

PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO RADICULAR POR FRAÇÕES
MOLECULARES DE ÁCIDO HÚMICO ISOLADO DE
VERMICOMPOSTO

DEBORA JESUS DANTAS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO - 2010

PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO RADICULAR POR FRAÇÕES
MOLECULARES DE ÁCIDO HÚMICO ISOLADO DE
VERMICOMPOSTO

DEBORA JESUS DANTAS

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO - 2010

PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO RADICULAR POR FRAÇÕES
MOLECULARES DE ÁCIDO HÚMICO ISOLADO DE
VERMICOMPOSTO

DEBORA JESUS DANTAS

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2010.

Comissão Examinadora:

Jader Galba Busato (D.Sc. em Produção Vegetal)-UENF

Marihus Altoé Baldotto (D.Sc. em Produção Vegetal)-UFV

Sílvia Aparecida Martim (D.Sc. em Produção Vegetal)-UENF

Luciano Pasqualoto Canellas (Ph.D. em Ciência do Solo)-UENF
(Orientador)

Aos meus pais Oscar Pereira Dantas e Josefa Ferreira de Jesus;
Ao meu irmão Django Jesus Dantas;

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo;

A UENF, pela concessão da bolsa;

Ao pesquisador Lázaro Eustáquio Pereira Peres, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", por disponibilizar as sementes dos tomateiros mutantes micro-tom e *dgt* para realização dos experimentos;

Aos meus amigos Juliana Guimarães e Leandro Hespanhol, pela força que me deram;

À minha amiga de todas as horas Erika Monteiro, pela amizade e apoio nas horas difíceis;

À minha amiga Dariellys Martinez, pela ajuda, pela amizade e paciência;

Ao meu amado Bruno, pelo amor, dedicação e compreensão, apoio e companheirismo;

Ao meu irmão Django e meu primo Elvis, pelo carinho e aos meus pais, Oscar e Josefa, pelos conselhos e incentivo;

Ao Prof. Luciano Pasqualoto Canellas, pelos ensinamentos e orientações;

Aos amigos Max Lacerda e Silvia Martim;

Aos amigos do laboratório: Jader, Gonzaga e Livinha e, em especial, ao Leonardo Dobbss pela ajuda e conselhos.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Transformação da matéria orgânica	3
2.2. Origem e Formação das Substâncias Húmicas.....	5
2.3. Teoria supramolecular para substâncias húmicas	6
2.4. O conceito de humificação a luz da teoria supramolecular.....	8
2.5. Fracionamento molecular usado como ferramenta para caracterização química das substâncias húmicas	9
2.6. Efeitos fisiológicos de substâncias húmicas	10
2.7. A auxina e seu mutante de tomateiro insensível.....	11
3. HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1. Extração das substâncias húmicas de vermicomposto.....	14
4.2. Obtenção de sub-frações de AH de vermicomposto por fracionamento químico sequencial	15

4.2.1. Moléculas não ligadas estruturalmente à matriz húmica removidas por solvente orgânico.	16
4.2.2. Moléculas ligadas fracamente à matriz húmica por meio de ligações éster removidas por transesterificação com borotrifluor metanol (BF ₃ – MeOH).....	16
4.2.3. Moléculas ligadas fortemente à matriz húmica por meio de ligações éster removidas por hidrólise alcalina em metanol.....	16
4.2.4. Moléculas ligadas fortemente à matriz húmica por meio de ligações éster removidas por hidrólise com ácido iodídrico.....	17
4.3. Caracterização química dos produtos das reações	17
4.3.1. Composição Elementar (C, H, N) e teor de cinzas	17
4.3.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier e Reflectância Difusa (DRIFT).....	18
4.3.3. Espectroscopia RMN ¹³ C no estado sólido.....	18
4.4. Ensaio de concentração do AHV e seus resíduos sólidos.....	19
4.4.1. Crescimento das plântulas de micro-tomateiros.....	19
4.4.2. Delineamento experimental e análise estatística.....	20
5. RESULTADOS.....	21
5.1. Caracterização química do AHV e das frações moleculares	21
5.1.1. Caracterização elementar.....	21
5.1.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier e Reflectância Difusa (DRIFT).....	22
5.1.3. RMN ¹³ C - CP/MAS.....	25
5.2. Efeito do ácido húmico e suas diferentes frações moleculares sobre o desenvolvimento das raízes em genótipos (MT e dgt) de tomateiro.....	27
6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÕES.....	35
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

RESUMO

DANTAS, DEBORA J. - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2010. PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO RADICULAR POR FRAÇÕES MOLECULARES DE ÁCIDO HÚMICO ISOLADO DE VERMICOMPOSTO. Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas.

Este trabalho teve a proposta de estudar a relação entre a estrutura química das substâncias húmicas e seu efeito sobre a promoção do crescimento radicular vegetal, tendo como ponto de partida o envolvimento dessas substâncias sobre o metabolismo das plantas. Parte-se do pressuposto que uma provável ação regulatória das substâncias húmicas sobre o metabolismo celular não é dependente da sua massa molecular, mas sim da presença de sinais químicos capazes de modular a sinalização celular. Para este estudo foi utilizado ácido húmico isolado de vermicomposto, o qual foi submetido a um fracionamento químico sequencial com remoção progressiva de moléculas leve, fraca e fortemente associadas à matriz húmica. Após este procedimento, foram obtidos quatro resíduos: (R1) resíduo obtido após a extração de lipídios livres; (R2) resíduo obtido após a transesterificação com borotri-fluor metanol ($\text{BF}_3 \cdot \text{MeOH}$);

(R3) resíduo obtido após hidrólise alcalina com solução 1M de hidróxido de potássio metanol (KOH:MeOH) e (R4) resíduo obtido após hidrólise com ácido iodídrico (HI) 47%. As frações e o ácido húmico intacto foram caracterizados por meio da análise de composição elementar e das espectroscopias de RMN ^{13}C no estado sólido (CP/MAS) e Infravermelho com Transformada de Fourier e Reflectância Difusa (DRIFT). Para os testes biológicos, concentrações distintas dos materiais húmicos (expressas em mM de C) foram utilizadas para estimular o crescimento radicular de plântulas de micro-tomateiros (micro-tom) com e sem introgressão do gene diageotrópico (*dgt*), que é modelo ideal para a comprovação de atividade auxínica. Os espectros de RMN ^{13}C e DRIFT mostraram que os componentes moleculares puderam ser separados da matriz húmica por meio de sua afinidade com o solvente e devido às hidrólises realizadas. Os resíduos R1 e R2, assim como o AHV, promoveram a emissão de raízes laterais e diminuição do eixo radicular em plântulas de tomateiro micro-tom, uma resposta típica da ação auxínica, que foi confirmada com a não indução da emergência de raízes laterais em plântulas de micro-tomateiro *dgt*. As frações R3 e R4 não estimularam a emergência de raízes laterais, sugerindo que a influência fisiológica no crescimento e arquitetura radicular pode estar associada à presença de moléculas bioativas encapsuladas nos domínios hidrofóbicos da supra-estrutura húmica que, com o fracionamento sequencial, foram expostas e conseqüentemente perderam sua atividade.

Palavras-chave: matéria orgânica, substâncias húmicas, efeitos fisiológicos, RMN ^{13}C -CP/MAS, DRIFT, HB/HI.

ABSTRACT

This work was the proposal to study the relationship between the chemical structure of humic substances and their effect on the promotion of plant root growth, taking as its starting point the involvement of these substances on plant metabolism. It starts from the assumption that a possible regulatory action of humic substances on the cellular metabolism is not dependent on their molecular weight, but the presence of chemical signals that modulate cell signaling. For this study we used humic acid isolated from vermicompost, which was subjected to a progressive removal of light molecules, weakly and strongly associated with humic matrix. After this procedure, we obtained four residues (R1) residue obtained after extraction of free lipids, (R2) residue obtained after transesterification with methanol borotrifluor ($\text{BF}_3 \cdot \text{MeOH}$), (R3) residue obtained after alkaline hydrolysis with 1 M of potassium hydroxide methanol (KOH: MeOH) and (R4) residue obtained after hydrolysis with hydroiodic acid (HI) 47%. The intact acid humic and fractions were characterized by analyzing the elemental composition and ^{13}C NMR spectroscopy in the solid state (CP / MAS) and Infrared Fourier Transform and Diffuse Reflectance (DRIFT). For biological tests, different concentrations of humic materials (expressed as mM C) were used to stimulate root growth of seedlings of tomato (micro-tom) with and without diageotrope introgression of gene (*dgt*), which

is ideal model for evidence of auxin activity. The ^{13}C NMR spectra and DRIFT showed that the molecular components could be separated from the humic matrix through its affinity with the solvent and carried out due to hydrolysis. The residues R1 and R2, as well as the AHV, promoted the issue of lateral roots and reduced root axis of seedlings of tomato micro-tom, a typical response of auxin action, which was confirmed not to induce the emergence of lateral roots in seedlings micro-tomato dgt. The fractions R3 and R4 did not encourage the emergence of lateral roots, suggesting that the physiological influence on growth and root architecture may be associated with the presence of bioactive molecules encapsulated in the hydrophobic domains of humic superstructure, that with the sequential fractionation, were exposed and therefore lost its activity.

Key-words: organic matter, humic substances, physiological effects, ^{13}C -CP/MAS NMR, DRIFT, HB / HI.

1. INTRODUÇÃO

Substâncias húmicas (SH) são formadas pela transformação de biomoléculas, durante o processo de decomposição de resíduos vegetais, animais e de micro-organismos presentes no ambiente (Stevenson, 1994). A visão tradicional sugere que as SH sejam produzidas pela polimerização dos resíduos de origem vegetal transformados formando produtos macromoleculares de elevada massa molecular química e biologicamente recalcitrantes. Entretanto, de acordo com a conformação em solução, as SH foram consideradas como uma mistura de compostos heterogêneos, de massa molecular relativamente baixa, formando agregados estabilizados principalmente por interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (Piccolo, 2001).

As SH apresentam efeitos significativos sobre o desenvolvimento e metabolismo de várias espécies de plantas (Nardi et al., 2002; Canellas et al., 2002; Zandonadi et al., 2007, Dobbss, et al., 2007; Canellas et al., 2010). A presença de componentes orgânicos com atividade do tipo hormonal, tal como a capacidade de induzir a atividade das bombas de prótons da membrana plasmática, são indicadores da bioatividade dos ácidos húmicos (AH) (Façanha et al., 2002).

O desenvolvimento de bioestimulantes à base de SH requer o conhecimento da natureza química da matéria orgânica humificada. A eficiência da estimulação biológica depende da natureza química das SH, um dos aspectos mais estudados, porém, mais controversos da química do solo. A dificuldade de aplicar conceitos clássicos da química, tais como, fórmula empírica, molecular ou estrutural, configuração e conformação molecular para as SH é uma barreira para o entendimento da natureza química desse material complexo. Os métodos clássicos de análise (e.g. determinação da composição elementar e comportamento espectroscópico) providenciaram avanços notórios, mas foram incapazes de precisar uma fórmula empírica capaz de prever seu comportamento. Outra lógica seguida para o estudo da estrutura foi a da produção de derivados químicos por diferentes reações (e.g. hidrólise ácida/básica, oxidação/redução e degradação térmica) que, ainda assim, levaram a resultados contraditórios, tais como a presença de elevada aromaticidade, existência de suposto coração estrutural não decomposto pelas reações. A estrutura macromolecular e a natureza polimérica altamente dispersa das SH foi criticada, especialmente por Piccolo et al. 1996, que as definiram como uma coleção de diversos componentes de massa molecular relativamente pequena, que formam uma associação dinâmica estabilizada por ligações hidrofóbicas fracas, conferindo um comportamento supramolecular e massa elevada só aparentemente. A possibilidade de rompimento do agregado húmico, obtendo constituintes de escala nanométrica, se constitui em um ramo ainda pouco explorado no campo da avaliação química estrutural e atividade fisiológica vegetal das SH.

Parte-se do pressuposto que uma provável ação regulatória das SH sobre o metabolismo celular não é dependente da sua massa molecular, mas sim da presença de classes de compostos capazes de modular a sinalização celular. Portanto, a separação dos constituintes moleculares de AH tem grande importância para entendimento do seu papel no ambiente, especialmente sobre o efeito fisiológico nas plantas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Transformação da matéria orgânica

A matéria orgânica existente em solos, turfas, sedimentos e águas naturais apresenta-se como um sistema complexo de substâncias de natureza diversa, cuja transformação contínua, por agentes químicos, físicos e biológicos resulta em um material que mesmo após centenas de anos de estudos, provoca discordância quanto às suas características.

O ataque inicial aos materiais orgânicos é promovido por formigas, cupins, oligoquetas e outros representantes da mesofauna. Em seguida, ocorrem transformações promovidas por diversos micro-organismos. A fase inicial da biodegradação microbiana é caracterizada pela perda rápida dos compostos orgânicos menos recalcitrantes, como açúcares, aminoácidos, proteínas, amido e celulose, onde as bactérias são especialmente ativas. Na fase subsequente, produtos orgânicos intermediários e protoplasma microbiano recentemente formado são biodegradados por uma variedade maior de micro-organismos, com produção de nova biomassa e liberação de gás carbônico. O estágio final é caracterizado pela decomposição gradual de compostos mais resistentes, exercida pela atividade de actinomicetos e fungos (Stevenson, 1994).

O material originado de todas essas transformações pode ser dividido em dois grandes grupos. O primeiro, denominado genericamente de substâncias não húmicas, é constituído por proteínas, aminoácidos, polissacarídeos, ácidos graxos e outros compostos orgânicos de características físicas e químicas bem definidas.

O segundo, denominado substâncias húmicas, embora estudado já a bastante tempo, apresenta resultados tão diversos que impedem, até hoje, o desenvolvimento de uma conformação estrutural aceita de maneira universal pelos pesquisadores.

As SH desempenham um papel importante no meio ambiente por diversas razões. Nos solos e sedimentos, por exemplo, elas contribuem para a retenção de calor (devido à sua coloração escura), estimulando dessa maneira a germinação de sementes e o desenvolvimento de raízes. Além disso, as SH favorecem a aeração do solo, devido aos agregados oriundos da combinação das SH com argilas, e atuam contra a erosão, pois evitam o escoamento devido à sua alta capacidade de retenção de água.

As SH podem ser divididas, conforme sua afinidade pela água, em: hidrofílicas, constituídas principalmente por carboidratos neutros ou ácidos de origem microbiana e derivados de plantas; e hidrofóbicas, formadas por cadeias alifáticas longas e compostos aromáticos ricos em polifenóis oriundos principalmente da oxidação da lignina e da celulose (Kaiser e Zech, 2000). Pela ligação argila-metal-substância húmica, a porção hidrofóbica da matéria orgânica orienta-se na direção do interior dos agregados, enquanto a porção hidrofílica direciona-se para a face externa, formando, assim, uma camada repelente à água. Essa camada, por sua vez, reduz a possibilidade de desestruturação do solo pela expulsão rápida do ar (Jonge et al., 1999; Piccolo e Mbagwu, 1999).

A presença de grupos funcionais distintos, tais como carboxilas, hidroxilas fenólicas e carbonilas, faz com que as SH assumam um comportamento polieletrólítico e atuem como agentes complexantes de vários íons metálicos (Rocha e Rosa, 2003), além de adsorverem diversos poluentes orgânicos, como pesticidas (Messias, 1998), diminuindo a toxidez desses materiais no ambiente.

2.2. Origem e Formação das Substâncias Húmicas

Existem pelo menos quatro vias principais (Figura 1) pelas quais as SH podem ser formadas durante a decomposição da matéria orgânica (Stevenson, 1994).

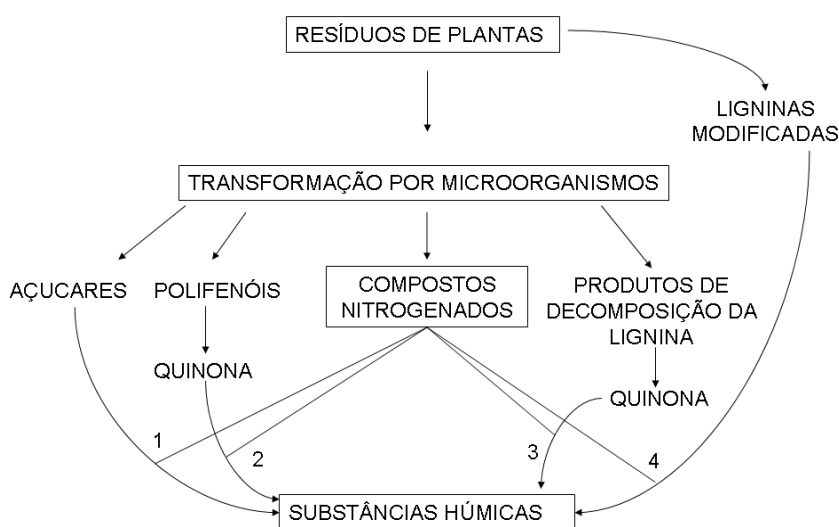


Figura 1. Mecanismos de formação das substâncias húmicas (adaptado de Stevenson, 1994).

A teoria de formação de SH a partir de açúcares (teoria da condensação amino-açúcar (Figura 1 - via 1) foi postulada por Maillard, em 1916, que considerou as SH como produtos da reação exclusivamente química entre açúcares redutores e aminoácidos (estes sim originados da atividade microbiana). Esse autor inclusive sintetizava compostos de coloração escura "semelhantes às substâncias húmicas". Surge então o conceito de humificação que considera a formação das SH decomposição microbiológica da matéria orgânica. Em 1921, Fischer e Schrader postularam uma nova teoria que preconizava que as SH seriam essencialmente ligninas parcialmente modificadas (Figura 1 - via 4). A lignina é um biopolímero de estrutura complexa, formado pela combinação de unidades fenilpropanóides (álcoois coniferílico, cumárico e sinapílico) com outras

subunidades, tais como éter guaiacilglicerol- β -coniferílico, álcool diidroconiferílico, pinorresinol e dibenzodioxocina (Giovanela, 2003).

De acordo com Stevenson (1994), as vias 2 e 3 da Figura 1 formam as bases da chamada teoria dos polifenóis. Essas duas vias são muito semelhantes, diferindo apenas na fonte de polifenóis. Na via 2, os polifenóis originam-se de fontes de carbono não lignínicas ou são sintetizados por microrganismos específicos. Na via 3, a fonte de polifenóis é a lignina. Os aldeídos e ácidos fenólicos, originados a partir da degradação parcial do biopolímero, podem sofrer recombinações entre si ou com outras moléculas orgânicas convertendo-se em quinonas. Essas quinonas poderiam sofrer reações de condensação com a amônia e outros compostos nitrogenados, como aminoácidos e proteínas, originando dessa forma as SH.

2.3. Teoria supramolecular para substâncias húmicas

São classificadas como supramoléculas aquelas espécies nas quais as propriedades eletrônicas das subunidades são perturbadas apenas devido à formação das ligações entre elas. A química supramolecular usa uma abordagem centrada na associação de moléculas, visando à obtenção de uma determinada propriedade ou funcionalidade (Araki e Toma, 2002). A formação de estruturas supramoleculares é um processo espontâneo e não ocorre em etapas, envolvendo o processo conhecido como “reconhecimento molecular”. Automontagem ou “self-assembly” é o principal processo espontâneo que confere ordem aos materiais moleculares. O processo de automontagem molecular envolve interações não covalentes e a construção de supramoléculas é controlada termodinamicamente, levando a estruturas finitas (tais como dímeros unidos por ligações de hidrogênio) ou as supramoléculas extendidas (cadeias lineares, planos bidimensionais ou redes tridimensionais) (Moore, 1996).

Segundo Piccolo (2001), as SH seriam moléculas pequenas e heterogêneas, de várias origens e auto-organizadas em conformações supramoleculares. As superestruturas húmicas não estariam associadas por ligações covalentes, mas, sim, seriam estabilizadas por forças fracas, tais como interações hidrofóbicas (van der Waals, π - π , e ligações CH- π) e ligações de hidrogênio, estas últimas sendo progressivamente mais importantes em valores

decrecentes de pH. Nas organizações húmicas supramoleculares, as forças intermoleculares determinariam a estrutura conformacional das SH, enquanto que a complexidade das interações múltiplas não covalentes controlaria sua reatividade ambiental.

Nessa perspectiva, as definições das diferentes frações das SH poderiam ou deveriam ser revistas. Os ácidos fúlvicos (AF), por exemplo, seriam associações de pequenas moléculas hidrófilas, nas quais existe um número suficiente de grupos ácidos para manter os “*clusters*”, por elas formados, dispersos em solução a qualquer valor de pH. Já os ácidos húmicos (AH) seriam constituídos por substâncias principalmente hidrofóbicas, tais como cadeias polimetilênicas, ácidos graxos e esteróides, que são estabilizados em pH neutro por forças dispersivas hidrofóbicas, como por exemplo, van der Waals, π - π , e ligações CH- π . Suas conformações cresceriam gradualmente em tamanho quando ligações de hidrogênio intermoleculares fossem formadas em intensidade crescente em baixos valores de pH, até sua precipitação (Piccolo, 2001).

Diferentemente das estruturas desenvolvidas em laboratório ou em sistemas biológicos, as estruturas húmicas supramoleculares seriam desprovidas de uma funcionalidade programada, embora não isentas de funcionalidade, pois as características químicas que usualmente são associadas aos benefícios agrônômicos das SH nos solos, exaustivamente conhecidos, dependem grandemente da conformação destas estruturas. A associação das SH com a fração inorgânica mineral do solo, especialmente com as argilas, poderia ter um papel fundamental no desenvolvimento desta funcionalidade e as argilas poderiam funcionar como verdadeiras matrizes de organização molecular.

Pode-se dizer, ainda quanto aos aspectos da gênese das SH, que seria de se esperar que diversos processos e mecanismos estariam envolvidos, podendo prevalecer um ou outro conforme o ambiente estudado, o tipo de solo, sua estrutura e profundidade, tipo de material orgânico e inorgânico envolvido, tipo de ambiente aquático (água doce ou marinha) e alterações antropogênicas.

Existem, na literatura, várias evidências químicas e espectroscópicas das associações supramoleculares de SH (Piccolo, 2001). Investigações por técnicas de supressão de intensidade de fluorescência (*quenching*) forneceram evidências de microdomínios hidrofóbicos em associações húmicas (Morra et al., 1990; Engbretson e von Wandruszka, 1994). Estes resultados confirmaram o conceito

de que as macromoléculas húmicas consistem de associações de estruturas menores com características químicas semelhantes.

2.4. O conceito de humificação a luz da teoria supramolecular

Segundo Piccolo (2002), a humificação pode ser considerada como um processo em dois passos simultâneos: (1) biodegradação de componentes celulares e (2) auto-agregação dos produtos biodegradados.

À luz do modelo supra-molecular não é necessário invocar a formação de novas ligações covalentes como sinônimo de grau de humificação, o processo que leva à produção de húmus. Assim, a humificação é a progressiva auto-associação de biomoléculas que resistem à biodegradação durante os ciclos naturais de umedecimento e secagem no solo (Figura 2).

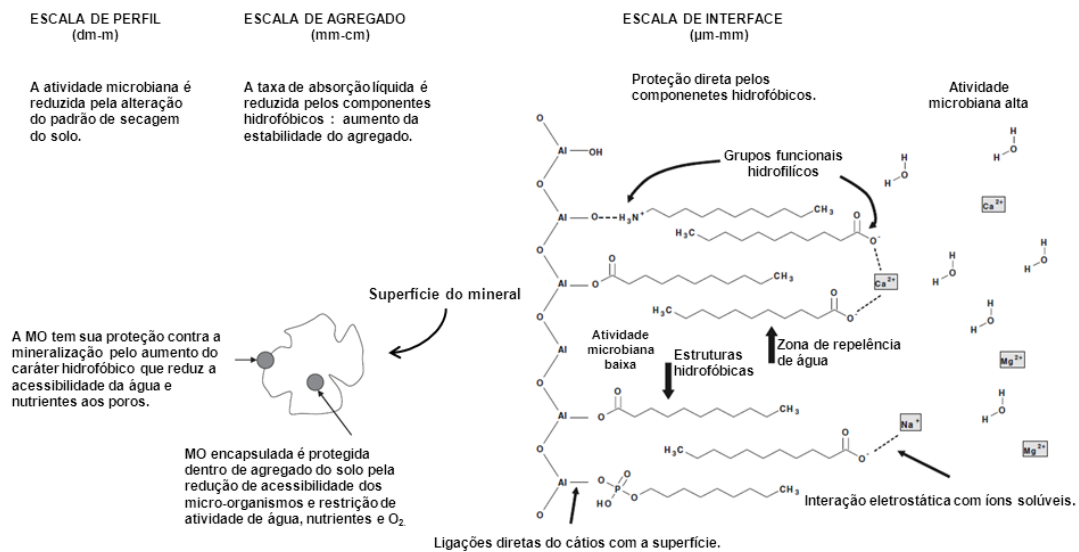


Figura 2. Representação esquemática do papel dos componentes hidrofóbicos na preservação da matéria orgânica. Modificado dos trabalhos de Goebel et al. (2005) e Kleber et al. (2007).

As supra-estruturas são termodinamicamente separadas pelo meio aquoso e adsorvidas a superfície dos minerais e/ou a outros agregados húmicos preexistentes. A exclusão da água no meio diminui as chances de degradação pelos micro-organismos levando a persistência por longo tempo das SH no solo.

A natureza supramolecular das SH pode ser explorada em diferentes modos: (1) Separação em associações húmicas de menor tamanho pela cromatografia preparativa de exclusão por tamanho para se atingir uma maior uniformidade no estudo da sua estrutura molecular; (2) Atingir o melhor entendimento com detalhamento da sua estrutura molecular por meio do fracionamento molecular. Essa última abordagem foi utilizada com sucesso para o estudo na natureza da evolução química dos compostos humificados durante a compostagem (Spaccini e Piccolo, 2007, 2008, 2009).

2.5. Fracionamento molecular usado como ferramenta para caracterização química das substâncias húmicas

Spaccini e Piccolo (2007) desenvolveram um fracionamento químico para isolar seletivamente componentes moleculares de composto e caracterizá-los de acordo com seu grau de interação com a matriz. O fracionamento sequencial implica uma primeira extração de material não ligado ou de componentes livres em um solvente orgânico. Em seguida, os biopoliésteres insolúveis de tecidos vegetais são despolimerizados por uma leve transesterificação metil ácida (Fiorentino et al., 2006), solubilizando, assim, moléculas fracamente ligadas. Em seguida, o produto é tratado com uma solução alcalina metanólica para hidrolisar os componentes mais fortemente ligados à matriz (Naafs et al., 2002). Este procedimento foi bem sucedido em mostrar as alterações moleculares ocorridas durante o processo de maturação do composto (Spaccini et al., 2007).

Spaccini et al. (2008) aplicaram o fracionamento químico sequencial a um composto e em suas frações solúveis, e observaram as diferentes interações intermoleculares que ligam os componentes moleculares entre si. Enquanto uma parte significativa do volume do composto ainda estava presente como resíduo sólido no final do fracionamento sequencial, todas as frações hidrossolúveis foram quase completamente hidrolisadas. Estes resultados indicam que os componentes solúveis em água do composto podem ser facilmente separados da matriz do composto e contribuir para a dinâmica ambiental da matéria orgânica natural. O reconhecimento químico dos componentes moleculares solúveis fraca, moderada e fortemente associados à matriz húmica, constitui a base, de acordo com prof. A. Piccolo, da humeômica: o segmento da ciência destinado a

caracterizar quimicamente as substâncias húmicas sob ponto de vista da associação supramolecular. Nesse contexto, os efeitos fisiológicos reconhecidamente exercidos pelas substâncias húmicas sobre as plantas dizem respeito à presença de moléculas semelhantes aos hormônios, em maior ou menor associação, no arranjo supramolecular.

2.6. Efeitos fisiológicos de substâncias húmicas

O uso de vermicomposto como fonte de substâncias húmicas (SH) apresenta algumas vantagens: pode ser fácil e comercialmente obtido, é uma fonte renovável de matéria orgânica (diferente da maioria das SH comercialmente disponíveis que são obtidas do lignito ou do carvão mineral) e apresenta capacidade de estimular diretamente o crescimento vegetal (Masciandro et al., 1999; Canellas et al., 2002; Façanha et al., 2002; Rodda et al., 2006 a,b).

O composto de minhoca (vermicomposto, húmus de minhoca) condiciona a fertilidade do solo pelo aumento da oferta de nutrientes e da melhoria das propriedades físicas do solo (Landgraf et al., 1999). As minhocas aumentam significativamente a velocidade da decomposição dos resíduos orgânicos (Vincelas-Akpa e Loquet, 1997) e também produzem SH que apresentam elevada atividade biológica (Nardi et al., 1996; Masciandro et al., 1999; Dell’Agnola e Nardi, 1987; Muscolo e Nardi, 1997; Muscolo et al., 1999; Façanha et al., 2002; Canellas et al., 2002; Quaggiotti et al., 2004; Canellas et al., 2006a; Rodda et al., 2006a,b; Zandonadi et al., 2007; Dobbss, et al., 2007; Aguiar, et al., 2009; Canellas, et al., 2010). Essas substâncias têm atividade parecida com a dos hormônios vegetais e aumentam a absorção de nutrientes e o crescimento vegetal (Vaughan e Malcolm, 1985; Chen e Aviad, 1990; Nardi et al., 2002). Além disso, são vários os experimentos com ação fisiológica de SH (Nardi et al., 2002 e Vaughan e Malcolm, 1985), nos quais são usados meios sem a presença de nutrientes. O formato das curvas de dose-resposta típicas de SH (*bell-shape curve*) sugerem uma ação do tipo hormonal.

As auxinas, principal hormônio envolvido no enraizamento, induzem o aumento de H^+ -ATPase de membrana plasmática nas plantas (Frias et al., 1996). As bombas de H^+ membranares acidificam o apoplasto e deixam a parede celular mais maleável, facilitando o alongamento celular (Hager et al., 1991; Frias et al.,

1996). A ativação das bombas de H^+ também promove a nutrição vegetal pela geração do gradiente eletroquímico que dirige o transporte iônico através das membranas celulares via sistemas transportadores secundários.

A presença de moléculas ou unidades bioativas semelhantes às auxinas ligadas ou agregadas às SH foi relacionada com a indução de sítios de mitose nas raízes e ativação das H^+ -ATPases (Canellas et al., 2002). Foi observado anteriormente, por meio de imunoenaios ou detecção por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, a presença de unidades estruturais semelhantes ao ácido indol acético (AIA) em ácidos húmicos (Quaggiotti et al. (2004). Façanha e Canellas (2002) e Canellas et al., (2002) observaram que ácidos húmicos isolados de vermicomposto induzem a proliferação de raízes laterais emergidas em plântulas de milho que, por sua vez, são formadas por células com membranas enriquecidas com H^+ -ATPases (Jahn et al., 1998). Além disso, verificou-se que os AH podem aumentar a expressão das H^+ -ATPases nas membranas e Canellas et al. (2002) justificaram esse fenômeno à luz da teoria do crescimento ácido que postula a acidificação do apoplasto, causado pela ativação das bombas de H^+ como evento essencial para a expansão celular (Rayle e Cleland, 1992). Tem sido relatado que a auxina pode induzir a síntese de H^+ -ATPase (Hager et al., 1991) pelo mecanismo de indução pós-transcricional (de mRNA de H^+ -ATPase) das isoformas (Mha2) expressas em milho (Frias et al., 1996). Quaggiotti et al. (2004) verificaram superexpressão desse gene em plantas tratadas com substâncias húmicas. Além disso, as SH podem estar envolvidas na indução da sinalização celular, uma vez que foi observado uma ativação concertada entre as bombas de H^+ da plasmalema e tonoplasto (Zandonadi et al., 2007).

2.7. A auxina e seu mutante de tomateiro resistente

Em 1946, o ácido indol-3-acético (AIA) foi extraído de grãos de milho imaturos sendo considerada a auxina predominante nas plantas superiores (Válio, 1986). A auxina é fundamental para a emissão de raízes laterais (Blakely et al., 1982), sendo necessário à iniciação e emergência desses órgãos seu transporte basípeto (fluxo de auxina a partir da ponta da raiz para a base da planta) e

acrópeto (fluxo de auxina da base da planta em direção a ponta da raiz) (Rashotte et al., 2000).

A biossíntese da auxina ocorre principalmente em tecidos com intensa divisão celular e crescimento, principalmente na parte aérea da planta (ápices caulinares e folhas jovens) (Taiz e Zeiger, 2002). O AIA é estruturalmente semelhante ao triptofano, seu precursor na maioria das espécies vegetais (Zazimalova e Napier, 2003). Embora as auxinas tenham sido a primeira classe de hormônios vegetais a ser identificada, o mecanismo molecular envolvido na sua ação ainda não está totalmente elucidado (Tomic et al., 1998; Leyser, 2002). Entretanto, sabe-se que a sinalização da auxina começa a partir da percepção deste hormônio por meio da interação com algum tipo de receptor (Leyser, 2002). Evidências sugerem a existência de vários sítios para a percepção da auxina e, nesse sentido, o sinal parece ser transduzido através de diferentes vias de sinalização (Leyser, 2002).

A via de sinalização celular envolvida na ação do tipo auxínica das SH é ainda controversa. Parte desse impasse pode ser atribuída aos problemas relacionados com possíveis alterações dos inibidores sintéticos quando em contato com as soluções de SH. Uma alternativa para o estudo criterioso dos efeitos hormonais de SH é o uso de plantas mutantes.

O mutante *dgt* de tomateiro (*Solanum lycopersicon*) é, praticamente, insensível à auxina. Tem a característica de ser uma planta anã, com crescimento diageotrópico de caules e raízes, sendo essas não ramificadas (Kelly e Bradford, 1986). Essa mutação foi introgridida na cultivar Micro-Tom, passando, assim, a ter porte e ciclo de vida reduzidos, além das características inerentes à mutação (Pino-Nunes, 2005). Portanto, o micro-*dgt* constitui um modelo possível para a comprovação de atividade auxínica ou não. Desse modo, se substâncias que produzem respostas ligadas à auxina em plantas não mutantes (e.g. enraizamento) falharem em induzir a mesma resposta em *dgt*, pode ser uma indicação de que tal substância tem uma ação do tipo auxina.

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

A hipótese de trabalho consiste na possibilidade de estabelecer uma provável relação entre estrutura química e atividade biológica de substâncias húmicas considerando estas como um agregado formado pela reunião de compostos químicos estabilizados por interações fracas.

OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito do resultado do fracionamento molecular sequencial de ácidos húmicos isolados de vermicomposto sobre a promoção do crescimento radicular em plântulas de micro-tomateiros.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o fracionamento molecular por meio de extrações por afinidade química e caracterizar as frações moleculares de AH isolados do vermicomposto.
- Testar o efeito dos resíduos do fracionamento na promoção do crescimento radicular de plântulas de tomate.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Extração das substâncias húmicas de vermicomposto

Os ácidos húmicos (AH) foram obtidos de vermicomposto (AHV) produzido com esterco bovino pela ação de minhocas californianas vermelhas (*Eisenia foetida*).

A extração dos AH foi realizada utilizando como solvente NaOH 0,5 mol L⁻¹, na razão resíduo:solvente de 1:10 (massa:volume) em atmosfera inerte de N₂. A separação do sobrenadante alcalino do material do vermicomposto foi realizada pela centrifugação das amostras a 3500 rpm, durante 10 minutos. O ácido húmico foi separado da fração fúlvica com o abaixamento do pH da solução até 1,0-1,5 utilizando HCl 6 mol L⁻¹. Após essa etapa o extrato ácido de matéria húmica foi imediatamente bombeado para uma coluna de baixa pressão preenchida com a resina XAD-8 com vazão de 15 volumes/hora. A matéria húmica adsorvida foi eluída da resina utilizando-se NaOH 0,1 mol L⁻¹ com vazão de 5 volumes/hora. O humato de sódio foi eluído em uma resina trocadora de cátions (Amberlit – IRA 120 H⁺) saturada com H⁺ para converter o sal orgânico contendo sódio na forma de ácido orgânico livre. A matéria húmica saturada com H⁺ foi dialisada e seca por

liofilização. O procedimento de extração e uso das colunas de resina está detalhadamente descrito no trabalho de Thurman e Malcolm (1981).

4.2. Obtenção de sub-frações de AH de vermicomposto por fracionamento químico sequencial

Esse procedimento remove progressivamente classes de moléculas não ligadas e ligadas fraca e fortemente a matriz húmica. A representação esquemática do fracionamento sequencial de AHV está demonstrada na figura 3.

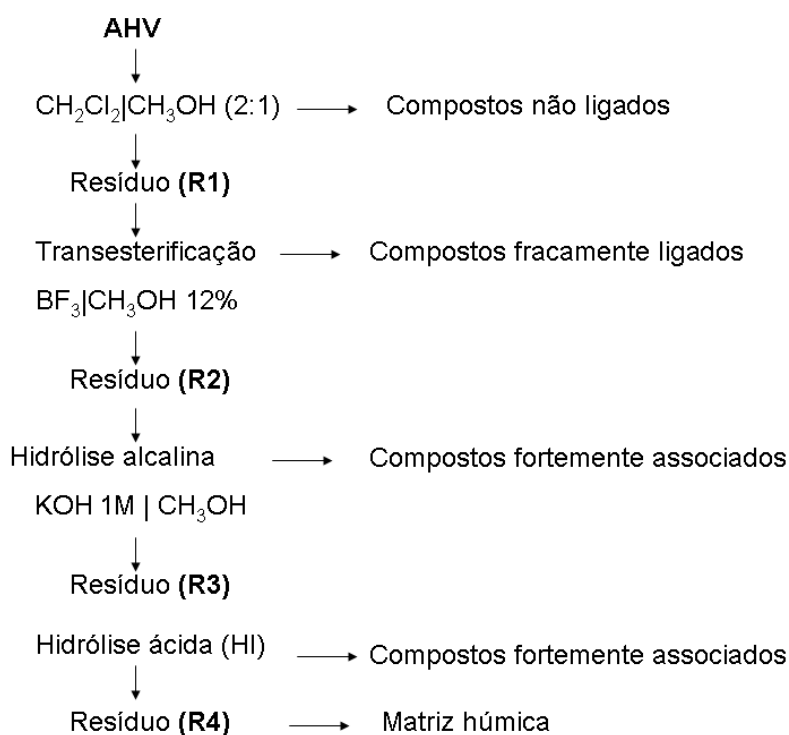


Figura 3. Obtenção de sub-frações de AH por fracionamento sequencial. Adaptado de Fiorentino et al. (2006)

4.2.1. Moléculas não ligadas estruturalmente à matriz húmica removidas por solvente orgânico.

Os componentes foram extraídos de três gramas de AH de vermicomposto (AHV), com 30 mL de uma mistura de diclorometano e metanol (2:1, v / v), por 2 horas à temperatura ambiente. O extrato foi separado do resíduo por centrifugação por 30 minutos a 3500 rpm. Foi repetida a extração no resíduo durante 12 horas à temperatura ambiente.

Parte do resíduo sólido resultante da extração de lipídios livres (R1) foi dialisado (limite de exclusão de 1000 Da) e reservado para teste de bioatividade em plantas de micro-tomateiro e para caracterização química e o restante seguiu para a sequência de extrações.

4.2.2. Moléculas ligadas fracamente à matriz húmica por meio de ligações éster removidas por transesterificação com borotrifluor metanol (BF₃ – MeOH)

Após a extração de lipídios estruturalmente não ligados, o resíduo (R1) seco ao ar foi tratado com 30 mL de borotrifluor metanol (BF₃-CH₃OH) 12% em refluxo, a 90°C, durante 12 horas. Posteriormente foi centrifugado a 3500 rpm por 30 minutos e o resíduo tratado por mais duas vezes com 20 mL BF₃-CH₃OH 12% por 12 horas e depois dialisado (limite de exclusão de 1000 Da).

Parte do resíduo sólido resultante da extração (R2) foi reservado para teste de bioatividade em plantas de micro-tomateiro e caracterização química e parte seguiu para a sequência de extrações.

4.2.3. Moléculas ligadas fortemente à matriz húmica por meio de ligações éster removidas por hidrólise alcalina em metanol

Foi realizado como recomendado por Spaccini e Piccolo (2007), no qual o resíduo transesterificado (R2) foi colocado para reagir por uma hora sob refluxo a 75°C com 20 mL de 1M KOH-CH₃OH sob atmosfera inerte de N₂. O sobrenadante foi recolhido por centrifugação (15 minutos, 3500 rpm) e o resíduo da filtração submetido ao refluxo com 20 mL de metanol por 30 minutos por duas vezes. O

produto residual foi abundantemente lavado com água deionizada, titulado automaticamente até pH 7,0 com KOH 0,1 M e dialisado (limite de exclusão de 1000 Da). Parte do resíduo sólido resultante da extração (R3) foi reservado para teste de bioatividade em plantas de micro-tomateiro e caracterização química e parte seguiu para a sequência de extrações.

4.2.4. Moléculas ligadas fortemente à matriz húmica por meio de ligações éster removidas por hidrólise com ácido iodídrico

O resíduo sólido proveniente da hidrólise alcalina (R3) foi tratado com 20 mL de HI em refluxo *overnight* 45°C. O resíduo foi centrifugado a 3500g por 20 minutos e recolhido o sobrenadante.

O resíduo sólido resultante da extração (R4) foi reservado para teste de bioatividade em plantas de micro-tomateiro e caracterização química.

4.3. Caracterização química dos produtos das reações

Os produtos resultantes do fracionamento molecular, bem como o AHV, foram caracterizados pela análise de composição elementar e pelas espectroscopias de RMN ¹³C no estado sólido e Infravermelho por Refletância Difusa com Transformada de Fourier (DRIFT).

4.3.1. Composição Elementar (C, H, N) e teor de cinzas

As amostras de AH e resíduos sólidos das extrações sequenciais foram encaminhados ao Laboratório de Ciências Ambientais (LCA), no Centro de Ciências Biológicas e analisados por um analisador elementar Perkin Elmer-CHN 2400. Para a determinação de cinzas, as amostras de AHV e resíduos sólidos (50 mg) foram calcinados por aproximadamente 4 horas a 700 °C em forno de mufla.

4.3.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier e Reflectância Difusa (DRIFT)

As amostras de AHV e os resíduos sólidos das extrações sequenciais foram previamente macerados em gral com KBr, na razão 1:100 e transferidos para um porta amostras.

Os espectros foram obtidos por um espectrofotômetro de infravermelho IR Prestige – 21 FTIS da Shimadzu com acessório para reflectância difusa. Cem varreduras foram coletadas em uma resolução de 4 cm^{-1} , na região de $500 - 4000\text{ cm}^{-1}$.

4.3.3. Espectroscopia RMN ^{13}C no estado sólido

A determinação da funcionalidade química do AHV e de suas frações foi realizada com ressonância magnética nuclear do isótopo de carbono de massa 13 no estado sólido com transferência de polarização cruzada e rotação no ângulo mágico (RMN ^{13}C CP/MAS) nas seguintes condições: foi utilizado um equipamento Bruker VANCE™ 300 equipado com *probe* de 4 mm *Wide Bore MAS*, operando na frequência de ressonância de ^{13}C a 75.475 MHz, e rotação na taxa de $5000 \pm 1\text{ Hz}$. As amostras foram colocadas em um porta-amostra (rotor de zircônio) de 4 mm. Cerca de 1510 *data points* foram coletados e tempo de aquisição de 20 ms, *recycle delay* de 3,0 s e 2000 scans. O parâmetro *recycle delay* (RD) foi escolhido depois de avaliação prévia do valor de T_1 (H) (Conte et al., 2007) para obter uma relação $\text{RD} > 5 T_1$ (H). Foi aplicada uma sequência de pulso com o tempo de contato variável (*variable contact time*, VCT) com uma rampa de 1H ramp para minimizar as condições de inhomogeneidade de Hartmann-Hahn em taxas elevadas de rotação (Conte et al., 2004). Um lock médio de spins na frequência de 60 MHz foi aplicado durante a rampa do tempo de transferência da polarização cruzada. Foi utilizado um tempo de contato com intervalo variando de 0,010 a 7 ms. A elaboração dos espectros foi realizada com programa computacional Mestre-C versão 4.9.9.9.

4.4. Ensaio de concentração do AHV e seus resíduos sólidos

Foi obtida uma curva de resposta para número de raízes laterais em plântulas de tomate (*Solanum lycopersicon L.*) de porte micro (MT), utilizando-se as concentrações de 0, 1, 4 e 8 mmol C L⁻¹. A dose de ótima concentração foi obtida no ponto de inflexão máxima pela primeira derivação da curva. Esses valores corresponderam a 4,06 mmol C L⁻¹ para AHV, 2,49 mmol C L⁻¹ para R1 e 3,55 mmol C L⁻¹ para R2. O resíduo sólido R3 obedeceu ao modelo linear e R4 ao modelo quadrático e a dose escolhida para ambos foi de 1 mmol de C L⁻¹, concentrações estas, que mais se aproximaram ao número máximo de raízes laterais na dose zero (controle).

Após o procedimento da análise de regressão, foram estabelecidos os ensaios com finalidade de comparação entre o AHV e seus resíduos sólidos.

4.4.1. Crescimento das plântulas de micro-tomateiros

Sementes de tomate (*Solanum lycopersicon L.*) do mutante *diageotropica* (*dgt*) insensível a AIA de porte micro e seu parente sensível a AIA (MT) foram esterilizadas com solução comercial de NaClO 30% por 15 minutos, sob agitação. Após este tempo, as sementes foram lavadas com água destilada e estéril e semeadas em caixas para germinação (11 x 11 x 4 cm). As caixas foram acondicionadas em câmara BOD com as seguintes condições: 25°C, e 16 h de fotoperíodo.

Após a germinação (5 dias), as plântulas foram tratadas, com 4 mL das soluções: ácido indol acético (AIA, Sigma Aldrich Co.) na concentração de 10⁻⁶ mol L⁻¹, AHV, R1, R2, R3 e R4, com as doses determinadas em ensaio preliminar de concentração (4,06 mmol C L⁻¹ para AHV, 2,49 mmol C L⁻¹ para R1, 3,55 mmol C L⁻¹ para R2 e 1 mmol C L⁻¹ para R3 e R4). No tratamento controle, foram aplicados somente 4 mL de solução de CaCl₂ 2 mmol L⁻¹.

As plântulas cresceram nos tratamentos durante 7 dias, nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo, e, após esse período, foram avaliados o número de raízes laterais emergidas e o comprimento do eixo principal com a finalidade de comparação entre AIA, AHV e seus resíduos.

4.4.2. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com 6 repetições por tratamento. Foi realizada a análise da variância e as médias foram comparadas pelo teste Desvio Mínimo Significativo (DMS), com nível de 5% de significância, pelo programa SISVAR da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização química do AHV e das frações moleculares

5.1.1. Caracterização elementar

A composição elementar e as relações atômicas do AHV e seus derivados são mostrados no Quadro 1. A hidrólise alcalina (R3) proporcionou a maior redução no teor de C em relação ao AHV, seguido de R2 e R1, enquanto em R4 houve um aumento relativo no teor de C, devido à retirada de polissacarídeos compostos ricos em O.

A extração de lipídios livres (R1), como esperado, não alterou o teor de N, que foi menor no derivado húmico obtido pela hidrólise alcalina (R3) e pela transesterificação com $\text{BF}_3 \cdot \text{MeOH}$ (R2). Em relação a R3, da mesma forma que o teor de C, o de N aumentou relativamente após a hidrólise ácida (R4). Apesar das variações de teores de C e N, a relação C/N não variou, exceto no derivado R4 que apresentou um grande aumento quando comparado ao AHV.

O teor de H foi diminuído após hidrólise alcalina (R3), e transesterificação com $\text{BF}_3 \cdot \text{MeOH}$ (R2) respectivamente, enquanto obteve pouca mudança após extração de lipídios livres (R1) e aumento após a hidrólise ácida (R4).

Pode-se observar que o teor de oxigênio em R3 (hidrólise alcalina em metanol) e R2 (BF₃.MeOH) foi superior em relação ao AHV e R1 (extração de lípidos livres), enquanto que em R4 o teor foi diminuído. A composição elementar das SH é uma propriedade relativamente muito estável e usada para sua caracterização e classificação (Stevenson, 1994). As mudanças observadas indicam a efetividade das reações produzidas pelo fracionamento molecular utilizado.

Quadro 1. Composição elementar livre de umidade e cinzas e relações atômicas de ácidos húmicos de vermicomposto e de seus resíduos sólidos.

Amostras	C	H	N	O	C/N	H/C	O/C
	%				Razão atômica		
AHV	28,96	2,68	2,46	65,90	13,72	1,11	1,71
R1	28,31	2,85	2,43	66,40	13,58	1,21	1,76
R2	19,02	1,99	1,75	77,23	12,67	1,26	3,04
R3	12,22	1,65	1,04	85,09	13,70	1,62	5,22
R4	38,00	2,65	1,63	57,72	27,18	0,84	1,14

AHV: ácido húmico de vermicomposto; R1: Resíduo sólido da extração com diclorometano:MeOH; R2: Resíduo sólido da transesterificação com BF₃.MeOH; R3: Resíduo sólido da hidrólise alcalina e R4: Resíduo sólido do tratamento com ácido iodídrico.

5.1.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier e Reflectância Difusa (DRIFT)

De um modo geral, os espectros de AHV apresentam nove bandas de absorção bem definidas e comum a todos os derivados (Figura 4): uma banda de absorção intensa, forte e larga com centro em 3380 cm⁻¹ (variando de 3346 a 3396 cm⁻¹) devido ao estiramento de ligações O-H de vários grupos hidroxilados, mas principalmente, ácidos carboxílicos capazes de fazer ligações hidrogênio que alteram a frequência de estiramento, provocando o alargamento da banda de absorção; uma banda aguda e bem definida de absorção centrada em 2929 cm⁻¹ devida ao estiramento simétrico de ligações C-H, principalmente de grupos

metilas (CH_3); banda de absorção forte e larga com centro em 1716 cm^{-1} (variando entre 1722 cm^{-1} e 1712 cm^{-1}) atribuída genericamente à presença de carbonilas ($\text{C}=\text{O}$) em cetonas e aldeídos; uma banda de absorção intensa e alargada em 1634 cm^{-1} (1625 e 1635 cm^{-1}) atribuída à presença de uma série de estiramentos simétricos de ligações $\text{C}=\text{O}$ de grupos COO^- , banda de Amida II e quinonas; banda de absorção centrada em 1533 cm^{-1} , devido a estiramentos $\text{C}-\text{C}$ de anéis aromáticos (indicador da presença de ligninas) e sistemas $\text{N}=\text{C}$ conjugados; uma banda de absorção em 1447 cm^{-1} atribuída à deformação de ligações $\text{C}-\text{H}$ de grupos metilas e metilenos; uma banda de absorção bem definida centrada em 1249 cm^{-1} atribuída à presença de deformação de $\text{O}-\text{H}$ em grupos carboxílicos e ligações éster ($\text{C}-\text{O}$) e ainda à presença de fenóis; uma banda de absorção centrada em 1126 cm^{-1} e 1035 cm^{-1} devida a estiramentos $\text{C}-\text{O}$ de polissacarídeos nos AH.

O espectro do resíduo sólido após a extração de lipídios livres (R1) apresentou grande similaridade ao do AHV (Figura 5). Enquanto que o resíduo sólido da transesterificação com $\text{BF}_3\cdot\text{MeOH}$ (R2) apresentou uma banda de absorção intensa centrada em $1091,71\text{ cm}^{-1}$, atribuída a estiramentos da ligação $\text{C}-\text{O}$ (éster) e o surgimento da banda 1413 cm^{-1} atribuída à deformação de ligações $\text{C}-\text{H}$ de grupos metilas e metilenos.

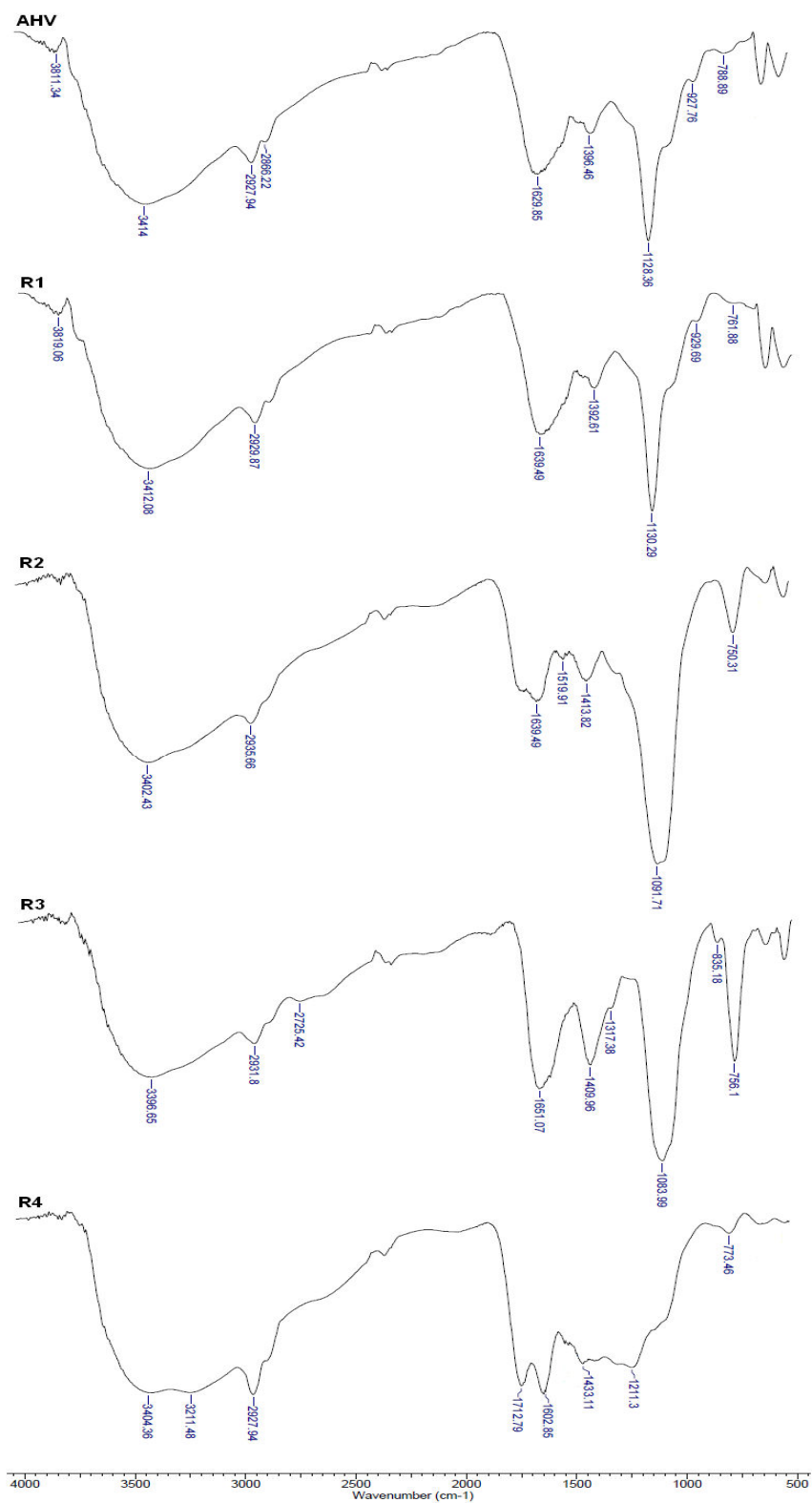


Figura 4. Espectros de infravermelho do ácido húmico de vermicomposto (AHV) e seus resíduos obtidos por extração sequencial: extração de lipídios livres (R1), transesterificação com $\text{BF}_3 \cdot \text{MeOH}$ (R2), hidrólise alcalina (R3) e hidrólise com ácido iodídrico (R4).

A banda de absorção centrada em 3.414 cm^{-1} , atribuída a estiramentos O-H é mais alargada no resíduo sólido proveniente da hidrólise com ácido iodídrico (R4), que apresentou um ombro adicional em $3.211,45\text{ cm}^{-1}$. Essa banda de absorção centrada em 3.400 cm^{-1} foi similar ao AHV nos resíduos R1, R2 e R3. A principal diferença entre o resíduo obtido após a hidrólise com ácido iodídrico (R4) e os resíduos anteriores reside na intensidade das bandas de absorção na região $1130-1091\text{ cm}^{-1}$ devida a estiramentos C-O de polissacarídeos, que desapareceram com o tratamento. Todos os resíduos apresentaram ombro de absorção em 2.927 cm^{-1} atribuído a estiramento C-H de metilas.

5.1.3. RMN ^{13}C - CP/MAS

As espécies de carbono no AHV original e de seus resíduos sólidos produzidos pelo fracionamento são mostradas na Figura 5.

O espectro RMN ^{13}C - CP/MAS do AHV mostra na região de C-álquila ($0-46\text{ ppm}$), a presença de sinais em $23,9\text{ ppm}$ e entre $30,4-32,8\text{ ppm}$ atribuídos a metilas (CH_3) em posição terminal e grupamentos metilênicos (CH_2)_n, respectivamente. Em 56 ppm pode ser observado o principal sinal do espectro e normalmente atribuído a grupos metoxilas (OCH_3) provenientes de polissacarídeos complexos como a lignina. Esse sinal acompanhado do forte e agudo deslocamento químico em $72,4\text{ ppm}$ (atribuído genericamente à presença da ligação C-heteroátomo especialmente C-O e C-N) é característico de material húmico isolado de vermicomposto. As SH isoladas de outras fontes apresentam menor ressonância nessa faixa de campo magnético típico de material quimicamente mais transformado. Corroborando essa observação verifica-se no espectro uma sequência de pequenos sinais entre $103,6$ e $110,7\text{ ppm}$, típicos da presença de carbono anomérico. Como esperado, em função do forte sinal em 56 ppm , foi observado a presença de C-aromático pouco substituído ($123, 129$ e 134 ppm). O alargamento do sinal centrado em $134,05\text{ ppm}$ pode então ser entendido como consequência da sobreposição de ressonâncias de anéis benzeno não substituídos e substituídos. C-aromáticos substituídos (atribuídos à presença de fenóis em substâncias húmicas) foram encontrados em $152,5\text{ ppm}$. Por fim, foi observado um sinal forte, intenso e agudo em 173 ppm típico da presença de C-carboxílico e, portanto, de material fortemente oxidado (Knicker et al. 1995).

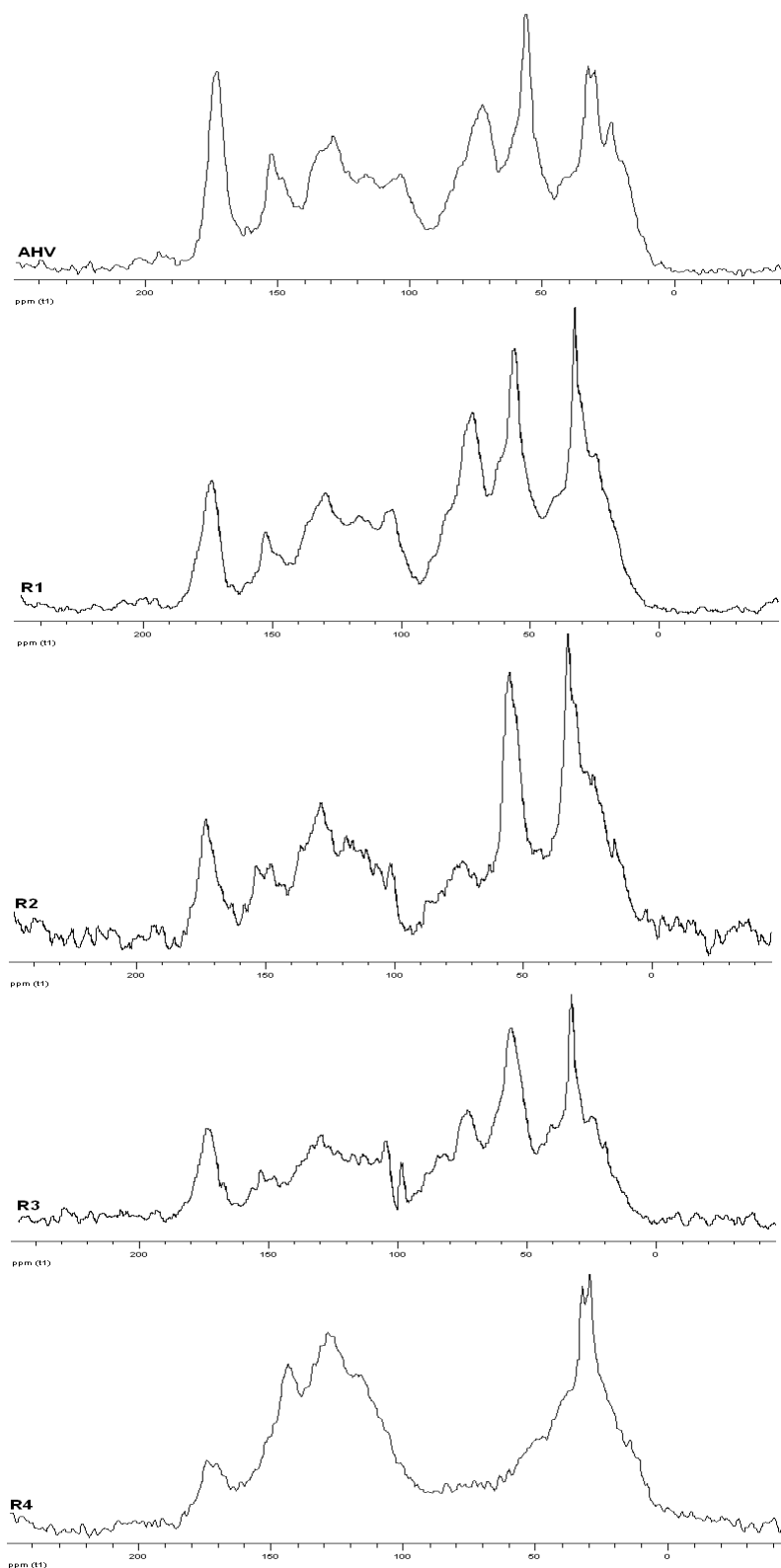


Figura 5. Espectros de RMN ^{13}C do ácido húmico de vermicomposto (AHV) e seus resíduos obtidos por extração sequencial: extração de lipídios livres (R1), transesterificação com $\text{BF}_3\cdot\text{MeOH}$ (R2), hidrólise alcalina (R3) e hidrólise com ácido iodídrico (R4).

Com a remoção dos lipídeos livres fracamente associados à matriz húmica foi perdido a resolução do sinal em 23,4 ppm, atribuído anteriormente a CH₃ em posição terminal (Figura 5). A reação de alquilação seguida da esterificação dos componentes húmicos, como esperado, reduziu a ressonância em 72,4 ppm modificando marcadamente a região de açúcares. A hidrólise alcalina produziu modificações na região de deslocamento químico atribuído aos açúcares (herança da reação precedente), mas principalmente na região atribuída a C-aromáticos substituídos ou não, bem como de grupos COOH. A hidrólise ácida removeu os sinais entre 45-110 ppm.

5.2. Efeito do ácido húmico e suas diferentes frações moleculares sobre o desenvolvimento das raízes em genótipos (MT e *dgt*) de tomateiro

A Figura 6 mostra as curvas de dose-resposta para o número de raízes laterais de plântulas tratadas com os diferentes compostos húmicos obtidos por fracionamento químico sequencial e com auxina sintética. O modelo quadrático ajustou a resposta do AHV e dos derivados R1 e R2 e para os produtos da hidrólise alcalina (R3) e ácida (R4) foi observado o modelo linear e modelo quadrático, respectivamente, neste caso, ambos apresentaram inibição da emissão de raízes laterais em relação ao controle, dessa forma, para essas frações foram escolhidas as concentrações que mais se aproximaram ao número de raízes laterais emitidas na dose zero. Assim, para o ensaio de comparação foi usado a concentração correspondente a 100% do estímulo, obtida pela primeira derivada da regressão quadrática do efeito da concentração de AHV (4,06 mmol C), R1 (2,49 mmol C), R2 (3,55 mmol C) e 1 mmol C para R3 e R4. Os resultados são apresentados na Figura 6.

O sistema radicular do tomateiro micro-tom foi significativamente modificado pela adição de AHV à solução de cultivo. O número de raízes laterais emergidas foi entre 200 a 300 % maior nas plantas tratadas com resíduo sólido da extração de lipídios livres (R1), AIA, resíduo sólido da transesterificação (R2). Para as plantas tratadas com AHV esse aumento foi superior a 300%. Os produtos de ambas as hidrólises (R3 e R4) não diferiram em relação ao controle (Figura 7A). A indução de raízes laterais é resultado típico da influência das SH sobre o crescimento radicular e como esperado foi manifestado nas plântulas de micro-tomateiro (MT). Paralelamente, também foi observado o encurtamento da

raiz principal provocado pela adição dos compostos húmicos. Esse efeito foi significativo para as plântulas tratadas com AIA, AHV e seus resíduos R1, R2, R3, R4. (Figura 7B).

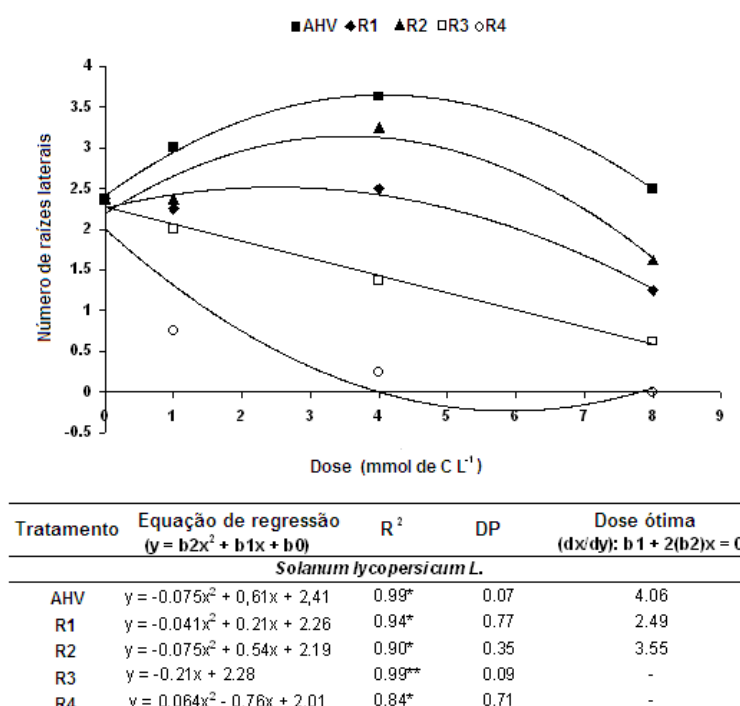


Figura 6. Curvas de dose-resposta para emergência de raízes laterais em plântulas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) após o tratamento com diferentes concentrações de C das soluções de AHV e seus resíduos sólidos obtidos pelo fracionamento sequencial, equação de regressão, R^2 , desvio padrão (DP) e dose ótima (n=32).

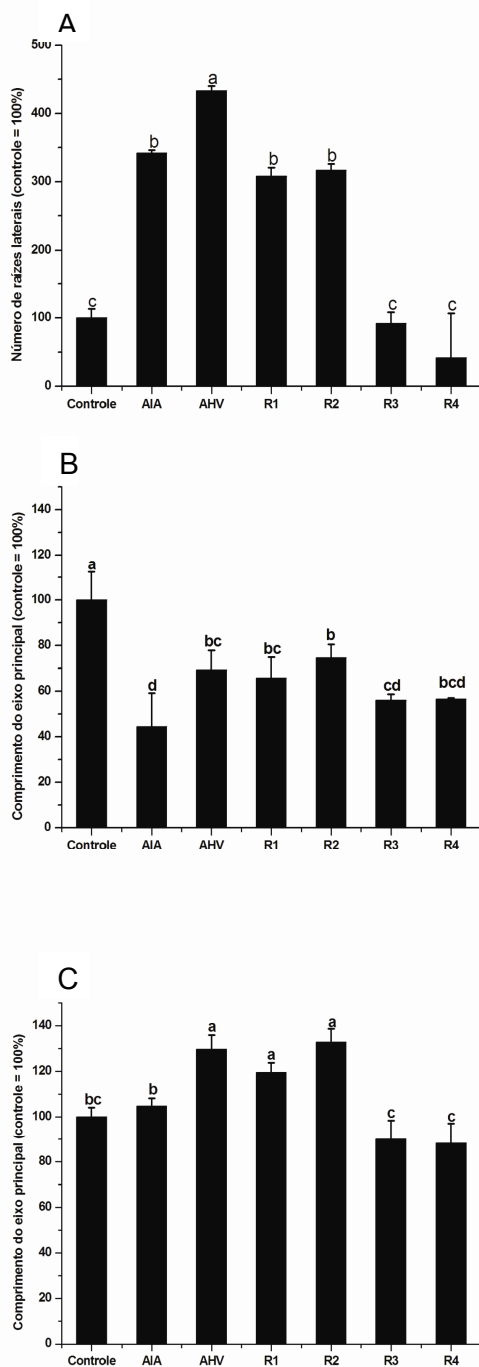


Figura 7. (A) Número de raízes laterais, Comprimento do eixo principal em microplantas de tomateiro micro-tom (B) e *diageotropico* (*dgt*) (C) com gene defeituoso para resposta à auxina. Dados representam à média de seis plantas \pm desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferença significativa pelo teste DMS $P < 0,05$.

Nas raízes das plântulas de micro-tomateiro pouco sensíveis à auxina (*dgt*) tratadas com AHV, AIA e os quatro resíduos não foram observados estímulos na emergência de raízes laterais (Figura 9A). O crescimento da raiz principal não foi fortemente inibido nas plântulas de micro-tomateiro *dgt* tratadas com os diferentes compostos húmicos, bem como com a aplicação de AIA (Figura 7C).

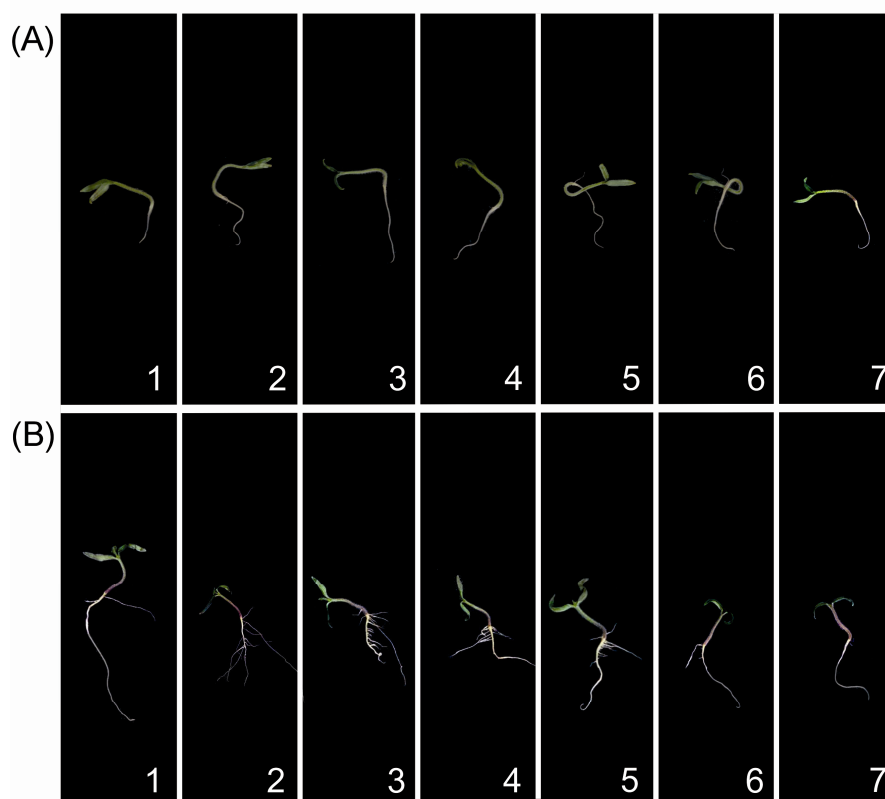


Figura 9. Plântulas de tomateiro *dgt* (A) e *Mt* (B) após 7 dias de tratamento com: 1- CaCl₂ (Controle), 2- AIA, 3- AHV, 4- extração de lipídios livres (R1), 5- transesterificação com BF₃.MeOH (R2), 6- hidrólise alcalina (R3) e 7- hidrólise com ácido iodídrico (R4).

6. DISCUSSÃO

O desenvolvimento da raiz é um requisito fundamental para a capacidade das plantas se adaptarem e sobreviverem a condições adversas e, portanto, a sua localização e o número de raízes laterais são bastante influenciados por fatores externos. O fracionamento sequencial preconizado por Spaccini e Piccolo (2007) modificou os AHV de acordo com a força do reagente utilizado (Figuras 4 e 5, RMN e IV, respectivamente). A extração de lipídeos livres fracamente associados à matriz húmica alterou pouco a feição do espectro de CP/MAS ^{13}C RMN, porém, foi notado a perda de sinais devido a metilas (CH_3) terminais e grupos metilênicos (CH_2)_n. O dublete observado entre 30,4-32,8 ppm nos AHV após a extração com diclorometano-metanol foi transformado em um singlete agudo com centro em 32,4 ppm indicando também a remoção de C- CH_2 . A retirada dessas espécies alquílicas de natureza essencialmente hidrofóbica promoveu um incremento significativo na indução do número de raízes laterais nas plântulas de tomateiro em relação às plantas-controle. Além disso, a concentração ótima foi reduzida em quase 50% (de 4,1 mmol C L⁻¹ para AHV para 2,5 mmol C L⁻¹ para R1, Figura 6). Recentemente Canellas et al. (2008a e 2009) observaram uma correlação significativa entre a hidrofobicidade de diferentes AH isolados da camada superficial de diferentes classes e tipos de solo e seus efeitos

na promoção do crescimento radicular, bem como na indução da síntese das H⁺-ATPases de membrana plasmática. Esses resultados foram justificados tendo em vista o papel da hidrofobicidade na preservação de biofragmentos contra a degradação microbiana (Sutton e Sposito, 2005). A diminuição da atividade enzimática na zona hidrofóbica da matéria humificada mantém compostos lábeis que a partir da ruptura do agregado húmico em solução, podem ficar disponíveis para as plantas e acessar os receptores celulares. Nesse sentido, foi observado previamente que as próprias plantas quando em contato com SH mais hidrofóbicas modificam seu perfil de extrusão de ácidos orgânicos aumentando, por exemplo, a concentração de ácido cítrico na rizosfera (Canellas et al., 2008b). A retirada dos grupamentos fracamente associados à matriz húmica torna, em tese, mais fácil o acesso de estruturas do tipo auxína ao receptores celulares e, portanto, sendo necessário uma menor dose para obtenção do mesmo efeito do que com o AHV. As reações de alquilação seguida de transesterificação também produziram o mesmo efeito sobre a indução da emergência de raízes laterais que o R1, mesmo com modificações significativas ocorridas na região de 72 ppm. A esperada transformação dos açúcares em seus ésteres implica pouco na dinâmica de estruturas do tipo auxinas e os resultados obtidos foram, portanto, muito próximos do tratamento com R1. Entretanto, os produtos das hidrólises (especialmente com a hidrólise ácida) promoveram redução significativa da capacidade de indução da emergência das raízes laterais tal como observado na Figuras 7. A redução da ressonância entre 50-110 ppm em R3 e o completo desaparecimento em R4 resultam na perda da bioatividade dos AH.

Tem sido postulado que algumas SH podem possuir compostos similares ao ácido indol-acético em sua estrutura complexa e a estes compostos foi atribuída a capacidade das SH promoverem o crescimento das raízes (Muscolo et al. 1998, Zandonadi et al., 2007). Baseado em uma série de resultados de técnicas cromatográficas e RMN, as SH puderam ser descritas, em vez de macropolímeros, como uma mistura supramolecular de biomoléculas parcialmente transformadas de massa molecular relativamente baixa mantidas por um conjunto de associações fracas, representadas principalmente pelas interações hidrofóbicas, com tamanho molecular apenas aparentemente grande (Piccolo, 2002). Este conceito de agregação supramolecular de moléculas húmicas heterogêneas relativamente pequenas foi ainda experimentalmente confirmado

(Simpson, 2002; Smejkalova e Piccolo, 2008). Uma consequência deste conceito é que a bioatividade da matéria húmica deve ser relacionada mais à forma de como as moléculas húmicas são mutuamente associadas e ao seu tamanho e força conformacional, do que a diversidades estruturais específicas (Canellas et al., 2008b).

A busca de uma relação entre a estrutura química e a atividade biológica das SH foi inicialmente estudada por Schnitzer e Poasp (1967) e, mais tarde, por Piccolo et al. (1992), que correlacionaram o teor de grupos carboxílicos (principalmente COOH) com o crescimento radicular. Canellas e Façanha, 2004 e Canellas et al. (2006b) mostraram que a matéria orgânica com maior grau de hidrofobicidade (C-aromático + C-alquílico) apresenta maior capacidade de estimular sistemas biológicos. Materiais mais hidrofóbicos, com maior capacidade de agrupar unidades estruturais bioativas podem, em tese, portar propriedade de estimulação biológica. Em outras palavras, SH com maior capacidade de proteger as biomoléculas da degradação microbiológica pode no contato raiz-solução húmica, liberar unidades bioativas capazes de acessar receptores celulares.

De acordo com Piccolo et al., 1999 e 2002, a estrutura complexa das SH podem ser rompidas por pequenas concentrações de ácidos orgânicos exsudados pelas raízes das plantas e alguns microorganismos e com isso, pequenas moléculas tipo-auxina podem ser liberadas e, em seguida, atuar sobre os receptores celulares da membrana plasmática (Canellas et al., 2008b). A arquitetura do sistema radicular é alterada em resposta aos estímulos hormonais e ambientais e a quantidade de raízes laterais é influenciada por uma diversidade muito complexa de sinais externos e internos (Torrey, 1986; López- Bucio et al., 2003; Sorin et al., 2005).

Com este trabalho foi possível verificar que materiais húmicos obtidos por fracionamento sequencial são capazes de afetar sua bioatividade em relação à morfologia radicular em plântulas de micro-tomateiros. Como já demonstrado por Canellas et al. 2010, com as modificações na composição química das supra-estruturas húmicas, é possível variar a sua hidrofobicidade, refletindo na capacidade de interação com as células vegetais. É possível sugerir que a bioatividade das SH sobre plantas é dependente da sua estrutura original para permitir interações com as células das raízes, porém, os domínios hidrofóbicos, ao mesmo tempo, devem possuir uma conformação suficientemente lábil para

liberar, possivelmente pela ação de exsudatos radiculares, moléculas tais como os fitormônios que poderão então exercer o estímulo biológico.

Os resultados apresentados parecem indicar que, a bioatividade atribuída ao AHV está relacionada a substâncias bioativas (fragmentos de biomoléculas) que foram preservadas da degradação dentro do domínio hidrofóbico, uma vez que no momento em que foi feita a hidrólise alcalina (R3), essa proteção parece ter sido dissipada expondo a molécula responsável pela atividade biológica à degradação. Esse comportamento foi confirmado no resíduo tratado com ácido iodídrico (R4) que não promoveu a emissão de raízes laterais em relação ao controle (Figura 7 e 9B). Esse efeito pode ser atribuído a uma ação do tipo hormonal, uma vez que o AHV e seus quatro resíduos não estimularam a emissão de raízes laterais no tomateiro mutante *dgt* (Figura 9A). A insensibilidade do tomate mutante *dgt* ao AIA já foi demonstrada (Kelly e Bradford, 1986; Pinno-Nunes, 2005), indicando que parte da ação dos AH nesse fenômeno está relacionada com o efeito promovido pela auxina.

7. CONCLUSÕES

A idéia de que as SH podem atuar no metabolismo vegetal não é recente. A presença de um sistema radicular ramificado com grande abundância de raízes laterais é fundamental para o crescimento das plantas. Plantas mutantes hormonais são bastante úteis para o estudo das vias de sinalização envolvidas no controle de uma determinada resposta fisiológica. A ação tipo auxínica do AH isolado de vermicomposto, bem como de suas sub-frações obtidas através de fracionamento sequencial foi avaliada no crescimento de plântulas de tomate de porte micro sensível (MT) ou insensível (*dgt*) à auxina.

Tomados em conjunto os dados obtidos nesta dissertação pode-se concluir que:

1. As frações moleculares de AHV obtidas por meio de fracionamento sequencial por afinidade química, extração de lipídios (R1) e transesterificação com $\text{BF}_3 \cdot \text{MeOH}$ (R2), apesar das modificações químicas, não perderam a capacidade de bioestimulação, modificando significativamente a arquitetura radicular da cultivar micro-tom, promovendo aumentos no número de raízes laterais emitidas e encurtamento do eixo.

2. Tanto o AHV quanto suas quatro frações obtidas pelo fracionamento sequencial não foram capazes de estimular a emissão de raízes laterais na cultivar *dgt*, defectivo na percepção de auxina, podendo dessa forma associar esse mecanismo a um efeito tipo auxina, exceto para frações R3 e R4, que não estimularam a emissão de raízes laterais.
3. As frações moleculares obtidas por meio da hidrólise alcalina metanólica (R3) e hidrólise ácida (R4) perderam sua capacidade de bioestimulação e considerando que as SH são estruturas supramoleculares estabilizadas por ligações por interações de natureza hidrofóbica e fracas, este é um indício de que moléculas com atividade tipo auxínica contidas ou associadas à matriz húmica podem ter sido degradadas após o fracionamento sequencial.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, N.O., Canellas, L. P, Dobbss, L. B., Zandonadi, D. B. Olivares, F.O., Façanha, A.R. (2009). Distribuição de massa molecular de ácidos húmicos e promoção do crescimento radicular. R. Bras. Ci. Solo, 33:1613-1623.
- Araki, K., Toma, H.E. (2002). Química de sistemas supramoleculares constituídos por porfirinas e complexos metálicos, Química Nova, v. 25, n. 6, p. 962-975.
- Blakely, L.M., Durham, M., Evans, T.A., et al. (1982). Experimental studies on lateral rootformation in radish seedling roots .1. general-methods, developmental stages, and spontaneous formation of laterals. botanical gazette, Vol. 143, Pag.341-352.
- Canellas, L. P. e Façanha, A. R. (2004). Chemical nature of soil humified fractions and their bioactivity. Pes. Agr. Bras., 39: 233-240.
- Canellas, L. P., Zandonadi, D.B., Busato, J. G., Baldotto, M. A., Simoes, M. L., Martin-Neto, L., Façanha, A. R., Spaccini, R., Piccolo, A. (2008a). Bioactivity and chemical characteristics of humic acids from tropical soils sequence. Soil Science, 174.

- Canellas, L. P. Spaccini, R., Piccolo, A., L. P., Dobbss, L. B., et al. (2009). Relationships Between Chemical Characteristics and Root Growth Promotion of Humic Acids Isolated From Brazilian Oxisols. *Soil Science*, 173: 624-637.
- Canellas, L.P. et al. (2006b). Chemical characteristics and biological activity of humic acids from a tropical soil sequence differing by the weathering degree. *Soil Biol. Biochem.* Manuscript number 1448 under second review.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Façanha, A.L.O., Façanha, A.R. (2002). Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol.*, 130: 1951-1957.
- Canellas, L.P., Piccolo, A., Dobbss, L.B., Spaccini, R., Olivares, F.L., Zandonadi, D.B., Façanha, A.R. (2010). Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. *Chemosphere* (Oxford) v. 78, p. 457-466.
- Canellas, L.P., Teixeira Junior, L.R.L., Dobbss, L.B., Silva, C.A., Médici, L.O., Zandonadi, D.B. e Façanha, A.R. (2008b). Humic acids crossinteractions with root and organic acids. *Ann. Appl. Biol.*, 153:157-166.
- Canellas, L.P., Zandonadi, D.B., Olivares, F.L., Façanha, A.R. (2006a). Efeitos fisiológicos de substâncias húmicas – o estímulo às H⁺-ATPases. In: *Nutrição Mineral de Plantas*. Fernandes, M.S. (Ed.). Viçosa, *Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*, p. 175-200.
- Chen, Y. e T. Aviad. (1990). Effects of humic substances on plant growth. p.161-186 In: P. MacCarthy, C.E. Clapp, R.L. Malcolm, and P.R. Bloom (eds.). *Humic substances in soil and crop sciences: selected readings*. Am Soc. of Agronomy and Soil Sci. Soc. of Am, Madison, WI.
- Conte P. et al. (2006). Advanced CPMAS ¹³C NMR techniques from molecular characterization of size-separated fractions from a soil humic acid. *Anal. Bioan. Chem.*, 386: 382-390.

- Dell'Agnola, G., Nardi, S. On overview of earthworm activity in the soil. In: Bonvicini Pagliai A.M., Omodeo P. (1987) (Eds.), *On earthworms selected symposia and monographs*. Part 2. Mucchi Editore, Modena, Italy, p. 103-112.
- Dobbss, L. B., Medici, L. O. , Peres, L. E. P., Pino-nunes, L. E. , Rumjanek, V. M., Façanha, A. R., Canellas, L. P. (2007). Changes in root development of *Arabidopsis* promoted by organic matter from oxisols. *Annals of Applied Biology*, v. 151, p. 199-211.
- Engebretson, R., von Wandruszka, R. (1994). Micro-organization of dissolved humic acids. *Environ. Sci. Technol.*, v. 28, p. 1934-1941.
- Façanha, A.R., Façanha, A.R., Olivares, F.L., Velloso, A.C.X., Braz-Filho, R., Santos, G.A., Canellas, L.P. (2002). Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesq. Agropec. Bras.*, 37: 1301-1310.
- Fiorentino, G., Spaccini, R., Piccolo, A. (2006). Separation of molecular constituents from a humic acid by solid-phase extraction following a transesterification reaction. *Talanta*, 68, 1135–1142.
- Frias, I., Caldeira, M.T., Perez Castineira, J.R., Avarro Avino, J.P., Culianez Macia, F.A., Kuppinger, O., Stransky, H., Pages, M., Hager, A., Serrano, R. (1996). A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase, characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell*, 8: 1533-1544.
- Giovanela, M. (2003). Caracterização química e morfológica de substâncias húmicas de ambientes aquáticos. 140 p. *Tese de Doutorado – CCFM*, Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Goebel, M., Bachmann, J., Woche, S. K., Fischer, W.R. (2005). Soil wettability, aggregate stability, and the decomposition of soil organic matter. *Geoderma*, 128, 80– 93.

- Hager, A., Debus, G., Edel, H.G., Stransky, H., Serrano, R. (1991). Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H⁺-ATPase. *Planta*, 185: 527-537.
- Jahn, T., Baluska, F., Michalke, W., Harper, J.F., Volkman, D. (1998). Plasma membrane H⁺-ATPase in the root apex: Evidence for strong expression in xylem parenchyma and asymmetric localization within cortical and epidermal cells. *Physiologia Plantarum*, 104: 311-316.
- Jonge, L.W., Jacobsen, O.H. e Moldrup, P. (1999). Soil water repellency: effects of water content, temperature and particle size. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 63:437-442, 1999.
- Kaiser, K. e Zech, W. (2000). Sorption of dissolved organic nitrogen by acid subsoil horizons and individual mineral phases. *Europ. J. Soil Sci.*, 51:403-411.
- Kelly, M. O. e Bradford, K. J. (1986). Insensitivity of the diageotropica tomato mutant to auxin.. *Plant Physiol.*, 82: 713-717.
- Kleber, M, Sollins, P., Sutton, R. (2007). Aconceptual model of organo-mineral interactions in soils:self-assembly of rganic molecular fragments into zonal structures on mineral surfaces. *Biogeochemistry*, 85:9–24.
- Knicker, H., Almendros, G., Gonzalez-Vila, F.J., Ludemann, H.D., Martin, F. (1995).C-13 and N-15 NMR analysis of some fungal melanins in comparison with soil organic matter. *Org. Geochem.* 23:1023-1028.
- Landgraf, M,D., Alves, M.R., da Silva, S.C., Rezende, M.O.D. Characterization of humic acids from vermicompost of cattle manure composting for 3 and 6 months. *Quim. Nova*, 22: 483-486, 1999.
- Leyser, O. (2002). Molecular genetics of auxin signaling. *Annual review of plant biology*. Vol. 53, Pag. 377-398.

- López-Bucio, J. A. Cruz-Ramírez, and L. Herrera-Estrella. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 280–287.
- Masciandaro, G., Ceccanti, B., Garcia, C. (1999). Soil agroecological management: fertirrigation and vermicompost treatments. *Biores. Technol.*, 59: 199-206.
- Messias, R.A. (1998). Estudo de adsorção, dessorção e biodegradação de simazina e 2,4 – D incorporador em turfas e poliuretana. São Carlos. 106p. *Dissertação (Mestrado)* – Instituto de química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- Moore, J.S. (1996). Molecular architecture and supramolecular chemistry, *Solid State e Material. Science*, v. 1, n. 6, p. 777-788.
- Morra, M.J., Corapcioglu, M.O., von Wanduszka, R., Marshall, D.B., Topper, K. (1990). Fluorescence quenching studies of Naphtalene and 1-Naphthol interaction with humic acid. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, v. 54, p. 1283-1289.
- Muscolo, A., Bovalo, F., Gionfriddo, F., Nardi, S. (1999). Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. *Soil Biol. Biochem.*, 31: 1303–1311.
- Muscolo, A., Cutrupi, S. e Nardi, S. (1998). IAA detection in humic substances. *Soil Biol. Biochem.*, 30:1199-1201.
- Muscolo, A., Nardi, S. (1997). Auxin or auxin-like activity of humic matter. In: Drozd, J., Gonet, S.S., Senesi, N., Weber, J. (eds.), *The Role of Humic Substances in the Ecosystems and Environmental Protection*. Polish Society of Humic Substances, Wroclaw, Poland, p. 987–992.

- Naafs, D.F.W., van Bergen, P.F. (2002). Effects of pH adjustments after base hydrolysis: implication for understanding organic matter in soils. *Geoderma*, 106, 191–217.
- Nardi, S., Concheri, G., Dell’Agnola, G. (1996). Biological activity of humus. In: Piccolo, A. (ed.), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier, New York, p.361–40.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello, A. (2002). Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology e Biochemistry*, 34: 1527-1536.
- Piccolo, A, Conte, P, Trivellone, E, et al. (2002b). Reduced heterogeneity of a lignite humic acid by preparative HPSEC following interaction with an organic acid. Characterization of size-separates by Pyr-GC-MS and H-1-NMR spectroscopy. *Environmental Science e Technology* . Vol.36 ed: 1 Pag. 76-84.
- Piccolo, A. (2001). The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science*, 66 (11), 810–832.
- Piccolo, A. (2002a). The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Adv. In: Agron.*, 75: 57-133.
- Piccolo, A. e Mbagwu, J.S.C. (1999). Role of hydrophobic components of soil organic matter in soil aggregate stability. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 63:1081-1810.
- Piccolo, A. et al. (1996). Macromolecular changes of soil humic substances induced by interactions with organic acids. *Eur. J. Soil Sci.*, 47: 319-328.
- Pino-Nunes, L. E. (2005). Obtenção e uso de mutantes com alterações no balanço auxina/citocinina no estudo da competência organogênica em microtomateiro (*Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM). Tese (Mestrado em

Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Piracicaba - São Paulo, Esalq, Usp, 86 p.

Quaggiotti, S., Rupert, B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tugnoli, V., Nardi, S. (2004). Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*, 55: 803-813.

Rashotte, AM, Brady, SR, Reed, RC, et al (2000). Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of arabidopsis. *Plant Physiology*, Vol. 122 Issue: 2 Pag.: .481-490.

Rayle, D.L., Cleland, R.E. (1992). The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, 99: 1271-1274.

Rocha, J.C., Rosa, A.H. (2003). Substâncias húmicas aquáticas. Interação com espécies metálicas. São Paulo, Editora UNESP. 120p.

Rodda, M.R.C., Canellas, L.P., Façanha, A.R., Zandonadi, D.B., Guerra, J.G.M., Almeida, D.L. de, Santos, G.A. (2006b). Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto. II - efeito da fonte de vermicomposto. *R. Bras. Ci. Solo*, 30: 657-664.

Rodda, M.R.C., Canellas, L.P., Façanha, A.R., Zandonadi, D.B., Guerra, J.G.M., Almeida, D.L. de, Santos, G.A (2006a). Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto. I - Efeito da concentração. *R. Bras. Ci. Solo*, 30: 649-656.

Schnitzer e Poasp (1967) Effects of a soil humic compound on root initiation. *Nature*, 213: 598.

Simpson, A.J. (2002). Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. *Magnetic Resonance In: Chem.*, 40: S72 - S82.

- Smejkalova, D., A. Piccolo (2008). Aggregation and disaggregation of humic supramolecular assemblies by NMR diffusion ordered Spectroscopy (DOSYNMR). *Env. Sci. Technol.* 42:699-706.
- Sorin C, Bussell JD, Camus I, Ljung K, Kowalczyk M, Geiss G, et al. (2005). Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONAUTE1. *Plant Cell* 17: 1343–1359.
- Spaccini, R. and Piccolo, A. (2008). Spectroscopic characterization of a compost at different maturity stages. *Clean* 36:152-157.
- Spaccini, R. e Piccolo A. (2009). Molecular characteristics of humic acids extracted from compost at increasing maturity stages. *Soil Biology e Biochemistry* 41 1164–1172.
- Spaccini, R., Piccolo, A. (2007). Molecular characterisation of compost at increasing stages of maturity. I: Chemical fractionation and infrared spectroscopy. *J.Agric. Food Chem.* 55, 2293–2302.
- Stevenson, F.J. (1994). Húmus chemistry: *Gênesis, composition, ractions*. New
- Sutton, R., Sposito, G. (2005). Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View. 39:9009-9015.
- Taiz, L. e Zeiger, E. (2002). *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre, Artmed, 719p.
- Thurman, E. M. e Malcolm, R. L. (1981). Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.*, 15: 463-466.
- Tomic, S, Gabdoulline, RR, Kojic-Prodic, B, et al. (1998). Classification of auxin related compounds based on similarity of their interaction fields: Extension to a new set of compounds. *Internet Journal of Chemistry*. Vol.1 ed: 26 Pag. CP1-U21.

- Torrey, JG. (1986). Endogenous and exogenous influences on the regulation of lateral root formation. In: Jackson MB, ed. New root formation in plants and cuttings. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 31–66.
- Válio, I. F. M. (1986). Auxinas. In: Ferri, M. G. (Ed.). Fisiologia vegetal. São Paulo : EPU, v. 2, p. 39-72.
- Vaughan, D., Malcolm, R.E. (1985). Influence of humic substances on growth and physiological processes. In: Vaughan, D., Malcolm, R.E. (Eds.), Soil Organic Matter and Biological Activity. Martinus-Nijhoff, Boston, MA, USA, p. 37-75.
- Vinceslas-Akpa, M., Loquet, M. (1997). Organic matter transformations in lignocellulosic waste products composted or vermicomposted (*Eisenia fetida* Andrei): chemical analysis and ^{13}C CPMAS NMR spectroscopy. Soil Biol Biochem., 29: 751–758.
- York, John Wiley. 496p.
- Zandonadi, D.B., Canellas, L.P., Façanha, A.R. (2007). Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. Planta, 225: 1583-1595.
- Zazimalova, E., Napier, RM (2003). Points of regulation for auxin action. Plant Cell Reports. Vol. 21, ed: 7 Pag.: 625-634.