruturas di-O-Alquílicas (91-110 ppm), arílicas (110-142 ppm) e O-arílicas (142-156ppm) quando comparados aos adicionados.

Os resultados mostram que os AH produzem um efeito protetor em plantas com condições fisiológicas de estresse hídrico. Estes efeitos parecem ser iniciados através de fenômenos de interações químicas e físicas entre os AH e o sistema radicular das plantas.

7. CONCLUSÕES GERAIS

- a) A partir do VC de esterco bovino produzido nas condições de Cuba foi possível caracterizar estruturalmente as duas frações humificadas isoladas: os ácidos húmicos (AH) e o sólido residual (RH) do processo de extração das substâncias húmicas solúveis. Os AH apresentaram características aromáticas mais marcantes que RH e ambas as frações apresentam fragmentos estruturais ricos em elementos oxigenados. Pela primeira vez é feita esse tipo de caracterização da fração RH que apresentou um 10,52 % de aromaticidade, 89,47 % de alifaticidade e 0,72 como índice de hidrofobicidade.
- b) Os AH isolados do VC, aplicados via radicular em plantas de arroz, regularam alguns componentes do metabolismo oxidativo. Essa fração aumentou a produção de ERO em nível radicular e o seu controle acontece a por meio do estímulo da atividade das enzimas SOD e POX e da biossíntese de ABA. Quando aplicados em plantas em condições de estresse hídrico, os AH exercem efeitos protetores diminuindo a produção de ERO e a peroxidação lipídica. Os efeitos de estimulação do crescimento e emissão de raízes dos AH parecem ser exercidos também através dos mecanismos de resposta antioxidativa.
- c) Em plantas adultas foi igualmente comprovado a utilização do metabolismo antioxidativo nas vias de ação dos AH em plantas e sua ação protetora diante estresse hídrico, chegando até a regulação da expressão de genes *OstIPs*. Esta se inicia por meio de interações entre os AH e o sistema radicular das plantas, onde acontecem aglomerações de fragmentos húmicos com menor complexidade estrutural que os adicionados de maneira exógena.
- d) A fração RH mostrou ser um material eficiente para a remoção de cátions metálicos Ni^{2+} e Pb^{2+} tanto em sistema monoelementares como bielementares aquosos. A retenção dos metais em RH parece acontecer através de fenômenos de natureza química e tanto em nível superficial quanto intraestrutural e está por tanto, relacionado com a heterogeneidade estrutural de RH. Em águas residuais industriais o RH removeu quantidades superiores aos 90% de cada metal.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As interferências dos AH no metabolismo de resposta antioxidativo das plantas, abre novas portas para o entendimento dos modos de ação destas substâncias de elevada complexidade estrutural e poderia servir para explicar parte dos efeitos de proteção observados de forma empírica quando utilizados os húmus líquido nas culturas.

As interações dos AH com o sistema radicular precisa ser estudado em detalhe mediante a utilização de outras técnicas de análises, pois resulta o ponto iniciante dos efeitos das SH nas plantas, tanto em condições naturais como experimentais.

O RH pode constituir uma fração eficiente que gere um dispositivo para a remoção de metais em residuais líquidos industriais e com isto se elimina como material residual dos processos de obtenção de húmus líquido aos VC.

9. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, E.; RIGO, G.; SZEKELY, G.; NAGY, R.; KONCZ, C.; SZABADOS, L. Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, v.51, p.363-372, 2003.
- AGATI, G.; AZZARELLO, E.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, v.196, p.67-76, 2012.
- AGUIAR, N.O., NOVOTNY, E.H., OLIVEIRA, A.L., RUMJANEK, V.M., OLIVARES, F.L., CANELLAS, L.P. Prediction of humic acids bioactivity using spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Geochemical Exploration* v.129, p.95-102, 2013.
- AGUIAR, N.O., OLIVARES, F.L., NOVOTNY, E.H., DOBBSS, L.B., BALMORI, D.M., SANTOS-JÚNIOR, L.G., CHAGAS, J.G., FAÇANHA, A.R., CANELLAS, L.P. Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. *Plant Soil* v.362, 161-174, 2012.
- AL-DEGS, Y.S., EL-BARGHOUTH, M.I., ISSA, A.A., KHRAISHEHB, M.A., WALKER, G.M. Sorption of Zn(II), Pb(II), and Co(II) using natural sorbents: Equilibrium and kinetic studies. *Water Research* v.40, p.2645-2658, 2006.
- ALVAREZ-PUEBLA, R.A., VALENZUELA-CALAHORRO, C., GARRIDO, J.J. Cu(II) retention on a humic substance. *Journal of Colloid and Interface Science* v.270, p.47-55, 2004.
- AMIR, S.; JOURAIPHY, A.; MEDDICH, A.; GHAROUS, M.; WINTERTO, P.; HAFIDI, M. Structural study of humic acids during composting of activated sludge-green waste: Elemental analysis, FTIR and ¹³C NMR. *Journal of Hazardous Materials*, v.177, p.524-529, 2010.
- ANJUM, S.A.; WANG, L.; FAROOQ, M.; XUE, L.; ALI, S. Fulvic Acid Application Improves the Maize Performance under Well-watered and Drought Conditions. *Journal of Agronomy and Crop Science*, v.197, p.409-417, 2011.
- AROCA, R.; PORCEL, R.; RUIZ-LOZANO, J.M. Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, v.63, p.43-57, 2012.
- ASADA, K. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiology*, v.141, p.391-396, 2006.
- ASLI, S., NEUMANN, P.M. Rhizosphere humic acid interacts with root cell walls to reduce hydraulic conductivity and plant development. *Plant Soil*, v.336, p.313-322, 2010.
- AYDIN, A.; KANT, C.; TURAN, M. Humic acid application alleviate salinity stress of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants decreasing membrane leakage. *African Journal of Agriculture Research*, v.7, p.1073-1086, 2011.
- BALDOTTO, M.; CANELLAS, L.P.; CANELA, M.C.; SIMÕES, M.L.; MARTINETO, L.; FONTES, M.P.; VELLOSO A.C.X. Propriedades redox e grupos funcionais de ácidos húmicos isolados de adubos orgânicos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.31, p.465-475, 2007.

- BALMORI, D.M. Evaluación del efecto del Liplant en indicadores bioquímicos-fisiológicos en el cultivo del maíz. Tesis en opción al título de Máster en Ciencias de la Química Agraria. Universidad Agraria de La Habana, Cuba. 2006.
- BALMORI, D.M.; OLIVARES, FL.; SPACCINI, R.; AGUIAR, K.P.; ARAÚJO, M.F.; AGUIAR, N.O.; GURIDI, F.; CANELLAS, L.P. Molecular characteristics of vermicompost and their relationship to preservation of inoculated nitrogen-fixing bacteria. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, DOI:p.2013.05.015, 2013.
- BARDY, M., FRITSCH, E., DERENNE, S., ALLARD, T., DO NASCIMENTO, N.R., BUENO, G.T. Micromorphology and spectroscopic characteristics of organic matter in waterlogged podzols of the upper Amazon basin. *Geoderma* v.145, p.222-230. 2008.
- BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water stress-water studies. *Plant soil*, v.39, p.205-207, 1973.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v.44, p.276–287, 1971.
- BECANA, M., MORAN, J.F., ITURBE-ORMAETXE, I. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. *Plant and Soil*, v. 201, p.137-147, 1998.
- BERBARA, R.L.L., GARCIA, A.C. Humic Substances and Plant Defense Metabolism. Em: *Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants Under Changing Environment*. Springerlink v1, pp. 608, 2014.
- BERNER, J.M., VAN, DER., WESTHUIZEN, A.J. Inhibition of Xanthine Oxidase Activity Results in the Inhibition of Russian Wheat Aphid-Induced Defense Enzymes. *Journal of Chemical Ecology* v.36, p.1375-1380, 2010.
- BHATTACHARJEE, S. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science*, v.89, p.1113-1121, 2005.
- BHATTACHARYA, A.K., MANDAL, S.N., DAS, S.K. Adsorption of Zn (II) from aqueous solution by using different adsorbents. *Chemical Engineering Journal* v.123, p.43-51, 2006.
- BIANCHIN, J.N., MARTENDAL, E., MIOR, R., ALVES, V.N., ARAÚJO, C.S.T., COELHO, N.M.M., CARASEK, E. Development of a flow system for the determination of cadmium in fuel alcohol using vermicompost as biosorbent and flame atomic absorption spectrometry. *Talanta* v.78, p.333-336, 2009.
- BIENERT, G.P., MOLLER, A.L., KRISTIANSEN, K.A., SCHULZ, A., MOLLER, I.M., SCHJOERRING, J.K., JAHN, T.P. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *Journal of Biological Chemistry*, v.282, p.1183-1192, 2007.
- BLOMSTER, T.; SALOJÄRVI, J.; SIPARI, N.; BROSCHE, M.; AHLFORS, R.; KEINÄNEN, M.; OVERMYER, K.; KANGASJÄRVI, J. Apoplastic Reactive Oxygen Species Transiently Decrease Auxin Signaling and Cause Stress-Induced Morphogenic Response in Arabidopsis. *Plant Physiology*, v.157, p.1866-1883, 2011.
- BOVERIS, A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods of Enzymology*, v.105, p.429–435, 1984.

- BRADFORD, M.M. A rapid a sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing of principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p.248-254, 1976.
- CALDERIN, A., GURIDI, F., GARCIA, E., ROSADO, E., VALDES, R, PIMENTEL, J., NILS, A. Material de origen natural que retiene cationes de metales pesados. *Revista Iberoamericana de Polímeros* v.8, p.204-214, 2007.
- CAMPITELLI, P.; CEPPI, S. Effects of composting technologies on the chemical and physicochemical properties of humic acids. *Geoderma*, v.144, p.325–333, 2008.
- CANELLAS, L.P., DOBBSS, L.B., OLIVEIRA, A.L., CHAGAS, J.G., AGUIAR, N.O., RUMJANEKC, V.M., NOVOTNY, E.H., OLIVARES, F.L. SPACCINI, R., PICCOLO. A. Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. *European Journal of Soil Science*, 63, 315-324, 2012.
- CANELLAS, L.P., PICCOLO, A., DOBBSS, L.B., SPACCINI, R., OLIVARES, F.L., ZANDONADI, D.B., FAÇANHA, A.R. Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. *Chemosphere*, v.78, p.457-466, 2010.
- CANELLAS, L.P.; DANTAS, D.J.; AGUIAR, N.O., PERES, L.E.P.; ZSOGON, A.; OLIVARES, F.L.; DOBBSS, L.B.; FAÇANHA, A.R.; NEBBIOSO, A.; PICCOLO A. Probing the hormonal activity of fractionated molecular humic components in tomato auxin mutants. *Annals of Applied Biology*, v.159, p.202–211, 2011.
- CANELLAS, L.P.; DOBBSS, L.B.; OLIVEIRA, A.L.; CHAGAS, J.G.; AGUIAR, N.O.; RUMJANEK, V.M.; NOVOTNY, E.H.; OLIVARES, F.L.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. *European Journal of Soil Science* v.63, p.315-324, 2012.
- CANELLAS, L.P.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; DOBBSS, L.B.; FAÇANHA, A.L.O.; SANTOS, G.A.; OLIVARES, F.L.; FAÇANHA, A.R. Relationships Between Chemical Characteristics and Root Growth Promotion of Humic Acids Isolated From Brazilian Oxisols. *Soil Science*, v.174, p.611-620, 2009.
- CÁRDENAS, A.; BAISRE, J.; CALZADA, NOÉ. El complejo de, adsorción de los suelos Ferríticos de Cuba. *Ciencias de la Agricultura*, v.3, p.18, 1978.
- CHAI, X.; TAKAYUKI, S.; CAO, X.; GUO, Q.; ZHAO, Y. Spectroscopic studies of the progress of humification processes in humic substances extracted from refuse in a landfill. *Chemosphere*, v.69, p.1446–1453, 2007.
- CHANCE, B.; MAEHLEY, A. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol*, v.2, p.764-775, 1955.
- CHEN, C., WANG, X., JIANG, H., WENPING, H.U. Direct observation of macromolecular structures of humic acid by AFM and SEM. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* v.302, p.121-125, 2008.
- CHEN, S.; LI, J.; WANG, T.; WANG, S.; POLLE, A.; HUTTERMANN, A. Osmotic stress and ion-specific effects on xylem abscisic acid and the relevance to salinity tolerance in poplar. *Journal of Plant Growth Regulation*, v.21, p.224-233, 2002.
- CHILSON, O.P.; KELLY-CHILSON, A.E.; SCHNEIDER, J.D. Pyrroline-5-Carboxylate Reductase in Soybean Nodules. *Plant Physiology*, v.99, p.119-123, 1992.

CHRISTIAN, D., WONG, E., CRAWFORD, R.L., CHENG, I.F., HESS, T.F. Heavy metals removal from mine runoff using compost bioreactors. *Environmental Technology* v.14, p.1533-1546, 2010.

CORDEIRO, F.C.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; DE SOUZA, S.R. Humic acid effect on catalase activity and the generation of reactive oxygen species in corn (*Zea Mays* L). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v.75, p.70-74, 2011.

CORPAS, F.J., PALMA, J.M., SANDALIO, L.M., VALDERRAMA, R., BARROSO, J.B., DEL RÍO, L.A. Peroxisomal xanthine oxidoreductase: Characterization of the enzyme from pea (*Pisum sativum*L.) leaves. *Journal of Plant Physiology* v.165, p.1319-1330, 2008.

DAHIYA, S., TRIPATHI, R.M., HEDGE, A.G. Biosorption of lead and copper from aqueous solutions by pre-treated crab and area shell biomass. *Bioresource Technology* v.99, p.179-187, 2008.

DE TULLIO, M.C.; JIANG, KENI.; FELDMAN, L.J. Redox regulation of root apical meristem organization: Connecting root development to its environment. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.48, p.328-336, 2010.

DEL LONGO, O.T.,CLAUDIO, A.G., PASTORI, G.M., TRIPPI, V.S. Antioxidant Defences under Hyperoxygenic and Hyperosmotic Conditions in Leaves of Two Lines of Maize with Differential Sensitivity to Drought. *Plant Cell Physiology*, v.34, p.1023-1028, 1993.

DEMIDCHIK, V.; SHABALA, S.N.; DAVIES, J.M. Spatial variation in H₂O₂ response of *Arabidopsis thaliana* root epidermal Ca²⁺ flux and plasma membrane Ca²⁺ channels. *Plant Journal*, v.49, p.377-386, 2007.

DEMIDCHIK, V.; SHANG, Z.; SHIN, R.; THOMPSON, E.; RUBIO, L.; LAOHAVISIT, A.; MORTIMER, J.C.; CHIVASA, S.; SLABAS, A.R.; GLOVER, B.J.; SCHACHTMAN, D.P.; SHABALA, S.N.; DAVIES, J.M. Plant extracellular ATP signalling by plasma membrane NADPH oxidase and Ca²⁺ channels. *Plant Journal*, v.58, p.903-913, 2009.

DHINDSA, R.S., MATOWE, W. Drought tolerance in two mosses: correlation with enzymatic defense against lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany*, 32, 79-91, 1981.

DOAN, T.T., NGO, P.T., RUMPEL, C., NGUYEN, B.V., JOUQUET, P. Interactions between compost, vermicompost and earthworms influence plant growth and yield: A one-year greenhouse experiment. *Scientia Horticulturae* v.160, p.148-154, 2013.

DOBBSS, L.; CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.L.; AGUIAR, N.O.; PERES, L.E.P.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.127, p.1-10, 2010.

DOBBSS, L.B., RUMJANECK, V.M., BALDOTTO, A.M., VELLOSO, A.C.X., CANELLAS, L.P. Caracterização química e espectroscópica de ácidos húmicos e fúlvicos isolados da camada superficial de latossolos brasileiros. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* v.33, p.51-63, 2009.

DOMÍNGUEZ, J.A.M., GÓMEZ-BRANDÓN, M. Vermicomposting: Earthworms Enhance the Work of Microbes, In: INSAM, H., FRANKE-WILTTL, I.,

GOBERNA, M., (eds.) *Microbes at Work*, 93-114, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2010.

DROUSSI, Z.; D'ORAZIO, V.; HAFIDI, M.; OUATMANE, A. Elemental and spectroscopic characterization of humic-acid-like compounds during composting of olive mill by-products. *Journal of Hazardous Materials*, v.163, p.1289–1297, 2009.

DUNAND, C.; CRÈVECOEUR, M.; PENEL, C. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. *New Phytologist*, v.174, p.332-341. 2006.

ELENA, A.; DIANE, L.; EVA, B.; FUENTES, M.; BAIGORRI, R.; ZAMARREÑO, A.M.; GARCÍA-MINA, J.M. The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.47, p.215-223, 2009.

FAUR-BRASQUET, C., KADIRVELU, K., LE, CLOIREC. P. Removal of metal ions from aqueous solution by adsorption onto activated carbon cloths: adsorption competition with organic matter. *Carbon* v.40, p.2387-2392, 2002.

FERRARI, E.; FRANCIOSO, ORNELLA.; NARDI, SERENELLA.; SALADINI, MONICA.; DAL FERRO, NICOLA.; MORARI, FRANCESCO. DRIFT and HR MAS NMR characterization of humic substances from a soil treated with different organic and mineral fertilizers. *Journal of Molecular Structure*, v.998, p.216–224, 2011.

FERRER, J.L., AUSTIN, M.B., STEWART, C.JR., NOEL, J.P. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry* v.46, p.356-370, 2008.

FILELLA, M., TOWN, R.M. Heterogeneity and lability of Pb(II) complexation by humic substances: practical interpretation tools. *Fresenius Journal Analytical Chemistry* v.370, p.413-418. 2001.

FOREMAN, J., DEMIDCHIK, V., BOTHWELL, J.H. F., MYLONA, P., MIEDEMA, H., TORRESK, M.A., LINSTED, P., COSTA, S., BROWNLEE, C., JONATHAN, D., JONESK, G., DAVIES, J.M., DOLAN, L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, v.422 p.442-445, 2003.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidant and Redox Signalling*, v.11, p.861-905, 2009.

GAO, J., LIU, J., LI, B., LI, Z. Isolation and purification of functional total RNA from blue-grained wheat endosperm tissues containing high levels of starches and flavonoids. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.19, p.185-1185, 2001.

GARCÍA, A.C., IZQUIERDO, F.G., GONZÁLEZ, O.L.H., ARMAS, M.M.D., LÓPEZ, R.H., REBATO, S.M., BALMORI, D.M., BERBARA, R.L.L. Biotechnology of humified materials obtained from vermicomposts for sustainable agroecological purposes. *African Journal of Biotechnology* v.7, p.625-634. 2013.

GARCÍA, A.C.; IZQUIERDO, F.G.; NIEBLAS, E.G.; ROSADO, E.; VALDÉS, R.; PIMENTEL, J.J.; NILS, A. Material de origen natural que retiene cationes de metales pesados. *Revista Iberoamericana de polímeros*, v.3, p.204-214, 2007.

- GARG, V.K., GUPTA, R. Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization, In: Singh-Nee Nigam, Poonam; Pandey, Ashok (Eds.) Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation, 431-456, Springer Science+Business Media B.V. 2009.
- GARCÍA, A.C., BERBARA, R.L.L., FARIAS, L.P., IZQUIERDO, F.G., HERNÁNDEZ, O.L., CAMPOS, R.H., CASTRO, R.N. Humic acids of vermicompost as an ecological pathway to increase resistance of rice seedlings to water stress. *African Journal of Biotechnology* v.11, p.3125-3134, 2012.
- GAY, C., GEBICKI, J.M. A critical evolution of the effect of sorbitol on the ferricylenol orange hydroperoxide assay. *Analytical Biochemistry*, v.284, p.217-220, 2000.
- GERKE, J. Aluminum complexation by humic substances and aluminum species in the soil solution. *Geoderma* v.63, p.165-175, 1994.
- GHABBOUR, E.A., DAVIES, G. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 OW, UK Registered Charity No. 207890. 2001.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide Dismutases. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, v.59, p.309-314, 1977.
- GILES, C.H., D' SILVA, A.P.D. Trivedi AS. Surface area determination. London: Butterworth v.135, p. 47, 1970.
- GILL, S.S., TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.48, p.909-930, 2010.
- GONDAR, D., LOPEZ, R., FIOL, S., ANTELO, J.M., ARCE, F. Characterization and acid-base properties of fulvic and humic acids isolated from two horizons of an ombrotrophic peat bog. *Geoderma* v.126, p.367-374, 2005.
- GUI-LIAN, Z.; LI-YUN, C.; SHUN-TANG, Z.; HUA, Z.; GUO-HUA, L. Effects of High Temperature Stress on Microscopic and Ultrastructural Characteristics of Mesophyll Cells in Flag Leaves of Rice. *Rice Science*, v.16, p.65-77, 2009.
- GUO-WEI, LI., YAN-HUI, PENG., XIN, YU., MIN-HUA, ZHANG., WEI-MING, CAI., WEI-NING, SUN., WEI-AI, SU. Transport functions and expression analysis of vacuolar membrane aquaporins in response to various stresses in rice. *Journal of Plant Physiology* v.165, p.1879-1888, 2008.
- GUSTAFSSON, J.P. Arsenate adsorption to soils: Modelling the competition from humic substances. *Geoderma* v.136, p.320-33, 2006.
- HACHEZ, C., ZELAZNY, E., CHAUMONT, F. Modulating the expression of aquaporin genes in planta: a key to understand their physiological functions? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembrane*, v.1758, p.1142-1156, 2006.
- HAGHIGHI, M.; KAFI, M.; FANG, P. Photosynthetic Activity and N Metabolism of Lettuce as Affected by Humic Acid. *International Journal of Vegetable Science*, v.18, p.182-189, 2012.
- HALL, K.R., EAGLETON, L.C., ACRIVOS, A., VERMEULEN, T. Pore and solid diffusion kinetics in fixed bed adsorption under constant-pattern conditions. *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals* v.5, p.212-223. 1996.

HENZLER, T., STEUDLE, E. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. *Journal of Experimental Botany*, v.51, p.2053-2066, 2000.

HERNÁNDEZ, R., GARCÍA, A., PORTUONDO, L., MUÑIZ, S., BERBARA, R., IZQUIERDO, F. Protección antioxidativa de los ácidos húmicos extraídos de vermicompost en arroz (*Oryza sativa* L.) var. IACuba30. *Revista de Protección Vegetal*, v.27, p.102-110, 2012.

HIRAYAMA, T.; SHINOZAKI, K. Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends in Plant Science*, v.12, p.343-351, 2007.

HLADKÝ, J.; POSPÍŠILOVÁ, L.; LIPTAJ, T. Spectroscopic Characterization of Natural Humic Substances. *Journal of Applied Spectroscopy*, v.80, p.12-18, 2013.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water- culture method for growing plants without soil. *California Agricultural of Experimental Station Bull*, v.347, p.1- 32, 1950.

HOHMANN, I., BILL, R., KAYINGO, I., PRIOR, B. Microbial MIP channels. *Trends in Microbiology*, v.8, p.33-38, 2000.

<http://www.worstpolluted.org/2012-report.html>. Acessado em Setembro de 2012.

IGLESIAS, A., LOPEZ, R., FIOL, S., ANTELO, J.M., ARCE, F. Analysis of copper and calcium–fulvic acid complexation and competition effects. *Water Research* v.37, p.3749-3755, 2003.

IHSS, 2013. International Humic Substances Society. Disponível em: <http://www.humicsubstances.org/>. Acesso em: 15 04 2012.

IQBAL, M., SAEED, A., KALIM, I. Characterization of Adsorptive Capacity and Investigation of Mechanism of Cu²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺ Adsorption on Mango Peel Waste from Constituted Metal Solution and Genuine Electroplating Effluent. *Separation Science and Technology* v.44, p.3770-3791, 2009.

JAIN, M., NIJHAWAN, A., TYAGI, A.K., KHURANA, J. P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.345, p.646–651, 2006.

JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; WAHID, A.; FAROOQ, M.; AL-JUBURI, H.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R.; Drought Stress in Plants: A Review on Morphological Characteristics and Pigments Composition. *International Journal of Agriculture and Biology*, v.11p.100-105, 2009.

JANNIN, L., ARKOUN, M., OURRY, A., LAÏNÉ, P., GOUX, D., GARNICA, M., FUENTES, M., SAN FRANCISCO, S., BAIGORRI, R., CRUZ, F., HOUDUSSE, F., GARCIA-MINA, J.M., YVIN, J.C., ETIENNE, P. Microarray analysis of humic acid effects on *Brassica napus* growth: Involvement of N, C and S metabolisms. *Plant Soil*, v.359, p.297-319, 2012.

JERZYKIEWICZ, M. Formation of new radicals in humic acids upon interaction Pb(II) ions. *Geoderma* v.122, p.305-309, 2004.

- JORDÃO, C.P., FERNANDES, R.B.A., RIBEIRO, K.L., NASCIMENTO, B.S., BARROS, P.M. Zn (II) adsorption from synthetic solution and kaolin wastewater onto vermicomposto. *Journal of Hazardous Materials* v.162, p.804-811, 2009.
- JORDÃO, C.P., FIALHO, L.L., NEVES, J.C.L., CECON, P.R., MENDONÇA, E.S., FONTES, R.L.F. Reduction of heavy metal contents in liquid effluents by vermicomposts and the use of the metal-enriched vermicomposts in lettuce cultivation. *Bioresource Technology* v.98, p.2800-2813, 2007.
- JORDÃO, C.P., PEREIRA, W.L., CARARI, D.M., FERNANDES, R.B.A, DE ALMEIDA, R.M., FONTES, M.P.F. Adsorption from Brazilian soils of Cu(II) and Cd(II) using cattle manure vermicomposto. *International Journal of Environmental Studies* v.68, p.719-736, 2011.
- JUBANY-MARÍ, T.; MUNNÉ-BOSCH, S.; ALEGRE, L. Redox regulation of water stress responses infield-grown plants. Role of hydrogen peroxide and ascorbate. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.48, p.351-358, 2010.
- JÚNIOR, F.E.M. Production of reactive oxygen intermediates in Rice, in the presence of aluminum. [Produção de intermediários reativos de oxigênio em arroz na presença de alumínio]. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa. *Magister Science Theses*, 2007.
- KADIRVELU, K., NAMASIVAYAM, C. Agricultural by-products as metal adsorbents: sorption of lead(II) from aqueous solutions onto coir pith carbon. *Journal Environmental Technology* v.21, p.1091-1097, 2000.
- KALAVATHY, M.H., KARTHIKEYAN, T., RAJGOPAL, S., MIRANDA, L.R. Kinetic and isotherm studies of Cu (II) adsorption onto H₃PO₄-activated rubber wood sawdust. *Journal of Colloid and Interface Science* v.292, p.354-362, 2005.
- KALDENHOFF, R., FISCHER, M. Functional aquaporin diversity in plants, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembrane*, v.1758, p.1134-1141, 2006.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. *Plant Physiology*, v.57, p.315-319, 1976.
- KEELER, C.; KELLY, E.F.; MACIEL, G.E. Chemical-structural information from solid-state ¹³C NMR studies of a suite of humic materials from a lower montane forest soil, Colorado, USA. *Geoderma*, v.130, p.124-140, 2006.
- KELEN, M. Separation of Abscisic Acid, Indole-3-Acetic Acid, Gibberellic Acid in 99-R (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) and Rose Oil (*Rosa damascena* Mill.) by Reversed Phase Liquid Chromatography. *Turkish Journal Chemistry*, v.28, p.603-610, 2004.
- KESBA, H.H.; EL-BELTAGI, H.S. Biochemical changes in grape rootstocks resulted from humic acid treatments in relation to nematode infection. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, p.287-293, 2012.
- KHAN, A.A., SINGH, R.P. Adsorption thermodynamics of carbofuran on Sn (IV) arseno silicate in H⁺, Na⁺ and Ca²⁺ forms. *Colloids and Surface* v.24, p.33-42, 1987.
- KOTCHONI, S.O.; KUHNS, C.; DITZER, A.; KIRCH, H.H.; BARTELS, D. Overexpression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. *Plant Cell and Environment*, v.29, p.1033-1048, 2006.

- KRAMER, E.M. Auxin-regulated cell polarity: an inside job?. *Trends in Plant Science*, v.14, p.242-247, 2009.
- KUO, M.C., KAO, C.H. Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzymes activities in rice leaves. *Biologia Plantarum*, v.46, p.149-152, 2003.
- KWAK, J.M., MORI, I.C., PEI, Z.M., LEONHARDT, N., TORRES, M.A., DANGL, J.L., BLOOM, R.E., BODDE, S., JONES, J.D., SCHROEDER, J.I. NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO Journal* v.22, p.2623-2633, 2003.
- KOOPAL, L.K., VAN RIEMSDIJK, H.W., KINNIBURGH, D.G. Humic matter and contaminants. General aspects and modeling metal ion binding. *Pure and Applied Chemistry* v.73, p.2005–2016, 2001.
- KULIKOVA, N.A., ABROSKIN, D.P., BEER, A.S., BADUN, G.A., CHERNYSHEVA, M.G., KOROBKOV, V.I., PERMINOVA, I.V. The Endodermis Is the Major Control Point for Radial Transport of Humic Substances into the Vascular System of Plants. *Em: Functions of Natural Organic Matter in Changing Environment* p. 873-876. 2013.
- LARIBIS, A.M., COJEAN, R. Assessing shrink/swell properties of two argillaceous soils from the Paris Basin: a comparison of cation exchange determination methods. *Bulletin of Engineering Geology and the Environment* v.67, p.415-424, 2008.
- LAZCANO, C., ARNOLD, J., TATO, A., ZALLER, J. G., DOMÍNGUES, J. Compost and vermicompost as nursery pot components: effects on tomato plant growth and morphology. *Spanish Journal of Agricultural Research* v.7, p.994-951, 2009.
- LAROUS, S., MENIAI, A.H., LEHOCINE, M.B. Experimental study of the removal of copper from aqueous solutions by adsorption using sawdust. *Desalination* v.185, p.483-490, 2005.
- LEI, Y.; YIN, C.; LI, C. Differences in some morphological, physiological, and biochemical responses to drought stress in two contrasting populations of *Populus przewalskii*. *Physiologia Plantarum*, v.127, p.187-191, 2006.
- LI, C.Y.; CHOW, T.J.; WU, T.S. The Epimerization of Sesamin and Asarinin. *Journal of Natural Products*, v.68, p. 1622-1624, 2005.
- LI, GUO-WEI., PENG, YAN-HUI., YU, XIN., ZHANG, MIN-HUA., CAI, WEI-MING., SUN, WEI-NING., SU, WEI-AI. Transport functions and expression analysis of vacuolar membrane aquaporins in response to various stresses in rice. *Journal of Plant Physiology*, v.165, p.1879-1888, 2008.
- LI, H. Principles and Techniques of plants physiological biochemical experimental. Higher education Press. Beijing. p.164-169, 2000.
- LI, XIAOWEI.; MEIYAN, XING.; JIAN, YANG.; ZHIDONG, HUANG. Compositional and functional features of humic acid-like fractions from vermicomposting of sewage sludge and cow dung. *Journal of Hazardous Materials*, v.185, p.740-748, 2011.
- LIU, L.H., LUDEWIG, U., GASSERT, B., FROMMER, W.B., WIRÉN, N.V. Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133, 1220-1128, 2003.

- LENHART, J.J., STEPHEN, E., PATRICK, M., HONEYMAN, B.D. Uranium(VI) complexation with citric, humic and fulvic acids. *Radiochimica Acta* v.88, p.345-353, 2000.
- LIU, Q., UMEDA, M., UCHIYAMA, H. Isolation and expression analysis of two rice genes encoding the major intrinsic protein. *Plant Molecular and Biology*, v.26, p. 2003–2007, 1994.
- LOPEZ, F., BOUSSER, A., SISSOËFF, I., GASPAR, M., LACHAISE, B. Diurnal regulation of water transport and aquaporin gene expression in maize roots: contribution of PIP2 proteins. *Plant Cell Physiology* v.44, p.1384–95, 2003.
- LÓPEZ, Y.P.; SOBRINHO, N.M.A.; ARIAS, M.I.B.; CARMENATE, R.V.; MAGALHÃES, M.O.L. Contenido de elementos metálicos en suelos característicos del municipio San José de las Lajas. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, v.21, p.43-46, 2012.
- LOQUE, D., LUDEWIG, U., YUAN, L., VON WIREN, N. Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH₃ transport into the vacuole. *Plant Physiology* v.137, p.671-680, 2005.
- LU, X.Q.; HANNA, J.V.; JOHNSON, W.D. Source indicators of humic substances: an elemental composition, solid state ¹³C CP/MAS NMR and Py-GC/MS study. *Applied Geochemistry*, v.15, p.1019-1033, 2000.
- LU, X.Q.; HANNA, J.V.; JOHNSON, W.D. Evidence of chemical pathways of humification: a study of aquatic humic substances heated at various temperatures. *Chemical Geology*, v.177, p.249–264, 2001.
- MA, S., QUIST, T.M., ULANOV, A., JOLY, R., BOHNERT, H.J. Loss of TIP1;1 aquaporin in Arabidopsis leads to cell and plant death. *Plant Journal* 40, 845-859, 2004.
- MAHAJAN, S., TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444, 139-158, 2005.
- MATYSIK, J.A.; BHALU, B.; MOHANTY, P. Molecular mechanism of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plant. *Current Science*, v.5, p.525-532, 2002.
- MAUREL, C., JAVOT, H., LAUVERGEAT, V., GERBEAU, P., TOURNAIRE, C., SANTONI, V., HEYES, J. Molecular physiology of aquaporins in plants. *International Review of Cytology*, v.215, p.105–148, 2002.
- MAUREL, C., VERDOUCQ, L., LUU, D.T., SANTONI, V. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annual Review of Plant Biology*, v.59, p.595–624, 2008.
- MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant Cell and Environmental*, v.33, p.453-467, 2010.
- MISRA, H.P., FRIDOVICH, I. The Generation of Superoxide Radical during the Autoxidation of Ferredoxins. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 25, p.6886-6890, 1971.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* v.7, p.405-10, 2002.

- MITTLER, R., VANDERAUWERA, S., GOLLERY, M., VAN, B.F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, v.9, p.490-498, 2004.
- MITTLER, RON.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.; TOGNETTI, V.B.; VANDEPOELE, K.; GOLLERY, M.; SHULAEV, V.; BREUSEGEM, F.V. ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science*, v.16, p.300-309, 2011.
- MOHAMMADI, M., KARR, A.L. Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. *Journal of Plant Physiology*, v.158, p.1023–1029, 2001.
- MONTILLET, J.L.; CHAMNONGPOL, S.; RUSTÉRUCCI, C.; DAT, J.; VAN DE COTTE, B.; AGNEL, J.P.; BATTISTI, C.; INZÉ, D.; VAN BREUSEGEM, F.; TRIANTAPHYLIDÈS, C. Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiology*, v.138, p.1516-1526, 2005.
- MORA, V.; BACAICOA, E.; ZAMARREÑO, A.M.; AGUIRRE, E.; GARNICA, M.; FUENTES, M.; GARCÍA-MINA, J.M. Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. *Journal of Plant Physiology*, v.167, p.633-642, 2010.
- MORI, I.C., SCHROEDER, J.I. Reactive Oxygen Species Activation of Plant Ca²⁺ Channels. A Signaling Mechanism in Polar Growth, Hormone Transduction, Stress Signaling, and Hypothetically Mechanotransduction. *Plant Physiology* v.135, p.702-708, 2004.
- MUSCOLO, A.; SIDARI, M.; ATTINÁ, E.; FRANCIOSO, O., TUGNOLI, V.; NARDI, S. Biological activity of humic substances is related to their chemical structure. *Soil Science Society of American Journal*, v.71, p.75-85, 2007.
- MUSCOLO, A.; SIDARI, M.; NARDI, S. Humic substance: Relationship between structure and activity. Deeper information suggests univocal findings Original. *Journal of Geochemical Exploration*, v.129, p.57-63, 2013.
- NARDI, S., PIZZEGHELLO, D., MUSCOLO, A., VIANELLO, A. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry* v.34, p.1527-1536, 2002.
- NARDI, S.; MUSCOLO, A.; VACCARO, S.; BAIANO, S.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Relationship between molecular characteristics of soil humic fractions and glycolytic pathway and krebs cycle in maize seedlings. *Soil Biology & Biochemistry*, v.39, p.3138- 3146, 2007.
- NEBBIOSO, A., PICCOLO, A. Advances in humeomics: Enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of a soil humic acid. *Analytica Chimica Acta* v.720, p.77-79, 2012.
- NEBBIOSO, A.; PICCOLO, A. Basis of a Humeomics Science: Chemical Fractionation and Molecular Characterization of Humic Biosuprastructures. *Biomacromolecules*, v.12, p.1187-1199, 2011.
- NEBBIOSO, A.; PICCOLO, A. Molecular Rigidity and Diffusivity of Al³⁺ and Ca²⁺ Humates As Revealed by NMR Spectroscopy. *Environmental Science Technology*, v.43, p.2417–2424, 2009.

- NIEBLAS, E.G., TRUJILLO, A.M., CARMENATE, R.V., GARCÍA, A.C., IZQUIERDO, F.G., ELÍAS, S.S., MORALES, A.R., ARIAS, M.I.B., GONZÁLEZ, O.L.H. Evaluation of liquid residuals with heavy metals dissolved in soils of the agroecosystem San José de las Lajas. *Centro Agrícola* v.35, p.2072-2001, 2008.
- NOELTING, G.; BERNFELD, P. On amylolytic enzymes III. The α -amylase : dosage of activity and control of the absence of amylase . *Helvetica Chimica Acta*, v.31, p.286-290, 1948.
- PASSARDI, F.; LONGET, D.; PENEL, C.; DUNAND, C. The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry*, v.65, p.1879-1893, 2004.
- PEI, Z.M., MURATA, Y., BENNING, G.S., THOMINE, B., KLÜSENER, G.J., ALLEN, E., GRILL, J., SCHROEDER, I. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature*, v.406, p.731-734, 2000.
- PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANTANA, R.; MOSQUIN, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in Sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.11, p.137-143, 1999.
- PÉREZ, J.J.R., IZQUIERDO, F.G., ESCOBAR, I.M.R., RUISÁNCHEZ, Y., MAYORAL, J.A.L., AMADOR, B.M., ESPINOZA, F.H., FABRÉ, T.B., AMADOR, C.A., SILVERA, C.M.O., MORALES, Y.A., MILANÉS, J.Y.R. Efectos del humus líquido sobre algunos parámetros de calidad interna en frutos de tomate cultivados en condiciones de estrés salino [Effects of liquid humus on some parameters of internal quality of tomato fruits grown under salt stress conditions]. *Centro Agrícola* v.38, p.57-61, 2011.
- PÉREZ, M.G.; TORRADO, P.V.; COLNAGO, L.A.; NETO, L.M.; OTERO, X.L.; MILORI, D.M.B.P.; GOMES, F.H. ^{13}C NMR and FTIR spectroscopy characterization of humic acids in spodosols under tropical rain forest in southeastern Brazil. *Geoderma*, v.146, p.425–433, 2008.
- PETOLINO, J.F.; YOUNG, S.; HOPKINS, N.; SUKHAPINDA, K.; WOOSLEY, A.; HAYES, C.; PELCHER, L. Expression of murine adenosine deaminase (ADA) in transgenic maize. *Transgenic Research*, v.9, p.1–9, 2000.
- PFEIFER, THOMAS.; KLAUS, UWE.; HOFFMANN, RALF; SPITELLER, MICHAEL. Characterisation of humic substances using atmospheric pressure chemical ionisation and electrospray ionisation mass spectrometry combined with size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.926, p.151–159, 2001.
- PICCOLO, A., STEVENSON, F.J. Infrared spectra of Cu^{2+} , Pb^{2+} and Ca^{2+} complexes of soil humic substances. *Geoderma* v.27, p.195-208, 1982.
- PICCOLO, A.; SPITELLER, M.; NEBBIOSO, A. Effects of sample properties and mass spectroscopic parameters on electrospray ionization mass spectra of size-fractions from a soil humic acid. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.397, p.3071–3078, 2010.

- PITZSCHKE, A., FORZANI, C., HIRT, H. Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxid.Redox Signal*, v.8, p.1757-1764, 2006.
- PLAZA, C., D'ORAZIO, V., SENESI, N. Copper (II) complexation of humic acids from the first generation of EUROSOLS by total luminescence spectroscopy. *Geoderma* v.125, p.177-186, 2005.
- POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione pathway by metabolic modeling: computer analysis as a step towards flux analysis. *Plant Physiology* v.126, p.445-462, 2001.
- POPKO, J.; HANSCH, R.; MENDEL, R.R., POLLE, A.; TEICHMANN, T. The role of abscisic acid and auxin in the response of poplar to abiotic stress. *Plant Biology*, v.12, p.242-258, 2010.
- QUAN, LI-JUAN., ZHANG, BO., SHI, WEI-WEI., LI, HONG-YU. Hydrogen Peroxide in Plants: a Versatile Molecule of the Reactive Oxygen Species Network. *Journal of Integrative Plant Biology*, v.50, p.2-18, 2008.
- RAMEL, F.; SULMON, C.; BOGARD, M.; COUÉE, I., GOUESBET, G.; Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *BMC Plant Biology*, v.9, p.1-18, 2009.
- RAMOS, A.V.R. Evaluación de una Base de Pintura Industrial Formulada con Extractos de Plantas del Género *Aloe* como Posible Recubrimiento Inhibidor de Corrosión. Tese de grado presentado como requisito parcial para Optar ao título de licenciado em química. 2013.
- RAO, M.V.; DAVIS, K.R. Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *Plant Journal*, v.17, p.603-614, 1999.
- 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.
- REINES, M. Lombrices de tierra con valor comercial. *Biología y técnicas de cultivo*, Universidad de La Habana y Universidad de Quintana Roo, La Habana, Cuba, 1998.
- RENTEL, M.C.; LECOURIEUX, D.; QUAKED, F.; USHER, S.L.; PETERSON, L.; OKAMOTO, H.; KNIGHT, H.; PECK, S.C.; GRIERSON, C.S.; HIRT, H.; KNIGHT, M.R. OXII kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis* development. *Nature*, v.427, p.858-861. 2004.
- ROMERO, E.; PLAZA, C.; SENESI, N.; NOGALES, R.; POLO, A. Humic acid-like fractions in raw and vermicomposted winery and distillery wastes. *Geoderma*, v.139, p.397-406, 2007.
- RUPIASIH, N.N.; VIDYASAGAR, P.B. Analytical study of humic acid from various sources commonly used as fertilizer: emphasis on heavy metal content. *International Journal of Design and Nature and Ecodynamics*, v. 4, p.32-46, 2009.
- RUSSELL, L., STOKES, A.R., MACDONALD, H., MUSCOLO, A., NARDI, S. Stomatal responses to humic substances and auxin are sensitive to inhibitors of phospholipase A2. *Plant Soil* v.283, p.175-185, 2006.

- SAEED, A., AKHTER, M.W., IQBAL, M. Removal and recovery of heavy metals from aqueous solution using papaya wood as a new biosorbent, *Separation and Purification Technology* v.45, p.25-31, 2005.
- SAEED, A., IQBAL, M., HÖLL, W.H. Kinetics, equilibrium and mechanism of Cd²⁺ removal from aqueous solution by mung bean husk. *Journal of Hazardous Materials* v.168, p.1467-1475, 2009.
- SAHA, B., TAI, M.H., STREAT, M. Study of activated carbon after oxidation and subsequent treatment characterization. *Process Safety and Environmental Protection* v.79, p.211-217, 2001.
- ŠAMAJ, J., BALUŠKA, F., MENZEL, D. New signalling molecules regulating root hair tip growth. *Trends in Plant Science* v.9, p.217-220, 2004.
- SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. (editores). 1999. *Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais*. Ed. Genesis, Porto Alegre, Brasil. 508pp.
- SAVOURÉ, A.; HUA, X.J.; BERTAUCHE, N.; VAN, M.M.; VERBRUGGEN, N. Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of the proline biosynthesis upon cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genetics and Genomics*, v.254, p.104-109, 1997.
- SCHIAVON, M.A.; GHELLO, D.P.; MUSCOLO, A.; VACCARO, S.; FRANCIOSO, O.; NARDI, S. High Molecular Size Humic Substances Enhance Phenylpropanoid Metabolism in Maize (*Zea mays* L.). *Journal of Chemical Ecology*, v.36, p.662-669, 2010.
- SCHMIDT, W.; SANTI, S.; PINTON, R.; VARANINI, Z. Water-extractable humic substances alter root development and epidermal cell pattern in *Arabidopsis*. *Plant Soil*, v.300, p.259-267, 2007.
- SCHNITZER, M. Humic substances: chemistry and reactions. In: Schnitzer, M., Khan, S.U. (Eds.), *Soil Organic Matter*. Elsevier, Amsterdam. 1978.
- SCHOPTER, P.; LISZKAY, A.; BECHTOLD, M.; FRAHRY, G.; WAGNER, A. Evidence that hydroxyl radicals mediate auxine-induced extension growth. *Planta*, v.214, p.821-828, 2002.
- SENESI, N., RIZZI, F.R., DELINO, P. Fractal dimension of humic acids in aqueous suspension as a function of pH and time. *Soil Science of American Journal*, v.60, p.1773-1778, 1996.
- SENESI, N., SPOSITO, G., MARTIN, J.P. Copper (II) and iron (III) complexation by soil humic acids: an IR and ESR study. *Science of the Total Environment* v.55, p.351-362, 1986.
- SENESI, N.; PLAZA, C.; BRUNETTI, G.; POLO, A. A comparative survey of recent results on humic-like fractions in organic amendments and effects on native soil humic substances. *Soil Biology & Biochemistry*, v.39, p.1244-1262, 2007.
- SENESI, N.; RIZZI, F.R.; DELINO, P. Fractal dimension of humic acids in aqueous suspension as a function of pH and time. *Soil Science Society of American Journal*, v.60, p.1773-1778, 1996.

- SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, v.2012, p.1-26, 2012.
- SHIRSHOVA, L.T.; GHABBOUR, E.A.; DAVIES, G. Spectroscopic characterization of humic acid fractions isolated from soil using different extraction procedures. *Geoderma*, v.133, p.204-216, 2006.
- SIDDIQUI, M.H., AL-WHAIBI, M.H., BASALAH, M.O. Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma* v.248p, 447-455, 2011.
- SINGH, R., SINGH, R., SONI, S.K., SINGH, S.P., CHAUHAN, U.K., KALRA, A. Vermicompost from biodegraded distillation waste improves soil properties and essential oil yield of *Pogostemon cablin* (patchouli) Benth. *Applied Soil Ecology* v.70, p.48-56, 2013.
- SLESIAK I, LIBIK M, KARPINSKA B, KARPINSKI S, MISZALSKI Z. *Acta Biochimica Polonica*, v.54, p.39–50, 2007.
- SMET, I.D.; ZHANG, H.; INZÉ, D.; BEECKMAN, T. A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends in Plant Science*, v.11, p.434-439, 2006.
- SPACCINI, R., PICCOLO, A. Molecular characterization of compost at increasing stages of maturity: Thermochemolysis-GC-MS and ¹³C-CPMAS-NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p.2303–2311, 2007.
- SRIVASTAVA, P.K., GUPTA, M., UPADHYAY, R.K., SHARMA, S., SHIKHA., SINGH, N., TEWARI, S.K., SINGH, B. Effects of combined application of vermicompost and mineral fertilizer on the growth of *Allium cepa* L. and soil fertility. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* v.175, p.101-107, 2012.
- STRIZHOV, N.; ABRAHAM, E.; OKRESZ, L.; BLICKLING, S.; ZILBERSTEIN, A.; SCHELL, J.; KONCZ, C.; SZABADOS, L. Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, v.12, p.557-569, 1997.
- SUGA, S., IMAGAWA, S., MAESHIMA, M. Specificity of the accumulation of RNA and proteins of the plasma membrane and tonoplast aquaporins in radish organs. *Planta*, v.212, p.294-304, 2001.
- SUJATHA, S., BHAT, R. Impacts of Vermicompost and Nitrogen, Phosphorus, and Potassium Application on Soil Fertility Status in Arecanut Grown on a Laterite Soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* v.43, p.2400-2412, 2012.
- SUZUKI, N.; KOUSSEVITZKY, S.; MITTLER, R.; MILLER, G. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell and Environment*, v.35, p.259-270, 2012.
- SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, v.15, p.89-97, 2009.
- TAÍZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*. Third Edition, Copyrights by Sinauer Associates, Inc. 2005.
- TAKEDA, S., GAPPER, C., KAYA, H., BELL, E., KUCHITSU, K., DOLAN, L. Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science* v.319, p.1241-1244, 2008.

- TEJADA, M., GARCÍA-MARTÍNEZ, A.M., PARRADO, J. Effects of a vermicompost composted with beet vinasse on soil properties, soil losses and soil restoration. *Catena* v.77, p.238-247, 2009.
- TERKHI, M.C.; TALEB, F.; GOSSART, P.; SEMMOUD, A.; ADDOU, A. Fourier transform infrared study of mercury interaction with carboxyl groups in humic acids. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v.198, p.205–214, 2008.
- TOGNETTI, V.B., MÜHLENBOCK, P., VAN BREUSEGEM, F. Stress homeostasis the redox and auxin perspective. *Plant Cell Environment* v.35, p.321-333, 2012.
- TREVISAN, S., BOTTON, A., VACCARO, S., VEZZARO, A., QUAGGIOTTI, S., NARDI, S. Humic substances affect Arabidopsis physiology by altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development. *Environment Experimental Botany*, v.74, p.45-55, 2011.
- TSUKAGOSHI, H., BUSCH, W., BENFEY, P.N. Transcriptional Regulation of ROS Controls Transition from Proliferation to Differentiation in the Root. *Cell* v.143, p.606-616, 2010.
- TUNALI, S., AKAR, T. Zn(II) biosorption properties of *Botrytis cinerea* biomass. *Journal of Hazardous Material* v.131, p.137-145, 2006.
- TYERMAN, S.D., NIEMIETZ, C.M., BRAMLEY, H. Plant aquaporins: Multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environmental*, v.25, p.173–194, 2002.
- UEHLEIN, N., FILESCHI, K., ECKERT, M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant aquaporin. *Phytochemistry*, v.68, p.122–129, 2007.
- URDANETA, C., PARRA, L.M.M., MATUTE, S., GARABOTO, M.A., BARROS, H., VÁZQUEZ, C. Evaluation of vermicompost as bioadsorbent substrate of Pb, Ni, V and Cr for waste waters remediation using Total Reflection X-ray Fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B* v.63, p.1455-1460, 2008.
- VALDEZ-PÉREZ, M.A., FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F., FRANCO-HERNANDEZ, O., COTERA, L.B.F., DENDOOVEN, L. Cultivation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in limed or unlimed wastewater sludge, vermicompost or inorganic amended soil. *Scientia Horticulturae* v.128, p.380-387, 2011.
- VASCONCELOS, F.; ZHANG, X.; ERVIN, E.H.; KIEHL, C.J. Enzymatic antioxidant responses bioestimulants maize and soybean subjected to drought. *Science Agriculture (Piracicaba, Braz.)*, v.66, p.395-402, 2009.
- VAUGHAM, D., LINEHAN, D.J. The growth of wheat plants in humic acid solutions under axenic conditions. *Plant Soil* v.44, p.445-9, 1976.
- VAUGHAN, D., ORD, B.G. Uptake and Incorporation of ¹⁴C-labelled Soil Organic Matter by Roots of *Pisum sativum* L. *Journal Experimental Botany* v.32, p.679-687, 1981.
- VAUGHAN, D.; ORD, B.G. An in vitro effect of soil organic matter fractions and synthetic humic acids on the generation of superoxide radicals. *Plant Soil*, v.66, p.113-116, 1982.
- VELIZ, L., MARTÍNEZ, J.D., ARAUJO, M.L., BRITO, F., LUBES, G., RODRIGUEZ, M., LUBES, V. Estudio de la hidrólisis del ion Niquel(II) y de la

formación de los complejos de Niquel (II) con los ácidos Picolínico y Dipicolínico en NaCl 1,0 mol.dm⁻³ a 25°C . *Avances en Química* v.6, p.3-8, 2011.

VINKLER, P., LAKATOS, B., MEISEL, J. Infrared spectroscopic investigations of humic substances and their metal complexes. *Geoderma* v.15, p.231-242, 1976.

WANG, S., TERDKIATBURANA, T., TADÉ, M.O. Adsorption of Cu(II), Pb(II) and humic acid on natural zeolite tuff in single and binary systems. *Separation and Purification Technology* v.62, p.64-70, 2008.

WEI, YU-LING., LEE, YA-CHUN., YANG, YAW-WEN., LEE, JYH-FU. Molecular study of concentrated copper pollutant with a compost. *Chemosphere* v.57, p.1201-1205, 2004.

WU, P., ZHANG, Q., DAI, Y., ZHU, N., DANG, Z., LI, P., WU, J., WANG, X. Adsorption of Cu(II), Cd(II) and Cr(III) ions from aqueous solutions on humic acid modified Ca-montmorillonite. *Geoderma* v.164, p.215-219 2011.

XIAOLI, C.; SHIMAOKA, T.; XIAOYAN, C.; QIANG, G.; YOUCAI, Z. Characterization of humic and fulvic acids extracted from landfill by elemental composition, ¹³C CP/MAS NMR and TMAH-Py-GC/MS. *Waste Management*, v.28, p.896–903, 2008.

XIAOLI, C.; SHIMAOKA, T.; XIAOYAN, C.; QIANG, G.; YOUCAI, Z. Spectroscopic studies of the progress of humification processes in humic substances extracted from refuse in a landfill. *Chemosphere*, v.69, p.1446-1453, 2007.

YANG, C., WANG, M., LU, Y., CHANG, I., CHOU, C. Humic Substances Affect the Activity of Chlorophyllase. *Journal of Chemical Ecology* v.8, p.1561-1573, 2004.

ZALLER, J.G. Vermicompost as a substitute for peat in potting media: Effects on germination, biomass allocation, yields and fruit quality of three tomato varieties. *Scientia Horticulturae* v.112, p.191-199, 2007.

ZANDONADI, D.B., SANTOS, M.P., DOBBSS, L.B., OLIVARES, F.L, CANELLAS, L.P., BINZEL, M.L., OKOROKOVA-FAÇANHA, A.L., FAÇANHA, A.R. Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. *Planta*, v.231, p.1025-1036, 2010.

ZEPEDA-JAZO, I., VELARDE-BUENDÍA, A.M., ENRÍQUEZ-FIGUEROA, R., BOSE, JAYAKUMAR., SHABALA, S., MUÑIZ-MURGUÍA, J., POTTOSIN, I.I. Polyamines Interact with Hydroxyl Radicals in Activating Ca²⁺ and K⁺ Transport across the Root Epidermal Plasma Membranes. *Plant Physiology* v.157, p.2167–2180, 2011.

ZU-YI, TAO., JIN, ZHANG., JIAN-JUN, ZHAI. Characterization and differentiation of humic acids and fulvic acids in soils from various regions of China by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* v.395, p.199-203, 1999.