

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO
RADICULAR DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

LEONARDO BARROS DOBBS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
JANEIRO - 2011

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO
RADICULAR DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

LEONARDO BARROS DOBBS

“Tese 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 Doutor em Produção Vegetal”.

Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
JANEIRO - 2011

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO
RADICULAR DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

LEONARDO BARROS DOBBS

“Tese 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 Doutor em Produção Vegetal”.

Aprovada em 17 de Janeiro de 2011.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Érika Flávia Machado Pinheiro (Ph.D., Ciência do Solo) - UFRRJ

Prof. Fábio Lopes Olivares (Ph.D., Ciência do Solo) - UENF

Prof. Victor Marcos Rumjanek (Ph.D., Química Orgânica) - UFRRJ

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

*"Se fiz o que fiz foi porque subi no
ombro de gigantes"*

À minha mãe,
Eliane Barros Dobbss.
"In memoriam"

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Norte Fluminense e a Università degli Studi di Napoli Federico II, pelo ensino, pesquisa e extensão;

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro;

Ao Laboratório de Solos e ao Nudiba da UENF;

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro e a CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Professor Luciano Pasqualoto Canellas, pela minha formação profissional, por me ensinar ciência, pelas dúvidas sempre esclarecidas, pela amizade e pelo exemplo de competência;

Ao Professor Alessandro Piccolo e ao Dr. Riccardo Spaccini, pelo apoio e recepção na Itália, pela oportunidade de trabalho, o constante otimismo com os resultados da pesquisa e por despertar-me para o estudo de RMN;

Aos Professores Fábio Lopes Olivares e Arnaldo Rocha Façanha, pelas críticas e sugestões a este trabalho e pelos conselhos e ensinamentos sempre seguros;

Ao Professor Cláudio Marciano meu muito obrigado;

Ao meu pai Walmir e a Luiza por sempre fazerem o melhor que puderam por mim e aos meus irmãos Leandro e Lais, simplesmente por serem meus irmãos!

Ao Sr. Nelson e à Dona Dulce, pelo acolhimento, carinho e suporte;

À minha querida cunhada Tati. Nem o tempo e nem a distância poderão apagar o que vivemos juntos;

A Lú, luz do meu caminho, companheira da minha estrada, amor da minha vida;

Aos companheiros e amigos do Nudiba: Jader, Validoro, Natália, Tiaguinho, Kamillinha, Jhonnatan, Lívia, Ingrid, Marcelly, Thales e Silézio que sempre fizeram do Laboratório um ambiente agradável para o trabalho;

Aos velhos amigos da UENF: Daniel, Robertinho, Lelly, Débora, Janaína, Anderson, Gonzaga, Mirella e Inga;

Aos amigos da UFRRJ: Flavinho, Gláucio, Duda e Silvia que, apesar da distância, vivem no meu coração;

Aos colegas da Università di Napoli e do DISSPAPA: Pierluigi, Donato, Suzzana, Antonio Nebbioso, Barbara, Lia, Antonio, Pedro e Valéria.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Natureza química das substâncias húmicas.....	4
2.2. Bioatividade da matéria orgânica humificada.....	6
2.3. Relação entre a estrutura química e atividade biológica das substâncias húmicas.....	10
2.4. Modelos matemáticos em estudos da relação entre estrutura química e a atividade biológica (REA).....	12
3. HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.1. Solos e sítios de amostragem.....	15
4.1.1. Experimento 1: Bioatividade e características químicas de ácidos húmicos isolados de uma seqüência de solos tropicais.....	15
4.1.2. Experimento 2: Características químicas e promoção do crescimento radicular de ácidos húmicos isolados de sete Latossolos brasileiros.....	16
4.2. Obtenção, isolamento e purificação das substâncias húmicas.....	16
4.2.1. Experimentos 1 e 2.....	16

4.2.2. Experimento 3: Composição química e propriedades bioativas de subfrações húmicas separadas a partir de um ácido húmico isolado de vermicomposto.....	17
4.2.2.1. Fracionamento dos AH por HPSEC preparativa.....	17
4.2.3. Experimento 4: Bioatividade da matéria húmica transformada quimicamente sobre o crescimento vegetal.....	18
4.2.3.1. Derivatização química a partir das substâncias húmicas de vermicomposto.....	18
4.2.3.1.1. Oxidação com KMnO ₄ , em meio ácido (D1).....	18
4.2.3.1.2. Oxidação com KMnO ₄ , em meio alcalino (D2).....	18
4.2.3.1.3. Redução com boroidreto de sódio (D3).....	19
4.2.3.1.4. Hidrólise metanólica-alcalina (D4).....	19
4.2.3.1.5. Hidrólise ácida com H ₂ SO ₄ (D5).....	19
4.2.3.1.6. Hidrólise ácida com HCl 2 M em dioxano (D6).....	20
4.2.3.1.7. Extração de lipídios livres (D7).....	20
4.2.3.1.8. Metilação (D8).....	20
4.3. Caracterização das substâncias húmicas.....	21
4.3.1. Composição elementar (realizada em todos os experimentos).....	21
4.3.2. Cromatografia de exclusão por tamanho (HPSEC) analítica (realizada em todos os experimentos).....	21
4.3.3. Espectroscopia ordenada por difusão (DOSY) (realizada nos experimentos 2, 3 e 4).....	22
4.3.4. Ressonância Magnética Nuclear do isótopo de carbono de massa treze com rotação no ângulo mágico e polarização cruzada (¹³ C RMN CP/MAS) (realizada em todos os experimentos).....	23
4.4. Bioatividade das substâncias húmicas.....	24
4.4.1. Crescimento das plantas e tratamento com os materiais húmicos (realizado em todos os experimentos).....	24
4.4.2. Avaliação do crescimento radicular (realizada em todos os experimentos).....	25
4.4.3. Frequência de sítios de mitose (realizada somente no experimento 1).....	25
4.5. Ensaio Bioquímicos.....	26

4.5.1. Isolamento das vesículas de membrana plasmática e atividade ATPásica (realizados em todos os experimentos).....	26
4.5.2. Bombeamento de H ⁺ da ATPase de membrana plasmática (realizado somente no experimento 3).....	27
4.5.3. Western Blot (realizado somente no experimento 2).....	28
4.5.4. Microscopia eletrônica de varredura em raízes de <i>Zea mays</i> (realizada somente no experimento 3).....	28
4.5.5. Ensaio com micro-tomateiro DR5:: <i>GUS</i> (realizado somente no experimento 4).....	29
4.6. Relação entre as características químicas e a atividade biológica das substâncias húmicas (REA).....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1. Propriedades das amostras de solos e vermicomposto.....	31
5.2. Características químicas e conformacionais das substâncias húmicas...	32
5.2.1 ¹³ C RMN CP/MAS.....	45
5.3. Bioatividade das substâncias húmicas.....	54
5.4. Efeitos sobre a atividade da H ⁺ -ATPase.....	59
5.5. Ensaio com Tomateiro (Micro-Tom) DR5:: <i>GUS</i>	63
5.6. Relação entre as características químicas e a atividade biológica das substâncias húmicas (REA).....	65
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
APÊNDICE.....	90

RESUMO

DOBBSS, LEONARDO B. D.S. - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Janeiro de 2011. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO RADICULAR DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS. Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas. Co-orientador: Prof. Arnaldo Rocha Façanha.

Este estudo avaliou uma provável relação entre a estrutura química e a atividade de promoção do crescimento radicular das substâncias húmicas (SH). Partiu-se do pressuposto que uma provável ação regulatória das SH sobre o metabolismo celular não é dependente da sua massa molecular, mas decorrente de constituintes químicos capazes de modular a sinalização celular. Para avaliar a influência da estrutura química foram empregadas as técnicas de ressonância magnética nuclear de ^{13}C no estado sólido (CP/MAS ^{13}C -NMR) e em gradiente de campo difuso (DOSY ^1H -NMR). Para este estudo foram conduzidos quatro experimentos independentes. No primeiro, foram isolados ácidos húmicos (AH) de uma seqüência de seis solos tropicais brasileiros em diferentes estádios de intemperismo. Os AH foram caracterizados química e espectroscopicamente e adicionalmente foi avaliada a sua capacidade de indução à emergência de raízes laterais em plântulas de milho bem como a atividade da H^+ -ATPase de membrana plasmática (MP). De uma maneira geral, AH isolados de classes de solos menos intemperizados apresentaram maior relação C/N e menores valores de massa molecular aparente (M_w) quando comparados aos AH isolados de classes de solos mais intemperizados. Os AH obtidos de solos em estágio avançado de intemperismo apresentaram a metade do estímulo biológico em comparação com

os AH provenientes de solos em estágio inicial de intemperismo. No segundo experimento foram investigados os efeitos sobre a promoção do crescimento radicular de AH isolados da camada superficial de sete diferentes Latossolos brasileiros. Apesar de isolados da mesma classe de solos, os AH obtidos diferiram entre si quanto aos valores de hidrofobicidade e Mw. Todos os AH promoveram o crescimento das raízes e estimularam a atividade hidrolítica da H⁺-ATPase da MP. No terceiro experimento, foi testada a bioatividade de frações mais homogêneas de AH, isolados de vermicomposto, obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão de tamanho (HPSEC). Seis subfrações (SF) de Mw diferentes apresentaram redução gradual do conteúdo de C-aromáticos com a diminuição de Mw sem perdas da bioatividade, sugerindo que a capacidade de indução do crescimento radicular se deve mais pela presença de moléculas bioativas (eg.: auxinas) do que pelas suas dimensões moleculares propriamente ditas. No quarto experimento SH, também isoladas de vermicomposto, foram submetidas a diferentes reações químicas (oxidação, redução, hidrólise ácida e alcalina e metilação) a fim de se modificar a sua funcionalidade. Todos os derivados húmicos foram capazes de induzir a emergência de raízes laterais bem como estimular a atividade da H⁺-ATPase. Foram obtidas evidências de que, pelo menos em parte, a promoção do crescimento radicular pelas SH é do tipo auxínica, uma vez que foi observada uma mudança significativa na rota de sinalização demonstrada pela maior atividade do gene promotor induzido por auxina (DR5::GUS) em plântulas de tomateiro transgênico (*S. lycopersicum* cv. Micro-Tom). Por fim, os dados relativos à composição estrutural e da atividade biológica das 29 SH obtidas nos quatro experimentos independentes foram normalizados e por meio da busca sistemática por regressão linear múltipla procurou-se estabelecer relações com a promoção do crescimento radicular. Foi possível concluir que o índice de hidrofobicidade foi a característica química que mais influenciou isoladamente ou em combinação a promoção do crescimento radicular avaliado tanto pelo número de raízes laterais emergidas do eixo principal como pela atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática obtida a partir de vesículas isoladas de raízes de plântulas de milho. O domínio hidrofóbico dos agregados húmicos em solução parece ser decisivo para conservação de fragmentos de biomoléculas (tais como os fitohormônios) capazes de induzir o crescimento radicular.

ABSTRACT

DOBBSS, LEONARDO B. D.S. - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. January, 2011. CHEMICAL CHARACTERISTICS AND ROOT GROWTH PROMOTION OF HUMIC SUBSTANCES. Adviser: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas. Co-adviser: Prof. Arnaldo Rocha Façanha.

This study evaluated a possible relationship between chemical structure and activity of root growth of humic substances (HS). This started from the assumption that a possible regulatory action of HS on cell metabolism is not dependent on its molecular mass, but due to the chemical constituents that modulate cell signaling. To characterize the influence of chemical structure the techniques of ^{13}C solid state nuclear magnetic resonance (CP/MAS ^{13}C -NMR) and diffusion ordered NMR spectroscopy (DOSY ^1H -NMR) were employed in this study in four independent experiments. In the first humic acids (HA) were isolated from a sequence of six Brazilian tropical soils at different stages of weathering. Humic acids were characterized chemically and spectroscopically and additionally evaluated for the ability to induce the emergence of lateral roots in maize seedlings and the activity of H^+ -ATPase plasma membrane (PM). In general, HA isolated from classes of less weathered soils had higher C/N ratio values and lower apparent molecular mass (Mw) compared to HA isolated from soil classes highly weathered. The humic acids obtained from soils at an advanced stage of weathering produced half the biological stimulus in comparison with the HA from soil in the initial stages of weathering. The second experiment investigated the effects on the promotion of root growth of HA isolated from topsoil of seven different Brazilian Oxisols. In spite

of isolates of the same class of soil, HA obtained differed as to the values of hydrophobicity and Mw. All HA promoted root growth and increased the hydrolytic activity of H⁺-ATPase of PM. In the third experiment, we tested the bioactivity of HA homogeneous fractions of HA isolated from vermicompost obtained by high performance liquid chromatography size exclusion (HPSEC). Six subfractions (SF) of different Mw showed gradual reduction of aromatic-C content with decreasing Mw without loss of bioactivity suggesting that the induction of root growth should be more dependent on the presence of bioactive molecules (eg, auxins) than on their molecular dimensions themselves. The fourth experiment involved HS also isolated from vermicompost which were subjected to different chemical reactions (oxidation, reduction, acid and alkaline hydrolysis and methylation) in order to modify their functionalities. All humic derivatives were able to induce the emergence of lateral roots as well as stimulate the activity of H⁺-ATPase. We obtained evidence that, at least in part, the promotion of root growth by auxin-type HS is as it was observed a significant change in the signaling pathway demonstrated by the increased activity of the promoter gene induced by auxin (DR5::GUS) in seedlings of transgenic tomato (*S. lycopersicum* cv. Micro-Tom). Finally, data on the structural composition and biological activity of 29 HS obtained in four independent experiments were standardized and systematic search through multiple linear regression was employed to try to establish relationships with the promotion of root growth. It was concluded that the hydrophobicity index is the chemical feature that most influenced, alone or in combination promotion of root growth measured both by the number of lateral roots emerged from the main roots, as by the activity of H⁺-ATPase of plasma membrane obtained from vesicles isolated from roots of maize seedlings. The hydrophobic domain of humic aggregates in solution appears to be critical for conservation of fragments of biomolecules (such as phytohormones) able to induce root growth.

1. INTRODUÇÃO

As substâncias húmicas (SH) são o principal componente da matéria orgânica de solos, águas e sedimentos. Além de influenciar as propriedades químicas, físicas e biológicas determinando a produção biológica dos ecossistemas, exercem efeito direto sobre o crescimento e metabolismo das plantas, especialmente sobre o sistema radicular (Nardi et al., 2002).

A eficiência da estimulação biológica depende da natureza química das SH e é 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 precisa ou capaz de prever o comportamento da sua complexidade química em solução.

Devido à complexidade das SH, as relações existentes entre sua estrutura química e a atividade biológica provavelmente não obedece a um modelo linear. Algumas tentativas de ajustamento entre estrutura e atividade de SH, feitas até agora, produziram resultados contrastantes. Por exemplo, Piccolo et al. (1992) correlacionaram positivamente o conteúdo de grupos carboxílicos com a atividade de enzimas. Por outro lado, Canellas et al. (2008a e 2009) e Dobbss et al. (2010)

mostraram que SH com maior grau de hidrofobicidade (C-aromático + C-alquílico) apresentam maior capacidade de estimular sistemas biológicos.

Para acessar receptores celulares é preciso que as substâncias cheguem ao apoplasto. Somente compostos com massa molecular relativamente pequena teriam essa propriedade, justificando os trabalhos realizados com bioatividade de ácidos fúlvicos (Nardi et al., 1994; Muscolo et al., 2007). SH de tamanho molecular aparentemente elevado (como os ácidos húmicos) não poderiam acessar o interior das células. Por isso, seu efeito sobre o crescimento radicular deveria ser atribuído a outros fatores, tais como a complexação e disponibilização de micronutrientes importantes na zona radicular, como o Fe^{2+} e Zn^{2+} (Chen et al., 2004). Porém, tanto SH de massa molecular aparentemente pequena (Schnitzer e Poapst, 1967) como as de massa mais elevada (Vaughan, 1974; O'Donnell, 1973) podem afetar o metabolismo vegetal (Quaggiotti et al., 2004 e Aguirre et al., 2009). Aguiar et al. (2009) utilizaram a cromatografia por exclusão de tamanho com gel de sephadex para obter frações húmicas com diferença na distribuição de massa molecular e não observaram qualquer relação entre o tamanho da fração e a capacidade de estimular a emergência de raiz lateral.

As SH têm sido descritas como uma auto-associação de biomoléculas mais ou menos transformadas e com distribuição de massa molecular relativamente pequena e estabilizadas em agregados por ligações fracas, principalmente interações hidrofóbicas, conferindo um comportamento supramolecular e massa/tamanho só aparentemente grande (Piccolo, 2002). O conceito de agregação supramolecular de moléculas húmicas heterogêneas e relativamente pequenas em solução foi demonstrado experimentalmente por Simpson (2002) e Šmejkalová e Piccolo (2008). Esses agregados húmicos podem ser facilmente rompidos na presença de ácidos orgânicos (Piccolo et al., 2001; Piccolo, 2002; Piccolo e Spiteller, 2003). Métodos de fracionamento químicos baseados nas forças de agregação dos componentes à matriz húmica (Spaccini e Piccolo, 2007) podem separar e individualizar os constituintes químicos do componente supramolecular húmico. E, com auxílio de técnicas como a cromatografia gasosa (CG-MS) e RMN, pode-se conhecer estruturalmente cada um dos constituintes não ligados e os associados fracamente, moderadamente ou fortemente à matriz húmica. Esse procedimento denominado por Piccolo de Humeomica é uma das possibilidades para o estabelecimento da relação entre estrutura química e

atividade biológica das SH. No entanto, as propriedades químicas e biológicas das SH podem ser consideradas como emergentes, isto é, são produtos da interação entre os constituintes e não da soma de cada um. Assim uma possível relação estrutura-atividade deve ser compreendida como um problema complexo (não sinônimo de difícil), mas de sistemas complexos que se auto-organizam até atingir um estado de aparente estabilidade.

As matemáticas para sistemas complexos (análises multivariadas, quimiometria) representam as ferramentas para o estudo de SH, na qual deseja-se estabelecer relações quantitativas entre um fenômeno observado e algumas variáveis independentes que se acreditam ter relevância na explicação do fenômeno. Em outras palavras, deseja-se construir um modelo matemático que seja capaz de explicar o fenômeno observado e que também seja capaz de proporcionar previsões dentro e, se possível, fora dos limites investigados (Gaudio e Zandonade, 2001). Para tanto, é necessário um conjunto grande e diverso de SH isoladas e caracterizadas da mesma forma. Nesse trabalho foram reunidos os resultados de quatro experimentos independentes, todos já publicados (Canellas et al., 2008a; 2009; 2010 e Dobbss et al. 2010) e analisados de forma a buscar uma possível relação entre a estrutura química e a atividade biológica das SH. Essa reunião constitui a base científica importante e necessária para a geração de biofertilizantes a base de SH mais eficazes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Natureza química das substâncias húmicas

O único denominador comum na química do húmus é o de que todas as classificações e definições sobre a matéria húmica, desconsiderando a natureza da amostra, ou seja, se dissolvida ou sólida, são somente operacionais e tomadas com base nos procedimentos utilizados para o seu isolamento (Peuravuori e Pihlaja, 1998). A natureza das SH aparenta ser uma função linear de grupos ácidos, mas é aceito que certas subfrações (ácidos fúlvicos e húmicos) podem representar entidades reais com constituintes químicos e frações de composição diferenciada (Stevenson, 1994).

Aiken (1985) definiu as SH como a classe geral de substâncias orgânicas heterogêneas que ocorrem naturalmente e que podem ser genericamente caracterizadas por apresentarem coloração amarelada até escura, alta massa molecular e serem resistentes à decomposição microbiológica. Hayes et al. (1989) compilaram a contribuição do grupo de cientistas organizados na sociedade internacional de substâncias húmicas (IHSS) e definiram as SH como macromoléculas de natureza polimérica altamente polidispersa. As justificativas científicas dessa proposição são baseadas na ausência de um controle biológico nas reações de síntese para esse material. Diferente dos sistemas biológicos, as unidades estruturais constituintes das SH não podem ser arranjadas em uma seqüência específica, conferindo a essas substâncias uma natureza polimérica,

porém, sem a presença de monômeros. Hayes (1997) considera a busca do entendimento dessas unidades estruturais, bem como, o estudo da forma e da conformação como vital para prever a reatividade química das SH. O mesmo autor afirma que os resultados obtidos por Piccolo e colaboradores (1996), tendo como base o fracionamento molecular indicam a possibilidade de uma associação de moléculas húmicas em agregados com sítios hidrofóbicos, que podem ser rompidos, modificando a conformação molecular. A interpretação inovadora de Piccolo (2002) para a conformação das SH foi obtida, inicialmente, a partir de resultados experimentais com cromatografia líquida de baixa-pressão por exclusão de tamanho. A variação cromatográfica de uma solução alcalina de SH levada até valores de pH igual a 2 com a adição de diferentes ácidos orgânicos foi observada por Piccolo et al. (1996), que registraram a mudança progressiva de baixo para elevados volumes de eluição. Esse fenômeno foi reversível, uma vez que, as bandas de eluição mudaram para baixos volumes quando a ação dos ácidos orgânicos foi neutralizada pela adição de base ($\text{KOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$). Conte e Piccolo (1999) usando a cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão de tamanho (HPSEC), verificaram o mesmo comportamento e providenciaram, portanto, evidências analíticas que as SH poderiam ser consideradas como uma associação de pequenas e heterogêneas moléculas em uma estrutura de tamanho só aparentemente grande. Sob esse ponto de vista, as SH constituiriam agregados que se auto-organizam em um arranjo supramolecular (Piccolo, 2002).

Em solução, a associação supramolecular é formada por meio da interação de domínios hidrofóbicos de compostos anfipáticos. A tendência termodinâmica natural desses compostos é de formar agregados espontaneamente. Essas associações são isoladas progressivamente da rede de estrutura da água (Wershaw, 1986). Tal separação resulta no acréscimo da entropia do sistema e na energia livre de estabilização das diferentes unidades moleculares húmicas para formar a superestrutura. Esta associação húmica supramolecular é estabilizada por forças de ligação relativamente fracas e, podem ser quebradas reversivelmente na presença de baixas concentrações de ácidos orgânicos (Nardi et al., 2000; Cozzolino, et al., 2001). Vários ácidos orgânicos são exsudados pelas raízes das plantas e podem mobilizar subunidades estruturais das SH. Essa proposição foi examinada por experimentos bidimensionais de RMN conduzidos

por Simpson (2002) que, usando campo difuso ordenado (DOSY-NMR), observou um número discreto de unidades com composição química diferente em uma solução de ácidos húmicos após a adição de ácido acético (Figura 1).

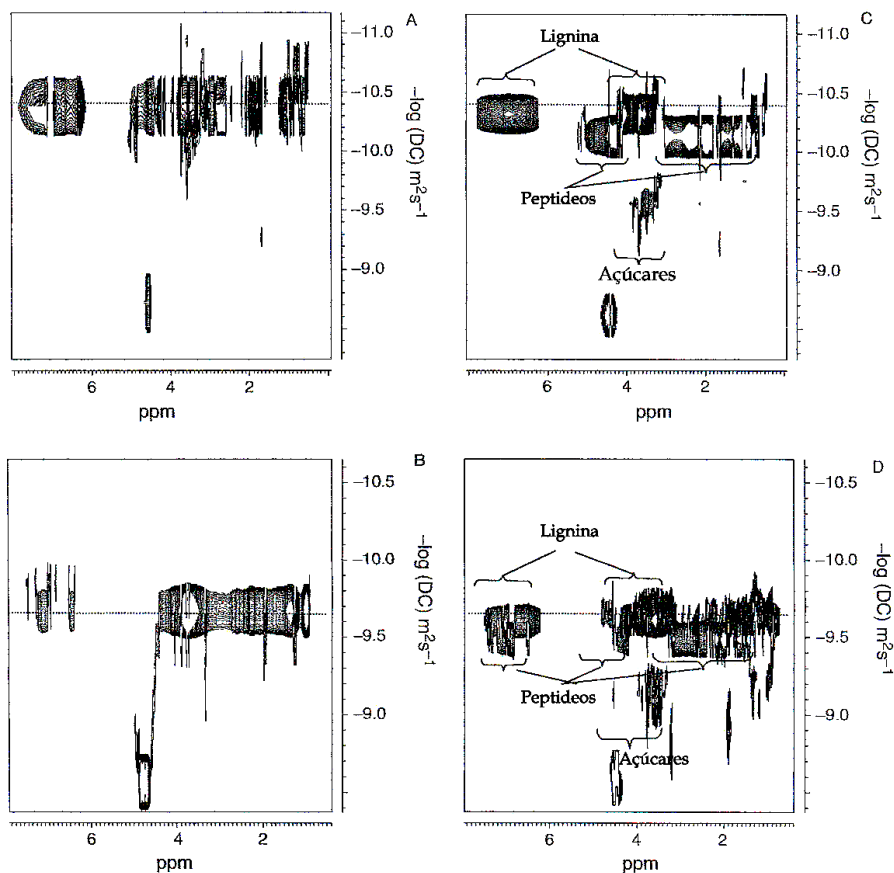


Figura 1. Espectros de DOSY de ácido húmico isolado de turfa em concentração de 5 mg mL^{-1} (A) e 133 mg mL^{-1} (B) e após adição de $5\text{ }\mu\text{L}$ de ácido acético (C e D). Adaptado de Simpson 2002.

Essas subunidades funcionais, uma vez dissociadas da molécula base dos ácidos húmicos, poderiam acessar receptores na superfície ou no interior das células das raízes desencadeando processos que culminariam com o estímulo do desenvolvimento radicular das plântulas.

2.2. Bioatividade da matéria orgânica humificada

O efeito das SH sobre o metabolismo das plantas foi resumido por Nannipieri et al. (1993) como resultado (i) da influência positiva sobre o transporte de íons facilitando a absorção; (ii) do aumento da respiração e da velocidade das

reações enzimáticas do ciclo de Krebs, resultando em maior produção de ATP; (iii) do aumento no conteúdo de clorofila; (iv) do aumento na velocidade e síntese de ácidos nucléicos; (v) do efeito seletivo sobre a síntese protéica e (vi) do aumento ou inibição da atividade de diversas enzimas. Todavia, os alvos moleculares primariamente envolvidos nessas respostas não foram ainda elucidados.

As SH são tradicionalmente consideradas como uma macromolécula que apresenta acidez, carga líquida negativa e elevada massa molecular, sendo extraída de solos, resíduos/compostos orgânicos e sedimentos por soluções alcalinas (Stevenson, 1994; Tan, 2003). O efeito fisiológico direto das frações humificadas de massa relativamente elevada, com centenas de milhares de Da, tais como os AH, é incompatível com seu tamanho e, conseqüentemente, com sua entrada na célula através das membranas biológicas. A promoção do crescimento vegetal tem sido justificada, então, pelo aumento da solubilidade de micronutrientes com a formação de complexos solúveis (Pinton et al., 1999a; Chen et al., 2003; Garcia-Mina et al., 2004) ou, ainda, pelo aumento da permeabilidade da membrana plasmática (MP), já que as SH têm um conhecido efeito surfactante e são, portanto, capazes de dissolver a camada lipídica das membranas biológicas (Visser, 1982). A formação de complexos de maior solubilidade com metais, especialmente com o ferro, foi extensamente documentada, mas não justifica, por exemplo, os aumentos observados no enraizamento de plantas em ensaios de curta duração (algumas horas) em meios de cultivo esterilizados e sem solução nutritiva (Vaughan e Malcolm, 1985). O aumento da permeabilidade das membranas biológicas por meio da dissipação de potencial, provocado por aberturas na camada lipídica, sem dúvida, aumenta a sua permeabilidade, porém com perdas na seletividade da barreira. Essa condição é essencial para a homeostase celular, pois, apesar de facilitar a entrada dos íons na célula, a saída é igualmente facilitada.

Não é recente a idéia de que as SH podem atuar no metabolismo vegetal da mesma forma como os hormônios atuam, ou seja, mediante processos de sinalização molecular. Bottomley (1917) verificou intensa promoção do crescimento com pequenas concentrações de SH. Tem sido encontrada, sistematicamente, atividade hormonal em SH de baixa massa molecular, como, por exemplo, os ácidos fúlvicos (AF) (Pinton et al., 1995, Pizzeghello et al., 2001;

Nardi et al., 2000), SH solúveis em água (Quaggiotti et al., 2004) e SH extraídas com ácidos orgânicos (Nardi et al., 2005). Todos esses extratos representam frações da matéria orgânica que, de acordo com a concepção tradicional de estrutura macromolecular, podem acessar a célula sem impedimentos devido ao tamanho/massa molecular. No entanto, os efeitos fisiológicos diretos de AH foram reportados a bastante tempo, incluindo evidências da absorção de AH pelas células utilizando-se radioisótopos (Flaig, 1968).

Uma das principais barreiras biológicas na interface solução do solo - célula vegetal é membrana plasmática (MP), sendo essa, portanto, alvo primário da ação de moléculas-sinais porventura presentes na solução do solo. As H⁺-ATPases têm papel central no balanço energético celular e na promoção do enraizamento, uma vez que fornecem energia (com a hidrólise de ATP → ADP + Pi + 3 a 5 mol de H⁺) para os transportadores de íons localizados na MP e geram o gradiente eletroquímico responsável pela polarização da MP. A geração do gradiente favorece termodinamicamente a absorção de íons e energiza o transporte transmembranar (Giannini e Briskin, 1987). Além disso, o abaixamento do pH proporcionado pelo acúmulo de H⁺ no lado externo à célula providencia condições fisiológicas ótimas para o funcionamento de enzimas do tipo hidrolases e fenol-oxidases, enzimas com habilidade de romper ligações da parede celular. Além dessas enzimas, as expansinas operam em pH < 4,5 e tornam a parede celular mais flexível com o rompimento das ligações hidrogênio (Cosgrove, 1998). Desse modo, o bombeamento de H⁺ para o meio externo, pela ação das ATPases, proporciona pH ótimo para ação de expansinas as quais relaxam a parede celular. O relaxamento da parede celular e a conseqüente diminuição do potencial de parede (ψ_p) e do potencial hídrico (ψ_H) dentro da célula favorecem a entrada de água e, portanto, o turgor celular (o acúmulo de íons no citoplasma deve ser compensado pelo aumento do volume da célula para atender o balanço de massa e carga) (Cosgrove, 2000). Esse mecanismo complexo e intrincado de promoção do crescimento celular mediado pelas H⁺-ATPases é conhecido como “a teoria do crescimento ácido” (Rayle e Cleland, 1992) (Figura 2). As auxinas assumem papel central nesse mecanismo, uma vez que promovem tanto a transcrição de genes codificando ATPases, quanto a ativação dessas proteínas (Rayle e Cleland, 1992).

Façanha et al. (2002) verificaram o estímulo na síntese da H^+ -ATPase de MP e Zandonadi et al. (2007) evidências do efeito sobre a atividade das bombas de prótons localizadas tanto na MP quanto no vacúolo promovidas por AH, indicando que tais bombas são importantes marcadores bioquímicos da bioatividade das SH. Esses autores postularam que subunidades estruturais de AH poderiam acessar receptores na superfície ou no interior da MP das células das raízes, resultando no estímulo do desenvolvimento.

Teoria do Crescimento Ácido

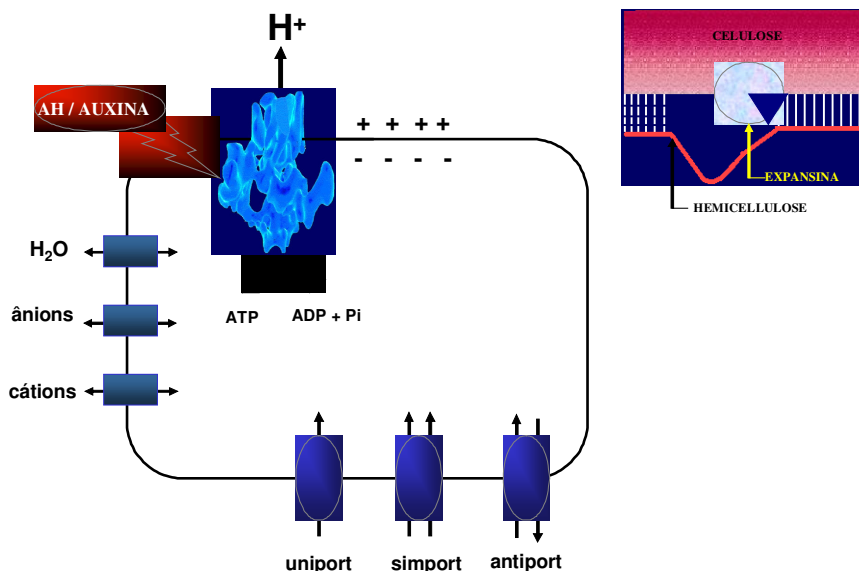


Figura 2. Representação esquemática da H^+ -ATPase de membrana plasmática. A atividade de hidrólise de ATP gera de 3 a 5 moles de H^+ que, transportados em outro domínio da mesma enzima, geram gradiente de prótons necessário para i) energizar o transporte de íons e ii) diminuir o pH do apoplasto (condição para ação das expansinas e conseqüente afrouxamento da parede celular). Extraído de Canellas et al. (2006).

Canellas et al. (2002) identificaram a indução de síntese de H^+ -ATPase de MP isoladas de raízes de milho, correlacionada com a presença de auxina nos AH e com uma alteração no padrão de desenvolvimento radicular de plântulas de milho. Confirmando essas constatações, Quaggiotti et al. (2004) ratificaram a presença de auxinas na estrutura de SH, através de um ensaio imunológico. No trabalho supacitado foi demonstrado que frações húmicas de baixo peso molecular estimulam a absorção de nitrato, possivelmente mediante o aumento da expressão gênica da isoforma Mha1 e Mha2 da H^+ -ATPase de MP. Nos últimos anos, pesquisas comprovaram a incapacidade de diferentes AH induzir o

enraizamento lateral no mutante de tomateiro defectivo para sinalização de auxina (*dgt*) (Dobbss, et al. 2007) fortalecendo a hipótese da atividade análoga à auxina desta SH. Recentemente, Zandonadi e colaboradores (2010) observaram que AH derivados de vermicomposto atuam como fontes ambientais de auxina induzindo a produção de óxido nítrico (ON) nos sítios de emissão de raízes laterais. O ON por sua vez seria capaz de ativar as bombas de H⁺ das células adjacentes, desencadeando o mecanismo de crescimento ácido responsável pela proliferação e alongação celular associados à formação das raízes laterais.

2.3. Relação entre a estrutura química e atividade biológica das substâncias húmicas

A falta de um conhecimento detalhado sobre a composição química das substâncias húmicas torna muito difícil as possíveis relações entre as características químicas e a atividade biológica destas substâncias. O estudo destas relações torna-se ainda mais complicado pela presença de várias moléculas presentes na estrutura dos materiais húmicos capazes de promover mudanças no metabolismo vegetal (Nardi et al., 2002).

A busca de uma relação entre estrutura-atividade de SH foi inicialmente estudada por Schnitzer e Poasp (1967) e mais tarde por Piccolo et al. (1992) que correlacionaram o teor de grupos carboxílicos com a atividade de enzimas. Durante alguns anos, uma série de trabalhos tem relatado que a atividade biológica das substâncias húmicas é dependente de sua origem (García, 1990), concentração (Albuzio et al., 1986) e tamanho molecular (Nardi et al, 1998, 2000).

Para o entendimento satisfatório de qualquer reação química ou bioquímica é necessário o conhecimento do tamanho molecular das espécies envolvidas. No caso das SH esse conhecimento primário não é uma tarefa simples. A cromatografia líquida de alta performance por exclusão de tamanho (HPSEC) parece ser, pelo menos até agora, a forma mais acurada para quantificar a presença de diferentes componentes de massa em uma solução aquosa de SH (Gloor, et al., 1981, Conte e Piccolo, 1999, Specht et al., 2000; Egeberg e Alberts, 2003).

Em 2007, Nardi e colaboradores observaram que frações húmicas de baixo tamanho molecular e alta hidrofiliabilidade foram capazes de modificar

significativamente a atividade de algumas enzimas da via glicolítica e do ciclo de Krebs. Entretanto Façanha et al. (2002); Canellas et al. (2002) ; Zandonadi et al. (2007) e Canellas et al. (2010) demonstraram que AH de massa aparentemente elevada (pelo menos maior que 14 kDa) isolados de vermicomposto apresentaram estímulos sobre a atividade de hidrólise e transporte de H^+ das H^+ -ATPases de MP isoladas de raízes de plantas mono e dicotiledôneas. A partir destes resultados conflitantes, Muscolo e colaboradores em 2007 relataram que a diferença na atividade biológica das substâncias húmicas parece estar mais relacionada às suas composições químicas diversas do que pelos seus tamanhos moleculares propriamente ditos.

A ressonância magnética nuclear (RMN) é a mais poderosa ferramenta para o estudo das composições químicas das SH (Preston, 1996; Conte et al., 2006). É possível acessar, de modo relativamente fácil, modificações na funcionalidade das SH, tais como as provocadas por alterações na distribuição da massa molecular ou por modificações químicas induzidas. Conte et al. (2006 e 2007) encontraram uma regularidade na natureza química de AH isolados tanto de solo como de lignito fracionados por HPSEC. Esses autores observaram que as frações de massa molecular mais elevada são compostas essencialmente por unidades hidrofóbicas, principalmente componentes alquílicos.

Atualmente, Zancani e colaboradores (2009) observaram através da técnica de ^{13}C -RMN, que a presença residual de alguns componentes hidrofóbicos em frações húmicas de diferentes tamanhos moleculares, pode limitar a disponibilidade de moléculas hidrofílicas exercendo um controle conformacional na atividade de algumas enzimas do metabolismo energético. Entretanto trabalhos recentes obtiveram correlações significativas entre o índice de hidrofobicidade [(calculado pela soma das áreas dos espectros de RMN correspondentes ao C hidrofóbico (0-40 ppm) + (110-160 ppm) dividido pela soma das áreas do carbono hidrofílico (40-110 ppm) + (160-200 ppm)] e o crescimento vegetal (Canellas et al., 2008a), a expressão (Canellas et al., 2009) e a atividade da enzima H^+ -ATPase (Dobbss, et al., 2010), indicando um papel importante do componente hidrofóbico dos materiais húmicos sobre o estímulo biológico vegetal.

2.4. Modelos matemáticos nos estudos da relação entre a estrutura química e a atividade biológica (REA)

Estudos de REA vêm sendo progressivamente desenvolvidos durante os últimos 40 anos. Hoje, são amplamente aplicados para descrever quantitativamente as relações entre a estrutura química de moléculas e a atividade biológica por elas desempenhada (Hansch & Leo, 1995; Wermuth, 2000). Pesquisas na área de REA têm como principal objetivo a construção de modelos matemáticos que relacionem a estrutura química e a atividade biológica de uma série de compostos (Gaudio, 1996; Martin, 1978) e em geral é comum dispor-se de mais de uma possibilidade em termos de modelos para a escolha daquele que será considerado o melhor modelo de relação estrutura-atividade (Gaudio & Zandonade, 2001). A construção dos modelos requer a elaboração de um conjunto ou uma matriz de dados contendo a medida quantitativa da atividade biológica e os parâmetros químicos e estruturais capazes de descrever as propriedades dos compostos.

Todas as análises de REA são baseadas na hipótese de que as diferentes propriedades estruturais ou características químicas de um composto, para sua atividade biológica são contribuições lineares. Devido ao fato de, quase sempre, o número total de variáveis disponíveis ser muito maior do que o número que será efetivamente incluído nos modelos, há necessidade de lançar-se mão de algum tipo de procedimento de seleção para a composição dos modelos de REA (Topliss & Costello, 1972).

Segundo Ferreira et al. (2002), a busca sistemática é sem dúvida o método mais seguro de seleção que pode ser utilizado na construção de modelos matemáticos baseados em regressão linear múltipla (RLM). A busca sistemática consiste em combinar as m variáveis disponíveis de forma a construir e analisar todas as possíveis equações de regressão com k variáveis e, a partir daí, selecionar as melhores. Este é o único método de seleção que pode assegurar que a melhor combinação será encontrada. A qualidade do ajuste do modelo aos valores observados da atividade biológica pode ser avaliada através do cálculo do coeficiente de correlação (R), do desvio padrão (s) e do teste de Fischer (F). Em termos simplificados, um modelo bem ajustado deverá apresentar valor de R próximo à unidade, s pequeno e F grande (Tavares, 2004).

A resposta biológica produzida por compostos bioativos está diretamente relacionada com os mecanismos de absorção, distribuição e atividade intrínseca Foye, et al. (1995) e Hansch, et al. (1990). Os processos de absorção e distribuição destes compostos são regulados basicamente pela sua hidrofobicidade, uma vez que é necessário que se dissolvam e atravessem as membranas biológicas das plantas, até alcançar seus respectivos sítios de ação (Kubinyi, 1979 e Wermuth, 2000).

Os trabalhos clássicos de Meyer (1899) e Overton (1901) juntamente com as inúmeras correlações encontradas entre a atividade biológica e a hidrofobicidade de compostos demonstraram claramente que esta propriedade desempenha papel fundamental na expressão da bioatividade destes compostos, embora esta seja apenas uma das várias propriedades físico-químicas que, atuando conjuntamente, determinam a atividade biológica de compostos (Hansch e Leo, 1995 e Kubinyi, 1993). Parâmetros tais como frequência de absorção na região do infravermelho e deslocamentos químicos de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, também têm sido empregados com sucesso como descritores estruturais de caráter eletrônico em estudos de REA (Hansch, 1969) e Buchwald e Bodor (1998).

No presente estudo, para correlacionar a atividade biológica das diferentes substâncias húmicas com suas características químicas expressas como descritores estruturais, utilizaram-se, além de métodos quimiométricos (aplicações de métodos estatísticos ou matemáticos em dados de origem química) buscas sistemáticas por meio de RLM (Kubinyi, 1993). O método de RLM foi utilizado por ser historicamente o mais utilizado devido à sua simplicidade e à facilidade de interpretação dos resultados (Ferreira et al., 2002).

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

Hipótese: H0: Existe relação entre as características químicas e a atividade biológica das substâncias húmicas; **H1:** Não existe.

A formulação desta hipótese considera as SH como um agregado formado pela reunião de compostos químicos estabilizados por interações fracas que podem se facilmente rompidas pela adição de pequenas quantidades de ácidos orgânicos. Dessa forma, pequenas subunidades bioativas (eg. fitormônios) têm acesso a receptores celulares específicos e poderiam estar envolvidas em processos de amplificação da sinalização celular.

O objetivo geral deste estudo foi averiguar o efeito de SH com características químicas diferentes sobre a promoção do crescimento radicular e a atividade da H^+ -ATPase em plântulas de milho. Especificamente, pretendeu-se:

- Caracterizar química e espectroscopicamente SH provenientes: i) de seis solos de uma seqüência de solos tropicais do Norte Fluminense; ii) da camada superficial de sete diferentes Latossolos modais do Brasil; iii) de seis subfrações húmicas obtidas por HPSEC preparativa e iv) de oito derivados químicos obtidos por diferentes reações químicas controladas;
- Avaliar a promoção do crescimento de raízes de plântulas de milho, bem como o estímulo à atividade ATPasica pelas diferentes SH;
- Estabelecer uma possível interpretação da relação estrutura-atividade biológica das SH através da utilização de modelos matemáticos obtidos através de buscas sistemáticas por regressão linear múltipla.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Solos e sítios de amostragem

4.1.1. Experimento 1: Bioatividade e características químicas de ácidos húmicos isolados de uma seqüência de solos tropicais

Foram coletadas amostras de horizonte superficial (horizonte A) de seis locais distintos pertencentes a uma seqüência típica de intemperismo de solos localizados na região noroeste do estado do Rio de Janeiro (Quadro 1). Os solos estudados foram coletados após seus perfis serem expostos e classificados de acordo com o manual de classificação da Embrapa (2006). As ordens dominantes foram: Latossolos, Argissolos, Luvisolos, Chernossolos e Neossolos (Quadro 1 - página 33). As amostras de solo foram secas do ar e peneiradas (peneira de malha 2 mm).

O teor de carbono orgânico (g kg^{-1}) foi determinado através do protocolo de Walldey-Black modificado (Yeomans e Bremner, 1988). O teor de nitrogênio (N) total foi determinado pelo método Kjeldahl (Bremner e Mulvaney, 1982). As propriedades químicas dos solos foram determinadas de acordo com o Manual da Embrapa (1997).

Algumas características químicas das amostras são apresentadas no Quadro 1 (página 33).

4.1.2. Experimento 2: Características químicas e promoção do crescimento radicular de ácidos húmicos isolados de sete Latossolos brasileiros

As amostras foram coletadas dos horizontes superficiais (horizonte A) de sete diferentes Latossolos brasileiros, sob cobertura vegetal de pastagens, que foram escolhidos cuidadosamente, para se obter grande variabilidade entre as características químicas dos solos desta ordem. Os perfis respectivos a cada solo já haviam sido previamente examinados pelo Centro Nacional de Pesquisa em Solos (Embrapa, 2006). As características químicas das amostras foram analisadas, de acordo com o manual de solos da Embrapa (1997), e estão resumidas no Quadro 1 (página 33).

4.2. Obtenção, isolamento e purificação das Substâncias Húmicas

4.2.1. Experimentos 1 e 2

Substâncias húmicas foram extraídas e purificadas como relatado em outros trabalhos (Stevenson, 1994; Canellas et al., 2002). Resumidamente, 200 g das amostras dos solos dos experimentos 1 e 2 (seqüência de solos do Norte e Noroeste do Estado do Rio de Janeiro e Latossolos modais do Brasil respectivamente) foram secas ao ar e peneiradas (peneira de malha de 2 mm). A extração das SH foi realizada com NaOH 0,5 mol L⁻¹, na razão solo:solvente de 1:10 (m:v) em atmosfera inerte de N₂. A separação dos ácidos húmicos foi conseguida com o abaixamento do pH da solução até 1,0-1,5 com HCL 6 mol L⁻¹ seguido de centrifugação (5000 g / 30 min). A redissolução e a precipitação foram repetidas três vezes. Em seguida, adicionou-se 200 mL de uma solução de ácido fluorídrico (HF) / clorídrico (HCl) 0,3 mol L⁻¹ submetendo as amostras à agitação durante 8 horas. Após centrifugação (5000 g por 15 min), o precipitado (AH) foi repetidamente lavado (3 a 4 vezes) com água deionizada até teste negativo com AgNO₃, dialisado contra água deionizada utilizando-se membranas com poros de 1000 Da (Thomas Scientific, Inc) e secos por liofilização.

4.2.2. Experimento 3: Composição química e propriedades bioativas de subfrações húmicas separadas a partir de um ácido húmico isolado de vermicomposto

Os AH foram extraídos do vermicomposto e purificados conforme relatado anteriormente. Após as etapas de extração e purificação, os AH foram ressuspensos em água destilada e titulados até pH 7,0 com auxílio de um titulador automático (VIT 909 Videotitrator, Copenhagen) com uma solução de KOH 0,1 mol L⁻¹ sob atmosfera inerte de N₂. O humato de potássio resultante foi filtrado (filtro Millipore 0,45 µm) e liofilizado.

4.2.2.1. Fracionamento dos AH por HPSEC preparativa

A fase móvel de HPSEC consistiu em uma solução preparada em H₂O milli-Q, devidamente ajustada a pH 7,0 com auxílio de KOH (100 mM) e contendo os seguintes reagentes: CH₃CO₂Na (10 mM), KCl (5 mM) e CH₃CO₂H (1 mM). Esta solução padrão foi utilizada para dissolver os humatos de potássio para uma concentração correspondente a 600 mg L⁻¹. A solução húmica obtida foi filtrada através de filtros de microfibras (Wathman GF/C) e carregada em um injetor rotatório *Rheodyne* e um *loop* de 5 mL para injeção da amostra.

O sistema de HPSEC consistiu de um modelo de amostrador automático Gilson modelo 231, uma bomba Gilson modelo 305, uma coluna preparativa Biosep SEC-S-2000 (600 mm x 21,2 mm id), precedida por uma coluna guarda Biosep SEC-2000-S (78,0 mm x 21,2 mm id) ambas Phenomenex (E.U.A.), um detector UV Gilson 116 fixado em 280 nm, e um coletor de fração Gilson FC 205, para coletar automaticamente as frações húmicas. A vazão da eluição foi fixada em 1,5 mL min⁻¹ e todas as corridas cromatográficas foram gravadas automaticamente pelo software Gilson UniPoint. Seis subfrações (SF) de diferentes tamanhos foram obtidas. As SF foram liofilizadas para reduzir o seu volume, ressuspensas em 5 mL de água deionizada, dialisadas em tubos de diálise (Spectra/Por 6, 1kD MW cut-off) contra água deionizada, e liofilizadas novamente.

Foram realizadas 642 injeções da solução de AH (1926 mg), a massa em mg medida para as 6 diferentes subfrações (SF1 a SF6) de tamanhos diferentes

foram: 492,6, 168,6, 369,1, 567,9, 61,0, 136,6, respectivamente, resultando em uma recuperação total de 93% (1798 mg) da massa inicial do AH.

4.2.3. Experimento 4: Bioatividade da matéria húmica transformada quimicamente sobre o crescimento vegetal

As SH de vermicomposto foram extraídas com uma solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹. Após 24 h sob atmosfera de N₂, a suspensão foi centrifugada e o resíduo insolúvel separado. O pH do sobrenadante foi ajustado a pH 3 com HCl 6 mol L⁻¹, e imediatamente passado em uma coluna preenchida com uma resina XAD-8. O material adsorvido na coluna foi eluído com uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹. O pH da solução eluída foi ajustado para 7 pela adição de algumas gotas de HCl 1 mol L⁻¹ e logo após, congelados e liofilizados. Após a liofilização as SH foram redissolvidas em um reduzido volume de água destilada e colocadas em membranas de diálise com porosidade de 1000 Da. A diálise foi realizada contra água deionizada. Após o tempo de diálise, as SH foram liofilizadas novamente antes da etapa de derivatização química.

4.2.3.1. Derivatização química a partir das substâncias húmicas de vermicomposto

4.2.3.1.1. Oxidação com KMnO₄, em meio ácido (D1)

A reação de oxidação das SH foi realizada com KMnO₄ (10 mM) em 20 mL de H₂SO₄ (0,25 mol L⁻¹). Pesou-se 300 mg de SH que foram oxidadas por uma hora em agitação constante, a 45 °C sob atmosfera de N₂. Depois desse tempo, o resíduo oxidado foi abundantemente lavado com água deionizada e titulado automaticamente até pH 7,0 com KOH 0,1 mol L⁻¹ para obtenção do humato de potássio. O sal resultante foi seco por liofilização.

4.2.3.1.2. Oxidação com KMnO₄, em meio alcalino (D2)

A reação de oxidação das SH foi realizado com KMnO₄ (10 mM) em 20 mL de KOH (0,5 mol L⁻¹). Pesou-se 300 mg de SH que foram oxidadas por uma hora

em agitação constante a 45°C sob atmosfera de N₂. Depois desse tempo o resíduo oxidado foi dialisado contra água. O produto da diálise foi titulado automaticamente até pH 7,0 e seco por liofilização.

4.2.3.1.3. Redução com boroidreto de sódio (D3)

A reação de redução de algumas funções (eg.: ligações duplas) das SH foi realizada conforme recomendação de Thorn et al. (1996). Pesou-se 300 mg de SH e dissolveu-se em 100 mL de água e o pH ajustado até 8,0 com NaOH 1 mol L⁻¹ e adicionado 400 mg de NaBH₄ dissolvido em 50 mL de NaOH 0,1 mol L⁻¹. A reação foi conduzida por 2 horas sob atmosfera de N₂. Após esse período a solução foi acidificada até pH 5,0 para destruição do complexo não reagente e dialisada contra água. O produto da diálise foi titulado automaticamente até pH 7,0 e seco por liofilização.

4.2.3.1.4. Hidrólise metanólica-alcálica (D4)

Esse procedimento de hidrólise alcalina das SH foi realizado como recomendado por Spaccini e Piccolo (2007) no qual 300 mg de SH foram colocados para reagir por uma hora sob refluxo a 75°C com 20 mL de KOH 1 mol L⁻¹ e CH₃OH sob atmosfera inerte de N₂. O sobrenadante foi recolhido por centrifugação (15 min, 10000 rpm) e o resíduo da filtração foi submetido ao refluxo com 20 mL de metanol por 30 min por duas vezes. O produto residual foi abundantemente lavado com água deionizada e titulado automaticamente até pH 7,0 com KOH 0,1 mol L⁻¹ para obtenção do humato de potássio. O sal resultante foi seco por liofilização.

4.2.3.1.5. Hidrólise ácida com H₂SO₄ (D5)

A hidrólise ácida foi realizada conforme recomendações de Oades et al. (1970). Na qual 300 mg de SH foram hidrolisadas por 2 horas sob refluxo a 60°C, com 25 mL de H₂SO₄ 2 mol L⁻¹. A suspensão foi filtrada e o resíduo abundantemente lavado com água deionizada e titulado automaticamente até pH

7,0 com KOH 0,1 mol L⁻¹ para obtenção do humato de potássio. O sal resultante foi seco por liofilização.

4.2.3.1.6. Hidrólise ácida com HCl 2 M em dioxano (D6)

Essa reação é tipicamente utilizada para purificação de ligninas (Fengel e Wegener, 1984). A hidrólise foi realizada em 300 mg de SH tratadas com 20 mL de dioxano e HCl 2 mol L⁻¹ por 30 min, sob refluxo a 60°C e atmosfera de N₂. O sobrenadante foi recolhido por centrifugação (30 min, 7000 rpm) e o resíduo lavado três vezes com dioxano (cerca de 50 mL). O resíduo foi abundantemente lavado com água deionizada e titulado automaticamente até pH 7,0 com KOH (0,1 mol L⁻¹) para obtenção do humato de potássio. O sal resultante foi seco por liofilização.

4.2.3.1.7. Extração de lipídios livres (D7)

A extração de componentes alquílicos livres ou não ligados foi realizada colocando-se cerca de 300 mg de SH em aparelho de soxhlet e extração sucessiva com solventes de polaridade diferentes [hexano e diclorometano:metanol (9:1)], por 24 horas a 45°C. O resíduo da extração foi abundantemente lavado com água deionizada e titulado automaticamente até pH 7,0 com KOH 0,1 mol L⁻¹ para obtenção do humato de potássio. O sal resultante foi seco por liofilização.

4.2.3.1.8. Metilação (D8)

A metilação foi realizada com iodeto de metila (CH₃I) depois da alquilação por transferência de fase de acordo com Piccolo et al. (2006). Cerca de 300 mg de SH foram suspensas em 15 mL de brometo de tetrabutilamônio ([[(CH₃(CH₂)₃]₄NBr) 20% em KOH 1 mol L⁻¹. Foram adicionados 20 mL de tetrahydrofurano (THF) e agitado por 24 h à temperatura ambiente para a completa neutralização dos prótons ácidos e então a completa dissolução das SH em [(CH₃(CH₂)₃]₄NBr. O haleto de alquila foi adicionado na quantidade molar de 5% em excesso do conteúdo de H⁺ ácidos presentes nas SH. Especificamente,

0,4 mL de CH_3I foi adicionado como agente metilante. A reação foi conduzida por 12 horas com agitação constante e posteriormente tratada com HCl 1 mol L^{-1} para ajustar o valor a pH 7. O agente alquilante e o THF foram removidos com uso de rotavapor produzindo um resíduo sólido. O $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{NBr}$ residual foi removido com lavagem com água deionizada a 60°C (50 mL) e então dialisado contra água deionizada. O produto da diálise foi titulado até pH 7,0 e seco por liofilização.

4.3. Caracterização das substâncias húmicas

4.3.1. Composição elementar (realizada em todos os experimentos)

A composição elementar das diferentes SH foi obtida após análise em auto-analisador CHN Perkin Elmer (14.800) com amostras de 4 mg de AH em triplicata. O teor de oxigênio foi obtido por diferença e o de cinzas pela incineração de 50 mg dos materiais húmicos por 700°C durante 8 h. 50 mg dos materiais húmicos obtidos foram mineralizados com uma solução de $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$. Tais soluções foram distribuídas em balões volumétricos de 20 mL, e posteriormente analisadas por espectrometria de absorção atômica (Perkin-Elmer AAS Analyst 700) onde não foram encontrados vestígios de potássio (K) e algumas espécies de metais (Fe, Mn, Cu, Al).

4.3.2. Cromatografia de exclusão por tamanho (HPSEC) analítica (realizada em todos os experimentos)

Uma solução de tampão fosfato (pH 7,0) com $0,3 \text{ g L}^{-1}$ de NaN_3 (um agente bacteriostático - detém a proliferação de microrganismos) foi usada para dissolver e eluir por HPSEC analítica cada SH obtida. Amostras ($0,02 \text{ g L}^{-1}$) foram filtradas em filtro de microfibras de vidro e injetadas em um sistema constituído por uma coluna Polysep P-300 (250 mm x 7.8 mm i.d.) da Phenomenex (termoestabilizado a 25°C), uma bomba Perkin-Elmer LC200 conectada a dois detectores em série: Gilson 118 UV/VIS em 280 nm (UV) e detector por índice de refração (IR) (Fysion instruments, Refractomonitor). Foram feitas quantas injeções necessárias para obter um desvio menor que 5% entre os cromatogramas obtidos. A coluna foi previamente calibrada com polímeros (poliestirenos) de 32000 Da, 16000 Da,

8000 Da, 4000 Da e 1100 Da. Os cromatogramas de exclusão por tamanho de cada SH detectados tanto por UV-vis quanto por IR foram obtidos através do programa Origin 6.1[®]. O cálculo da massa molecular média (Mw) das SH foi realizado pelo método de Yau et al. (1979) usando a seguinte equação:

$$Mwa = \frac{\sum h_i M_i}{\sum h_i}$$

Onde h_i é a altura do cromatograma de exclusão por tamanho de cada amostra com um volume (i), e M_i é o tamanho molecular aparente de cada amostra com um volume (i).

4.3.3. Espectroscopia ordenada por difusão (DOSY) (realizada nos experimentos 2, 3 e 4)

Espectros de RMN no estado líquido utilizando-se a técnica de difusão ordenada (DOSY) foram obtidos em um instrumento Bruker Avance[™] 400 MHz que opera na frequência do próton (H^+) em 400,13 MHz, equipado com uma sonda inversa de banda larga Bruker de 5 mm. Todos os espectros foram processados por Bruker Topspin 1.3 (Bruker Biospin). Cinco miligramas de cada SH liofilizada foram dissolvidas em 0,75 mL de água deuterada (D_2O) e transferidos para tubos de RMN de 5 mm.

Os espectros de 1H -RMN foram referenciados pelo deslocamento químico do solvente, ressoando em 4,8 ppm. O pulso 1H de 90 graus foi calibrado usando o sinal da água monodeuterada (HOD). Os espectros de difusão ordenada em duas dimensões (2D-DOSY) foram obtidos utilizando um estímulo por seqüências de pulsos com gradiente bipolar (STEBPGP). 329 scans foram coletados por meio de pulsos de 2,5 milissegundo, variando entre 0,674-32,030 mT cm^{-1} em 32 incrementos, com um tempo de difusão de 100-160 milissegundos, e 8-K pontos de dados em domínio de tempo. A apodização foi conseguida através da multiplicação de dados com uma linha de ampliação de 1,0 Hz, fator de supressão de 1,0, números de interações máximos fixados em 100, fator de sensibilidade de ruído 2 e o número de componentes definido em 1.

Os coeficientes de difusão de sete compostos padrões de massas moleculares conhecidas foram medidos para expressar a difusão em função da

massa molecular, a partir do qual, os dados de difusão foram aproximados para os tamanhos moleculares. Os padrões selecionados CH_3OH (32,0 Da), catecol (110,1 Da), ácido caféico (180,2 Da), catequina (290,0 Da), verde de bromocresol (698,0 Da), e dois de poliestireno sulfonato de 1100 e 6780 Da, foram dissolvidos e adquiridos da mesma maneira como descrito anteriormente para as amostras das SH.

4.3.4. Ressonância Magnética Nuclear do isótopo de carbono de massa treze com rotação no ângulo mágico e polarização cruzada (^{13}C RMN CP/MAS) (realizada em todos os experimentos)

A determinação da funcionalidade química foi realizada pela técnica de ressonância nuclear magnética do isótopo de carbono de massa 13 no estado sólido com transferência de polarização cruzada e rotação no ângulo mágico (^{13}C RMN CP/MAS) nas seguintes condições: foi utilizado um equipamento Bruker AVANCE™ 300 para a aquisição dos espectros 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 ± 1 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 seqüência 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. Todos os decaimentos livres de indução (FID) foram transformados aplicando, primeiro, um “zero filling” de 16 k zero filling, e depois uma função exponencial para ajuste (line broadening, LB) de 100 Hz. A linha base foi corrigida manualmente utilizando-se 14 pontos interpolados por uma função cúbica. Os espectros foram automaticamente integrados nas principais regiões de

deslocamento químico ($^{13}\text{C}\delta$) $^{13}\text{C}\delta$ 165-200 (carbonilas, cetonas, amidas, aldeídos), $^{13}\text{C}\delta$ 150-165 (C aromáticos substituídos), $^{13}\text{C}\delta$ 110-150 (C aromáticos não substituídos) $^{13}\text{C}\delta$ 95-110 (carbono anomérico), $^{13}\text{C}\delta$ 65-95 (sistemas C-O em álcool e ésteres), $^{13}\text{C}\delta$ 45-65 (grupos C-N e carbonos alifáticos ramificados), $^{13}\text{C}\delta$ 25-45 (carbonos sp^3 principalmente CH_2) e $^{13}\text{C}\delta$ 0-25 (carbono sp^3 principalmente CH_3). As áreas correspondentes a C alquílicos ($^{13}\text{C}\delta$ 0-40) e aromáticos ($^{13}\text{C}\delta$ 110-160) foram somadas para quantificar o conteúdo de C hidrofóbico. Da mesma forma as áreas nos intervalos entre 160-200, 90-110, 60-90 e 40-60) foram usadas para estimar a quantidade de carbono hidrofílico.

4.4. Bioatividade das substâncias húmicas

4.4.1. Crescimento das plantas e tratamento com os materiais húmicos (realizado em todos os experimentos)

As sementes de milho (*Zea mays* L., var. UENF 506-6) foram desinfestadas por meio de imersão em uma solução de NaClO (1,0%), por 30 minutos. Em seguida, as sementes foram colocadas em água destilada, por um período de seis horas após a lavagem. Então, as sementes foram acondicionadas em papel, para germinação no escuro a 28°C. Quatro dias após a germinação das sementes de milho, plântulas de milho com aproximadamente 0,5-0,7 cm, foram transferidas para vasos (quatro vasos por tratamento) contendo uma solução de meio mínimo (CaCl_2 2 mM) com zero (controle) ou 2 mM C L^{-1} (Canellas et al., 2002; Zandonadi et al., 2007; Zandonadi et al., 2010) das diferentes SH obtidas. O pH da solução foi ajustado para 5,8-6,0. O meio mínimo (CaCl_2 2 mM) foi utilizado a fim de se evitar qualquer influência dos nutrientes, que poderiam funcionar de maneira sinérgica com as SH, estimulando o desenvolvimento radicular e o metabolismo das plântulas (Pinton et al., 1999b).

Nos experimentos 3 e 4 foi realizado preliminarmente um ensaio de dose resposta onde as plantas foram tratadas com o AH original e suas 6 subfrações obtidas por HPSEC (SF1 a SF6) e/ou com a SH original e seus 8 derivados produzidos (D1 a D8) em diferentes concentrações: 0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mM L^{-1} C (pH 5,8). Após o ensaio de doses, foi conduzido um novo experimento, porém utilizando-se a concentração ótima de cada SH.

4.4.2. Avaliação do crescimento radicular (realizada em todos os experimentos)

Após sete dias de crescimento nas soluções húmicas, raízes de 10 plântulas por vaso foram coletadas para a avaliação do crescimento por meio de análises do número de raízes laterais (avaliado em todos os experimentos), comprimento das raízes principais (avaliado nos experimentos 2, 3 e 4) e comprimento das raízes laterais (avaliado nos experimentos 3 e 4). Outras amostras de raízes também foram escaneadas a 300 dpi para a obtenção da área radicular (avaliada nos experimentos 1 e 2) utilizando-se o programa *Delta T scan* (Delta-T Devices, Cambridge, UK) e pesadas em balança analítica de precisão, imediatamente após a coleta, para determinação das massas fresca (experimento 2) e seca (experimento 1).

4.4.3. Frequência de sítios de mitose (realizada somente no experimento 1)

Os sítios de mitose presentes nas raízes de plântulas de milho foram analisados individualmente (10 repetições por tratamento). O sistema radicular foi coletado, lavado com água e clareado em solução de KOH 0,5 %, durante 20 minutos em banho-maria a 75 °C. Após esse clareamento, as amostras de raízes foram lavadas novamente e mantidas no escuro por pelo menos 14 horas em uma solução de hematoxilina férrica. Após este tempo, as raízes foram enxaguadas em água destilada e clareadas em uma solução de ácido láctico 80%, durante 30 a 90 segundos em banho-maria a 75° C. As raízes inteiras foram transferidas individualmente para placas de petri com água destilada e observadas sob uma lupa esterioscópica, para avaliação do número de sítios de mitose. Esses sítios aparecem como pontos vermelho-escuros contra o fundo da cor do tecido da raiz. O estoque de solução de hematoxilina contém 1 g de hematoxilina, 0,5 g de sulfato férrico de amônio e 50 mL de ácido acético a 45%. A solução estoque (40 vezes concentrada) foi mantida em ambiente protegido da luz, em temperatura ambiente.

4.5. Ensaio Bioquímicos

4.5.1. Isolamento das vesículas de membrana plasmática e atividade ATPásica (realizados em todos os experimentos)

As vesículas de membrana plasmática (MP) foram isoladas de raízes de plântulas de milho crescidas nas soluções com as diferentes SH ou sem (controle) utilizando-se centrifugação diferencial, como descrito por DeMichelis e Spanswich (1986), com algumas modificações (Façanha e de Meis, 1995).

Resumidamente, 10 g (massa fresca) de raízes de plântulas de milho foram homogeneizadas usando grau e pistilo em 20 mL de meio de extração gelado contendo 250 mM de sacarose, 10% de glicerol (m:v), 0,5% de PVP-40 (polivinilpirrolidona-40 KDa), 2 mM de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) 0,2% de BSA (Albumina Sérica Bovina) (m:v) e 0,1 M de tampão Tris [tris-(hidroximetil) aminometano] -HCl, pH 8,0. As soluções-estoque utilizadas na preparação foram mantidas em geladeira. Imediatamente antes do uso, foram adicionados 150 mM de KCl, 2 mM de DTT (ditiotreitól) e 1 mM de PMSF (fluoreto de metilfenilsulfonil). Na manipulação das raízes até a obtenção do homogenato, bem como nas centrifugações, a temperatura foi controlada a fim de que não excedesse 4° C. Além disso, o pH do tampão de extração foi monitorado durante o procedimento, mantendo-se na faixa de 7,5-8,0. Após a maceração, o homogenato resultante foi filtrado através de quatro camadas de gaze e submetido à centrifugação em uma centrífuga himac CP (HITACHI) à 8.000 g durante 15 minutos para a remoção de células não rompidas e núcleos. O sobrenadante foi coletado e submetido a uma nova centrifugação a 10.000 g por 15 minutos em uma ultracentrífuga himac CP 85b (HITACHI), utilizando-se o rotor P70 para o isolamento das mitocôndrias. O precipitado foi coletado e ressuspenso em 1 mL de solução tampão (meio de ressuspenção: glicerol 15 % (v:v), DTT 1 mM, PMSF 1 mM, 10 mM de Tris-HCl pH 7,6 e EDTA 1 mM) e armazenado em freezer a -70°C. O sobrenadante foi submetido à nova centrifugação, agora a 100.000 g por 40 minutos. O precipitado dessa nova centrifugação, denominado “fração microssomal”, foi ressolubilizado em meio de ressuspenção. As vesículas foram coletadas e utilizadas imediatamente ou congeladas em N₂ líquido e

armazenadas a -70°C antes do uso. A concentração de proteína total contida na preparação foi dosada pelo método descrito por Bradford (1976).

A atividade ATPásica foi determinada pela medida da liberação de Pi segundo o método colorimétrico clássico descrito por Fiske e Subbarow (1925). A reação foi iniciada com a adição da proteína e parada através da adição de ácido tricloroacético (TCA) gelado para uma concentração final de 10% (v/v). A revelação do Pi hidrolisado foi realizada mediante a adição de 0,5 mL da mistura contendo Molibdato de Amônio 2% em H_2SO_4 2% + Ácido Ascórbico 1% (100:1) e, após 15 minutos, efetuou-se a leitura em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2000 no comprimento de onda de 750 nm. Nessa reação, o fosfato é incorporado dentro de um complexo fósforo-molibdênio e reduzido com ácido ascórbico para formar a cor azul. Composição do meio de reação: 10 mM de Mops [ácido 3-(N-morfino) propano sulfônico]-Tris pH 6,5, 3 mM de MgCl_2 , 100 mM de KCl, 1 mM de ATP e 50 μg de proteína. Cerca de 80-95% da atividade da H^+ -ATPase das vesículas medida foi inibida por 0,2 mM de vanadato, um inibidor muito eficiente da ATPase do tipo P (DeMichelis e Spanswick, 1986). Em todos os experimentos, a atividade hidrolítica da H^+ -ATPase foi medida a 30°C , com ou sem vanadato, e a diferença entre essas duas atividades foi atribuída à atividade específica da ATPase tipo P.

4.5.2. Bombeamento de H^+ da ATPase de membrana plasmática (realizado somente no experimento 3)

O gradiente eletroquímico de H^+ gerado pela H^+ -ATPase de MP foi estimado por meio do decréscimo de fluorescência da sonda sensível a pH 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA) (415/485 nm excitação/emissão), e expressa em porcentagem. O meio de reação foi composto de 10 mM de Mops-Tris (pH 6,5), 100 mM de KCl, 5 mM de MgCl_2 , ACMA 2 μM e 50 μg de proteína. A reação foi desencadeada pela adição de ATP (1 mM). A adição, tanto de 3 μM FCCP quanto de 2 μM NH_4Cl cessa o gradiente de H^+ formado pela hidrólise de ATP.

4.5.3. Western Blot (realizado somente no experimento 2)

Vesículas de MP isoladas de raízes de plântulas de milho tratadas ou não (controle) com AH isolados de sete diferentes Latossolos, foram incubadas a 65°C, durante 10 min, em 7,5% (massa/vol). Foi utilizada a técnica de eletroforese em gel para separar as proteínas desnaturadas por massa. As proteínas foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose, onde foi utilizado como sonda um anticorpo específico para a H⁺-ATPase. Os imunossinais foram quantificados densitometricamente como descrito por Retamal et al. (1999).

4.5.4. Microscopia eletrônica de varredura em raízes de *Zea mays* (realizada somente no experimento 3)

As raízes de plântulas de milho, cultivadas por uma semana nos diferentes tratamentos (AH original e suas 6 subfrações) foram preparadas para a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Resumidamente, as amostras de raízes foram coletadas e imediatamente cortadas manualmente, com uma lâmina nova em segmentos de 1,0 cm de comprimento sobre uma placa de parafina, e cuidadosamente imersas em uma solução fixadora contendo glutaraldeído 2,5% e formaldeído 4,0% em 0,05 M tampão fosfato (pH 7,0). As amostras foram fixadas por 24 horas à temperatura ambiente, lavadas três vezes no mesmo tampão e desidratadas em uma série gradual de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%; - 1 h cada). As amostras foram imersas na solução de acetona 100% por duas vezes consecutivas e ali permaneceram até serem secas pelo método do ponto crítico com CO₂ no equipamento Critical Point Dryer (BAL-TEC CPD 030) e metalizadas com prata (Ag) no equipamento Sputter Coater (BAL-TEC SCD 050), após montagem em suportes de alumínio. Posteriormente, as amostras de raízes de milho foram observadas em 15-25 kV com o uso de um microscópio eletrônico de varredura (DSEM 962 - Zeiss). Para cada tratamento, cinco segmentos foram totalmente digitalizados pela MEV para obter uma imagem representativa dos pêlos radiculares, densidade e tamanho.

4.5.5. Ensaio com micro-tomateiro DR5::GUS (realizado somente no experimento 4)

Plântulas transgênicas de tomateiro (cv. Micro-Tom) contendo o gene repórter responsivo para auxina (DR5::GUS) com quatro dias de idade foram tratadas com a SH original e seus 8 derivados químicos com o objetivo de confirmar a detecção da atividade tipo auxínica das SH (Zandonadi et al. 2007, Dobbss et al., 2007). Após a determinação das concentrações adequadas, as plântulas de micro-tomateiro foram tratadas por quatro dias com as melhores doses dos tratamentos, ou somente com o meio mínimo (CaCl_2 2 mM - controle).

Os ensaios histoquímicos para detecção da atividade da enzima β -glucuronidase (GUS) foram realizados de acordo com o protocolo desenvolvido por Jefferson et al. (1987), com algumas modificações no que se diz respeito à incubação dos segmentos de raízes. Neste experimento os segmentos de raízes, foram embebidos no tampão de ensaio da enzima GUS [$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 100mM (pH 7,0), $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10mM, Triton X-100 0,1% (v/v)], contendo 1mM de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D glucuronide (X-Gluc) e foram incubados a 37°C por 1 dia no escuro.

As amostras foram visualizadas e as imagens capturadas em um microscópio ótico Axioplan - Zeiss, acoplado a um sistema de aquisição de imagem digital, câmera ZVS-47EC, utilizando o programa Analysis[®].

Na presença da enzima GUS, o substrato cromogênico, X-Gluc, forma um precipitado de cor azul intensa no tecido, identificando a atividade positiva da enzima β -glucuronidase (GUS) e, portanto, a expressão transiente do gene marcador GUS, dirigido pelo promotor DR5. As sementes de micro-tomateiro DR5::GUS foram gentilmente cedidas pelo Dr. Luiz José Garcia-Martinez da Universidad Politécnica de Valencia, na Espanha.

4.6. Relação entre as características químicas e a atividade biológica das substâncias húmicas (REA)

Para identificação das características químicas de todas as SH utilizadas nesse trabalho que mais se relacionam estreitamente com a atividade biológica, realizou-se uma busca sistemática por regressão multilinear com um ou dois

membros. Para atender esse objetivo foi utilizando o software BuildQSAR. Preliminarmente, descritores com elevado grau de autocorrelação foram eliminados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Propriedades das amostras de solos e vermicomposto

Com o intuito de obter-se SH diversificadas quanto às suas características químicas foram utilizadas nesse estudo diferentes fontes de matéria orgânica (MO). Nos experimentos 1 e 2 foram utilizados solos de uma seqüência do Norte Fluminense e diferentes Latossolos modais do Brasil, respectivamente, como fonte de MO. Já para realização dos experimentos 3 e 4, o vermicomposto foi utilizado devido ao seu alto teor de C (Quadro 1), fornecendo grandes quantidades de SH, necessárias para a obtenção das subfrações de diferentes Mw por HPSEC (experimento 3) e os derivados químicos produzidos a partir de diferentes reações químicas controladas (experimento 4). As características químicas dos solos selecionados para os experimentos 1 e 2 e do vermicomposto utilizado nos experimentos 3 e 4 são mostradas no Quadro 1.

No experimento 1, O Neossolo Litólico aparece em uma fase inicial de intemperismo, devido à ausência de qualquer horizonte diagnóstico, devido a espessura do horizonte A e o contato lítico abrupto. O complexo de troca deste solo é saturado por Al^{3+} (Quadro 1), o que é presumivelmente decorrente do material de origem. O Chernossolo Argilúvico e Chernossolo Rêndzico pertencem a um estágio intermediário de intemperismo, devido à presença de argila de alta atividade, bem como, por possuírem metais alcalinos terrosos saturando o complexo sortivo. As argilas de atividade baixa e a baixa saturação de bases caracterizam o estágio mais avançado de intemperismo na qual foram

classificadas as demais classes de solo: Argissolo, Luvisolo e Latossolo (Quadro 1). O conteúdo de C orgânico variou em uma faixa de 10 a 44 g C kg⁻¹, e o rendimento de extração dos AH foi entre 1,1 a 25 g C_{AH} kg⁻¹ de solo.

Os solos selecionados do experimento 2 apresentam características típicas de solos altamente intemperizados (Quadro 1). As mineralogias desses solos são dominadas por óxidos e hidróxidos de Fe e Al e caulinita. No Latossolo 5 (L5), foi observado a presença de vermiculita intercamada (Quadro 1). Os solos foram ordenados de acordo com o índice Ki (relação molar Si/Al). Uma elevada variação química pode ser observada entre as amostras dos solos, que de uma maneira geral, são ácidos e possuem baixa CTC. O teor de carbono orgânico total variou entre 8,6-43,0 g C kg⁻¹. O conteúdo de AH nas amostras desses solos foi relativamente baixo (Quadro 1).

O vermicomposto utilizado nos experimentos 3 e 4 foi obtido após vermicompostagem a partir da mistura de resíduos vegetais de *Panicum maximum* Jacq. e esterco bovino (5:1 v/v). Os resíduos orgânicos foram misturados e as minhocas foram adicionadas na proporção de 5 kg de minhoca (*Eisenia foetida*) por m³ de resíduo orgânico. A cama de minhocas e de resíduos orgânicos foi preparada pela primeira vez em um recipiente onde outras camadas adicionais de resíduos orgânicos foram periodicamente adicionadas sobre a primeira em função da temperatura, até que a altura da pilha chegasse a 50 cm. Ao final do processo de transformação (3 meses após a adição dos resíduos), as minhocas foram removidas da pilha. A composição da matéria orgânica resultante da vermicompostagem é mostrada no Quadro 1.

5.2. Características químicas e conformacionais das substâncias húmicas

A composição elementar e as razões atômicas de todas as SH utilizadas nos 4 experimentos estão listadas no Quadro 2. As características elementares são freqüentemente utilizadas para relacionar características químicas de SH com a gênese e/ou propriedades da origem de extração (Stevenson, 1994). No experimento 1 os AH isolados da seqüência de solos no Norte Fluminense apresentaram teores de C variando de 450,7-558,8 g kg⁻¹, enquanto que os teores de N e H variaram entre 33,1-62,2 e 52,6-58,7 g kg⁻¹, respectivamente (Quadro 2).

Quadro 1. Algumas propriedades das amostras de solos e do vermicomposto utilizados.

Exp. 1: Seqüência de solos no Norte do Estado do Rio de Janeiro																	
Tipo de solo	Ref.	Localização	Prof. Cm	Kf ⁽¹⁾	Mineralogia ⁽²⁾	Estágio de intemperismo	Vegetação Atual	pH H ₂ O	CTC cmol _c kg ⁻¹	Al ³⁺ kg ⁻¹	Ctotal g kg ⁻¹	C _{AH} g kg ⁻¹	N	C/N	Argila g kg ⁻¹ solo	AH**	C _{AH} /C* 100 ⁽³⁾
Neossolo Litólico	1	22°15'30"/43°00'22"	0-10	1,94	-	inicial	Floresta Nativa	5,4	7,4	1,8	44	-	2,5	17,4	132	25,0	-
Chernossolo Argilúvico	2	21°1'303"/41°49'30"	0-20	1,91	-	intermediário	Pastagem	5,6	14,0	0,0	16	-	1,8	9,1	470	2,4	-
Chernossolo Rêndzico	3	21°25'15"/41°41'12"	0-15	2,60	-	intermediário	Pastagem	8,0	28,9	0,0	26	-	4,4	6,0	420	3,4	-
Argissolo Vermelho-Amarelo	4	21°12'33"/41°50'24"	0-18	1,80	-	Avançado	Pastagem	5,8	8,7	0,0	12	-	1,5	10,6	270	1,4	-
Luvissolo Crômico	5	21°12'52"/41°50'05"	0-22	1,84	-	Avançado	Pastagem	6,2	9,7	0,0	14	-	1,4	9,9	240	2,0	-
Latossolo Amarelo Coeso	6	21°43'06"/41°20'25"	0-23	1,60	-	Avançado	Pastagem	5,1	5,7	0,1	10	-	0,9	13,6	250	1,1	-
Exp. 2: Camada superficial de Latossolos modais do Brasil																	
Latossolo Vermelho perférrico húmico	L1	20°04' S e 43°58' W Nova lima, MG	0-11	0,1	ht>>g>gt	Avançado	Pastagem	5,8	2,1	-	12,8	0,02	1,8	7,1	280	-	0,16
Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico húmico	L2	22°16' S e 42°31' W Nova Friburgo, RJ	0-22	0,7	k>>gt	Avançado	Pastagem	5,2	3,0	-	29,5	0,08	3,3	8,9	490	-	0,27
Latossolo Vermelho-Amarelo distroférrico típico	L3	22°16' S e 42°31' W Mendes, RJ	0-16	1,5	k>>gt>g>ht	Avançado	Pastagem	5,3	6,5	-	12,5	0,06	1,6	7,8	490	-	0,48
Latossolo Vermelho distrófico típico	L4	22° 31' S and 43°43' W Brasília, DF	0-14	1,6	g>ht>gt	Avançado	Pastagem	5,1	5,2	-	25,4	0,07	1,2	21,2	750	-	0,28
Latossolo Bruno distroférrico rúbrico	L5	28°17' S e 54°15' W Vacaria, RS	0-23	1,8	k>>va>g>gt	Avançado	Pastagem	6,1	8,6	-	43,0	0,05	3,9	11,0	720	-	0,12

Quadro 1. Continuação

Latossolo Vermelho Acriférico típico	L6	15°47' S e 47° 55' W Santo Ângelo, RS	0-21	2,0	k>>gt;g	Avançado	Pastagem	6,8	7,4	-	10,7	0,06	2,0	5,4	620	-	0,56
Latossolo Amarelo eutrófico típico	L7	21°45' e 41°19' W Campos, RJ	0-17	2,1	k>>gt;	Avançado	Pastagem	5,1	3,2	-	8,6	0,09	0,9	9,6	380	-	1,05
Exp. 3 e 4: Subfrações de AH obtidos por cromatografia de exclusão por tamanho e derivados químicos produzidos a partir de reações controladas																	
Vermicomposto			-	-	-	-	-	6,2	-	-	134,0	16,4	13,3	10	-	-	-

⁽¹⁾ SiO₂/Al₂O₃ - Classificação proposta por Moniz (1972)

⁽²⁾ Composição mineralógica obtida através de difratogramas de raio X - k: caulinita; g: gibbsita; gt: goetita; ht: hematita; va: vermiculita aluminosa. Valores extraídos de Barreto (1986); Anjos (1985) e Rodrigues e Klant (1978).

⁽³⁾ Rendimento de extração dos AH

O maior teor de C e menor teor de N foram encontrados no AH1 isolado do solo “mais jovem”, enquanto que o menor teor de H foi o encontrado no AH5 isolado do solo “mais antigo”. A alta relação C/N e a baixa relação H/C são consideradas indicadoras de um alto grau de estabilidade do húmus e de uma grande quantidade de estruturas condensadas (Stevenson, 1994), que têm sido tradicionalmente interpretadas como índices de avanço da “humificação”. No entanto, a maior relação C/N foi encontrada para o AH1 (solo menos intemperizado) e a menor para AH2 (solo em estágio intermediário de intemperismo). AH isolados de solos altamente intemperizados mostraram relação H/C entre 1,29 e 1,45 e os de solos em fase inicial de intemperismo na faixa de 1,25-1,32. Os valores da relação O/C foram maiores para os AH isolados dos solos mais intemperizados, sugerindo maior oxidação dos AH isolados destes solos (Quadro 2).

No experimento 2, foram analisadas as características de AH isolados da camada superficial de Latossolos modais de diferentes regiões do país. O teor de C nos AH variou de 432 a 563 g kg⁻¹, enquanto o de O variou de 321,0 a 453,0 g kg⁻¹ (Quadro 2). O teor de N encontrado nos AH isolados de Latossolos foi elevado, entre 47 e 69 g kg⁻¹, demonstrando que SH solúveis são uma importante fonte de compostos nitrogenados armazenados nos diferentes Latossolos. Curtin & Wen (1999) verificaram que as frações solúveis de matéria orgânica foram significativamente correlacionadas com o N-mineralizável do solo e Jacquín & Vong (1989) identificaram os AF como a principal fração alcalino solúvel responsável pela estabilização de N adicionado na forma de (15NH₄)₂SO₄. O teor relativamente elevado de N e baixo de C confere valores baixos (em torno de 11) para a relação C/N dos AH (Quadro 2). A mineralogia predominada por óxidos de ferro impede a evolução das SH gerando baixo acúmulo de C e complexação de formas de N em reações com OH fenólicos.

Com relação ao experimento 3, as subfrações de AH obtidas por HPSEC preparativa apresentaram valores de C, H, N e O, obtidos pela análise da composição elementar, diferentes do AH original (Quadro 2). Todas as subfrações, de uma maneira geral, apresentaram menores valores de C e N, mas um maior conteúdo de O em relação ao AH original isolado de vermicomposto. O conteúdo de H foi maior nas subfrações 1, 2 e 5 quando comparadas com o AH original. Os baixos teores de C, N e H, e o alto conteúdo de O encontrado para a

subfração 4 (SF4), podem ser explicados devido ao fato de que esta corresponde à parte difusa do pico cromatográfico. Pode-se notar também que os conteúdos de N foram menores nas subfrações do que no AH original. Em trabalho anterior, Egeberg et al. (1999) relataram um enriquecimento de nitrogênio no início da eluição, bem como a presença de frações altamente agregadas quando a matéria húmica dissolvida foi submetida à HPSEC. Portanto, é concebível que o conteúdo de N das moléculas húmicas seja mobilizado a partir de frações menos fortemente associadas, que são separadas por HPSEC em maiores volumes de eluição, podendo ser, posteriormente perdidas durante o período da etapa de diálise.

A relação H/C (Quadro 2) é freqüentemente utilizada para indicar o conteúdo predominante de carbono aromático/insaturado (valores baixos) ou de carbono alifático (valores altos) em materiais húmicos (Rice e MacCarthy, 1991). Em comparação com o AH original, as seis subfrações de tamanhos moleculares diferentes, mostraram um aumento nos valores da relação H/C, atingindo o maior valor na SF5, deste modo, pode-se sugerir que existe um baixo conteúdo de carbonos insaturados nas SF de diferentes tamanhos, com o menor teor na SF5. A relação C/N confirmou a distribuição desigual de N nas diferentes subfrações. Os valores da relação C/N variaram de 15 a 24 indicando que todas as SF podem estar sujeitas à degradação microbiana. Observa-se também que todas as SF tiveram um aumento significativo na relação O/C, com exceção da SF2. Os valores desta relação geralmente aumentam com a redução do tamanho molecular nominal das frações (Quadro 2).

No experimento 4, a composição elementar tanto das SH quanto de seus derivados obtidos por diferentes reações químicas é mostrada no Quadro 2. A hidrólise metanólica-alcálica (D4) produziu a maior redução no conteúdo de C em relação à SH original, enquanto que as outras modificações químicas, invariavelmente, aumentaram o conteúdo de C dos derivados húmicos produzidos. O teor de N foi reduzido em maior intensidade com a hidrólise metanólica-alcálica (D4), mantiveram valores semelhantes à SH original após a hidrólise ácida com HCl 2 M em dioxano (D6) e a extração de lipídios livres (D7), e foi consideravelmente aumentado nas outras reações químicas. Apesar das variações no conteúdo de C e N, os valores da relação atômica C/N não apresentaram alterações, com exceção do D6, que gerou um grande aumento no

conteúdo de C (Quadro 2). O teor de H foi um pouco reduzido no D4 em comparação com a SH original, enquanto houve poucas mudanças nos outros derivados químicos.

Quadro 2. Composição elementar (livre de água e cinzas) e relações atômicas das substâncias húmicas estudadas.

Amostras	C	H	N	O	C/N	H/C	O/C
g kg⁻¹							
Exp. 1: Seqüência de solos no Norte Fluminense							
AH1	558,8	58,2	33,1	349,8	19,70	1,25	0,47
AH2	534,6	58,7	62,2	344,5	10,03	1,32	0,48
AH3	540,8	56,4	44,7	358,2	14,11	1,25	0,50
AH4	489,1	57,8	41,1	411,9	13,88	1,42	0,63
AH5	490,5	52,6	40,6	416,3	14,09	1,29	0,64
AH6	450,7	54,6	44,1	450,5	11,92	1,45	0,75
Média	510,8	56,4	44,3	388,5	14,0	1,3	0,6
DP*	40,7	2,4	9,7	43,6	3,2	0,1	0,1
Exp. 2: Camada Superficial de Latossolos modais do Brasil							
AH _{L1}	503,0	51,0	50,0	396,0	11,74	1,22	0,59
AH _{L2}	432,0	57,0	58,0	453,0	8,69	1,58	0,79
AH _{L3}	505,0	61,0	69,0	365,0	8,54	1,45	0,54
AH _{L4}	536,0	63,0	53,0	348,0	11,80	1,41	0,49
AH _{L5}	468,0	61,0	47,0	424,0	11,62	1,56	0,68
AH _{L6}	542,0	64,0	59,0	335,0	10,72	1,42	0,46
AH _{L7}	563,0	64,0	53,0	321,0	12,37	1,37	0,43
Média	507,0	60,1	55,6	377,4	10,8	1,4	0,6
DP*	45,4	4,7	7,3	48,7	1,6	0,1	0,1
Exp. 3: Subfrações de AH obtidos por cromatografia de exclusão por tamanho							
AH ORIGINAL	446,0	45,1	37,5	471,4	13,88	1,21	0,79
SF1	324,1	53,0	19,8	603,1	19,10	1,96	1,40
SF2	450,0	53,1	32,5	464,4	16,15	1,42	0,77
SF3	282,8	40,8	16,9	659,5	19,52	1,73	1,75
SF4	158,2	26,6	7,40	807,8	24,94	2,02	3,83
SF5	265,7	51,1	20,5	662,6	15,12	2,31	1,87
SF6	210,4	33,6	10,3	745,7	23,83	1,92	2,66
Média	305,3	43,3	20,7	630,6	18,9	1,8	1,9
DP*	110,9	10,3	11,0	129,2	4,2	0,4	1,1
Exp. 4: Derivados químicos produzidos a partir de reações controladas							
SH ORIGINAL	252,4	23,8	27,4	696,4	10,75	1,13	2,07
D1	281,4	28,0	43,2	647,4	7,60	1,19	1,73
D2	312,5	30,2	40,7	616,6	8,96	1,16	1,48
D3	250,0	22,4	36,9	690,7	7,90	1,08	2,07
D4	216,4	19,9	20,4	743,3	12,38	1,10	2,58
D5	316,0	29,4	33,7	620,9	10,94	1,12	1,47
D6	478,4	30,8	27,1	463,7	20,60	0,77	0,73
D7	276,0	23,8	26,9	673,3	11,97	1,03	1,83
D8	332,3	29,8	44,0	593,9	8,81	1,08	1,34
Média	301,7	26,5	33,4	638,5	11,1	1,1	1,7
DP*	75,8	4,0	8,4	80,4	4,0	0,1	0,5

* Desvio padrão da média

A distribuição de massa/tamanho moleculares das 29 SH obtidas nesse estudo foi analisada por HPSEC analítica (Quadro 3). Para a calibração foi utilizado um padrão comercialmente disponível, o sulfonato de poliestireno, que difere das substâncias húmicas em seu raio hidrodinâmico e sua interação com a coluna de fase estacionária (Piccolo et al., 2001). Como resultado, os tamanhos moleculares das SH calculados a partir dos cromatogramas de exclusão por tamanho foram apenas nominais, estando relacionados com o padrão selecionado. O peso médio nominal (Mw) das SH foi medido a partir dos resultados da cromatografia pelos detectores de ultravioleta (UV-vis) e índice de refração (IR) (Quadro 3) para estimar respectivamente a absorção de luz em 280 nm e a distribuição em massa da matéria húmica eluída através de mudanças de polarização (Piccolo et al., 2001). O tamanho molecular das substâncias húmicas também foi avaliado pela espectroscopia de difusão ordenada (DOSY). Esta técnica é particularmente adequada para amostras complexas, tais como as SH, pois fornece uma correlação direta da difusão translacional (D) com o deslocamento químico na segunda dimensão. Portanto, uma separação prévia dos componentes da mistura, neste caso, não é exigida (Cobas et al., 2005). Além disso, o tamanho molecular aparente (Mw) pode ser derivado da difusão translacional com base em uma curva de calibração construída com a difusividade dos padrões de pesos moleculares conhecidos (Šmejkalová e Piccolo, 2008). Os coeficientes de difusão fornecem informações sobre o raio hidrodinâmico das associações de moléculas em solução e podem ser usados para calcular as dimensões moleculares (DM) dos componentes húmicos (Šmejkalová e Piccolo, 2008).

Os valores nominais das DM, calculados por DOSY-RMN a partir de um padrão de calibração são apresentados no Quadro 3. As SH possuem DM por volta de 4800, 6800, 6200 e 8000 Da para constituintes aromáticos (8-6 ppm), carboidratos (6-4 ppm), complexos alquílicos (4-2 ppm), e lineares alquílicos (2-0 ppm), respectivamente (Quadro 3).

Com relação a massa/tamanho médios nominais (Mw) dos AH isolados de uma seqüência de solos do Norte Fluminense (experimento 1), pode-se observar que o AH5, isolado do solo em maior estágio de intemperismo da seqüência, possui o maior tamanho molecular relativo quando comparado com os demais AH. Em contrapartida, o AH1, extraído do solo “mais jovem”, mostrou menor

tamanho molecular. Os valores de Mwa detectados por UV-vis, seguiram de um modo geral os da detecção por IR. Na detecção por IR a ordem dos valores de Mwa foi: AH5>AH6>AH4>AH3>AH2>AH1 (Quadro 3).

No experimento 2, os AH isolados dos sete diferentes Latossolos apresentaram a mesma ordem decrescente de tamanho molecular nominal: AH_{L6}>AH_{L7}≥AH_{L5}>AH_{L4}~AH_{L1}~AH_{L2}>AH_{L3}, para ambos os detectores (IR e UV-vis), no entanto, os valores nominais (Mw) foram consideravelmente mais baixos na detecção por IR (Quadro 3). Com relação à espectroscopia de DOSY-RMN, neste experimento, a relação entre a difusão translacional e tamanho molecular aparente foi: $D = 67,4 * Mw^{-0,48}$ ($R^2 = 0,98$, $P < 0,01$). Os coeficientes de difusão dos AH do experimento 2, avaliados nas quatro diferentes regiões espectrais de DOSY-RMN são mostrados no Quadro 3, revelando que os menores tamanhos moleculares em todos os AH foram devido aos constituintes aromáticos, ao passo que os constituintes carboidratos foram em geral os componentes com as maiores dimensões. Uma exceção foi observada para o AH_{L7}, onde os maiores valores de Mw foram encontrados para complexos alquílicos.

O tamanho molecular dos AH pode ser considerado como uma função da força das interações hidrofóbicas e o raio de hidratação das várias moléculas heterogêneas associadas às estruturas húmicas (Piccolo, 2002; Šmejkalová e Piccolo, 2008). É, portanto, possível atribuir as maiores dimensões moleculares para os AH_{L5}, AH_{L6} e AH_{L7} (Quadro 3) devido aos maiores índices combinados de C-alquílico e C-carboidratos (Quadro 3). Já foi demonstrado por Piccolo e colaboradores (2002), que os componentes alquílicos promovem as maiores dimensões moleculares aos AH devido à sua forte interação hidrofóbica, levando a grandes agregados moleculares. Opostamente, as amostras dos AH_{L1}, AH_{L3} e AH_{L4}, onde o C alquílico e carboidratos foram responsáveis por um tamanho molecular significativamente menor (Quadro 3), a agregação molecular global resultou em uma menor dimensão. A dimensão molecular intermediária do AH_{L2}, portanto, parece ser causada pelo tamanho médio dos componentes alquílicos e carboidratos e tamanho muito menor devido aos componentes aromáticos (Quadro 3).

No experimento 3 foram obtidas subfrações de AH isolados de vermicomposto de acordo com o processo de cromatografia líquida de alta eficiência preparativa por exclusão de tamanho. O cromatograma HPSEC

apresentou um perfil bi-modal, típico de SH e foram coletadas arbitrariamente seis subfrações em diferentes intervalos de eluição (Figura 3). A matéria húmica com maior tamanho molecular nominal diz respeito à primeira subfração (SF1), seguido pela segunda (SF2) com um tamanho molecular intermediário. A terceira subfração (SF3) pertence a um pico largo e difuso em torno de 50 mL de eluição, seguido por um material de absorção decrescente coletado como subfração 4 (SF4). Dois picos adicionais apareceram no final do cromatograma e foram coletados como SF5 e SF6, respectivamente.

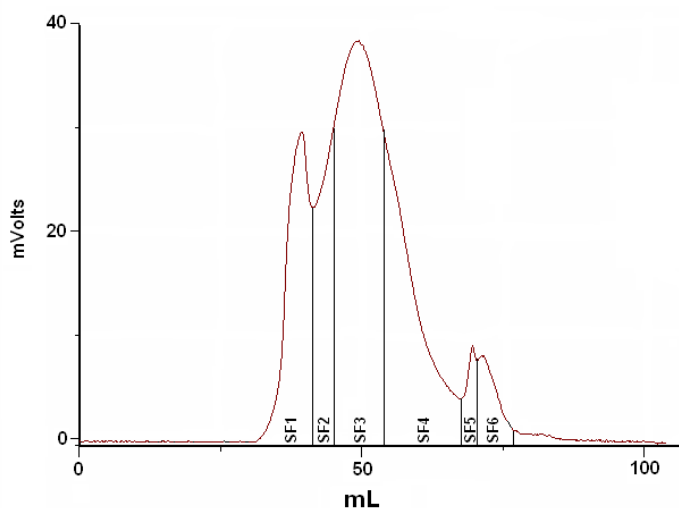


Figura 3. Cromatograma de exclusão por tamanho por HPSEC preparativa de um AH isolado de vermicomposto.

As diferenças na complexidade molecular das subfrações húmicas obtidas por HPSEC preparativa foram mostradas também pela técnica de DOSY-NMR, que tem sido bastante utilizada para avaliar qualitativamente a distribuição dos coeficientes de difusão em substâncias húmicas (Šmejkalová e Piccolo, 2008). As projeções em DOSY 2-D do AH original e suas subfrações são mostradas no Quadro 3 e na Figura 4.

O AH original apresentou valores médios de difusão dos componentes moleculares negativos (correspondente às maiores dimensões) maiores do que os observados para todas as SF. Como observado anteriormente (Piccolo et al., 2002), a distribuição dos componentes moleculares mudou nas subfrações húmicas, onde os compostos aromáticos se concentraram principalmente nas subfrações de tamanho maior, enquanto que o maior teor de carboidratos foi encontrado em subfrações de menor tamanho (Quadro 3, Figura 4).

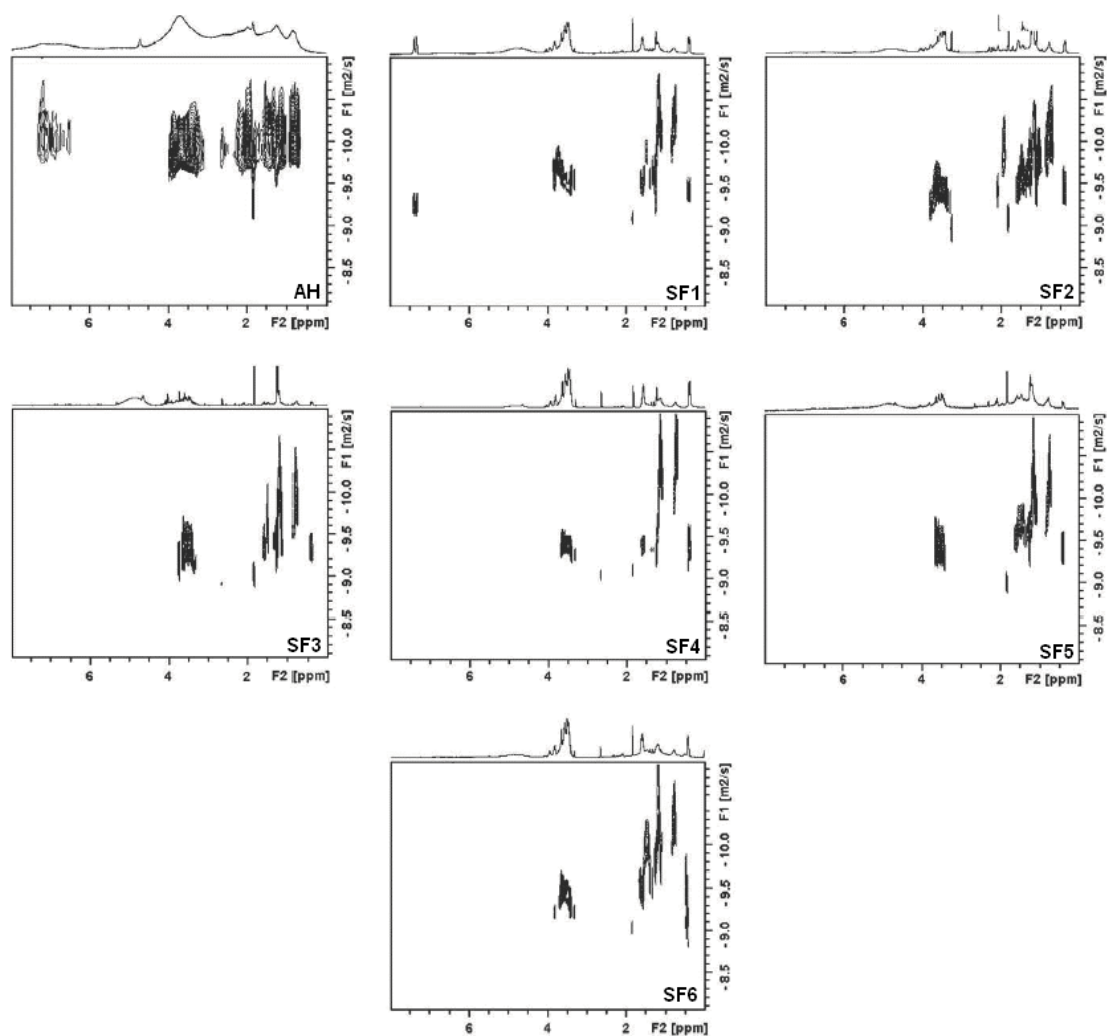


Figura 4. Projeções DOSY ^1H -RMN dos AH e suas subfrações obtidas por HPSEC preparativa (experimento 3).

O tamanho da molécula dissolvida está relacionado com o seu raio hidrodinâmico e com a energia de solvatação em água (Tanford, 1991). O efeito hidrofóbico reduz a energia de solvatação das moléculas apolares, favorecendo suas associações. Assim, os componentes hidrofóbicos húmicos diminuem a energia livre total da solução pela auto-associação e separação da água, atuando como grandes agregados supramoleculares, enquanto os constituintes hidrofílicos são facilmente solvatados e dispersos na solução, atuando como associações relativas de menor porte. Este mecanismo termodinâmico aumenta a dimensão molecular das associações hidrofóbicas húmicas, que são eluídas antes das mais hidrofílicas (de menor tamanho molecular) das colunas de HPSEC (Piccolo, 2002;

Piccolo et al., 2002). Isso explica o maior teor de componentes polares e o menor valor de aromaticidade encontrados nas subfrações 3, 4, 5 e 6 em relação às SF1 e SF2 eluídas precocemente (Quadro 3 e 4). De fato, as subfrações de diferentes tamanhos, sofreram uma simplificação da associação molecular por HPSEC, produzindo projeções em DOSY 2-D cujos constituintes carboidratos e as associações de alguns componentes alquílicos revelaram dimensões progressivamente menores. Quando comparados ao AH original, os valores de DM para as mesmas regiões espectrais foram substancialmente reduzidos nas subfrações, confirmando assim a ocorrência do rompimento das associações intermoleculares fracas durante a separação por HPSEC. Apenas alguns componentes alquílicos mantiveram uma associação suficiente forte por todo intervalo de separação das SF, fornecendo agregados com DM comparáveis aos valores encontrados para o AH original. Isso indica uma força estável das ligações hidrofóbicas intermoleculares fracas das SH (Piccolo, 2002; Piccolo et al, 2002). Além disso, já que os componentes aromático (apenas visível para SF1) e carboidrato mostraram valores de difusão menores em comparação aos componentes alquílicos (Quadro 3), é concebível que tais estruturas, inicialmente presas nos domínios hidrofóbicos-alquílicos das subfrações húmicas, possam ser liberadas em meio aquoso após dissolução.

Com relação aos derivados químicos produzidos a partir de reações controladas (experimento 4), as medidas de M_w baseadas na detecção por UV-vis tiveram uma boa reprodutibilidade. Enquanto que, as medidas pelo detector por IR foram menos precisas. No entanto, os dois detectores indicaram que os valores de M_w diminuíram significativamente quando as SH foram submetidas à oxidação com $KMnO_4$, em meio ácido (D1), hidrólise metanólica-alcalina (D4), hidrólise ácida com HCl 2 M em dioxano (D6) e extração de lipídios livres (D7). Por outro lado, a oxidação com $KMnO_4$, em meio alcalino (D2), a redução com borohidreto de sódio (D3) e a hidrólise ácida com H_2SO_4 (D5) aumentaram os valores de M_w . A reação de metilação (D8) proporcionou valores de M_w similares e maiores em relação ao controle, respectivamente, pela detecção por IR e UV-vis. Esses fenômenos foram observados anteriormente por Piccolo (2002) e foram atribuídos à conjugação de cromóforos na solução húmica proporcionando um aumento na absorção da energia.

O tamanho molecular das SH e seus derivados químicos produzidos foram avaliados também pela técnica de DOSY ^1H -RMN. Quando comparado com a SH original, o derivado resultante da hidrólise ácida com H_2SO_4 (D5) apresentou sinais de prótons (aromáticos), pertencentes a componentes moleculares de maiores tamanhos. Em contrapartida, os derivados químicos 1, 3 e 6 apresentaram constituintes húmicos de menor tamanho molecular, no que se diz respeito aos compostos aromáticos (Quadro 3). Os componentes moleculares observados em C-O/C-N (carboidratos), possuíram valores sempre menores em relação ao controle (SH original), com D6 mostrando os valores mais baixos, exceto para o D2 (KMnO_4 em meio alcalino) e o D7 (extração de lipídios livres) onde não houve diferença significativa em relação à SH original. Paralelamente, o intervalo entre 0-4 ppm (componentes alquílicos) indica um aumento do tamanho molecular devido aos componentes alquílicos no derivado 5 (hidrólise ácida com H_2SO_4), enquanto o restante dos derivados químicos das SH resultaram em menores tamanhos moleculares quando comparados com a SH original, com exceção do D4, cujo valor não diferiu significativamente do controle. A reação de metilação (D8), promoveu decréscimos do tamanho molecular em todos os componentes orgânicos (aromáticos, carboidratos e alquílicos) em comparação com a SH original (Quadro 3).

Quadro 3. Massa/tamanho molecular médio aparente (Mwa) e polidispersividade (*P*) de AH isolados de uma seqüência de solos tropicais com diferentes graus de intemperismo determinados por IR e UV-vis. Apresentados somente os dados brutos. Valores originais (médias \pm desvio padrões) estão apresentados nas Figuras 1A, 2A, 3A, 4A e 5A do apêndice.

Materiais Húmicos	IR		UV		DOSY- ¹ H RMN			
	Mwa	<i>P</i>	Mwa	<i>p</i>	8-6	6-4	4-2	2-0
ppm								
Exp. 1: Sequência de solos do Norte Fluminense								
AH1	2045	1,1	1295	1,2	-	-	-	-
AH2	4082	1,7	9343	3,2	-	-	-	-
AH3	8694	2,4	5602	2,8	-	-	-	-
AH4	10497	4,3	7952	3,2	-	-	-	-
AH5	28438	7,29	32526	4,3	-	-	-	-
AH6	10590	4,08	1375	5,0	-	-	-	-
Exp. 2: Camada Superficial de Latossolos modais do Brasil								
AH _{L1}	1229	3,5	7100	2,4	3200	3900	3490	-
AH _{L2}	2635	2,5	5574	1,4	2250	4350	3600	-
AH _{L3}	727	9,5	2433	1,1	2650	3900	3250	-
AH _{L4}	1354	14,3	8661	2,9	3000	3600	3200	-
AH _{L5}	5655	1,0	12437	3,4	3350	5200	4900	-
AH _{L6}	10272	10,6	17000	3,0	2950	4000	3990	-
AH _{L7}	5771	2,1	12502	6,0	2970	3700	5800	-
Exp. 3: Subfrações de AH obtidos por cromatografia de exclusão por tamanho								
AH ORIGINAL	32872	-	-	-	4816	6866	6296	8010
SF1	22142	-	-	-	259	967	3445	2764
SF2	18373	-	-	-	n.v. ^c	1075	2913	4904
SF3	17875	-	-	-	n.v.	570	2149	5859
SF4	13189	-	-	-	n.v.	642	2360	3485
SF5	8309	-	-	-	n.v.	1277	4435	6186
SF6	7010	-	-	-	n.v.	797	5653	2906
Exp. 4: Derivados químicos produzidos a partir de reações controladas								
SH ORIGINAL	4860	-	5500	-	3241	4465	2978	-
D1	4100	-	3800	-	2290	2948	1750	-
D2	5850	-	6900	-	3226	4238	1222	-
D3	7860	-	8000	-	1813	2644	1739	-
D4	4050	-	2500	-	2990	3937	2969	-
D5	5600	-	5600	-	3656	3454	3801	-
D6	1100	-	900	-	n.v.	2264	1694	-
D7	4000	-	3050	-	3072	4238	2798	-
D8	4700	-	6750	-	2126	2782	2170	-

5.2.1 ^{13}C RMN CP/MAS

Os espectros de ^{13}C RMN CP/MAS das 29 diferentes SH utilizadas nos 4 experimentos são mostrados nas Figuras 3, 4, 5, 6 respectivamente e os detalhes sobre a distribuição de carbono dos materiais foram obtidos pela integração dos deslocamentos químicos dos espectros de ^{13}C RMN CP/MAS (Quadro 4).

No experimento 1, a distribuição de carbono mostrou que a quantidade relativa de carbono alquila em geral diminuiu com o aumento do grau de intemperismo dos solos, enquanto que os grupos carbolixa, C-N/C-O, e carbonos aromáticos/olefínicos aumentaram nos AH isolados dos solos mais intemperizados (Quadro 4). Os espectros de ^{13}C RMN CP/MAS dos AH1 e AH2 registraram sinais mais intensos de C alquílico centrado em 28 e 36 ppm, enquanto que o AH3 é caracterizado por um sinal relativamente mais intenso na região entre 40 e 90 ppm (Figura 3). Em contrapartida, os AH isolados de solos altamente intemperizados (AH4, AH5 e AH6) apresentaram um pequeno sinal adicional em 13-15 ppm e um grande conteúdo relativo de carbonos sp^2 . Os sinais em 28 e 36 ppm são normalmente atribuídos aos grupos metileno de cadeia alquílica, enquanto aqueles centrados em 13-15 ppm são atribuídos aos grupos metil terminal das cadeias de carbono (Wilson, 1987).

O AH1 e AH2 provenientes de solos menos intemperizados mostraram um predomínio de ressonância de 0-44 ppm (área do espectro referente ao C hidrofóbico) devido à espécie de C sp^3 , enquanto os AH 5 e 6 isolados de solos altamente intemperizados apresentaram sinais intensos nos intervalos de 110 a 160 e 160 a 200 ppm, que correspondem a espécies de C sp^2 em estruturas aromáticas / olefínicas e carbonilas de cetonas, quinonas, aldeídos e carboxilas, respectivamente (Figura 3).

O aumento de estruturas aromáticas / olefínicas em AH já foi previamente relatado, como resultado da humificação (Ikeya et al., 2004; Xiaoli et al., 2007), enquanto que a diminuição no teor de C-alquílico também foi observada em outros estudos utilizando-se AH isolados de solos tropicais sob a alteração da vegetação de floresta para um solo cultivável (Spaccini et al., 2006). O AH3 isolado de um solo com grau intermediário de intemperismo apresentou uma ressonância marcada entre os deslocamentos químicos 44-92 ppm (Figura 3). Esta região é normalmente atribuída aos sistemas CO, tais como carboidratos,

éteres, grupos C-N e complexo de carbonos alifáticos, que podem ser atribuídos à celulose e aos resíduos de lignina, material proteico e metabólitos microbianos, respectivamente (Wilson, 1987).

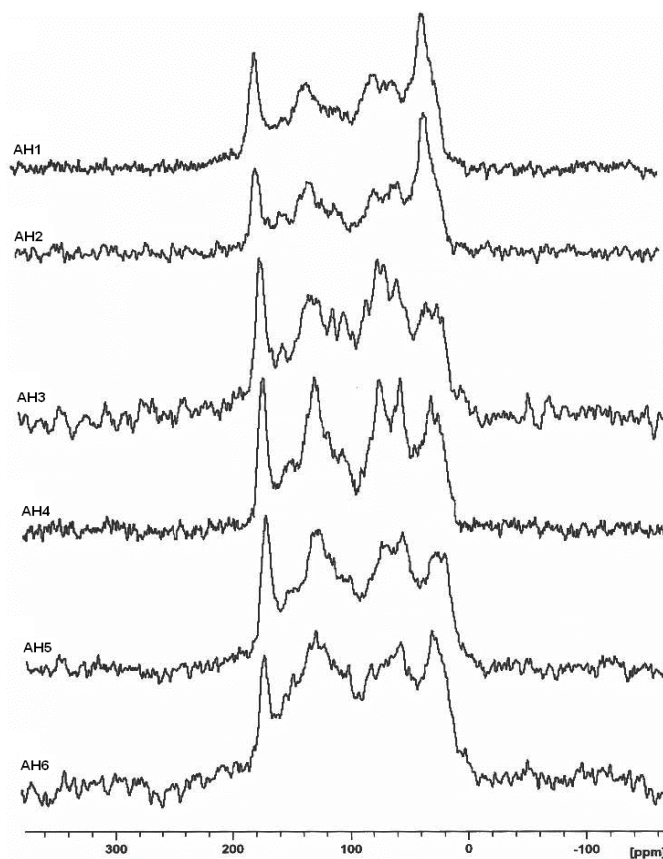


Figura 3. Espectros de ^{13}C RMN CP/MAS dos AH isolados de Neossolo Litólico (AH1); Chernossolo Argilúvico (AH2); Chernossolo Rêndzico (AH3); Argissolo Vermelho-Amarelo (AH4); Luvisso Crômico (AH5) e Latossolo Amarelo Coeso (AH6).

Detalhes sobre a distribuição de carbono dos materiais húmicos utilizados no experimento 2 foram obtidos pela integração dos deslocamentos químicos (Quadro 4) dos espectros de ^{13}C RMN CP/MAS (Figura 4). De acordo com os espectros, pode-se observar uma diminuição na área destinada a C-aromático, uma ressonância dominante de carboidratos e uma presença constante de C-alifático.

A maior quantidade de C-alquílico (0-40 ppm) e o menor conteúdo de C-aromáticos (110-160 ppm) foram encontrados para o AH_{L5}. No entanto, a abundância relativamente grande de C-alquílico e C-aromático encontrados em todos os AH indica uma contribuição geral do carbono hidrofóbico (HB) em suas composições (Quadro 4).

A hidrofobicidade dos AH do segundo experimento é compatível com a boa qualidade estrutural dos Latossolos gerada pela estrita associação de C aromáticos e alquílicos com as partículas de argila e silte (Spaccini et al., 2006). Nenhuma variação substancial entre as amostras de AH foi observada nos intervalos dos espectros de RMN comumente atribuídos a C-N e C-metoxil e C-O de carboidratos (40-110 ppm). As diferenças nas áreas dos espectros correspondentes a C-carboxílico (160-200 ppm) foram pequenas.

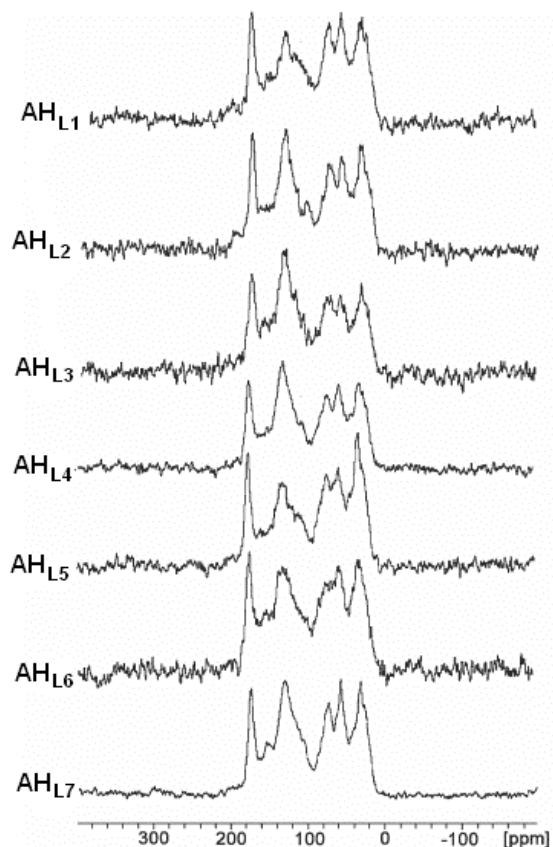


Figura 4. Espectros de ^{13}C RMN CP/MAS dos AH isolados de sete diferentes Latossolos brasileiros.

No terceiro experimento as diferenças estruturais entre o AH original e suas 6 subfrações também foram avaliadas pela espectroscopia de ^{13}C RMN CP/MAS (Figura 5). O espectro da amostra de AH indica a presença de C-aromático (em cerca de 130 ppm), C-carboidrato (em cerca de 70 ppm), C-metoxila (lignina) e/ou C ligados a peptídeos (em cerca de 60 ppm). Outros picos significativos estão centrados em 172, 152, 31 e 24 ppm, que são comumente atribuídos a COOH, C-fenólico e constituintes CH_3 e CH_2 , respectivamente. Em comparação com o AH, os espectros de ^{13}C RMN CP/MAS das suas subfrações de diferentes tamanhos,

revelaram uma diminuição na área destinada a C-aromático, uma ressonância dominante de carboidratos e uma presença constante de C-alifático (Figura 5).

Estas observações foram confirmadas pela integração dos sinais dos espectros de RMN, que forneceram abundâncias relativas dos núcleos de carbono em quatro diferentes regiões do espectro (Quadro 4). A distribuição relativa de C indicou uma diminuição significativa na área referente a carbonos carboxílicos nas seis subfrações húmicas quando comparadas com o AH original. A mesma tendência foi observada para a área referente a carbonos aromáticos, que reduziram consideravelmente, principalmente, nas subfrações 3, 4, 5 e 6. Por outro lado, a porcentagem da distribuição de C referente a C-carboidrato aumentou nos espectros das SF em comparação com o espectro do AH original e, de maneira geral, os valores aumentaram com a diminuição do tamanho das SF (Figura 5).

A redução drástica da ressonância em torno de 56 ppm nos espectros das subfrações húmicas está em conformidade com a redução observada nos teores de N das SF (Quadro 3). Nas subfrações húmicas 1 e 2 (SF1 e SF2) as porcentagens de carbonos alifáticos permaneceram semelhantes à do AH original e aumentaram progressivamente nas outras subfrações. Esse comportamento se reflete na redução linear do grau de aromaticidade e do conteúdo de C-carboxila e C-anomérico ($R^2 = -0,87$, $p < 0,002$; $R^2 = -0,74$, $p < 0,01$ e $R^2 = -0,59$, $p < 0,04$, respectivamente), com a redução dos seus tamanhos nominais, enquanto que uma tendência oposta foi observada para C-carboidrato e C-alifático ($R^2 = 0,81$, $p < 0,005$, $R^2 = 0,68$, $p < 0,02$, respectivamente) (Quadro 4).

A hidrofobicidade das amostras húmicas, como mostrado pela relação HB/HI (Quadro 4), sugere que o conteúdo de C aromático das SF1 e SF2 contribui para a associação hidrofóbica de suas moléculas húmicas em solução, justificando seus grandes tamanhos moleculares e conseqüentemente suas eluições precoces da coluna HPSEC. A eluição tardia das subfrações 5 e 6 reflete seus maiores conteúdos de C-hidrofílico (carboidratos), que indicam um menor grau de associações hidrofóbicas entre as moléculas.

Resultados de ^{13}C RMN CP/MAS têm sido usados para agrupar características moleculares de subfrações húmicas pela Análise de Componentes Principais (ACP), que tem se mostrado útil para comparar dados de RMN das substâncias húmicas (Šmejkalová et al., 2008). O método Biplot de ACP (Figura

11A - apêndice) revelou diferenças químicas entre as subfrações de diferentes tamanhos obtidas de acordo com suas eluições por HPSEC, sendo as mais hidrofóbicas (SF1 e SF2) separadas distinta e espacialmente das mais hidrofílicas SF5 e SF6.

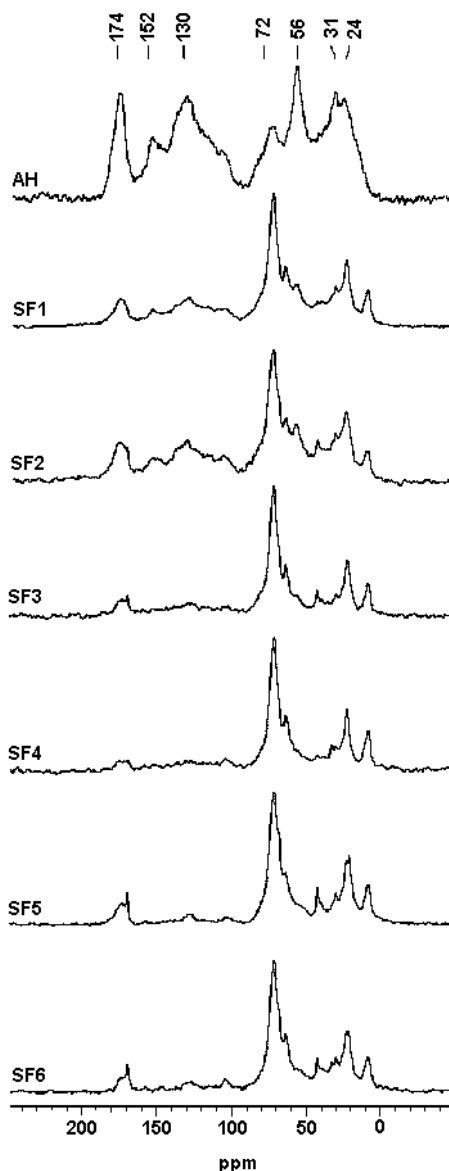


Figura 5. Espectros de ^{13}C RMN CP/MAS do AH isolado de vermicomposto e das suas subfrações obtidas por HPSEC.

A distribuição de carbono da SH original e dos seus derivados químicos produzidos (quarto experimento) foi revelada a partir dos espectros de ^{13}C RMN CP/MAS (Figura 6). O espectro da SH original apresentou sinais nas regiões de C-alquílico (0-40 ppm) e C-O/C-N (40-110 ppm), correspondentes, respectivamente, aos grupos metil-metileno de terminais de ceras e poliésteres, e

grupos metoxi de guaiacil, encontrados principalmente em compostos de lignina. Adicionalmente, também apresentaram sinais correspondentes a C2, C3 e C5 e C-anomérico (103 ppm) de unidades de celulose e hemicelulose (Spaccini e Piccolo, 2008) (Figura 6). A região correspondente ao C-aromático foi caracterizada por uma banda alargada centrada em 136 ppm de ressonâncias sobrepostas de anéis benzênicos substituídos e não-substituídos e por um pequeno sinal em 151 ppm atribuído ao C-fenólico. Um sinal visível e acentuado de carbonos quaternários em 173 ppm é comumente atribuído a grupos carboxila, ésteres e amidas (Knicker, et al., 1995). Quando comparado com a SH original, os espectros dos derivados húmicos apresentaram alterações principalmente na intensidade relativa dos deslocamentos químicos supracitados (Figura 6).

O Quadro 4 mostra a distribuição de carbono a partir da integração dos espectros das SH após as diferentes reações químicas. O conteúdo de C-carboxílico foi pouco afetado pelas reações químicas, exceto por uma diminuição após a hidrólise ácida com H_2SO_4 (D5). Os conteúdos de C-aromático e fenólico aumentaram substancialmente após as reações ácidas (D1, D5 e D6), tiveram um leve aumento após a extração de lipídios livres (D7), e não se alteraram após as outras reações químicas. Os sinais de C-O/C-N foram reduzidos, principalmente nas SH submetidas às oxidações com $KMnO_4$ e na hidrólise ácida com H_2SO_4 (D5). Já os sinais correspondentes ao C-alquílico aumentaram seus valores nos derivados 1, 2 e 5 e 8 enquanto foram diminuídos pela redução com borohidreto de sódio (D3), nos derivados D4 e D6 e na extração de lipídios livres (D7).

Essas mudanças estruturais ocorridas durante as diferentes reações químicas foram refletidas no índice de hidrofobicidade (HB/HI) (Quadro 4). As reações de hidrólise ácida (D5), as oxidações (D1 e D2) e a metilação (D8) aumentaram o caráter hidrofóbico do material húmico, enquanto que a extração de lipídios livres (D7) diminuiu sua hidrofobicidade. Apesar das mudanças significativas na composição elementar e nos perfis de RMN, o restante das SH modificadas quimicamente não mostrou variações significativas no índice de hidrofobicidade (HB/HI) (Quadro 4). A maioria das modificações químicas aumentou a intensidade de C aromáticos e fenólicos nos derivados húmicos, com exceção do D8 (Quadro 4).

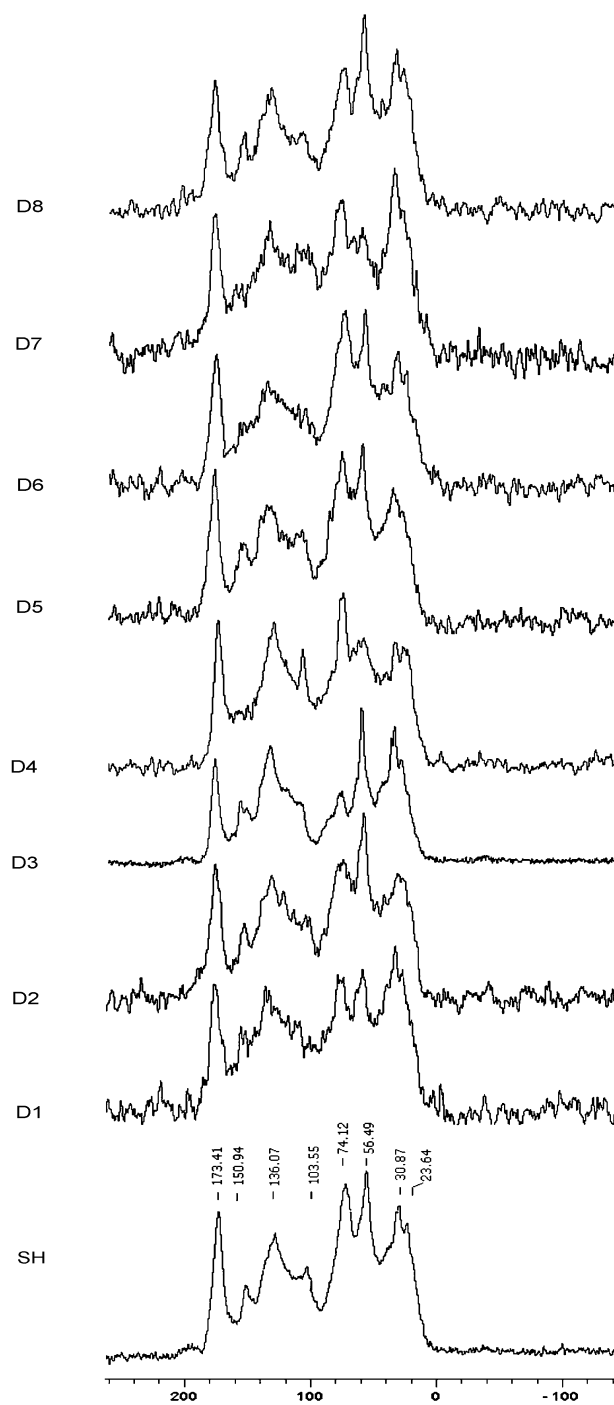


Figura 6. Espectros de ^{13}C RMN CP/MAS da SH original e seus 8 derivados produzidos através de diferentes reações químicas.

Quadro 4. Distribuição de carbono (%) nas regiões destinadas a diferentes deslocamentos químicos dos espectros de ^{13}C RMN CP/MAS de todos os materiais húmicos (experimento 1 ao 4)

Materiais Húmicos	Deslocamentos Químicos				GA*	HB**	HI***	HB/HI
	PPM							
	160-200	110-160	40-110	0-40				
Exp. 1: Sequência de solos do Norte Fluminense								
AH1	20.0	19.0	30.0	31.0	23.8	50.0	50.0	1.00
AH2	20.0	20.0	38.0	22.0	25.0	42.0	58.0	0.72
AH3	14.0	22.0	33.0	30.0	25.9	52.0	47.0	1.13
AH4	15.0	27.0	36.0	21.0	32.1	48.0	51.0	0.92
AH5	22.0	23.0	30.0	26.0	29.1	49.0	52.0	0.96
AH6	16.0	25.0	35.0	23.0	30.1	48.0	51.0	0.92
Exp. 2: Camada Superficial de Latossolos modais do Brasil								
AH _{L1}	12.2	27.6	38.4	21.9	31.4	49,5	42,3	1,17
AH _{L2}	12.8	33.6	33.7	19.9	38.5	53,5	40,9	1,31
AH _{L3}	12.4	36.7	32.9	18.0	41.9	54,7	37,9	1,44
AH _{L4}	10.9	33.0	34.8	21.3	37.0	54,3	38,4	1,41
AH _{L5}	11.2	25.5	36.9	26.4	28.7	51,9	40,6	1,28
AH _{L6}	11.4	30.3	36.5	21.9	34.2	52,2	39,7	1,31
AH _{L7}	10.9	32.6	35.6	20.8	36.6	53,4	39,1	1,37
Exp. 3: Subfrações de AH obtidos por cromatografia de exclusão por tamanho								
AH original	11.2	30.6	32.0	26.3	34.4	56.9	43.2	1.32
SF1	7.5	18.4	47.2	26.9	19.9	45.3	54.7	0.83
SF2	9.0	21.1	44.7	25.1	23.2	46.2	53.7	0.86
SF3	6.9	13.0	52.2	28.0	13.9	41.0	59.1	0.69
SF4	3.5	9.0	56.2	31.3	9.3	40.3	59.7	0.67
SF5	6.8	5.2	51.8	36.2	5.6	41.4	58.6	0.71
SF6	5.2	6.8	52.3	35.8	7.2	42.6	57.5	0.74
Exp. 4: Derivados químicos produzidos a partir de reações controladas								
SH original	10.0	23.9	42.9	23.2	26.6	47.1	52.9	0.89
D1	9.8	26.2	38.7	25.4	29.0	51.6	48.5	1.06
D2	10.2	25.1	39.9	24.7	28.0	49.8	50.1	0.99
D3	9.9	24.2	43.9	22.0	26.9	46.2	53.8	0.86
D4	10.6	25.8	42.4	21.2	28.9	47.0	53.0	0.89
D5	8.5	30.7	35.1	25.7	33.6	56.4	43.6	1.29
D6	9.3	27.3	42.7	20.8	30.1	48.1	52.0	0.93
D7	10.8	25.6	43.3	20.3	28.7	45.9	54.1	0.85
D8	9.9	23.9	41.2	25.0	26.5	48.9	51.1	0.96

GA* (grau de aromaticidade) = $[(110-160) / (0-160)] * 100$

HB** (C hidrofóbico) = $[(110-160) + (0-40)]$

HI*** (C hidrofílico) = $[(160-200) + (110-140)]$

Como se pode observar nos Quadros 2, 3 e 4 as diferentes SH utilizadas nesse estudo são quimicamente distintas com relação aos valores da composição elementar, massa/tamanho moleculares nominais (obtidos por HPSEC analítica e por DOSY-RMN) e suas funcionalidades químicas. Com a finalidade exploratória de se verificar a maior ou menor sensibilidade das variáveis químicas no que diz

respeito à separação das 29 diferentes SH, foi empregada a técnica multivariada de componentes principais (Figura 7). Em tal técnica, a primeira componente é descrita de forma que os pontos resultem na maior variabilidade possível entre todas as coordenadas lineares; e a segunda deve ter o máximo de variância igual ou menor que a primeira, sendo ortogonal a esta. Esta nova configuração de pontos é obtida pela determinação de autovetores a partir da matriz de variância (Gnanadesikan, 1977).

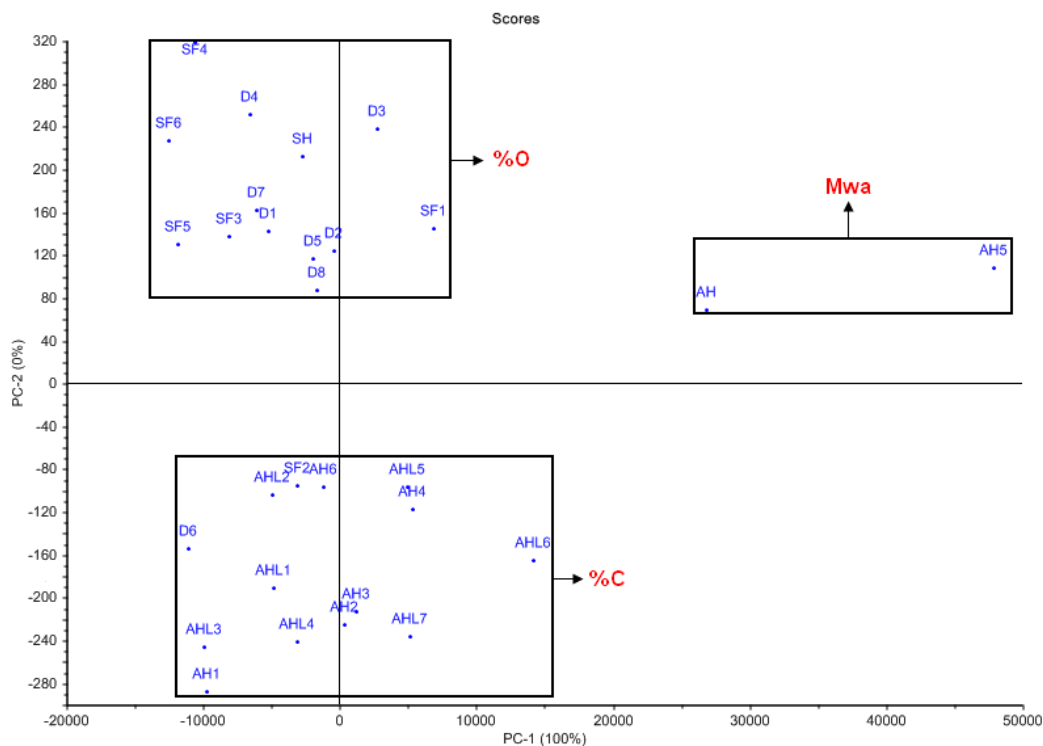


Figura 7. Dispersão das 29 SH em relação aos seus escores, nos dois primeiros componentes principais.

De acordo com a Figura 7 observa-se que 100% da variância total foi explicada pelo primeiro componente principal, podendo-se distinguir facilmente 3 grupos semelhantes entre as SH. Os componentes principais, ao contrário das variáveis originais, não possuem significado físico, mas podem ser interpretados como uma combinação linear dessas variáveis originais. No caso mostrado na Figura 7, as variáveis originais de maior peso em ordem crescente dos valores absolutos dos loadings foram: a massa/tamanho molecular médio aparente (Mwa); % de O e % de C. Tais variáveis originais foram as mais importantes sob o ponto de vista estatístico.

5.3. Bioatividade das substâncias húmicas

No experimento 1, os aspectos funcionais e morfológicos das raízes de plântulas de milho foram intensamente afetados pelo tratamento com os AH. Na condição experimental, o baixo teor de cinzas dos AH e o curto período de exposição das plantas à solução de AH sugerem que os efeitos sobre o crescimento da raiz não são dependentes do seu conteúdo inorgânico residual. Neste contexto, percebe-se que plântulas de milho com 7 dias de idade dependem mais da quantidade de nutrientes armazenados no seu endosperma do que os recursos nutricionais presentes na solução de cultivo. Como se pode observar no Quadro 7, as plântulas de milho tratadas por sete dias com os 6 diferentes AH isolados do primeiro experimento, tiveram um aumento de 237 a 395% na massa seca de raízes, em relação ao controle.

O tratamento das plântulas com AH aumentou também o número de sítios de mitose e o de raízes laterais em 35 a 62% e de 14 a 108%, respectivamente (Quadro 7). Tanto o alongamento quanto a proliferação de raízes secundárias (laterais) foram estimulados pelos AH, resultando em um aumento da área radicular na ordem de 89 a 378% (Quadro 7).

Os resultados sobre o efeito dos AH isolados de sete diferentes Latossolos brasileiros (segundo experimento) sobre o crescimento radicular são mostrados no Quadro 7. Substâncias húmicas extraídas de vermicomposto (Canellas et al., 2002; Zandonadi et al., 2007); argissolos altamente intemperizados (Canellas e Façanha, 2004), ou de uma seqüência de solos tropicais (Canellas et al., 2008a) mostraram-se bioativas na mesma concentração utilizada neste experimento (2,0 mM de C AH L⁻¹). Esta dose foi a que promoveu o maior estímulo às plantas e foi utilizada para comparar os efeitos dos sete diferentes AH sobre as diferentes características avaliadas, atreladas, ao crescimento vegetal. Apesar de todos os AH estimularem o crescimento das raízes, a magnitude de resposta às plantas variou entre as amostras de AH. O aumento na área radicular, por exemplo, variou de 25% a 330%. De uma maneira geral, os AH isolados dos sete diferentes Latossolos promoveram um aumento no comprimento total das raízes de plântulas de milho (tanto nas raízes principais quanto nas laterais) em relação ao controle.

No terceiro experimento, foi explorada a distribuição de tamanho molecular e a função de diferentes subfrações húmicas separadas de um AH isolado de vermicomposto por HPSEC preparativa. Essas frações húmicas de diferentes tamanhos moleculares induziram a proliferação de raízes laterais em plântulas de milho (Quadro 7) e promoveram um aumento na área superficial radicular. Tanto o AH original quanto suas subfrações alteraram a arquitetura radicular e os padrões de crescimento das raízes de plântulas de milho, proporcionando um maior tamanho de raízes, raízes mais ramificadas, e / ou maior proliferação de pêlos radiculares (Figura 7).

Um modelo quadrático descreve os efeitos de diferentes concentrações de AH e suas subfrações húmicas sobre o número de raízes laterais de plântulas de milho (Quadro 5). Não houve uma diferença marcante entre as melhores concentrações obtidas para o AH original e suas subfrações, cujo maior valor obtido foi de 1,98 mM C L⁻¹ para as plântulas de milho (Quadro 5).

Quadro 5. Equações de regressão; coeficientes de determinação da regressão (R²); desvios padrão da regressão (DP), níveis de significância da regressão (valores-*p*) e doses ótimas para o número de raízes laterais emergidas em plântulas de *Zea mays* (milho) após tratamento com diferentes doses de C (mM C L⁻¹) do AH e suas 6 diferentes subfrações obtidas por HPSEC (n=18).

Materiais Húmicos	Equações de Regressão ($y = b_2x^2 + b_1x + b_0$)	R ²	DP	<i>p</i>	Doses ótimas
					(dx/dy): $b_1 + 2(b_2)x = 0$
<i>Zea Mays L.</i>					
AH original	$y = -1,77x^2 + 6,52x + 4,50$	0,77	1,83	<0,0001	1,85
SF1	$y = -2,17x^2 + 7,91x + 4,96$	0,82	1,93	<0,0001	1,83
SF2	$y = -2,72x^2 + 10,80x + 4,60$	0,68	3,33	<0,001	1,98
SF3	$y = -2,55x^2 + 9,53x + 4,08$	0,84	2,12	<0,0001	1,87
SF4	$y = -2,34x^2 + 8,89x + 4,32$	0,67	2,99	<0,0012	1,90
SF5	$y = -2,23x^2 + 8,40x + 3,74$	0,88	1,52	<0,0001	1,89
SF6	$y = -1,87x^2 + 6,46x + 6,35$	0,80	1,92	<0,0001	1,73

Os resultados quantitativos do crescimento radicular (Quadro 7) foram normalizados em relação às plântulas controle que foram cultivadas em meio mínimo (CaCl₂ 2 mM L⁻¹), a pH 5,8. A concentração ótima tanto para o AH original quanto para suas subfrações foi capaz de promover aumentos e reduções sobre o comprimento das raízes principais de plântulas de milho. Reduções significativas foram observadas nos tratamentos com as subfrações 1, 2, 4 e 6, enquanto que a SF3 gerou um incremento de 25% (Quadro 7). O tratamento com AH original não

desenvolveu nenhum tipo de estímulo às plântulas de milho em relação ao tratamento controle. Outras características morfológicas, tais como o número e o comprimento de raízes laterais, e a densidade de raízes laterais foram, invariavelmente, incrementadas tanto no tratamento com AH original quanto com suas subfrações (Quadro 7).

Na verdade, o número de raízes laterais em plântulas de milho foi incrementado de 84 a 165% (Quadro 7). Além disso, o comprimento de raízes laterais também foi aumentado pelo tratamento com o AH original, bem como pelos tratamentos com todas as subfrações. Com relação a esta característica morfológica pode-se destacar que as subfrações 2, 4 e 6 promoveram os maiores estímulos (Quadro 7). Uma tendência semelhante foi observada para a formação de pêlos radiculares e seu desenvolvimento ao longo da raiz (Figura 7). Tanto o tratamento com o AH original quanto com as subfrações húmicas promoveram incrementos no crescimento e densidade dos pêlos radiculares em plântulas de milho, com exceção da SF3.

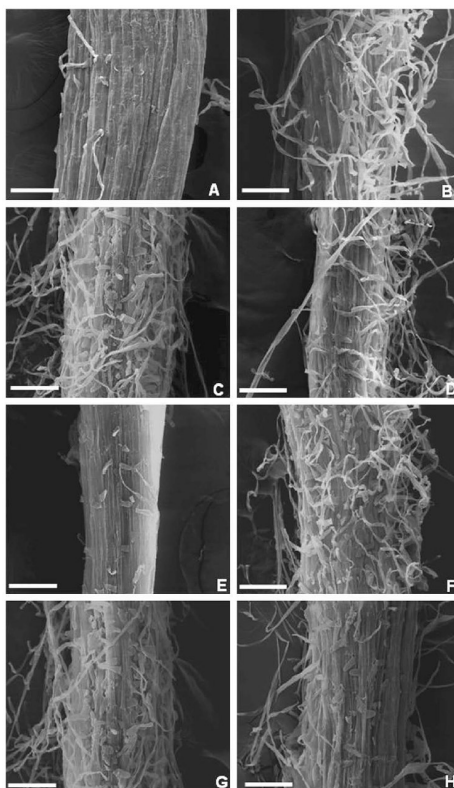


Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura de segmentos de raízes de plântulas de milho tratadas com o AH (B) e suas diferentes subfrações (SF1-SF6, respectivamente, C-H). Observe o tamanho, a densidade e distribuição de pêlos nas raízes de plântulas de milho em relação ao controle (A). Barras = 100 μ m.

Os resultados dos materiais húmicos, referentes ao experimento 4 (SH original e seus derivados obtidos por diferentes reações químicas), sobre o crescimento radicular de plântulas de milho também são apresentados no Quadro 7. A concentração ótima obtida para emissão de raízes laterais para a SH original foi de 2,05 mM de C (Quadro 6). A dose ótima encontrada para o derivado metilado (D8) foi a menor para a indução de raízes laterais em todas as espécies de plantas (Quadro 6). O ponto de inflexão das equações quadráticas (dose ótima) (Quadro 6) foi utilizado para comparar a SH original com seus derivados químicos em um experimento independente. O número de raízes laterais emergidas aumentou de 37 a 210 % em plântulas de milho (Quadro 7).

Quadro 6. Equações de regressão; coeficientes de determinação da regressão (R^2); desvios padrão da regressão (DP), níveis de significância da regressão (valores- p) e doses ótimas para o número de raízes laterais emergidas em plântulas de *Zea mays* (milho) após tratamento com diferentes doses de C (mM $C L^{-1}$) da SH original e seus 8 derivados químicos produzidos.

Materiais Húmicos	Equações de Regressão			Doses ótimas		
	($y = b_2x^2 + b_1x + b_0$)	R^2	DP	p	(dx/dy): $b_1 + 2(b_2)x = 0$	
<i>Zea Mays L,</i>						
SH original	$y = -2,94x^2 + 12,03x + 2,69$	0,87	2,80	<0,026	2,05	
D1	$Y = -1,82x^2 + 6,85x + 4,28$	0,82	2,26	<0,018	1,95	
D2	$Y = -2,28x^2 + 9,54x + 3,00$	0,84	2,48	<0,015	2,09	
D3	$y = -2,77x^2 + 11,57x + 3,67$	0,72	4,38	<0,028	2,09	
D4	$y = -2,73x^2 + 11,41x + 2,06$	0,85	2,83	<0,014	2,09	
D5	$y = -2,44x^2 + 10,65x + 2,04$	0,76	3,49	<0,023	2,19	
D6	$Y = -2,25x^2 + 9,29x + 2,34$	0,92	1,71	<0,008	2,07	
D7	$Y = -2,07x^2 + 9,23x + 2,94$	0,91	1,71	<0,009	2,23	
D8	$Y = -1,80x^2 + 7,01x + 5,11$	0,78	2,43	<0,021	1,88	

Considerando que todos os materiais húmicos induziram a emissão das raízes laterais, os maiores efeitos foram produzidos pela oxidação com $KMnO_4$, em meio ácido (D1), hidrólise metanólica-alcálica (D4), hidrólise ácida com H_2SO_4 e com HCl + dioxano (D5 e D6, respectivamente), e pela reação de metilação (D8). O comprimento de raízes laterais também foi alterado tanto pela SH original quanto pelos seus derivados químicos (Quadro 7). Os derivados químicos produzidos, em geral, menos bioativos para as plantas testadas foram aqueles obtidos a partir da redução com borohidrato de sódio (D3), da hidrólise metanólica-alcálica (D4) e da extração de lipídios livres (D7). Enquanto que os

derivados 4 e 7 não apresentaram diferenças nos tamanhos moleculares (obtidos por DOSY-RMN) quando comparados com a SH original, o D3 teve um dos menores tamanhos moleculares obtidos através das medidas de difusão (Quadro 3).

Quadro 7. Efeitos dos materiais húmicos sobre o crescimento radicular de plântulas de milho. Os dados foram normalizados em relação às plântulas controle (0%). Os desvios padrão da média e as diferenças estatísticas estão apresentados nas Figuras 6A, 7A, 8A e 9A do apêndice.

Materiais Húmicos	Número de raízes laterais emergidas	Comprimento das raízes laterais	Comprimento das raízes principais	Área radicular	Massa fresca das raízes	Massa seca das raízes	Número de sítios mitóticos
Exp. 1: Sequência de solos do Norte Fluminense							
AH1	139	-	-	356	-	395	141
AH2	97	-	-	378	-	374	146
AH3	17	-	-	256	-	358	162
AH4	14	-	-	167	-	237	128
AH5	17	-	-	111	-	316	114
AH6	108	-	-	89	-	274	35
Exp. 2: Camada Superficial de Latossolos modais do Brasil							
AH_{L1}	700	-	30	22	65	-	-
AH_{L2}	905	-	130	120	48	-	-
AH_{L3}	800	-	145	140	27	-	-
AH_{L4}	1120	-	133	265	95	-	-
AH_{L5}	990	-	36	330	200	-	-
AH_{L6}	1010	-	138	50	120	-	-
AH_{L7}	770	-	20	25	100	-	-
Exp. 3: Subfrações de AH obtidos por cromatografia de exclusão por tamanho							
AH original	94	223	-1	-	-	-	-
SF1	84	238	-14	-	-	-	-
SF2	165	436	-15	-	-	-	-
SF3	114	140	25	-	-	-	-
SF4	133	368	-20	-	-	-	-
SF5	100	36	1	-	-	-	-
SF6	125	251	-12	-	-	-	-
Exp. 4: Derivados químicos produzidos a partir de reações controladas							
SH original	149	39	53	75	-	-	-
D1	190	74	42	50	-	-	-
D2	37	75	60	39	-	-	-
D3	107	60	29	33	-	-	-
D4	156	50	16	74	-	-	-
D5	210	81	42	95	-	-	-
D6	129	33	41	81	-	-	-
D7	115	39	45	39	-	-	-
D8	167	95	15	60	-	-	-

5.4. Efeitos sobre a atividade da H⁺-ATPase

A principal função da H⁺-ATPase de MP é gerar um gradiente eletroquímico de prótons, proporcionando assim uma força motriz para a absorção e efluxo de íons e metabólitos por toda a membrana (Sze et al., 1999). Diversos trabalhos científicos têm demonstrado que os AH induzem a atividade da bomba de H⁺, também podendo desempenhar um papel fundamental no mecanismo de crescimento ácido relacionado aos seus efeitos sobre o crescimento e morfologia radicular (Canellas et al., 2002; Zandonadi et al., 2007; Canellas et al., 2008a; Canellas et al. 2009; Canellas et al., 2010 e Dobbss et al., 2010). O estímulo à atividade da H⁺-ATPase proporcionado pelas 29 SH utilizadas nesse estudo, sugere que as alterações no metabolismo vegetal, não se restringem apenas a arquitetura radicular, mas sim, se estendem também a componentes bioquímicos importantes.

Com raras exceções, todas as SH foram capazes de induzir a atividade da H⁺-ATPase, estimular a emissão das raízes laterais e aumentar a área radicular em plântulas de milho. Tomados em conjunto, os resultados apresentados nos Quadros 7 e 8 demonstram que os padrões de ativação da H⁺-ATPase estão fortemente correlacionados com as mudanças no desenvolvimento radicular, onde a variação dos seus efeitos pode explicar, pelo menos parcialmente, as modificações geradas pelos tratamentos com as diferentes SH sobre a morfologia radicular.

No experimento 1, vesículas de membrana plasmática isoladas de raízes de plântulas de milho tratadas por sete dias com os seis diferentes AH isolados de uma sequência de solos do Norte Fluminense mostraram estímulos significativos à atividade hidrolítica da H⁺-ATPase sensível a vanadato (Quadro 8, Figura 10A-Apêndice). O estímulo variou de 63 a 509% quando comparado com a atividade enzimática das vesículas isoladas de raízes das plantas controle (cultivadas na ausência de AH). Os maiores estímulos à atividade ATPásica, foram proporcionados pelos AH isolados dos solos menos intemperizados, portanto a ordem de estímulo promovida pelos ácidos húmicos à H⁺-ATPase de membrana plasmática foi: AH1>AH2>AH3>AH6>AH4>AH5.

No segundo experimento todos os AH isolados da camada superficial de sete diferentes Latossolos modais do Brasil promoveram incrementos à atividade

da H^+ -ATPase de MP, obedecendo à seguinte ordem: $AH_{L7} > AH_{L5} = AH_{L4} > AH_{L3} = AH_{L6} = AH_{L1} > AH_{L2}$ (Quadro 8). Este resultado foi posteriormente confirmado pela técnica de *immunoblotting* que mostrou aumento dos níveis de expressão da H^+ -ATPase após tratamento com os sete diferentes AH (Figura 8).

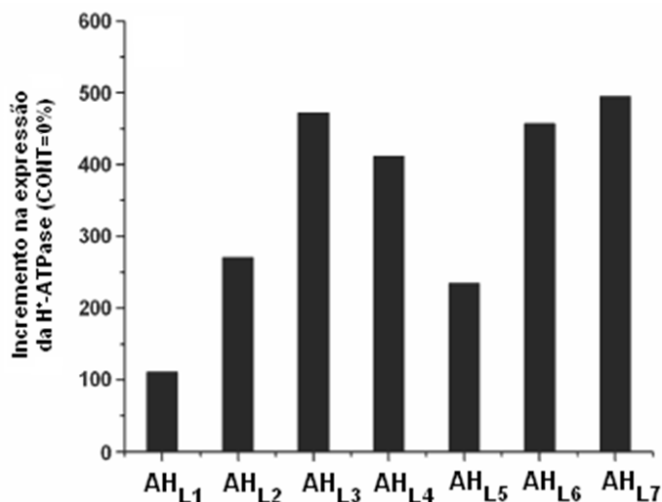


Figura 8. Perfis de Western blot de vesículas de membrana plasmática isodadas de plântulas de milho tratadas ou não (controle) com AH isolados de 7 diferentes Latossolos na concentração de $2,0 \text{ mM}$ de C $AH \text{ L}^{-1}$ durante 7 dias. Os dados foram normalizados em relação ao controle (Cont=0%).

O incremento tanto na atividade quanto na expressão da H^+ -ATPase de MP está em consonância com o mecanismo do crescimento ácido (Rayle e Cleland, 1992). Um mecanismo semelhante foi descrito para a bioatividade das SH, que também podem estimular o crescimento radicular, induzindo a ativação da bomba de H^+ da MP (Pinton et al., 1997; Canellas et al., 2002; Quaggiotti et al., 2004). Zandonadi et al. (2007) também forneceram evidências do efeito dos AH sobre as bombas de prótons localizadas no vacúolo (V-ATPases) sob o desenvolvimento do sistema radicular, sustentando assim o conhecimento de que o vacúolo age combinando com a dinâmica da parede celular para gerar turgor, que é a força motriz para a expansão celular e o crescimento vegetal (Maeshima et al., 1996).

Raízes de plântulas de milho tratadas por cinco dias tanto com o AH original quanto com as suas subfrações de diferentes tamanhos (terceiro experimento) apresentaram uma ativação diferencial na atividade da H^+ -ATPase de MP sensível a vanadato. O estímulo sobre a bomba de H^+ foi avaliado pela atividade hidrolítica da enzima H^+ -ATPase (Quadro 8) e pelo bombeamento de H^+ dependente de ATP (Figura 9). Na maioria dos casos, tanto o tratamento com AH

quanto o tratamento com as diferentes subfrações estimularam mais a atividade hidrolítica da H⁺-ATPase do que as taxas de bombeamento de H⁺. Como exemplo, pode-se citar que, enquanto o tratamento com AH original estimulou 2,8 vezes a atividade da H⁺-ATPase o estímulo proporcionado pelas SF2 e SF4 foi entre 3,5 e 4,0 vezes maior do que o tratamento controle.

Ainda com relação ao experimento 3, a taxa de bombeamento de prótons foi aumentada após o tratamento com as subfrações 1, 2, 4, 5 e 6, mas não pela SF3 (Figura 9), sendo esta também a única subfração húmica que não promoveu aumentos na proliferação de pêlos em relação ao tratamento controle (Figura 7). Na verdade, a força motriz gerada para a absorção da maioria dos nutrientes é exercida por um gradiente eletroquímico de H⁺ através da membrana plasmática, que é gerado principalmente pela H⁺-ATPase. Em consonância com a teoria de que os pêlos radiculares são especializados na absorção de nutrientes, mudanças nos níveis de expressão de genes relacionados a H⁺-ATPase em pêlos radiculares já foram demonstrados (Moriau, 1999), com aumentos em pêlos jovens e redução em pêlos maduros (Gilroy e Jones, 2000).

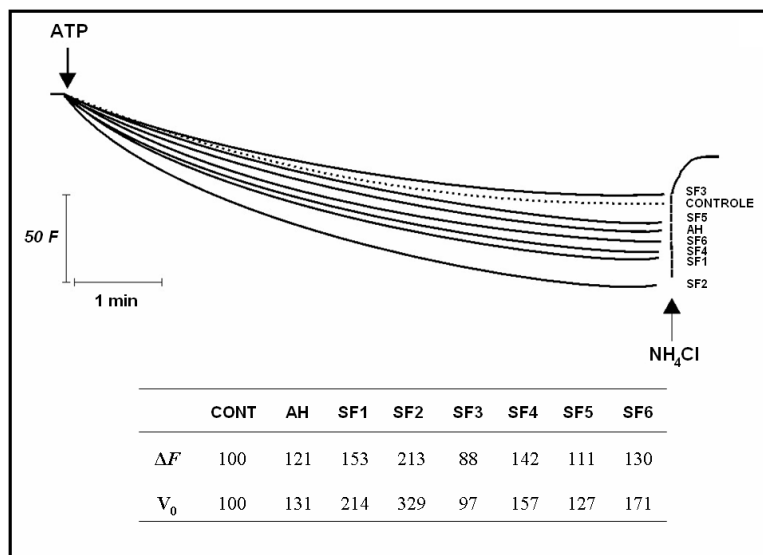


Figura 9. (A) Efeito do AH e suas diferentes subfrações (SF) obtidas por HPSEC sobre o transporte de H⁺ da ATPase de MP (% min⁻¹) dependente de ATP em vesículas da fração microssomal de raízes de plântulas de milho.

Além disso, o tratamento com as subfrações 1, 2, 4, 5 e 6 também causou um encurtamento do tamanho das raízes principais e um aumento na emissão de raízes laterais (Quadro 7). Esses efeitos são típicos do tratamento com o fitormônio auxina (Laskowski et al., 1995; Bhalerao et al., 2002). Isto está de

acordo com relatos anteriores sobre a presença intrínseca de moléculas tipo-auxina dentro do arranjo supramolecular dos AH (Canellas et al., 2002). Efetivamente, existem mais de 240 tipos diferentes de moléculas tipo-auxina (Ferro et al., 2006), portanto, este grande número de moléculas e seus efeitos pleiotrópicos poderiam explicar a diversidade nos padrões de crescimento, bem como na ativação das bombas de H^+ em raízes de plântulas de milho tratadas com o AH original e suas subfrações de diferentes tamanhos.

Neste contexto, pode-se especular que dentro da estrutura complexa dos AH existam diferentes tipos e concentrações de moléculas de auxina, e os efeitos estimulatórios dos AH e suas SF pode ser devido à liberação dessas moléculas bioativas de suas estruturas supramoleculares, podendo acessar aos receptores fora ou dentro da célula. Estudos anteriores já detectaram um receptor que se liga à auxina na membrana plasmática e ativa a H^+ -ATPase de MP em plantas de milho (Ruck et al., 1993). Esta hipótese é consistente com o mecanismo de crescimento ácido proposto para a bioatividade dos AH (Zandonadi et al., 2007). Deste modo, a indução da atividade da H^+ -ATPase por AH também pode estar diretamente ligada à proliferação de pêlos, uma vez que já foi demonstrado que o crescimento celular depende de acidificação extracelular (Peters e Felle, 1999). A possível participação das bombas de prótons no estímulo promovido pela SF3 sobre o crescimento radicular não pode ser descartada uma vez que ativações específicas da H^+ -ATPase na zona de alongamento da raiz primária ou nos sítios mitóticos de raízes laterais podem ter sido mascaradas, pelo fato da atividade hidrolítica da H^+ -ATPase ter sido realizada com vesículas oriundas de preparações microsomais de todo sistema radicular das plântulas de milho.

No quarto experimento, os tratamentos com os derivados 1, 5 e 8 foram capazes de promover estímulos de 121 a 202% sobre a atividade da H^+ -ATPase de MP (Quadro 8). Nota-se que estes mesmos derivados foram os que mais estimularam a emissão de raízes laterais em plântulas de milho (Quadro 5). O derivado resultante da oxidação com $KMnO_4$, em meio alcalino (D2) foi o que mostrou o maior estímulo à atividade hidrolítica da H^+ -ATPase em vesículas isoladas de raízes de plântulas de milho em relação aos outros tratamentos (Quadro 8). É interessante ressaltar que este derivado não diferiu da SH original quanto à difusão dos componentes aromáticos e carboidratos e apresentou o menor valor correspondente aos componentes alifáticos obtidos por DOSY-RMN

(Quadro 3), bem como uma hidrofobicidade substancialmente maior do que a SH original (Quadro 4).

Quadro 8. Efeitos dos materiais húmicos sobre a atividade hidrolítica da H⁺-ATPase de MP. Os valores apresentados foram normalizados em relação ao controle. Valores originais (médias ± desvio padrão) estão apresentados na Figura 10A do apêndice.

Atividade hidrolítica da H ⁺ ATPase de MP***							
μmol Pi mg prot ⁻¹ min ⁻¹ (controle=0%)							
Exp. 1: Sequência de solos do Norte Fluminense		Exp. 2: Latossolos modais do Brasil		Exp. 3: Subfrações de AH obtidos por HPSEC		Exp. 4: Derivados químicos	
AH1	509	AH_{L1}	90	AH original	180	SH original	38
AH2	412	AH_{L2}	75	SF1	50	D1	171
AH3	327	AH_{L3}	115	SF2	239	D2	202
AH4	186	AH_{L4}	220	SF3	43	D3	97
AH5	63	AH_{L5}	249	SF4	296	D4	-8
AH6	213	AH_{L6}	100	SF5	85	D5	121
		AH_{L7}	400	SF6	172	D6	6
						D7	67
						D8	180

5.5. Ensaio com Tomateiro (Micro-Tom) DR5::GUS

Evidências preliminares da atividade tipo-hormonal das SH foram fornecidas pela sua capacidade de indução aos mesmos alvos moleculares de ação das auxinas, como por exemplo, a ativação da H⁺-ATPase (Canellas, et al., 2002 e Zandonadi, et al., 2007), e pela constatação de que diferentes ácidos húmicos não foram capazes de induzir o surgimento de raízes laterais em um micro-tomateiro mutante pouco sensível à auxina (tomateiro diageotrópica - *dgt*) (Dobbss, et al., 2007). Com o objetivo de verificar a ação tipo hormonal das substâncias húmicas, plântulas transgênicas de tomateiro (cv. Micro-Tom) contendo o gene repórter responsivo para auxina (DR5::GUS) foram tratadas com a SH original e seus derivados químicos produzidos a partir de diferentes reações controladas.

A acidificação do apoplasto mediada pela H⁺-ATPase de MP está diretamente envolvida com dois mecanismos fundamentais do desenvolvimento vegetal: a energização de sistemas secundários de translocação de íons fundamentais para a absorção de macro e micronutrientes e o aumento da

plasticidade da parede celular para possibilitar o processo de crescimento e divisão da célula vegetal (Façanha, et al., 2002). Este último mecanismo está intimamente relacionado com o efeito do fitormônio auxina, como proposto pela teoria do crescimento ácido (Rayle e Cleland, 1992). Trabalhos recentes vêm postulando a presença de compostos similares ao ácido indolacético (AIA) nas estruturas de uma variedade de materiais húmicos que possuem atividade biológica sobre as plantas (Muscolo, et al., 1998 e Canellas, et al., 2002). Na verdade, essas complexas estruturas húmicas podem ser rompidas pela exudação de ácidos orgânicos pelas raízes das plantas (Piccolo, et al., 1999 e 2002), onde pequenas moléculas de auxina podem então ser liberadas, atuando sobre os receptores celulares ligados à membrana plasmática (Canellas, et al., 2008b).

A ação tipo auxínica (ácido 3-indolacético), promovida pela SH original, bem como pelos 8 diferentes derivados químicos produzidos a partir de reações controladas é mostrada na Figura 10.

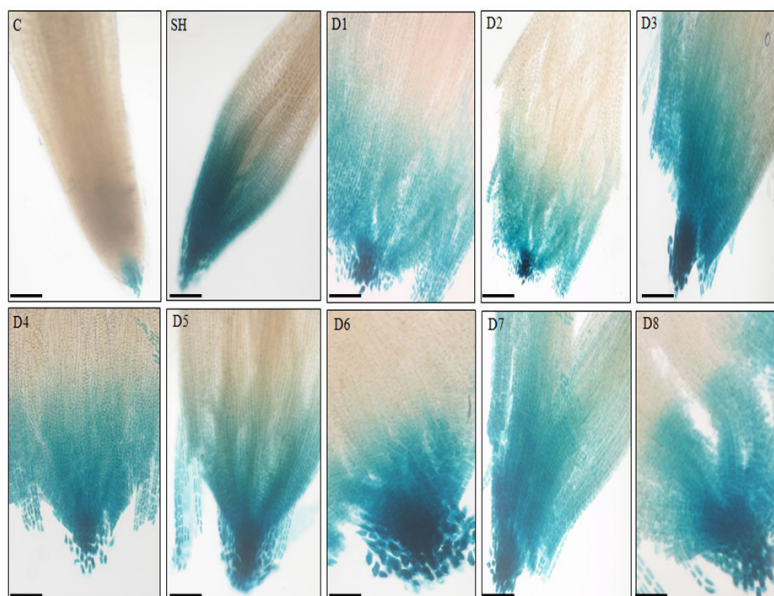


Figura 10. Ensaio histoquímico para detecção da atividade da enzima β -glucuronidase (GUS) em raízes de plântulas do tomateiro transgênico DR5::GUS. As plântulas foram cultivadas durante 4 dias em meio mínimo (CaCl_2 2mM - Controle) ou nas concentrações ótimas de cada material húmico (SH e seus 8 derivados químicos). Barras correspondem à escala de 100 μm .

O gene DR5::GUS, tem sido utilizado como uma ferramenta para visualização das respostas de auxina em tecidos de plantas através de ensaios histoquímicos para detecção da sua expressão. Neste experimento, os ensaios

histoquímicos foram feitos a partir de cortes na região das raízes (próximo ao ápice) das plântulas. Todos os tratamentos foram capazes de ativar a expressão do gene (DR5::GUS) em comparação com o controle (plântulas tratadas somente com CaCl_2 2mM) (Figura 10). A presença de atividade auxínica em outros locais que comumente são considerados como de acúmulo endógeno de AIA, indicam a atividade tipo hormonal tanto da SH original como de seus derivados químicos.

A indução da expressão do gene promotor induzido por auxina (DR5::GUS) em plântulas de tomateiro (Micro-Tom) transgênico (Figura 10) é uma prova clara da atividade tipo-auxínica de tais substâncias, como proposto anteriormente (Canellas, et al., 2002; Zandonadi, et al., 2007; Dobbss, et al., 2007; Trevisan, et al., 2010). Como todos os derivados húmicos obtidos foram também capazes de induzir respostas específicas a este gene, é provável que exista um local em comum na estrutura das SH onde estejam presentes moléculas que possuem a atividade tipo-auxínica. Os resultados obtidos a partir deste experimento poderão gerar, portanto informações importantes para pesquisas futuras que tenham como objetivo desvendar a identidade molecular, tipo-auxina, presente nas estruturas das SH (Canellas, et al., 2002; Zandonadi, et al., 2007; Dobbss, et al., 2007).

5.6. Relação entre as características químicas e a atividade biológica das SH (QSAR)

O desenvolvimento radicular é requisito chave para adaptação das plantas a condições adversas. Portanto, o número de raízes laterais é fortemente influenciado pelo ambiente externo (Leyser e Fitter, 1998). As SH podem agir como promotores do crescimento radicular e a compreensão dos prováveis fatores químicos que influenciam nesse estímulo são importantes para geração de fertilizantes orgânicos mais eficientes. Com o objetivo de identificar as características químicas das SH que mais se relacionam com o número de raízes laterais (NRL) em plântulas de milho bem como a atividade da H^+ -ATPase de MP foram realizadas buscas sistemáticas de variáveis pelo método da regressão linear múltipla (RLM) com um ou mais descritores químicos utilizando-se o software BuildQSAR.

Os modelos (y observado versus y calculado) foram testados utilizando-se o coeficiente de correlação (R) e o desvio padrão da regressão (S). A variância foi

testada pelo teste de Fisher (F), e a probabilidade de significância do teste F foi estimada (p). Um número expressivo de modelos de RLM significativos entre as características químicas das 29 diferentes SH e seus efeitos sobre o NRL (Quadro 9) e a atividade da H⁺-ATPase (Quadro 10) foram observados. Foi possível observar que o índice de hidrofobicidade foi o descritor químico que produziu os melhores modelos de RLM. Quando utilizado como única variável para prever o comportamento tanto do NRL (Quadro 9) quanto da atividade da H⁺-ATPase (Quadro 10) este indicador produziu modelos com ajustes moderados (0,75 e 0,73 respectivamente), desvios padrão (S) baixos, os maiores valores de F além das probabilidades do limite de confiança do teste elevados ($P < 0,0001$). Os coeficientes do modelo linear foram positivos, conseqüentemente, com o aumento dos valores HB/HI foi observado maiores estímulos ao NRL (Figura 11) e à atividade da H⁺-ATPase (Figura 12) em plântulas de milho.

De acordo com o Quadro 9 (equações 1, 7 e 9) é possível observar a importância do carbono hidrofóbico no incremento à proliferação de raízes laterais. Na equação 1 o NRL aumenta quando são aumentados os valores de HB/HI. Na equação 7 há o aumento do NRL quando são aumentados os valores de HB/HI paralelamente aos de ¹³C-RMN-(110-160 ppm) correspondente à região destinada ao C aromático e na equação 9 há o aumento do NRL quando são aumentados os valores de HB/HI paralelamente aos de ¹³C-RMN (0-40 ppm) correspondente à região destinada a C-alquílico. Vale destacar que tais áreas correspondentes a C-alquílicos (¹³Cδ 40-0) e aromáticos (¹³Cδ 160-110) quando somadas quantifica-se o conteúdo de C hidrofóbico.

O acréscimo de descritores nos modelos aumenta um pouco o ajuste dos mesmos, porém com diminuição nos valores do teste F. Por exemplo, com duas variáveis foi observado aumento no ajuste para 0,81 com o uso da HB/HI associado à presença de grupamentos metoxílicos e peptídicos típicos da região de absorção entre 40 e 110 ppm no espectro de ¹³C-RMN. No entanto, a presença de grupamentos funcionais nessa região do espectro foi negativamente associada pelo modelo com a indução do NRL (Quadro 9), paralelamente, com relação aos modelos para predição da atividade da H⁺-ATPase, a inclusão de %C e %H associados ao HB/HI tiveram o ajuste matemático (R) de 0,74 e 0,81, respectivamente (Quadro 10, equações 2 e 3).

Quadro 9. Seleção de variáveis para regressão linear múltipla a fim de se descrever o número de raízes laterais (NRL) de plântulas de milho utilizando-se uma ou duas variáveis após a matriz de correlação de Pearson usado para eliminar variáveis

%C	%H	%N	%O	Deslocamentos Químicos (¹³ C-RMN)				Mw (IR)	GA	HB/HI	R	S	F	P<
				160-200	110-160	40-110	0-40							
•										0.449	321.160	6.808	0.0146	
	•									0.525	305.787	10.293	0.0034	
		•								0.605	286.268	15.552	0.0005	
			•							0.490	313.219	8.544	0.0069	
				•						0.012	359.353	0.004	0.9523	
					•					0.541	302.162	11.193	0.0024	
						•				0.364	334.669	4.134	0.0520	
							•			0.401	329.188	5.179	0.031	
								•		0.321	340.310	3.110	0.0891	
									•	0.518	307.326	9.920	0.004	
										0.747	238.749	36.116	0.0001⁽¹⁾	
•	•									0.509	309.281	9.455	0.0048	
•		•								0.564	296.679	12.618	0.0014	
•			•							0.667	272.886	10.414	0.0005	
•				•						0.620	287.462	8.100	0.0018	
•					•					0.567	296.134	12.764	0.0014	
•						•				0.411	327.699	5.472	0.0270	
•							•			0.515	308.04	9.749	0.0042	
•								•		0.563	297.055	12.518	0.0015	
•									•	0.542	301.903	11.259	0.0024	
•										0.748	242.887	16.555	0.0001⁽²⁾	
	•	•								0.631	278.743	17.880	0.0002	
	•		•							0.527	305.393	10.389	0.0033	
	•			•						0.650	273.119	19.748	0.0001	
	•				•					0.680	263.582	23.192	0.0001	
	•					•				0.49	313.322	8.521	0.007	
	•						•			0.629	279.327	17.693	0.0003	
	•							•		0.670	271.763	10.608	0.0004	
	•								•	0.603	292.160	7.426	0.0028	
	•									0.756	235.051	34.176	0.0001⁽³⁾	

Quadro 9. Continuação

%C	%H	%N	%O	Deslocamentos Químicos (¹³ C-RMN)				Mw (IR)	GA	HBHI	R	S	F	P<
				160-200	110-160	40-110	0-40							
		•	•							0.739	246.528	15.688	0.0010	
		•		•						0.615	283.511	16.383	0.0004	
		•			•					0.639	281.587	8.989	0.0011	
		•				•				0.605	286.056	15.615	0.0005	
		•					•			0.560	297.854	12.306	0.0016	
		•						•		0.596	288.676	14.845	0.0007	
		•							•	0.733	244.560	31.303	0.0001 ⁽⁴⁾	
			•	•						0.672	271.211	10.704	0.0004	
			•		•					0.588	290.730	14.256	0.0008	
			•			•				0.432	324.072	6.203	0.0192	
			•				•			0.588	290.651	14.278	0.0008	
			•					•		0.538	302.993	10.984	0.0026	
			•						•	0.564	296.881	12.564	0.0015	
			•						•	0.751	241.962	16.781	0.0001 ⁽⁵⁾	
				•	•					0.577	299.075	6.493	0.0052	
				•		•				0.519	313.143	4.781	0.0171	
				•			•			0.242	348.688	1.681	0.2058	
				•				•		0.263	346.725	2.006	0.1681	
				•					•	0.583	297.650	6.680	0.0046	
				•					•	0.762	237.143	18.004	0.0001 ⁽⁶⁾	
					•	•				0.461	318.962	7.276	0.0119	
					•		•			0.551	305.630	5.665	0.0091	
					•			•		0.580	292.754	13.687	0.0010	
					•				•	0.531	304.552	10.596	0.0030	
					•				•	0.762	237.292	17.965	0.0001 ⁽⁷⁾	
						•	•			0.423	325.609	5.891	0.0222	
						•		•		0.472	316.801	7.745	0.0097	
						•			•	0.441	322.579	6.511	0.0167	
						•			•	0.811	214.390	24.934	0.0001 ⁽⁸⁾	

Quadro 9. Continuação

%C	%H	%N	%O	Deslocamentos Químicos (¹³ C-RMN)				Mw (IR)	GA	HBHI	R	S	F	P<
				160-200	110-160	40-110	0-40							
							•				0.478	315.689	7.990	0.0087
							•		•		0.480	315.364	8.062	0.0085
							•			•	0.750	242.268	16.706	0.0001 ⁽⁹⁾
								•	•		0.569	295.609	12.905	0.0013
								•		•	0.785	226.998	20.837	0.0001 ⁽¹⁰⁾
									•	•	0.764	236.222	18.246	0.0001 ⁽¹¹⁾

% C: teor de carbono orgânico; % H: teor de hidrogênio; % N: teor de nitrogênio; % O: teor de oxigênio; 160-200 (deslocamento químico ¹³C RMN: 110-160 ppm); 110-160 (deslocamento químico ¹³C RMN: 110-160 ppm); 40-110 (deslocamento químico ¹³C RMN: 40-110 ppm); 40-110 (deslocamento químico ¹³C RMN: 0-40 ppm), MW: tamanho molecular aparente determinado por HPSEC com IR; GA: grau de aromaticidade; HB/Hi: índice de hidrofobicidade; R: coeficiente de correlação do modelo de regressão; S: desvio padrão do modelo ; F: Teste de Fisher do modelo; P: probabilidade da significância de F.

As equações dos modelos (**destaque em vermelho**) no Quadro 9 seguem abaixo. Os valores correspondem ao coeficiente ± desvio padrão.

⁽¹⁾ **NRL** = + 1121.9519 (± 393.8148) **HB/Hi** + 843.0267 (± 412.1291);

⁽²⁾ **NRL** = + 0.1303 (± 0.9036) **%C** + 1083.0713 (± 483.5602) **HB/Hi** - 854.8632 (± 428.0324);

⁽³⁾ **NRL** = + 6.0503 (± 6.4156) **%H** + 960.0247 (± 413.2083) **HB/Hi** + 949.1147 (± 409.0934);

⁽⁴⁾ **NRL** = + 3.5722 (± 8.4254) **%N** + 956.2173 (± 556.6853) **HB/Hi** - 809.3602 (± 422.3136);

⁽⁵⁾ **NRL** = - 0.2002 (± 0.7674) **%O** + 1047.6223 (± 490.9943) **HB/Hi** + 662.6745 (± 808.0591);

⁽⁶⁾ **NRL** = - 12.6993 (± 22.3320) [**¹³C-RMN-160-200**] + 1162.7010 (± 398.4253) **HB/Hi** - 741.0297 (± 447.6591);

⁽⁷⁾ **NRL** = + 12.1305 (± 21.6042) [**¹³C-RMN-110-160**] + 1453.3618 (± 708.6452) **HB/Hi** + 891.7930 (± 419.5010);

⁽⁸⁾ **NRL** = - 22.8795 (± 17.1949) [**¹³C-RMN-40-110**] + 1612.6937 (± 511.4372) **HB/Hi** - 2256.9717 (± 1125.4743);

⁽⁹⁾ **NRL** = + 5.3380 (± 23.3296) [**¹³C-RMN-0-40**] + 1073.9062 (± 452.1190) **HB/Hi** + 661.2545 (± 898.1625);

⁽¹⁰⁾ **NRL** = + 0.0106 (± 0.0111) **Mw(IR)** - 1059.1249 (± 380.8663) **HB/Hi** + 686.1504 (± 425.4833);

⁽¹¹⁾ **NRL** = - 10.9772 (± 17.9501) **GA** + 1459.4846 (± 676.0564) **HB/Hi** - 889.9842 (± 415.7140).

Quadro 10. Seleção de variáveis para regressão linear múltipla a fim de se descrever a atividade da H⁺-ATPase de MP de plântulas de milho utilizando-se uma ou duas variáveis após a matriz de correlação de Pearson usado para eliminar variáveis

%C	%H	%N	%O	Deslocamentos Químicos (¹³ C-RMN)				Mw (IR)	GA	HB/HI	R	S	F	P<
				160-200	110-160	40-110	0-40							
•										0.565	318.262	12.693	0.0014	
	•									0.632	299.094	17.943	0.0002	
		•								0.649	293.686	19.614	0.0001	
			•							0.603	307.810	15.434	0.0005	
				•						0.108	383.617	0.320	0.5761	
					•					0.476	339.321	7.919	0.0090	
						•				0.395	354.557	4.982	0.0341	
							•			0.298	368.369	2.629	0.0434	
								•		0.378	357.31	4.491	0.1166	
									•	0.472	340.290	7.720	0.0098	
										0.729	264.200	30.599	0.0001⁽¹⁾	
•	•									0.636	303.389	8.840	0.0012	
•		•								0.661	295.166	10.074	0.0006	
•			•							0.725	270.862	14.400	0.0001	
•				•						0.677	289.549	10.978	0.0003	
•					•					0.603	313.670	7.432	0.0028	
•						•				0.568	323.636	6.193	0.0063	
•							•			0.574	321.922	6.398	0.0055	
•								•		0.591	317.256	6.972	0.0038	
•									•	0.667	293.063	10.406	0.0005	
•										0.754	258.470	17.091	0.0001⁽²⁾	
	•	•								0.716	274.689	13.642	0.0001	
	•		•							0.770	250.960	18.918	0.0001	
	•			•						0.668	292.595	10.481	0.0005	
	•				•					0.717	274.044	13.768	0.0001	
	•					•				0.639	302.511	8.967	0.0011	
	•						•			0.678	289.102	11.052	0.0003	
	•							•		0.643	301.104	9.173	0.0010	
	•								•	0.700	280.770	12.500	0.0002	
	•									0.814	228.598	25.468	0.0001⁽³⁾	

Quadro 10. Continuação

%C	%H	%N	%O	Deslocamentos Químicos (¹³ C-RMN)				Mw (IR)	GA	HB/HI	R	S	F	P<
				160-200	110-160	40-110	0-40							
		•	•							0.666	293.228	10.380	0.0005	
		•		•						0.719	273.178	13.938	0.0001	
		•			•					0.649	299.276	9.444	0.0008	
		•				•				0.665	293.638	10.315	0.0005	
		•					•			0.661	294.979	10.103	0.0006	
		•					•			0.680	288.38	11.172	0.0003	
		•						•		0.651	298.588	9.548	0.0008	
		•							•	0.754	258.404	17.106	0.0001 ⁽⁴⁾	
			•	•						0.724	271.401	14.292	0.0001	
			•		•					0.629	305.688	8.513	0.0014	
			•			•				0.612	311.122	7.768	0.0023	
			•				•			0.608	312.175	7.628	0.0025	
			•				•			0.695	282.915	12.115	0.0002	
			•					•		0.618	309.084	8.042	0.0019	
			•						•	0.762	254.790	17.966	0.0001 ⁽⁵⁾	
				•	•					0.359	360.208	3.987	0.0560	
				•		•				0.267	371.847	2.077	0.1610	
				•			•			0.252	373.394	1.837	0.1866	
				•			•			0.188	378.973	0.994	0.3277	
				•				•		0.342	362.641	3.572	0.0695	
									•	0.545	323.549	11.406	0.0022	
					•	•				0.465	341.612	7.452	0.0110	
					•		•			0.403	353.120	5.242	0.0301	
					•		•			0.547	323.092	11.515	0.0021	
					•			•		0.475	339.616	7.858	0.0093	
					•				•	0.766	252.665	18.489	0.0001 ⁽⁶⁾	
						•	•			0.406	352.716	5.317	0.0290	
						•	•			0.532	326.813	10.643	0.0030	
						•		•		0.455	343.687	7.037	0.0132	
						•			•	0.606	307.081	15.636	0.0005	

Quadro 10. Continuação

%C	%H	%N	%O	Deslocamentos Químicos (¹³ C-RMN)				Mw (IR)	GA	HB/HI	R	S	F	P<
				160-200	110-160	40-110	0-40							
							•			0.422	349.905	5.838	0.0227	
							•	•		0.401	353.462	5.181	0.0310	
							•		•	0.730	268.627	14.858	0.0001 ⁽⁷⁾	
							•	•		0.547	323.020	11.532	0.0021	
							•		•	0.723	266.752	29.502	0.0001 ⁽⁸⁾	
									•	0.760	255.760	17.732	0.0001 ⁽⁹⁾	

% C: teor de carbono orgânico; % H: teor de hidrogênio; % N: teor de nitrogênio; % O: teor de oxigênio; 160-200 (deslocamento químico ¹³C RMN: 110-160 ppm); 110-160 (deslocamento químico ¹³C RMN: 110-160 ppm); 40-110 (deslocamento químico ¹³C RMN: 40-110 ppm); 0-40 (deslocamento químico ¹³C RMN: 0-40 ppm), MW: tamanho molecular aparente determinado por HPSEC com IR; GA: grau de aromaticidade; HB/HI: índice de hidrofobicidade; R: coeficiente de correlação do modelo de regressão; S: desvio padrão do modelo; F: Teste de Fisher do modelo; P: probabilidade da significância de F.

As equações dos modelos (**destaque em vermelho**) no Quadro 10 seguem abaixo. Os valores correspondem ao coeficiente ± desvio padrão.

⁽¹⁾ **ATPase** = + 1174.7839 (± 435.7960) **HB/HI** + 728.0553 (± 456.0626);

⁽²⁾ **ATPase** = + 0.6954 (± 0.9616) **%C** + 967.3045 (± 514.5832) **HB/HI** + 791.2188 (± 455.4930);

⁽³⁾ **ATPase** = + 9.9513 (± 6.4491) **%H** + 908.4511 (± 415.3654) **HB/HI** - 902.5455 (± 411.2290);

⁽⁴⁾ **ATPase** = + 6.5863 (± 9.0784) **%N** + 869.2077 (± 599.8279) **HB/HI** + 665.9820 (± 455.0425);

⁽⁵⁾ **ATPase** = - 0.6843 (± 0.8081) **%O** + 920.7493 (± 517.0258) **HB/HI** + 111.6697 (± 850.9006);

⁽⁶⁾ **ATPase** = - 20.9964 (± 23.0039) [**¹³C-RMN-110-160**] + 1748.4151 (± 754.5560) **HB/HI** - 812.4639 (± 446.6791);

⁽⁷⁾ **ATPase** = - 4.3107 (± 25.8679) [**¹³C-RMN-0-40**] + 1213.5835 (± 501.3098) **HB/HI** - 874.8465 (± 995.8833);

⁽⁸⁾ **ATPase** = + 0.0122 (± 0.0122) **Mw(IR)** + 1102.6050 (± 419.0205) **HB/HI** + 547.8277 (± 468.1071);

⁽⁹⁾ **ATPase** = - 15.8496 (± 19.4348) **GA** + 1662.1357 (± 731.9744) **HB/HI** - 795.8556 (± 450.0985).

Modificações na estrutura dos materiais húmicos promovidas por diferentes procedimentos químicos, bem como pela utilização de substâncias húmicas isoladas de diferentes fontes geraram 29 substâncias húmicas com diferentes tamanhos moleculares. No entanto, como pode ser observado nos Quadro 9 e 10, o tamanho molecular aparente (M_w), obtido com índice de refração (IR) como detector, quando utilizado sozinho como descritor químico, não possui nenhuma relação tanto com o NRL quanto com a atividade da H^+ -ATPase de plântulas de milho respectivamente. Porém quando usado em conjunto com o HB/HI descreve um modelo de regressão multilinear aceitável para ambas as características biológicas [($R=0,79$; $F=21$; $P<0,0001$ - Quadro 9: Equação 10) e ($R=0,72$; $F=30$ e $P<0,0001$ - Quadro 10: Equação 8)]. De acordo com os resultados dos quatro experimentos conduzidos, as 29 substâncias húmicas utilizadas apresentaram M_w diferentes medidos tanto por HPSEC analítica quanto por DOSY-RMN (Quadro 3) e mesmo assim foram capazes de promover a indução do crescimento radicular em plântulas de milho independentemente de seus tamanhos. Portanto, é provável, que a atividade biológica destes materiais húmicos seja condicionada mais por moléculas móveis e heterogêneas encapsuladas nas superestruturas húmicas do que pelas suas dimensões moleculares propriamente ditas. Para avaliar as interações entre as variáveis dependentes (NRL e a atividade da H^+ -ATPase) com as variáveis independentes (M_w obtido pelo detector de IR e HB/HI) foram utilizados gráficos de superfície de resposta, elaborados pelo programa Unscrambler 10.0. De acordo com as Figuras 11 e 12 é possível observar que tanto a atividade da H^+ -ATPase quanto o NRL aumentam com o aumento dos valores do índice de hidrofobicidade independentemente da massa/tamanho moleculares nominais das diversas substâncias húmicas.

A utilização da quimiometria baseada em relação estrutura-atividade foi desenvolvida para moléculas discretas, ou seja, com estrutura bem definida. A aplicação desses modelos em extratos ou misturas geralmente não encontra qualquer relação. Os valores relativamente baixos encontrados para os ajustes dos modelos (entre 0,73 e 0,81), mas significativos, candidatam o HB/HI como um descritor eficiente para a bioatividade das substâncias húmicas.

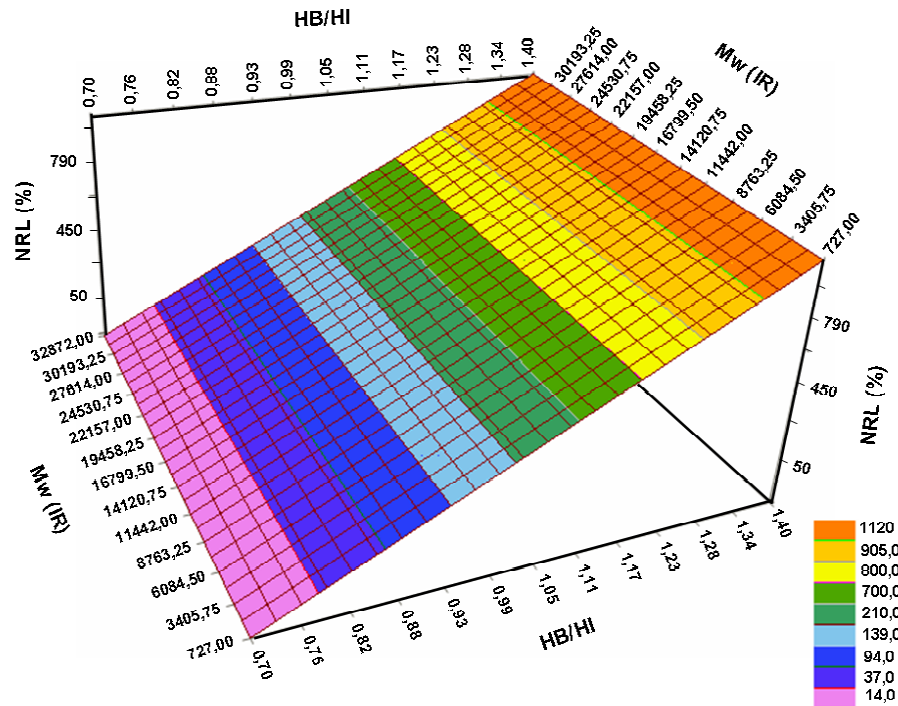


Figura 11. Superfície de resposta entre o número de raízes laterais, o índice de hidrofobicidade e a massa/tamanho molecular médio aparente (Mw).

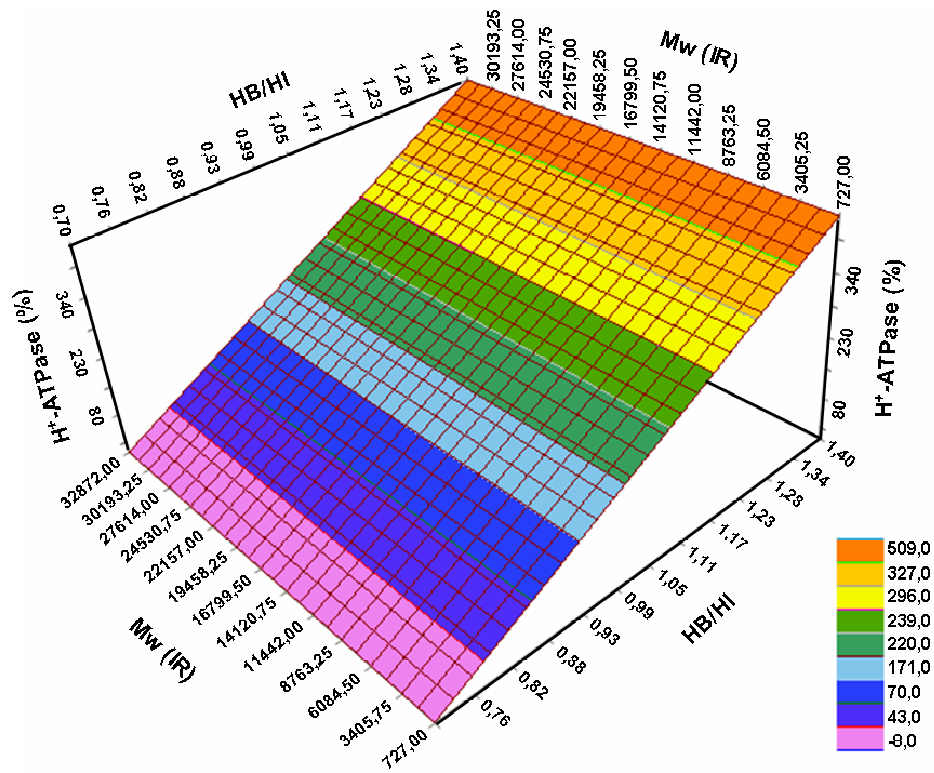


Figura 12. Superfície de resposta entre a atividade da H⁺-ATPase, o índice de hidrofobicidade e a massa/tamanho molecular médio aparente (Mw).

Quando analisados isoladamente, os experimentos encontraram valores mais altos de ajuste no modelo linear entre HB/HI e a promoção do crescimento radicular (Canellas et al. 2008a; Canellas et al. 2009; Canellas et al. 2010; e Dobbss et al. 2010). Piccolo (1996) postulou que os componentes hidrofóbicos da matéria húmica resultantes da decomposição de resíduos vegetais e da atividade microbiana são capazes de incorporar aleatoriamente moléculas mais polares e, portanto, protegê-las contra a degradação. Spaccini et al. (2000) mostraram que compostos orgânicos liberados no solo durante a mineralização de resíduos vegetais foram estabilizados contra a degradação microbiana, havendo um forte envolvimento dos componentes hidrofóbicos. Desta forma, seria plausível imaginar que tais materiais húmicos possuem um arranjo conformacional em solução por meio de uma hidratação de funções ácidas, permitindo que compostos de carbono entrem em contato com a superfície radicular promovendo o crescimento.

A relação entre a qualidade do solo e hidrofobicidade de matéria orgânica já foi mostrada em trabalho anterior (Capriel, 1997) e o conteúdo de carbono hidrofóbico já foi considerado responsável pela formação de complexos argilo-húmicos estáveis (Laird et al., 2001), pela estabilização da estrutura supramolecular dos ácidos húmicos em pH neutro (Piccolo, 2001), e pela preservação de biomoléculas oriundas de plantas e microrganismos no solo (Spaccini et al, 2000; Piccolo et al., 2004).

O processo de interceptação molecular em domínios húmicos hidrofóbicos sugere que quanto mais hidrofóbica a substância húmica, maior seu potencial de incorporação de moléculas bioativas hidrofóbicas, ao passo que, quanto maior for a diversidade química de tais moléculas, mais diversificada é sua bioatividade. De acordo com a visão estrutural recente que considera as SH como uma associação supramolecular, os agregados húmicos podem ser rompidos na presença de ácidos orgânicos (Piccolo et al., 2001; Piccolo, 2002; Piccolo e Spiteller, 2003). Na verdade, uma série de ácidos orgânicos que estão presentes em exsudatos radiculares de plantas podem “desagregar” as SH em moléculas húmicas relativamente menores (Piccolo et al., 1999; Cozzolino et al., 2001; Piccolo et al., 2003). Tais moléculas húmicas são então liberadas, podendo acessar as membranas celulares induzindo diferentes respostas fisiológicas. Este processo está de acordo com resultados recentes que mostram que plântulas de milho

tratadas com AH mudam o perfil de exudação de ácidos orgânicos e essa mudança está relacionada a um aumento na atividade da H⁺-ATPase de MP (Canellas et al., 2008b). Esse comportamento de agregação e desagregação dos domínios moleculares das SH pode, então, explicar a razão pela qual estas têm sido consideradas detentoras de atividade tipo-hormonal, agindo muitas vezes como fitormônios, tais como: auxinas, giberelinas, citocininas, e ou poliaminas (Young e Chen, 1997; Nardi et al. 2002).

Zandonadi et al. (2007) observaram que raízes de plântulas de milho tratadas com diferentes AH ou com diferentes concentrações de auxina apresentaram uma ativação diferencial nas suas bombas de H⁺ (de MP e vacúolo). Nesse estudo (voltar ao tópico 5.5) foram obtidas evidências de que, pelo menos em parte, a promoção do crescimento radicular pelas SH é do tipo auxínica uma vez que foi observada uma mudança significativa na rota de sinalização demonstrada pela maior atividade do gene promotor induzido por auxina (DR5::GUS) em plântulas de tomateiro transgênico (*S. lycopersicum* cv. Micro-Tom) tratados com diferentes SH. Como já relatado anteriormente, a presença de auxina na estrutura das SH já havia sido detectada por diferentes métodos, incluindo imunoenaios biológicos (Quaggiotti et al., 2004) e espectrometria de massas (Canellas et al., 2002). Contudo, no que diz respeito à atividade biológica, as SH são muito mais eficazes do que as auxinas sintéticas, sugerindo-se que a ativação das bombas de H⁺ e promoção do desenvolvimento radicular podem envolver a liberação de mais de uma molécula com atividade tipo hormonal das associações moleculares das SH. Portanto, as ações combinadas destas diferentes moléculas bioativas podem promover a indução de diferentes padrões de expressão e da atividade enzimática, além de estimular diferentes processos envolvidos com o crescimento radicular.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

As evidências experimentais obtidas nesse estudo permitiram estabelecer correlações significativas entre as estruturas químicas dos diferentes materiais húmicos estudados e suas respectivas atividades biológicas. O índice de hidrofobicidade foi a característica química que mais influenciou isoladamente ou em combinação com outros descritores químicos a promoção do crescimento radicular, avaliado tanto pelo número de raízes laterais emergidas do eixo principal como pela atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática, obtida a partir de vesículas de raízes de plântulas de milho. O domínio hidrofóbico dos agregados húmicos em solução parece ser decisivo para conservação de fragmentos de biomoléculas capazes de induzir o crescimento radicular. A partir dos resultados as principais conclusões que puderam ser obtidas foram:

1. Através de análises químicas e espectroscópicas pode-se concluir que as diferentes SH utilizadas nesta Tese possuem características químicas diferenciadas. Diferenças quanto aos valores da composição elementar, dimensões moleculares (medidas por HPSEC e DOSY-RMN) e índices de hidrofobicidade foram observadas;
2. As substâncias húmicas, quando em solução, puderam atuar como reguladoras do crescimento, uma vez que foram capazes de aumentar a atividade da H⁺-ATPase de MP, bem como o desenvolvimento radicular em plântulas de milho;

3. Foram obtidas evidências de que, pelo menos em parte, a promoção do crescimento radicular pelas SH é do tipo auxínica, uma vez que foi observada uma mudança significativa na rota de sinalização demonstrada pela maior atividade do gene promotor induzido por auxina (DR5::GUS) em plântulas de tomateiro transgênico (*S. lycopersicum* cv. Micro-Tom);
4. As análises de REA permitiram sugerir que quanto maior for o índice de hidrofobicidade das substâncias húmicas, maior será seu potencial de incorporação de moléculas bioativas hidrofóbicas, ao passo que, quanto maior for a diversidade química de tais moléculas, mais diversificada será sua bioatividade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, N.O., Canellas, L.P., Dobbss, L.B., Zandonadi D.B. (2009) Distribuição de massa molecular e bioatividade de ácidos húmicos. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, 33: 1613-1623.
- Aguirre, E., Lemenager, D., Bacaicoa, E., Fuentes, M., Baigorri, R., Angel, Z., Jose, G.M. (2009) 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 Physiol Biochem*, 47: 215-223.
- Aiken, G.R. (1985) Isolation and concentration techniques for aquatic humic substances. *In: Humic Substances in soil, sediment and water: geochemistry, isolation and characterization*. 1ed. New York. Ed. John Wiley e Sons. pp. 363-385.
- Albuzio, A., Ferrari, G., Nardi, S. (1986) Effects of humic substances on nitrate uptake and assimilation in barley seedlings. *Can. J. Soil Science*, 66: 731-736.
- Anjos, L.H.C. (1985) *Caracterização, gênese, classificação e aptidão agrícola de uma seqüência de solos do Terciário na região de Campos, RJ*. Tese (mestrado em Ciências - área de Ciência do Solo) Itaguaí - RJ, UFRRJ, 110 p.
- Barreto, W.O. (1986) *Eletroquímica de solos tropicais de carga variável: capacidade da dupla camada elétrica*. Tese (Doutorado em Agronomia) - Itaguaí - UFRRJ, 294 p.
- Bhalerao, R.P., Eklof, J., Ljung, K., Marchant, A., Bennett, M., Sandberg, G., (2002) Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in Arabidopsis seedlings. *Plant J.*, 29: 325-332.

- Bottomley, W.B. (1917) Some effects of organic-promotion substances auxinones) on the growth of *Lema minor* in mineral cultural solutions. *Roy. Soc. Proc., B. London*, 89: 481- 507.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *An. Bioch.*, 72: 248-254.
- Bremner, J.M., Mulvaney, C.S. (1982) Nitrogen total. *In: Methods of Soil Analysis*. A. L. Page (ed), American Society of Agronomy, Madison, pp. 595-624.
- Buchwald, P., Bodor, N. (1998) Proteins: structure and function. *Genetics*, 30: 86-88.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Façanha, A.L., 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.; 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., Olivares, F.L., Façanha, A.R. (2006) Efeitos Fisiológicos de Substâncias Húmicas - O estímulo às H⁺-ATPases. *In: Nutrição Mineral de Plantas*. Manlio Silvestre Fernandes. (Org.). Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 1, p. 175-200.
- Canellas, L.P., Zandonadi, D.B., Busato, J.G., Baldotto, M.A., Simões, 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 Sci.*, 173: 624-637.
- Canellas, L.P., Teixeira Junior, L.R.L., Dobbss, L.B., Silva, C.A., Medici, L.O., Zandonadi, D.B., Façanha, A.R. (2008b) Humic acids crossinteractions with root and organic acids. *Ann. Appl. Biol.*, 153:157-166.
- Canellas, L.P., Spaccini, R., Piccolo, A., Dobbss, L.B., Okorokova-Façanha, A.L., Santos, G.A., Olivares, F.L., Façanha, A.R. (2009) Relationships between chemical characteristics and root growth promotion of humic acids isolated from Brazilian oxisols. *Soil Sci.*, 174: 611-620.
- Canellas, L.P., Piccolo, A., Dobbss, L.B., Spaccini, R., Olivares, F.L., Zandonadi, D.B. Façanha, A.R. (2010a) Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. *Chemosphere*, 78: 457-466.
- Capriel, P. (1997) Hydrophobicity of organic matter in arable soils: Influence of management. *Eur. J. Soil Sci.*, 48: 457-462.
- Chen, J., Gu, B., Royer, R.A., Burgos, W.D. (2003) The roles of natural organic matter in chemical and microbial reduction of ferric ion. *Sci. Total Environment*, 307: 167-178.

- Chen, Y., Clapp, C.E., Magen, H. (2004) Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: The role of organo-iron complexes. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 50: 1089-1095.
- Cobas, J.C., Groves, P., Martín-Pastor, M., De Capua, A. (2005) New applications, processing methods and pulse sequences using diffusion NMR. *Curr. Anal. Chem.* 1: 289-305.
- Conte, P., Piccolo, A. (1999) Conformational arrangement of dissolved humic substances. Influence of solution composition on association of humic molecules. *Environm. Sci. Technol.*, 33: 1686-1690.
- Conte, P., Spaccini, R., Piccolo, A. (2004) State of the art of CPMAS ^{13}C NMR spectroscopy applied to natural organic matter. *Progr Nucl Magn Res Spectrom.*, 44: 215-223.
- Conte P., Spaccini, R., Piccolo, A. (2006) Advanced CPMAS ^{13}C NMR techniques from molecular characterization of size-separated fractions from a soil humic acid. *Anal. Bioan. Chem.*, 386: 382-390.
- Conte, P., Spaccini, R., Šmejkalová, D., Nebbioso, A., Piccolo, A. (2007) Spectroscopic and conformational properties of size-fractions separated from a lignite humic acid. *Chemosphere*, 69: 1032-1039.
- Cosgrove, D.J. (1998) Cell Wall Loosening by expansins. *Plant Physiol.*, 118: 333-339.
- Cosgrove, D.J. (2000) Expansive growth of plant cell walls. *Plant. Phys. Bioch.*, 38: 109-124.
- Cozzolino, A., Conte, P., Piccolo, A. (2001) Conformational changes of humic substances induced by some hydroxy, keto, and sulfonic acids. *Soil Biol. Biochem.*, 33: 563-571.
- Curtin, D., Wen, G. (1999) Organic matter fractions contributing to soil nitrogen mineralization potential. *Soil Science Soc. Am. J.*, 63: 410-415.
- DeMichelis, M.I., Spanswich, R.M. (1986) H^+ -pumping driven by vanadate sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiol.*, 81: 542-547.
- 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. *Ann. Appl. Biol.*, 151: 199-211.
- Dobbss, L.B., Canellas, L.P., Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Peres, L.E.P., Azevedo, M., Spaccini, R., Piccolo, A., Façanha, A.R. (2010) Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 3681-3688.

- Egeberg, P.K., Alberts, J.J. (2003) HPSEC as a Preparative Fractionation Technique for Studies of Natural Organic Matter (NOM). *Environmental Technology*, 24: 309-318.
- Egeberg, P.K., Eikenes, M., Gjessing, E.T. (1999) Organic nitrogen distribution in nom size classes. *Environ. Int.* 25: 225-236.
- Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) (1997) *Manual de Métodos de Análises de Solo*. 2nd ed. Centro Nacional de Pesquisa de Solos, Rio de Janeiro, 212 p.
- Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) (2006) Centro Nacional de Pesquisa de Solos. *Sistema Brasileiro de Classificação de Solos*. Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 412 p.
- Façanha, A.R., de Meis, L. (1995) Inhibition of maize root H⁺-ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes. *Plant Physiol.* 108: 241-246.
- 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.
- Fengel, D., Wegener, G. (eds.) (1984) *Wood, chemistry, ultrastructure, reactions*. New York: Waster e Grugter, 613 p.
- Ferreira, M.M.C., Montanari, C.A., Gáudio, A.C. (2002) Seleção de variáveis em QSAR. *Quim. Nova*, 25: 439-448.
- Ferro, N., Gallegos, A., Bultinck, P., Jacobsen, H.J., Carbo-Dorca, R., Reinard, T. (2006) Coulomb and overlap self-similarities: a comparative selectivity analysis of structure-function relationships for auxin-like molecules. *J. Chem. Inf. Model*, 46: 1751-1762.
- Fiske, C.F., Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66: 375.
- Flaig, W. (ed.) (1968) *Uptake of organic substances from soil organic matter by plants, study week on organic matter and soil fertility*, New York: Wiley-Interscience, pp. 723-776.
- Foye, W.O., Lemke, T.L., Willians, D.A. (1995) *Principles of medicinal chemistry*. 4. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 995 p.
- García, C. (1990) *Estudio del compostaje de residuos orgánicos. Valoración agrícola*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Murcia. 117p.
- Garcia-Mina, J.M., Antolin, M.C., Sanchez-Diaz, M. (2004) Metal-humic complexes and plant micronutrient uptake: a study based on different plant species cultivated in diverse soil types. *Plant and Soil*, 258: 57-68.

- Gaudio, A.C. (1996) Proposition, validation and analysis of QSAR models. *Quim. Nova*, 19: 278.
- Gaudio, A.C., Zandonade, E. (2001) Proposição, validação e análise dos modelos que correlacionam estrutura química e atividade biológica. *Quim. Nova*, 24: 658-671.
- Giannini, J. L., Briskin, D.P. (1987) Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissues. *Plant Physiol.*, 84: 613-618.
- Gilroy, S., Jones, D.L. (2000) Through form to function: root hair development and nutrient uptake. *Trends Plant Sci.*, 5: 1360-1385.
- Gloor, R., Leidner, H., Wuhrmann, K., Fleischmann, T. (1981) Exclusion chromatography with carbon detection (A tool for further characterization of dissolved organic carbon). *Water Res.*, 15: 457-462.
- Gnanadesikan, R. (ed.) (1977) *Methods for statistical data analysis of multivariate observations*. New York, John Wiley & Sons, 299 p.
- Hansch, C. (1969) A quantitative approach to biochemical structure-activity relationships. *Acc.Chem. Res.*, 2: 232.
- Hansch, C., Sammes, P.G., Taylor, J.B. (eds.) (1990) *Comprehensive medicinal chemistry: the rational design, mechanistic study & therapeutic application of chemical compounds*. Pergamon Press: Oxford, vol. 4. pp. 224.
- Hansch, C., Leo, A. (1995) *Exploring QSAR: Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*. American Chemical Society, Washington D. C., (Chapter 4) pp. 551.
- Hayes, M.H.B. (1997) Emerging concepts of the compositions and structures of humic substances. *In: Humic Substances, peats, and sludges. Health and Environmental Aspects*. M.H.B. Hayes and W.S. Wilson (eds), The Royal Society of Chemistry, Cambridge. pp. 3-30.
- Hayes, M.H.B., MacCarthy, P., Malcolm, R.L., Swift, R.S. (1989) Structure of Humic Substances: The Emergence of Forms, Chapter 24 *In: Humic Substances: II. In Search of Structure*", M.H.B. Hayes, P. MacCarthy, R.L. Malcolm and R.S. Swift, Eds., John Wiley and Sons, Chichester, pp. 689-733.
- Ikeya, K., Yamamoto, S., Watanabe, A. (2004) Semiquantitative GC/MS analysis of thermochemolysis products of soil humic acids with various degrees of humification. *Org. Geochem.*, 35: 583-594.
- Jacquin, F.; Vong, P.G. (1989) Incorporation of nitrogen fertilizer in the humified compounds of a typic Hapludalf. *The Science of the Total Environment*, 81/82: 465-469.

- Jefferson, R.A.; Kavanagh, T.A.; Bevan, M.W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.*, 6: 3901-3907.
- 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.
- Kubinyi, H. (1979) Lipophilicity and drug activity. *Prog Drug Res.*, 23:97-198.
- Kubinyi, H. (1993) *QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches*, Wiley-VCH, New York. 307p.
- Laird, D.A., Martens, D.A., Kingery, W.L. (2001) Nature of clay-humic complexes in an agricultural soil: I. chemical, biochemical, and spectroscopic analyses. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 65: 1413-1418.
- Laskowski, M.J., Williams, M.E., Nusbaum, H.C., Sussex, I.M. (1995) Formation of lateral-root-meristems is a 2-stage process. *Development*, 121: 3303-3310.
- Leyser, O., Fitter, A. (1998). Roots are branching out in patches. *Trends Plant Sci.*, 3: 203-204.
- Maeshima, M., Nakanishi, Y., Matsuura-Endo, C., Tanaka, Y. (1996) Proton pumps of the vacuolar membrane in growing plant cells. *J. Plant Res.*, 109: 119-125.
- Martin, Y.C. (1978) *Quantitative Drug Design: A Critical Introduction*. Marcel Dekker Inc.: New York, Basel, (Chapter 2) pp. 425
- Meyer, H.H. (1899) Welche Eigenschaft der Anästhetica bedingt ihre narkotische Wirkung? *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 42: 109-118. Traduzido para o inglês por Lipnich, R.L. (1993) capítulo 1. *In: Studies of narcosis*.
- Moniz, A.C. (1972) Mineralogia do Solo. *In: Elementos de Pedologia*. A.C. Moniz (ed.). Editora Poligono, São Paulo, Brazil, pp. 391-408.
- Moriau, L. (1999) Expression analysis of two gene subfamilies encoding the plasma membrane H⁺-ATPase in *Nicotiana glauca* reveals the major transport functions of this enzyme. *Plant J.*, 19: 31-41.
- Muscolo, A., Cutrupi, S., and Nardi, S. (1998) IAA detection in humic substances. *Soil Biol. Biochem.*, 30: 1199-1201.
- Muscolo, A., Francioso, O., Tugnoli, V., Nardi, S. (2007) The auxin-like activity of humic substances is related to membrane interactions in carrot cell cultures. *J. Chem. Ecol.*, 33: 115-129.
- Nannipieri, P., Grego, S., Dell'agnola, G., Nardi, S. (1993) Proprietà biochimiche e fisiologiche della sostanza organica. *In: Ciclo della sostanza organica nel*

- suolo: aspetti agronomici, chimici, ecologici, ecologici y selvicolturnali*. P. Nannipieri (ed.). Bologna: Patron, pp. 67-78.
- Nardi, S., Panuccio, M.R., Abenavoli, M.R., Muscolo, A. (1994) Auxin-like effect of humic substances from faeces of *Allolobophora caliginosa* and *A. rosea*. *Soil Biol. Biochem.*, 26:1341-1346.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Dalla Vecchia, F., Concheri, G. (1998). Effects of forest humus on biological activity in roots of *Pinus sylvestris* related to chemical humus fraction characteristics. *Fresenius environmental bulletin*, 7: 203-208.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Gessa, C., Ferrarese, L., Trainotti, L., Casadoro, G. (2000) A low molecular weight humic fraction on nitrate uptake and protein synthesis in maize seedlings. *Soil Biology e Biochemistry*, 32: 415-419.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello, A. (2002) Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biol. Biochem.*, 34: 1527-15336.
- Nardi, S., L'osoni, M., Pizzeghello, D., Provenzano, M.R., Cilenti, A., Sturaro, A., Rella, R., Vianello, A. (2005) Chemical characteristics and biological activity of organic substances extracted from soils by root exudates. *Soil Sci. Soc. Am.*, 369: 312-2019.
- Nardi, S., Muscolo, A., Vaccaro, S., Baiano, S., Spaccini, R., Piccolo, A. (2007) Relationship between molecular characteristics of soil humic fractions and glycolytic pathway and Krebs cycle in maize seedlings. *Soil Biol. Biochem.*, 39: 3138-3146.
- Oades, J.M., Kirkman, M.A., Wagner, G.H. (1970) The use of gas-liquid chromatography for the determination of sugars extracted from soils by sulphuric acids. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 34: 230-235.
- O'Donnell, R.W. (1973) The auxin-like effects of humic preparations from leonardite. *Soil Sci.*, 116:106-112.
- Overton, C.E. (1901). *Studien über die Narkose zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie*. Gustav Fischer, Jena. pp. 1-195. Traduzido para o inglês por Lipnich, R.L. (1993) capítulo 2. *In: Studies of narcosis*.
- Peters, W.S., Felle, H. (1999) The correlation of profiles of surface pH and elongation growth in maize roots. *Plant Physiol.*, 121: 905-912.
- Peuravuori, J., Pihlaja, K. (1998) Multi-method characterization of lake aquatic humic matter isolated with two different sorbing solids. *Anal. Chim. Acta*, 363: 235-247.
- Piccolo, A. (1996) Humus and soil conservation. *In: Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. A. Piccolo (ed.). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 225-264.

- Piccolo, A. (2001) The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci.*, 166: 810-833.
- Piccolo, A. (2002) The supramolecular structure of humic substances. A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Adv. Agr.*, 75: 57-134.
- Piccolo, A., Conte, P., Cozzolino, A. (2001) Chromatographic and spectrophotometric properties of dissolved humic substances compared with macromolecular polymers. *Soil Sci.*, 166: 174-185.
- Piccolo, A., Spiteller, M. (2003) Electrospray ionization mass spectrometry of terrestrial humic substances and their size-fractions. *Anal. Bioanal. Chem.* 377: 1047-1059.
- Piccolo, A., Nardi, S., Concheri, G. (1992) Structural characteristics of humic substances as related to nitrate uptake and growth-regulation in plant-systems. *Soil Biol. e Bioch.*, 24: 373-380.
- Piccolo, A., Nardi, S., Concheri, G. (1996) Macromolecular changes of humic substances induced by interaction with organic acids. *Europ. J. Soil Sci.*, 47: 319-328.
- Piccolo, A., Spaccini, R., Haberhauer, G., Gerzabek, M.H. (1999) Increased sequestration of organic carbon in soil by hydrophobic protection, *Naturwissenschaften*, 86: 496-499.
- Piccolo, A., Conte, P., Cozzolino, A. (2001) Chromatographic and spectrophotometric properties of dissolved humic substances compared with macromolecular polymers. *Soil Sci.*, 166: 174-185.
- Piccolo, A., Conte, P., Trivellone, E., Van Lagen, B., Buurman, P. (2002) 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 ¹H-NMR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.*, 36: 76-84.
- Piccolo, A., Conte, P., Spaccini, R., Chiarella, M. (2003) Effects of some dicarboxylic acids on the association of dissolved humic substances. *Biol. Fertil. Soils.*, 37: 255-259.
- Piccolo, A., Spaccini, R., Nieder, R., Richter, J. (2004) Sequestration of a biologically labile organic carbon in soils by humified organic matter. *Clim. Change*, 67: 329-343.
- Piccolo, A., Conte, P., Patti, A. F. (2006) O-Alkylation of a lignite humic acid by phase-transfer catalysis. *Anal. Bioanal. Chem.*, 384: 994-1001.
- Pinton, R., Cesco, S., Santi, S., Varanini, Z. (1995) Effect of soil humic substances on surface redox activity of oat roots. *Journal of Plant Nutrition*, 18: 2111-2120.

- Pinton, R., Cesco, S., Santi, S., Varanini, Z. (1997) Soil humic substances stimulate proton release by intact oat seedlings roots. *J. Plant Nutr.* 20: 857-869.
- Pinton, R., Cesco, S., Santi, S., Agnolon, F., Varanini, Z. (1999a) Water extractable humic substances enhance iron deficiency responses by Fe deficient cucumber plants. *Plant and Soil*, 210: 145-157.
- Pinton, R., Cesco, S., Lacoletti, G., Astolfi, S., Varanini, Z. (1999b) Modulation of nitrate uptake by water-extractable humic substances: Involvement of root plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant and Soil*, 215: 155-163.
- Pizzeghello, D., Nicolini, G., Nardi, S. (2001) Hormone-like activity of humic substances in *Fagus sylvaticae* forests. *New Phytol.*, 151: 647-657.
- Preston, C.M. (1996) Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. *Soil Sci.*, 161: 144-166.
- Quaggiotti, S, Ruperti, 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.). *J. Exp. Bot.*, 55: 803-813.
- Rayle, D.L., Cleland, R.E. (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.*, 99: 1271-1274.
- Retamal, C.A., Thiebaut, P., Alves, E. W. (1999) Protein purification from polyacrylamide gels by sonication extraction. *Anal. Biochem.* 268: 15-20.
- Rice, J., MacCarthy, P. (1991) Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances. *Org. Geochem.*, 17: 635-648.
- Rodrigues, T.E., Klant, E. (1978) Mineralogia e gênese de uma seqüência de solos do distrito federal. *Rev. Bras. Ci. Solo.*, 2: 132-139.
- Ruck, A., Palme, K., Venis, M.A., Napier, R.M., Felle, R.H. (1993) Patch-clamp analysis establishes a role for an auxin-binding protein in the auxin stimulation of plasma-membrane current in *Zea mays* protoplasts. *Plant J.*, 4: 41-46.
- Schnitzer, M., Poasp, P.A. (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. *Magn. Reson. Chem.*, 40: 572-582.
- Šmejkalová, D., Spaccini, R., Piccolo, A. (2008) Multivariate analysis of CPMAS ¹³C NMR spectra of soils and humic matter as a tool to evaluate organic carbon quality in natural systems. *Eur. J. Soil Sci.*, 59: 496-504.

- Šmejkalová, D., Piccolo, A. (2008) Aggregation and disaggregation of humic supramolecular assemblies by NMR diffusion ordered spectroscopy (DOSY-NMR). *Environ. Sci. Technol.*, 42: 699-706.
- Spaccini, R., Piccolo, A. (2007) Molecular characterization of compost at increasing stages of maturity. 2. Thermochemolysis-GC-MS and ^{13}C -CPMAS-NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 2303-2311.
- Spaccini, R., Piccolo, A. (2008) Spectroscopic characterization of a compost at different maturity stages. *Clean*, 36: 152-157.
- Spaccini, R., Piccolo, A., Haberhauer, G., Geerbazek, M.H. (2000) Transformations of organic matter from maize residues into labile and humic fractions of three European soils as revealed by ^{13}C distribution and CPMAS-NMR spectra. *Eur. J. Soil Sci.*, 51: 583-594.
- Spaccini, R., Piccolo, A., Conte, P., Mbagwu, J.S.C. (2006) Changes of humic substances characteristics from forested to cultivated soils in Ethiopia. *Geoderma*, 132: 9-19.
- Specht, C.H., Kumke, M.U., Frimmel, F.H. (2000) Characterization of NOM adsorption to clay minerals by size exclusion chromatography. *Water Res.*, 34: 4063-4069.
- Stevenson, J.F. (ed.) (1994) *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd ed., New York: John Wiley e Sons INC., 496p.
- Sze, H., Li, X., Palmgren, M. G. (1999) Energization of plant cell membranes by H^+ -pumping ATPases: Regulation and biosynthesis. *Plant Cell*. 11: 677-689.
- Tan, K.H. (ed.) (2003) *Humic Matter in Soil and the Environment: Principles and Controversies*. New York basel, New York: Marcel Dekker, INC., 386p.
- Tanford, C. (ed.) (1991) *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*. New York, Wiley, 402p.
- Tavares, L.C. (2004) QSAR: A Abordagem de Hansch. *Quim. Nova*, 27: 631-639.
- Thorn, K., Pettigrew, P., Goldenberg, W., Weber, E. (1996) Covalent binding of aniline to humic substances. 2. ^{15}N NMR studies of nucleophilic addition reactions. *Environ. Sci. Technol.*, 30: 2764-2775.
- Topliss, J.G., Costello, R.J. (1972) Chance correlations in structure-activity studies using multiple regression analysis. *J. Med. Chem.*, 15: 1066-1068.
- Trevisan, S., Pizzeghello, D., Ruperti, B., Francioso, O., Sassi, A., Palme, K., Quaggiotti, S., Nardi, S. (2010) Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in Arabidopsis. *Plant Biology*, 12: 604-614.

- Vaughan, D. (1974) A possible mechanism for humic acid action on cell elongation in root segments of *Pisum sativum* under aseptic conditions. *Soil Biol. Biochem.*, 6:241-247.
- Vaughan, D., Malcolm, R.E. (1985) Influence of humic substances on growth and physiological processes. *In: Soil organic matter and biological activity*. D. Vaughan e R. E. Malcolm (eds.). Dordrecht: Martins Nijhoff Dr W. Junk Publisher, pp. 37-75.
- Visser, S.A. (1982) Surface active phenomena by humic substances of aquatic origin. *Rev. Fr. Sci. Eau*, 1: 285-295.
- Wermuth, D.G. (ed.) (2000) *The practice of medicinal chemistry*. San Diego: Academic Press. 967 p.
- Wershaw, R.L. (1986) A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic chemicals in soil-water or sediment-water systems. *J. Contam. Hydrol.*, 1: 29-45.
- Wilson, M. A. (ed.) (1987) *NMR Techniques and Applications in Geochemistry and Soil Chemistry*. 1st ed. Pergamon Press, London. 205p.
- Xiaoli, C., Shimaoka, T., Xiaoyan, C., Qiang, G., Youcai, Z. (2007) Spectroscopic studies of the progress of humification processes in humic substances extracted from refuse in a landfill. *Chemosphere*, 69: 1446-1453.
- Yeomans, J.C., Bremner, J. (1988) A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 19: 1467-1476.
- Yau, W.W., Kirkland, J.J., Bly, D.D. (1979) *Modern Size Exclusion Chromatography*. Wiley Interscience, New York, NY, pp. 318-326.
- Young, C.C., Chen, L.F. (1997) Polyamines in humic acid and their effect on radical growth of lettuce seedlings. *Plant Soil.*, 195: 143-149.
- Zancani, M., Petrusa, E., Krajšáková, J., Casolo, V., Spaccini, R., Piccolo, A., Macrì, F., Vianello, A. (2009) Effect of humic acids on phosphate level and energetic metabolism of tobacco BY-2 suspension cell cultures. *Environmental and Experimental Botany*, 65: 287-295.
- 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.
- 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. (2010) Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. *Planta*, 231: 1025-1036.

APÊNDICE

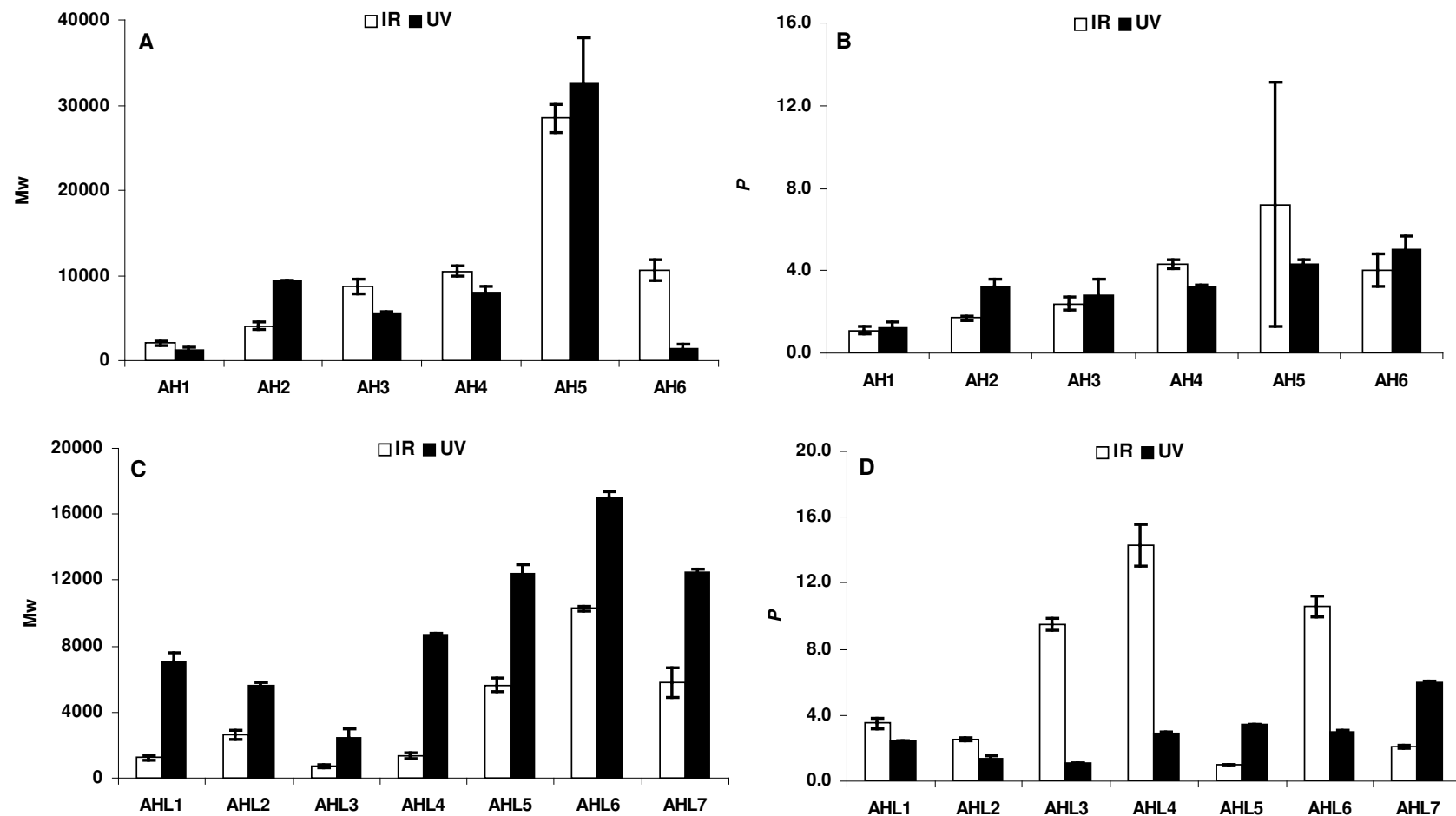


Figura 1A. M_w e polidispersividade determinados pelos detectores de UV e IR. Em A e B: respectivamente, M_w e polidispersividade dos AH isolados de uma seqüência de solos. Em C e D: respectivamente, M_w e polidispersividade dos AH isolados dos sete diferentes Latossolos.

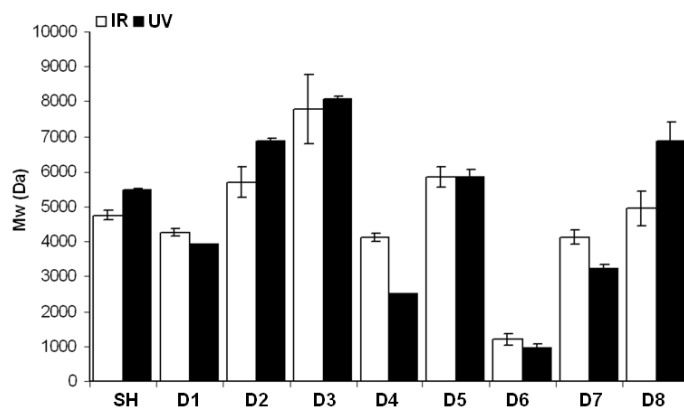


Figura 2A. Mw da SH original e seus derivados obtidos por diferentes reações químicas, determinados pelos detectores de UV e IR.

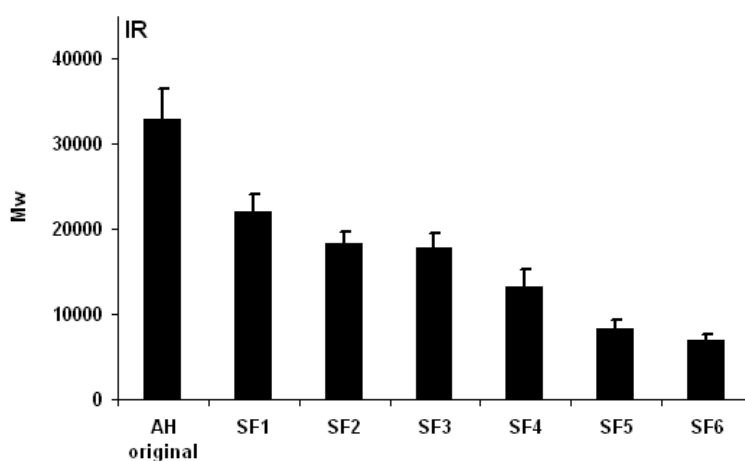


Figura 3A. Mw do AH original e suas subfrações determinados pelo detector de IR.

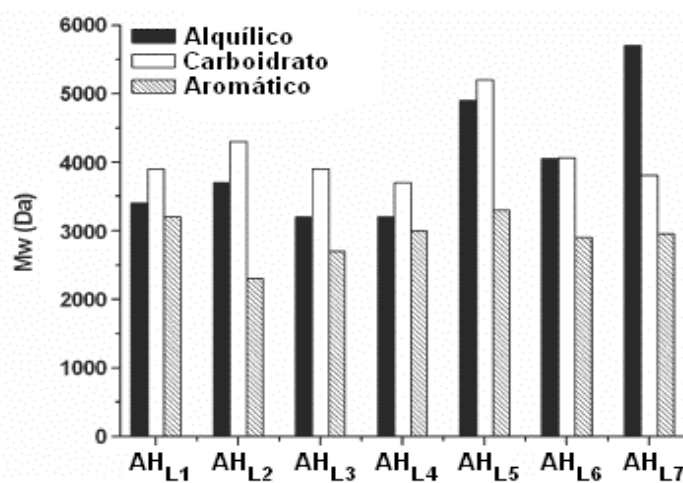


Figura 4A. Tamanhos moleculares (Mw) dos sete diferentes AH isolados de Latossolos devido aos componentes alquílico; carboidrato e aromático, observados por DOSY-RMN.

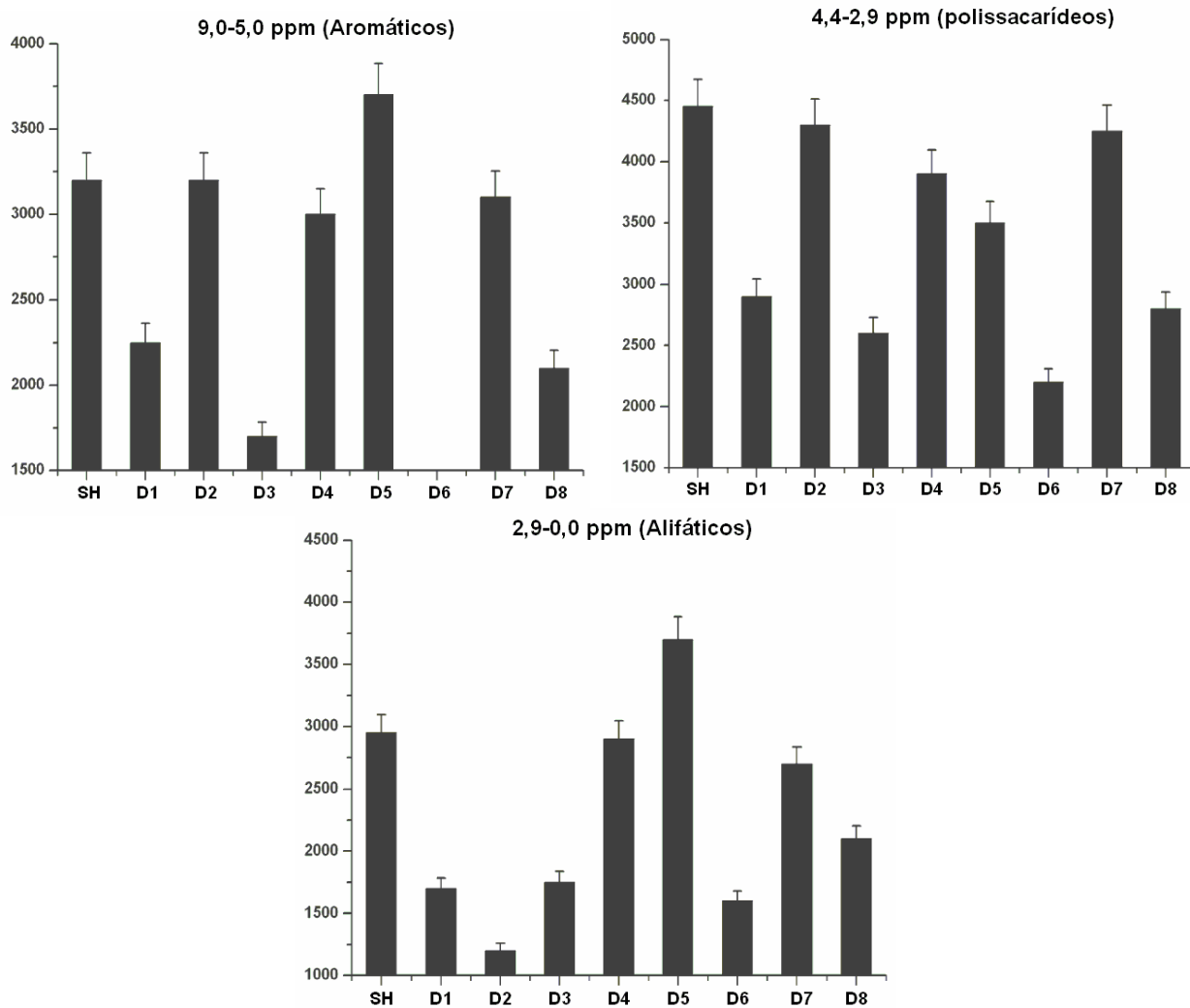


Figura 5A. Tamanho molecular (Mw) da SH original e seus derivados químicos obtidos pelos coeficientes de difusão a partir dos espectros de DOSY ^1H -RMN e curva de calibração de padrões de conhecidos de pesos moleculares.

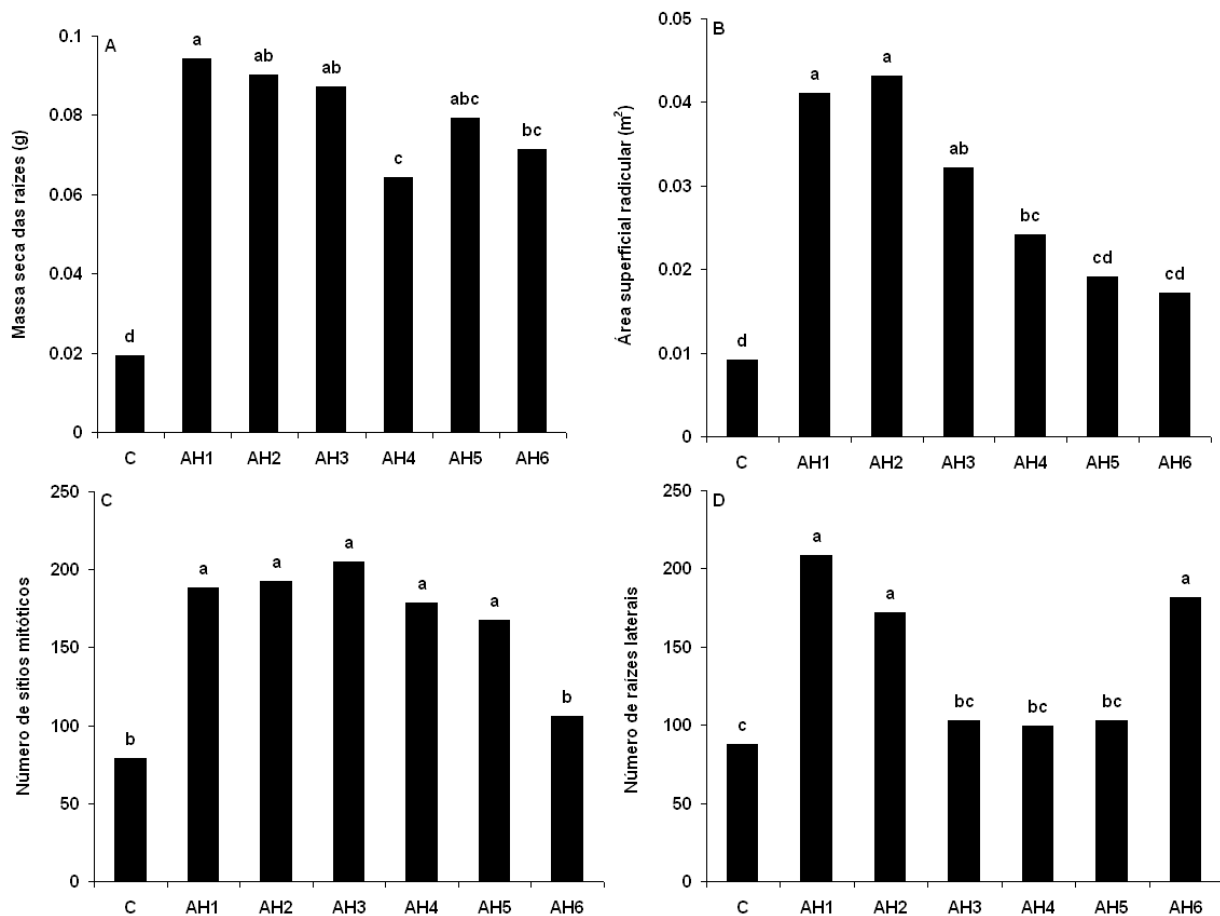


Figura 6A. Efeitos dos AH isolados a partir de seis diferentes solos tropicais no crescimento radicular de plântulas de milho. Dados referentes a massa seca das raízes (A); área superficial radicular (B); número de sítios mitóticos (C) e número de raízes laterais (D) representam a média de 15 repetições. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste DMS ($P < 0,05$).

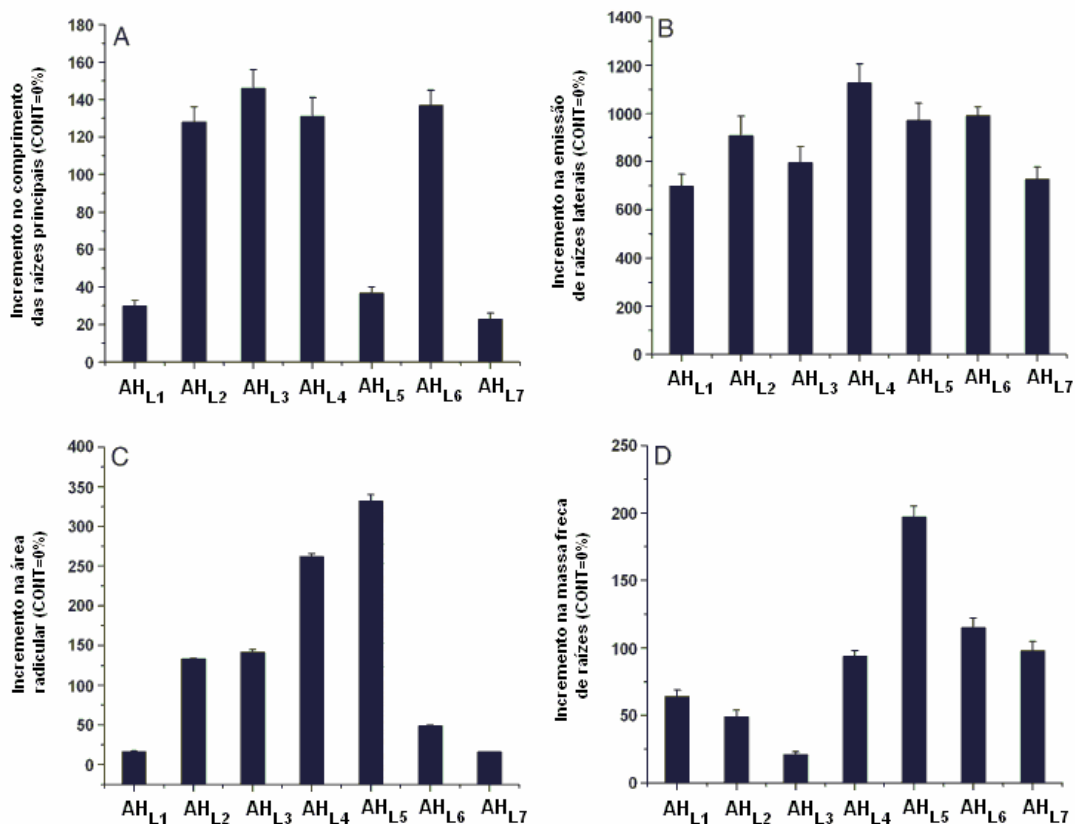


Figura 7A. Efeitos de AH isolados de sete diferentes Latossolos em raízes de plântulas de milho. Os dados foram normalizados em relação ao controle [(plantas sem tratamento com AH (Cont = 0)], sendo os valores representados pelas médias \pm DP (n=15). A: comprimento das raízes principais; B: número de raízes laterais emergidas; C: área radicular; D: massa fresca de raízes.

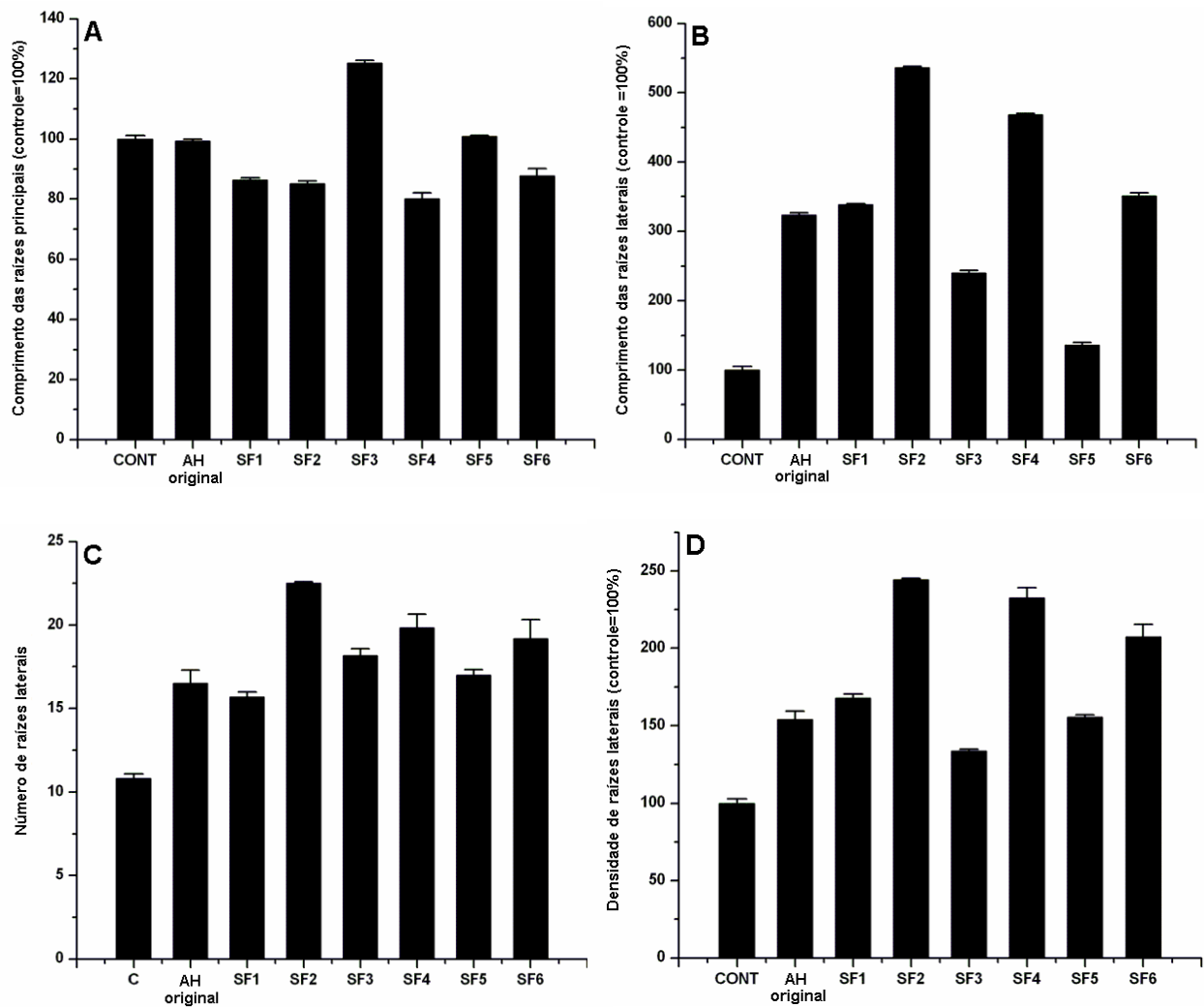


Figura 8A. Efeito do AH e suas subfrações sobre o crescimento radicular de plântulas de milho. Os dados foram normalizados em relação as plântulas controle (100%), \pm desvio padrão. (A) comprimento da raiz principal, (B) número de raízes laterais; (C) comprimento das raízes laterais e (D) Densidade de raízes laterais.

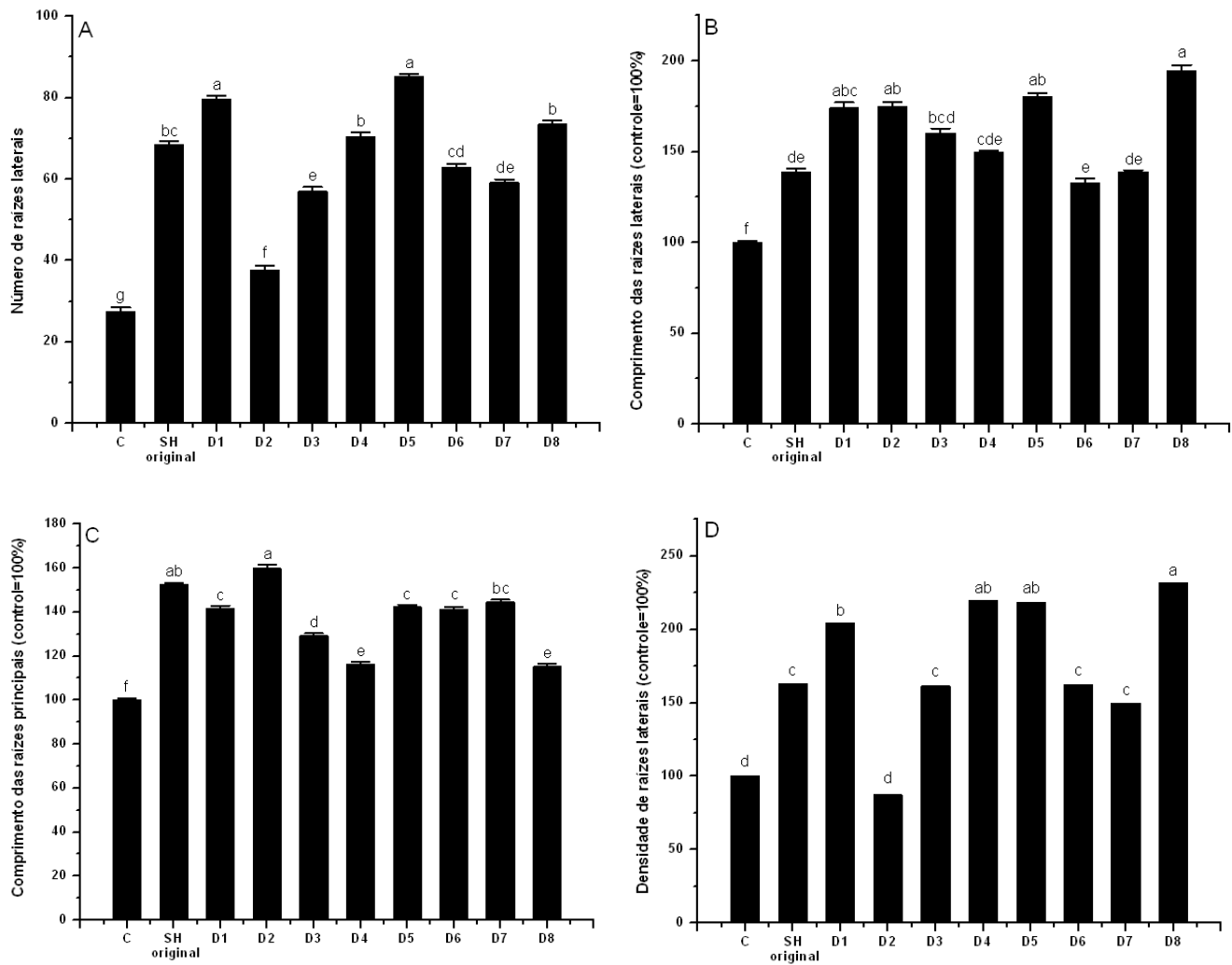


Figura 9A. Efeito da SH original e seus 8 derivados húmicos produzidos sobre o crescimento radicular de plântulas de milho tratadas com a dose ótima de cada material húmico (em mM C L⁻¹). Em A: Número de raízes laterais emergidas; B: Comprimento das raízes laterais; C: comprimento das raízes principais e D: Densidade de raízes laterais. C=controle. Letras minúsculas diferentes correspondem às diferenças significativas entre as médias pelo teste DMS ($p < 0,05$). Dados do comprimento das raízes principais e laterais, bem como da densidade de raízes laterais normalizados em relação as plântulas controle (100%) \pm desvio padrão.

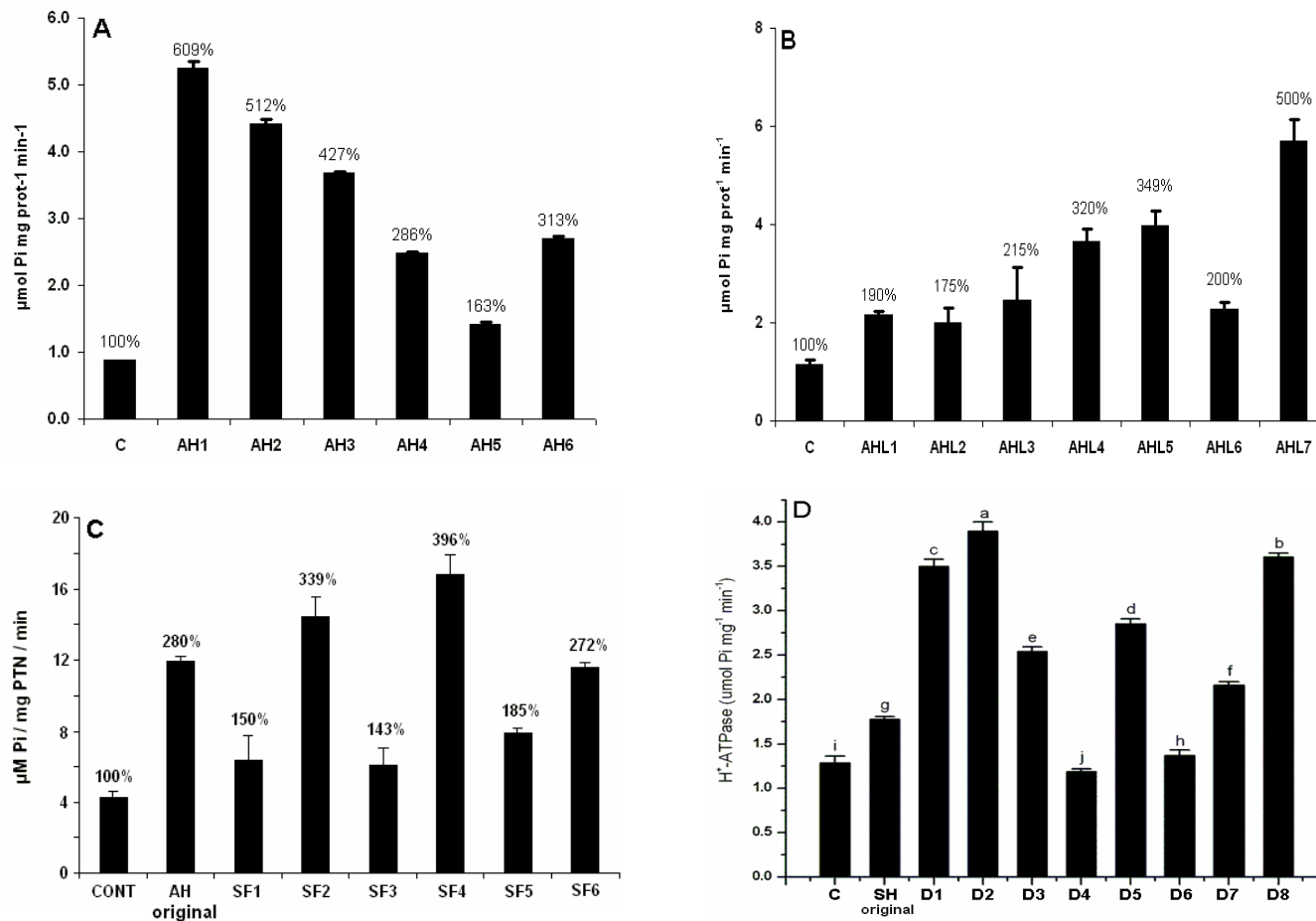


Figura 10A. Atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática de vesículas isoladas de raízes de plântulas de milho tratadas com as doses ótimas de cada material húmico. Em A: Dados do primeiro experimento; B: Dados do experimento 2; C: Dados do terceiro experimento e D: Dados do experimento 4. Os valores representam o resultado de três preparações independentes para obtenção das vesículas microssomais.

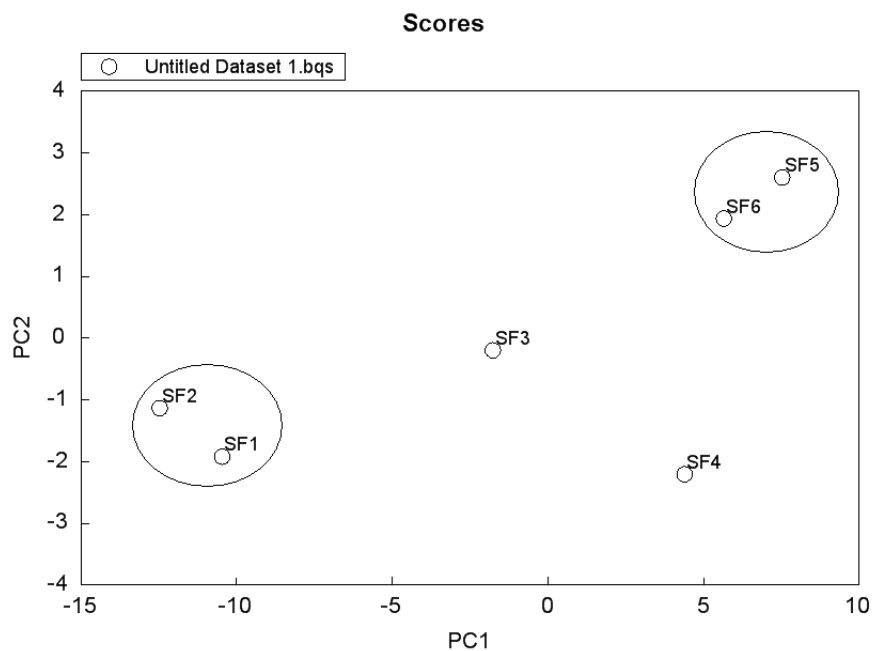


Figura 11A. Dispersão das subfrações húmicas obtidas por HPSEC preparativa em relação aos seus escores, nos dois primeiros componentes principais. 90 % da variância total foi representada pelos 2 primeiros componentes principais. Em destaque a nítida distinção entre as subfrações mais hidrofóbicas (SF1 e SF2) com relação às mais hidrofílicas (SF5 e SF6).