

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus globulus* E ÁCIDOS HÚMICOS:
ATIVIDADE BIOLÓGICA SOBRE PLÂNTULAS DE *Stylosanthes*
(Leguminosae)**

ANDRÉ LUIZ PAIER BARROSO

VILA VELHA
FEVEREIRO / 2016

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus globulus* E ÁCIDOS HÚMICOS:
ATIVIDADE BIOLÓGICA SOBRE PLÂNTULAS DE *Stylosanthes*
(Leguminosae)**

Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecosistemas, para a obtenção grau de Mestre em Ecologia de Ecosistemas.

ANDRÉ LUIZ PAIER BARROSO

VILA VELHA
FEVEREIRO / 2016

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

B277o Barroso, André Luiz Paier.
Óleo essencial de *Eucalyptus globulus* e ácidos húmicos:
atividade biológica sobre plântulas de *Stylosanthes*
(Leguminosae) / André Luiz Paier Barroso. – 2016.
46f.: il.

Orientador: Leonardo Barros Dobbss.
Co-orientador: Marco Pittarelo
Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ecossistemas) –
Universidade Vila Velha, 2016.
Inclui bibliografias.

1. Ecologia. 2. Eucalipto. I. Dobbss, Leonardo Barros.
II. Pittarelo, Marco. III. Universidade Vila Velha. IV. Título.

CDD 577

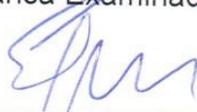
ANDRÉ LUIZ PAIER BARROSO

ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus globulus* E ÁCIDOS HÚMICOS:
ATIVIDADE BIOLÓGICA SOBRE PLÂNTULAS DE *Stylosanthes*
(Leguminosae)

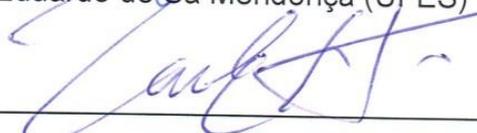
Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção grau de Mestre em Ecologia de Ecossistemas.

Aprovada em 29 de fevereiro de 2016,

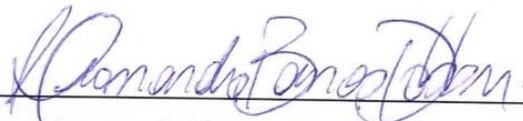
Banca Examinadora:



Eduardo de Sá Mendonça (UFES)



Carlos Eduardo Tadokoro (UWV)



Leonardo Barros Dobbss (UWV)

Orientador

LISTA DE ABREVIATURAS

SH - Substâncias húmicas

AF - Ácido fúlvico

AH - Ácido húmico

OE - Óleos essenciais

OEE - Óleo essencial de eucalipto

AH+OEE - tratamento com as melhores concentrações encontradas de AH e OEE.

RESUMO

BARROSO, André Paier, M.Sc., Universidade Vila Velha - ES, fevereiro de 2016.
Óleo essencial de *Eucalyptus globulus* e ácidos húmicos: atividade biológica sobre plântulas de *Stylosanthes* (Leguminosae).

Orientador: Leonardo Barros Dobbss. Co-orientador: Marco Pittarelo.

O uso de bioestimulantes é benéfico não somente para o crescimento das plantas, mas também para a proteção contra o ataque de patógenos, a formação de simbioses e a multiplicação de organismos importantes para microbiota do solo. Esses componentes possuem usos em diferentes áreas do conhecimento: comercial, ecológico e agrícola. Existe um foco grande na descoberta de novas alternativas para a recuperação de solos e áreas degradadas no geral, que utilizem alternativamente recursos naturais e renováveis, tais como os bioestimulantes. Este estudo avaliou o uso combinado da fração dos ácidos húmicos (AH) extraídos de vermicomposto e óleo essencial de folhas de *Eucalyptus globulus* (OEE), por meio de seus efeitos em combinação e isoladamente sobre a atividade biológica de plântulas de *Stylosanthes*. A extração dos AH de vermicomposto foi feita de acordo com o protocolo desenvolvido pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas e o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* foi adquirido comercialmente. Cada bioestimulante vegetal foi analisado isoladamente através de ensaios preliminares com diferentes concentrações, avaliando-se características relacionadas ao crescimento vegetal de *Stylosanthes*. Após a obtenção das melhores concentrações para o AH (3,14 mM C L⁻¹) e para o OEE (48,0 µL), os efeitos de cada bioestimulante foram avaliados tanto individualmente quanto em combinação (AH+OEE), sobre o crescimento, fisiologia e estimativa da atividade da H⁺-ATPase das plântulas de *Stylosanthes*. Todos os bioestimulantes promoveram efeitos benéficos sobre os diversos parâmetros avaliados. O AH se destacou particularmente em promover o crescimento do número, comprimento e densidade de raízes laterais (65%, 237% e 72%, respectivamente), além do crescimento da área radicular total (69% de aumento). A combinação AH+OEE gerou os maiores benefícios em todos os parâmetros fisiológicos medidos (sendo estes aumentos na: taxa fotossintética líquida 13%, transpiração vegetal 47%, rendimento quântico 10%, índice de SPAD 9%, condutância estomática 77% e relação carbono interno/externo 30%). AH+OEE foi, também, responsável pelos maiores aumentos sobre a estimativa da atividade da H⁺-ATPase, onde a acidificação das soluções de meio mínimo e a estimativa da extrusão de H⁺ atingiram valores altamente expressivos ao longo de 140 minutos. Os resultados encontrados mostraram que existe um interacionismo benéfico entre os bioestimulantes testados e, portanto, se pode afirmar que a combinação de AH+OEE gerou benefícios concretos sobre as características avaliadas em plântulas de *Stylosanthes*, visando seu emprego futuro na recuperação de áreas degradadas.

PALAVRAS-CHAVE: bioestimulantes, crescimento vegetal, fisiologia e H⁺-ATPase.

ABSTRACT

BARROSO, André Paier, M.Sc., Universidade Vila Velha - ES, fevereiro de 2016.
***Eucalyptus globulus* essential oil and humic acids: biological activity on *Stylosanthes* (Leguminosae) seedlings.**

Orientador: Leonardo Barros Dobbss. Co-orientador: Marco Pittarelo.

The use of bio-stimulants is beneficial for not only plant growth, but also to protect against pathogen attack, forming symbioses and multiplication of organisms important to soil microbes. These components have uses in different areas of knowledge: commercial, ecological and agricultural. There is a strong focus on finding new alternatives for the recovery of soils and degraded areas in general, which alternatively utilize natural and renewable resources such as bio-stimulants. This study evaluated the combined use of the humic acids fraction (HA) extracted from vermicompost and essential oil from *Eucalyptus globulus* leaves (EEO), through its effects in combination and individually on the biological activity of *Stylosanthes* seedlings. The extraction of humic acids from vermicompost was made according to the protocol developed by International Humic Substances Society and the essential oil of *Eucalyptus globulus* leaves was purchased commercially. Each plant bio-stimulant was examined individually by preliminary tests with different concentrations, evaluating characteristics related to the growth of *Stylosanthes*. After obtaining the best concentration for HA (3,14 mM C L⁻¹) and for EEO (48,0 µL), the effects of each bio-stimulant was evaluated both individually and in combination (HA+EEO), over growth, physiology and the estimated activity of H⁺-ATPase of *Stylosanthes* seedlings. All bio-stimulants promoted beneficial effects on the different parameters measured. The HA particularly excelled in promoting growth of number, length and density of lateral roots (65%, 237% and 72%, respectively), and growth of total root area (69% increase). The combination HA+EEO generated the greatest benefits in every physiological parameter measured (the following increases were: net photosynthetic rate 13%, plant transpiration 47% quantum yield 10%, SPAD index 9%, stomatal conductance 77% and internal/external carbon relation 30%). HA+EEO was, also, responsible for the greatest increases over the estimated activity of H⁺-ATPase, wherein the acidification of the minimal medium solution and the estimation of H⁺ extrusion reached highly expressive values over 140 minutes. The results showed that there is a beneficial interactionism between the tested bio-stimulants and, therefore, it can be said that the combination of HA+EEO generated concrete benefits over the characteristics evaluated in *Stylosanthes* seedlings, aiming for future employment in the recovery of degraded areas.

KEY WORDS: bio-stimulants, plant growth, physiology and H⁺-ATPase.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. Introdução	8
2. Fundamentação Teórica	10
2.1 O gênero <i>Stylosanthes</i>	10
2.2 Bioestimulantes vegetais, os OE e o OEE	11
2.3 Bioestimulantes vegetais, as SH e a fração dos AH	13
2.4 Bioestimulantes e <i>Stylosanthes</i> na recuperação de áreas degradadas	14
3. Material e Métodos	17
3.1 Obtenção dos ácidos húmicos de vermicomposto (AH)	17
3.2 Obtenção do óleo essencial de Eucalipto	17
3.3 Condições de germinação e cultivo	17
3.4 Ensaios preliminares de concentrações para AH	17
3.5 Ensaio preliminar para obtenção da melhor dose de OEE	18
3.6 Combinação das melhores concentrações de AH+OEE	19
3.7 Avaliação dos biestimulantes quanto ao crescimento radicular de plântulas de <i>Stylosanthes</i>	20
3.8 Avaliação dos biestimulantes quanto aos parâmetros fisiológicos de plântulas de <i>Stylosanthes</i>	21
3.8.1 Trocas gasosas	21
3.8.2 Fluorescência da clorofila	22
3.8.3 Conteúdo de clorofila	22
3.9 Medida de acidez em solução possivelmente associada à atividade das SH sobre as H ⁺ -ATPases	22
3.10 Delineamento experimental e análise estatística	23
4. Resultados e Discussão	24
4.1 Ensaio de concentrações ótimas	24
4.2 Efeitos sobre a biometria das raízes de <i>Stylosanthes</i>	25
4.3 Efeitos sobre a fisiologia de <i>Stylosanthes</i>	28
4.4 Efeito sobre a estimativa da atividade da ATPase	31
5. Conclusões	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

Nos anos recentes, o uso de bioestimulantes provenientes de diferentes fontes tem aumentado consideravelmente (Romero *et al.*, 2007; Parrado *et al.*, 2008; García-Martínez *et al.*, 2010). Estes produtos incluem uma gama de substâncias como as substâncias húmicas da matéria orgânica (SH) e os mais diversos óleos essenciais (OE) (produtos derivados do metabolismo secundário vegetal). Muitas áreas do conhecimento têm se beneficiado da utilização de metabolitos secundários, ou OE, extraídos de diferentes espécies vegetais (Ferreira e Áquila, 2000; Serafini e Cassel, 2001). Os OE possuem odor forte e característico, são voláteis e, normalmente, estão concentrados em determinadas partes do vegetal, como por exemplo: folhas, caules, flores ou frutos (Conner, 1993). De acordo com a literatura, estima-se que cerca de 3000 OE são conhecidos, dos quais 300 são importantes comercialmente e utilizados, principalmente, por seus sabores e fragrâncias (Burt, 2004). Entre os muitos OE utilizados estão aqueles provenientes de espécies vegetais do gênero *Eucalyptus* (OEE) que pertence à família Myrtaceae, englobando cerca de 140 gêneros e 3800 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (Ali *et al.*, 2011).

Outro bioestimulante que vem ganhando atenção crescente nos últimos anos são as substâncias húmicas (SH), que são o principal componente da matéria orgânica e estão presentes em qualquer material orgânico tanto em ambientes terrestres como aquáticos. De acordo com a visão tradicional, as SH foram descritas como sendo macromoléculas heterogêneas e orgânicas, possuindo cor escura, resultante do metabolismo de microrganismos (Aiken *et al.*, 1985). Porém um novo conceito foi formulado (Piccolo, 2002) para as SH com base na química de supramoléculas, baseada em dados cromatográficos e espectroscópicos (Piccolo *et al.*, 1996; Simpson, 2002; Piccolo e Spiteller, 2003), resultando em uma definição mais recente para a provável estrutura dessas substâncias. Este conceito define um arranjo supramolecular, de diversas moléculas orgânicas de tamanho comparativamente pequeno, gerando agregados ligados por ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas fracas, de massa molecular elevada e extremamente suscetível a mudanças de acordo com o meio de reação. O fracionamento químico da matéria orgânica leva a obtenção de três principais frações húmicas: ácidos fúlvicos (AF), ácidos húmicos (AH) e huminas. Os AH, um dos bioestimulantes

utilizados nesse trabalho, possuem grande massa molecular, estruturas complexas e pouca solubilidade em água (Qualls, 2004), desta forma são grandes associações com preferência e predominância de compostos hidrofóbicos e tendem a permanecer estabilizados em pH neutro por interações hidrofóbicas dispersivas (Piccolo, 2002).

A espécie alvo utilizada no presente estudo, a *Stylosanthes*, é um gênero de leguminosas forrageiras amplamente distribuído e naturalmente presente em regiões tropicais e subtropicais das Américas, África e sudeste da Ásia (Williams *et al.*, 1984). Sendo *S. guinensis*, *S. humilis* e *S. capitata* as espécies mais importantes desse gênero e largamente aplicadas em muitos sistemas agrícolas (Grof *et al.*, 1979; Costa e Ferreira, 1984; Edye, 1987). Muitos autores já estudaram o efeito de AH sobre plantas leguminosas, principalmente a soja e observaram que esse bioestimulante é capaz de aumentar a nodulação radicular desta espécie, favorecendo a fixação biológica de nitrogênio (Tan e Tantiwiranond, 1983), bem como outros verificaram que a utilização de extratos e óleos essenciais de plantas vem sendo uma alternativa eficiente no bioestímulo do crescimento vegetal (Parrado *et al.*, 2007; Ludley *et al.*, 2009; Steffen *et al.*, 2010), porém, não existem na literatura estudos que envolvam o efeito de AH e OE sobre o crescimento de plantas de leguminosas forrageiras destinadas para a recuperação de áreas degradadas.

Portanto, de acordo com o exposto, a hipótese metodológica dessa dissertação é de que os bioestimulantes utilizados tanto em combinação quanto isoladamente proporciona incrementos tanto sobre o crescimento, quanto sobre a fisiologia e a estimativa da atividade da ATPase, pela acidificação do meio de cultivo, em plântulas de *Stylosanthes*, que posteriormente poderão ser inseridas em áreas de solos degradados, visando sua posterior recuperação. Dito isso, o objetivo geral do presente trabalho foi testar os efeitos dos ácidos húmicos isolados de vermicomposto (AH), o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* (OEE) e da combinação entre eles (AH+OEE), sobre a bioatividade de plântulas de *Stylosanthes*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 O gênero *Stylosanthes*

As distribuições de muitas espécies de *Stylosanthes* já foram caracterizadas através do Sistema de Informações Geográfico (GIS) (Sawkins, 1999) em diferentes continentes como África e Oceania (Figura 1). Certas espécies formam variantes que, normalmente, se concentram em certas regiões ou países, como no caso de *S. humilis* que apresenta variações únicas na região do México (Vander Stappen *et al.*, 2000). De forma similar, *S. scabra* foi introduzida no nordeste do Brasil (Burt *et al.*, 1979) e hoje já possui representação expressiva na região. Mais de 600 caracteres genéticos foram detectados para *S. scabra* em todo o mundo, sendo que 90% deles se concentram no Brasil (Schultze Kraft *et al.*, 1984).

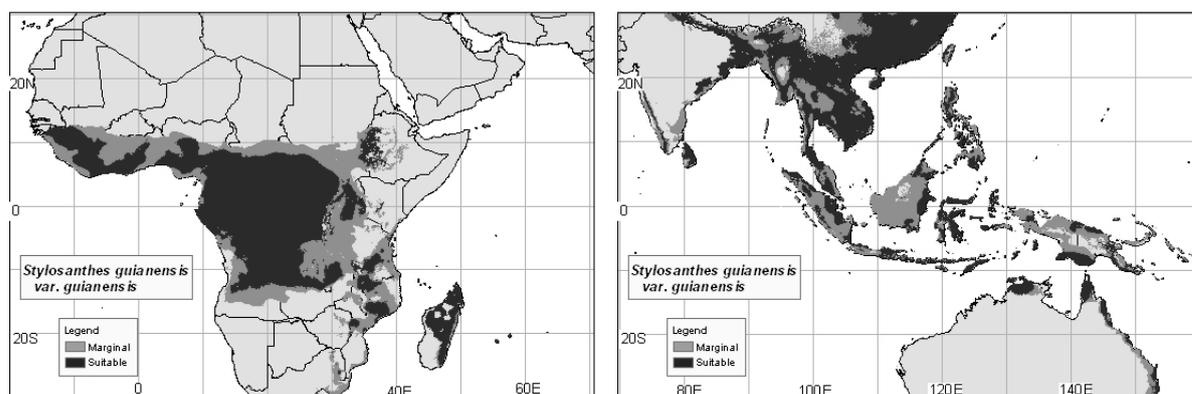


Figura 1. Distribuição geográfica de *Stylosanthes guianensis* no continente Africano e Oceania, onde cinza claro (■) mostram condições de crescimento aceitáveis e preto (■) exibem áreas onde o crescimento é ideal.

Fonte: http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Stylosanthes_guianensis_var._guianensis.htm

Por pertencerem à família leguminosae, o gênero *Stylosanthes* possui espécies que fazem eficientemente bem a fixação biológica de nitrogênio (FBN), como é o caso de *Stylosanthes guianensis* (Figura 2). A liberação do N fixado pelas plantas para o solo, numa associação simbiótica com bactérias do gênero *Rizobium*, geralmente é determinada pelas condições ambientais e características químicas e físicas do próprio ecossistema em questão (Cadisch e Giller, 1997).



Figura 2. Desenho representativo da espécie *Stylosanthes guianensis* (Aublet) Swartz (família leguminosae), destacando o ramo de floração (1) e o fruto (2).
Fonte: http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Stylosanthes_guianensis_var._guianensis.htm

Com relação a esse fato, plantas da família leguminosae ganham destaque quando se diz respeito à recuperação de solos degradados ou em processo de degradação pela sua capacidade de fixar o N atmosférico e acumulá-los nos tecidos vegetais, devolvendo dessa maneira, uma maior quantidade de N para o sistema solo. Muitos estudos vêm mostrando que a liberação de N está relacionada com a relação entre Carbono e Nitrogênio (C:N) presente nos resíduos orgânicos (Herman *et al.*, 1977; Thomas e Asakawa, 1993), pois dependendo do conteúdo de N nos tecidos vegetais das plantas, os gastos posteriores com adubações nitrogenadas podem ser significativamente diminuídos.

2.2 Bioestimulantes vegetais, os OE e o OEE

Os bioestimulantes vegetais podem ser encontrados facilmente no meio ambiente, oriundos diretamente do solo, vindos da decomposição da matéria orgânica vegetal e até mesmo das plantas *in natura*, como no caso dos OE. Uma das principais vantagens desses produtos inclui a sua absorção direta pelos vegetais, resultando em uma menor utilização de energia por parte das plantas para realizar este processo. Dessa forma, estes produtos não trazem somente benefícios

ao crescimento vegetal, mas também podem estimular o seu metabolismo energético, por exemplo, aumentando a atividade das bombas de prótons (Parrado *et al.*, 2007).

A extração de óleos essenciais é uma alternativa relativamente barata para tratamentos de infecções e cuidados gerais com a saúde, além de ser disponível em todo o mundo. Os óleos extraídos de diversas espécies do gênero *Eucalyptus* estão entre os mais estudados (Valéria *et al.*, 2015). As propriedades biológicas e farmacológicas do OE de *Eucalyptus* são reconhecidas e sua demanda é alta nas áreas cosméticas e medicinais, sendo que a maior parte do fornecimento e comércio dos OE recai sobre a espécie *Eucalyptus globulus* (Bajaj, 1995). Os OE possuem aplicações que vão de desodorantes, antisséptico, sedativo e estimulante, até tratamentos populares para artrite, diabete, diarreia, câncer, laringite e vários outros (Elliot e Jones, 1986). Além disso, o Brasil possui uma posição de destaque em relação à extração, comercialização, volume e qualidade do OEE produzido (Maffeis *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2006).

Eles também vêm sendo utilizados como agentes bioativos, exercendo o controle de doenças e até mesmo pragas que ameaçam espécies vegetais de interesse comercial (Delasquis *et al.*, 2002; Bonaldo *et al.*, 2004; Sandi e Blanco, 2007; Steffen *et al.*, 2008). Hoje em dia, sabe-se que o óleo essencial de eucalipto (OEE) pode gerar alelopatia a outras espécies de plantas (Cruz *et al.*, 2000; Goetze e Thomé, 2004), porém essa reação depende da concentração utilizada e de compostos específicos presentes. Dessa forma, torna-se importante conhecer os benefícios do OEE que, assim como outros bioestimulantes, quando utilizado em concentrações pequenas podem estimular o crescimento vegetal e aumentar a população de importantes microrganismos do solo (Blum, 1999).

Já existem pesquisas que confirmam a capacidade dos OE de algumas plantas (quando aplicados em baixas concentrações) de serem bioestimuladores do crescimento vegetal (Ludley *et al.*, 2009; Steffen *et al.*, 2010). Os OE podem não possuir importância nutricional para o crescimento da planta em si, porém ainda assim favorecem seu crescimento das mais variadas formas como, por exemplo, reforçando a resiliência a diferentes perturbações (Russo e Berlyn, 1990). Além disso, a literatura cita outros benefícios da utilização dos OE para o crescimento de fungos de interesse comercial (Zhi-Lin *et al.*, 2007) e para a manutenção dos ecossistemas (Ryabushkina, 2005).

2.3 Bioestimulantes vegetais, as SH e a fração dos AH

O aumento constante de pressões como o uso da terra e a degradação dos solos tropicais tem se tornado uma crescente preocupação. Logo, a descoberta de novas alternativas para a recuperação de áreas degradadas, pelos mais diferentes impactos, tem se tornado cada vez mais importante. Isso torna as substâncias consideradas bioestimulantes vegetais cada vez mais alvos de pesquisas com o intuito da produção de novas biotecnologias (Calvo *et al.*, 2014). Dentro deste quadro temos a crescente importância das SH (Figura 3), que são bioestimulantes com a capacidade comprovada de induzir o crescimento vegetal, contribuindo para a diminuição do uso extensivo de fertilizantes minerais, reduzindo assim, a preocupação quanto à exaustão dos recursos naturais (Ertani *et al.*, 2009; Kauffman *et al.*, 2005).

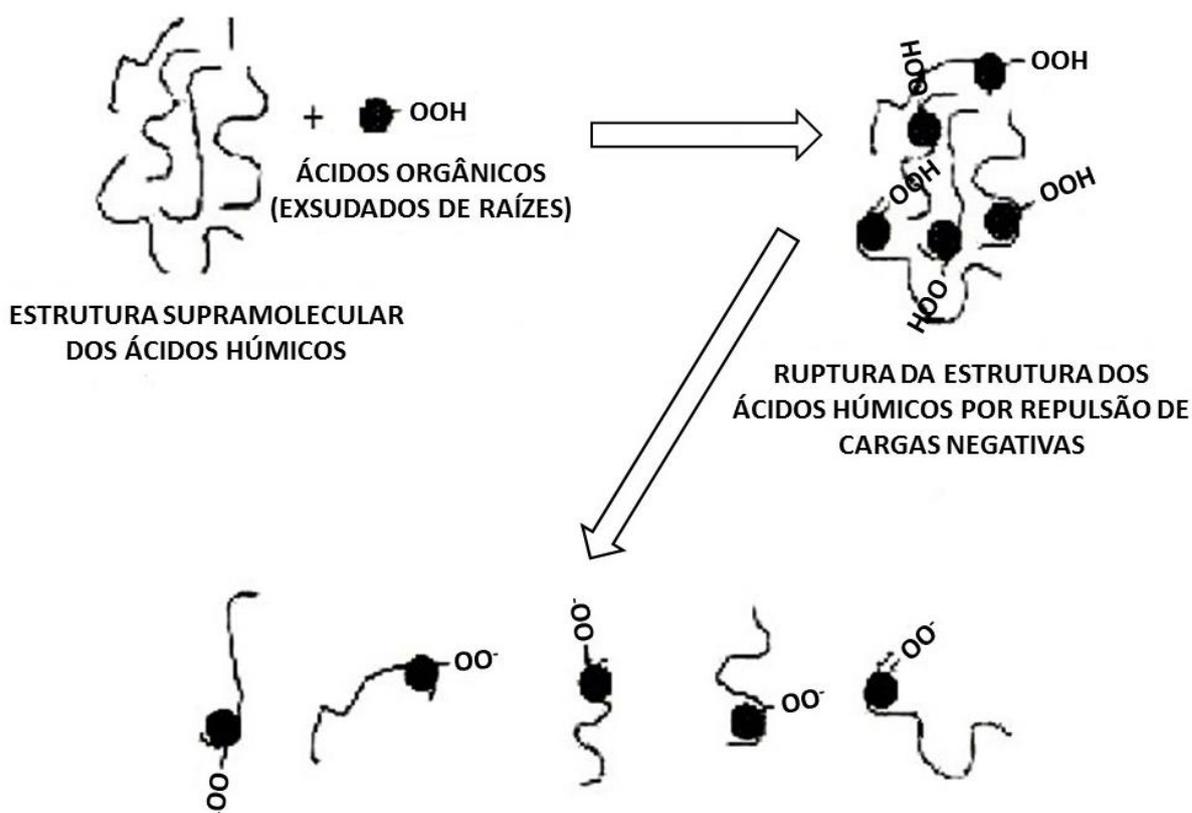


Figura 3. Modelo supra-estrutural para ácidos húmicos de acordo com Piccolo (1997).

Fonte: Adaptado do Livro Humosfera, tratado preliminar sobre a química de substâncias húmicas, página 52.

Além das SH incrementarem comprovadamente o crescimento vegetal (Stevenson, 1994) também já foi descrito que esses bioestimulantes atuam sobre o metabolismo bioquímico das mesmas, como descrito no trabalho de Façanha e

colaboradores (2002), que verificaram o estímulo na síntese da H⁺-ATPase de membrana plasmática (MP) em raízes de plântulas de café e milho tratadas com SH e Zandonadi e colaboradores (2007) que verificaram evidências do efeito sobre a atividade das bombas de prótons localizadas tanto na MP quanto no vacúolo promovidas pela fração AH, indicando que tais bombas são importantes marcadores bioquímicos da bioatividade das SH.

Outros autores postularam que subunidades estruturais dos AH poderiam acessar receptores na superfície ou no interior da MP das células das raízes, resultando no estímulo do crescimento. As SH são materiais biológicos muito versáteis devido a sua multifuncionalidade, grande gama de interações, atividade biológica e capacidade de acumular água (Nasir *et al.*, 2011; David *et al.*, 2014; Jindo *et al.*, 2012; Stevenson, 1994). Contudo, a abundância e distribuição especificamente da fração dos AH no solo afeta significativamente suas interações com uma ampla gama de outras substâncias (Machesky, 1993; Ritchie e Perdue, 2003; Plaza *et al.*, 2006), o que reforça a possibilidade de interações sinérgicas entre os AH e o OEE, além do fato de que ambas substâncias possuem grande afinidade apolar.

2.4 Bioestimulantes e *Stylosanthes* na recuperação de áreas degradadas

As SH podem ser extraídas diretamente do solo, porém existem outras fontes que podem gerar SH mais concentradas, como os vermicompostos. Estes são produtos da ação de compostagem realizada por minhocas do solo (*Eisenia foetida* Sav.), resultando em um material humificado de alta qualidade que pode ser utilizado na recuperação de solos (Vinceslas-Akpa e Louquet, 1997; Bajsa *et al.*, 2004). Isso é especialmente importante, já que o AH obtido de vermicomposto é, também de alta qualidade o que melhora sua bioatividade, estabilidade química e o torna mais eficiente na recuperação de ambientes degradados/antropizados (Benitez *et al.*, 2000; Senesi *et al.*, 2007).

Grande parte da atenção dos pesquisadores tem se voltado para as propriedades funcionais dos OE e algumas pesquisas já mostraram que eles exibem vários efeitos biológicos sobre o crescimento e desenvolvimento de plantas (Takahashi *et al.*, 2004). O uso dos OE como compostos funcionais em diversas áreas tem adquirido cada vez mais investimentos, seja por consumidores procurando por “produtos de origem natural” ou pela preocupação crescente na

utilização de compostos sintéticos que podem ser danosos (Sacchetti *et al.*, 2005) e, assim, evitar possíveis degradações ao ambiente. Por possuírem muitos compostos bioativos, os óleos essenciais são promissores para o uso como bactericidas, fungicidas e antioxidantes (Baratta *et al.*, 1998). Pesquisas mostram que alguns OE podem ser utilizados para melhorar o desenvolvimento de plantas, afetando seu crescimento de forma direta ou indireta (Mafia *et al.*, 2007), servindo, não apenas como nutriente para o crescimento, mas também melhorando seu vigor e sua resistência a condições adversas, como é o caso de áreas degradadas (Mafia *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2006).

Muitas espécies de *Stylosanthes* já são utilizadas como forrageiras para rotações de cultura, melhorando de forma significativa a fertilidade e conservação dos solos (Ramesh *et al.*, 1997), além de melhorar a fixação de N (Reddy *et al.*, 1989). O gênero *Stylosanthes* foi escolhido para utilização nesse estudo devido a seu reconhecido potencial como recuperador de solos (Carneiro *et al.*, 1999), além de ocorrerem em áreas com diferentes tipos de solos, incluindo os ácidos e de baixa fertilidade (Williams *et al.*, 1984) e possuir espécies mais resistentes a escassez de água (Chandra *et al.*, 2004). Dessa forma, este gênero pode ser considerado excelente para a recuperação de solos brasileiros, pelos mesmos serem naturalmente pouco férteis e muito intemperizados (Figura 4). Além disso, essa espécie produz uma grande quantidade de massa radicular (Maass e Sawkins, 2004), que é característica importante para que haja uma forte interação com bioestimulantes, visando à possibilidade de sua inserção em programas de recuperação de áreas degradadas ou em processo de degradação.

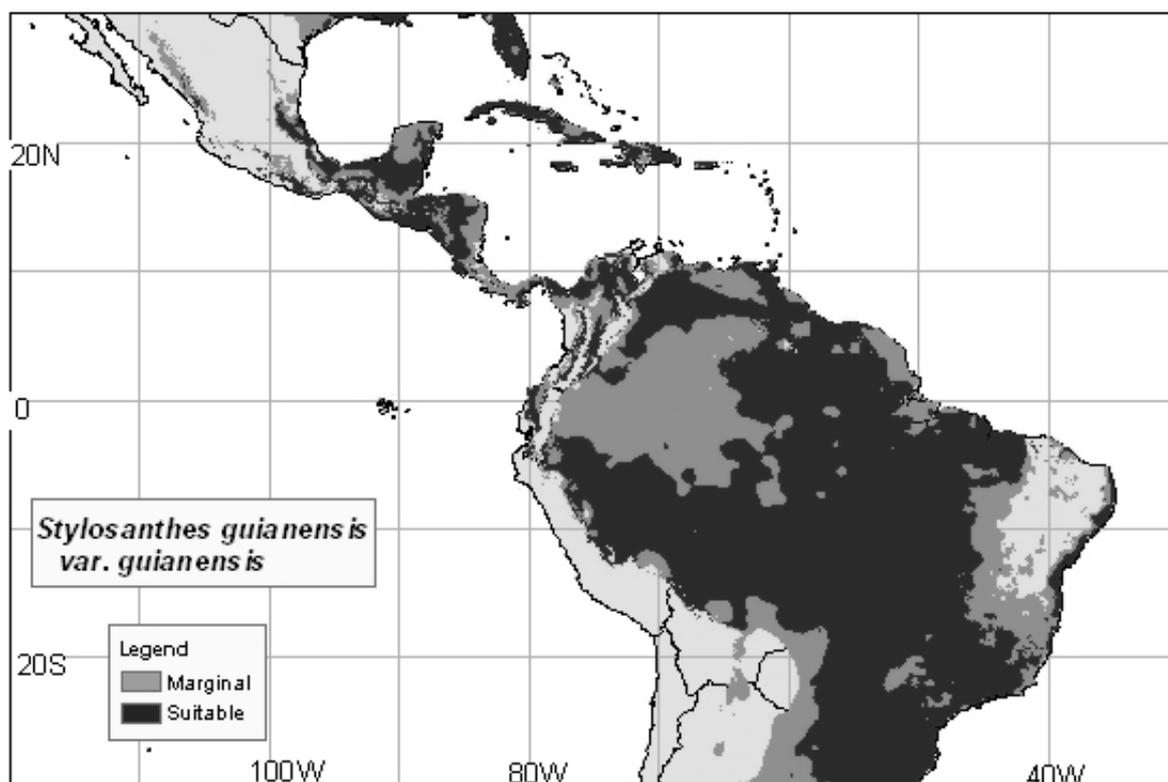


Figura 4. Distribuição geográfica de *Stylosanthes guianensis* na América Central e América do Sul incluindo boa parte do território brasileiro, onde cinza claro (■) mostram condições de crescimento aceitáveis e preto (■) exibem áreas onde o crescimento é ideal.

Fonte: http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Stylosanthes_guianensis_var._guianensis.htm

Plantas do gênero *Stylosanthes* possuem outras vantagens, como o crescimento rápido, grande fixação de biomassa, boa resistência a condições adversas, abundância de sementes e fácil cultivo, o que às tornam ótimas candidatas a serem empregadas em programas de recomposição da vegetação (Xingfeng *et al.*, 2010). Isso é especialmente importante já que grandes diferenças na produção e acumulação de massa durante o processo de sucessão primária podem ocorrer no mesmo ambiente florestal (Kellman, 1970; Snedaker, 1970; Tergas e Popenoe, 1971).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos ácidos húmicos de vermicomposto (AH)

O AH utilizado nos experimentos foi extraído no Laboratório de Ecologia da Matéria Orgânica (LEMO) da Universidade Vila Velha (UVV), seguindo o protocolo clássico desenvolvido pela Sociedade Internacional das Substâncias Húmicas (IHSS). Para tanto, foram utilizados 200 g de vermicomposto e 2000 mL de NaOH 0,1 mol L⁻¹ (relação vermicomposto:solvente de 1:10). O material foi agitado por um período de 12 horas e, posteriormente, o recipiente permaneceu em repouso. O extrato solúvel foi retirado por sifonação e teve o pH diminuído até 1-1,5 utilizando-se ácido clorídrico 6,0 mol L⁻¹. O material acidificado foi então centrifugado (3000 rpm por 30 min) para obtenção dos AH. Após a obtenção dos AH os mesmos foram lavados até teste negativo contra cloreto e purificados por meio de uma diálise contra água destilada utilizando-se membranas de 2000 Daltons. Após a diálise os AH foram liofilizados e submetidos à análise de composição elementar (CHN), onde se obteve o valor de carbono de 40,8%.

3.2. Obtenção do óleo essencial de Eucalipto

O OEE foi adquirido comercialmente do revendedor BioEssência (Fonte: <http://loja.bioessencia.com.br/index.html>), com garantias de que o OE distribuído é 100% puro, sem modificações ou adições e extraído de todas as partes das folhas de *Eucalyptus globulus* por destilação a vapor.

3.3. Condições de germinação e cultivo

Sementes de *Stylosanthes* foram germinadas em bandejas contendo areia autoclavada, e irrigada somente com água. Após a germinação, as bandejas foram regadas diariamente com água de forma que a areia estivesse sempre húmida, sendo cultivadas neste regime por 20 dias. Após o cultivo, plantas com padrões similares de crescimento (tanto das partes aéreas quanto das raízes) foram selecionadas para utilização nos experimentos a seguir.

3.4. Ensaios preliminares de concentrações para AH

Plântulas de *Stylosantes* com padrões similares de crescimento (1 par de folhas e aproximadamente 4 cm de raiz principal) foram selecionadas para a

montagem do experimento com o intuito de encontrar a concentração de AH que melhor estimulou o crescimento vegetal. Foi montado um sistema hidropônico (Figura 5), com aeração constante por intermédio de um micro aspersor, com as seguintes concentrações de AH: 0,0 (controle) 1,0; 3,0, 6,0 mM de C L⁻¹. Cada tratamento possuiu 3 vasos (réplicas), com 7 plantas por vaso, totalizando 21 plantas para cada tratamento, que cresceram neste regime por 20 dias. Após feita análise de regressão dos dados biométricos coletados, foram utilizados para a obtenção da melhor dose aqueles que obtiveram o modelo de regressão quadrático.



Figura 5. O sistema hidropônico utilizado nos ensaios preliminares de concentrações para ácidos húmicos com plantas de *Stylosanthes*, mostrando as réplicas de todos os tratamentos e o sistema de aeração através de microaspersores.

3.5. Ensaio preliminar para obtenção da melhor dose de OEE

Plântulas de *Stylosanthes* com padrões similares de crescimento (1 par de folhas e aproximadamente 4 cm de raiz principal) foram selecionadas para a montagem do experimento com o intuito de encontrar a dose de OEE que melhor estimulou o crescimento vegetal. Foram utilizados vasos de Leonard, preenchidos com areia na parte superior e solução nutritiva de Hoagland, com $\frac{1}{4}$ da força iônica, na parte inferior. Somente $\frac{1}{4}$ da força iônica foi adicionada pois se sabe que *Stylosanthes* se estabelece com facilidade em solos mais pobres e com teores de P

entre 3-4 ppm (Jones *et al.*, 1997). Foram feitos os seguintes tratamentos com OEE: 0,0 (controle) 10; 30 e 90 μL , sendo que a quantidade total do OEE foi dividida e pipetada na base cada uma das 3 plantas (sendo 3,33; 10 e 30 μL respectivamente) (Figura 6). Cada tratamento possuiu 6 vasos (réplicas), com 3 plantas por vaso, totalizando 18 plantas para cada tratamento, que cresceram neste regime por 20 dias. A solução de Hoagland e o OEE foram renovados a cada 7 dias. Após feita uma análise de regressão dos dados biométricos coletados, foram utilizados somente aqueles que apresentaram o modelo de regressão quadrático e assim obtendo as melhores doses através da integração da curva de dose resposta.

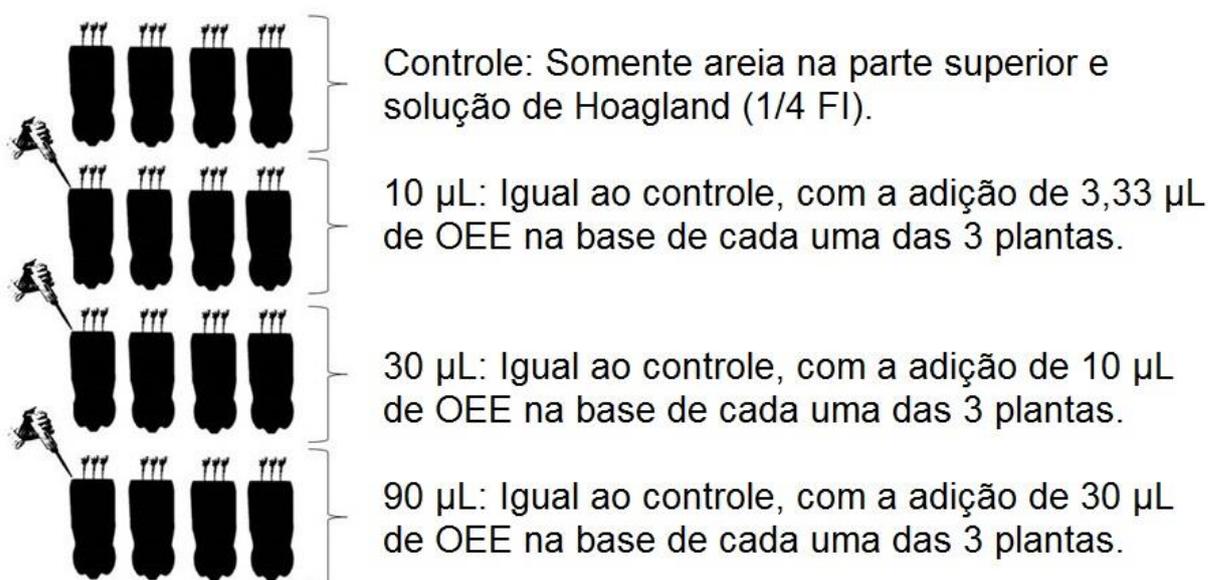


Figura 6. Esquema representativo ilustrando o experimento do Ensaio preliminar para obtenção da melhor dose de OEE com plantas de *Stylosanthes*, exemplificando os quatro tratamentos criados.

3.6. Combinação das melhores concentrações de AH+OEE

Após a obtenção das concentrações ideais, tanto do AH quanto do OEE, que melhor estimularam o crescimento vegetal, novas plântulas de *Stylosanthes*, com padrões similares de crescimento (1 par de folhas e aproximadamente 4 cm de raiz principal), foram selecionadas para a montagem de um novo experimento com o intuito de testar as melhores doses encontradas isoladamente e em combinação (Figura 7), gerando-se os seguintes tratamentos: Controle, Ácidos Húmicos (AH), Óleo Essencial de Eucalipto (OEE) e o tratamento combinando os bioestimulantes (AH+OEE). Foram utilizados vasos de Leonard, preenchidos com areia na parte superior e solução nutritiva de Hoagland (1/4 força iônica) na parte inferior. O

tratamento controle consistia somente da solução nutritiva, já para os tratamentos com os AH adicionou-se a melhor concentração encontrada à solução. Para os tratamentos com OEE a quantidade total ideal foi dividida e pipetada na base de cada planta. Foram feitos 4 vasos (réplicas), com 6 plantas por vaso, totalizando 24 plantas por tratamento, que cresceram neste regime por 20 dias.

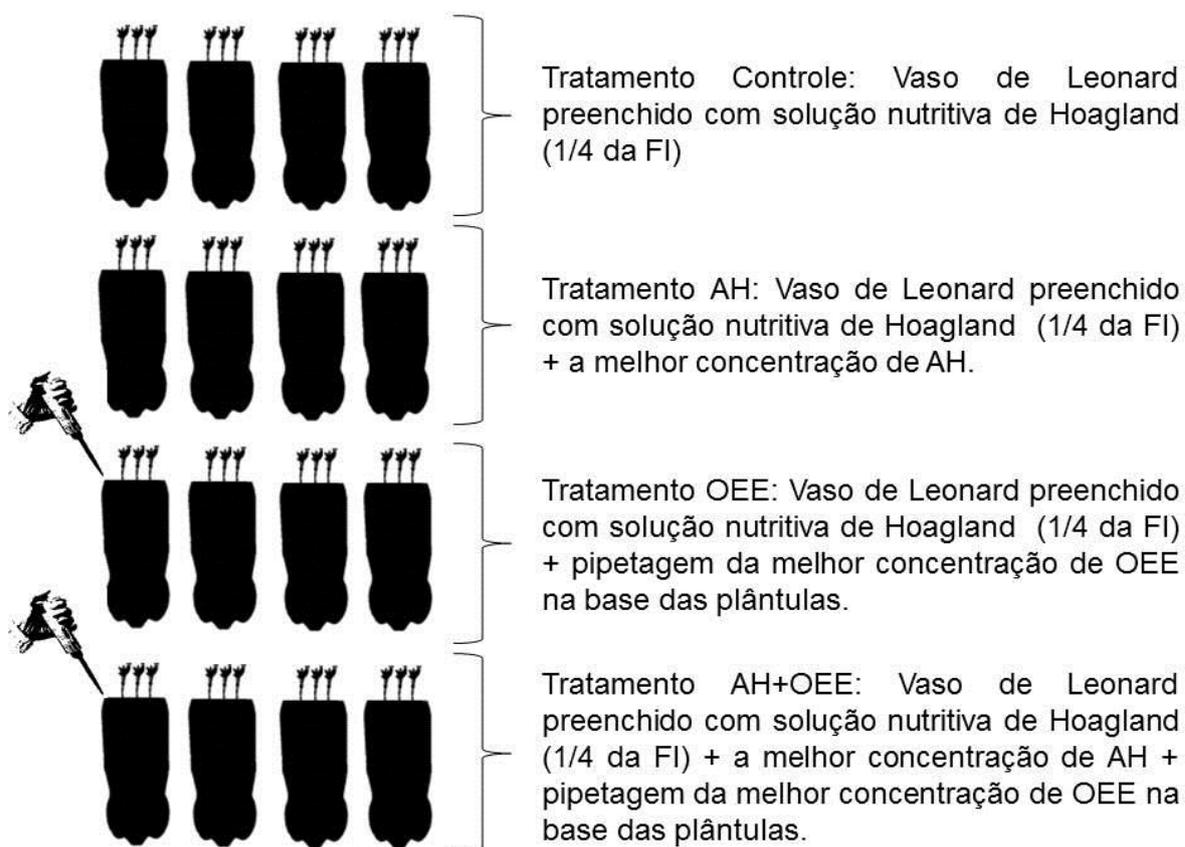


Figura 7. Esquema representativo ilustrando o experimento que foi montado utilizando-se as melhores doses encontradas dos bioestimulantes que foram utilizados tanto em combinação quanto isoladamente.

3.7. Avaliação dos biestimulantes quanto ao crescimento radicular de plântulas de *Stylosanthes*

Os efeitos das concentrações ótimas encontradas durante os “Ensaio preliminares de concentrações” (AH e OEE) e do tratamento combinado (AH+OEE), sobre o crescimento de plântulas de *Stylosanthes*, foram avaliados de acordo com o número de raízes laterais, comprimento das raízes principais e laterais (com auxílio de uma régua milimetrada), densidade de raízes laterais e da área radicular total, utilizando-se o programa computacional para análise digital de imagens Delta-T Scan™ (Figura 8).

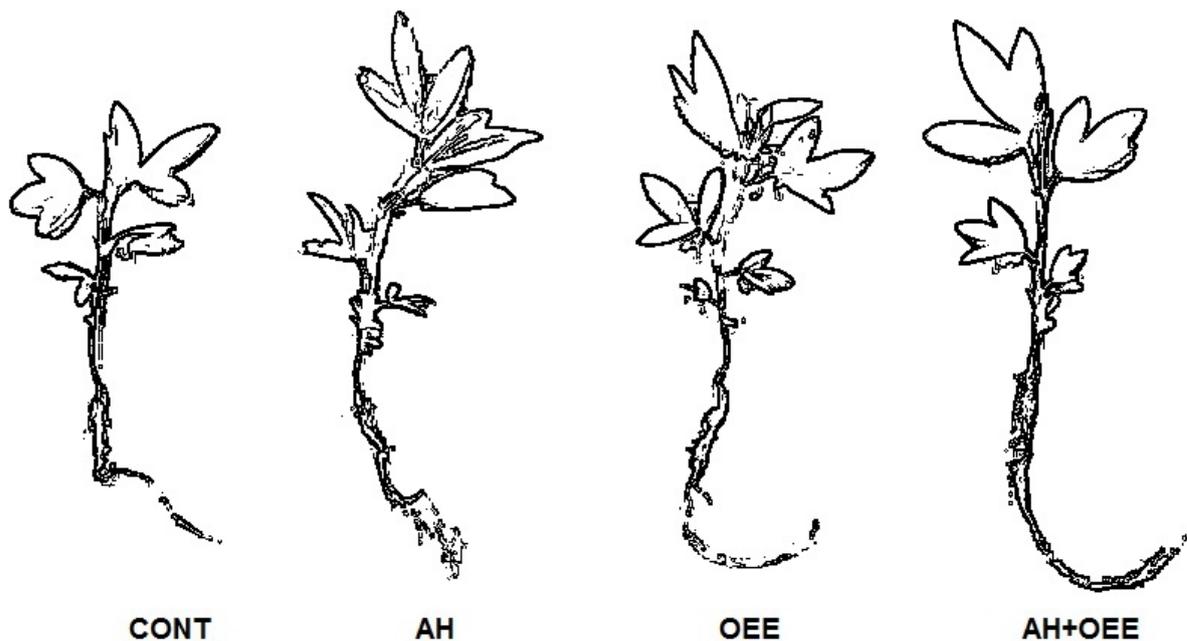


Figura 8. Exemplo de imagem preto-e-branco 1 bit de plântulas de *Stylosanthes* representativas de cada tratamento e utilizadas para as medições de diferentes parâmetros de crescimento através da contagem do número de pixels das raízes e posterior cálculo da área radicular.

3.8. Avaliação dos biestimulantes quanto aos parâmetros fisiológicos de plântulas de *Stylosanthes*

Os efeitos dos tratamentos com AH, OEE e combinados (AH+OEE), sobre os parâmetros fisiológicos de plântulas de *Stylosanthes*, foram analisados pelas medições de trocas gasosas, fluorescência e conteúdo da clorofila, conforme descrito a seguir. Todas as mensurações foram realizadas nas plantas após os 20 dias de crescimento em vasos de Leonard (Figura 7) em casa de vegetação.

3.8.1. Trocas gasosas

A medição das trocas gasosas foi realizada nas folhas individuais do 2º par de folhas totalmente expandidas, nas 6 plantas de cada um dos 4 vasos (total de 24 plantas), em cada tratamento, sendo uma medição por planta. Nas avaliações das folhas individuais, a taxa fotossintética líquida, transpiração, condutância estomática, concentração interna e ambiente de CO₂ (relação C_i/C_a), foram determinadas com o auxílio de um analisador a gás infravermelho portátil (IRGA), modelo Li 6400 (LI-COR, Lincoln, NE, USA), utilizando uma fonte luminosa fixa em 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade de fluxo de fótons fotossintéticos (FFF).

3.8.2. *Fluorescência da clorofila*

As medições da emissão da fluorescência da clorofila foram realizadas por meio de um modelo PEA não-modulado (Hansatech Instruments Ltd, King's Lynn, Norfolk, UK). Para tanto, foram utilizadas pinças fornecidas pelo fabricante para a adaptação do tecido foliar ao escuro por 30 minutos, para que todos os centros de reação estejam abertos (Qa oxidada) (Bolhar-Nordenkampf et al., 1989). Por meio de um fluorímetro não-modulado, foi possível obter as medidas da fluorescência inicial (F0), fluorescência máxima (Fm) e fluorescência variável (Fv). A partir dos valores de Fv e Fm, foi possível obter a relação Fv/Fm (rendimento quântico máximo do fotossistema II) (Bolhar-Nordenkampf et al., 1989). A indução da fluorescência foi feita por pulso de luz vermelha (650 nm) com duração de 2 segundos com intensidade de 600 W m⁻² (100% de intensidade), obtido por meio de seis LEDs (Light Emitting Diodes) localizados na sonda do aparelho.

3.8.3. *Conteúdo de clorofila*

A estimativa do conteúdo de clorofila foi avaliada por meio dos valores do índice SPAD, os quais foram obtidos por meio do medidor portátil de clorofila (MPC), SPAD-502 (Minolta, Japão). Foram feitas três medições por folha, nas mesmas folhas onde foram feitas as medições da taxa fotossintética líquida e da emissão da fluorescência da clorofila. Todas as medições das trocas gasosas, da fluorescência da clorofila A e o teor de clorofila foram realizadas entre 8:00 e 10:40 horas da manhã para todos os tratamentos.

3.9. *Medida de acidez em solução possivelmente associada à atividade das SH sobre as H⁺-ATPases*

A estimativa da atividade da H⁺-ATPase foi avaliada pela medição de acidez em solução (Silva et al., 2015), realizada nas plântulas de *Stylosanthes* tratadas com AH, OEE e AH+OEE. Foram utilizadas as melhores doses de cada bioestimulante obtida no ensaio preliminar de dose resposta. Nesse experimento, o meio mínimo (CaCl₂ 2 mM) foi utilizado a fim de evitar qualquer influência dos nutrientes, que poderiam funcionar de maneira sinérgica com os bioestimulantes, estimulando o desenvolvimento radicular e o metabolismo das plântulas. As plantas foram submetidas ao tratamento com e sem os bioestimulantes em vasos de Leonard (Figura 7) durante 48 horas. Após este período, foram transferidas para um

recipiente com 250 mL de uma solução de CaCl_2 2mM a pH 7. A medida da acidez (pH) da solução foi realizada com o auxílio de um pHmetro durante 150 minutos. As raízes foram digitalizadas através da captura digital das imagens por fotografia e secas em estufa de ar forçado, e a quantidade de H^+ foi expressa em extrusão de H^+ por grama de massa seca de raiz.

3.10. Delineamento experimental e análise estatística

Para todas as variáveis analisadas foi realizada a análise de variância, para verificar o efeito do tratamento em relação às respostas. Os dados foram analisados utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Para o experimento de obtenção das melhores concentrações ou doses dos bioestimulantes, procedeu-se a análise de regressão, os modelos apresentados foram os quadráticos que melhor se ajustaram. Os dados de regressão foram normais e suas significâncias, e de seus coeficientes, foram verificadas pelo teste F ($p < 0,05$) e pelo teste t ($p < 0,05$), respectivamente. O ajuste de regressão foi efetuado pelo coeficiente ajustado (R^2). Tanto a obtenção das melhores doses dos bioestimulantes quanto às respostas sobre a morfologia das plântulas foram avaliadas ao final de 20 dias. Para a estimativa da atividade da H^+ -ATPase, foi utilizado um DIC, com 4 tratamentos (controle, AH, OEE e AH+OEE) contendo 10 plantas cada e 3 repetições. Todos os dados foram analisados com o emprego do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011) e as diferenças entre as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ensaio de concentrações ótimas

Para encontrar as concentrações ou doses ótimas de ambos os bioestimulantes (AH e OEE) foram utilizadas somente as regressões quadráticas com os valores encontrados após os “ensaios preliminares de concentrações e ou doses”. Tal procedimento foi feito devido aos bioestimulantes vegetais possuírem, muitas vezes, ação muito similar a de alguns fitohormônios (Zandonadi et al., 2010), que possuem como característica o estabelecimento de equações de regressão quadráticas como as mais adequadas por representarem os melhores estímulos sobre o crescimento dos vegetais. Para o AH foram utilizados os valores da densidade de raízes laterais, onde a concentração ótima encontrada foi de 3,14 mM C L⁻¹ (Tabela 1), sendo um valor semelhante ao encontrado por Canellas et al. (2010), Dobbss et al. (2010) e Ramos et al. (2015) para plântulas de *Arabidopsis*, milho e tomate e arroz respectivamente, que variaram de 2,0 a 4,0 mM C L⁻¹. No caso do OEE, foram utilizados os valores das massas frescas e secas das raízes das plântulas de *Stylosanthes*, onde a concentração ótima encontrada foi de 48,0 µL (Tabela 2), valor similar ao encontrado por Steffen et al. (2010), onde os autores verificaram que a aplicação de OE de *Eucalyptus grandis* nas concentrações de 25 e 50 µL proporcionaram aumentos superiores a 90% sobre a germinação de sementes e, nas concentrações 30 e 40 µL, favoreceram o crescimento das raízes e da parte aérea em mudas do próprio eucalipto.

Tabela 1. Modelo de concentração-resposta, coeficiente de correlação (R²), desvio-padrão da regressão (DP), número de unidades que integram a amostra (n), nível de significância da regressão (valor-p) e ponto de inflexão [concentração ótima - (dx/dy): $b_1 + 2(b_2)x = 0$] para a densidade de raízes laterais de plântulas de *Stylosanthes* após tratamento com AH de vermicomposto.

Equação ($y = b_2x^2 + b_1x + b_0$)	R ²	DP	n	valor-p	Concentração ótima de AH
$y = -0,0284x^2 + 0,1782x + 6,0281$	0,83	6,34	25	<0,0018	3,14 mM C L ⁻¹

Tabela 2. Modelo de dose-resposta, coeficiente de correlação (R²), desvio-padrão da regressão (DP), número de unidades que integram a amostra (n), nível de significância da regressão (valor-p) e ponto de inflexão [dose ótima - (dx/dy): $b_1 + 2(b_2)x = 0$] para as massas frescas e secas das raízes de plântulas de *Stylosanthes* após tratamento com OEE.

Equação ($y = b_2x^2 + b_1x + b_0$)	R ²	DP	n	valor-p	Dose ótima de OEE
$y = -0,0003x^2 + 0,0291x + 0,8342$	0,79	3,89	25	<0,024	48,5 µL
$y = -6E-05x^2 + 0,0057x + 0,1164$	0,85	1,71	25	<0,006	47,5 µL
				MÉDIA	48,0 µL

4.2. Efeitos sobre a biometria das raízes de *Stylosanthes*

O tratamento com AH não refletiu em diferenças significativas para o comprimento das raízes principais (CRP) em *Stylosanthes*, que chegaram a apresentar valores cerca de 4% inferiores ao controle (Figura 9 A). Os estímulos causados pelo AH sobre o comprimento da raiz principal em diferentes espécies vegetais tende a ser variado, o que pode ser encontrado no trabalho de Canellas et al. (2010), onde as concentrações de AH utilizadas geraram um crescimento significativo da raiz principal em *Arabidopsis*, porém não surtiram nenhum efeito sobre plantas de milho. Assim como para o OEE, o estímulo sobre o CRP não foi significativo (menos de 1% de diferença) (Figura 9 A) o que pode ter sido causado pela concentração do tratamento (48,0 µL), autores observaram que as concentrações ideais de OEE para o estímulo do crescimento da raiz principal são maiores que as concentrações que melhor estimulam o crescimento das raízes laterais (Steffen et al., 2010). A combinação de AH+OEE também não exibiu influencias significativas sobre o CRP (Figura 9 A), com valores 7% menores em relação ao controle, o que pode ter sido causado por ambos os motivos pelos quais esses bioestimulantes, em separado, também não afetaram o CRP.

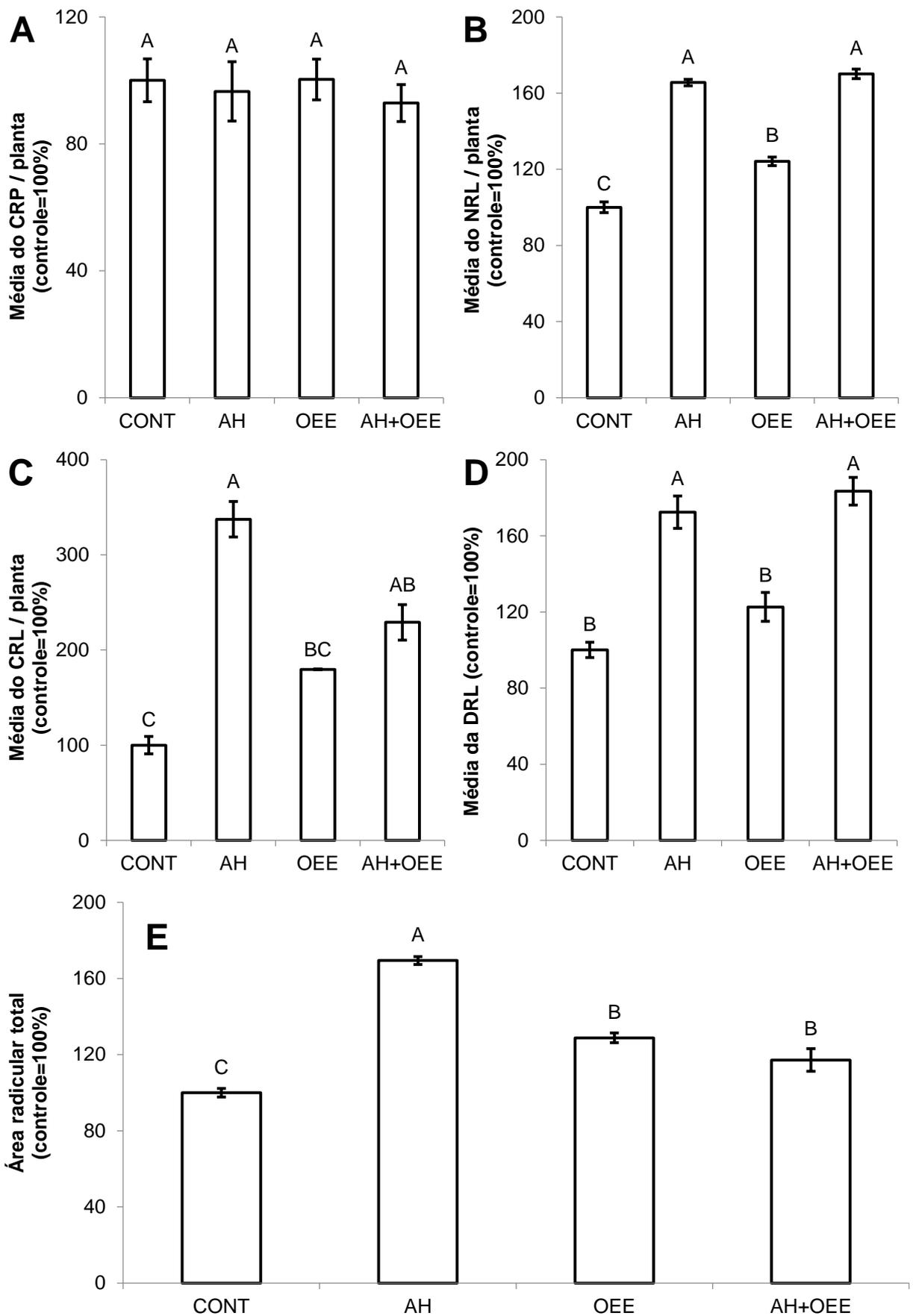


Figura 9. Resultados da biometria das raízes de *Stylosanthes*, onde os parâmetros avaliados foram: (A) Comprimento das raízes principais, (B) Número de raízes

laterais, (C) Comprimento das raízes laterais, (D) Média da densidade de raízes laterais e (E) Área radicular total. As barras representam os tratamentos Controle, AH, OEE e AH+OEE respectivamente, o desvio padrão está expresso acima de cada barra e letras diferentes no topo indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey (com 5% de probabilidade).

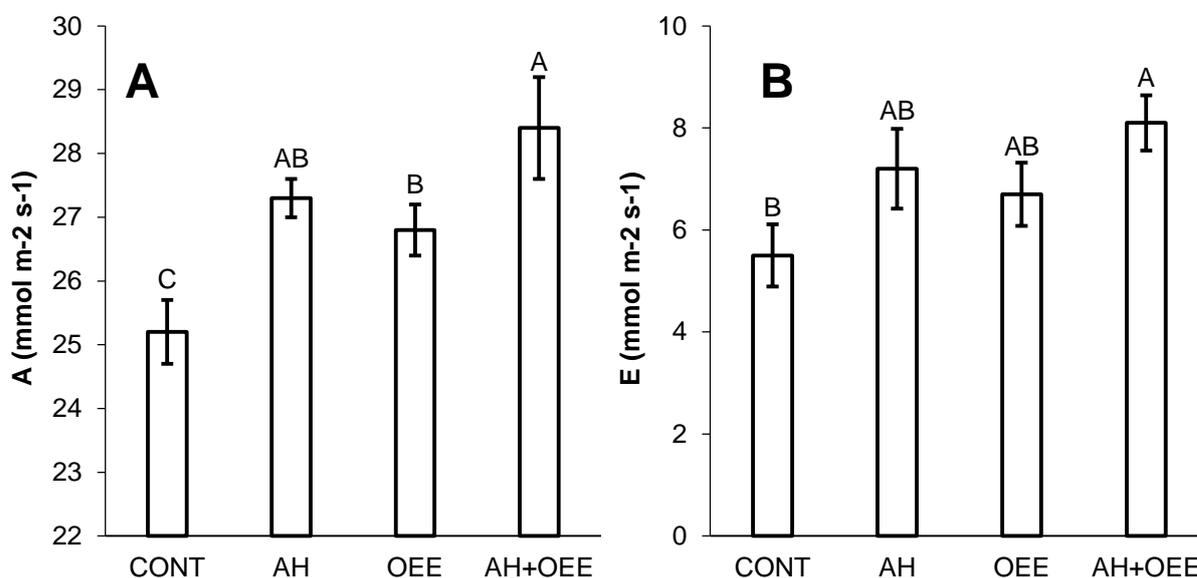
Os estímulos de todos os tratamentos sobre o número de raízes laterais (NRL) em *Stylosanthes* (Figura 9 B) foram significativamente positivos em relação ao tratamento controle, sendo que AH, OEE e AH+OEE geraram aumentos de cerca de 65%, 24% e 70% respectivamente. Da mesma forma, foram observados incrementos significativos no comprimento das raízes laterais (CRL) para todos os tratamentos em relação ao controle (Figura 9 C), sendo da ordem de 237% para o AH, 79% para o OEE e 129% para o AH+OEE. Em relação à densidade de raízes laterais (DRL = razão do NRL/CRP), apenas o OEE apresentou resultados não significativos em relação ao controle, sendo que AH e AH+OEE apresentaram resultados significativos das ordens de 72% e 83% respectivamente (Figura 9 D). O efeito estimulante dos AH sobre o crescimento de raízes laterais era esperado e já havia sido descrito por outros autores, como Aguiar *et al.* (2012) que verificou o desenvolvimento significativo de raízes laterais em milho após serem tratadas com AH extraídos de vermicompostos com mais de 60 dias de maturação, e Canellas *et al.* (2010) que observou o aumento na densidade, número e comprimento de raízes laterais em outras duas espécies vegetais quando expostas aos AH. Além disso, Steffen *et al.* (2010) encontrou resultados similares, onde uma concentração de apenas 30 µL de OEE foi suficiente para gerar desenvolvimento significativo sobre o volume relativo das raízes de *Eucalyptus grandis*.

Quanto à área radicular total (Figura 9 E) todos os tratamentos obtiveram resultados com significância estatística quando comparados ao controle, sendo da ordem de 28% para o OEE e cerca de 69% para o AH. Porém é importante observar que, apesar do AH+OEE também ter apresentado efeito significativo sobre a área radicular total (cerca de 17%) em relação ao controle, seus efeitos foram 52% menores quando comparados ao tratamento com AH somente. O principal motivo para isso pode estar na acumulação dos bioestimulantes, pois Steffen e colaboradores (2010) postularam que os estímulos dos OE são ideais quando aplicados em pequenas quantidades e Nardi e colaboradores (2009) mostraram que os efeitos benéficos dos AH no crescimento radicular também ocorrem quando aplicados em baixas concentrações. Logo, a combinação de AH+OEE pode ter

gerado stress devido à grande concentração dos bioestimulantes num mesmo tratamento e passando, gradativamente, de efeito estimulante para inibitório.

4.3. Efeitos sobre a fisiologia de *Stylosanthes*

A taxa fotossintética líquida (Figura 10 A) nas plantas de *Stylosanthes* foi benéficamente afetada por todos os tratamentos, de forma significativa, em relação ao tratamento controle. Onde os aumentos gerados pelos AH foram da ordem de 8%, para o OEE 6% e AH+OEE cerca de 13%. O trabalho de Fan *et al.* (2014) encontrou resultados similares, onde a aplicação foliar de AH em plantas de crisântemo gerou incrementos a índices morfológicos e à atividade fotossintética quando comparado ao fertilizante inorgânico (NPK) após um período de 30 dias. Além disso, é possível perceber que o maior estímulo do OEE ocorreu sobre a taxa fotossintética líquida (Figura 10 A) e já se sabe que esse é um dos parâmetros que melhor reflete a capacidade fotossintética de uma espécie (Sicher e Bunce, 2001). Esses fatores podem estar relacionados com os valores superiores encontrados na combinação AH+OEE em relação aos outros tratamentos, indicando um possível sinergismo entre os bioestimulantes estudados.



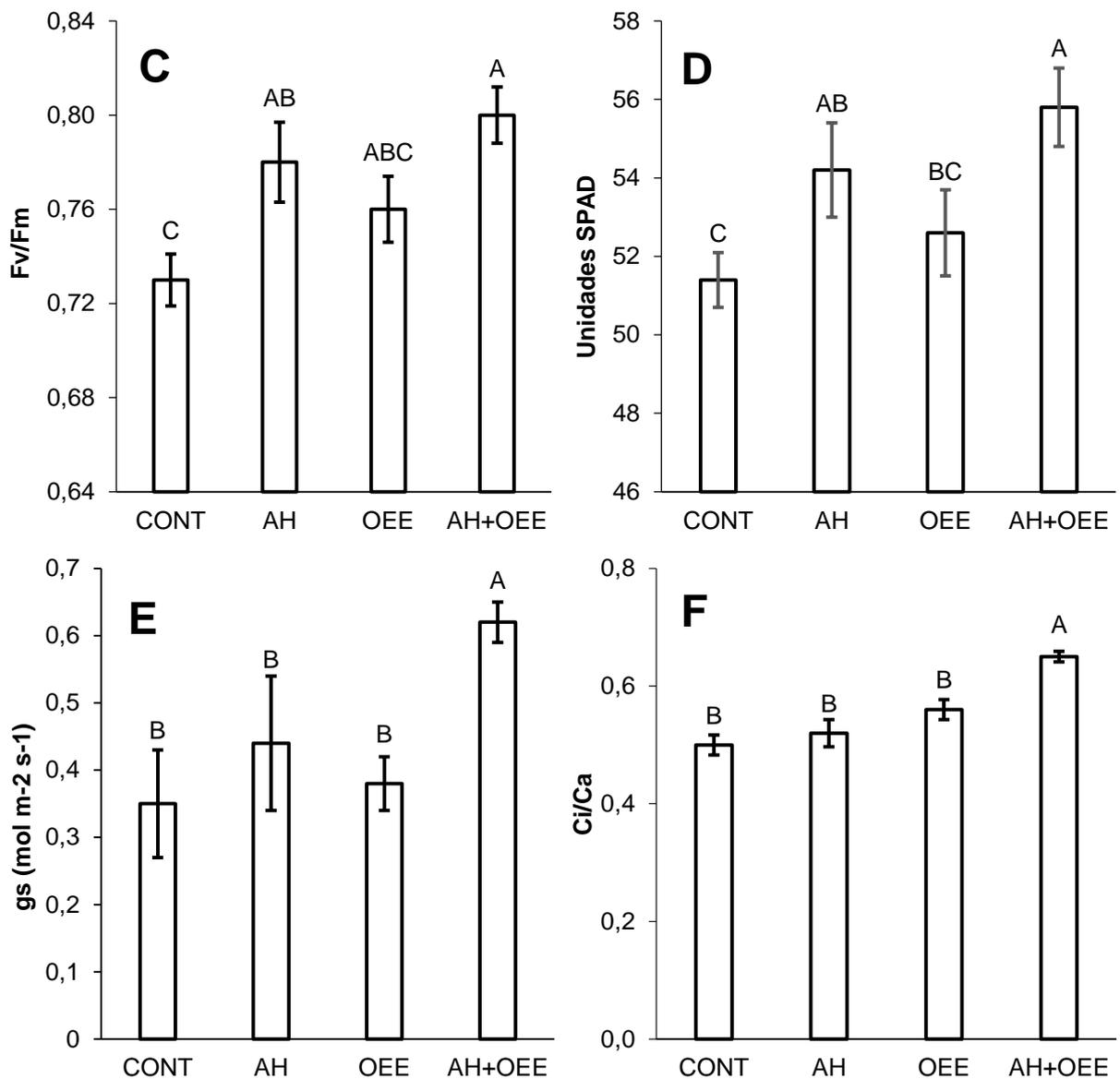


Figura 10. Resultados dos parâmetros fotossintéticos das partes aéreas de *Stylosanthes*, onde os gráficos seguintes apresentam: (A) Taxa fotossintética líquida, (B) Transpiração vegetal, (C) Rendimento quântico, (D) Índice de SPAD, (E) Condutância estomática e (F) Relação carbono interno/externo (Ci/Ca). As barras representam os tratamentos Controle, AH, OEE e AH+OEE respectivamente, o desvio padrão está expresso acima de cada barra e letras diferentes no topo indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey (com 5% de probabilidade).

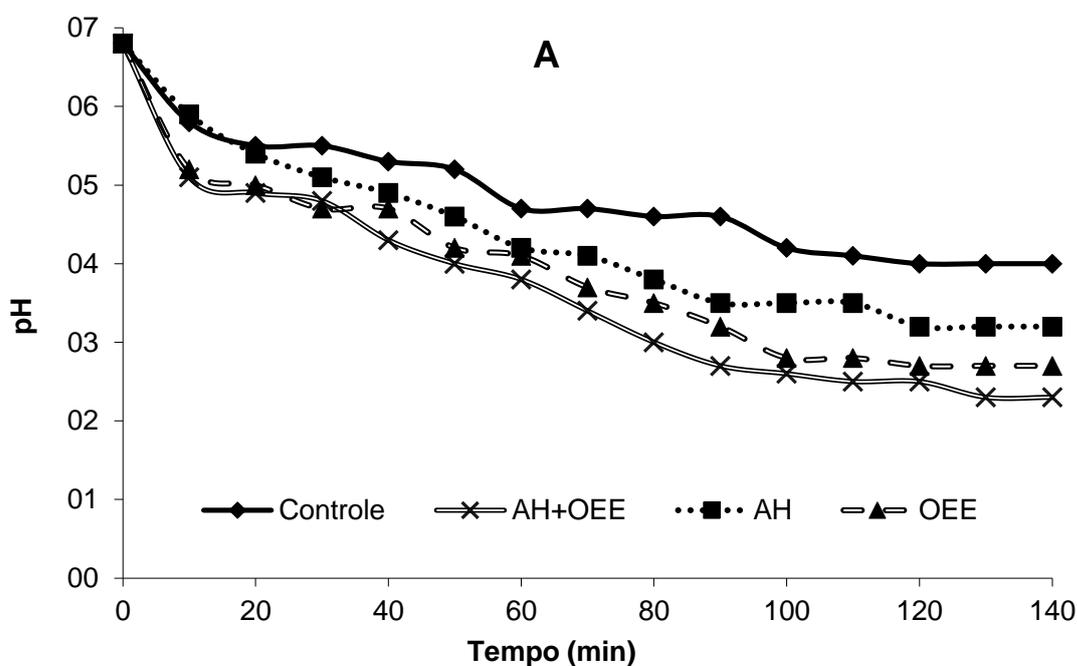
De forma a confirmar os resultados obtidos pela medida da taxa fotossintética líquida, também foram mensurados a transpiração vegetal, rendimento quântico e o índice de SPAD. Com relação a transpiração vegetal ocorreram diferenças entre os tratamentos (Figura 10 B), onde o AH, OEE e AH+OEE geraram aumentos significativos em torno de 31, 22 e 47%, respectivamente, em relação ao controle. Os aumentos no rendimento quântico (Figura 10 C) também foram significativos para todos tratamentos, quando comparados ao controle, com

aumentos de 7% para os AH, 4% para o OEE e cerca de 10% para AH+OEE. Um padrão similar se manteve nos resultados do índice de SPAD (Figura 10 D), onde o AH gerou aumentos da ordem de 5%, OEE 2% e AH+OEE 9%, sendo todos significativos quando comparados com o tratamento controle. Com relação a esses resultados é possível observar que a interação entre AH+OEE foi a que mais proporcionou incrementos nos parâmetros fotossintéticos avaliados em relação ao controle, e isso pode estar relacionado, não somente aos bioestimulantes isoladamente, mas principalmente à interação benéfica de sua combinação. Já foi postulado na literatura que os AH exercem papel ativo na estimulação da fotossíntese, respiração vegetal, entre outros parâmetros fisiológicos (Chen *et al.*, 2004), deixando claro seus efeitos benéficos para espécies vegetais. Apesar de trabalhos que avaliam o efeito de OE sobre a fisiologia de plantas serem escassos, Ibrahim e colaboradores (2004; 2006) avaliaram o efeito de monoterpenos (constituintes representativos dos OE) sobre diferentes cultivares de alfaces e cenouras. Esses autores encontraram concentrações limite de limoneno (terpeno, extraído de cascas cítricas) variando entre 60 e 90 mL L⁻¹ que afetaram negativamente diferentes variáveis fisiológicas, como a fluorescência da clorofila II, nos cultivares testados. Porém, no trabalho citado, não foram testadas concentrações mais baixas, o que vai de encontro ao que a literatura diz sobre os efeitos benéficos dos OE, que preconiza a aplicação dos mesmos em baixas concentrações (Steffen *et al.* 2010).

Os resultados da mensuração da condutância estomática (Figura 10 E) e da razão carbono interno:externo (Ci/Ca) (Figura 10 F) apresentaram um padrão análogo, onde apenas o tratamento combinado AH+OEE gerou efeitos significativos em relação ao controle, sendo eles das ordens de 77 e 30%, respectivamente. Já se sabe que a abertura dos estômatos e a concentração de CO₂ são fatores que regulam a fotossíntese de forma relativa, onde a baixa concentração de CO₂ no tecido vegetal induz diretamente a abertura dos estômatos e, conseqüentemente, a atividade fotossintética (Marengo e Lopes, 2005; Marengo *et al.*, 2006; Dias e Marengo, 2007), assim sendo esses dois parâmetros estudados atuam como confirmadores da atividade fotossintética. Tais dados obtidos podem estar relacionados ao sinergismo gerado pela aplicação dos AH e do OEE em baixas concentrações, o que pode vir a promover efeitos benéficos sobre o crescimento e fisiologia das plantas (Steffen *et al.*, 2010; Nardi *et al.*, 2009).

4.4. Efeito sobre a estimativa da atividade da H⁺-ATPase

Ocorreu um decréscimo gradativo dos valores de pH nos tratamentos com AH, OEE e AH+OEE, respectivamente (Figura 11 A), onde a acidez das soluções onde as plantas permaneceram nos tratamentos com os bioestimulantes por 48 horas foram consideravelmente maiores quando comparados ao tratamento controle. O aumento da acidez gerado pelo tratamento com AH corroboram com os dados de Aguiar et al. (2011) que encontraram maior acidificação nas soluções de plantas de milho, tratadas com AH extraídos de vermicompostos, pelo mesmo período descrito acima. Pode-se afirmar que os resultados do presente trabalho constituem a primeira evidencia do efeito positivo de OE sobre a acidificação do meio de cultivo radicular, assim como outros autores relataram os primeiros efeitos de monoterpenos sobre a fluorescência da clorofila II, taxa fotossintética líquida e o funcionamento dos estômatos (Ibrahim *et al.*, 2004) em diferentes cultivares. É importante perceber que o efeito do AH+OEE sobre o pH do meio de cultivo atingiu os valores mais baixos dentre todos os tratamentos (Figura 11 A). De acordo com Aguiar *et al.* (2011), a acidificação do meio pode estar relacionada a dois principais fatores, sendo eles a produção de CO₂ pela respiração radicular e a extrusão de H⁺ pela H⁺-ATPase presente tanto na membrana plasmática quanto nos vacúolos das células.



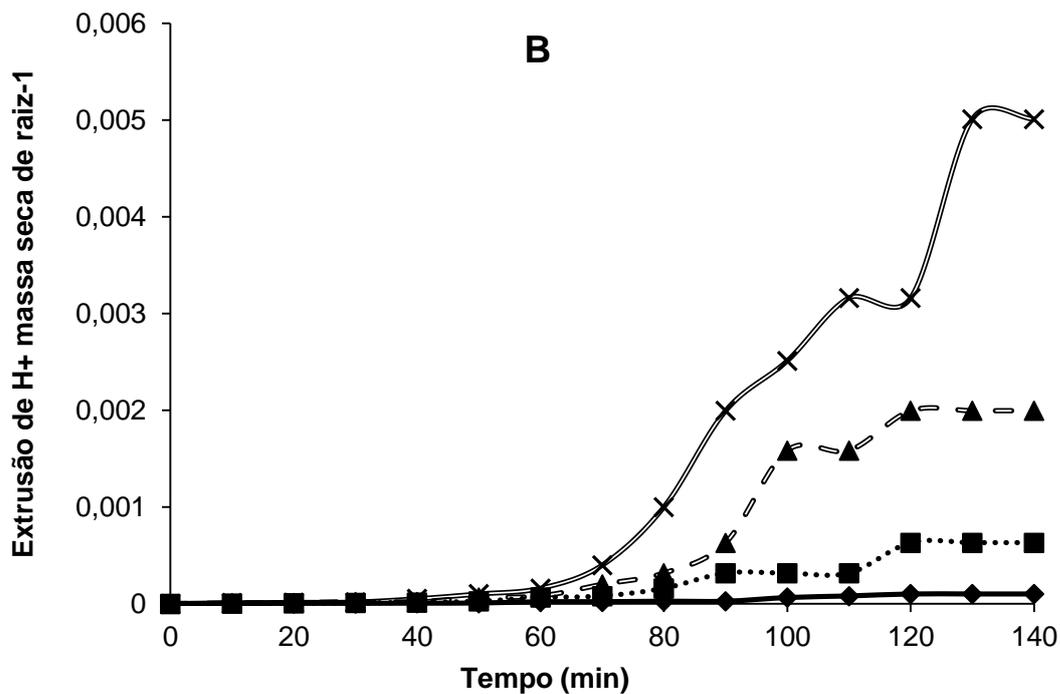


Figura 11. A. Curvas dos resultados da acidificação (pH) das soluções de meio mínimo (CaCl_2 2mM) contendo plântulas de *Stylosanthes* (após permanecerem 48 horas nos tratamentos) no decorrer de duas horas e vinte minutos. **B.** Estimativa da extrusão de H^+ pela massa seca de raízes de *Stylosanthes*.

Já se sabe que uma das principais razões para o aumento na extrusão de H^+ reside na atividade das H^+ -ATPases. Logo foi mensurado a extrusão de H^+ pelas raízes de *Stylosanthes* (Figura 11 B), com o intuito de relacionar os valores de pH e H^+ encontrados com a acidificação das soluções de CaCl_2 2mM, após a exposição das plântulas aos tratamentos. Os valores exibidos na Figura 11 B refletem os decréscimos do pH na Figura 11 A, onde aumentos gradativos na extrusão de H^+ para AH, OEE e AH+OEE, respectivamente, sendo que todos os valores foram superiores em relação ao tratamento controle. Silva *et al.* (2015) também verificaram que o tratamento com AH, gerou aumentos nítidos na extrusão de H^+ nas raízes de *Cattleya warneri* (Orchidaceae), o que está em conformidade com os dados encontrados no presente trabalho. Assim como os resultados encontrados por Silva *et al.* (2015), é possível afirmar, ao menos parcialmente, que a diminuição do pH das soluções de cultivo está relacionada com a atividade da H^+ -ATPase de membrana plasmática e, conseqüentemente, ao aumento da extrusão de H^+ .

Vale ressaltar que os aumentos na extrusão de H^+ são de ordem exponencial e refletem paralelamente seus respectivos decréscimos de pH, sendo que o tratamento utilizando-se a interação entre AH+OEE foi o que alcançou os

valores mais expressivos (Figura 11 B), podendo, portanto, ser um forte indicativo do efeito benéfico dessa interação entre os biostimulantes estudados (AH e OEE) sobre a indução do “crescimento ácido”, encontrado e descrito previamente por outros autores para somente para a fração AH (Cordeiro *et al.*, 2010; Canellas e Santos, 2005).

5. CONCLUSÕES

A combinação de AH isolados de vermicomposto e OE de *Eucalyptus globulus* (AH+OEE) apresentaram a capacidade de estimular o crescimento radicular de *Stylosanthes* e, principalmente, incrementar os parâmetros fotossintéticos e a estimativa da atividade da H⁺-ATPase avaliados nas plântulas. Os efeitos da combinação entre os bioestimulantes (AH+OEE) foram superiores em relação aos outros tratamentos na estimulação fisiológica de *Stylosanthes*, na acidificação das soluções após exposição aos tratamentos e a extrusão de H⁺ (e consequente indução do crescimento ácido), mostrando que existe um interacionismo entre os bioestimulantes. Com isso, podemos afirmar que a combinação de AH+OEE geraram benefícios suficientemente concretos sobre as características avaliadas em plântulas de *Stylosanthes*, criando-se a expectativa de podermos utilizar plantas dessa espécie tratadas com a combinação de AH e OEE (fornecendo plantas de alto vigor e provavelmente mais preparadas para a sobrevivência em condições adversas), num futuro próximo, visando a recuperação de áreas degradadas ou em processo de degradação. Da mesma forma se pode melhorar a aplicabilidade de *Stylosanthes* em suas diferentes formas, como em rotações de plantios, alimentação animal, fixadora de solos em processo de erosão e formação de consórcios com outras espécies. Trabalhos futuros podem testar os efeitos das substâncias húmicas totais, ou outras de suas frações, sobre os parâmetros estudados principalmente sobre os efeitos fisiológicos e sobre a extrusão de H⁺, que apresentaram os resultados mais significativos no presente estudo. Também é de se ressaltar que alguns parâmetros não medidos neste estudo podem apresentar relevância significativa em trabalhos futuros, notadamente a medição do peso fresco/seco das partes aéreas e a espessura das raízes laterais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Revista brasileira de Ciência do Solo: Nome de todos os autores, Título do artigo. Título abreviado do periódico, volume: páginas inicial e final, ano de publicação.

Aguiar, N.O. Características químicas e bioatividade de ácidos húmicos isolados de vermicompostos em diferentes estádios de maturação. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, Campos dos Goytacazes. 86, 2011. Disponível em <http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/PRODVEGETAL_3434_1328639584.pdf>. Acesso em 17 janeiro 2014.

Aguiar, N.O.; Olivares, F.L.; Novotny, E.H.; Dobbss, L.B.; Balmori, D.M.; Santos Jr., L.G.; Chagas, J.G.; Façanha, A.R.; Canellas, L.P. Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. *Plant Soil*, 2012.

Aiken, G.R.; McKnight, D.M.; Wershaw, R.L.; MacCarthy, P. Introductory remarks. Em: Aiken, G.R.; McKnight, D.M.; Wershaw, R.L.; MacCarthy, P. Humic substances in soil, sediment and waters. New York, Jonh Wiley, 1-12, 1985.

Ali, N.; Ahmed, G.; Ali Shah, S.; Shah, I.; Ghias, M.; Khan, I. Acute toxicity, brine shrimp cytotoxicity and relaxant activity of fruits of *callistemon citrinus* Curtis. *BMC Complement Altern Med* 11:99, 2011.

Andrade, W.F.; Almeida, M.; Gonçalves, A.N. Multiplicação in vitro de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 41, 12:1715-1719, 2006.

Bajaj, Y.P.S. Medicinal and aromatic plants. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Edition; 8:194-196, 1995.

Bajsa, O.; Nair, J.; Mathew, K.; Ho, G.E. Vermiculture as a tool for domestic wastewater management. *Water Sci. Technol.* 48:125-132, 2004.

Baratta, M.T.; Dorman, H.J.; Deans, S.G.; Figueiredo, A.C.; Barroso, J.G.; Ruperto, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 13:235-244, 1998.

Benitez, E.; Nogales, R.; Masciandaro, G.; Ceccanti, B. Isolation by isoelectric focussing of humic-urea complexes from earthworm (*Eisenia foetida*) processed sewage sludge. *Biol. Fertil. Soils* 31:489-493, 2000.

Blum, U. Designing laboratory plant debris – soil bioassays: some reflections. Em: Inderjit, Dakhini, K. M.N.; Foy, C.L. (eds.). *Principles and practices in plant ecology*. Boca Raton: CRC Press LLC, p.17-23, 1999.

Bolhàr-Nordenkamp, H.R.; Long, S.P., Baker, N.R. Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrument. *Functional Ecology*, 3:497-514, 1989.

Bonaldo, S.M.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J.R.; Tessmann, D.J.; Scapim, C.A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 29:128-134, 2004.

Burt, R.L.; Isbell, R.F.; Williams, W.T. Strategy of evaluation of a collection of tropical herbaceous legumes from Brazil and Venezuela. I. Ecological evaluation at the point of collection. *Agro-Ecosystems*, 5:99-117, 1979.

Burt, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *International Journal of Food Microbiology*. 94:223-253, 2004.

Cadisch G.; Giller K.E. *Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition*. CAB International, Wallingford. 1997.

Calvo, P.; Nelson, L.; Kloepper, J.W. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil*. 2014.

Canellas, L.P.; Piccolo, A.; Dobbss, L.B.; Spaccini, R.; Olivares, F.L.; Zandonadi, D.B.; Façanha, A.R. Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. *Chemosphere* 78:457-466, 2010.

Canellas, L.P.; Santos, G.A. Humosfera – Tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas. L.P. Canellas e G.A. Santos, Campos de Goytacazes. 309, 2005.

Carneiro, M.A.C.; Siqueira, J.O.; Curi, N.; Moreira, F.M.S. Efeitos da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e da aplicação de fósforo no estabelecimento de forrageiras em solo degradado. *Pesq. agropec. bras.* v.34, 9:1669-1677, 1999.

Chandra, A.; Pathak, P.S.; Bhatt, R.K.; Dubey, A. Variation in drought tolerance of different *Stylosanthes* accessions. *Biol. Plant.* 48:457-460, 2004.

Chen, Y.; De Nobili, M.; Aviad, T. Stimulatory effects of humic substances on plant growth. In: *Soil organic matter in sustainable agriculture* (Magdoff F., Weil R.R., eds). CRC Press, NY, USA. 103-129, 2004.

Conner, D.E. Naturally occurring compounds. In P. Davidson; A. L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in foods*, New York: Marcel Dekker Inc. 441-468, 1993.

Cordeiro, F.C.; Fernandes, M.S.; Souza, S.R. Influência dos ácidos húmicos no metabolismo vegetal pode ser considerada uma resposta auxínica? *Revista de Ciências da Vida* 30:111-131, 2010.

Costa, N.M.S.; Ferreira M.B. Some Brazilian species of *Stylosanthes*. In: Stace HM, EdyeLA, editors. *The biology and agronomy of Stylosanthes*. Sydney: Academic Press. 53-101, 1984.

Cruz, M.E.S.; Nozaki, M.H.; Batista, M.A. Plantas medicinais e alelopatia. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília. 15:28-34, 2000.

Zandonadi, D.B.; Santos, M.P.; Dobbss, L.B.; Olivares, F.L.; Canellas, L.P.; Binzel, M.L.; Okorokova-Façanha, A.L.; Façanha, A.R. Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺- ATPase activation. *Planta*, 231:1025-1036, 2010.

David, J.; Smejkalova, D.; Hudecova, S.; Zmeskal, O.; von Wandruszka, R.; Gregor, T.; Kucerik, J. Physico-chemical properties of regenerated humic substances correlated with their biostimulative activity. *SpringerPlus*. 3:156-171, 2014.

Delasquis, P.J.; Stanich, K.; Girard, B.; Mazza, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Food Microbiology*, Illinois. 74:101-109, 2002.

Dias, D.P.; Marengo, R.A. Fotossíntese e fotoinibição em mogno e acariquara em função da luminosidade e temperatura foliar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42(3):305-311, 2007.

Dobbss, L.B.; Canellas, L.P.; Olivares, F.L.; Aguiar, N.O.; Peres, L.E.P.; Azevedo, M.; Spaccini, R.; Piccolo, A.; Façanha, A.R. Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth. *Journal Agriculture Food Chemistry* 58:3681-3688, 2010.

Edye, L.A. Potential of *Stylosanthes* for improving tropical grasslands. *Outlook Agric.* 16:124-30, 1987.

Elliot, W.R.; Jones, D. *The Encyclopaedia of Australian plants*, Vol.4. Melbourne: Lothian Publishing Company Pty Ltd; 1986.

Ertani, A.; Cavani, L.; Pizzeghello, D.; Brandellero, E.; Altissimo, A.; Ciavatta, C.; Nardi, S. Biostimulant activity of two protein hydrolyzates in the growth and nitrogen metabolism of maize seedlings. *J. Plant. Nutr. Soil Sci.* 2009.

Façanha, A.R.; Olivares, F.L.; Velloso, A.C.X.; Braz-Filho, R.; Santos, G.A.; Canellas, L.P. Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e

sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesq. Agropec. Bras.* 37:1301-1310, 2002.

Ferreira, A.G.; Aquila, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, São Carlos. 12:175-204, 2000.

García-Martínez, A.M.; Díaz, A.; Teajada, M.; Bautista, J.; Rodríguez-Morgado, B.; Santa María, C.; Revilla, E.; Parrado, J. Enzymatic production of an organic soil biostimulant from wheat-condensed distiller solubles: effects on soil biochemistry and biodiversity. *Process Biochem.* 47:1127-1133, 2010.

Goetze, M.; Thomé, G.C.H. Efeito alelopático de extratos de *Nicotiana tabacum* e *Eucalyptus grandis* sobre a germinação de três espécies de hortaliças. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas. v.10, 1:43-50, 2004.

Grof B.; Schultze-Kraft R.; Muller F. *Stylosanthes capitata* Vog., some agronomic attributes, and resistance to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.). *Trop Grassl* 13:28-37, 1979.

Herman W.A.; McGill W.B.; Dormaar J.F. Effects of initial chemical composition on decomposition of roots of three grass species. *Canadian Journal of Soil, Science.* 57:205-215, 1977.

Hong-mei, F.; Xiao-wen, W.; Xia, S.; Ying-ying, L.; Xian-zhi, S.; Cheng-shu, Z. Effects of humic acid derived from sediments on growth, photosynthesis and chloroplast ultrastructure in chrysanthemum. *Scientia Horticulturae* 177:118-123, 2014.

Ibrahim, M.; Nissinen, A.; Prozherina, N.; Oksanen, E.; Holopainen, J. The influence of exogenous monoterpene treatment and elevated temperature on growth, physiology, chemical content and headspace volatiles of two carrot cultivars (*Daucus carota* L.). *Environmental and Experimental Botany*, Paris, 56(1):95-107, 2006.

Ibrahim, M.; Oksanen, E.; Holopainen, J. Effects of limonene on the growth and physiology of cabbage (*Brassica oleracea* L) and carrot (*Daucus carota* L) plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture, Davis*, v. 84(11):1319-1326, 2004.

Jindo, K.; Martim, S.A.; Navarro, E.C.; Perez-Alfocea, F.; Hernandez, T.; Garcia, C.; Aguiar, N. O.; Canellas, L.P. Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. *Plant Soil*. 353:209-220, 2012.

Jones, R.J.; McIvor, J.G.; Middleton, C.H.; Burrows, W.H.; Orr, D.M.; Coates, D.B. Stability and productivity of *Stylosanthes* pastures in Australia. I. Long-term botanical changes and their implications in grazed *Stylosanthes* pastures. *Tropical Grasslands* 31, 482–493, 1997.

Kauffman, G.L. III; Knievel, D.P.; Watschke, T.L. Growth regulator activity of Macro-Sorb foliar in vitro. *PGRSA Q.* 33:134–141, 2005.

Kellman, M.C. Secondary plant succession in tropical montane Mindanao. *Publ. BG/2*, Australian National University, Canberra. 174, 1970.

Ludley, K.E.; Robinson, C.H.; Jickells, S.; Chamberlain, P.M.; Whitaker, J. Potential for monoterpenes to affect ectomycorrhizal and saprotrophic fungal activity in coniferous forest is revealed by novel experimental system. *Soil Biology & Biochemistry*, Brisbane. v.41,1:117-124, 2009.

Maass B.L.; Sawkins M.C. History, relationships and diversity among *Stylosanthes* species of commercial significance. In: Chakraborty S, editor. High-yielding anthracnose-resistant *Stylosanthes* for agricultural systems. Sydney: CSIRO. 9-25, 2004.

Machesky, M.L. Calorimetric acid–base titrations of aquatic and peat derived fulvic and humic acids. *Sci. Technol.* 27:1182-1188, 1993.

Maffeis, A.R.; Silveira, R.L.V.A.; Brito, J.O. Reflexos das deficiências de macronutrientes e boro no crescimento de plantas, produção e qualidade de óleo essencial em *Eucalyptus citriodora*, *Scientia Forestalis*, Piracicaba. 57:87-98, 2000.

Mafia, R.G.; Alfenas, A.C.; Ferreira, E.M.; Teixeira, D.A.; Zauza, E.A.V. Indução do enraizamento e crescimento do eucalipto por rizobactérias: efeito da adição de fonte alimentar e da composição do substrato de enraizamento. *Revista Árvore*, Viçosa. v.31, 4:589-597, 2007.

Mafia, R.G.; Alfenas, A.C.; Ferreira, E.M.; Zarpelon, T.G.; Siqueira, L. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. *Revista Árvore*, Viçosa. v.29, 6:843-851, 2005.

Marenco, R.A.; Lopes, N.F. *Fisiologia Vegetal: Fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral*, Editora UFV. Viçosa, MG. 451, 2005.

Marenco, R.A.; Siebke, K.; Farquhar, G.D.; Ball, M.C. Hydraulically based stomatal oscillations and stomatal patchiness in *Gossypium hirsutum*. *Functional Plant Biology*, 33(12):1103-1113, 2006.

Nardi, S.; Carletti, P.; Pizzeghello, D.; Muscolo, A. Biological Activities of humic substances. In: Senesi N, Xing B, Huang PM (eds) *Biophysico-chemical process involving natural nonliving organic matter in environmental systems*. Wiley, New Jersey, 305–340, 2009.

Nasir, S.; Sarfaraz, T.B.; Verheyen, T.V.; Chaffee, A.L. Structural Elucidation of Humic Acid Extracted from Pakistani Lignite Using Spectroscopic and Thermal Degradative Techniques. *Fuel Process. Technol. J.* 92:983-991, 2011.

Parrado, J.; Bautista, J.; Romero, E.J.; García-Martínez, A.M.; Friaza, V.; Mejada, M. Production of a carob enzymatic extract: potential use as a biofertilizer. *Bioresour. Technol.* 99:2312-2318, 2008.

Parrado, J.; Escudero, M.L.; Friaza, V.; González-Miret, M.L.; García-Martínez, A.M.; Bautista, J.; Heredia, F.J. Enzymatic vegetable extract with bio-active components: influence of fertiliser on the colour and anthocyanins of red grapes. *J. Sci. Food Agric.* 87:2310-2318, 2007.

Piccolo, A. The Supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Adv. Agron.* 75:57-134, 2002.

Piccolo, A.; Nardi, S.; Cancheri, G. Macromolecular changes of soil humic substances induced by interactions with organic acids. *Eur. J. Soil Sci.* 47:319-328, 1996.

Piccolo, A.; Spiteller, M. Electrospray ionization mass spectrometry of terrestrial humic substances and their size fractions. *Anal. Bioanal. Chem.* 377:1047-1059, 2003.

Plaza, C.; Brunetti, G.; Senesi, N.; Polo, A. Molecular and quantitative analysis of metal ion binding to humic acids from sewage sludge and sludgeamended soil by fluorescence spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 40:917-923, 2006.

Qualls, R.G. Biodegradability of humic substances and other fractions of decomposing leaf litter. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 68:1705-1712, 2004.

Ramesh, C.R.; Bhag, M.; Hazara, C.R.; Sukanya, D.H.; Ramamurthy, V.; Chakraborty, S. Status of Stylosanthes development in other countries. III. Stylosanthes development and utilization in India. *Trop. Grasslands.* 31:467-475, 1997.

Ramos, A.C.; Dobbss, L.B.; Santos, L.A.; Fernandes, M.F.; Olivares, F.L.; Aguiar, N.O.; Canellas, L.P. Humic matter elicits proton and calcium fluxes and signaling dependent on Ca²⁺-dependent protein kinase (CDPK) at early stages of lateral plant root development. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 2:1-12, 2015.

Reddy, N.V.; Das, R.B.; Rao, D.G.; Korwar, G.R. Role of stylo legume (*S. hamata*) in improving soil fertility and crop production in Alfisols of semiarid tropics. *Ind. J. Dryland Agric. Res. Dev.* 4:48-54, 1989.

Ritchie, J.D.; Perdue, E.M. Proton-binding study of standard and references fulvic acids, humic acids, and natural organic matter. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 67:85-96, 2003.

Romero, E.J.; Bautista, J.; García-Martínez, A.; Cremades, O.; Parrado, J. Bioconversion of corn distiller's dried grains with solubles (CDDGS) to extracellular proteases and peptones. *Process Biochem.* 42:1492-1497, 2007.

Russo, R.O.; Berlyn, G.P. The use of organica biostimulants to help low input sustainable agriculture. *Journal of Sustainable Agriculture, Binghamton.* v.1, 2:19-42, 1990.

Ryabushkina, N.A. Synergism of metabolite action in plant responses to stress. *Russian Journal of Plant Physiology, Moscow.* v.52, 4:547-552, 2005.

Sacchetti, G.; Maietti, S.; Muzzoli, M.; Scaglianti, M.; Manfredini, S.; Radice, M.; Bruni, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry,* 91:621-632, 2005.

Sandi, J.T.T.; Blanco, R.F. Atividade inseticida do óleo essencial obtido de eucalipto, *Eucalyptus globulus* Labill (Myrtaceae), sobre o gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais*, (Coleoptera: curculionidae), *Biology & Health Journal, Dois Vizinhos.* v.1, 1:101-106, 2007.

Sawkins, M.C. Geographic and genetic studies of *Stylosanthes* Sw. species. Tese de doutorado, University of Birmingham, Inglaterra, 184, 1999.

Schultze-Kraft, R.; Reid, R.; Williams, R.J.; Coradin, L. The existing *Stylosanthes* collection. Academic Press, Sydney, Australia. 23-28, 1984.

Senesi, N.; Plaza, C.; Brunetti, G.; Polo, A. A comparative surveys of recent results on humic-like fractions in organic amendment and effect on native soil humic substances. *Soil Biol. Biochem.* 39:1244-1262, 2007.

Serafini, L.A.; Cassel, E. Produção de óleos essenciais: uma alternativa para a agroindústria nacional. Em: Serafini, L.A.; Barros, N.M.; Azevedo, J.L. *Biotecnologia na agricultura e na agroindústria*. Guaíba: Agroindústria. 333-377, 2001.

Sicher, R.C.; Bunce, J.A. Adjustments of net photosynthesis in *Solanum tuberosum* in response to reciprocal changes in ambient and elevated growth CO₂ partial pressures. *Physiol. Plant.* 112:55–61, 2001.

Silva, M.A.C.; Santos, W.C.; Simoura, N.T.; Tesch, J.A.; Ruas, K.F.; Colodete, C.M.; Tannure, F.P.; Barbirato, J.O.; Ramos, A.C.; Dobbss, L.B. Ácidos húmicos de vermicomposto estimulam o crescimento in vitro de plântulas de *Cattleya warneri* (Orchidaceae) *Rodriguésia* 66(3):759-768, 2015.

Silva, P.H.M.; Brito, J.O.; Silva Junior, F.G. Potential of eleven *Eucalyptus* species for the production of essential oils. *Scientia Agrícola*, Piracicaba. v.63, 1:85-89, 2006.

Simpson, A.J. Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. *Magnetic Res. Chem.* 40:572-582, 2002.

Snedaker, S. Ecological studies on tropical moist forest succession in eastern lowland Guatemala. Ph.D. Dissertation, University of Florida, Gainesville. 131, 1970.

Steffen, R.B.; Antonioli, Z.I.; Bosenbecker, V.K.; Steffen, G.P.K.; Lupatini, M.; Campos, Â.D.; Gomes, C.B. Avaliação de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de *Meloidogyne graminicola* em arroz irrigado. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba. v.32, 2:127-135, 2008.

Steffen, R.B.; Antonioli, Z.I.; Steffen, G.P.K. Efeito estimulante do óleo essencial de eucalipto na germinação e no crescimento inicial de mudas de *Eucalyptus grandis*. *Pesquisa Florestal Brasileira*, Colombo. v.30, 63:199-206, 2010.

Stevenson, F.J. Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions. Wiley, New York, 1994.

Takahashi, T.; Kokubo, R.; Sakaino, M. Antimicrobial activities of Eucalyptus leaf extracts and flavonoids from Eucalyptus maculate. Letters in Applied Microbiology, 39:60-64, 2004.

Tan, K.H.; Tantiwiranond, D. Effect of Humic Acids on Nodulation and Dry Matter Production of Soybean, Peanut, and Clover. SOIL SCI. SOC. AM. J., 47, 1983.

Tergas, L.E. and Popenoe, H.L. Young secondary vegetation and soil interactions in Izabel, Guatemala. Plant Soil, 34:675-690, 1971.

Thomas R.J.; Asakawa N.M. Decomposition of leaf litter from tropical forage grasses and legumes. Soil Biology and Biochemistry 25:1351-1361, 1993.

Toky, O.P.; Ramakrishnan, P.S. Secondary succession following slash and burn agriculture in north-eastern India. I. Biomass, litterfall, and productivity. J. Ecol., 71:735-745, 1983.

Valéria, S.M.; Ruth, N.T.T.; Vanessa, B.P. Antimicrobial activity of Eucalyptus globulus oil, xylitol and papain: a pilot study. Rev Esc Enferm USP, 49(2):215-219, 2015.

Vander Stappen, J.I.; Weltjens, S.; Gama, L.; Volckaert, G. Genetic diversity in Mexican *Stylosanthes humilis* as revealed by AFLP, compared to variability of *S. humilis* accessions of South American origin. Euphytica, 113:145-154, 2000.

Vinceslas-Akpa, M.; Loquet, M. Organic matter transformation in lignocellulosic waste products composted or vermicomposted (*Eisenia foetida* Andrei): chemical analysis and ¹³C CPMAS NMR spectroscopy. Soil Biol. Biochem. 29:751-758, 1997.

Williams R.J.; Reid R.; Schultze-Kraft R.; Souza Costa N.M.; Thomas B.D. Natural distribution of Stylosanthes. Em: Stace HM, Edye LA, editors. The biology and agronomy of Stylosanthes. Sydney: Academic Press. 73-101, 1984.

Xingfeng, Z.; Hanping, X.; Zhian, L.; Ping, Z.; Bo, G. Potential of four forage grasses in remediation of Cd and Zn contaminated soils. *Bioresource Technology*. 101:2063-2066, 2010.

Zandonadi, D.B., Canellas, L.P., Façanha, A.R. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta*. 225:1583-1595, 2007.

Zhi-lin, Y.; Chuan-chao, D.; Jian-qing, C. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. *African Journal of Biotechnology*. v.6, 11:1266-1271, 2007.