

**CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E BIOATIVIDADE DE ÁCIDOS
HÚMICOS ISOLADOS DE VERMICOMPOSTOS EM DIFERENTES
ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO**

NATÁLIA DE OLIVEIRA AGUIAR

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO - 2011**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 001/2012

Aguiar, Natália de Oliveira

Características químicas e bioatividade de ácidos húmicos isolados de vermicompostos em diferentes estádios de maturação / Natália de Oliveira Aguiar. – 2010.

96 f. : il.

Orientador: Luciano Pasqualoto Canellas

Dissertação (Mestrado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2010.

Bibliografia: f. 62 – 80.

1. Humificação 2. Relação estrutura-atividade 3. Efeitos fisiológicos
4. Ácido húmico I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 631.417

**CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E BIOATIVIDADE DE ÁCIDOS
HÚMICOS ISOLADOS DE VERMICOMPOSTOS EM DIFERENTES
ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO**

NATÁLIA DE OLIVEIRA AGUIAR

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

Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO - 2011

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E BIOATIVIDADE DE ÁCIDOS
HÚMICOS ISOLADOS DE VERMICOMPOSTOS EM
DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO

NATÁLIA DE OLIVEIRA AGUIAR

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

Aprovada em 11 de Outubro de 2011.

Comissão Examinadora:



Prof. Eduardo de Sá Mendonça (Ph.D., Ciência do solo) - UFES



Pesq. Riccardo Spaccini (Ph.D., Ciência do solo)
Universidade de Nápoles, IT



Prof. Dr. Leonardo Oliveira Medici - UFRRJ



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

A minha família que é à base de tudo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pelo apoio ao ensino e pesquisa
- Ao Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para Agricultura (Nudiba) pela oportunidade e excelente suporte para pesquisa;
- Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos;
- Ao meu orientador Prof. Luciano Pasqualoto Canellas, pela confiança, oportunidades e ensinamentos;
- Ao meu co-orientador Etelvino Henrique Novotny e seu co-orientado Ruben Aucchaise por todo suporte e ajuda nas análises de RMN e multivariada;
- Ao Prof. Lazaro Eustaquio Pereira Peres da ESALQ e seus alunos, pelos ensinamentos e acolhida;
- Aos amigos do Nudiba: Leonardo Dobbss, Fabio Olivares, Validoro, Jhonnatan, Ingridy, Marcellly, Silésio, Tales, Manuella, Daniele, Jucimara,

em especial a Kamilla Aguiar, Livia Lima e Lely pelos momentos de descontração, alegria e companheirismo!

- Ao meu eterno amigo Tiago David que muito ajudou me e deu me forças para chegar aonde cheguei. Onde quer que esteja será sempre meu amigo “malinha”;
- Aos meus amigos Pedro, Paulo Cesar, Priscila e Liliane por estarem sempre comigo;
- Ao Gilliard pela paciência, amor incondicional e companheirismo.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Vermicompostagem	4
2.2 Processo de Humificação	6
2.3 Caracterização Química da Matéria Húmica	9
2.4 Bioatividade das Substâncias Húmicas	12
3. HIPÓTESE E OBJETIVO GERAL	16

3.1	Objetivos específicos	16
4.	MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1	Produção dos vermicompostos, amostragem e análises	18
4.2	Extração das substâncias húmicas.....	19
4.3	Ressonância Magnética Nuclear com Polarização Cruzada e Rotação no Ângulo Mágico (^{13}C CP-MAS NMR)	20
4.4	Análise dos componentes principais (ACP)	20
4.4	Cromatografia Líquida de Alta Performance por Exclusão de Tamanho (HPSEC).....	21
4.5	Cromatografia Líquida de Alta Performance com Fase Reversa (RP-HPLC).....	22
4.6	Análise de raízes laterais de plântulas de milho	22
4.7	Medida de acidez em solução.....	23
4.8	Atividade da H^+ -ATPase de membrana plasmática	24
4.9	Ensaio com mutantes de tomateiro variedade Micro-Tom com gene repórter sintético DR5::GUS	25
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1.1	Caracterização do vermicomposto.....	26
5.1.2	Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C com Polarização Cruzada e Rotação no Ângulo Mágico (^{13}C CP-MAS NMR) do vermicomposto	29
5.2.1	Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C com Polarização Cruzada e Rotação no ângulo mágico (^{13}C CP-MAS NMR).....	36
5.3	Análise dos componentes principais (ACP)	40
5.4	Cromatografia líquida por exclusão de tamanho	43

5.5 Cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa (RP-HPLC).....	47
5.6 Promoção do crescimento radicular em plântulas de milho.....	50
5.7 Medida da acidez em solução e atividade da H ⁺ -ATPase	54
5.8 Ensaio com mutantes de tomateiro variedade Micro-Tom com gene repórter sintético DR5::GUS.....	57
6.CONCLUSÕES	60
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

Lista de Figuras

- Figura 1. Mudanças na CTC= extraída com acetato de amônio a pH 7, relação C/N e teor de ácidos húmicos (AH) extraídos de diferentes vermicompostos: (VC1) esterco bovino, (VC2) esterco bovino e bagaço de cana, (VC3) esterco bovino e torta de girassol e (VC4) esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol, em diferentes estádios de maturação (0, 30, 60, 90 e 120 dias).28
- Figura 2. Espectros de RMN ^{13}C de vermicomposto produzido a partir de: (VC1) esterco bovino; (VC2) esterco e bagaço de cana; (VC3) esterco bovino e torta de girassol e (VC4) esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol em diferentes estádios de maturação (0 e 120 dias).32
- Figura 3. Espectros de RMN de ^{13}C de AH extraídos de diferentes vermicompostos: (AH1) esterco bovino; (AH2) esterco e bagaço de cana; (AH3) esterco bovino e torta de girassol e (AH4) esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol em diferentes estádios de maturação (0,60 e 120 dias).38

Figura 4. Scores (A) e Loadings (B) das componentes principais (CP1 e CP2) extraídas dos espectros de RMN de ¹³ C das amostras de vermicompostos e ácidos húmicos ao longo do tempo de maturação.	42
Figura 5. HPSEC - Perfil cromatográfico de AH extraídos de diferentes vermicompostos : (AH1) esterco bovino; (AH2) esterco e bagaço de cana; (AH3) esterco bovino e torta de girassol e (AH4) esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol em diferentes estádios de maturação (0,60 e 120 dias).	45
Figura 6. Índice de massa molecular relativa (Mw) de AH extraídos de diferentes vermicompostos: (AH1) esterco bovino; (AH2) esterco e bagaço de cana; (AH3) esterco bovino e torta de girassol e (AH4) esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol em diferentes estádios de maturação (0, 60 e 120 dias).	46
Figura 7. RP-HPLC - Perfil cromatográfico de AH extraídos de diferentes vermicompostos : (AH1) esterco bovino; (AH2) esterco e bagaço de cana; (AH3) esterco bovino e torta de girassol e (AH4) esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol em diferentes estádios de maturação (0,60 e 120 dias).	48
Figura 8. RP-HPLC – Índice de Hidrofobicidade de AH extraídos de diferentes vermicompostos : (AH1) esterco bovino; (AH2) esterco e bagaço de cana; (AH3) esterco bovino e torta de girassol e (AH4) esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol em diferentes estádios de maturação (0,60 e 120 dias).	49
Figura 9. Efeito estimulatório de AH sobre o número de raízes laterais de plântulas de milho. Os AH foram isolados de diferentes vermicompostos : (AH1) esterco bovino; (AH2) esterco e bagaço de cana; (AH3) esterco bovino e torta de girassol e (AH4) esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol em diferentes estádios de maturação (0,30, 60, 90 e 120 dias).	53
Figura 10. Medida de pH de solução contendo plântulas de milho tratadas com AH. Os AH foram isolados de diferentes vermicompostos: (AH1) esterco bovino; (AH2) esterco e bagaço de cana; (AH3) esterco bovino e torta de girassol e (AH4) esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol em diferentes estádios de maturação (0,30, 60, 90 e 120 dias).	56

Figura 11. Relação entre extrusão de H^+ e atividade H^+ -ATPase de membrana plasmática de plântulas de milho tratadas com o AH2 (esterco bovino e bagaço de cana) extraídos ao final do processo de vermicompostagem.57

Figura 12. Ensaio histoquímico para detecção da atividade da enzima glucuronidase (GUS) em raízes de plântulas do tomateiro transgênico DR5::GUS. As plântulas foram tratadas com AIA, $CaCl_2$ 2 mM (controle) e AH extraídos vermicomposto em diferentes estádios de maturação (0,60 e 120 dias): (AH1) esterco bovino; (AH2) esterco e bagaço de cana; (AH3) esterco bovino e torta de girassol e (AH4) esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol. A barra de escala corresponde a 50 μm59

RESUMO

AGUIAR, NATÁLIA O. Msc.- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Outubro de 2011. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E BIOATIVIDADE DE ÁCIDOS HÚMICOS ISOLADOS DE VERMICOMPOSTOS EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO. Orientador: Luciano Pasqualoto Canellas. Co-orientador: Etelvino Henrique Novotny.

A utilização de insumos biológicos na produção agrícola vem crescendo a cada dia, diminuindo a dependência por produtos industrializados, que apresentam baixa eficiência de uso e custos cada vez mais significativos. A matéria orgânica (MO) estabilizada pela ação de minhocas tem reconhecida capacidade de estimular o crescimento vegetal e pode ser utilizada na produção de bioestimulantes. O produto gerado pelo processo da vermicompostagem de resíduos orgânicos é rico em substâncias húmicas (SH), especialmente ácidos húmicos (AH), um estimulante do crescimento vegetal. O objetivo do trabalho foi avaliar o processo de vermicompostagem de diferentes resíduos orgânicos através das características químicas e da bioatividade dos AH isolados dos vermicompostos em diferentes estádios de maturação (0, 30, 60, 90 e 120 dias).

Quatro resíduos foram utilizados na produção dos vermicompostos: esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol. Os vermicompostos foram caracterizados quimicamente pela determinação da relação C/N, CTC e teor de AH. A conformação em solução dos AH foi analisada por cromatografia líquida de alta performance por exclusão de tamanho (HPSEC) utilizando a coluna Polysep-GFC-P 3000 (Phenomenex). O conteúdo hidrofóbico foi obtido por cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (RP-HPLC) utilizando a coluna Supelco C-18. O processo de maturação dos vermicompostos e dos AH também foi avaliado por medidas espectroscópicas utilizando a ressonância magnética nuclear (RMN do ^{13}C). A bioatividade do material foi analisada pelo número de raízes laterais e medição de pH em solução contendo plântulas de milho tratadas com AH. Plantas mutantes com gene DR5::GUS responsivo a auxina foram utilizadas para verificar possível ação auxínica dos AH. Independentemente dos resíduos orgânicos usados neste trabalho, o processo de vermicompostagem foi caracterizado pela diminuição da relação C/N, aumento da CTC e do conteúdo de C-AH, assim como mudanças na abundância relativa de grupamentos funcionais verificados pela RMN de ^{13}C , tais como aumento de aromáticos e fenólicos e diminuição de carboidratos. A ACP mostrou que os AH apresentam menor quantidade de celulose (CP1) e maior quantidade de ácidos graxos (CP2) quando comparado aos vermicompostos. A promoção do crescimento radicular pelos AH parece ser do tipo auxínica, uma vez que foi observada a ativação do gene sintético (DR5::GUS) responsivo a auxina. Os AH são bons indicadores do processo de humificação. Todos os AH apresentaram bioatividade elevada a partir dos 60 dias de vermicompostagem. Os vermicompostos independentes do resíduo utilizado podem ser utilizados como fontes de extração de substâncias húmicas bioativas aos 60 dias de vermicompostagem.

Palavras-chave: humificação, relação estrutura-atividade e efeitos fisiológicos.

ABSTRACT

AGUIAR, NATÁLIA O. Msc.- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. October, 2011. CHARACTERISTICS OF HUMIC ACIDS ISOLATED FROM VERMICOMPOSTS AT DIFFERENT MATURATION STAGES. Adviser: Luciano Pasqualoto Canellas. Co-adviser: Etelvino Henrique Novotny.

Vermicompost is an environmentally friendly alternative, which is enriched with highly bioactive humic acid (HA)-like substances. The main objective of this work was to evaluate vermicompost process through chemical characteristics and bioactivity of HAs isolated at increasing vermicompost maturation stages (0, 30, 60, 90 and 120 days). Four residues were used in the vermicomposting production: cattle manure, sugarcane bagasse and sunflower cake. The molecular conformation of the HAs was determined by high performance size exclusion chromatographic (HPSEC) and reverse phase – high performance liquid chromatographic (RP-HPLC). We applied solid-state NMR spectroscopy (^{13}C -NMR) and principal components analysis (PCA) to follow the humification process. Measuring acidity in solution and lateral root emergence were used to monitor HAs bioactivity. The auxin-like activity of HAs was tested using tomato (cv. MicroTom) seedlings expressing *DR5* auxin synthetic promoter fused to the β -glucuronidase (*GUS*) reporter gene. Independently of organic waste used in this work, the

vermicomposting process shows decrease in C/N ratio, increase CEC and HA-C, as well changes in the relative abundance of functional groups analyzed by ^{13}C NMR. During vermicompost maturation, a decrease of carbohydrate content and the selective preservation of the hydrophobic alkyl and aryl C components were observed by ^{13}C -NMR. The PCA indicated that the HA have a lower amount of cellulose (CP1) and an increased amount of fatty acids (CP2) when compared to the vermicomposting process. The apparent molecular weight and hydrophobicity determined of HPLC did not show direct relation with HAs bioactivity. However after 60 days of vermicomposting, all HAs enhanced inducing lateral root emergence, acidity increase in solution. The HAs showed ability to induce auxin-responsive synthetic reporter *DR5::GUS* in tomato. They are all effective in promoting root growth and can be used as organic substrates.

Keywords: humification, structure-activity, physiology effects.

1. INTRODUÇÃO

A prática da adubação de plantas com matéria orgânica (MO) é milenar e se confunde com a própria história da civilização. A forma pela qual ela sustenta a agricultura ao longo de todos esses anos instiga a curiosidade e motiva as pesquisas. Durante muito tempo, baseado apenas no seu conhecimento empírico, o homem associou solos com coloração mais escura a solos mais férteis, devido ao maior conteúdo de MO. Aristóteles (384-322 A.C.) foi o primeiro a sugerir que as plantas adquiriam seu alimento “digerindo” componentes da terra tal como os animais (Nardi et al., 2009). Plínio, o Velho (23-79 AC), na *Naturalis historiae* relatou a capacidade do solo de produzir um tipo de esterco capaz de fornecer nutrientes para as plantas. Civilizações ainda mais antigas como os Persas no oriente crescente, Egípcios no vale do Nilo e Chineses foram sustentadas pela produção agrícola nas margens de rios que eram naturalmente enriquecidas com detritos orgânicos e sedimentos devido a inundações periódicas. A adição de carvão ao solo é resultante de uma prática milenar dos índios da Amazônia, que resultou na conhecida “Terra Preta de Índios”. Essa prática aumentava a

fertilidade do solo, a produtividade agrícola e atualmente está sendo resgatada e avaliada como alternativa de mitigação dos efeitos do aquecimento global.

A revolução tecnológica proporcionada pela agricultura produziu as bases materiais necessárias para alterar o curso do processo civilizatório (Ribeiro, 1991). Ao longo de sua história de mais de 10 mil anos, a agricultura tornou-se a mais importante atividade econômica do planeta, movimentando cerca de US\$ 1,64 trilhão por ano. Baseada na intensificação de técnicas modernas, tais como novas variedades de cultivo, fertilizantes químicos solúveis, medidas de proteção da lavoura (inseticidas, fungicidas, herbicidas) e mecanização intensiva, a “Revolução Verde” elevou a produção e a produtividade das lavouras (Singh, 2000). Porém, a intensificação da produção agrícola trouxe consigo a degradação do ambiente de produção em escala global, provocando a degradação dos solos, matas e recursos hídricos. A agricultura intensiva é dependente de energia e produtos químicos oriundos de fontes minerais e combustíveis fósseis (petróleo), cujas reservas são limitadas, principalmente a matéria-prima para a indústria de fertilizantes. As reservas mundiais de fosfato, por exemplo, são muito limitadas e estima-se que estas poderão se exaurir antes que as de petróleo, representando uma séria ameaça à agricultura intensiva nos trópicos, pois os solos altamente intemperizados são dependentes de aplicação massiva de fosfatos solúveis para se tornarem produtivos.

Essa estratégia de produção, que esgota os recursos naturais e é dependente de recursos não renováveis, tem gerado enormes perdas de MO. Além disso, as perdas de MO podem estar diretamente associadas com o aumento do fluxo de gases do efeito estufa, já que o solo representa o principal compartimento superficial de carbono.

A crise da agricultura, ou melhor, do modo como se faz agricultura, não vai ser superada com o aumento do uso de tecnologia ou uso de tecnologias mais avançadas desenvolvidas sobre a mesma base de conhecimento. É necessário a ruptura desse paradigma e o desenvolvimento de novas bases científicas que busquem otimizar processos biológicos naturais e renováveis.

O manejo de processos biotecnológicos naturais ainda está muito aquém do potencial que pode representar para o sucesso da produção agrícola sustentada. A ciclagem de nutrientes, a fixação biológica de nitrogênio e a

solubilização de rochas fosfatadas são alguns exemplos de processos microbiológicos naturais que garantem o potencial produtivo do solo e podem ser amplificados com o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis (Olivares, 2009)

O desenvolvimento de bioestimulantes a base de substâncias húmicas (SH) requer o conhecimento da natureza química da MO humificada. A eficiência da estimulação biológica depende principalmente da natureza química das SH, um dos aspectos mais estudados, porém, mais controversos da Química do Solo. A dificuldade de aplicar conceitos clássicos da química, tais como, fórmula molecular ou estrutural, configuração e conformação para as SH é uma barreira para o entendimento da natureza química desse material complexo.

O uso de estimuladores de crescimento vegetal a base de SH na agricultura tem crescido nos últimos anos especialmente em culturas de elevado interesse econômico (Cunha et al., 2009; Baldotto et al., 2009). Para atender esse mercado promissor tem sido importada uma grande quantidade de produtos húmicos, geralmente obtidos de fontes geológicas não renováveis tais como turfas e rochas ricas em carbono humificado, como a leonardita e a lignita. Uma alternativa possível é a obtenção de matéria húmica a partir do produto da transformação de resíduos orgânicos pelos microrganismos e minhocas, conhecido como vermicompostagem. O produto final é o húmus de minhoca, naturalmente enriquecido com ácidos húmicos (AH) e com grande capacidade de promoção do crescimento vegetal, especialmente do sistema radicular (Canellas et al., 2002).

Nesse trabalho foi realizado um estudo do processo de transformação de resíduos orgânicos e da bioatividade dos AH isolados em diferentes estádios de maturação do vermicomposto visando identificar a partir de qual estágio é possível obter AH em quantidade e com capacidade de estimular o crescimento radicular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Vermicompostagem

Uma fonte alternativa para extração de SH é o produto final da ação de minhocas sobre os resíduos orgânicos, ou seja, o húmus de minhoca, um material enriquecido com SH de elevada atividade biológica (Nardi et al., 2009). Embora os microrganismos sejam os responsáveis pela degradação bioquímica da MO, as minhocas direcionam o processo condicionando o substrato e alterando a atividade biológica (Dominguez, 2004). O estudo das transformações dos resíduos e o papel dos invertebrados nesse processo são a base da vermicompostagem e uma possibilidade de geração de inovações visando o desenvolvimento de insumos biológicos.

Diversos resíduos orgânicos, além de esterco bovino, têm sido convertidos em vermicomposto (Edwards et al., 1985, 1998; Mitchell, 1997; Bansal e Kapoor, 2000; Kaushik e Garg, 2003). Tais como, lodo de esgoto (Hait e Tare, 2011), esterco de cavalo (Hartenstein et al., 1979; Kaplan et al., 1980; Edwards et al.,

1998; Garg et al., 2005a); folhas de mangueira (Talashilkar et al., 1999); esterco de porco (Chan e Griffiths, 1988; Reeh, 1992; Edwards et al., 1998); peru (Edwards et al., 1998); ovelha (Edwards et al., 1985); galinha (Ghosh et al., 1999; Garg e Kaushik, 2005b); resíduo de papel (Gajalakshmi et al., 2002) etc. No entanto, estudos sobre o tempo de maturação, características químicas e a atividade biológica das SH isoladas de diferentes vermicompostos são relativamente escassos.

Dois produtos úteis são gerados com a vermicompostagem de resíduos, a biomassa de minhocas e o vermicomposto. O vermicomposto é um produto homogêneo, com reduzido nível de contaminantes (as minhocas funcionam como eficientes biosensores de acordo com Wolters, 2000), elevados teores de nutrientes (Suthar 2008, encontrou aumentos de NPK na ordem de 143%, 111% e 100%, respectivamente, no material vermicompostado em relação ao início do processo) e sem impactos adversos quando lançados no ambiente. De acordo com Suthar (2008), comparado ao sistema convencional de compostagem, a vermicompostagem sempre resulta na diminuição de massa dos resíduos, menor tempo de processamento e maior quantidade de húmus.

A adição de vermicomposto ao solo estimula o crescimento das plantas pelo aumento do conteúdo de nutrientes (Kale et al., 1992; Behera et al., 2007), da melhoria das propriedades físicas do solo (Landgraf et al., 1999, Albiach et al. 2001), proteção contra doenças pela supressão de microrganismos patógenos (Szczech, 1999; Bailey e Lazarouits, 2003, Sahni et al., 2008), economia no uso de água, aumento da atividade e diversidade biológica (Fracchia et al., 2006). O vermicomposto consiste em um excelente substrato para crescimento de plantas substituindo com vantagens os substratos a base de turfas (Zaller, 2007). Além disso, as minhocas produzem SH com elevada atividade biológica (Nardi et al., 1996; Masciandaro et al., 1999; Dell’Agnola e Nardi, 1987; Muscolo e Nardi, 1997; Muscolo et al., 1999; Façanha et al., 2002; Canellas et al., 2002; Quaggiotti et al., 2004; Canellas et al., 2006; Rodda et al., 2006b; Zandonadi et al., 2007; Canellas et al., 2010; Dobbss et al., 2010; Canellas et al., 2011). Essas substâncias têm atividade similar à dos hormônios vegetais e aumentam a absorção de nutrientes e o crescimento vegetal (Vaughan e Malcolm, 1985; Chen e Aviad, 1990; Nardi et al., 2002).

2.2 Processo de Humificação

O processo de humificação do composto envolve mudanças significativas na composição química dos resíduos orgânicos, e tem sido avaliado pelas alterações na relação C/N, índices de humificação e medidas espectroscópicas incluindo UV-VIS (ultravioleta-visível), IV-TF/DRIFT (Infravermelho com Transformada de Fourier e Refletância Difusa) e RMN (Ressonância Magnética Nuclear) (Domeizel et al., 2004; Plaza e Senesi, 2009).

A elevada relação C/N do resíduo torna lento o processo de transformação da MO. Além disso, baixas taxas de decomposição também são justificadas pela recalcitrância dos compostos orgânicos presentes conferida tanto pela elevada massa molar, como pela capacidade de múltiplas interações (Huang e Hardie, 2009) ou pelo baixo conteúdo de N.

Outros índices baseados na natureza química dos compostos orgânicos têm sido usados na avaliação da maturidade de compostos e vermicompostos. Tais índices baseiam-se no conteúdo de SH, AH e fúlvicos (Domeizel et al., 2004). Os índices mais usados são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Índices de maturação da matéria orgânica

Razão de humificação	C_{AH}/C	Inbar et al. (1990)
Taxa de extração	C_{SH}/C	Morel et al. (1979)
Taxa de Humificação	$(C_{AH}+C_{AF}/C) \times 100$	Plaza e Senesi (2009)
Razão AH/AF	C_{AH}/C_{AF}	Sugehara e Inoko (1981)
Índice de polimerização	C_{FF}/C_{SH}	Morel et al. (1979)

Adaptado de Domeizel et al. 2004

Onde: C_{AH} , C_{SH} , C_{FF} , C_{AF} e C representam o conteúdo de carbono nos ácidos húmicos, substâncias húmicas, fração fúlvica, ácidos fúlvicos e carbono total oxidável, respectivamente.

Jimenez e Garcia (1992) estudaram a utilização desses índices na avaliação do processo de transformação de resíduos orgânicos e, com ajuda da APC (procedimento estatístico multivariado pela análise de componentes principais), indicaram a relação C_{AH}/C_{AF} como o melhor indicador da maturidade e humificação. O problema associado ao uso dos índices baseado no conteúdo das SH está no procedimento analítico de extração considerado demorado e tedioso.

De acordo com Piccolo (2002) a estabilização da MO ocorre em dois passos: biodegradação dos componentes celulares e autoagregação dos produtos da biodegradação e ressíntese microbiana. Dessa forma, não é necessário a formação de novas ligações co-valentes para aumentar o grau de humificação da MO. A humificação, nessa concepção, é a progressiva autoassociação das biomoléculas que resistem a biodegradação e produtos orgânicos transformados durante ciclos de umedecimento e secagem. As supra-estruturas são termodinamicamente separadas pelo meio aquoso e adsorvidas na superfície dos minerais e/ou outros agregados húmicos preexistentes no caso da vermicompostagem. A exclusão da água significa diminuição da degradação microbiana e aumento da persistência da matéria húmica (Goebel et al., 2005).

A estabilização da MO é, portanto, sinônimo de proteção contra a mineralização. O primeiro mecanismo responsável é a preservação seletiva dos compostos que leva a acumulação de moléculas recalcitrantes (Spaccini e Piccolo, 2009). Os resíduos vegetais e os esterco são as principais fontes de compostos de carbono para formação de húmus de minhoca. Esses resíduos conforme Kögel-Knaber, (2000) são formados por uma mistura complexa de produtos orgânicos compostos principalmente por polissacarídeos (amido, celulose, hemicelulose e pectina: 50-60%) e ligninas (15-20%), mas também de proteínas, polifenóis (taninos), clorofila, cutina e suberina, lipídeos e graxas (10-20%). A quantidade de cada um desses compostos varia com o material a ser compostado. Esses componentes orgânicos são utilizados como substratos para obtenção de energia pelos microrganismos.

De acordo com Sollins et al. (1996), as propriedades moleculares que mais influenciam na taxa de decomposição são: tamanho molecular; polaridade; ligações éter, presença de C-quaternário; fenil e grupos N heterocíclicos e longas cadeias de hidrocarbonetos hidrofóbicos. De forma simplificada, a complexidade

molecular (tamanho molecular associado à capacidade de fazer reações inter e intramoleculares) parece estar associada à recalcitrância. Além disso, uma das características das substâncias macromoleculares facilmente decompostas é a ocorrência de ligações hidrofílicas (Lutzow et al., 2006). Essas ligações são rompidas pelas hidrolases: um grupo genérico e sempre presente de enzimas (celulase, glicosidase, amidase, pectinase, xilanase, proteases, quitinases) com habilidade para quebrar ligações éster-, glicosídica-, éter-, peptídica e outras ligações C-N (Lutzow et al., 2006).

Assim, os biopolímeros mais recalcitrantes a degradação são aqueles que contêm anéis aromáticos como as ligninas e moléculas polimetilênicas tais como lipídeos, graxas, cutina e suberina (Derenne e Largeu, 2001). As ligninas contêm ligações não hidrolíticas, ou seja, somente ligações alifáticas-, alquil-aril e diaril. Portanto, não é facilmente degradada e pode se acumular durante a fase inicial da decomposição dos resíduos. Esse conceito de preservação seletiva foi questionado por uma série de autores. A concentração de ligninas é baixa em solos agriculturáveis indicando que pode ser decomposta rapidamente nessas condições (Kögel-Knaber, 2000). O uso da RMN ^{13}C no estado sólido permitiu verificar que a lignina pode ser rapidamente degradada e não parece ser estabilizada durante a vermicompostagem (Venceslas-Akpas, 1997). Já o C-alquílico em estruturas polimetilênicas é considerado uma forma bastante recalcitrante de C (Derene e Largeu, 2001) devido à sua hidrofobicidade.

Determinar a hidrofobicidade das SH não é uma tarefa simples e a RMN de ^{13}C tem sido usada para estabelecer índices relativos tais como o índice de hidrofobicidade definido pela razão entre a soma das regiões de deslocamentos químicos de C-aromáticos e C-alquílicos e a soma das regiões de C-O alquílico e COOH (Piccolo, 2002). A espectroscopia de IV-TF/DRIFT também permite a obtenção de índices relativos de hidrofobicidade, tais como a razão entre as bandas de absorção de estiramentos C-H (entre 2930 e 2850 cm^{-1}) e de polissacarídeos (1010 a 1160 cm^{-1}) (Inbar et al., 1989). Em solução, a hidrofobicidade das SH pode ser fácil e rapidamente acessada por meio da cromatografia líquida de alta performance com fase reversa (RP-HPLC, em inglês Reverse phase - High performance liquid chromatographic) utilizando colunas de natureza hidrofóbica (C-18). Em tese, compostos mais hidrofílicos interagem

pouco com a coluna e são eluídos rapidamente. Já os compostos mais hidrofóbicos reagem com a matriz da coluna e por isso ficam mais tempo adsorvidos (maior tempo de retenção).

2.3 Caracterização Química da Matéria Húmica

Existem vários métodos disponíveis para determinação da distribuição de massa/tamanho molecular das SH, como ultracentrifugação, viscosimetria, crioscopia, espalhamento de luz, difração de raios X, osmometria por pressão de vapor, entre outros (Cabaniss et al., 2000). As técnicas cromatográficas baseadas no princípio da exclusão por tamanho em gel (CGE) e cromatografia líquida de alta performance por exclusão de tamanho (HPSEC, em inglês High Performance Size Exclusion Chromatography) são os métodos mais frequentemente usados, devido à simplicidade na obtenção de resultados (Janos, 2003). Atualmente tem sido enfatizado o uso de colunas rígidas, cujo empacotamento é compatível com a instrumentação da HPLC. Assim, a HPSEC tornou-se uma ferramenta importante na caracterização das SH, uma vez que favorece a elucidação de seu comportamento associativo em solução (Conte e Piccolo, 1999; Silva et al., 2000; Sierra et al., 2006; Peuravuori e Pihlaja, 2007). O processo de exclusão por tamanho baseia-se na velocidade diferencial de migração dos componentes de diferentes tamanhos em uma coluna específica, na qual moléculas maiores são eluídas e percorrem mais rapidamente o caminho entre os poros da coluna; e moléculas menores percorrem por dentro dos poros da fase estacionária da coluna, tendo assim um tempo maior de retenção dentro da coluna.

A hidrofobicidade da MO tem sido avaliada por diferentes métodos operacionais. A RP-HPLC (Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography) tem sido usada para distinguir frações hidrofílicas e hidrofóbicas da MO (Guggenberger et al. 1994). Entretanto, a dificuldade no estabelecimento de métodos de análise ainda é um obstáculo na determinação da hidrofobicidade da MO (Abbt-Braun e Frimmel, 1999). Egeberg e Alberts (2002) demonstraram através da RP-HPLC a influência do pH e da força iônica na determinação da hidrofobicidade da MO e observaram que o pH é o principal fator de influência, já

que existe uma fração que é hidrofílica em qualquer valor de pH. A utilização da RP-HPLC com colunas de fase-reversa e caráter hidrofóbico (C-18) tem fornecido informações importantes a cerca da hidrofobicidade das SH. Vários trabalhos têm sido conduzidos no sentido de demonstrar a influência da hidrofobicidade sobre o solo. Estudos iniciais de Martin e Synge (1941) e Conden et al. (1944) demonstraram que a cromatografia pode fornecer informações quantitativas sobre a hidrofobicidade de moléculas em solução. Sullivan (1990) mostrou que a distribuição não-uniforme da hidrofobicidade da MO no solo pode retardar a entrada de água nos agregados e assim aumentar sua resistência a hidratação (repelência a água). Desta forma, solos que contêm MO de natureza mais hidrofóbica são capazes de formar agregados mais estáveis do que aqueles que possuem MO mais hidrofílica. Atanassova e Doerr (2010) verificaram que a extração de compostos lipofílicos modifica a capacidade de infiltração de água nos agregados do solo. A hidrofobicidade da MO também tem sido relacionada com a capacidade de formação de complexos argilo húmicos estáveis (Laird et al., 2001). Segundo Bastos et al. (2005), a adição de moléculas orgânicas com acentuado caráter hidrofóbico e hidrofílico na sua estrutura, como os AH, foi capaz de melhorar a agregação de solos com grau de intemperismo avançado.

As espectroscopias no estado sólido (IV-TF/DRIFT e RMN de ^{13}C) são ferramentas poderosas para o exame detalhado de mudanças na composição dos compostos de carbono durante a vermicompostagem. Chen et al. (1989) demonstraram que durante a vermicompostagem o conteúdo de carboidratos decresceu enquanto que o de C-aromático e grupos carboxílicos aumentaram. Resultados similares foram obtidos por Sen e Chandra (2007) que verificaram rápido aumento durante o período inicial de vermicompostagem, da intensidade de sinais relativos a C-aromáticos e C-alifáticos, enquanto que o sinal atribuído à ligação O-C alquílico diminuiu. Vincelas-Akpa e Loquet (1997) encontraram aumento de celulose (em massa e volume) no final da vermicompostagem com conseqüente decréscimo no conteúdo de ligninas. Apesar de não permitir um nível de detalhamento na análise da funcionalidade da matéria húmica, quando comparável a RMN de ^{13}C , a espectroscopia na região do IV-TF/DRIFT tem um custo muito mais baixo associado à enorme rapidez (a escala de obtenção dos espectros é de horas/dia para RMN de ^{13}C e de segundos para IV-TF/DRIFT).

Com o aumento do uso de técnicas instrumentais cada vez mais sofisticadas que tentam elucidar o comportamento da MO e suas características relacionadas com a indução do crescimento vegetal, tornou-se imprescindível o uso de técnicas de tratamentos de dados mais complexas do ponto de vista matemático e estatístico. De maneira que o modelo matemático 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), citado por Dobbss (2010).

Com o advento da tecnologia computacional técnicas analíticas multivariadas estão sendo amplamente utilizadas nas diversas áreas do conhecimento. Segundo os estatísticos Hardyck e Petrinovich (1976), os métodos de análise multivariada predominarão no futuro e resultarão em drásticas mudanças na maneira de como profissionais de pesquisa pensam e planejam suas pesquisas (Hair et al., 2005). Uma análise multivariada considera diferentes variáveis relacionadas simultaneamente, sendo todas consideradas igualmente importantes. Trata-se de uma análise exploratória, que gera hipóteses, e não uma técnica confirmatória, como nos testes de hipótese, nos quais se tem uma afirmação a respeito da amostra em estudo. Embora, às vezes, possa ser utilizada para confirmação dos eventos (Hair et al., 2005), citado por Vicini (2005). Dentre as técnicas de análise multivariada mais estabelecida estão: (a) análise de componentes principais e análise dos fatores comuns, (b) regressão múltipla e correlação múltipla, (c) análise discriminante múltipla, (d) análise multivariada de variância e co-variância, (e) análise de agrupamentos e (f) escalonamento multidimensional (Hair et al., 2005).

A análise de componentes principais foi inicialmente descrita por Karl Pearson (1901), mas foi Hotelling (1933) que denominou o termo "Principal Component Analysis". Esta é considerada um método fatorial, pois a redução do número de variáveis não se faz por uma simples seleção de algumas variáveis, mas pela construção de novas variáveis sintéticas, obtidas pela combinação linear das variáveis iniciais (Bouroche, 1982).

2.4 Bioatividade das Substâncias Húmicas

Desde o início do século passado já se conhecia a propriedade dos AH de estimular o crescimento vegetal quando usados em concentrações relativamente pequenas (Bottomley, 1917). Vários mecanismos de ação têm sido propostos para explicar como as SH podem induzir o crescimento radicular. Os mais tradicionais se referem à formação de complexos solúveis com metais, especialmente com os cátions que também são micronutrientes e encontrados em pequena concentração na solução do solo (Cesco et al., 2002); também foi popular a explicação de que a ação surfactante das SH poderia levar ao aumento da permeabilidade das membranas biológicas (Visser, 1987) e por conseguinte ao aumento da absorção de íons. Se por um lado o aumento da permeabilidade das membranas aumenta a entrada de íons, por outro facilita a saída já que o referido aumento não é seletivo. Além disso, são vários os experimentos com ação fisiológica de SH (Vaughan e Malcolm, 1985; Nardi et al., 2009) nos quais são usados meios sem a presença de nutrientes. O formato das curvas de dose-resposta (bell-shape curve) típicas de SH sugere uma ação do tipo hormonal.

As auxinas, principal hormônio envolvido no enraizamento, induzem o aumento de H^+ -ATPase de membrana plasmática nas plantas (Frias et al., 1996). As bombas H^+ membranares acidificam o apoplasto e deixam a parede celular mais maleável facilitando o alongamento celular (Hager et al., 1991; Frias et al., 1996). A ativação das bombas de H^+ também promove a nutrição vegetal pela geração do gradiente eletroquímico que dirige o transporte iônico através das membranas celulares via sistemas transportadores secundários. Uma revisão do papel das bombas no crescimento vegetal pode ser encontrada em Morsomme e Boutry (2000). A presença de moléculas ou unidades bioativas semelhantes às auxinas ligadas ou agregadas às SH foi relacionada com a indução de sítios de mitose nas raízes e ativação das H^+ -ATPases (Canellas et al., 2002). Foi observado anteriormente, por meio de imunoenaios (Muscolo et al., 1998) ou detecção por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Canellas et al., 2002), a presença de unidades estruturais semelhantes ao ácido indol acético (AIA) em AH. Muscolo et al., (1998) também observaram que AH

isolados de vermicomposto podem induzir a proliferação de raízes laterais em plântulas de milho que, por sua vez, são formadas por células com membranas enriquecidas com H⁺-ATPases (Jahn et al., 1998). Além disso, verificou-se que os AH podem aumentar a expressão das H⁺-ATPases nas membranas e Canellas et al. (2002) justificaram esse fenômeno à luz da teoria do crescimento ácido que postula a acidificação do apoplasto, causado pela ativação das bombas de H⁺ como evento essencial para a expansão celular (Rayle e Cleland, 1992). Tem sido relatado que a auxina pode induzir a síntese de H⁺-ATPase (Hager et al., 1991) pelo mecanismo de indução pós-transcricional (de mRNA de H⁺-ATPase) das isoformas (Mha2) expressas em milho (Frias et al., 1996). Quaggiotti et al. (2004) verificaram superexpressão desse gene em plantas tratadas com SH. Uma revisão sobre o efeito das SH nas bombas de H⁺ membranares pode ser encontrada em Canellas et al. (2006). Além disso, as SH podem estar envolvidas na indução da sinalização celular uma vez que foi observada uma ativação concertada entre as bombas de H⁺ da plasmalema e tonoplasto (Zandonadi et al., 2007). Recentemente, Dobbss et al. (2010) utilizando plântulas transgênicas de tomateiro Micro Tom com gene repórter DR5::GUS visualizaram a rota de sinalização utilizada por auxinas estimuladas por SH isoladas de vermicomposto.

Os efeitos das SH sobre a fisiologia das plantas geralmente é reconhecido como resultado da promoção do crescimento radicular (Vaughan e Malcon, 1985; Chen e Aviad, 1990; Nardi et al., 2002). Isso permite que planta explore um volume maior de solo, além de representar um processo importante na adaptação das plantas a ambientes com baixo conteúdo de nutrientes disponíveis ou submetidos a estresse hídrico (Fitter, 1991).

Muscolo et al. (2007) postularam que a interação entre a matéria húmica e o sistema radicular é possível na rizosfera quando moléculas húmicas em solução têm tamanho suficiente para permitir seu fluxo no apoplasto e atingir as membranas celulares. Dessa forma, uma série de trabalhos (como os de Piccolo et al., 1992; Nardi et al., 2002; Quaggiotti et al., 2004; Muscolo et al., 2007; Nardi et al., 2007) relacionaram os AF como a fração das SH de maior bioatividade. Entretanto, frações de distribuição de massa molecular maior tais como os AH resultantes de vermicompostos têm reconhecida bioatividade (Canellas et al., 2002). Aguiar et al. (2009) e Canellas et al. (2010) utilizaram a cromatografia por

exclusão em gel de sephadex e a HPSEC e não encontraram qualquer relação entre a distribuição de massa molecular e a bioatividade das SH avaliadas tanto pela indução na emergência das raízes laterais como pela promoção da atividade das H⁺-ATPases de membrana plasmática.

Assim, com o avanço da humificação durante o processo de vermicompostagem é possível que se obtenha material húmico de maior atividade biológica e que o ensaio com plantas seja um bom indicador do momento oportuno para extração de matéria húmica a ser utilizada como promotor do crescimento vegetal.

2.5 Bioatividade das substâncias húmicas e hidrofobicidade

O estabelecimento da relação entre a composição estrutural e a atividade biológica das SH é de extrema importância para o desenvolvimento de insumos biológicos para a agricultura. No entanto, isso não é uma tarefa simples, visto à complexidade molecular das SH e sua ação em diferentes rotas metabólicas de plantas (Carletti et al., 2008). Estudos prévios demonstraram que as SH em solução aquosa apresentam comportamento típico de micelas heterogêneas (Šmejkalová e Piccolo, 2008), cujas estruturas supramoleculares possuem “domínios hidrofóbicos” que favorecem interações moleculares como moléculas surfactantes, água ou moléculas orgânicas em solução (Nowick et al., 1994).

O papel da hidrofobicidade das SH e a sua atividade química no solo foram discutidos por Piccolo (2002). Além da formação de agregados estáveis e estruturação do solo, ele descreve o papel relevante das SH na preservação de compostos labéis no solo e, portanto, no sequestro de carbono. Piccolo (1996) postulou que os componentes hidrofóbicos, derivados da degradação de plantas ou da ressíntese de microrganismos, são capazes de incorporar moléculas hidrofílicas nos seus domínios hidrofóbicos e protegê-las contra a degradação. Spaccini et al. (2000) mostraram que os compostos orgânicos liberados no solo por mineralização de resíduos vegetais frescos são armazenados na fração hidrofílica de AH, que são, por sua vez, estabilizados contra a degradação microbiana pelos domínios húmicos mais hidrofóbicos. Além disso, Spaccini et al. (2002) utilizando um composto de fácil degradação marcado isotopicamente,

demonstraram que a adição de matéria húmica de natureza hidrofóbica no solo protegeu o composto da degradação bioquímica.

O processo de “aprisionamento” de moléculas hidrofílicas bioativas nos domínios hidrofóbicos dos AH sugere que quanto mais hidrofóbicas forem as SH, maior é o potencial de incorporação dessas moléculas. Neste contexto, especula-se que dentro da estrutura complexa das SH, existem diferentes tipos e concentrações de moléculas bioativas, tais como as auxinas. Uma possível explicação se baseia na nova conformação supra-estrutural das SH. Este modelo postula a hipótese de que compostos de reconhecida capacidade de regulação e estimulação do crescimento vegetal (hormônios vegetais) estariam fracamente unidos aos domínios hidrofóbicos das SH (Piccolo, 2002). E que a liberação dessas subunidades bioativas aconteceria pelo rompimento dessa estrutura quando em contato com pequenas concentrações de ácidos orgânicos, o que favoreceria o acesso aos receptores fora ou dentro da célula (Piccolo et al., 1996; Canellas et al., 2008b; Hottz-Rima et al., 2011).

Nebbioso e Piccolo (2011) mostraram uma grande quantidade de compostos orgânicos ligados aos agregados húmicos em diferentes níveis de interação. É provável que as SH atuem absorvendo ou liberando moléculas de sinalização, se comportando como um regulador do equilíbrio hormonal, no que diz respeito à emergência das raízes laterais. Canellas et al. (2011), aplicando a mesma abordagem “humeomic” proposta por Nebbioso e Piccolo (2011), verificaram que AH submetidos a hidrólise alcalina e ácida perderam a capacidade de indução de raízes lateral. Esses resultados ajudam a confirmar a hipótese de que os domínios húmicos hidrofóbicos protegem e preservam fragmentos moleculares bioativos que, quando liberados em solução devido a alterações na sua conformação estrutural, podem interagir com receptores de plantas e induzir o crescimento vegetal.

3. HIPÓTESE E OBJETIVO GERAL

A hipótese de trabalho é de que existe uma relação entre o tempo de vermicompostagem dos diferentes resíduos e a bioatividade dos AH. O objetivo geral do trabalho foi avaliar algumas características químicas e a bioatividade dos AH isolados de diferentes vermicompostos e em diferentes estádios de maturação.

3.1 Objetivos específicos

1. Produzir diferentes vermicompostos a partir da mistura de esterco bovino, bagaço de cana-de-açúcar e torta de girassol;
2. Avaliar o processo de transformação da matéria orgânica durante o processo da vermicompostagem usando relação C/N, produção de AH, capacidade de troca de cátions (CTC), composição elementar e

distribuição de grupamentos funcionais através de técnicas de RMN de ^{13}C como parâmetros indicadores;

3. Avaliar a natureza química dos AH em diferentes estádios de maturação do vermicomposto por métodos cromatográficos (HPSEC e a RP-HPLC) e espectroscópicos (CP-MAS RMN de ^{13}C);
4. Avaliar a bioatividade dos AH isolados em diferentes estádios de maturação do vermicomposto através da avaliação do número de raízes laterais, atividade da H^+ -ATPase e medidas de acidez (extrusão de prótons) em solução contendo plântulas de milho tratadas com AH;
5. Avaliar uma possível atividade auxínica dos AH isolados em diferentes estádios de maturação do vermicomposto utilizando mutantes de tomateiro variedade MicroTom com gene repórter sintético DR5::GUS responsivo a auxina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produção dos vermicompostos, amostragem e análises

Quatro diferentes compostos foram utilizados na produção dos vermicompostos: (VC1) esterco bovino; (VC2) esterco bovino + bagaço de cana (1:1 v/v massa seca); (VC3) esterco bovino + torta de girassol (1:1 v/v massa seca); (VC4) esterco bovino + bagaço de cana-de-açúcar + torta de girassol (1:1:1 v/v/v massa seca). Os resíduos foram colocados em cilindros de concreto com capacidade para 150 L e a umidade foi mantida entre 60-70% com adição de água semanalmente, seguida de mistura do composto. Depois de aproximadamente um mês, foram introduzidas as minhocas (*Eisenia foetida*) na proporção de 5 kg por m³ de resíduo. Ao final do processo de vermicompostagem (4 meses), as minhocas foram retiradas e o composto foi armazenado em recipientes. Dois cilindros foram utilizados para amostragem de cada resíduo orgânico, nos diferentes tempos: 0, 30, 60, 90 e 120 após a adição das minhocas. As amostras coletadas foram rigorosamente misturadas, secas, moídas, peneiradas. O carbono orgânico total e o conteúdo de N total foram determinados por combustão seca no analisador automático CHN.

4.2 Extração das substâncias húmicas

A extração das SH solúveis dos vermicompostos foi realizada com NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, na razão solvente: vermicomposto de 1:10 (v:v) em atmosfera inerte de N_2 . A extração foi repetida até a obtenção de extrato descolorido obtido, em média, após cinco extrações. Uma parte do extrato alcalino foi ajustado a pH 7,0 e submetido ao processo de diálise contra água destilada em membranas com poros de exclusão menor que 1000 Da. Após a diálise, as SH alcalino solúveis foram congeladas e secas por liofilização. A outra parte do extrato alcalino foi utilizada para a obtenção dos AH mediante o ajuste do pH da solução até aproximadamente 1,5 com HCl 6 mol L^{-1} . A operação de redissolução (com NaOH $0,1 \text{ mol/L}$) e precipitação (com HCl 6 mol L^{-1}) foi repetida três vezes. Em seguida, foram adicionados 200 mL de solução aquosa diluída de HF e HCl (preparada com 5 mL de HCl concentrado e 5 mL de HF concentrado, sendo o volume da solução completado para 1 L com água deionizada). A amostra ficou sob agitação durante oito horas e os AH separados por centrifugação. Os AH foram lavados com água deionizada até teste negativo contra cloreto utilizando-se AgNO_3 . Antes do congelamento os AH foram titulados até pH 7 com KOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, logo após foram submetidos a diálise e secos por liofilização. O sobrenadante produzido com a acidificação do meio alcalino foi eluído em uma coluna preenchida com a resina XAD-8 (0,33 g resina: 1 g vermicomposto). A coluna foi lavada com dois volumes de água destilada para retirada de compostos hidrofílicos livres e os ácidos fúlvicos (AF) retidos na coluna foram eluídos com um volume de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os AF foram titulados a pH 7,00 com HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, submetidos a diálise, congelados e secos por liofilização.

A determinação dos teores de C oxidável nos vermicompostos e nas frações humificadas foi realizada após a reação com $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ $0,0866 \text{ mol L}^{-1}$ com fornecimento de calor externo seguido da titulação com $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$.

4.3 Ressonância Magnética Nuclear com Polarização Cruzada e Rotação no Ângulo Mágico (¹³C CP-MAS NMR)

O processo de vermicompostagem foi analisado ao 0 e 120 dias utilizando a espectroscopia ¹³C CP-MAS NMR. Os espectros de vermicomposto e AH foram obtidos no equipamento Bruker-400 equipado com sonda para amostras sólidas nas seguintes condições experimentais: sequência de pulsos utilizada: CP/MAS; frequência de observação: 75,4 MHz para o ¹³C; largura espectral de 50 kHz; tempo de aquisição 50 ms; pulso de 5 ms (90 °); intervalo entre pulsos: de 4 s; tempo de contato de 1 ms; núcleo desacoplado na aquisição: ¹H; modo desacoplador: “gated”; e número de transientes: 10.000. As áreas dos sinais de RMN foram integradas utilizando-se o software do espectrômetro Bruker (Topspin) e hexametilbenzeno (HMB) (δ metilas = 17,3 ppm) como referência secundária. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm e os espectros integrados nas seguintes regiões: C alquílico (0–50 ppm), C mono ou dioxigenado ou C de peptídeos (50–110 ppm), C aromáticos e olefinas (110–150 ppm), C aromático substituído por heteroátomo (150–165 ppm) e C em grupamentos carboxílicos, cetonas, amidas ou éteres (165–200 ppm).

4.4 Análise dos componentes principais (ACP)

A análise dos componentes principais (CP) permite a identificação das medidas responsáveis pelas maiores variações entre os resultados, sem perdas significativas de informações, transformando um conjunto original de variáveis em outro conjunto, os CP de dimensões equivalentes (Vicini, 2005).

Para a determinação das CP, é necessário calcular a matriz de variância-co-variância, ou a matriz de correlação, encontrar os autovalores e os autovetores e, por fim, escrever as combinações lineares, que serão as novas variáveis, denominadas de CP (Regazzi, 2001). Consiste em encontrar combinações não correlacionadas que descreva a variação entre as amostras.

A ACP foi realizada no programa “Unscrambler” (CAMO Software AS, Oslo, Norway). A matriz de dados foi representada por 16 amostras e 1024

variáveis (espectros). O algoritmo usado para calcular os loadings e scores foi SVD (Singular Value Decomposition). A validação do modelo foi realizada pelo método “full cross-validation”. A diferença entre os modelos completos e de validação foi inferior a 10 %.

4.4 Cromatografia Líquida de Alta Performance por Exclusão de Tamanho (HPSEC)

A HPSEC foi utilizada para avaliar a distribuição da massa molecular aparente (M_w) dos AH em diferentes estádios de vermicompostagem. O sistema HPSEC YoungLin Acme 9000 (Seul, Korea) consiste de dois detectores em série, um UV-Vis (YoungLin) operando a 280 e um Índice de Refração, uma bomba isocrática, um injetor automático e um *loop* de 100 μL para injeção manual da amostra. O sistema está acoplado a um computador, que processa os dados pelo software Autochro 3000. A separação por exclusão de tamanho se deu através da coluna BioSep- SEC S200 Phenomenex, com 300 mm de comprimento, 7,8 mm de diâmetro interno e 5 μm de diâmetro de poros. A pré-coluna Polysep-GFC-Guard Column, com 35 mm de comprimento, 7,8 mm de diâmetro interno e 0,2 μm de diâmetro de poros, foi usada para proteger a coluna de possíveis contaminações presentes nas amostras. O tampão fosfato (NaH_2PO_4 0,0625 mol L^{-1} , pH 7,0 e força iônica 0,104 mol L^{-1}) foi usado como eluente (fase móvel), com fluxo de 1,5 mL min^{-1} em alta pressão. O volume injetado na coluna foi de 20 μL na concentração de 0,5 g L^{-1} de AH. O índice relativo de M_w foi calculado pela razão dos componentes de menor massa molecular ($M_w 2$) pelos componentes de maior massa molecular ($M_w 1$).

4.5 Cromatografia Líquida de Alta Performance com Fase Reversa (RP-HPLC)

A RP-HPLC foi utilizada para avaliar a hidrofobicidade dos AH ao longo do processo de vermicompostagem. Foi utilizado o sistema RP-HPLC YoungLin Acme 9000 (Seul, Korea) que consiste de dois detectores em série, um UV-Vis (YoungLin) operando a 254 nm e um Índice de Refração; uma bomba isocrática, um injetor automático e um *loop* de 100 µL para injeção manual da amostra. O sistema estava acoplado a um computador, que processa os dados pelo software Autochro 3000. Utilizou-se a coluna Supelcogel (USA): Nucleosil C-18, com 7 mm de diâmetro interno e 25 mm x 4 mm de comprimento. As amostras foram dissolvidas em KOH 0,01 mol L⁻¹ e diluídas em água Mili-Q (ultrapura), em seguida filtradas em membranas com poros de 13 mm. Acetonitrila e água Mili-Q foram utilizadas como fase móvel na proporção 60 : 40 % vv, respectivamente. O volume injetado na coluna foi de 20 µL na concentração de 0,5 g L⁻¹ de AH, com fluxo de 0,5 ml min⁻¹. O índice de hidrofobicidade foi obtido pela razão da área hidrofílica (H_I) pela hidrofóbica (H_B). Considerando que o primeiro pico corresponde aos componentes hidrofílicos, ou seja, que pouco interage com a matriz da coluna (fase estacionária) e que o segundo representa os componentes hidrofóbicos, que ficaram mais adsorvidos na fase estacionária da coluna cromatográfica.

4.6 Análise de raízes laterais de plântulas de milho

Sementes de milho (*Zea mays* L., var 'UENF 506-6'), foram esterilizadas através da imersão em uma solução de NaClO 1.0% por 30 minutos e, depois, colocadas em água destilada por um período de seis horas após a lavagem. Em seguida, as sementes foram acondicionadas em papel, para germinação no escuro, a 28°C. Quatro dias após a germinação das sementes, as plântulas foram transferidas para um meio mínimo contendo CaCl₂ 2 mM e 20 mg C L⁻¹ de AH

extraídos dos diferentes vermicompostos ao longo da vermicompostagem. O pH da solução foi ajustado para 5,8. Após cinco dias, as plântulas foram coletadas e avaliadas. O meio mínimo (CaCl_2 2 mM) foi utilizado a fim de evitar qualquer influência dos nutrientes, que poderiam funcionar de maneira sinérgica com os AH, estimulando o desenvolvimento radicular e o metabolismo das plântulas (e.g. Pinton *et al.*, 1999).

4.7 Medida de acidez em solução

A bioatividade dos AH foi avaliada pela medição de acidez em solução contendo plântulas de milho tratadas com AH. Foi utilizada a concentração de 2,0 mM de C de AH (Dobbss *et al.*, 2010). Nesse experimento, o meio mínimo (CaCl_2 2 mM) foi utilizado a fim de evitar qualquer influência dos nutrientes, que poderiam funcionar de maneira sinérgica com os AH, estimulando o desenvolvimento radicular e o metabolismo das plântulas. Sementes de milho (*Zea mays* L., var. UENF 506-6) foram esterilizadas com uma solução de NaClO 1,0% por 30 minutos, e, em seguida, colocadas em água destilada por um período de seis horas após a lavagem. As sementes foram acondicionadas em papel germitest, no escuro a 28°C. Quatro dias após a germinação das sementes de milho, as plântulas foram transferidas para o meio mínimo contendo CaCl_2 2 mM e a concentração de 2,0 mM C de AH. As plantas foram submetidas ao tratamento com e sem AH durante 48 horas. Após este período, as plantas foram transferidas para um recipiente com 50 mL de uma solução de CaCl_2 2mM com pH 7. Após 24 horas foi medida acidez (pH) da solução com potenciômetro Orion da Thermo Inc. As raízes foram digitalizadas e secas em estufa de ar forçado. A acidez do meio foi expressa em $\text{mM H}^+ \text{g}^{-1}$ massa seca de raiz. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com 10 repetições por tratamento, cujo modelo matemático pode ser descrito como: $Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$, onde: Y_{ij} = resposta experimental medida na unidade experimental j submetida ao tratamento i; μ = média geral; t_i = efeito relativo ao tratamento i; e_{ij} = erro aleatório. Foi feita a

análise da variância e as médias comparadas pelo teste DMS $P < 0,05$ pelo programa SAEG.

4.8 Atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática

Plântulas de milho (híbrido UENF 506-6) foram crescidas durante sete dias em meio mínimo contendo 2,0 mM L⁻¹ de CaCl₂ (controle) ou suplementado com AH isolados do VC2 (aos 120 dias) concentração equivalente a 2,0 mM L⁻¹ de C. As vesículas da fração microssomal (membranas do vacúolo e plasmática) foram isoladas de raízes de plântulas de milho utilizando-se a centrifugação diferencial, como descrito por De Michelis e Spanswich (1986). Resumidamente, 10 g (massa de tecido fresco) de raízes de milho foram homogeneizadas usando grau e pistilo em 20 mL de meio de extração gelado com 0,250 mol L⁻¹ de sacarose, 10 % de glicerol (m:v), 0,5 % de PVP-40 (polivinilpirrolidona-40 KDa), 0,002 mol L⁻¹ de EDTA (ácido etileno diamino tetracético), 0,2 % de BSA (albumina sérica bovina) (m:v) e 0,1 mol L⁻¹ de tampão Tris [tris-(hidroximetil) aminometano] -HCl, pH 7,8. Imediatamente antes do uso foram adicionados 0,150 mol L⁻¹ de KCl, 0,002 mol L⁻¹ de DTT (ditiotreitól) e 0,001 mol L⁻¹ de PMSF (fluoreto de metilfenilsulfonil). A manipulação das raízes até a obtenção do homogenato, bem como as centrifugações, teve a temperatura controlada a fim de que não excedesse 4 °C. Além disso, o pH do tampão de extração também foi monitorado durante o procedimento, mantendo-se na faixa de 7,2-7,6. Após a maceração, o homogenato resultante foi filtrado por meio de quatro camadas de gaze e submetido à centrifugação em uma centrífuga himac CP (HITACHI) a 1.700 g durante 12 min. O sobrenadante foi coletado e submetido a uma nova centrifugação a 10.000 g por 15 min em uma ultracentrífuga himac CP 85b (HITACHI), utilizando o rotor P70. O sobrenadante foi submetido à nova centrifugação (100.000 g por 40 min). O precipitado dessa nova centrifugação, denominado fração microssomal, foi ressolubilizado em meio de ressuspensão. O precipitado foi coletado e ressuspendido em 1 mL de solução-tampão (glicerol 15 % (v:v), DTT 0,001 mol L⁻¹, PMSF 0,001 mol L⁻¹, 0,01 mol L⁻¹ de Tris-HCl pH 7,6 e EDTA 0,001 mol L⁻¹) e armazenado em freezer a -70 °C por não mais que três

semanas. A atividade de hidrólise da H⁺-ATPase foi determinada de acordo com o método de Fiske e Subbarow (1925). A reação foi iniciada com a adição da proteína e interrompida por meio da adição de ácido tricloroacético (TCA) gelado para uma concentração final de 10 % (v/v). O meio de reação continha 0,01 mol L⁻¹ de Mops [ácido 3-(N-morfino) propano sulfônico]-Tris pH 6,5, 0,003 mol L⁻¹ de MgCl₂, 0,1 mol L⁻¹ de KCl, 0,001 mol L⁻¹ de ATP e 50 µg de proteína. Cerca de 75 % da atividade da H⁺-ATPase das vesículas foi inibida por 0,0002 mol L⁻¹ de vanadato, um inibidor muito eficiente da ATPase do tipo P (De Michelis e Spanswick, 1986). Em todos os experimentos, a atividade hidrolítica da H⁺-ATPase foi medida a 32 °C, com ou sem vanadato, e a diferença entre essas duas atividades foi atribuída à ATPase do tipo P.

4.9 Ensaio com mutantes de tomateiro variedade MicroTom com gene repórter sintético DR5::GUS

Sementes de plantas transgênicas de tomate da variedade MicroTom DR5::GUS foram esterilizadas com hipoclorito 30% durante 5 minutos sob agitação e colocadas para germinar em caixas gerbox em uma BOD (27° C). Quatro dias após a germinação, foram tratadas com os AH isolados dos vermicompostos. As plântulas foram tratadas durante quatro dias com 50 mg de AH L⁻¹ em solução com CaCl₂ 2 mM L⁻¹, 10 mM de AIA ou CaCl₂ 2 mM L⁻¹ (tratamento controle). As análises histoquímicas foram realizadas de acordo com o procedimento descrito anteriormente por Jeferson et al. (1986). O ensaio histoquímico é um método qualitativo, baseado na clivagem do substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronídeo (X-gluc) pela β-glucuronidase. O produto dessa reação, na presença de oxigênio, forma dímeros, resultando em um precipitado insolúvel de cor azul. A microscopia ótica foi utilizada para avaliar os segmentos de raízes corados. As sementes foram gentilmente cedidas pelo Dr. José Luiz Garcia-Martinez da Universidad Politécnica de Valência, Espanha.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos vermicompostos

O processo de vermicompostagem foi monitorado para avaliar as principais mudanças ocorridas nas características químicas. A Figura 1 apresenta as mudanças ocorridas na CTC, na relação C/N e no conteúdo de AH extraído do vermicomposto ao longo do processo de vermicompostagem. A CTC (Figura 1A) aumentou consideravelmente ao final do processo de vermicompostagem. As transformações químicas ocorridas nos resíduos decorrentes da ação de microrganismos e minhocas são conhecidas como reações de biooxidação, e resultam na fragmentação física e enriquecimento de produtos da degradação. Exoenzimas acessam seus substratos produzindo reações de oxidação e conseqüentemente grupamentos funcionais oxigenados capazes de sofrer ionização e contribuir para a CTC da MO. Os resultados da CTC estão dentro da

faixa recomendada por Jimenez e Garcia (1992) para produtos estabilizados, ou seja, valores de CTC superiores a $60 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$.

A Figura 1B apresenta a relação C/N dos diferentes vermicompostos. O VC2 apresentou a maior relação no início da vermicompostagem, seguido do VC3, VC1 e VC4. A partir dos trinta dias de vermicompostagem, o VC2 sofreu queda significativa na relação C/N e praticamente se manteve estável até os cento e vinte dias. Os demais vermicompostos apresentaram diminuições na relação até os sessenta dias, e então se mantiveram sem grandes mudanças até o final do processo. A relação C/N é um dos mais importantes parâmetros no controle do processo de compostagem e na determinação do grau de maturação (Jiménez e Garcia, 1989; Stevenson, 1982 e Kononova, 1996). Os resultados aqui encontrados já eram esperados visto que o processo de humificação promove uma diminuição na relação C/N (Atiyeh et al., 2002). Ao final da vermicompostagem a relação C/N de todos os vermicompostos estava dentro da faixa permitida, indicando que o processo de maturação dos compostos foi satisfatório.

A Figura 1C apresenta os teores de AH extraídos dos vermicompostos. Os maiores teores de AH foram encontrados nos VC2 e VC4 no final da vermicompostagem, enquanto que o VC1 e VC3 pouco se alteraram. O aumento no teor de AH pode ser considerado um indicador de melhoria da qualidade do húmus ou do incremento da atividade biológica que promove a síntese de SH mais condensadas, segundo Orlov (1998), citado por Canellas et al. (2001). Xiaowei Li e Jian Yang (2010) analisando a composição e funcionalidade de frações húmicas de vermicomposto, também verificaram diminuição da relação C/N e aumento no conteúdo de AH. Tais resultados sugerem que a vermicompostagem é uma tecnologia eficiente para produção de matéria orgânica humificada de qualidade.

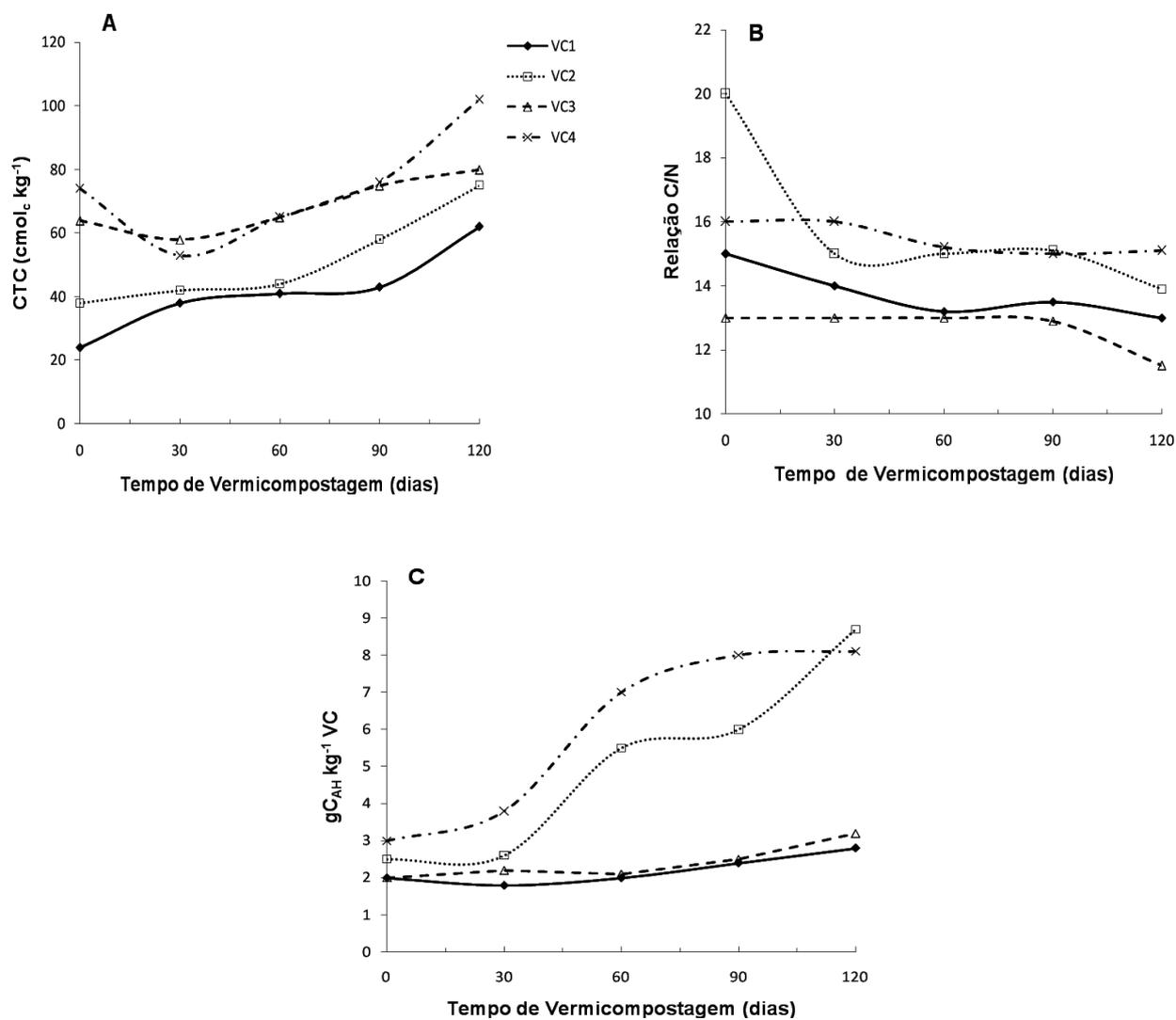


Figura 1. Mudanças na CTC= extraída com acetato de amônio a pH 7, relação C/N e teor de ácidos húmicos (AH) extraídos de diferentes vermicompostos: (VC1) esterco bovino, (VC2) esterco bovino e bagaço de cana, (VC3) esterco bovino e torta de girassol e (VC4) esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol, em diferentes estádios de maturação (0, 30, 60, 90 e 120 dias).

5.1.1 Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C com Polarização Cruzada e Rotação no Ângulo Mágico (^{13}C CP-MAS NMR) do vermicomposto

A análise de RMN de ^{13}C das amostras de vermicomposto foi realizada no tempo zero e no final do processo para avaliar a característica do material final. Os espectros podem ser observados na Figura 2 e a abundância relativa das espécies de C nos grupos funcionais é mostrada no Quadro 2.

Os espectros de RMN de ^{13}C foram divididos em diferentes regiões segundo os deslocamentos químicos dos grupamentos funcionais encontrados. Na região de C-alquílico (0-45 ppm), contribuem para a região alifática do espectro, e é composta por grupos $(\text{CH}_2)_n$ e grupos $(\text{CH}_3)_n$ terminal de compostos lipídicos de plantas e microrganismos, como graxas e poliésteres alifáticos (Deshmukh et al., 2005). A região alifática oxigenada (O-alquila e di-O-alquila 45-110 ppm) é típica de carboidratos, como unidades monoméricas de oligossacarídeos e cadeias de polissacarídeos, presentes em tecidos de plantas lenhosas (Johnson et al., 2005). O sinal em 56 ppm também pode ser associado ao substituinte metoxil em anéis aromáticos de guaiacila e siringila (unidades da estrutura da lignina), ou a ligações C-N em aminoácidos (Hatcher, 1987). O sinal intenso próximo a 72 ppm corresponde a estrutura de celulose e hemicelulose, enquanto que o sinal em 106 ppm é atribuído ao C anomérico da celulose (Wilson, 1987). A região de 110-160 ppm é típica de anéis aromáticos (110-140 ppm) e fenóis (140-160 ppm) pouco decompostos e muitas vezes associados à estrutura da lignina. A região de 160-190 ppm está relacionada a grupos carboxílicos que determinam a hidrofiliabilidade das SH.

Todos os vermicompostos independentemente do tempo de vermicompostagem apresentaram sinais típicos destes grupamentos funcionais, embora com diferentes abundâncias relativas entre os vermicompostos e tempo de maturação (Figura 2). A região de O-alquila (65-95) foi relativamente a mais abundante em todos os espectros dos vermicompostos, principalmente nos VC2, VC3 e VC4 que tiveram adição de bagaço de cana e torta de girassol (Tabela 2). O bagaço de cana é constituído por três frações principais, celulose (50 %),

hemicelulose (25 %) e lignina (25 %) (Pandey et al., 2000) que correspondem a sinais típicos de O-alquila.

Ao final do processo de vermicompostagem todos os vermicompostos apresentaram diminuição relativa na região de O-alquila (65-95 ppm), sendo mais acentuada nos vermicompostos VC2, VC3 e VC4. De acordo com Piccolo (2002) a estabilização da MO ocorre em dois passos: biodegradação dos componentes celulares e autoagregação dos produtos da biodegradação e ressíntese microbiana. O processo de vermicompostagem é caracterizado pela alta atividade biológica proporcionada pelas minhocas, estas são conhecidas por digerir longas cadeias de polissacarídeos e melhorar a colonização microbiana simultaneamente (Raphael e Velmourougane, 2011). Também é conhecido que diferentes populações microbianas predominam nas diferentes fases da compostagem (Ryckeboer et al., 2003). Segundo Sánchez (2009), os fungos têm uma grande habilidade de decompor resíduos orgânicos como lignina, hemicelulose e celulose, sendo ativos principalmente na última fase da compostagem. Os fungos decompositores produzem tipicamente o aminoaçúcar glucosamina, enquanto que as bactérias produzem o ácido murâmico (Zhang et al., 1998; Möller et al., 2002; Simpson et al., 2004). Esse processo de degradação é de extrema importância para o processo de vermicompostagem e pode direcionar a neossíntese de compostos mais estáveis, como as SH.

Todos os vermicompostos apresentaram aumento na região de 110-160 ppm, típica de C- aromático e fenólico, aos 120 dias. Segundo Möller et al. (2002) durante o processo de decomposição da lignina, ligações intramoleculares entre componentes de fenilpropanoides são clivadas e oxidadas, contribuindo com derivados de compostos fenólicos no solo. O aumento relativo no conteúdo de C- aromáticos, ao longo da compostagem, sugere uma predominância de materiais lignino-celulósicos e materiais hidrofóbicos recalcitrantes.

Os VC1, VC3 e VC4 apresentaram diminuição de C-alquílico e polissacarídeos (metoxila) enquanto que o VC2 apresentou aumento nessa região, ao final do processo. A diminuição de C-alquílico durante a compostagem em VC1, VC3 e VC4 é um indício da mineralização de compostos lipídicos lábeis (Spaccini e Piccolo, 2007). A grande quantidade de celulose e lignina presente no bagaço de cana pode ter levado ao acúmulo relativo de C-alquílico no VC2, já que

o processo de decomposição pelos microrganismos se inicia por compostos mais abundantes, o que conseqüentemente levaria a um acúmulo seletivo de lipídeos.

Os VC1 e VC2 apresentaram aumentos significativos na região de grupos carboxílicos, enquanto que o VC3 sofreu diminuição e o VC4 pouco se alterou (Quadro 2). O aumento na abundância relativa de grupos carboxílicos contribui para hidrofobicidade do material húmico e pode ser produto da degradação microbiana e ressíntese de alguns compostos mais estáveis. O aumento no VC2 pode estar relacionado com C-alquílicos de longas cadeias metilênicas em ácidos graxos, enquanto no VC1 pode ser o resultado da degradação da celulose e lignina por microrganismos presentes no rúmen bovino, os quais transformam as substâncias indigeríveis em ácidos orgânicos, aminoácidos e vitaminas. O comportamento dos vermicompostos VC3 e VC4 pode ser um indício da decomposição parcial da lignina, uma vez que nestes vermicompostos houve diminuição de todos os outros grupamentos funcionais. A oxidação parcial da lignina leva ao acúmulo das formas acídicas de guaiacila e siringila (Spaccini et al., 2009).

A hidrofobicidade dos vermicompostos foi definida como a porcentagem da área do espectro referente aos grupos alquílicos (0-45 ppm) e aromáticos (110-160 ppm) em relação ao restante da área do espectro (45-110 ppm e 160-190 ppm). Todos os vermicompostos apresentaram incremento no índice de hidrofobicidade aos 120 dias. Para os VC2, VC3 e VC4, esse aumento foi pronunciado, sendo de 36, 20 e 46,67 %, respectivamente. No VC2 o aumento da hidrofobicidade pode ser justificado principalmente pelo aumento da região de C-alquílico atribuído a longas cadeias de ácidos graxos, e nos vermicompostos VC3 e VC4 pelo incremento na região de C-aromático. Ao final do processo todos os índices de hidrofobicidade tenderam para uma mesma faixa, indicando que o processo biológico foi o mesmo para todos os vermicompostos e direcionou o processo para produção de compostos semelhantes independente do material de origem.

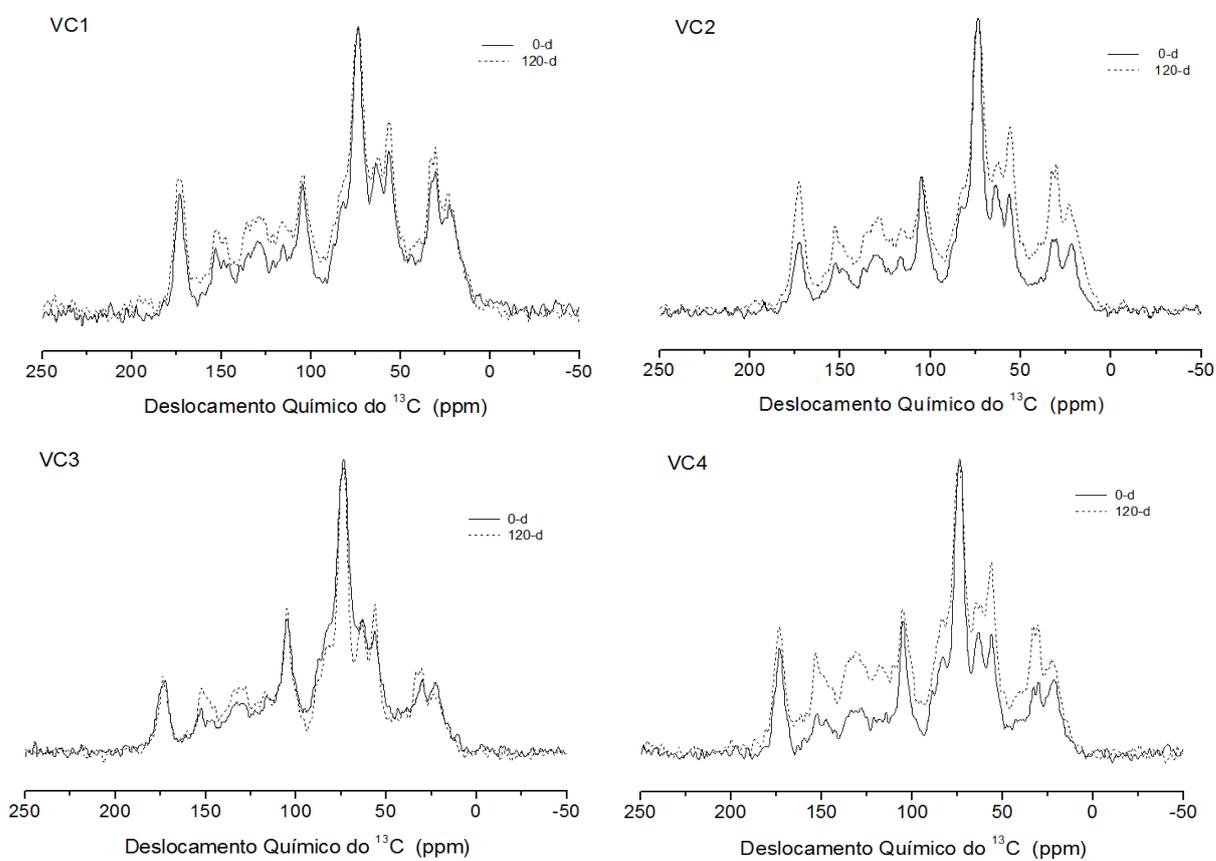


Figura 2. Espectros de RMN ^{13}C de vermicomposto produzido a partir de: (VC1) esterco bovino; (VC2) esterco e bagaço de cana; (VC3) esterco bovino e torta de girassol e (VC4) esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol em diferentes estádios de maturação (0 e 120 dias).

Quadro 2. Distribuição relativa do C (%) nas diferentes regiões do espectro de RMN ¹³C das amostras de vermicomposto: (VC1) esterco bovino; (VC2) esterco e bagaço de cana; (VC3) esterco bovino e torta de girassol e (VC4) esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol em diferentes estádios de maturação (0 e 120 dias).

	Deslocamento Químico (ppm)							HB/HI
	(0-45)	(45-65)	(65-95)	(95-110)	(110-140)	(140-160)	(160-190)	
VC1 (0d)	23.16	17.70	24.97	9.99	11.45	6.39	6.34	0.69
VC1 (120d)	19.67	16.64	23.70	10.51	13.85	7.94	7.69	0.71
Δ	(-15.7)	(-5.9)	(-5.0)	(+5.2)	(+20.9)	(+24.2)	(+21.3)	(+2.9)
VC2 (0d)	14.46	16.58	31.90	12.39	12.00	6.94	5.73	0.50
VC2 (120d)	19.22	16.68	24.49	10.91	13.46	7.82	7.42	0.68
Δ	(+32.9)	(+0.6)	(-23.2)	(-11.9)	(+12.1)	(+12.6)	(+29.5)	(+36.0)
VC3 (0d)	15.04	17.29	33.35	12.48	10.50	5.36	5.99	0.45
VC3 (120d)	13.88	17.13	29.80	12.19	13.44	7.95	5.60	0.54
Δ	(-7.7)	(-0.9)	(-10.6)	(-2.3)	(+28.0)	(+48.3)	(-6.5)	(+20.0)
VC4 (0d)	15.85	17.65	32.74	11.26	9.93	5.33	7.25	0.45
VC4 (120d)	15.77	16.53	25.23	11.10	14.94	9.16	7.26	0.66
Δ	(-0.5)	(-6.3)	(-22.9)	(-1.4)	(+50.4)	(+71.8)	(+0.1)	(+46.67)

Δ: aumento ou diminuição em relação ao tempo zero. HB/HI: (0-45)+(110-165) / (45-110) + (165-184).

5.2 Caracterização dos ácidos húmicos

O Quadro 3 apresenta os teores de C, H e N dos AH extraídos dos vermicompostos. O teor de C dos AH no início da vermicompostagem variou em uma faixa de 40,69 a 60,58 %, sendo os maiores teores encontrados nos AH2, AH3 e AH4. Tais resultados podem ser atribuídos às misturas de esterco com bagaço de cana (AH2) e torta de girassol (AH3 e AH4) na formulação dos vermicompostos. Ao final do processo (120 dias) os AH2, AH3 e AH4 tiveram o conteúdo de C diminuído, o que pode ser atribuído ao processo de humificação que envolve a degradação de compostos mais lábeis pelos microrganismos presentes no material. Apenas o AH1 apresentou um pequeno aumento no conteúdo de C, sugerindo uma menor degradação de compostos lábeis e conseqüentemente menor atividade microbiana. O conteúdo de H e N praticamente não se alterou, exceto para o AH3 que apresentou queda de 5,78 para 3,98 % ao final do processo. O que pode estar associado à imobilização microbiana ou a perdas de N no sistema, como lixiviação de nitrato, volatilização de amônia e emissão de N_2 , N_2O e outros óxidos de nitrogênio (Anghinoni, 1986). As pequenas faixas de variações encontradas nos teores de C, H e N dos AH, ao longo do processo de vermicompostagem, refletem a estabilidade dessa fração da MO.

Quadro 2. Teores de C, H e N nos AH extraídos de diferentes vermicompostos: (VC1) esterco bovino, (VC2) esterco bovino e bagaço de cana, (VC3) esterco bovino e torta de girassol e (VC4) esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol, em diferentes estádios de maturação (0, 30, 60, 90 e 120 dias).

HA	0 d			30 d			60 d			90 d			120 d		
	C	H	N	C	H	N	C	H	N	C	H	N	C	H	N
	----- % -----			----- % -----			----- % -----			----- % -----			----- % -----		
HA1	48.69	5.86	3.65	50.57	5.80	3.62	51.05	5.68	3.74	51.28	5.62	3.43	52.58	5.65	3.4
HA2	51.96	6.06	3.12	49.15	6.72	3.56	49.05	5.82	3.55	49.56	5.80	3.32	49.14	5.54	3.32
HA3	58.86	7.60	5.78	47.87	5.57	4.81	47.39	5.48	4.35	48.58	5.60	4.51	47.53	5.53	3.98
HA4	60.58	7.44	3.72	48.00	5.81	3.72	46.57	5.53	3.25	47.48	5.32	3.48	46.56	5.29	3.72
Mean	54.07	6.52	3.89	49.14	5.88	3.84	48.62	5.59	3.66	49.10	5.5	3.65	48.90	5.49	3.58
SD	5.32	0.93	1.08	1.21	0.49	0.55	1.73	0.16	0.42	1.42	0.25	0.49	2.29	0.14	0.27

5.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C com Polarização Cruzada e Rotação no Ângulo Mágico (^{13}C CP-MAS NMR)

Mudanças nos grupos funcionais dos AH foram verificadas pela ^{13}C CP-MAS NMR ao longo do processo de vermicompostagem e estão apresentadas na Figura 2. A distribuição relativa das espécies de C foi obtida pela integração das áreas dos espectros (Quadro 3). Os espectros e a integração das áreas revelaram diferenças marcantes entre os quatro AH, cada um deles com comportamentos peculiares, ao longo do processo de humificação.

A abundância dos sinais de C-alquílico e C-aromático nos espectros dos AH foi semelhante aos dos vermicompostos. Uma diminuição relativa na região de C-alquílico (0-50 ppm) foi observada nos AH1, AH3 e AH4 aos 120 dias de vermicompostagem, no entanto no AH2 observou-se aumento desse sinal. O sinal atribuído aos grupos aromáticos (110-140 ppm) aumentou em todos os vermicompostos (Tabela 3). Castaldi et al (2005) estudando RMN de ^{13}C AH isolados de composto de lodo de esgoto, verificaram redução de C-alifático e aumento de grupos aromáticos, carboxílicos e carbonilas, sugerindo uma neoformação de material humificado.

No final da vermicompostagem a região de 45-65 ppm foi a mais abundante (Tabela 3). Essa região é típica de polissacarídeos, no entanto o sinal em 56 ppm pode ser associado ao substituinte metoxil de lignina ou a ligações C-N em aminoácidos. Nos AH2 e AH4 o aumento relativo no sinal de 56 ppm pode ser associado ao acúmulo de unidades peptídicas, uma vez que diminui o sinal de grupamentos O-arila. Entretanto, nos AH1 e AH3 o sinal de 56 ppm pode ser atribuído à metoxila de unidades de lignina, visto que o sinal de grupamentos O-arila aumentou.

O AH1 e AH2 apresentaram diminuição relativa na região de carboidratos (65-110 ppm) e aumento na região de grupos fenóis e carboxílicos (140-190 ppm) aos 120 dias. A redução de C-alquílico em decorrência da transformação progressiva dos polissacarídeos em outros compostos oxigenados, tais como carboxílicos e ésteres, assim como aumento de estruturas aromáticas foi reportado por Castaldi et al. (2005). O inverso ocorreu com o AH4, que apresentou aumento na região de carboidratos e diminuição na região de fenóis e

carboxílicos. O AH3 apresentou aumento relativo nas regiões típicas de carboidratos e fenóis; e diminuição de carboxílicos (Tabela 3). O comportamento dos AH3 e AH4 pode estar associado à torta de girassol e uma menor atividade microbiana devido à presença de compostos menos lábeis nesse substrato.

O AH1 e o AH2 apresentaram aumentos de 10 e 19,1 % respectivamente, no índice de hidrofobicidade (HB/HI) ao final do processo de vermicompostagem, o que se explica pelo aumento da área da região de aromáticos para o AH1 e C-aquílico, aromáticos para o AH2. O AH3 e AH4 apresentaram diminuição de 32 e 29 %, respectivamente no índice de hidrofobicidade, que pode ser explicado pelo aumento relativo da região de carboidratos ao final da vermicompostagem.

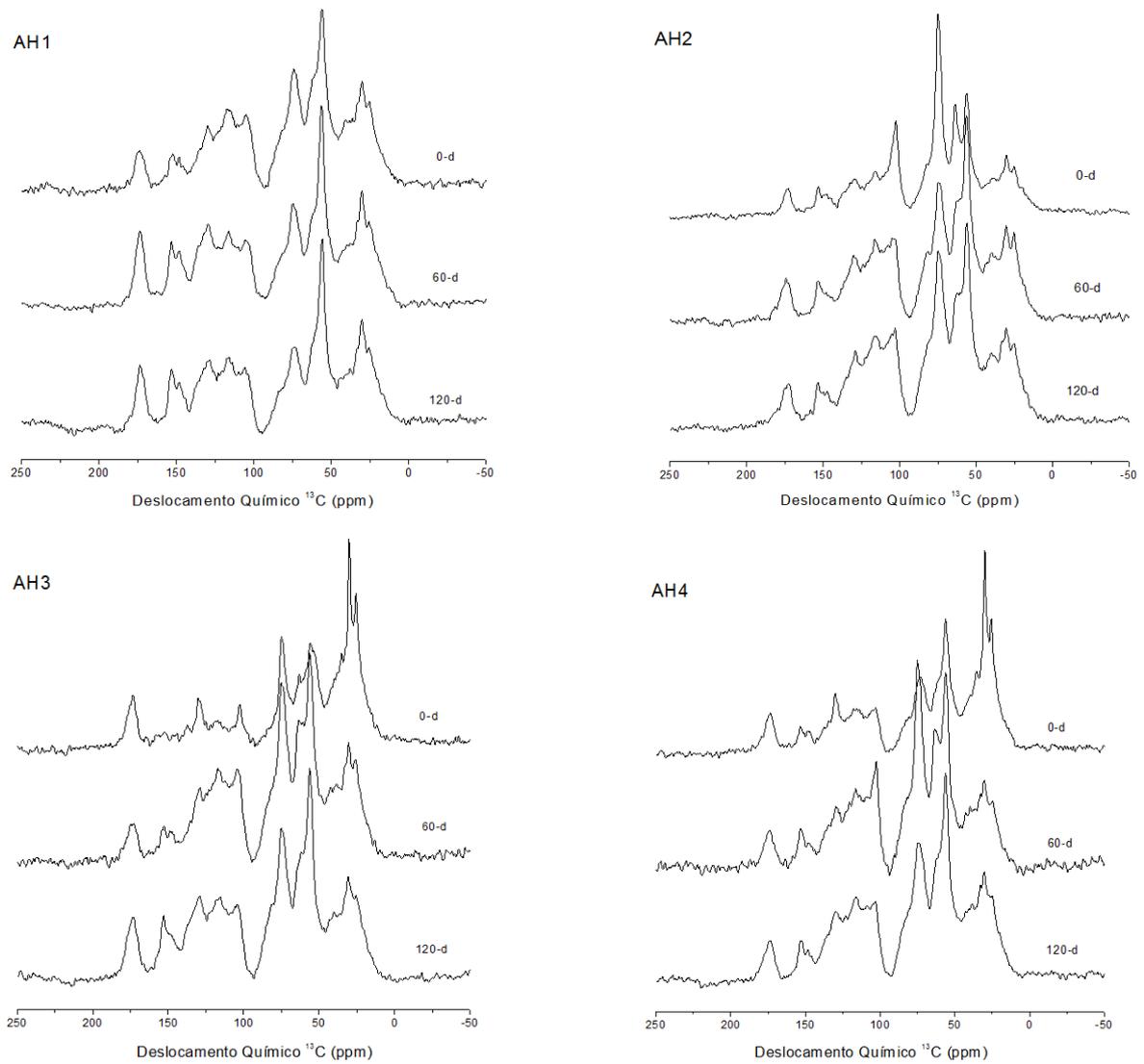


Figura 3. Espectros de RMN de ^{13}C de AH extraídos de diferentes vermicompostos: (AH1) esterco bovino; (AH2) esterco e bagaço de cana; (AH3) esterco bovino e torta de girassol e (AH4) esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol em diferentes estádios de maturação (0,60 e 120 dias).

Quadro 4. Distribuição relativa do C (%) nas diferentes regiões do espectro de RMN de ^{13}C das amostras de AH extraídos de diferentes vermicompostos: (AH1) esterco bovino; (AH2) esterco e bagaço de cana; (AH3) esterco bovino e torta de girassol e (AH4) esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol em diferentes estádios de maturação (0 e 120 dias).

	Deslocamento Químico do ^{13}C (ppm)							HB/HL
	(0-45)	(45-65)	(65-95)	(95-110)	(110-140)	(140-160)	(160-190)	
AH1 (0 d)	28.41	21.29	15.74	8.58	16.62	4.97	4.39	1.00
AH1 (60 d)	25.55	19.45	14.28	7.53	18.42	7.54	7.23	1.06
AH1 (120 d)	27.12	22.82	12.40	6.55	19.36	6.87	4.88	1.14
Δ	(-4.5)	(+7.1)	(-21.2)	(-23.6)	(+16.4)	(+56.5)	(+11.1)	(+14.0)
AH2 (0 d)	23.79	19.9	22.56	10.99	13.17	5.31	4.29	0.73
AH2 (60 d)	25.40	21.36	17.52	8.94	16.23	5.11	5.43	0.87
AH2 (120 d)	25.01	20.37	18.20	9.68	16.37	5.39	4.98	0.88
Δ	(+5.1)	(+2.3)	(-19.3)	(-11.9)	(+24.3)	(+1.50)	(+16.0)	(+20.5)
AH3 (0 d)	42.22	18.76	12.57	5.40	10.39	4.16	6.49	1.31
AH3 (60 d)	27.00	21.34	17.93	8.73	16.12	4.34	4.54	0.90
AH3 (120 d)	21.83	21.64	17.22	7.90	18.57	6.83	6.01	0.90
Δ	(-48.3)	(+15.3)	(+ 36.9)	(+46.3)	(+78.7)	(+64.2)	(-7.40)	(-31.3)
AH4 (0 d)	37.27	18.56	12.66	6.67	14.25	4.88	5.71	1.29
AH4 (60 d)	21.24	22.68	21.27	9.80	16.12	4.36	4.52	0.71
AH4 (120 d)	26.23	22.15	17.25	8.71	16.95	4.51	4.19	0.91
Δ	(-29.6)	(+19.3)	(+36.2)	(+30.6)	(+18.9)	(-7.5)	(-26.6)	(-29.4)

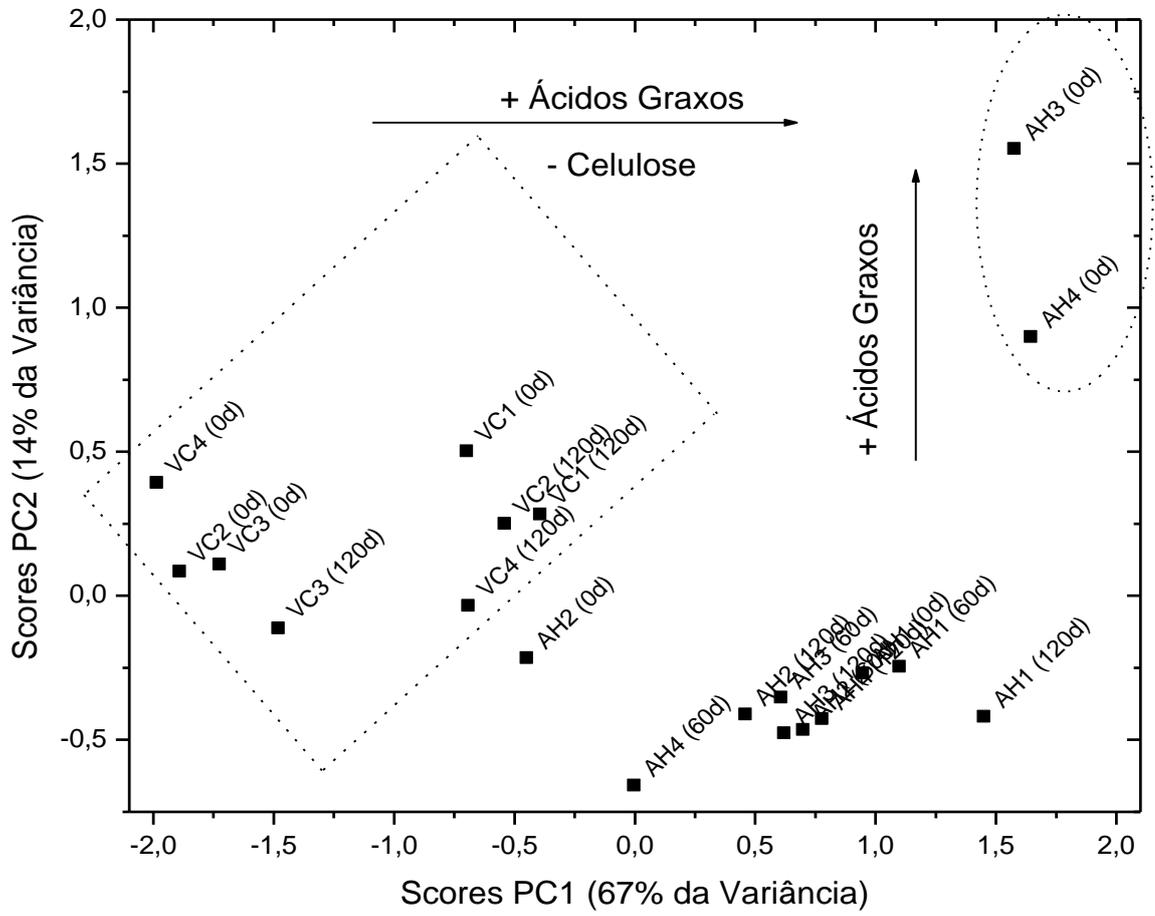
Δ : aumento ou diminuição em relação ao tempo zero. HB/HL: $(0-45)+(110-165) / (45-110) + (165-184)$

5.3 Análise dos Componentes Principais (ACP)

Duas componentes principais (CP) foram extraídas dos espectros de RMN de ^{13}C , capturando 81% da variância total. A primeira CP capturou 67% da variância total e de modo geral, diferenciou os ácidos húmicos (AH) dos vermicompostos, Figura 4A. Os loadings da CP1 revelam menores conteúdos de carboidratos nos AH, provavelmente devido à celulose parcialmente oxidada a ácidos urônicos (73, 105 e 172 ppm) e mais grupos alquilas (20-46 ppm) e N-alquilas (55 ppm) (Figura 4B). Atribui-se esse sinal (55 ppm) a peptídeos visto que não há carregamentos positivos na região dos O-Arilas, que indicariam grupos metoxilas substituinte de guaiacila e siringila. Esses resultados indicam que houve extração seletiva de peptídeos e grupos alifáticos insaturados em detrimento à celulose parcialmente oxidada.

A segunda CP capturou 14% da variância total (Figura 4A), e foi caracterizada por sinais positivos de polimetilênos amorfos (30 ppm) e outros grupos alquilas (26 ppm) associados a grupos carboxílicos (173 ppm), atribuíveis a ácidos graxos de cadeia longa (Figura 4B). Como as amostras que apresentaram maiores scores para essa CP, foram os AH3 e AH4 no início da vermicompostagem (Figura 4A) e esses AH foram extraídos de vermicompostos que apresentavam em sua composição torta de girassol, deduz-se que esses ácidos graxos sejam oriundos desse material. Porém, trata-se de um composto lábil, visto que após 60 dias de vermicompostagem essas amostras já se agruparam com as demais, não apresentando conteúdos de ácidos graxos de cadeia longa significativamente diferentes. Pelos carregamentos negativos de sinais atribuíveis à lignina (metoxila em 56 ppm e O-arila em 154 ppm) pode-se inferir que esses AH (3 e 4, tempo 0) possuíam um menor conteúdo desse biopolímero.

4A



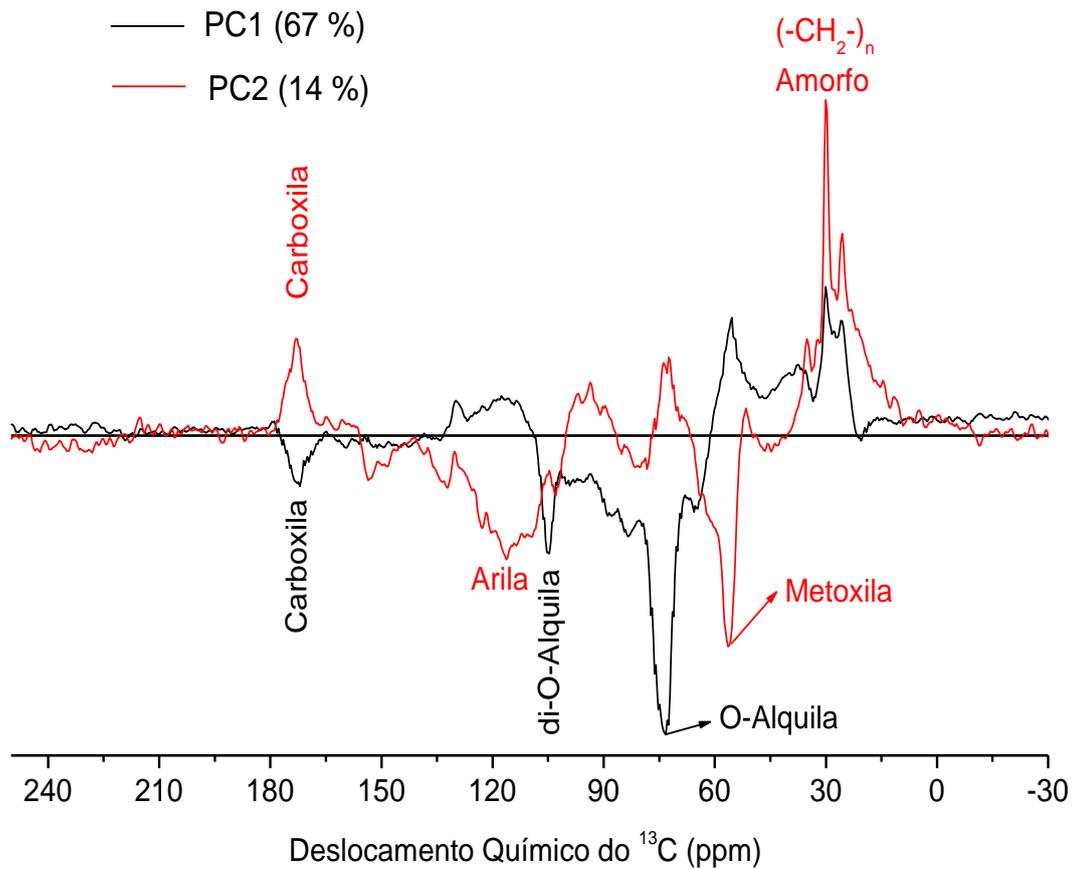


Figura 4. Scores (A) e Loadings (B) das componentes principais (CP1 e CP2) extraídas dos espectros de RMN de ^{13}C das amostras de vermicompostos e ácidos húmicos ao longo do tempo de maturação.

5.4 Cromatografia Líquida por Exclusão de Tamanho (HPSEC)

A Mw relativa determina a conformação estrutural das SH, e sua possível reatividade no solo e no ambiente. A Figura 5 apresenta os cromatogramas com a distribuição de tamanho/massa molecular (Mw) dos AH extraídos dos diferentes vermicompostos. A Figura 6 apresenta os índices relativos de Mw. Baseado nos cromatogramas (Figura 5) foi possível observar que, de modo geral, os AH apresentam perfis cromatográficos semelhantes, com modificações apenas na intensidade das absorções de UV ao longo do processo de vermicompostagem. As diferenças observadas entre os AH estão mais relacionadas com a distribuição de tamanho (mais precisamente do raio hidrodinâmico das moléculas) do que com a massa molecular (De Nobili e Chen, 1999). Contudo, o termo distribuição de massa molecular (Mw) foi consagrado pelo uso e é tido como sinônimo de distribuição de tamanho molecular.

A ausência de um padrão cromatográfico válido e reconhecido consiste no problema central do estudo da massa molecular das SH. Desta forma, muitas vezes faz-se necessário o uso de proteínas globulares, carboidratos e/ou polímeros orgânicos para calibração das colunas. Conseqüentemente, a distribuição da Mw pode não resultar em valor absoluto, mas só aparente e relativo aos padrões utilizados na calibração da coluna. Nesse trabalho os valores de Mw relativa foram calculados baseados apenas na integração das áreas dos picos. O cálculo do índice de Mw foi feito dividindo a área 2 do pico (moléculas de menor Mw relativa) pela área 1 (moléculas de maior Mw relativa). Experimentos com HPSEC sugerem que o 1º pico eluído pela coluna seja composto principalmente por componentes mais apolares (fração de alta massa molecular) que tiveram sua energia de solvatação reduzida, e por isso são capazes de formar livres associações (agregados supramoleculares), que ficam dentro dos domínios hidrofóbicos. Enquanto que associações hidrofílicas são facilmente solvatadas e dispersas na solução, sendo por isso consideradas frações de baixa massa molecular (Piccolo, 2002; Piccolo et al., 2002).

De modo geral pode-se afirmar que a Mw dos AH foi alterada ao longo do processo de vermicompostagem e que os diferentes AH aqui analisados não apresentaram a mesma tendência de modificação, o que já era esperado em

função de suas diferentes composições estruturais iniciais. Observou-se que os AH3 e AH4 apresentaram acúmulo de moléculas de menor Mw relativa ao longo de todo o processo de vermicompostagem. Enquanto que os AH1 e AH2 apresentaram acúmulo de moléculas de maior Mw até os 60 dias, e a partir daí uma tendência de acúmulo de moléculas de menor Mw relativa. Tais resultados corroboram com hipótese de que a estabilização da MO ocorre no sentido da biodegradação dos componentes celulares (alta massa molecular) e autoagregação dos produtos da biodegradação e ressíntese microbiana (moléculas de menor massa molecular) Piccolo (2002), independente da característica do material inicial.

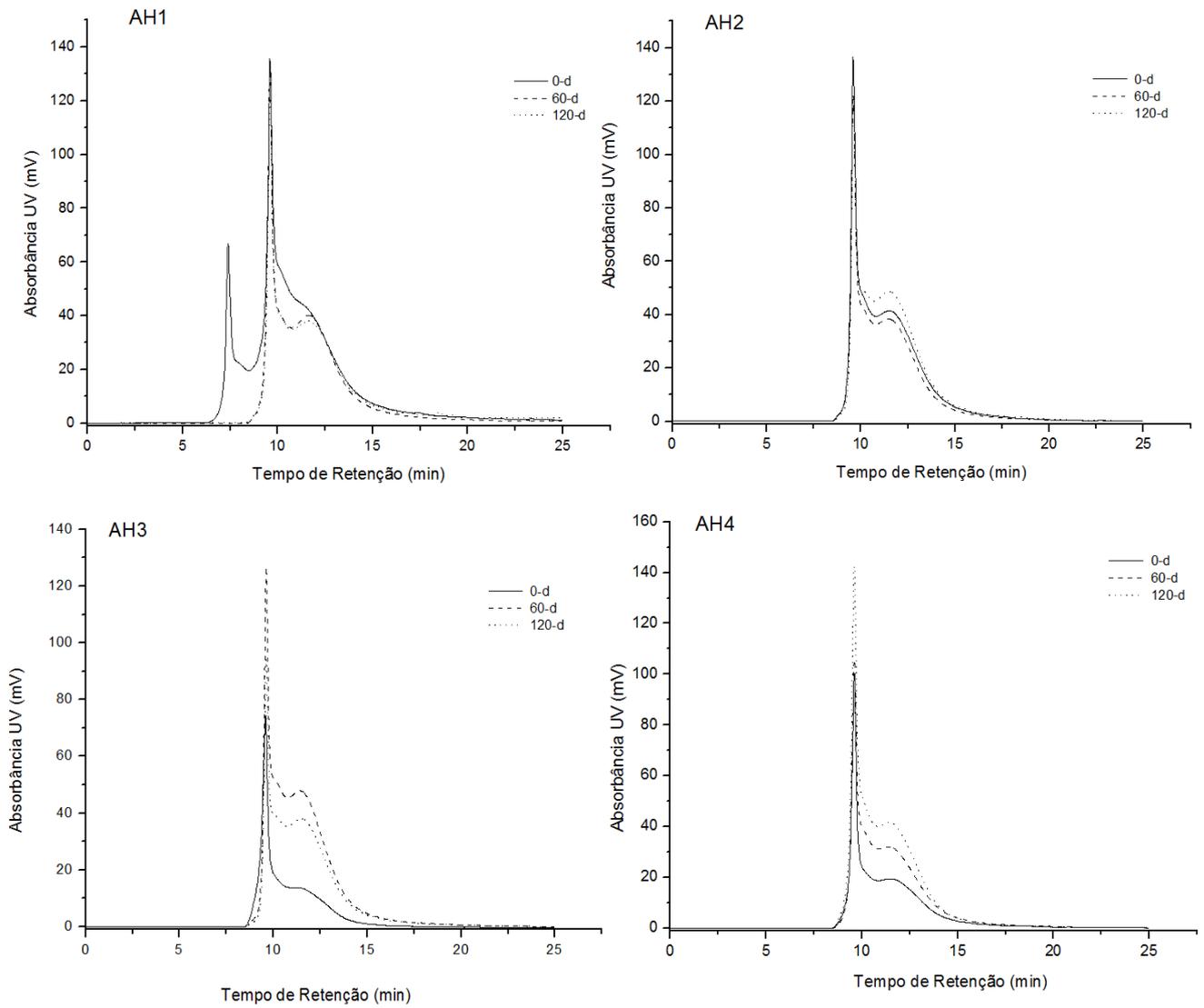


Figura 5. HPSEC - Perfil cromatográfico de AH extraídos de diferentes vermicompostos : (AH1) esterco bovino; (AH2) esterco e bagaço de cana; (AH3) esterco bovino e torta de girassol e (AH4) esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol em diferentes estádios de maturação (0,60 e 120 dias).

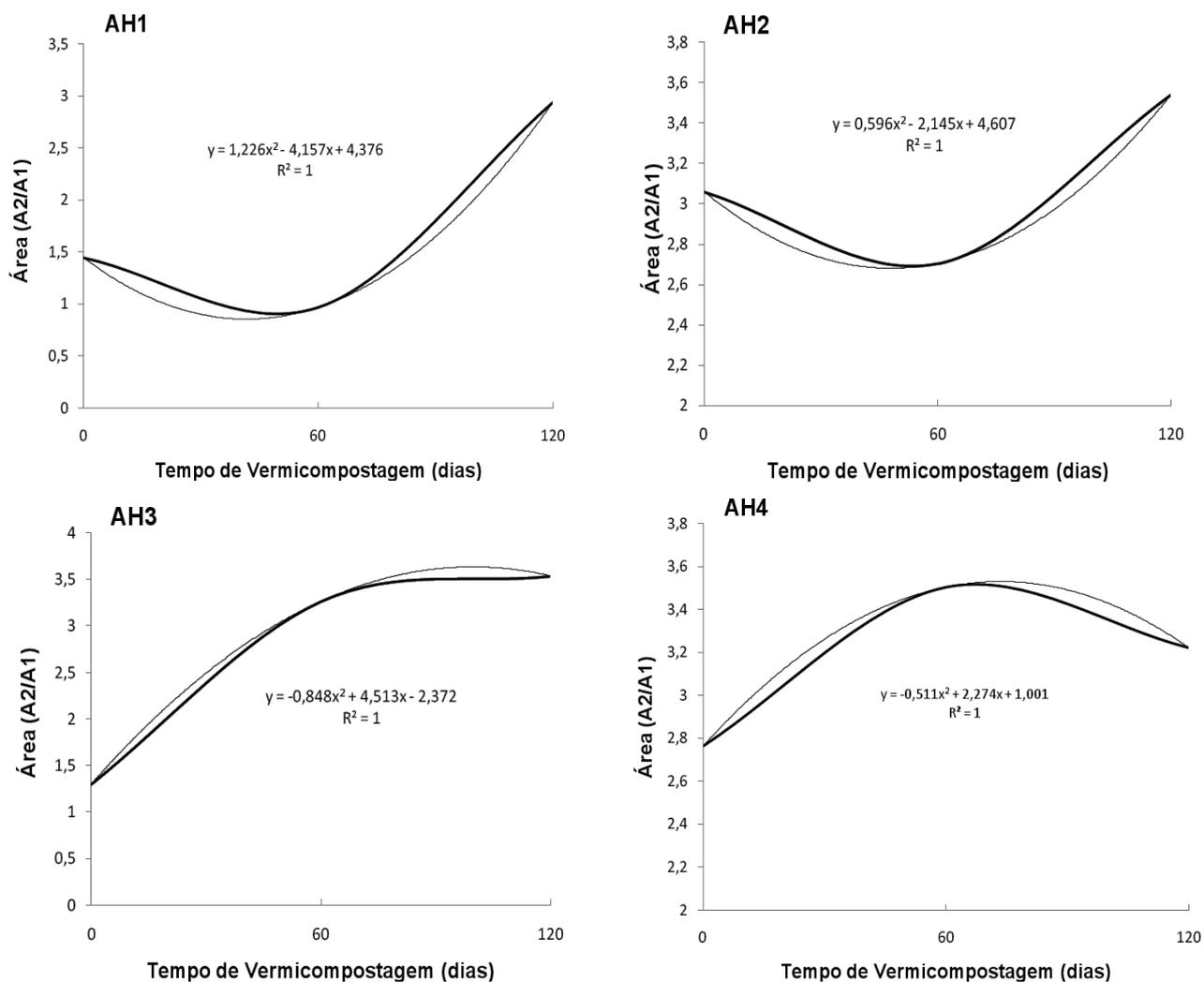


Figura 6. Índice de massa molecular relativa (Mw) de AH extraídos de diferentes vermicompostos: (AH1) esterco bovino; (AH2) esterco e bagaço de cana; (AH3) esterco bovino e torta de girassol e (AH4) esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol em diferentes estádios de maturação (0, 60 e 120 dias).

5.5 Cromatografia Líquida de Fase Reversa (RP-HPLC)

A Figura 7 apresenta os índices de hidrofobicidade (HB/HI) dos AH isolados de diferentes vermicompostos. Os AH apresentaram variações no perfil cromatográfico, indicando que ao longo do processo de vermicompostagem a hidrofobicidade dos AH é alterada. Os AH2, AH3 e AH4 foram os que apresentaram as maiores modificações no perfil cromatográfico ao longo do processo de vermicompostagem. Tais modificações podem ser facilmente visualizadas na Figura 8, que apresenta os índices de hidrofobicidade baseado na integração dos cromatogramas. Operacionalmente definiu-se a área 2 do cromatograma como a região típica de “moléculas hidrofóbicas” e a área 1 como região típica de “moléculas hidrofílicas”. Entretanto outros autores têm se baseado no tempo de retenção das moléculas. O AH1 e o AH2 apresentaram tendência de comportamento bastante diferenciado dos demais. O índice de hidrofobicidade do AH1 se manteve elevado até os 60 dias, acompanhado de diminuição de até o final da vermicompostagem (120 dias). O AH2 apresentou incremento no índice de hidrofobicidade somente a partir dos 60 dias. Enquanto que para o AH3 e AH4 ocorreu o contrário, ou seja, o índice de hidrofobicidade aumentou até os 60 dias, seguido de diminuição até os 120 dias de vermicompostagem como no AH1. Observa-se que o comportamento cromatográfico dos AH em solução não apresentou tendência uniforme de modificação ao longo do processo de vermicompostagem. Tal fato já era esperado visto que cada vermicomposto tem um processo de humificação que é peculiar ao seu material de origem, dentre outros fatores, que influenciam na transformação desses materiais.

Os índices de hidrofobicidade determinados por RP-HPLC evidenciam comportamento semelhante da hidrofobicidade medida tanto por RMN como por RP-HPLC. Tais resultados ratificam a eficiência da RP-HPLC e sugerem um novo método de análise, simples e eficaz, na determinação da hidrofobicidade da MO.

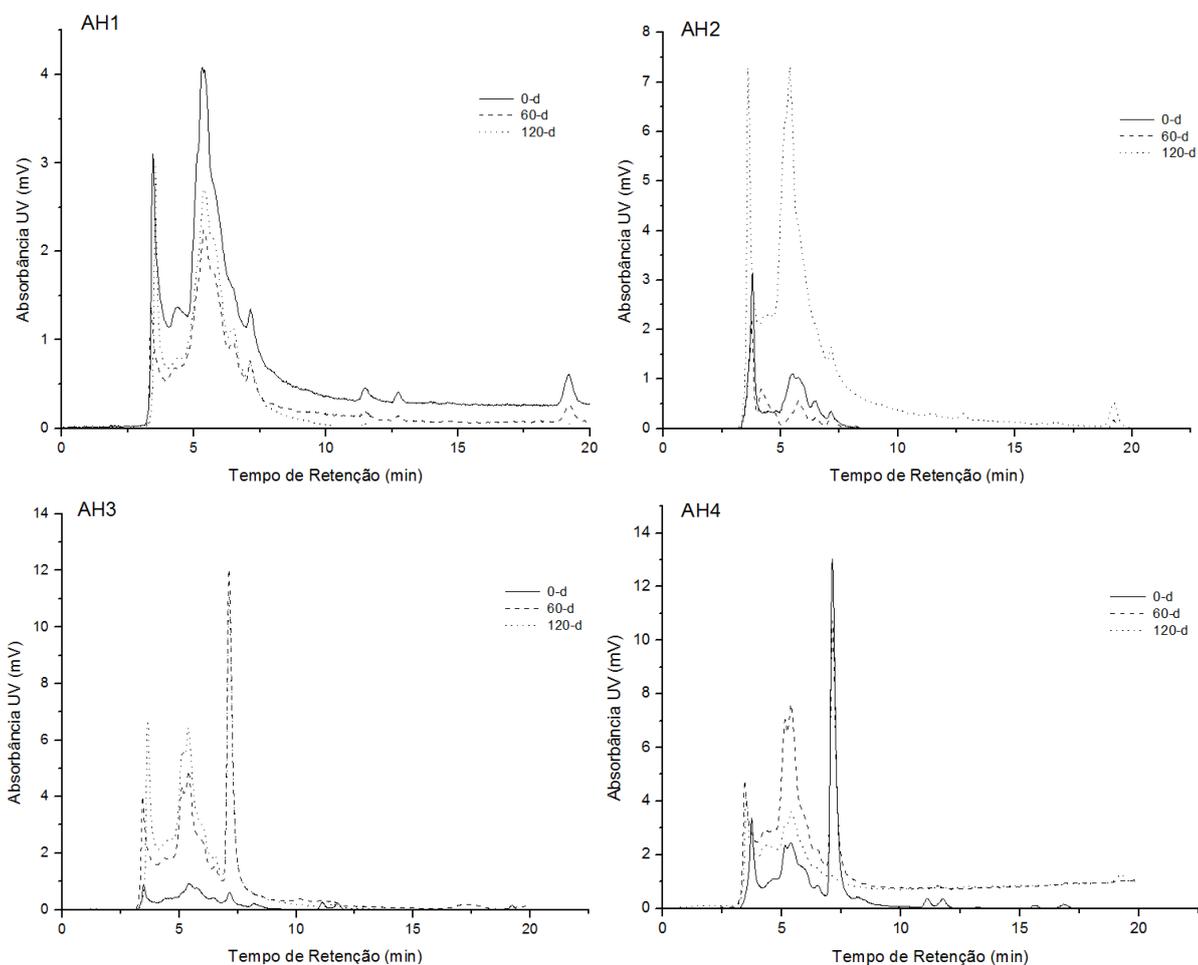


Figura 7. RP-HPLC - Perfil cromatográfico de AH extraídos de diferentes vermicompostos : (AH1) esterco bovino; (AH2) esterco e bagaço de cana; (AH3) esterco bovino e torta de girassol e (AH4) esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol em diferentes estádios de maturação (0,60 e 120 dias).

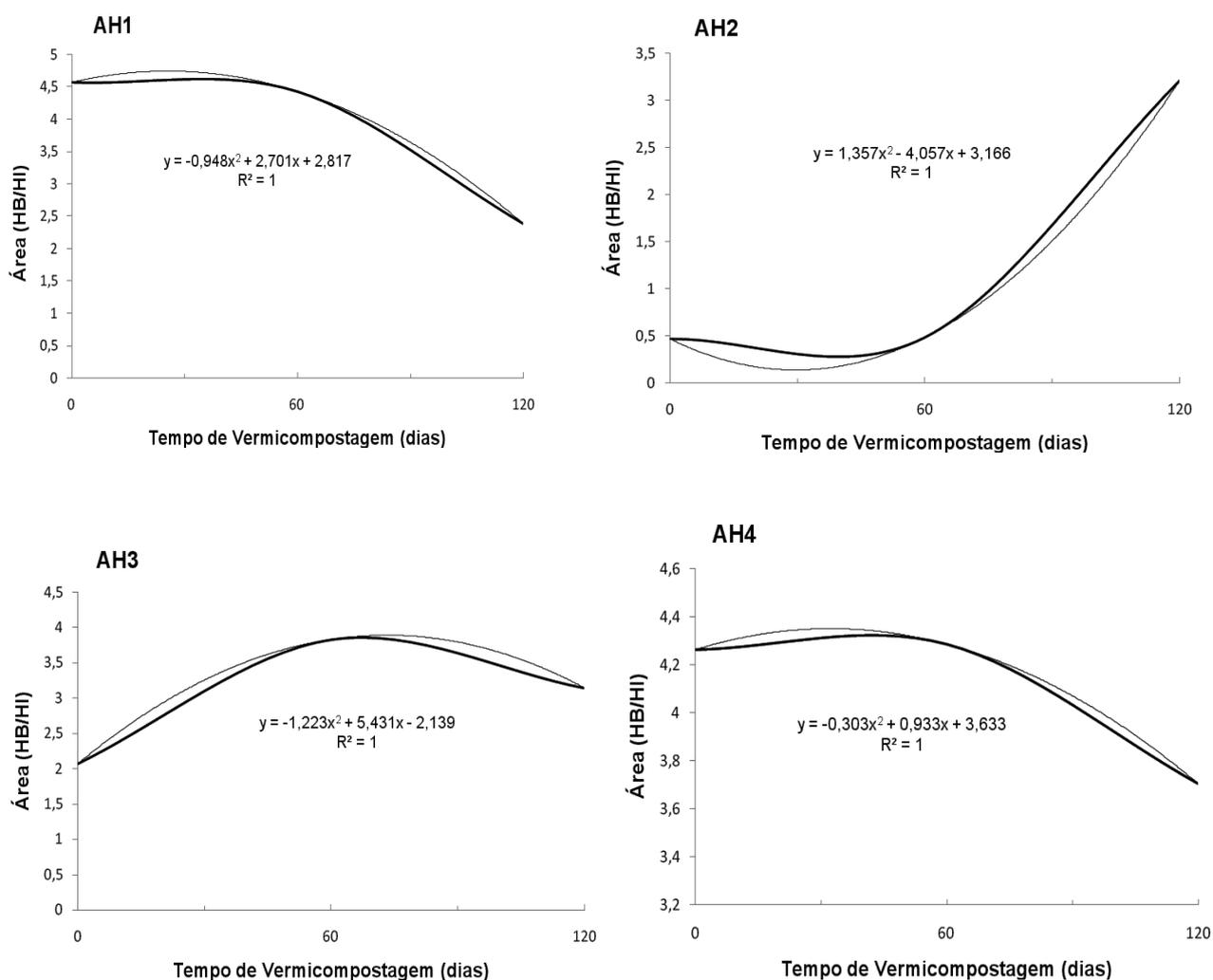


Figura 8. RP-HPLC – Índice de Hidrofobicidade de AH extraídos de diferentes vermicompostos : (AH1) esterco bovino; (AH2) esterco e bagaço de cana; (AH3) esterco bovino e torta de girassol e (AH4) esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol em diferentes estádios de maturação (0,60 e 120 dias).

5.6 Promoção do crescimento radicular em plântulas de milho

Com o objetivo de verificar a relação entre o avanço da humificação durante o processo de vermicompostagem e a atividade dos AH como promotores do crescimento vegetal procedeu-se os ensaios com plântulas de milho.

A Figura 8 apresenta o número de raízes laterais induzidas pelo tratamento com diferentes AH ao longo do tempo de vermicompostagem. O resultado da aplicação de SH sobre o crescimento vegetal pode variar conforme a origem das SH, a dose utilizada e a espécie vegetal em estudo (Vaughan e Malcolm, 1985). Neste trabalho todos os AH foram capazes de estimular o crescimento radicular em plântulas de milho a partir dos 60 dias de vermicompostagem. A indução do enraizamento já era esperada visto que ela é resultado da influência das SH sobre o crescimento radicular, conforme demonstrado para plântulas de milho (Canellas et al., 2002; Zandonadi et al., 2006) e *Arabidopsis* (Dobbss et al., 2007). Entretanto, durante muitos anos acreditou-se que somente SH com dimensões compatíveis para acessar o apoplasto seriam fisiologicamente ativas, ou seja, somente compostos com Mw relativamente pequeno como os ácidos fúlvicos teriam essa propriedade (Nardi et al., 1994; Muscolo et al., 2007). No entanto, processos bioquímicos intracelulares, como a regulação das bombas de prótons (Canellas et al., 2002; Zandonadi et al., 2006) e a estimulação de enzimas ligadas ao ciclo de Krebs (Nardi et al., 2007), foram alterados pela presença de SH com distribuição de massa/tamanho molecular maior, como os AH.

Mudanças no perfil cromatográfico e nos índices de Mw foram observadas em todos os AH ao longo do processo de maturação. Entretanto, ao comparar os dados de indução do crescimento radicular com os de Mw verificou-se que independente do aumento ou diminuição da Mw, todos os AH foram capazes de estimular o crescimento radicular a partir dos 60 dias de vermicompostagem. Os resultados aqui encontrados corroboram com Aguiar et al. (2009), que avaliando a distribuição de Mw de AH e a promoção do crescimento radicular verificaram que a Mw não foi o fator determinante na indução de raízes laterais, número de sítios de mitose e atividade de H⁺-ATPase. Muscolo et al (2007) relataram que a diferença na atividade biológica das SH parece estar mais relacionada às suas

composições químicas diversas do que pelos seus tamanhos moleculares propriamente ditos. Uma possível explicação se baseia na nova conformação supra-estrutural das SH (Piccolo, 2002). Este modelo postula a hipótese de que compostos de reconhecida capacidade de regulação e estimulação do crescimento vegetal (hormônios vegetais) estariam fracamente unidos aos domínios hidrofóbicos das SH. Nos domínios hidrofóbicos da MO, a atividade da água e dos microrganismos é menor e favorece a preservação de biopolímeros resultantes da decomposição de resíduos vegetais ou da atividade de microrganismos (Kleber et al., 2007). Essa hipótese foi parcialmente confirmada com os resultados obtidos com plântulas de milho e café, onde o perfil de exsudação de ácidos orgânicos foi modificado em resposta à adição de AH, sugerindo uma alta afinidade entre a planta e a solução com SH (Canellas et al., 2008a). Hottz-Rima et al. (2011) também verificaram que a adição de pequenas concentrações de ácido cítrico potencializou a capacidade de estimulação dos AH, comprovado pela superexpressão do perfil protéico da membrana plasmática, atividade da H⁺-ATPase e número de raízes laterais em plântulas .

Neste trabalho, os índices de hidrofobicidade dos AH calculados a partir das técnicas de RMN de ¹³C e RP-HPLC não apresentaram relação direta com a indução de raízes laterais em plântulas de milho. Entretanto, Canellas et al. (2008a) encontraram correlação significativa entre o grau de hidrofobicidade de AH e sua capacidade de promoção do crescimento radicular. Zancani e colaboradores (2009) verificaram através da técnica de RMN de ¹³C, 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, outros trabalhos obtiveram correlações significativas entre o índice de hidrofobicidade 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.

Devido à complexidade das SH, as relações existentes entre sua estrutura química e a atividade biológica provavelmente não obedecem a um modelo linear e padrão. Algumas tentativas de relacionar a estrutura com a

atividade de SH produziram resultados contraditórios. 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.

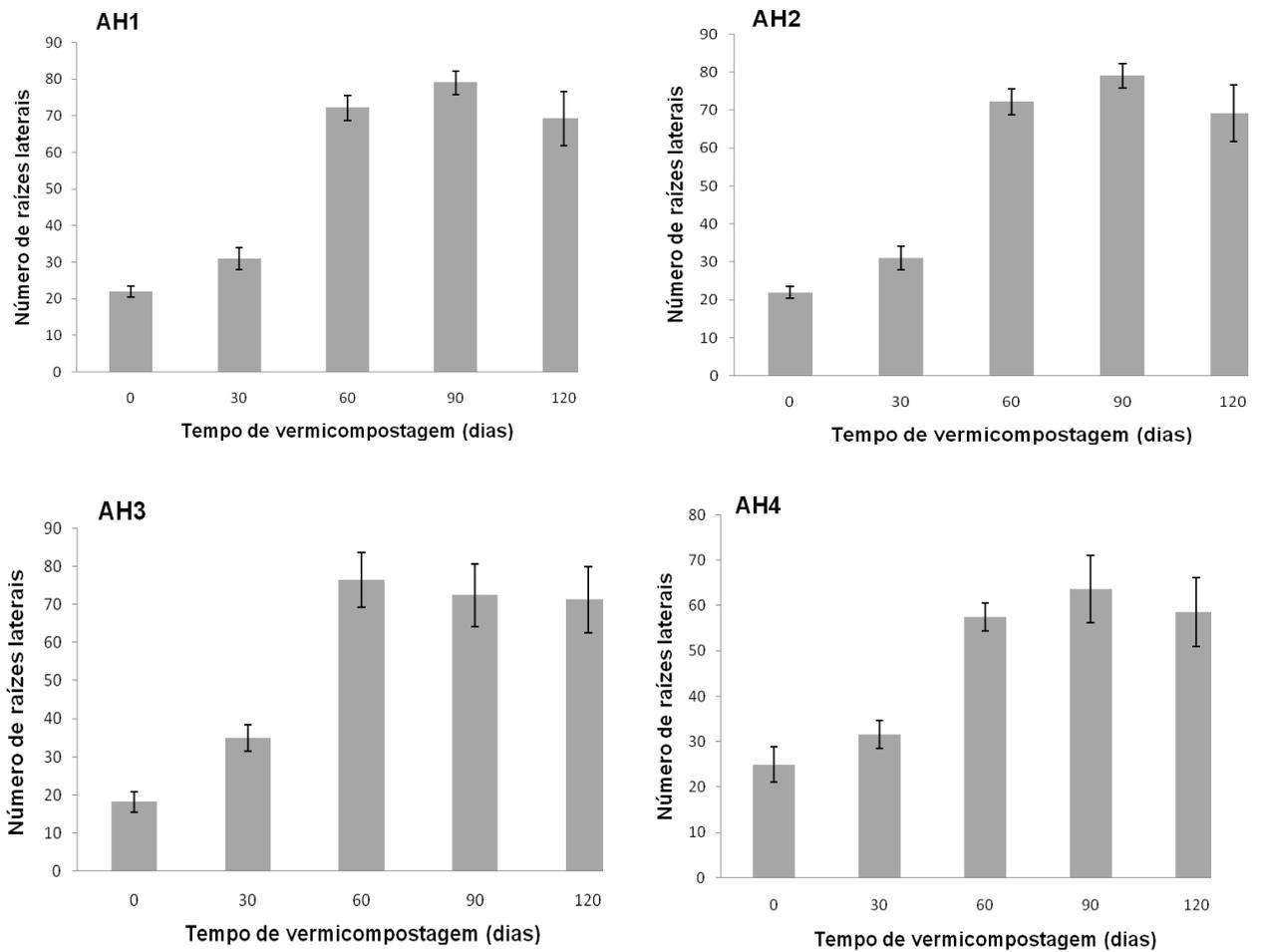


Figura 9. Efeito estimulatório de AH sobre o número de raízes laterais de plântulas de milho. Os AH foram isolados de diferentes vermicompostos : (AH1) esterco bovino; (AH2) esterco e bagaço de cana; (AH3) esterco bovino e torta de girassol e (AH4) esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol em diferentes estádios de maturação (0,30, 60, 90 e 120 dias).

5.7 Medida da acidez em solução e atividade da H⁺-ATPase

A Figura 9 apresenta as medidas de acidez (pH) do meio contendo plântulas de milho tratadas com AH extraídos de vermicompostos em diferentes estádios de maturação. O aumento da acidez da solução foi observado nos AH1, AH2 e AH3 a partir dos 60 dias de vermicompostagem, e são semelhantes aos resultados encontrados para o número de raízes laterais. Somente o AH4 apresentou comportamento diferenciado, com aumento da acidez em solução logo a partir dos 30 dias. O aumento da acidez do meio pode ser principalmente associado a dois fatores principais: i) produção de CO₂ pela respiração radicular, ou seja, durante a respiração há a produção de CO₂ que ao se dissolver no meio causa redução do pH e ii) aumento da extrusão de H⁺, possivelmente associado à atividade dos AH sobre as H⁺-ATPases.

Apesar da acidez proporcionada pela exposição das plântulas aos diferentes AH não ser exclusivamente devido ao estímulo nas bombas de H⁺, foi encontrado uma correlação significativa com a atividade da fração microssomal isolada das raízes de milho tratadas com AH2 no tempo 120 dias. Esse resultado sugere que o método simplificado pode ser usado no estudo de SH fisiologicamente ativas (Figura 11).

Esses resultados eram esperados visto que o mecanismo de promoção do crescimento celular é mediado pelas H⁺-ATPases em um processo conhecido como “a teoria do crescimento ácido”. Acredita-se que as auxinas tenham um papel central nesse mecanismo, uma vez que promovem tanto a transcrição de genes codificando ATPases, quanto a ativação dessas proteínas. A indução da expressão dessa enzima representa o sistema primário de transporte de H⁺ do interior da célula para o apoplasto e, para a formação do gradiente de H⁺, gerado através da membrana plasmática (Rayle e Cleland, 1992). O processo de ativação das H⁺-ATPases que culmina com o alongamento celular se inicia com a geração do gradiente de H⁺ e abaixamento do pH, proporcionado pelo acúmulo de H⁺ no lado externo à célula. Tal processo proporciona as condições fisiológicas ótimas para o funcionamento de enzimas do tipo hidrolases e fenol-oxidases, enzimas com habilidade de romper ligações da parede celular. A expansão celular é favorecida pela ação de algumas enzimas específicas como, por exemplo, as

expansinas, que em pH menor ou igual a 4,5, promovem o aumento da plasticidade da parede celular pela liberação momentânea de pequenos segmentos da matriz de glucanos ligados às microfibrilas de celulose. O relaxamento da parede celular e o aumento do turgor culminam com o alongamento celular (Canellas et al.,2005).

O dados confirmam pelo menos em parte, que a medida da acidez da solução contendo plantas tratadas com AH está relacionada com a atividade da H⁺-ATPase (aumento da extrusão de H⁺) de membrana plasmática.

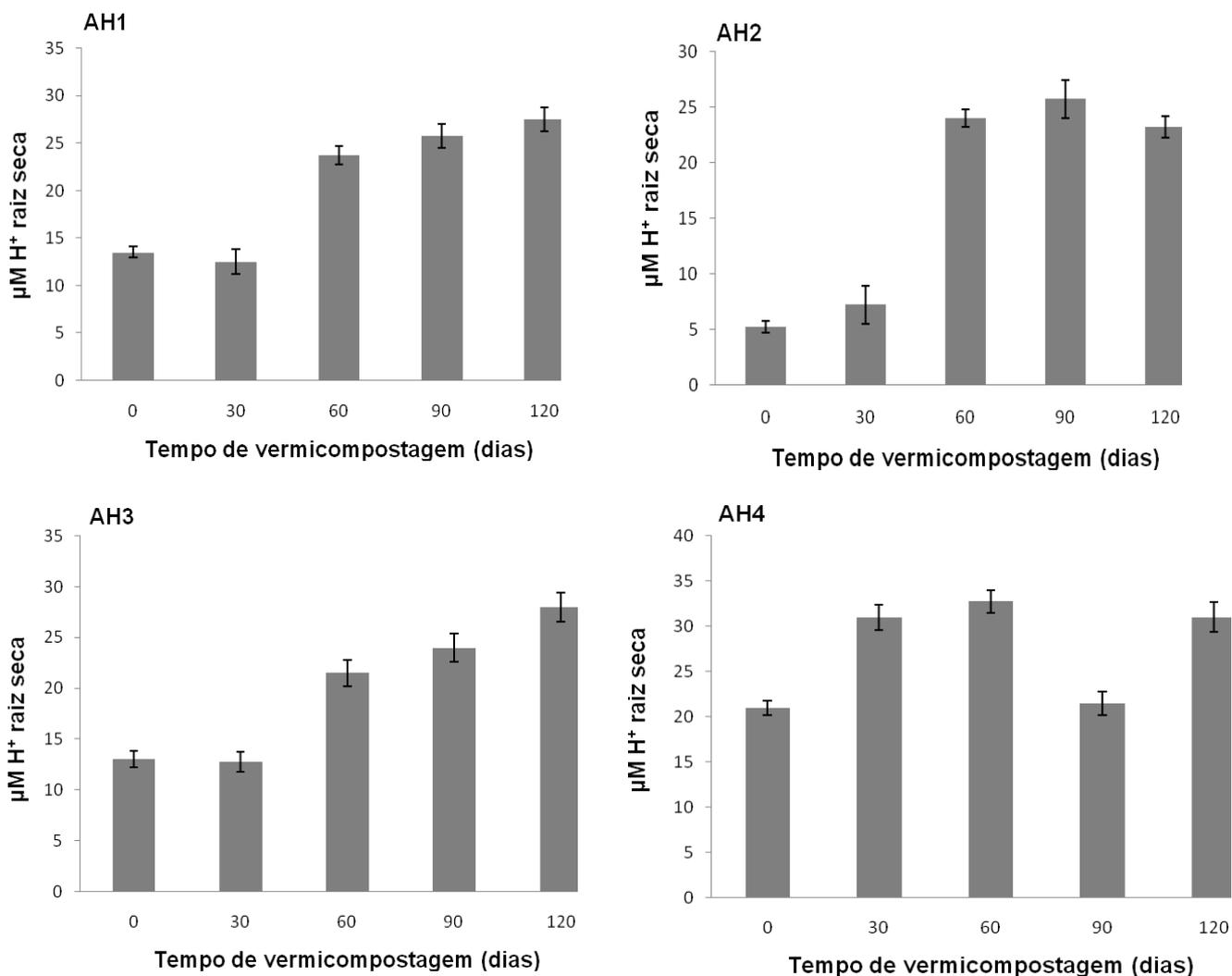


Figura 10. Medida de pH de solução contendo plântulas de milho tratadas com AH. Os AH foram isolados de diferentes vermicompostos: (AH1) esterco bovino; (AH2) esterco e bagaço de cana; (AH3) esterco bovino e torta de girassol e (AH4) esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol em diferentes estádios de maturação (0,30, 60, 90 e 120 dias).

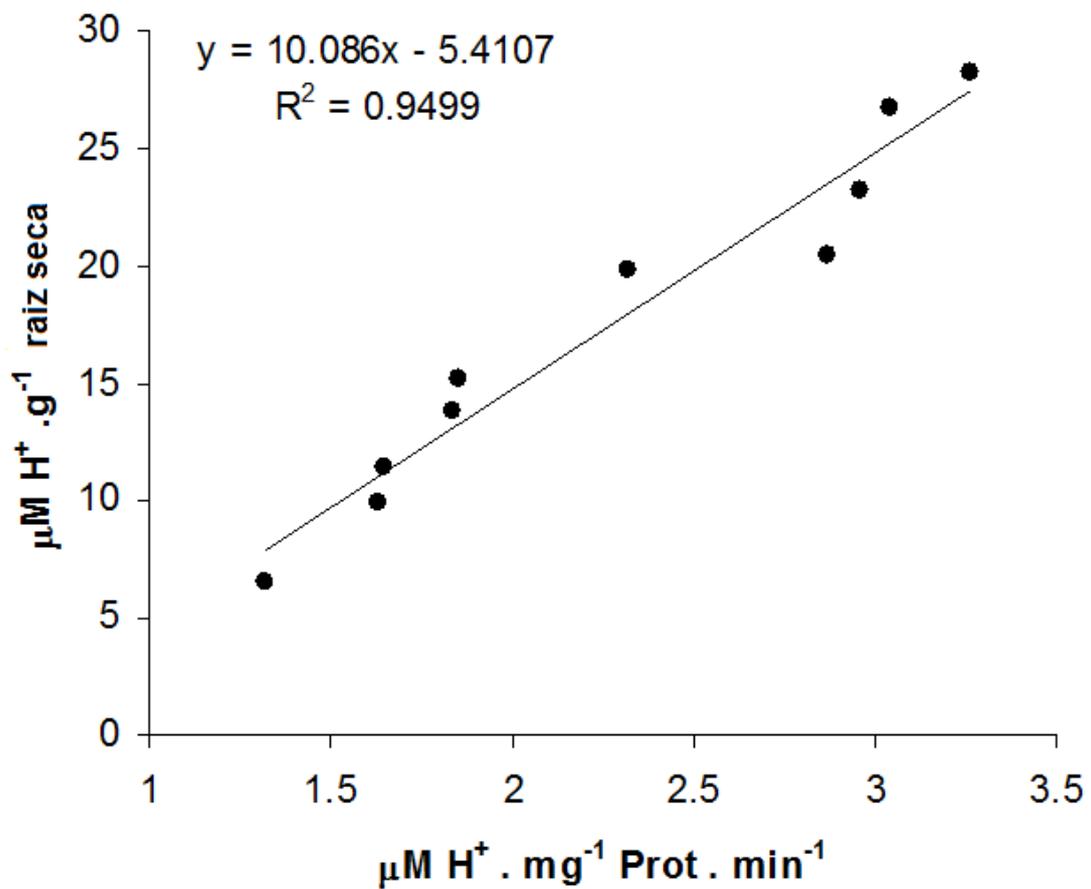


Figura 11. Relação entre extrusão de H^+ e atividade H^+ -ATPase de membrana plasmática de plântulas de milho tratadas com o AH2 (esterco bovino e bagaço de cana) extraídos ao final do processo de vermicompostagem.

5.8 Ensaio com mutantes de tomateiro variedade MicroTom com gene repórter sintético DR5::GUS

Com o objetivo de verificar uma possível ação do tipo hormonal dos AH, utilizou-se plântulas transgênicas de tomateiro (cv. MicroTom) contendo o gene repórter responsivo a auxina (DR5::GUS). A Figura 10 apresenta a atividade auxínica dos AH isolados de vermicomposto em diferentes estádios de maturação, sobre as raízes do tomateiro DR5::GUS. Em todos os tratamentos foi possível visualizar a indução da expressão do gene, que é resultado da clivagem da enzima β -glucosidase com o substrato X-gluc, produzindo coloração azul. Como esperado, a atividade da enzima também foi verificada no tratamento controle, como resultado da produção interna de auxina. A presença de atividade auxínica exógena em raízes indica uma atividade tipo hormonal, resultado da aplicação de AH. Todos os AH apresentaram maior proporção de coloração (azul) nas raízes quando comparados ao controle. O ensaio histoquímico não permite quantificar a atividade enzimática, porém a eficiência da transformação pode ser facilmente visualizada pela magnitude da coloração de raízes de plântulas tratadas com os diferentes AH e raízes de plântulas controle (tratadas com CaCl_2 2mM). Evidências de que SH podem ativar o gene repórter DR5::GUS vêm sendo demonstradas em vários trabalhos e de maneira geral, confirmam a hipótese de que a indução de raízes laterais é pelo menos em parte, promovida por uma atividade “tipo-auxínica” das SH (Trevisan et al., 2007; Dobbs, 2010 e Canellas et al., 2011).

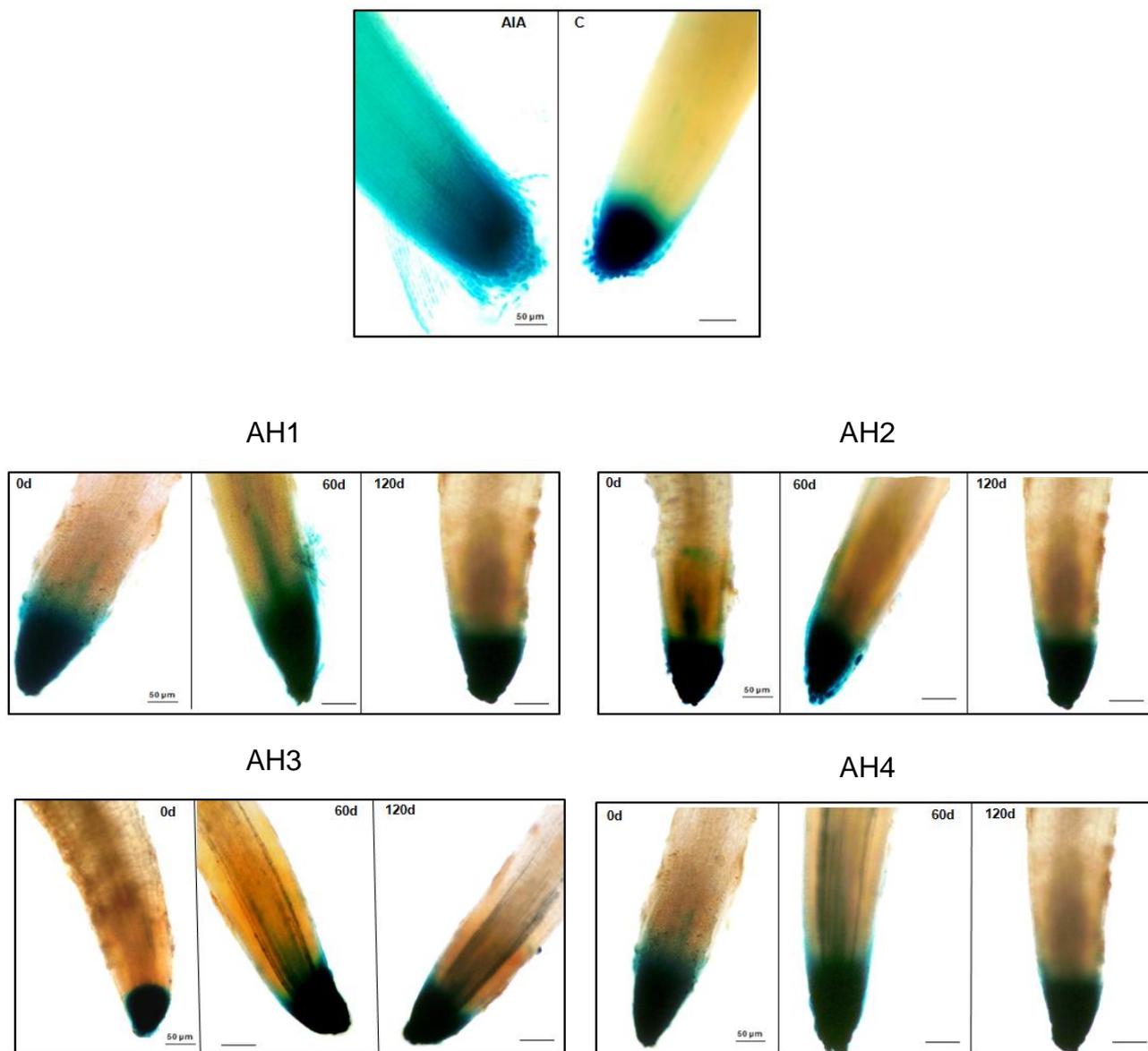


Figura 12. Ensaio histoquímico para detecção da atividade da enzima glucuronidase (GUS) em raízes de plântulas do tomateiro transgênico DR5::GUS. As plântulas foram tratadas com AIA, CaCl_2 2 mM (controle) e AH extraídos vermicomposto em diferentes estádios de maturação (0,60 e 120 dias): (AH1) esterco bovino; (AH2) esterco e bagaço de cana; (AH3) esterco bovino e torta de girassol e (AH4) esterco bovino, bagaço de cana e torta de girassol. A barra de escala corresponde a 50 μm .

6. RESUMO E CONCLUSÕES

O processo de humificação decorrente da vermicompostagem foi acompanhado por mudanças estruturais na conformação dos AH, tais como alterações na composição elementar, grupos funcionais, Mw e hidrofobicidade. Os resultados aqui obtidos revelam que os AH são bons indicadores do processo de humificação. Todos os AH apresentaram bioatividade elevada a partir dos 60 dias de vermicompostagem independentemente do tipo de resíduo orgânico utilizado.

1. Mudanças na abundância relativa de grupamentos funcionais verificados pela RMN de ^{13}C indicaram que as rotas biológicas não são alteradas pelas diferentes misturas de resíduos orgânicos, pois ao final da vermicompostagem todos os AH apresentaram redução de carboidratos e aumento no índice de hidrofobicidade;
2. A promoção do crescimento radicular pelos AH parece ser do tipo auxínica, uma vez que foi observada a ativação do gene sintético (DR5::GUS) responsivo à auxina. O que poderia estar associado à presença e

concentração de compostos bioestimulantes, tais como hormônios vegetais e não com modificações estruturais na sua conformação, visto que a magnitude de promoção do crescimento promovido pelos AH não apresenta resposta direta com a distribuição de Mw e a hidrofobicidade;

3. A partir dos 60 dias de vermicompostagem os AH estão biologicamente ativos, independente das combinações de resíduos. Esse resultado é de extrema importância para produção de bioestimulantes a base de SH isoladas de fontes renováveis, uma vez que significa economia de mão de obra e tempo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbt-Braun G., Frimmel F.H. (1999) Basic characterization of Norwegian NOM samples similarities and differences. *Environ Int.*, 25: 161-80.
- Albiach R., Canet R., Pomares F., Ingelmo, F. (2001) Organic matter components and aggregate stability after the application of different amendments to a horticultural soil. *Bioresour Technol.*, 76: 125-129.
- Anghinoni, I. Adubação nitrogenada nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (1986) In: Santana, M.B.M. *Adubação nitrogenada no Brasil*. Ilhéus CEPLAC/SBCS, Cap.I. p.1-18.
- Atanassovaa I., Doerra, S. (2010) Organic compounds of different extractability in total solvent extracts from soils of contrasting water repellency. *European Journal of Soil Science*, 61: 298-313.

- Atiyeh, R.M., Lee, S., Edwards, C.A., Arancon, N.Q., Metzger, J.D., (2002) The influence of humic acids derived from earthworms processed organic wastes on plant growth. *Bioresource Technology*, 84: 7-14.
- Bailey K.I., Lazarovits, G. (2003) Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. *Soil Tillage Res.* 72: 169-180.
- Baldotto, L.E.B., Baldotto, M.A, Giro, V.B., Canellas, L.P., Olivares, F.L., Bressan, R.S. (2009) Desempenho do abacaxizeiro vitória em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante aclimação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 33: 979-990.
- Bansal, S., Kapoor, K.K. (2000) Vermicomposting of crop residues and cattle dung with *Eisenia foetida*. *Bioresour. Technol.*, 73: 95-98.
- Bastos, R.S., Sá Mendonça E., Víctor Hugo A.V., Corrêa, M.M. (2005) Formação e estabilização de agregados do solo decorrentes da adição de compostos orgânicos com diferentes características hidrofóbicas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 29:11-20.
- Behera, U.K., Sharma, A.R., Pandey, H.N. (2007) Sustaining productivity of wheat–soybean cropping system through integrated nutrient management practices on the Vertisols of central India. *Plant Soil*, 297:185-199.
Biol. Biochem., 26: 1341-1346.
- Bottomley, W.B. (1917) Some effects of organic growth-promotion substances (auximones) on the growth of *Lemna minor* in mineral cultural solutions. *Proc. Royal Soc. Lond. (Biol.)*, 89: 481-505.
- Bouroche, J. M., Saporta, G. (1982) *Análise de dados*. Rio de Janeiro: Zahar.

- Cabaniss S.E., Zhou Q., Maurice, P.A, Chin Y.P., Aiken, G.R. (2000) A log-normal distribution model for the molecular weight of aquatic fulvic acids. *Environ Sci Technol.*, 34: 1103-1109.
- Canellas L.P., Dantas D.J., Aguiar N.O., Peres L.E.P., Zsögön A., Olivares F.L., Dobbss L.B., Façanha A.R., Nebbioso A. e Piccolo A. (2011) Probing the hormonal activity of fractionated molecular humic components in tomato auxin mutants. *Ann Appl Biol.*, 159: 202-211.
- Canellas L.P., Santos G.A., Rumjanek V.M., Moraes A.A., Guridi, F. (2001) Distribuição da matéria orgânica e características de ácidos húmicos em solos com adição de resíduos de origem urbana. *Pesq. Agropec. Bras.*, 36(12): 1529-1538.
- Canellas, L.P., Façanha, A.O., Olivares, F.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 Physiology*, 130: 1951-1957.
- Canellas, L.P., Piccolo, A., Dobbss, L.B., Spaccini, R., Olivares, F.L., Zandonadi, D.B. Façanha, A.R. (2010) Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. *Chemosphere*, 78: 457-466.
- 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., 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., 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., 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, 1: 175-200.
- Carletti, P., Masi A. , Spolaore B. , Polverino P.D.L., De Zorzi M., Turetta L., Ferretti M., Nardi S. (2008) Protein expression changes in maize roots in response to humic substances. *Journal of Chemical Ecology*, 34: 804-818.
- Castaldi P., Alberti G., Merella R., Melis P. (2005) Study of the organic matter evolution during municipal solid waste composting aimed at identifying suitable parameters for the evaluation of compost maturity. *Waste Manage*, 25: 209-213.
- Cesco, S., Romheld, V., Varanini, Z., Pinton, R. (2002) Uptake of Fe-59 from soluble Fe-59-humate complexes by cucumber and barley plants. *Plant Soil*, 241: 121-128.
- Chan, L.P.S., Griffiths, D.A. (1988) The vermicomposting of pre-treated pig manure. *Biol Wastes*, 24: 57- 69.
- Chen, Y., Inbar, Y., Hadar, Y., Malcolm, R.L. (1989) Chemical properties and solid-state CPMAS ¹³C NMR of composted organic matter. *Sci. Total Environ.*, 81: 201-208.
- Chen, Y., Aviad, T. (1990) Effects of humic substances on plant growth. *In: Maccarthy, P., Capp, C.E., Malcolm, R.L. and Bloom, P.R., eds. Humic*

- substances in soil and crop sciences: selected readings. Madison, *American Society of America*, p. 161-186.
- Consden R., Gordon, A.H., Martin, A.J.P. (1944) Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper. *Biochemistry Journal*, 38: 224.
- 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.
- Cunha, T.J.F., Bassoi, L.H., Simões, M.L., Martinneto, L., Petrere, V.G., Ribeiro, P.R.A. (2009) Ácidos húmicos em solo fertirrigado no Vale do São Francisco. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 33:1583-1592.
- De Michelis, M.I, Spanswick, R.M. (1986) H⁺ Pumping driven by the vanadate-sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiol.*, 81:542-547.
- De Nobili, M., Gjessing, E., Sequi, P. (1989) *Sizes and shapes of humic substances by gel chromatography. In Humic Substances II. In Search of Structure.* M.H.B. Hayes, P. McCarthy, R. L. Malcolm and R.S. Swift (eds.). New York, Wiley, p. 562-587.
- Dell'agnola, G., Nardi, S. (1987) On overview of earthworm activity in the soil. In: *Bonvicini Pagliai A.M., Omodeo P.* (Eds.), *On earthworms selected symposia and monographs. Part 2.* Mucchi Editore, Modena, Italy, p. 103-112.
- Derenne, S. Largeau, C. (2001) A review of some important families of refractory macromolecules: composition, origin, and fate in soils and sediments. *Soil Sci.*, 166: 833-847.

- Deshmukh, A.P., Simpson, A.J., Hadad, C.M., Hatcher, P.G., (2005) Insights into the Sorption Properties of Cutin and Cutan Biopolymers. *Environ. Sci. Technol.*, 42: 1165–1171.
- 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, Azevedo, M., Peres L.E.P., Spaccini, R., Piccolo, A., Façanha, A.R. (2010) Bioactivity of Chemically Transformed Humic Matter from Vermicompost on Plant Root Growth. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58: 3881-3688.
- Dobbss, L.B. (2010) *Características químicas e promoção do crescimento radicular de substâncias húmicas*. Tese de doutorado. Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense -UENF, 112p.
- Domeizel, M., Khalil, A., Prudent P. (2004) UV spectroscopy: a tool for monitoring humification and for proposing an index of the maturity of compost. *Bioresource Technology*, 94: 177-184.
- Dominguez, J., (2004) State-of-the art and new perspectives on vermicomposting research. In: Edwards, C.A. (Ed.), *Earthworm Ecology*, 2 ed. CRC Press, Boca Raton, 401-424.
- Edwards, C. A., Dominguez, J., Neuhauser, E.F. (1998) Growth and reproduction of *Perionyx excavatus* (Perr.) (Megascolecidae) as factors in organic waste management. *Biol. Fert. Soils*, 27: 155-161.
- Edwards, P., Kamal, M., Wee, K.L. (1985) Incorporation of composted and dried water hyacinth in pelleted feed for the tilapia *Oreochromis niloticus* (Peters). *Aquaculture and Fisheries Management*, 1: 233-248.

- Egeberg, P. Kr., Alberts, J. (2002) Determination of hydrophobicity of NOM by RP-HPLC, and the effect of pH and ionic strength. *J. Water Res.*, 36: 4997-5004.
- Façanha, A.R., Façanha, A.L.O., Olivares, F.L., Guridi, F., Santos, G.A., Velloso, A.C.X., Rumjanek, V.M., Brasil, F., Schripsema, J., Braz, R., Oliveira, M.A., Canellas, L.P. (2002) Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre as bombas de prótons da membrana plasmática. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37: 1301-1310.
- Fiske, C.F. e Subbarow, Y. (1925) The colorometric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66:375.
- Fitter, A.H., Stickland, T.R. (1991) Architectural analysis of plant root systems 2. Influence of nutrient supply on architecture in contrasting plant species. *New Phytologist*, 118: 383-389.
- Fracchia, L., Dohrmann, A.B., Martinotti, M.G., Tebbe, C.C. (2006) Bacterial diversity in a finished compost and vermicompost: differences revealed by cultivation-independent analyses of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 71: 942-952.
- Frias, I., Caldeira, M.T., Perez Castineira, J.R., Avarro Avino, J.P., Cullianez Macia, F.A., Kuppinger, O., Stransky, H., Pages, M., Hager, A., Serrano, R. (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase, characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell*, 8:1533-1544.
- Gajalakshmi, S., Ramasamy, E.V., Abbasi, S.A. (2002) Vermicomposting of paper waste with the anecic earthworm *Lampito mauritii* Kingburg. *J. Chem. Technol.*, 9: 306-311.
- Garg, V.K., Kaushik, P. (2005a) Vermistabilisation of solid textile mill sludge spiked with poultry droppings by an epigeic earthworm *Eisenia foetida*. *Bioresour. Technol.*, 96: 1063-1071.

- Garg, V.K., Chand, S., Chhillar, A., Yadav, A. (2005b) Growth and reproduction of *Eisenia foetida* in various animal wastes during vermicomposting. *Appl. Ecol. Environ. Res.*, 3: 51-59.
- Gaudio, A.C., Zandonade, E. (2001) Proposição, validação e análise dos modelos que correlacionam estrutura química e atividade biológica. *Quim. Nova*, 24: 658-671.
- Ghosh, M., Chattopadhyay, G.N., Baral, K. (1999) Transformation of phosphorus during Vermicomposting. *Bioresour. Technol.*, 69: 149-154.
- Goebel, M.O., Bachmann J., Woche S.K., Fischer W.R. (2005) Soil wettability, aggregate stability, and the decomposition of soil organic matter. *Geoderma*, 128: 80-93.
- Guggenberg, G., Zech, W., Schulten, H.R.(1994) Formation and mobilization pathways of dissolved organic matter: evidence from chemical structural studies of organic matter fractions in acid forest floor solution. *Org. Geochem.*, 21: 51-66.
- Hager, A., Debus, G., Edel, H.G., Stransky, H., Serrano, R. (1991) Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H⁺-ATPase. *Planta*, 185: 527-537.
- Hair, J.F., Anderson, R.E. Tatham, R.L., Black, W.C. (2005) *Análise Multivariada de Dados*. 5. ed. Porto Alegre, Bookman.
- Hait S., Tare V. (2011) Vermistabilization of primary sewage sludge. *Bioresource Technology*, 102 : 2812-2820.
- Hardyck, C., Petrinovich, L., Goldman, R. (1976) Lefthandedness and cognitive deficit. *Cortex*, 12: 266-279.

- Hartenstein, R., Neuhauser, E.F., Kaplan, D.L. (1979) Reproductive potential of the earthworm *Eisenia foetida*. *Oecologia*, 43: 329-340.
- Hatcher, P.G. (1987) Chemical structure studies of natural lignin by dipolar dephasing solid-state ^{13}C nuclear magnetic resonance. *Org. Geochem.*, 11, 31-39.
- Hotelling, H. (1933). Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology*, 24: 417-441.
- Hottz-Rima J. A., Martim S. A., Dobbss L. B., Medeiros J.A. E., Retamal C. A., Façanha A. R., Canellas L.P. (2011) Adição de ácido cítrico potencializa a ação de ácidos húmicos e altera o perfil protéico da membrana plasmática em raízes de milho. *Ciência Rural*, 41 (4): 614-620.
- Huang, P.M., Hardie, A.G. (2009) Formamation mechanisms of humic substances in the environment. In: Senesi, N., Xing, B., Huang, P.M. (eds). *Biophysical-chemical Process involving natural nonliving organic matter in environmental systems Wiley-IUPAC*, New Jersey,p.41-110.
- Inbar, Y., Chen, Y., Hadar, Y. (1990) Humic substances formed during the composting of organic matter. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 54: 1316-1323.
- Inbar, Y., Chen, Y., Hadar, Y. (1989) Solid state C-13 nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopy of composted organic matter. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 53: 1695-1701.
- Jahn, T., Baluska, F., Michalke, W., Harper, J.F., Volkman, D. (1998) Plasma membrane H^+ -ATPase in the root apex: Evidence for strong expression in xylem parenchyma and asymmetric localization within cortical and epidermal cells. *Physiologia Plantarum*, 104: 311-316.

- Janos, P. (2003) Separation methods in the chemistry of humic substances. *J. of Chromatogr. A.*, 983: 1-18.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. (1987) GUS fusions::B-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, 6: 3901-3907.
- Jimenez, E.I., Garcia, V.P. (1992) Determination of maturity indices for city refuse composts. *Agric. Ecosystems Environ.*, 38: 331-343.
- Johnson, C.E., Smernik, R.J., Siccama, T.G., Kiemle, D.K., Xu, Z., Vogt, D.J., (2005) Using ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy for the study of northern hardwood tissues. *Canadian Journal of Forest Research*, 35: 1821-1831.
- Kale, R.D., Mallesh, B.C., Bano, K., Bagyaraj, D.J. (1992) Influence of vermicompost application on the available macronutrients and selected microbial populations in a paddy fields. *Soil Biol. Biochem.*, 24: 1317-1320.
- Kaplan, D.L., Hartenstein, R., Neuhauser, E.F., Malecki, M.R. (1980) Physico-chemical requirement in the environment of the earthworm *Eisenia foetida*. *Soil Boil. Biochem.*, 12: 347-352.
- Kaushik, P., Garg, V.K. (2003) Vermicomposting of mixed solid textile mill sludge and cow dung with the epigeic earthworm *Eisenia foetida*. *Bioresour. Technol.*, 90: 311-316.
- Kleber, M. Sollins, P., Sutton, R. (2007) A conceptual model of organo-mineral interactions in soils:self-assembly of organic molecular fragments into zonal structures on mineral surfaces. *Biogeochemistry*, 85: 9-24.
- Kögel-Knaber, I. (2000) Analytical approaches for characterizing soil organic matter. *Org. Geochem.*, 31:609-625.

- Kononova, M. M. (1966) *Soil Organic Matter, its Nature, its Role in Soil Formation and in Soil Fertility*, 2 ed. Pergamon, New York, p. 544.
- 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.
- Landgraf, M.D., Alves, M.R., Da Silva, S.C., Rezende, M.O.D. (1999) Characterization of humic acids from vermicompost of cattle manure composting for 3 and 6 months. *Quim. Nova*, 22: 483-486.
- Lutzow, M. V., Kogel-Knabner, I., Ekschmitt, K., Matzner, E., Guggenberger, G., Marschner, B., Flessa, H. (2006) Stabilization of organic matter in temperate soils: mechanisms and their relevance under different soil conditions: a review. *European J. of Soil Science*, 57: 426- 445.
- Martin, A. J. P., Syngé, R. L. M. (1941) Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. *Biochem. J.*, 35: 1359.
- Masciandaro, G., Ceccanti, B., Garcia, C. (1999) Soil agroecological management: fertirrigation and vermicompost treatments. *Biores. Technol.*, 59: 199-206.
- Mitchell A., Edwards, C.A. (1997) The production of vermicompost using *Eisenia fetida* from cattle manure. *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 3-4.
- Möller, A., Kaiser, K., Zech, W. (2002) Lignin, carbohydrate, and amino sugar distribution and transformation in the tropical highland soils of northern Thailand under cabbage cultivation, Pinus reforestation, secondary forest, and primary forest. *Australian Journal of Soil Research*, 40: 977-998.
- Morel, J.L., Jacquin, F., Guckert, A., Barthel, C. (1979) Contribution a la détermination de tests de la maturité des composts urbains. *Compte-rendu de*

fin de contrat no. 75–124. Ministère de l'Environnement et du Cadre de Vie, Ensaia, Nancy.

- Morsomme, P., Boutry, M. (2000) The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica*, 1465: 1-16.
- Muscolo, A., Nardi, S. (1997) Auxin or auxin-like activity of humic matter. In: Drozd, J., Gonet, S.S., Senesi, N., Weber, J. (eds.), *The Role of Humic Substances in the Ecosystems and Environmental Protection*. Polish Society of Humic Substances, Wrocław, Poland, 987-992.
- Muscolo, A., Cutrupi, S., Nardi, S. (1998) IAA detection in humic substances. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 1199-1201.
- Muscolo, A., Bovalo, F., Gionfriddo, F., Nardi, S. (1999) Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. *Soil Biol. Biochem.*, 31: 1303-1311.
- Muscolo A., Sidari M., Attina E., Francioso O., Tugnoli V. e Nardi S. (2007) Biological activity of humic substances is related to their chemical structure. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 71:75-85.
- 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., Concheri, G., Dell'agnola, G. (1996) Biological activity of humus. In. Piccolo, A. (ed.), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier, New York, p. 361-40.

- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello, A. (2002) Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 1527-1536.
- 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.
- Nardi, S., Carletti, P., Pizzeghello, D., Muscolo, A. (2009) Biological activities of humic substances. In: Senesi, N., Xing, B., Huang, P.M. (eds). *Biophysical-chemical Process involving natural nonliving organic matter in environmental systems Wiley-IUPAC*. New Jersey, 305-341.
- Nebbio A., Piccolo A., Spaccini, R. (2011) Basis of a Humeomics Science: Chemical Fractionation and Molecular Characterization of Humic Biosuprastructures. *Biomacromolecules*, 12: 1187-1199.
- Nowick J. S., Cao T., Noronha G. (1994) Molecular Recognition between Uncharged Molecules in Aqueous Micelles. *J. Am. Chem. Soc.*, 116 (8): 3285-3289.
- Olivares, F.L. Bactérias promotoras de crescimento vegetal. (2009) *Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, 33-34.
- Orlov, D. S. (1998) Organic substances of Russian soils. *Eurasian Soil Science*, 31: 946-953.
- Pandey, A., Socol, C.R., Nigam, P., Socol, V.T. (2000) Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 74: 69-80.

- Pearson, K. (1901). On lines and planes of closest fit to points in space. *Philosophical Magazine*, 2: 559-572.
- Peuravuori, J., Pihlaja, K. (2007) Advanced TMAH and TMAAc thermochemolysis-pyrolysis techniques for molecular characterization of size-separated fractions from aquatic dissolved organic matter. *Anal. Bioanal.*, 389:475-491.
- 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., (1996) Humus and soil conservation. In: Piccolo, A. (Ed.), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier, Amsterdam, p. 225-264.
- Piccolo, A. (2002). The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. Adv. In: *Agron.*, 75: 57-133.
- Piccolo, A., 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 PYRGC- MS and ¹H-NMR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.*, 36: 76-84.
- 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.
- Plaza, C. Senesi, N. (2009) The effects of organic matter amendment on native soil. In: Senesi, N., Xing, B., Huang, P.M. (eds). *Biophysical-chemical Process*

involving natural nonliving organic matter in environmental systems Wiley-IUPAC, New Jersey, 147-182.

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

Raphael, K., Velmourougane, K. (2011). Chemical and microbiological changes during vermicomposting of coffee pulp using exotic (*Eudrilus eugeniae*) and native earthworm (*Perionyx ceylanesis*) species. *Biodegradation*, 22: 497–507.

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

Reeh, U. (1992) Influence of population densities on growth and reproduction of the earthworm *Eisenia andrei* on pig manure. *Soil Biol. Biochem.*, 24: 1327-1331.

Regazzi, A. J. (2001) *Análise multivariada*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas. Departamento de Informática, 166p. Apostila de disciplina.

Ribeiro, D. (1998) O processo civilizatório: Etapas da evolução sociocultural. Companhia das letras, São Paulo.

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

- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Vaes, K., Klammer, S., De Clercq, D., Coosemans, J., Insam, H., Swings, J. (2003). A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Annals of Microbiology*, 53(4): 349-410.
- Sahni, S., Sarma, B.K., Singh, D.P., Singh, H.B., Singh, K.P. (2008) Vermicompost enhances performance of plant growth-promoting rhizobacteria in *Cicer arietinum* rhizosphere against *Sclerotium rolfsii*. *Crop Protection*, 27: 369-376.
- Sánchez Gómez, T. (2009). Caracterización microbiológica del proceso de compostaje a partir de residuos azucareros. *Agronomía Trop.*, 59 (3): 309-316.
- Sen, B., Chandra, T.S. (2007) Chemolytic and solid-state spectroscopic evaluation of organic matter transformation during vermicomposting of sugar industry wastes. *Bioresource Technology*, 98: 1680-1683.
- Sierra, M.M.D., Giovanela, M., Parlanti, E., Soriano-Sierra, E.J. (2006) 3D-fluorescence spectroscopic analysis of HPLC fractionated estuarine fulvic and humic acids. *J. Braz. Chem. Soc.*, 17: 113-124.
- Silva, C.A., Anderson, S.J., Guilherme, L.R.G. (2000) Uso da cromatografia de exclusão por tamanho na caracterização de substâncias húmicas de Latossolo Vermelho-Escuro sob efeito da calagem. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 24: 495-503.
- Simpson, A. J., Lefebvre, B., Moser, A., Williams, A., Larin, N., Kvasha, M., Kingery, W. L., Kelleher, B. (2004) Identifying residues in natural organic matter through spectral prediction and pattern matching of 2D NMR datasets. *Magn. Reson. Chem.*, 42: 14-22.

- Singh, R.B. (2000) Conseqüências ambientais de desenvolvimento agrícola: um estudo de caso do estado da Revolução Verde Haryana , Índia .*Agricultura, Ecosystemas e Meio Ambiente*, 82: 97-103V.
- Šmejkalová, D., Piccolo, A. (2008) Aggregation and disaggregation of humic supramolecular assemblies by NMR diffusion ordered spectroscopy (DOSYNMR). *Environ. Sci. Technol.*, 42: 699-706.
- Sollins, P., Homann, P., Caldwell, B. A. (1996) Stabilization and destabilization of soil organic matter: mechanisms and controls. *Geoderma*, 74: 65-105.
- Spaccini, R., Piccolo, A., Haberhauer, G., Gerzabek, M.H. (2000) Transformation 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. *European Journal of Soil Science*, 51: 583-594.
- Spaccini, R., Piccolo, A., Conte, P., Haberhauer, G., Gerzabek, M.H. (2002) Increased soil organic carbon sequestration through hydrophobic protection by humic substances. *Soil Biol. and Biochem*, 34: 1839-1851.
- Spaccini, R., Piccolo, A. (2007) Molecular characterization of compost at increasing stages of maturity. 2. Thermochemolysis-GC-MS and ^{13}C -CPMASNMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 2303-2311.
- Spaccini, R. e Piccolo A. (2009) Molecular characteristics of humic acids extracted from compost at increasing maturity stages. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 1164-1172.
- Stevenson, J.F. (ed.) (1994) *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd ed., New York: John Wiley e Sons INC., 496p.

- Sugara, K., Inoko, A. (1981) Composition analysis of humus and characterization of humic acid obtained from city refuse compost. *Soil Sci.and Plant Nutr.*, 27: 213-24.
- Sullivan, L.A. (1990) Soil organic matter, air encapsulation and water stable aggregation. *J. Soil Sci.*, 41: 529-534.
- Suthar, S. (2008) Bioconversion of post harvest crop residues and cattle shed manure into value-added products using earthworm *Eudrilus eugeniae* Kinberg. *Ecological Engineering*, 32: 206-214.
- Szczecz, M.M. (1999) Supressiveness of vermicompost against fusarium wilt of tomato. *J. Phytopathol.*, 147: 155-161.
- Talashilkar, S.C., Bhangrath, P.P., Mehta, V.P. (1999) Changes in chemical properties during composting of organic residues as influenced by earthworm activity. *J. Indian Soc. Soil Sci.*, 47: 50-53.
- Trevisan S., Pizzeghello, D., Ruperti, B., Francioso, O., Sassi, A., Palme, K., Quaggiotti, S., Nardi, S. (2009) Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in Arabidopsis. *Plant Biol.*, 12: 604-614.
- Vaughan, D., Malcolm, R.E. (1985) Influence of humic substances on growth and physiological processes. In: Vaughan, D., Malcolm, R.E. (Eds.), *Soil Organic Matter and Biological Activity*. Martinus-Nijhoff, Boston, MA, USA, 37-75.
- Vicini, Lorena (2005) *Análise multivariada da teoria à prática*. Santa Maria : UFSM, CCNE, p.215 .
- Vinceslas-Akpa M., Loquet M. (1997) Organic matter transformations in lignocellulosic waste products composted or vermicomposted (*Eisenia fetida*

- andrei): Chemical analysis and ^{13}C CPMAS NMR spectroscopy. *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 751-758.
- Visser, S.A. (1987) Effect of humic substances on mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation. *Sci. Total Environ.*, 62:347-354.
- Wilson, M.A., (1987) NMR Techniques and Applications in Geochemistry and Soil Chemistry. *Pergamon Press*.
- Wolters, V. (2000) Invertebrate control of soil organic matter stability. *Biol Fertil Soils.*, 31:1-19.
- Xiaowei Li, Xing M., Yang J., Huang Z. (2011) Compositional and functional features of humic acid-like fractions from vermicomposting of sewage sludge and cow dung. *Journal of Hazardous Materials*, 185 : 740-748.
- Zaller, J.G., (2007) Vermicompost as a substitute for peat in potting media: effects on germination, biomass allocation, yields and fruit quality of three tomato varieties. *Sci. Hortic.*, 112: 191-199.
- Zancani, M., Petrusa, E., Krajnáková, 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.
- Zhang, X., Amelung, W. (1998) Gas chromatographic determination of muramic acid, glucosamine, amine, and galactosamine in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 28: 1201-1206.