

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

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADE DE SUBSTÂNCIAS
HÚMICAS ISOLADAS DO ECOSISTEMA MANGUEZAL**

FERNANDA PAVESI TANNURE

VILA VELHA
MARÇO / 2013

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

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADE DE SUBSTÂNCIAS
HÚMICAS ISOLADAS DO ECOSISTEMA MANGUEZAL**

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

FERNANDA PAVESI TANNURE

VILA VELHA
MARÇO/ 2013

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

T167c Tannure, Fernanda Pavesi.

Caracterização química e bioatividade de substâncias húmicas isoladas do ecossistema manguezal / Fernanda Pavesi Tannure. – 2013.

65 f. : il.

Orientador: Leonardo Barros Dobbss.

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) – Universidade Vila Velha, 2013.

Inclui bibliografias.

1. Ecologia dos manguezais – Espírito Santo (Estado). 2. Humus. 3. Manguezais – Vitória (ES). I. Dobbss, Leonardo Barros. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 577.698

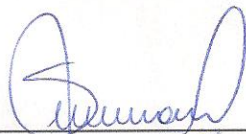
FERNANDA PAVESI TANNURE

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADE DE SUBSTÂNCIAS
HÚMICAS ISOLADAS DO ECOSSISTEMA MANGUEZAL**

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

Aprovado em 27 de Março de 2013.

Banca Examinadora:



Prof.ª. Dr.ª. Silvia Fanie Matsumoto - UFES



Prof. Dr. Flávio Couto Cordeiro - UFRRJ



Prof. Dr. Leonardo Barros Dobbss - UVV
(Orientador)

Dedico este trabalho aos meus pais, Elenice Pavesi e Luiz Valentim Tannure, a quem tudo devo e sou eternamente grata. A minha irmã Bruna Pavesi Tannure. À minha madrinha Miriam da Penha Pavesi, meu tio José Maria Izoton e minha tia Maria Pavesi Alves.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Vila Velha (UVV), pelo ensino, pesquisa e extensão.

Aos laboratórios de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LMAB) e Ictiologia Aplicada da UVV, ao Núcleo de desenvolvimento de insumos biológicos para agricultura (NUDIBA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) e ao Departamento de química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) pelo apoio na realização das análises.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo - FAPES nº 53294424/2011, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Dr. Leonardo Barros Dobbss, pois para alcançarmos alguns objetivos na vida precisamos de garra, empenho, dedicação e conhecimento. Características que devem ser inerentes a nós. Mas existe também o apoio, o respeito e a confiança. Neste percurso de grandes obstáculos e conquistas, só foi possível chegar até aqui devido ao orientador, professor e acima de tudo pessoa que você é.

Ao Professor Dr. Alessandro Coutinho Ramos, pelo incentivo aos estudos e dedicação à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas.

Aos Professores Dr. Anderson Lopes Peçanha e Dra. Renata Venturim Fontes, pelas críticas e sugestões a este trabalho.

Às minhas “irmãs”, Jordana Borini e Stephanie Aléssio, pelo carinho, atenção, conselhos e por não me deixar esquecer o sentido da amizade.

Aos colegas de laboratório Victor Libardi, Izabela Salles, Bárbara Duarte, Hilton, Maísa Duarte, Juliano Barbirato, Katherine Fraga, Karla Stephanie, Cintia Bullus, Andrea Prenholatto, Vinícius Dadalto, Graciele Maciel e Lenize Malheiros pela ajuda nas coletas de sedimentos e análises em laboratório.

Aos amigos Giovani Izoton, Jordana Borini, Stephanie, Alexandra Frossard, Juliana Melo, Henrique Filqueiras, Werther Krolling, Wallace Kiffer, Victor Libardi, Izabela Salles, Bárbara Duarte e Cinthia Casotti, pela ajuda, incentivo e momentos de descontração.

À Secretaria Municipal de Meio Ambiente da Prefeitura de Vitória pelo suporte a pesquisa realizada na Estação Ecológica Municipal Ilha do Lameirão.

Aos colegas, Lincon, Leoni e Joel Nery pela ajuda indispensável e essencial para a realização do trabalho em campo e confecção dos mapas cartográficos.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Mapa dos limites das Estação Ecológica Municipal Ilha do Lameirão – EEMIL. 11
- Figura 2** (A) Curvas de titulação potenciométrica (NaOH 0,1 mol L⁻¹) e (B) Curvas de derivação [(dv/dpH)/pH] usada para estimar a capacidade tampão de ácidos húmicos das áreas estudadas (Canal dos Escravos - CE e Maria Ortiz - MOr). 16
- Figura 3** (A) Curvas de titulação potenciométrica (NaOH 0,1 mol L⁻¹) e (B) Curvas de derivação [(dv/dpH)/pH] usada para estimar a capacidade tampão de ácidos fúlvicos das áreas estudadas (Canal dos Escravos - CE e Maria Ortiz - MOr). 18
- Figura 4** (A) Curvas de titulação potenciométrica (NaOH 0,1 mol L⁻¹) e (B) Curvas de derivação [(dv/dpH)/pH] usada para estimar a capacidade tampão de substâncias húmicas das áreas estudadas (Canal dos Escravos - CE e Maria Ortiz - MOr). 18
- Figura 5** Espectros da região do infravermelho obtidos com transformada de Fourier dos ácidos húmicos (AH) isolados das diferentes áreas estudadas (MOr e CE). 24
- Figura 6** Espectros da região do infravermelho obtidos com transformada de Fourier dos ácidos fúlvicos (AF) isolados das diferentes áreas estudadas (MOr e CE). 25
- Figura 7** Espectros da região do infravermelho obtidos com transformada de Fourier das substâncias húmicas (SH) isoladas das diferentes áreas estudadas (MOr e CE). 26
- Figura 8** Plântulas de *Solanum lycopersicum*, tratadas na ausência (CONT) e na presença de SH, AH e AF das duas áreas estudadas. (A) área do Canal dos Escravos - CE. (B) área de Maria Ortiz - MOr. 28
- Figura 9** Efeito dos AH (4,24 mM C L⁻¹), AF (4,33 mM C L⁻¹) e SH (4,89 mM C L⁻¹) da área do Canal dos Escravos (CE) e dos AH (4,57 mM C L⁻¹), AF (4,51 mM C L⁻¹) e SH (4,84 Mg C L⁻¹) da área de Maria Ortiz (MOr) sobre o sistema radicular de *Solanum lycopersicum*. Dados do número de raízes laterais (A); peso fresco radicular (B); peso fresco da parte aérea (C); peso seco radicular (D) e peso seco da parte aérea (E). Os resultados representam a média de

10 plantas. As medidas foram normalizados em relação ao controle (CONT=100%). Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste DMS $P < 0,05$. 30

Figura 10 Plântulas de *Zea mays*, tratadas na ausência (CONT) e na presença de SH, AH e AF das duas áreas estudadas. (A) Área do Canal dos Escravos - CE. (B) área de Maria Ortiz - MOr. 32

Figura 11 Efeito dos AH (4,24 mM C L⁻¹), AF (4,33 mM C L⁻¹) e SH (4,89 mM C L⁻¹) da área do Canal dos Escravos (CE) e dos AH (4,57 mM C L⁻¹), AF (4,51 mM C L⁻¹) e SH (4,84 mM C L⁻¹) da área de Maria Ortiz (MOr) sobre o sistema radicular de *Zea mays*. Dados do número de raízes laterais (A); peso fresco radicular (B); peso fresco da parte aérea (C); peso seco radicular (D) e peso seco da parte aérea (E). Os resultados representam a média de 10 plantas. As medidas foram normalizados em relação ao controle (CONT=100%). Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste DMS $P < 0,05$. 34

Figura 12 (A) Medida de acidez em solução de plântulas de milho tratadas com AH (4,24 mg C L⁻¹) da área do Canal dos Escravos (CE) e AH (4,57 mg C L⁻¹) da área de Maria Ortiz (MOr). (B) Extrusão de H⁺ por grama de massa seca de raiz de plântulas de milho, possivelmente associada ao estímulo das bombas de H⁺ pelos AH. 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sistemas tampão presentes nos ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e substâncias húmicas solúveis das áreas do Canal dos Escravos e de Maria Ortiz.	19
Tabela 2	Composição elementar e relações atômicas de ácidos húmicos, fúlvicos e substâncias húmicas isoladas das duas áreas estudadas (Maria Ortiz - MOr e Canal dos Escravos - CE).	20
Tabela 3	Relação E_4/E_6 e intensidade de fluorescência de ácidos húmicos, fúlvicos e substâncias húmicas das áreas estudadas (Canal dos Escravos - CE e Maria Ortiz - MOr).	22
Tabela 4	Equações de regressão; coeficientes de determinação da regressão (R^2); desvios padrão da regressão (DP), níveis de significância da regressão (valores- p) e doses ótimas para o número de raízes laterais emergidas em plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i> L. (tomate) após tratamento com diferentes doses de C (mM C L^{-1}) de AH, AF e SH da área do Canal dos Escravos (CE) e Maria Ortiz (MOr).	29
Tabela 5	Equações de regressão; coeficientes de determinação da regressão (R^2); desvios padrão da regressão (DP), níveis de significância da regressão (valores- p) e doses ótimas para o número de raízes laterais emergidas em plântulas de <i>Zea mays</i> L. (milho) após tratamento com diferentes doses de C (mM C L^{-1}) de AH, AF e SH da área do Canal dos Escravos (CE) e Maria Ortiz (MOr).	33

RESUMO

TANNURE, Fernanda Pavesi, M.Sc., Universidade Vila Velha - ES, março de 2013.
Caracterização química e bioatividade de substâncias húmicas isoladas do ecossistema manguezal. Orientador: Dr. Leonardo Barros Dobbss.

Os manguezais são ecossistemas com importância ecológica, social e econômica que vêm sofrendo intensa destruição. Os sedimentos dos manguezais são ricos em matéria orgânica (MO) e as substâncias húmicas (SH) ali presentes apresentam funções importantes. O presente trabalho teve como objetivo avaliar quimicamente e comparar a atividade biológica das substâncias húmicas (SH), ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF) isolados de duas áreas de manguezal localizadas no interior da Estação Ecológica Municipal Ilha do Lameirão (EEMIL), levando em consideração o grau de interferência antrópica de cada região. Os sedimentos foram coletados em duas áreas, Maria Ortiz (MOr) - alto grau de interferência antrópica e Canal dos Escravos (CE) - baixo grau de interferência antrópica. Para determinar o grau de estabilidade estrutural da MO foram realizadas análises da acidez dos materiais húmicos por titulação potenciométrica e as análises de composição elementar, relação E_4/E_6 , intensidade de fluorescência e infravermelho (IV) foram utilizadas para determinar o grau de humificação da MO. A atividade biológica dos materiais húmicos foi realizada utilizando-se plântulas de tomate e milho. O método de medida de acidez em solução foi utilizado para determinar uma possível associação da atividade dos AH sobre a atividade das H^+ -ATPases. Os resultados obtidos indicaram que a MO presente na área do CE apresenta maior quantidade de sistemas tampão, quando comparados com a área MOr, indicando uma maior estabilidade estrutural da MO. Valores mais altos da relação C/N foram encontrados nos materiais húmicos da área de MOr, quando comparados com os da área CE. O índice de fluorescência apresentou valores mais altos nos materiais húmicos da área MOr e a relação E_4/E_6 apresentou valores mais baixos nos materiais húmicos da área MOr. As bandas de absorção do espectro de IV indicaram similaridades com relação a funcionalidade química dos materiais húmicos, no entanto pôde-se perceber nitidamente diferenças entre as áreas (CE e MOr) tanto nos espectros dos AH quanto dos AF e SH. Todos os materiais húmicos isolados de MOr e CE promoveram aumento no número de raízes laterais emergidas em tomate e milho, quando comparados com o tratamento controle. Os materiais húmicos da área CE apresentaram tendência de aumento na atividade biológica quando comparado com MOr, com exceção dos AH sobre a atividade biológica de tomate e dos AF sobre a atividade biológica do milho. Observou-se um aumento expressivo no valor da acidez quando adicionada a melhor dose de AH do CE à solução de cultivo. Constata-se com este trabalho que existe diferença entre as características químicas avaliadas e a atividade biológica dos diferentes materiais húmicos. Evidencia-se que a atividade antrópica altera a qualidade da MO dos sedimentos de manguezal, o que pode vir a interferir na sobrevivência e desenvolvimento das florestas de mangue.

Palavras-chave: mangue, matéria orgânica, análises químicas e espectroscópicas.

ABSTRACT

TANNURE, Fernanda Pavesi, Universidade Vila Velha – ES. March, 2013. **Chemical evaluation and biological activity of humic materials isolated from the mangrove ecosystem.** Adviser: Prof. Dr. Leonardo Barros Dobbss.

Mangroves are ecosystems with ecological, social and economic importance that's suffering intense destruction. The mangrove sediments are rich in organic matter (MO) and the humic substances (HS) found there has important functions. This study aimed to evaluate chemically and compare the biological activity of HS, AH and AF isolated from two mangrove areas located at the Ilha do Lameirão Municipal Ecological Station (EEMIL), considering the human interference degree in each region. The sediments were collected in two specific areas inside the EEMIL, a high anthropogenic interference (Maria Ortiz - MOr) and a low anthropogenic interference (Canal dos Escravos - CE). Analyses were conducted to determine the structural stability degree of MO through the acidity of the humic material. Those analyses were conducted by potentiometric titration. Elemental composition analyses, ratio E_4/E_6 , fluorescence and infrared (IV) intensity were used to determine the MO humification degree. The biological activity of humic materials was performed using tomato and corn seedlings. We also conducted the acidity in solution measurement method to determine a possible association of AH activity on the H⁺-ATPases activity. The results obtained in this study indicates that MO present in the CE area has greater amount of buffering systems, when compared to MOr area, indicating a higher structural stability of the MO. Higher values of C/N ratio were found in AH (12.5), AF (6.3) and SH (6.4) at MOr area, when compared with AH (11.9), AF (4,5) and SH (6.4) at the CE area. The fluorescence index showed higher values in AH (133.07), AF (100.04) and HS (104.86) at the MOr area and E_4/E_6 ratio values were also lower in AH (4.1), AF (7.0) and HS (5.8) at the same area. The absorption bands of the IV spectrum showed similarities within humic materials chemical functionality, however it were clearly difference between areas (CE and MOr) both in AH and SH, AF spectra. All humic materials isolated from EC and MOr led to an increase in number of lateral roots emerged in tomato and corn when compared to the control. The humic materials at CE area showed an increase tendency of biological activity when compared with MOr, with the exception of AH on the biological activity of tomato and AF on the biological activity of corn. We observed a significant increase in the acidity values when added the best dose of CE AH on the culture solution. This study showed there are differences between chemical properties and biological activity evaluated in the different humic materials. It is evident that human activity alters the MO mangrove sediments quality, which might interfere on the survival and development of mangrove forests.

Key words: mangrove, organic matter and spectroscopic, chemical analysis, humic substances.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. Introdução.....	1
2. Fundamentação teórica.....	3
2.1. Extensão, composição florística e o sedimento das florestas de mangue.....	3
2.2. Características estruturais das substâncias húmicas.....	4
2.3. Características químicas das substâncias húmicas.....	5
2.4. Atividade biológica das substâncias húmicas.....	7
3. Hipótese.....	9
4. Objetivos.....	10
5. Material e métodos.....	11
5.1. Área de estudo.....	11
5.2. Coleta dos sedimentos.....	11
5.3. Extração das SH das amostras dos sedimentos das florestas de mangue.....	12
5.4. Caracterização química e espectroscópica dos materiais húmicos solúveis.....	13
5.4.1. Determinação da acidez dos materiais húmicos por titulação potenciométrica.....	13
5.4.2. Composição elementar dos materiais húmicos.....	13
5.4.3. Espectroscopia no ultravioleta e no visível.....	13
5.4.4. Espectroscopia na região do infravermelho.....	14
5.5. Ensaio biológicos.....	14
5.5.1. Crescimento das plantas e tratamento com os materiais húmicos (avaliação do desenvolvimento inicial de <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Zea mays</i>).....	14
5.5.2. Avaliação do crescimento radicular.....	14
5.5.3. Medida de acidez em solução possivelmente associada à atividade dos materiais húmicos sobre as H ⁺ -APTases.....	15
5.6. Delineamento experimental e análise estatística.....	15
6. Resultados e discussão.....	16

6.1. Avaliação química e espectroscópica dos materiais húmicos solúveis.....	16
6.1.1. Determinação da acidez das substâncias húmicas por titulação potenciométrica.....	16
6.1.2. Composição elementar e espectroscópica na região UV-Vis	19
6.1.3. Espectroscopia na região do infravermelho (IV).....	22
6.2. Atividade biológica das substâncias húmicas.....	27
6.2.1. Desenvolvimento inicial de plântulas de <i>Solanum lycopersicum</i>	27
6.2.2. Desenvolvimento inicial de plântulas de <i>Zea mays</i>	31
6.3. Medida de acidez em solução possivelmente associada à atividade dos AH sobre as H ⁺ -ATPases	35
7. Conclusões e considerações finais.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
ANEXOS.....	48

1. INTRODUÇÃO

O manguezal é classificado como área de preservação permanente (APP) desde 1965 pela Lei nº 477 e essa classificação permanece em vigor no Novo Código Florestal (Lei nº 12.651 de 2012). Apesar disto, a destruição desta APP vem ocorrendo em taxas alarmantes, mesmo diante da sua importância na manutenção da produtividade dos ecossistemas costeiros e dos diversos esforços para conter essa devastação (Lal, 2002). É imperativa a necessidade de estudos mais aprofundados de um dos ecossistemas mais ameaçados do planeta, o qual, na grande Vitória, representa uma importante fonte de subsistência de uma parcela representativa da população.

A matéria orgânica (MO) e seu principal componente - as substâncias húmicas (SH) - presentes nos sedimentos de manguezais apresentam funções importantes tais como: reduzir a toxidez de metais pesados nas plantas, ciclagem dos nutrientes do substrato e servir como sequestro do carbono atmosférico (Torrico *et al.*, 2013). O papel das SH na sustentação da vida no planeta origina-se de sua importância na bioquímica do carbono (C) orgânico e relação com a emissão de gás carbônico (CO₂) atmosférico, no destino de poluentes e no crescimento vegetal (Piccolo, 1996). Cerca de 95% da MO acumulada na superfície do planeta é constituída de SH (Hayes & Malcolm, 2001), as quais não possuem características bioquímicas definidas. É possível separar as frações SH de acordo com sua solubilidade em: ácidos fúlvicos (AF - solúveis em meio aquoso ácido ou básico), ácidos húmicos (AH - solúveis em meio alcalino que quando acidificado a valores de pH menor que 2,0 floculam) e huminas (H - fração relativamente insolúvel ou residual)(Canellas & Santos, 2005).

A eficiência da estimulação biológica vegetal depende da natureza química das SH. No entanto, a dificuldade de aplicar conceitos clássicos da química, tais como, fórmula empírica, molecular ou estrutural, configuração e conformação molecular para as SH torna-se uma barreira para o entendimento da natureza química desse material complexo. Os métodos clássicos de análise (e.g. determinação da composição elementar e comportamento espectroscópico) providenciaram avanços notórios, mas foram incapazes de apresentar uma fórmula empírica precisa ou capaz de prever o comportamento da sua complexidade química em solução (Dobbss, 2011).

Algumas tentativas de ajustamento entre a estrutura e a atividade das SH, feitas até agora, produziram resultados contrastantes. Por exemplo, Piccolo *et al.* (1992) correlacionaram positivamente o conteúdo de grupos carboxílicos com a atividade de enzimas. Canellas & Façanha, (2004) observaram que materiais húmicos com alto grau de humificação, avaliado pela composição elementar, acidez total e relação E_4/E_6 , apresentaram maior bioatividade. Por outro lado, Canellas *et al.* (2008 e 2009) e Dobbss *et al.* (2010) mostraram que SH com maior grau de hidrofobicidade apresentam maior capacidade de estimular sistemas biológicos.

Os mecanismos envolvidos na estimulação do crescimento radicular promovido por SH estão associados à modulação de enzimas relacionadas ao metabolismo energético vegetal necessário à absorção de nutrientes (Canellas *et al.*, 2002; Zandonadi *et al.*, 2007; Zandonadi *et al.*, 2010). Estas enzimas são as bombas de prótons (H^+) da membrana plasmática (H^+ -ATPase). A ação das SH sobre a H^+ -ATPase de membrana plasmática se reflete no aumento da emissão de raízes, da biomassa radicular e da absorção de nutrientes (Pinton *et al.*, 1999; Canellas *et al.*, 2002; Zandonadi *et al.*, 2007). Esta enzima é uma excelente marcadora bioquímica e molecular da absorção de nutrientes, estresses ambientais e crescimento radicular (Canellas & Santos, 2005). Portanto, sua utilização como marcadora ambiental para o monitoramento do estabelecimento inicial de plantas de mangue pode vir a ser uma ferramenta útil e inovadora no estudo de mangues preservados e para o repovoamento de áreas de manguezal degradadas.

Para identificar se há diferença entre as características químicas dos diferentes materiais húmicos (SH, AH e AF) isolados das diferentes áreas estudadas (Maria Ortiz -alto grau de interferência antrópica e Canal dos Escravos - baixo grau de interferência antrópica), e sua bioatividade sobre diferentes espécies vegetais, esta dissertação teve a intenção de caracterizar quimicamente diferentes materiais húmicos (SH, AH e AF) isolados de diferentes áreas de manguezal localizadas no interior da Estação Ecológica Municipal Ilha do Lameirão (EEMIL) e avaliar a promoção do crescimento de raízes de plântulas de *Solanum lycopersicum* (L.) e *Zea mays* (L.), bem como, o estímulo sobre a atividade da ATPase por um método novo mensurando-se a acidez da solução de cultivo (Aguiar, 2011 e Silva *et al.*, 2012) promovida pelos diferentes materiais húmicos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Extensão, composição florística e faunística e o sedimento das florestas de mangue

Característico de regiões tropicais e subtropicais e sujeito ao regime das marés, o manguezal é um ecossistema costeiro de transição entre os ambientes terrestre e marinho. Ocorrem em regiões costeiras abrigadas como estuários, baías e lagunas, e apresenta condições propícias para alimentação, proteção e reprodução para muitas espécies animais, sendo considerado importante transformador de nutrientes em matéria orgânica e gerador de bens e serviços (Schaeffer-Novelli 1995).

No ano de 2000 foi realizado o primeiro levantamento das florestas de mangue do mundo e estimou-se uma área total de 137.760 km² (Giri *et al.*, 2011). Atualmente, calcula-se menos da metade do que existia anteriormente e muito do que resta está ameaçada por ações antrópicas (UNEP, 2004).

O manguezal no Brasil ocupa uma área de 962.683 ha, o que insere o país em terceiro lugar em extensão de áreas de manguezal do mundo, atrás da Indonésia e da Austrália (Giri *et al.*, 2011). A composição florística dos manguezais do Brasil é constituída pelas espécies *Avicennia germinans* (L.) Stearn, *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechm. ex Moldenke, *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. f. e *Rhizophora mangle* (L.) (Silva *et al.*, 2005).

No Estado do Espírito Santo, o manguezal ocupa uma área aproximada de 70 km² e sua distribuição vai desde o riacho Doce, no extremo Norte do estado, até o rio Itabapoana, na divisa com o estado do Rio de Janeiro. As florestas mais extensas são encontradas no entorno da baía de Vitória e nos estuários dos rios Piraqueaçu e São Mateus (Vale & Ferreira 1998). Na capital deste estado, Vitória, o manguezal existente já ocupou grande parte do entorno da Ilha e continente no passado, entretanto, resta somente 20% deste ecossistema (aproximadamente 18 km²) (Jesus *et al.*, 2004). A composição florística das florestas de mangue deste município é constituída por três das quatro espécies encontradas no Brasil, *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechm. ex Moldenke, *Laguncularia racemosa* L. Gaertn. f. e *Rhizophora mangle* L. (Anexo 1) (Prefeitura Municipal de Vitória, 2012).

Durante a década de 1970, devido ao término das obras da Companhia Siderúrgica de Tubarão, atualmente a empresa Arcelor Mittal, e de outros

empreendimentos, a mão-de-obra desempregada ocupou o entorno da ilha construindo moradias precárias e aumentando a degradação ambiental. Na mesma época, a prefeitura de Vitória passou a despejar todo o lixo produzido pelo município (urbano, residencial, comercial, hospitalar e industrial) no manguezal, área que foi aterrada posteriormente para criação do bairro São Pedro (Prefeitura Municipal de Vitória, Lei Municipal nº 2.959/82). Em Maio de 1986 foi criada, através da Lei Municipal nº 3.326, a Reserva Biológica Municipal Ilha do Lameirão com área de aproximadamente 9 km². Em Setembro do mesmo ano esta área foi transformada em Estação Ecológica pela Lei Municipal nº 3337.

O sedimento do manguezal é conhecido por apresentar forte odor e uma textura pastosa, porém, não existe um padrão para classificar o solo ou sedimento deste ecossistema, uma vez que podem ser ácidos ou alcalinos (pH entre 5,8 – 8,5) (Alongi, 2009). Barbirato (2012) estudou os sedimentos das regiões da EEMIL e encontrou na área de Maria Ortiz predominantemente a fração areia com classificação textural franco-argilo-arenosa. A área do Canal dos Escravos predominou o silte com classificação textural fraca.

O pH do sedimento de manguezais varia devido a concentração dos componentes orgânicos e inorgânicos, regime de maré, umidade, atividade microbiológica, textura e grau de interferência antrópica (Alongi, 2009). O pH médio encontrado na EEMIL foi de 5,9 (Barbirato, 2012).

Existem problemas ambientais graves ameaçando a integridade da referida Estação Ecológica. Estudos demonstraram que o nível de elementos traço (Cu, Pb, Zn, Mn e Hg) encontra-se elevado em diferentes regiões do sistema estuarino da Ilha (Jesus *et al.*, 2004) e na área próxima ao bairro Maria Ortiz, o grande problema encontrado é a decadência e a morte de árvores de mangue, devido a extração incorreta da casca das árvores de *Rizophora mangle* e ao lançamento de resíduos domésticos na região (Barbirato, 2012).

2.2. Características estruturais das Substâncias Húmicas

As SH são o principal componente da matéria orgânica dos solos, das águas e dos sedimentos. O conceito para sua composição é muito difícil de definir devido sua origem envolver combinações de diversas vias (Hayes, 1997). Muitos dos métodos clássicos originais para compreender a natureza das SH foram baseados

na composição elementar (Hayes *et al.*, 1989) e no comportamento espectroscópico (Dobbss, 2011).

As substâncias húmicas têm sido definidas como substâncias de coloração escura compostas por macromoléculas de massa relativamente elevada (Stevenson, 1994). No entanto, Piccolo (2002) redefiniu as SH, por meio de diversas análises químicas e espectroscópicas, como uma associação supramolecular de pequenas moléculas heterogêneas estabilizadas por ligações fracas que podem ser quebradas, por exemplo, por ácidos orgânicos exsudados das raízes das plantas. Neste mesmo estudo, a fração ácidos fúlvicos (AF) foram definidos como uma associação de pequenas moléculas hidrofílicas que apresentam uma quantidade de grupamentos funcionais ácidos suficientemente grandes para se manter dispersos em qualquer valor de potencial hidrogeniônico (pH). A fração ácidos húmicos, por sua vez, foi definido como associações de materiais humificados onde predominam compostos hidrofóbicos (cadeias polimetilênicas, ácidos graxos, esteróides), que são estabilizados em pH neutro por forças hidrofílicas dispersivas. A estrutura dos ácidos húmicos cresce quando as forças das ligações de hidrogênio são aumentadas até um valor baixo de pH onde os ácidos húmicos floculam.

Essa concepção foi duramente criticada por Swift (1999), que considerou as modificações provenientes do cromatograma de exclusão por tamanho das substâncias húmicas com variação do pH de eluição, como uma consequência de artefatos produzidos pela interação polímero - gel da cromatografia. No entanto, o modelo supramolecular sugerido por Piccolo (2002) se mostrou consistente ao ser comprovado principalmente pelos estudos de Façanha *et al.* (2002).

Quando se trata de SH isoladas do ecossistema manguezal, a dificuldade aumenta ainda mais, devido à escassez de informações na literatura referente às características químicas e a atividade de tais substâncias.

2.3. Características químicas das substâncias húmicas

Por apresentar um grande número de diferentes grupos funcionais em sua estrutura, as SH apresentam uma natureza complexa. De acordo com Dobbss *et al.* (2009) a reatividade da matéria orgânica do solo e, particularmente, das substâncias húmicas (SH) está relacionada às suas propriedades eletroquímicas. A acidez depende do conteúdo de grupos funcionais oxigenados. De modo geral, a reação da matéria orgânica com íons em solução depende das características das moléculas

orgânicas (e.g., carga molecular, par de elétrons isolados, pKa, ponto isoelétrico, polaridade e massa molecular). No entanto, a avaliação dessas propriedades nas SH não é tarefa simples. São normalmente usadas para ácido as definições de Lowry e Brönsted e de Lewis. Os primeiros definiram um ácido como uma substância que libera próton (H^+) e base como àquela que aceita H^+ . Um composto pode funcionar como um ácido (ou base) somente na presença de uma base conjugada (ou ácido). Lewis definiu um ácido como uma substância que pode receber um par de elétrons para formar uma ligação covalente, e uma base como aquela que pode fornecer um elétron para formar uma ligação covalente. Portanto, para se comportar como ácido, uma molécula deve estar deficiente em elétrons e isso ocorre nos grupos funcionais das substâncias húmicas, tais como, R-COOH, OH, S-H.

Shulten e Schnitzer (1997) percorreram a história da investigação estrutural das SH e mostraram que, Fischer e Schader, em 1921, consagraram a teoria de Waksman, ou da lignina, considerando as SH como ligninas modificadas como via de estabilização das formas de carbono no solo. Esta abordagem foi revista ao observarem que o alto conteúdo de nitrogênio nas SH era proveniente da incorporação de produtos nitrogenados às ligninas, provavelmente devido à ação de ressíntese da atividade microbiana. Em 1931, Fuchs sugeriu que as SH eram constituídas pela condensação de anéis aromáticos substituídos por grupos carboxílicos e hidroxílicos.

Kononova (1982), ao analisar os dados de composição elementar, concluiu que as SH apresentam uma natureza química diferente de qualquer substância de natureza vegetal e animal. A composição elementar das SH é pouco sujeita a variações, pois, apresenta uma propriedade bastante estável, mesmo com grandes alterações no manejo dos solos (Caretta, 1995). Na maioria dos trabalhos, a porcentagem de oxigênio (O) é obtida pela diferença entre o somatório da composição de Carbono (C), Hidrogênio (H) e Nitrogênio (N), de acordo com a equação abaixo.

$$\text{Concentração de O (\%)} = 100 - \text{C\%} + \text{H\%} + \text{N\%}$$

A formação de substâncias húmicas amorfas coloidais de alto peso molecular e um aumento da coloração escura, compreendem o processo de evolução da MO do solo (Kumada, 1987). A forma de absorção de luz na região do UV-Vis pode indicar mudanças na configuração eletrônica decorrentes do processo de

humificação. Para avaliar o grau de humificação da MO é utilizada a razão entre a absorvância a 465 nm e a 665 nm, chamada de relação E_4/E_6 (Kononova, 1982).

A espectroscopia na região do infravermelho, ao contrário da espectroscopia UV-Vis, apresenta um espectro com várias bandas de absorção, atribuídas a determinadas funções orgânicas. A absorção da radiação infravermelha permite avaliar o tipo, a reatividade e o ambiente químico dos grupos funcionais oxigenados das SH (MacCarthy & Rice, 1985). Apesar de apresentar limitações para a caracterização estrutural das SH, a espectroscopia do infravermelho é muito útil para indicar a presença e o comportamento dos grupos funcionais (Stevenson, 1994).

A matéria orgânica dissolvida apresenta propriedades óticas e uma parte desse material absorve radiação luminosa e a reemite parcialmente sob a forma de fluorescência. A fluorescência foi usada, pela primeira vez, para avaliar o comportamento e o destino da fração fluorescente do carbono orgânico dissolvido em água. Uma série de parâmetros das SH, tais como, massa molar, concentração, pH, força iônica, temperatura, potencial redox e origem, determinam as propriedades de fluorescência e podem fornecer informações indiretas sobre as características moleculares e a química das SH (Sierra *et al.*, 1996). Além, de diferenciar as diversas frações humificadas do solo, uma vez que o comprimento máximo de emissão e excitação se encontram em faixas (λ) maiores para os AH em relação aos AF. É possível correlacionar a diminuição da intensidade de fluorescência, em λ menores, com o aumento da evolução da matéria orgânica humificada (Canellas & Santos, 2005).

2.4. Atividade biológica das Substâncias Húmicas

Em geral, a matéria orgânica, proporciona ao solo melhores condições de cultivo, oferecendo benefícios para o crescimento e desenvolvimento vegetal. Tal influência está diretamente envolvida com a capacidade da matéria orgânica de trocar cátions com a solução do solo aumentando a concentração de nutrientes pelo incremento na capacidade de troca de cátions (CTC). Uma série de evidências experimentais afirma que a matéria orgânica atua indiretamente em reações importantes que ocorrem no solo, como por exemplo, na detoxificação de elementos químicos indesejáveis, tais como os elementos traço (Canellas *et al.*, 1999).

O estudo da ação direta das SH sobre o metabolismo e o crescimento das plantas era voltado, principalmente, para a fração humificada considerada de menor

massa molecular, os ácidos fúlvicos (Vaughan & Malcolm, 1985). Isto porque não era possível entender como uma substância como os ácidos húmicos que apresentam um tamanho molecular maior (Cameron *et al.*, 1972) pudessem passar por poros ou espaços aparentes no apoplasto. No entanto, compostos de regulação e estimulação do crescimento vegetal, tais como os hormônios vegetais, podem estar fracamente unidos à supraestrutura das substâncias húmicas e serem liberados para a solução do solo e para a absorção das plantas por uma simples variação de pH, decorrente da exsudação de ácidos orgânicos como experimentado por Façanha *et al.* (2002).

Uma série de trabalhos tem relatado que a atividade biológica das SH é dependente de sua origem (García, 1990), concentração (Albuzio *et al.*, 1986) e tamanho molecular (Nardi *et al.*, 1998, 2000). Dentre as principais enzimas estimuladas pela ação das SH está a H⁺-ATPase de membrana plasmática que exerce um papel central no crescimento das células vegetais (Canellas & Santos, 2005). A acidificação da parede celular causada pela ativação da H⁺-ATPase de membrana plasmática, evento inicial da expansão celular conhecido como *teoria do crescimento ácido*, está associado à ação da auxina, um hormônio vegetal que ativa a H⁺-ATPase por diversos mecanismos (Morsomme *et al.*, 2000).

De acordo com Nannipieri *et al.* (1993), com a estimulação do crescimento vegetal, as SH podem influenciar positivamente o transporte de íons, facilitando a absorção; aumentar a respiração e a velocidade das reações enzimáticas do ciclo de Krebs, resultando em maior produção de energia metabólica sob a forma de ATP; aumentar o incremento da clorofila e a síntese de ácidos nucléicos e aumentar ou inibir a atividade de diversas enzimas. A absorção de íons da solução do solo pode acontecer contra ou a favor de um gradiente de concentração e, em qualquer dos casos, o gradiente de H⁺ pode exercer forte influência, quer seja energizando o transporte ativo através de transportadores tipo simporte, uniporte ou antiporte, quer seja regulando a abertura e o fechamento de alguns canais responsáveis pelo transporte passivo de íons (Façanha *et al.*, 2002).

3. HIPÓTESE

H0: Haverá diferenças entre as características químicas das SH isoladas das diferentes áreas estudadas (Maria Ortiz –área com alto grau de interferência antrópica e Canal dos Escravos – área com baixo grau de interferência antrópica), e suas atividades biológicas sobre diferentes espécies vegetais. H1: Não haverá.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar quimicamente e comparar a atividade biológica das SH, AH e AF isolados de duas áreas de manguezal localizados no interior da Estação Ecológica Municipal Ilha do Lameirão (EEMIL), levando em consideração o grau de interferência antrópica de cada região estudada.

4.1.1. Objetivos específicos

- Avaliar quimicamente as SH, AH e AF isolados das diferentes áreas de manguezal localizadas no interior da Estação Ecológica Municipal Ilha do Lameirão (EEMIL).
- Determinar a promoção do crescimento de raízes de plântulas de *Solanum lycopersicum* (L.) e *Zea mays* (L.) tratadas com as SH, AH e AF da área do Canal dos Escravos (CE) e da área de Maria Ortiz (MOr).
- Avaliar o estímulo promovido pelos diferentes AH das duas áreas estudadas sobre a atividade da ATPase por um método novo mensurando-se a acidez da solução de cultivo.

5. MATERIALE MÉTODOS

5.1. Área de estudo

O trabalho foi realizado na Estação Ecológica Municipal Ilha do Lameirão (Figura 1), localizada no Município de Vitória, estado do Espírito Santo.

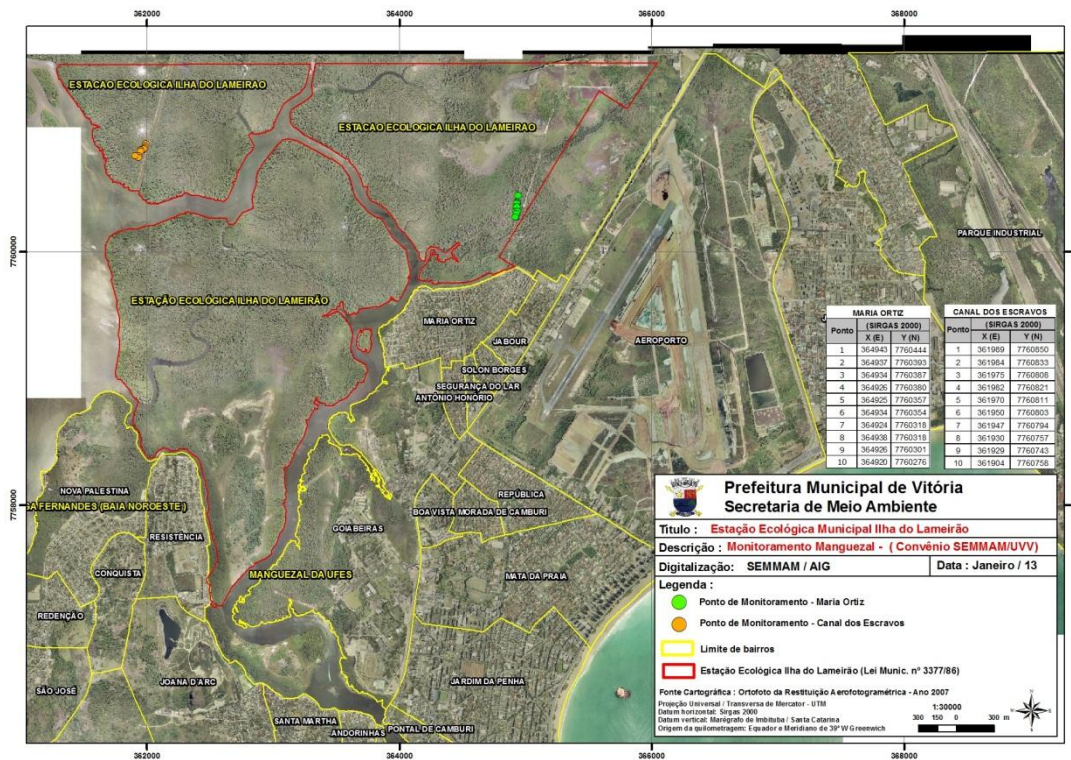


Figura 1. Mapa dos limites da Estação Ecológica Municipal Ilha do Lameirão (EEMIL).

As áreas de coleta foram escolhidas de acordo com as classes de vulnerabilidade (Anexo 2), onde a área do Canal dos Escravos (CE) (Anexo 3) apresenta baixo grau de interferência antrópica e a área de Maria Ortiz (MOr) (Anexo 4) apresenta alto grau de interferência antrópica.

5.2. Coleta dos sedimentos

Os sedimentos foram coletados, na maré baixa, no mês de Maio de 2011 e Maio de 2012 e foram respeitadas as normas de coleta de solos descrita pela Embrapa (2012).

Foram realizadas coletas de sedimento (0-20 cm de profundidade) nas duas áreas estudadas, Maria Ortiz (MOr) e Canal dos Escravos (CE), utilizando como

ferramenta de coleta o Core (10 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento). Para cada área, foram coletadas 10 amostras de sedimento com aproximadamente 500 g cada. As amostras coletadas em 2011 foram misturadas, formando uma amostra composta para cada área e os materiais húmicos extraídos foram usados para a avaliação química dos materiais. Em 2012 foram coletadas novas amostras de sedimentos que seguiram os mesmos procedimentos descritos anteriormente e os materiais húmicos extraídos foram usados para a avaliação da atividade biológica dos materiais.

5.3. Extração das SH das amostras dos sedimentos das florestas de mangue

Foram realizadas as extrações das SH alcalino-solúveis, provenientes dos sedimentos das diferentes áreas estudadas, após secagem e peneiramento.

Foi utilizado $\text{NaOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$, na razão sedimento: solvente de 1:10 (m:v), em função do maior rendimento de extração, além deste solvente ser o recomendado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) para a obtenção das frações húmicas. A extração foi repetida até a obtenção de um extrato incolor, para isso, foram necessários, em média, 5 extrações da matéria orgânica. A separação dos AH foi obtida com o abaixamento do pH da solução até 1,0 com $\text{HCl } 6,0 \text{ mol L}^{-1}$. A redissolução e precipitação foram repetidas três vezes. Os AH foram lavados com água deionizada até teste negativo com AgNO_3 . Em seguida, os AH foram dializados contra água em membranas com poros de 14 kDa e secos em estufa. O AF produzido com a acidificação do meio alcalino foi colocado numa coluna preenchida com resina XAD-8 (36 g mL^{-1} de solução). A coluna foi lavada com dois volumes de água destilada e os AF retidos na coluna, foram eluídos com uma solução de $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, a solução alcalina contendo AF foi dializada contra água em membranas com poros de 700 Da e secos em estufa à 40°C .

5.4. Caracterização química e espectroscópica dos materiais húmicos solúveis

5.4.1. Determinação da acidez dos materiais húmicos por titulação potenciométrica

As soluções aquosas experimentais de SH, AH e AF foram preparadas com água destilada e tituladas com NaOH isento de CO₂ (água destilada foi fervida) à temperatura ambiente. Amostras de 50 mg L⁻¹ das SH, AH e AF foram tituladas com NaOH 0,1 mol L⁻¹ até pH 11 (Anexo 5). A força iônica foi mantida constante com NaCl 0,01 mol L⁻¹. Os resultados foram tratados com o programa Origin para obtenção das curvas de derivação (Dobbss *et al.*, 2006).

5.4.2. Composição elementar dos materiais húmicos

A composição elementar foi realizada em analisador elementar automático (Perkin Elmer 2400) com amostras de 4 mg de AH, AF e SH. O conteúdo de oxigênio foi determinado por diferença, descontando os teores de cinzas e de umidade.

5.4.3. Espectroscopia na região no Ultravioleta - Visível (UV-Vis)

A intensidade de fluorescência foi obtida em solução aquosa de SH, AH e AF na concentração de 20 mg L⁻¹ equilibrada a 25°C e pH = 8. Utilizou-se um espectrofotômetro Molecular Devices Spectra Max 190 e as condições experimentais utilizadas foram as mesmas indicadas por Milori *et al.* (2002).

A avaliação do grau de humificação das SH por espectroscopia na região do visível foi realizada pela razão obtida com a absorbância entre 465 e 665 nm (relação E₄/E₆). Para isso, foi utilizada uma solução aquosa de SH, AH e AF pesando-se 4 mg dos materiais húmicos e adicionando 10 mL de NaHCO₃ 0,05 mol L⁻¹ (Rodda *et al.*, 2006).

5.4.4. Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

A espectroscopia na região do infravermelho das SH solúveis foi realizada na faixa de 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , utilizando-se pastilhas com 1 mg dos materiais húmicos em 100 mg de KBr, num aparelho Brunner IFS 55.

5.5. Ensaio Biológicos

5.5.1. Crescimento das plantas e tratamento com os materiais húmicos (Avaliação do desenvolvimento inicial de *Solanum lycopersicum*, *Zea mays*)

Plântulas de milho (*Zea mays*) (Anexo 6) e de tomate (*Solanum lycopersicum*) (Anexo 7), cinco dias após a germinação em caixa gerbox transparente e apresentando raízes de 1,5 cm de comprimento foram transferidas para vasos e cultivadas hidroponicamente na presença e ausência (controle) dos diferentes materiais húmicos (AH, AF e SH) extraídos dos sedimentos da floresta de mangue tanto da área com grande interferência antrópica (MOr) quanto da área com pouca interferência antrópica (CE). Preliminarmente foi realizado um ensaio de dose resposta. As plantas foram tratadas com os diferentes materiais húmicos em diferentes concentrações: 0,0; 1,0; 2,0; 4,0; e 8,0 mM L⁻¹ C (pH 5,8). Cada concentração foi testada em um vaso, contendo 10 plântulas e 1 L de solução. As plântulas de milho cresceram sob estes diferentes tratamentos durante 7 dias (Canellas *et al.*, 2002) e as de tomate foram mantidas por 15 dias nos tratamentos (diferentes concentrações) (Dobbss *et al.*, 2010). Após este tempo as diferentes espécies vegetais foram coletadas para avaliação do número de raízes laterais emergidas (NRL). Após a análise de regressão foi determinada a melhor dose de estímulo das plântulas, para o NRL, através da integração da curva de dose resposta. Após o ensaio de doses, foi conduzido um novo experimento hidropônico, porém utilizando-se apenas a concentração ótima de cada material húmico.

5.5.2. Avaliação do crescimento radicular

Após o crescimento das diferentes espécies nas melhores doses obtidas dos materiais húmicos, o sistema radicular de 10 plântulas foram coletadas para a avaliação do crescimento por meio de análises do número de raízes laterais, massa

fresca e seca das raízes. As massas frescas e secas (após período de 48 horas em estufa de circulação forçada) foram obtidas através de pesagem em balança analítica de precisão.

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

A estimativa da atividade da H⁺-ATPase foi avaliada pela medição da acidez em solução (Dobbss *et al.*, 2008; Aguiar *et al.*, 2012 e Silva *et al.*, 2012) contendo plântulas de milho tratadas com os ácidos húmicos das duas áreas estudadas. Foi utilizada a melhor dose de cada AH 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 AH, estimulando o crescimento radicular e o metabolismo das plântulas. As plântulas foram submetidas ao tratamento hidropônico com e sem AH (concentrações ótimas) durante 48 horas. Após este período, foram transferidas para um recipiente com 50 mL de uma solução de CaCl₂ 2mM a pH 7,0. A acidez (pH) da solução foi medida com auxílio de um potenciômetro durante 150 minutos. As raízes foram secas em estufa de ar forçado. A quantidade de H⁺ foi expressa em extrusão de H⁺ por grama de massa seca de raiz. Apesar da acidez proporcionada pela exposição das plântulas ao AH não ser exclusivamente devido ao estímulo nas bombas de H⁺, possivelmente pode-se sugerir que este método simplificado pode ser usado no estudo dos AH fisiologicamente ativos (Aguiar *et al.*, 2011).

5.6. Delineamento experimental e análise estatística

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente ao acaso com três repetições para cada característica avaliada (tanto química quanto biológica). Foi realizada a análise da variância e as médias foram comparadas pelo teste Tukey (P<0,05) pelo programa SISVAR da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Para comparação do efeito entre as SH, AH e AF, as médias obtidas com a concentração ótima dos diferentes materiais húmicos solúveis, foram utilizadas através das plantas-controle (CONT=100%) e estabelecidas às devidas comparações.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Avaliação química e espectroscópica dos materiais húmicos solúveis

6.1.1. Determinação da acidez dos materiais húmicos por titulação potenciométrica

Substratos com maior número de sistemas tampão tendem a apresentar maior resistência à variação da carga, pois, além da quantidade de H^+ , o número de sistemas tampão definidos por unidades moleculares capazes de se dissociarem em valores diferentes de pH, afeta a capacidade tampão ácido-base de solos e sedimentos (García-Gil *et al.*, 2004). Os AH, AF e SH (Figura 2, 3 e 4) das duas áreas estudadas apresentaram capacidade tampão diferentes entre si (Tabela 1).

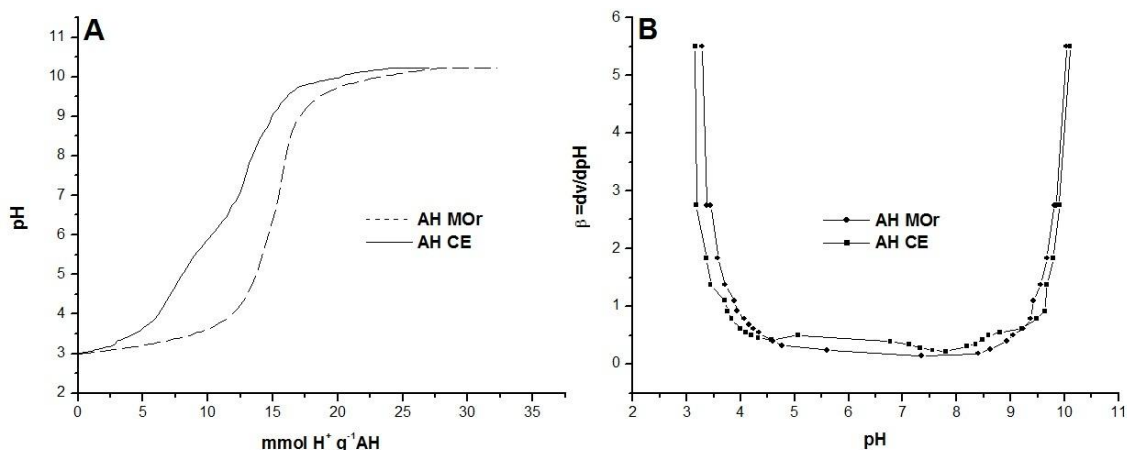


Figura 2. (A) Curvas de titulação potenciométrica (NaOH 0,1 mol L⁻¹) dos ácidos húmicos (AH) e (B) Curvas de derivação [(dv/dpH)/pH] usada para estimar a capacidade tampão dos AH das áreas estudadas (Canal dos Escravos - CE e Maria Ortiz - MOr).

Na área do CE, foram encontrados, 5 sistemas tampão nos AH, 3 sistemas tampão nos AF e 2 sistemas tampão nas SH. Essa área apresentou o maior número de sistemas tampão quando comparados com os valores encontrados para a área de MOr tanto na faixa ácida, como na faixa básica (Figuras 2, 3 e 4 e Tabela 1).

Mendonça *et al.* (2006), por meio de curvas de titulação, observaram que a fração orgânica é a principal responsável pelo poder tampão de solos. Com isso, pode-se pressupor que os materiais húmicos extraídos da área menos impactada

(Canal dos Escravos) pode apresentar uma maior resistência à variação de carga, ou seja, esta área apresenta maior estabilidade da matéria orgânica presente no sedimento (García-Gil *et al.*, 2004).

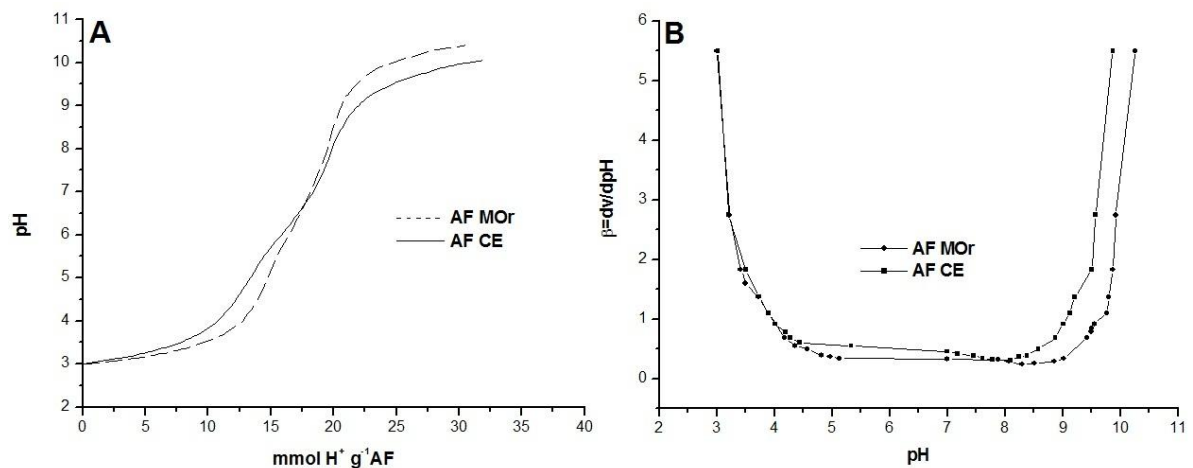


Figura 3. (A) Curvas de titulação potenciométrica (NaOH 0,1 mol L⁻¹) dos ácidos fúlvicos e **(B)** Curvas de derivação [(dv/dpH)/pH] usada para estimar a capacidade tampão dos AF das áreas estudadas (Canal dos Escravos - CE e Maria Ortiz - MOr).

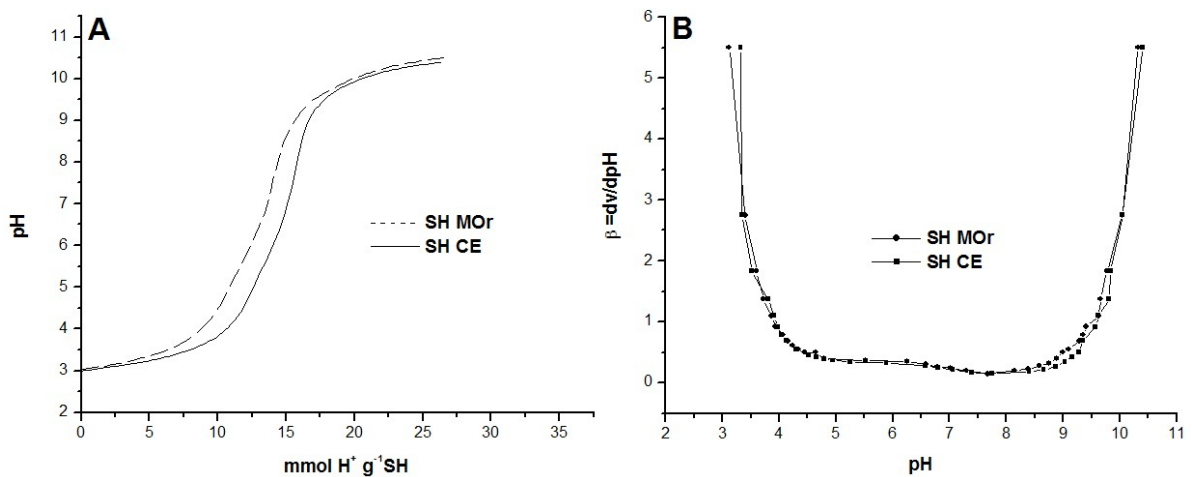


Figura 4. (A) Curvas de titulação potenciométrica (NaOH 0,1 mol L⁻¹) das substâncias húmicas e **(B)** Curvas de derivação [(dv/dpH)/pH] usada para estimar a capacidade tampão das SH das áreas estudadas (Canal dos Escravos - CE e Maria Ortiz - MOr).

Tabela 1. Sistemas tampão presentes nos ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) e substâncias húmicas (SH) solúveis das áreas do Canal dos Escravos (CE) e de Maria Ortiz (MOr).

Amostras	Nº de Sistemas tampão	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃	pKa ₄	pKa ₅
AH CE	5	2,4	3,8	5,1	8,2	9,1
AH MOr	3	2,7	3,6	4,9		
AF CE	3	2,6	3,9	5,3		
AF MOr	2		3,4	4,7		
SH CE	2			4,8	6,7	
SH MOr	1			5,2		

Foi observado ainda um número maior de sistemas tampão nos AH do que nos AF e SH, compatível com a maior heterogeneidade estrutural dos AH. (Dobbss *et al.*, 2009) Mendonça *et al.* (2006), por meio de curvas de titulação, observaram que a fração orgânica foi a principal responsável pelo poder tampão de solos e sedimentos e, que a fração ácidos húmicos foi mais importante do que a fração fúlvica para a capacidade tampão medida com NaOH.

Segundo Dobbss *et al.* (2008) experimentos deste tipo possibilitam observar que o sistema de tamponamento de cargas de solos e sedimentos é altamente dependente da concentração das SH alcalino solúveis. A MO humificada insolúvel pode ter capacidade para recobrir a superfície sólida mineral, mas o tamponamento das propriedades eletroquímicas do conjunto organomineral que forma a superfície sólida é dirigido pela presença de uma pequena fração alcalino solúvel.

6.1.2. Composição elementar e espectroscopia na região UV-Vis

A composição elementar, o conteúdo de umidade e cinzas e as relações atômicas dos AH, AF e SH das áreas estudadas são mostradas na Tabela 2. O teor de C e O encontrado nos AH da área CE foi de 526,5 e 544 g kg⁻¹, respectivamente. Já os AH da área MOr, apresentou um teor de C de 512,6 g kg⁻¹ e de O de 563,4 g kg⁻¹. O valor de C nos AF foi de 381,7 e o de O de 787,6 g kg⁻¹ na área CE. Já na área MOr, o teor de C encontrado foi de 342,8 g kg⁻¹ e o teor de O de 797,4 g kg⁻¹. As SH da área CE apresentou 260,2 g kg⁻¹ de C e 764 g kg⁻¹ de O. Em MOr os valores encontrados nas SH foi de 239,7 g kg⁻¹ de C e 767 g kg⁻¹ de O.

O teor médio mais elevado de C nos AH e menor de O é compatível com o maior grau de humificação dos AH em relação aos AF e SH (Stevenson, 1994). O teor de N elevado encontrado nos materiais húmicos, indica os tais como uma fonte importante de compostos nitrogenados. Curtin & Wen (1999) verificaram que as frações solúveis de matéria orgânica foram significativamente correlacionadas com o N-mineralizável do solo e Jacquín & Vong (1989) identificaram os AF como a principal fração alcalino solúvel responsável pela estabilização de N adicionado na forma de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. O teor relativamente elevado de N e baixo de C nos AH e AF confere valores baixos para a relação C/N dos materiais húmicos.

Tabela 2. Composição elementar e relações atômicas de ácidos húmicos, fúlvicos e substâncias húmicas isoladas das duas áreas estudadas (Maria Ortiz - MOr e Canal dos Escravos - CE).

Amostras	C	H	N	O	Umidade	Cinzas	C/N	H/C	O/C
----- g kg ⁻¹ -----									
Ácidos húmicos									
CE	526,5	67,3	51,2	544,0	93,0	66,0	11,9	1,5	0,8
MOr	512,6	70,7	48,0	563,4	81,0	82,0	12,5	1,7	0,8
Ácidos fúlvicos									
CE	381,7	64,3	99,7	787,6	150,0	100,0	4,5	2,0	1,5
MOr	342,8	46,5	63,3	797,4	20,0	180,0	6,3	1,6	1,7
Substâncias húmicas									
CE	260,2	35,2	51,9	764,0	15,0	85,0	5,9	1,6	2,2
MOr	239,7	42,4	43,4	767,0	15,0	70,0	6,4	2,1	2,4

Estudos realizados por Kononova (1982) comprovam que quanto maior a quantidade de C e N, maior é o grau de evolução dos materiais húmicos. Os resultados (Tabela 2) mostram um maior grau de evolução da matéria orgânica da área CE, quando comparados com a área MOr.

As relações atômicas de C/N, H/C e O/C, são muitas vezes utilizados para monitorar as alterações estruturais das frações húmicas e para elucidar as fórmulas estruturais das substâncias húmicas de diferentes fontes (Adani *et al.*, 2006). A relação C/N indica o grau de incorporação do N e o grau de humificação na estrutura das SH (Stevenson, 1994; Lu *et al.*, 2000). A razão O/C é normalmente utilizada para estimar a abundância de oxigênio contido em grupos funcionais (He *et al.*, 2008) e a razão H/C é utilizada como índice de aromaticidade e alifaticidade da matéria orgânica (Stevenson, 1994).

Os valores de C/N encontrados nos AH (11,9), AF (4,5) e SH (5,9) (Tabela 2) da área do Canal dos Escravos, foram menores quando comparados com a área de Maria Ortiz que apresentou, nos AH 12,45, nos AF 6,32 e nas SH 6,45. Isso pode indicar um maior grau de humificação na estrutura dos AH, AF e SH da área de Maria Ortiz. A relação O/C mostrou valores duas vezes maior nos AF do que nos AH extraídos das diferentes áreas avaliadas, compatível com a maior acidez desses compostos, que permite sua solubilidade em qualquer valor de pH do meio.

Os resultados da relação E_4/E_6 e da intensidade de emissão de fluorescência com excitação na faixa do azul (IF_{465}) são apresentados na Tabela 3. O grau de humificação pode ser avaliado pelos valores da relação E_4/E_6 obtidos com a espectroscopia na região do visível. Alta relação E_4/E_6 reflete um baixo grau de condensação aromática, ou seja, um baixo grau de humificação (Kononova, 1982). Valores altos de E_4/E_6 foram encontrados na área com menor interferência antrópica (Canal dos Escravos). Estes resultados, provavelmente, podem ser explicados pelo lançamento de efluentes domésticos no manguezal da área de Maria Ortiz, corroborando com os resultados obtidos por Canellas *et al.* (2000), que encontraram alto grau de humificação em lodo de estação de tratamento de esgoto do estado do Rio de Janeiro.

Os ácidos húmicos apresentaram valores para a razão E_4/E_6 dentro da faixa esperada para ácidos húmicos extraídos de solos que, segundo Kononova (1982), normalmente são menores que 5,0.

Os valores obtidos para a intensidade de emissão de fluorescência com excitação fixa em 465 nm (IF_{465}) é mostrada na Tabela 3. Pode-se observar que os valores obtidos foram maiores nos AH quando comparados com as SH e AF, compatível com maior grau de complexidade desse material húmico (Dobbss *et al.*, 2009). Entre os diferentes AH, os isolados da área MOr apresentaram valores da intensidade de fluorescência 1,2 vezes maior que os isolados da área CE. Tanto as SH quanto os AF isolados da área CE apresentam intensidade de emissão de fluorescência mais baixa enquanto que os mesmos materiais húmicos isolados da área MOr apresentam uma intensidade relativamente maior. A IF_{465} pode ser usada com objetivo de discriminar diferentes materiais húmicos (Senesi *et al.*, 1991) e estabelecer uma ordem relativa ao grau de humificação entre eles. Milori *et al.* (2002) obtiveram correlações significativas entre a IF_{465} e a concentração de radicais do tipo semiquinonas e com o grau de aromaticidade obtido por RMN ^{13}C em AH de diferentes fontes. O sucesso dessa correlação, de acordo com Milori *et al.* (2002),

vem da possibilidade de interpretação da teoria da humificação no sentido de identificar um aumento do grau de maturidade das SH com a estabilização de estruturas conjugadas com ressonância de elétrons, tais como, anéis aromáticos e radicais livres do tipo semiquinonas que aumentam de concentração com a evolução química das SH (Zech *et al.*, 1997). Dessa forma, SH mais humificadas devem apresentar, relativamente, maior intensidade de emissão de fluorescência com excitação no azul (Senesi *et al.*, 1991). Segundo o índice IF_{465} , o grau de humificação dos materiais húmicos isolados da área de MOr são relativamente maiores dos que os da área CE confirmando os resultados obtidos na relação E_4/E_6 (Tabela 3).

Tabela 3. Relação E_4/E_6 e intensidade de fluorescência de ácidos húmicos, fúlvicos e substâncias húmicas das áreas estudadas (Canal dos Escravos - CE e Maria Ortiz - MOr).

Amostras	E_4/E_6	$IF_{465}^{(1)}$ u.a
AH CE	4,1	111,33
AF CE	7,0	74,20
SH CE	5,8	62,87
AH MOr	2,8	133,07
AF MOr	5,1	100,04
SH MOr	3,9	104,86

⁽¹⁾Intensidade total de fluorescência em unidades arbitrárias (u.a) obtida pelo espectro de emissão de uma solução de AH, AF e SH (20mg C L⁻¹), das duas áreas estudadas, com excitação fixa em 465 nm.

6.1.3. Espectroscopia na região do IV

Os diferentes grupamentos funcionais de uma mistura heterogênea de compostos químicos com predominância de grupamentos ácidos podem ser facilmente analisados por meio da espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF), que é capaz de caracterizar vibrações de estiramento e deformações de ligações químicas entre átomos que apresentem momento dipolo diferente de zero (Colthup *et al.*, 1964). Portanto, a espectroscopia de IV-TF é especialmente útil para a observação de grupamentos funcionais oxigenados. As Figuras 5, 6 e 7 apresentam os espectros de IV-TF dos diferentes materiais húmicos isolados tanto da área mais impactada (MOr) quanto da menos impactada antropogenicamente (CE).

Todos os espectros de uma maneira geral apresentaram perfis típicos de ácidos orgânicos fracos (Coulthup *et al.*, 1964). De um modo geral, os espectros de

AH apresentam de 9 a 13 bandas de absorção bem definidas variando entre as diferentes áreas [mais afetada por impactos antrópicos (MOr) ou mais preservada (CE)]. Os AF devido a maior homogeneidade estrutural desse conjunto de agregados húmicos, apresentou espectros mais simples com 6 a 7 bandas bem definidas, com absorções mais agudas e com bastante similaridade com relação às áreas de MOr e CE. As SH assim como os AF apresentaram menos bandas que os AH. De acordo com a Figura 7 pode-se observar também similaridades grandes entre os espectros das SH.

Uma banda de absorção intensa, forte e larga com centro em aproximadamente 3400 cm^{-1} aparece em todos os materiais húmicos, independente de sua origem, principalmente devido ao estiramento de ligações O-H de vários grupos hidroxilados, mas, principalmente, ácidos carboxílicos capazes de fazer ligações hidrogênio que alteram a frequência de estiramento; Uma aguda e bem definida banda de absorção centrada em aproximadamente 2920 cm^{-1} também aparece em todos os materiais avaliados devido ao estiramento simétrico de ligações C-H, principalmente de grupos metilas (CH_3); uma banda de absorção intensa e alargada ao redor de 1630 e 1690 cm^{-1} pode ser atribuída à presença de uma série de estiramento simétrico de ligações C=O de grupos COO^- , banda de Amida II e quinonas.

Outras bandas importantes também podem ser visualizadas nos espectros que variam de intensidade principalmente entre os diferentes tratamentos (MOr e CE) tais como uma de absorção ao redor de 1400 cm^{-1} atribuída à deformação de ligações C-H de grupos metilas e metilenos; uma banda de absorção centrada em aproximadamente 1000 cm^{-1} devido a estiramentos C-O de polissacarídeos nos diferentes materiais húmicos e outra em 800 cm^{-1} atribuídas a vibrações de ligações C-H de grupos aromáticos e de impurezas inorgânicas e organo-metálicas.

As principais diferenças entre os diferentes materiais húmicos residem na intensidade da banda de absorção atribuída a grupos metilas (mais intensa nos materiais oriundos da área do Canal dos Escravos com aparecimento de uma absorção adicional em 2800 a 3000 cm^{-1} atribuída a C-H de metilenos), em aumentos da intensidade de absorção nas bandas entre 1600 - 1640 cm^{-1} nos materiais húmicos isolados da área de Maria Ortiz e na absorção mais intensa em 800 cm^{-1} nos materiais da área MOr, provavelmente devido ao maior grau de humificação encontrado nas relações E_4/E_6 e IF para os materiais húmicos oriundos da área MOr.

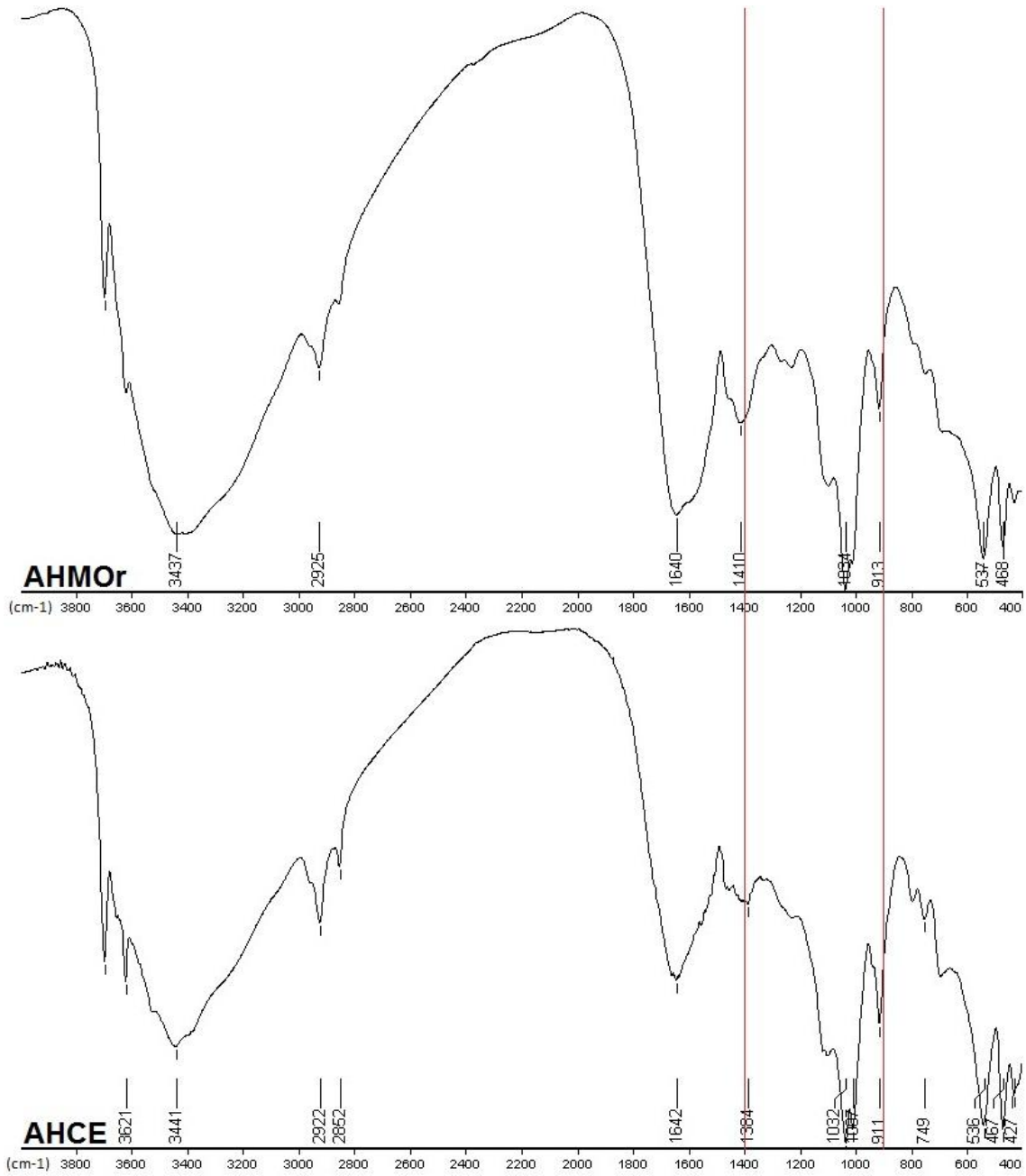


Figura 5. Espectros da região do infravermelho obtidos com transformada de Fourier dos ácidos húmicos (AH) isolados das diferentes áreas estudadas (MOr e CE).

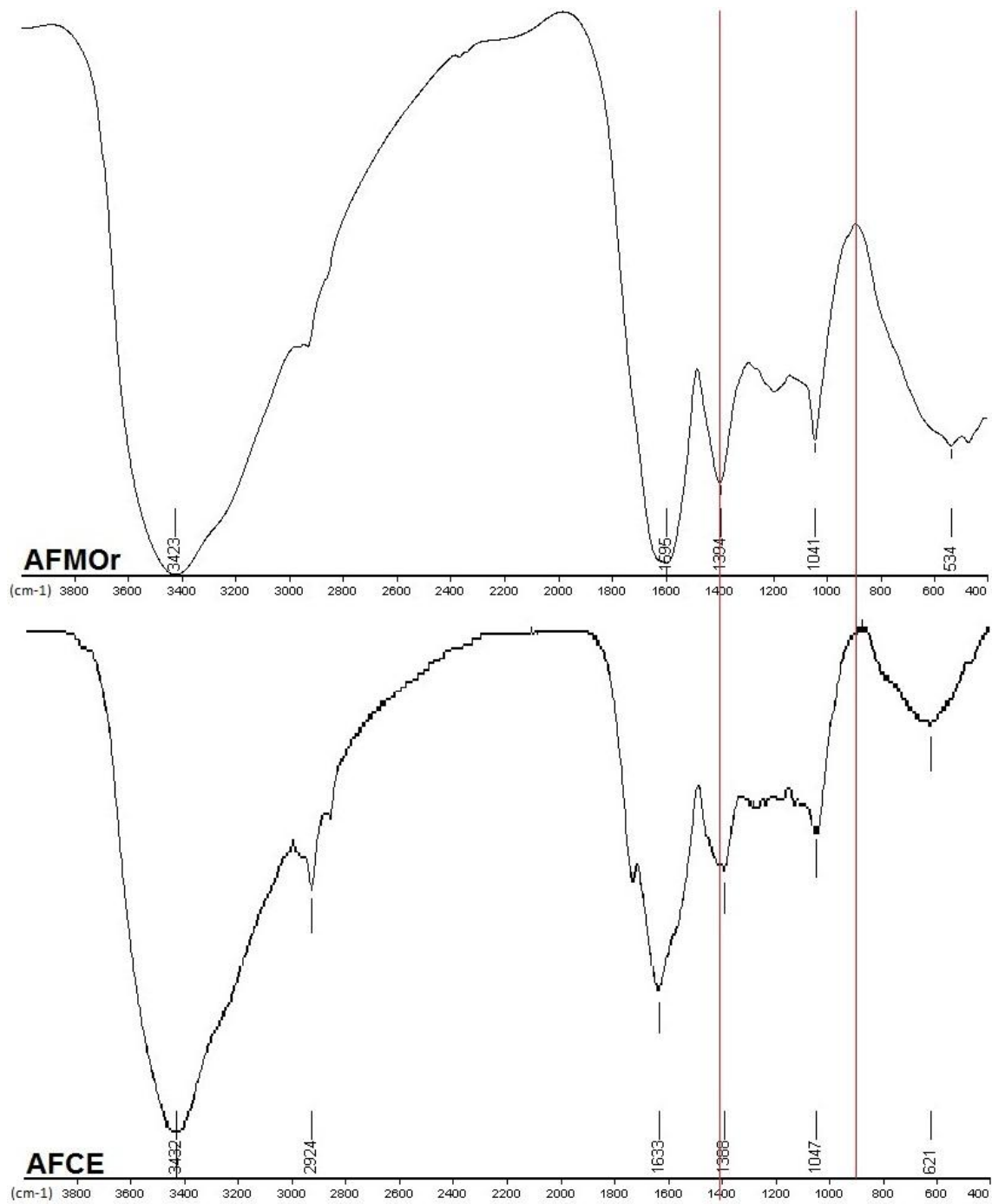


Figura 6. Espectros da região do infravermelho obtidos com transformada de Fourier dos ácidos fúlvicos (AF) isolados das diferentes áreas estudadas (MOr e CE).

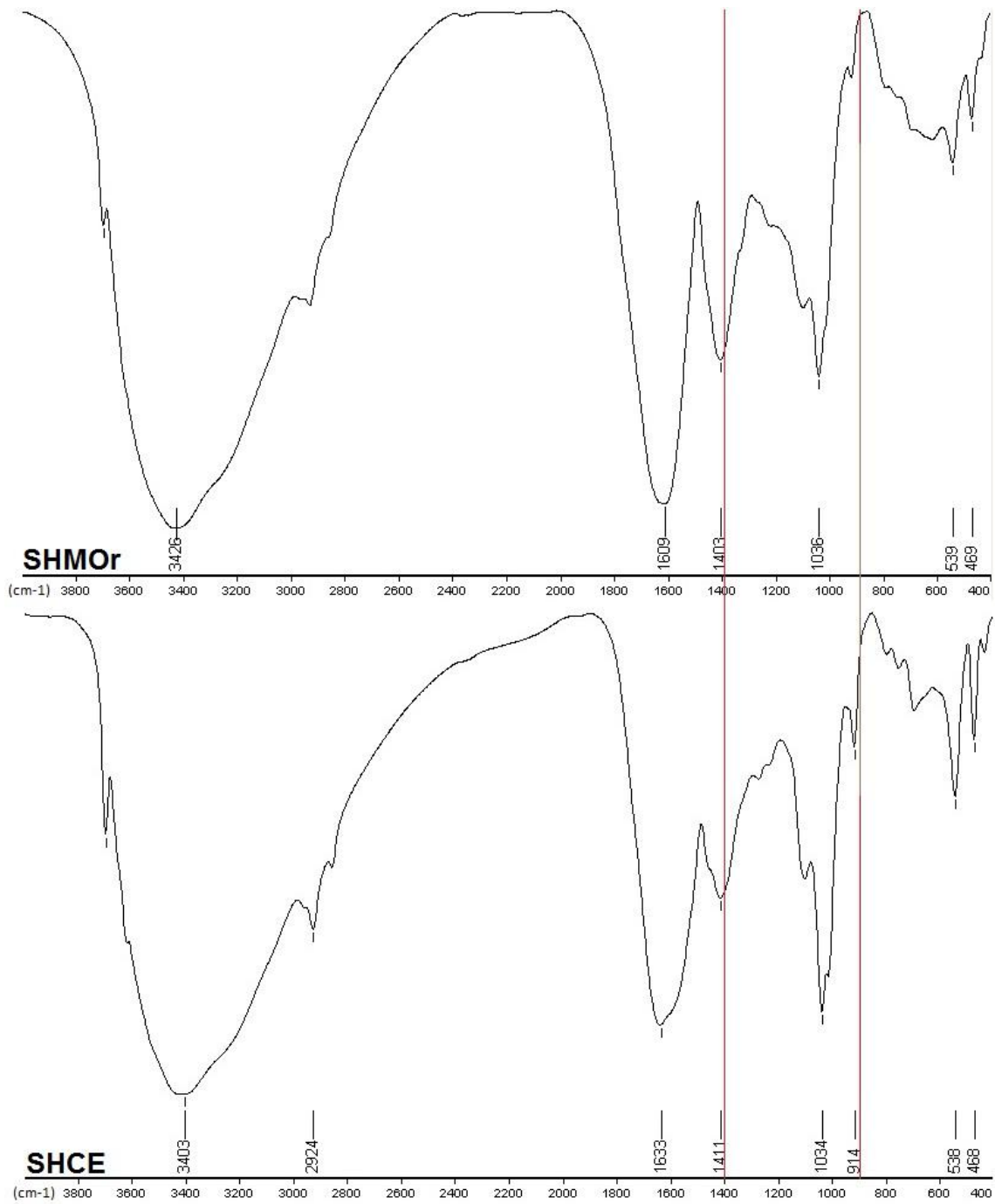


Figura 7. Espectros da região do infravermelho obtidos com transformada de Fourier das substâncias húmicas (SH) isoladas das diferentes áreas estudadas (MOr e CE).

As análises das regiões de impressão digital (entre 1400-900 cm^{-1}) com destaque nas Figuras 5, 6 e 7 revelam uma similaridade muito grande na funcionalidade dos espectros de IV entre os tratamentos, mas que, no entanto, não são exatamente idênticos, indicando uma origem distinta (provavelmente devido as diferentes intensidades de impactos antrópicos) para cada tipo de material húmico.

6.2. Atividade biológica das Substâncias Húmicas

O padrão observado na indução do número de raízes laterais do tomate e do milho pelos AH, AF e SH isolados do ecossistema manguezal sugerem uma ação similar à observada pelos hormônios de crescimento especialmente as auxinas que promovem aumento do número de raízes laterais emergidas, (Cordeiro *et al.*, 2010; Canellas *et al.*, 2010) quando comparados com o controle.

6.2.1 Desenvolvimento inicial de plântulas de *Solanum lycopersicum*

A quantidade de raízes laterais é influenciada por uma diversidade de estímulos hormonais e ambientais muito complexos (Sorin *et al.*, 2005). Os AH, AF e SH das duas áreas estudadas induziram aumento no número de raízes laterais de *Solanum lycopersicum*, quando comparadas com o controle. A Figura 8 demonstra essa indução.

A concentração ótima obtida para as frações AH, AF e SH da área CE foi de 4,24 mM C L^{-1} , 4,33 mM C L^{-1} e 4,89 mM C L^{-1} , respectivamente (Tabela 4). Para a área MOr, a melhor dose encontrada para AH foi de 4,57 mM C L^{-1} , para AF de 4,51 mM C L^{-1} e para SH de 4,84 mM C L^{-1} (Tabela 4).

As SH isoladas das duas áreas estudadas promoveram aumento significativo no número de raízes laterais emergidas da raiz principal, quando comparadas com o tratamento controle (Figura 9A). Mesmo não tendo diferença significativa entre a atividade biológica das SH isoladas do CE e de MOr, há uma tendência de aumento desta atividade para as SH isoladas da área CE que apresentou a maior estabilidade estrutural e menor grau de humificação da matéria orgânica pelas análises de acidez, E_4/E_6 e IF. Devido a tendência no aumento do número de raízes laterais das plantas tratadas com SH do CE, o peso fresco e seco radicular (Figura 9B e 9D) também apresentaram diferenças, quando comparados com o tratamento com SH de MOr.

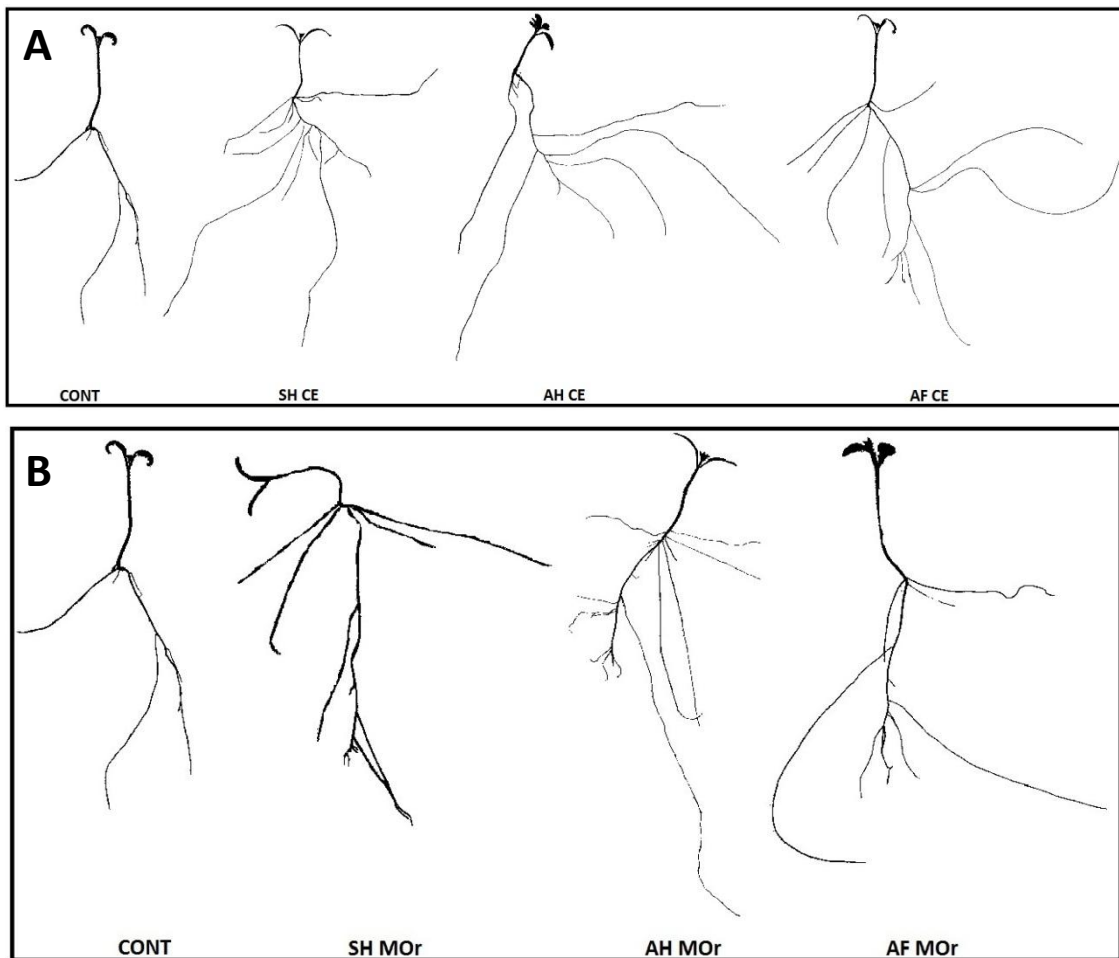


Figura 8. Plântulas de *Solanum lycopersicum*, tratadas na ausência (CONT) e na presença de SH, AH e AF das duas áreas estudadas. **(A)** área do Canal dos Escravos - CE. **(B)** área de Maria Ortiz - MOr.

Todas as amostras de AH promoveram indução no número de raízes laterais emergidas (Figura 9A). A área MOr estimulou mais o crescimento de raízes laterais, provavelmente devido a espécie *Solanum lycopersicum* responder melhor a AH com elevado grau de humificação, corroborando assim com os resultados encontrados por Silva *et al.* (2011). Confirmando os resultados obtidos para a indução do crescimento de raízes laterais, as plântulas tratadas com AH da área MOr apresentaram valores significativamente maiores para o peso seco radicular (Figura 9D), provavelmente devido ao maior número de raízes laterais nas plântulas tratadas com AH de MOr.

Tabela 4. Equações de regressão; coeficientes de determinação da regressão (R^2); desvios padrão da regressão (DP), níveis de significância da regressão (valores- p) e doses ótimas para o número de raízes laterais emergidas em plântulas de *Solanum lycopersicum* L. (tomate) após tratamento com diferentes doses de C (mM C L^{-1}) de AH, AF e SH da área do Canal dos Escravos (CE) e Maria Ortiz (MOr).

Materiais Húmicos	Equações de Regressão	R^2	DP	P	Doses ótimas
	$(y = b_2x^2 + b_1x + b_0)$				$(dx/dy): b_1 + 2(b_2)x = 0$
<i>Solanum lycopersicum</i> L.					
AH CE	$y = -0,27x^2 + 2,29x + 2,63$	0,99	1,08	0,001	4,24
AF CE	$y = -0,16x^2 + 1,40x + 3,40$	0,92	1,64	0,005	4,33
SH CE	$y = -0,20x^2 + 1,97x + 3,97$	0,81	2,46	0,016	4,89
AH MOr	$y = -0,29x^2 + 2,65x + 4,07$	0,85	2,48	0,017	4,57
AF MOr	$y = -0,18x^2 + 1,65x + 3,56$	0,89	2,61	0,011	4,51
SH MOr	$y = -0,14x^2 + 1,40x + 3,84$	0,75	3,72	0,02	4,84

Os AF do CE apresentaram resultados bem expressivos, estimulando três vezes mais a indução de raízes laterais quando comparados com a área MOr (Figura 9A), provavelmente devido ao grau de humificação dos AF de MOr ser maior e apresentar uma baixa estabilidade estrutural. Resultados similares foram encontrados por Silva *et al.* (2011), onde os AF com baixo grau de humificação estimularam mais o crescimento de raízes laterais em plântulas de tomate. Corroborando com os resultados encontrados para a atividade biológica dos AF do CE, o peso fresco e seco radicular (Figura 9B e 9D) também apresentaram diferenças significativas, quando comparados com a atividade biológica dos AF de MOr.

Pesquisadores têm encontrado nos materiais húmicos substâncias fisiologicamente ativas com capacidade de influenciar positivamente o desenvolvimento das plantas, não só estimulando o sistema radicular, mas também a parte aérea (folhas e caules) (Vaughan & Malcolm, 1985). Os resultados encontrados para a massa fresca e seca da parte aérea (Figura 9C e 9E) de plântulas de tomate, tratadas com os materiais húmicos isolados da área de CE, mesmo não tendo uma diferença significativa das plântulas tratadas com os materiais húmicos de MOr, apresentaram uma tendência de aumento da atividade biológica.

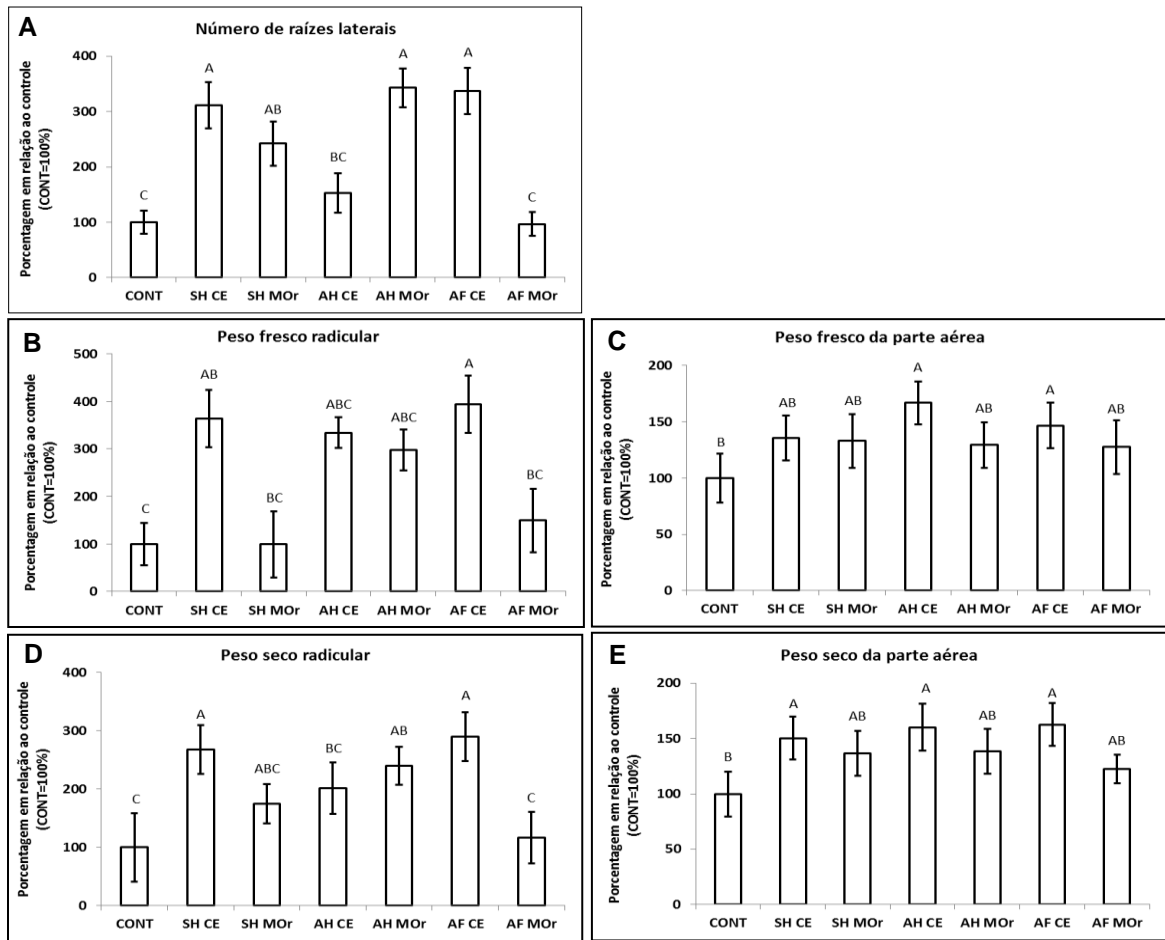


Figura 9. Efeito dos AH ($4,24 \text{ mMC L}^{-1}$), AF ($4,33 \text{ mM C L}^{-1}$) e SH ($4,89 \text{ mM C L}^{-1}$) da área do Canal dos Escravos (CE) e dos AH ($4,57 \text{ mMC L}^{-1}$), AF ($4,51 \text{ mM C L}^{-1}$) e SH ($4,84 \text{ Mg C L}^{-1}$) da área de Maria Ortiz (MOr) sobre o sistema radicular de *Solanum lycopersicum*. Dados do número de raízes laterais **(A)**; peso fresco radicular **(B)**; peso fresco da parte aérea **(C)**; peso seco radicular **(D)** e peso seco da parte aérea **(E)**. Os resultados representam a média de 10 plantas. As medidas foram normalizadas em relação ao controle (CONT=100%). Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste Tukey $P < 0,05$.

6.2.2. Desenvolvimento inicial de plântulas de *Zea mays*

Os AH, AF e SH das duas áreas estudadas induziram mudanças no número de raízes laterais de *Zea mays* (Figura 10), quando comparadas com o controle. As melhores doses obtidas para as frações AH, AF e SH da área CE foi de 4,08 mM C L⁻¹, 4,01 mM C L⁻¹ e 4,72 mM C L⁻¹, respectivamente (Tabela 5). Para a área MOr, a melhor dose encontrada para AH foi de 4,12 mM C L⁻¹, para AF de 4,13 mM C L⁻¹ e para SH de 4,45 mM C L⁻¹ (Tabela 5).

As SH isoladas das duas áreas estudadas promoveram aumento no número de raízes laterais emergidas do eixo principal, quando comparadas com o tratamento controle (Figura 11A). Não houve diferença significativa entre a atividade biológica das SH das duas áreas estudadas, porém os resultados obtidos para a massa fresca (Figura 11B) e seca (Figura 11D) radicular comprovam que as SH isoladas da área que apresentou a maior estabilidade estrutural da matéria orgânica nas análises E₄/E₆ e IF, estimulou mais o desenvolvimento radicular, apresentando provavelmente o menor número de raízes, porém a maior área radicular.

Todas as amostras de AH promoveram indução no número de raízes laterais emergidas (Figura 11A), quando comparadas com o tratamento controle. Porém, quando comparamos a atividade biológica dos AH das duas áreas estudadas, observamos diferença significativa na indução de número de raízes laterais do tratamento com o material húmico da área CE. Os resultados corroboram com os estudos de Aguiar *et al* (2009), que encontraram a maior promoção de raízes laterais nos tratamentos com materiais húmicos de baixo grau de humificação. Os valores encontrados para a massa fresca e seca radicular confirmam os resultados do número de raízes laterais, uma vez que o tratamento com AH do CE apresentou valores maiores, corroborando com os estudos realizados por Cordeiro *et al.* (2011) que indicam aumento significativo no peso fresco de raízes de milho tratadas com AH.

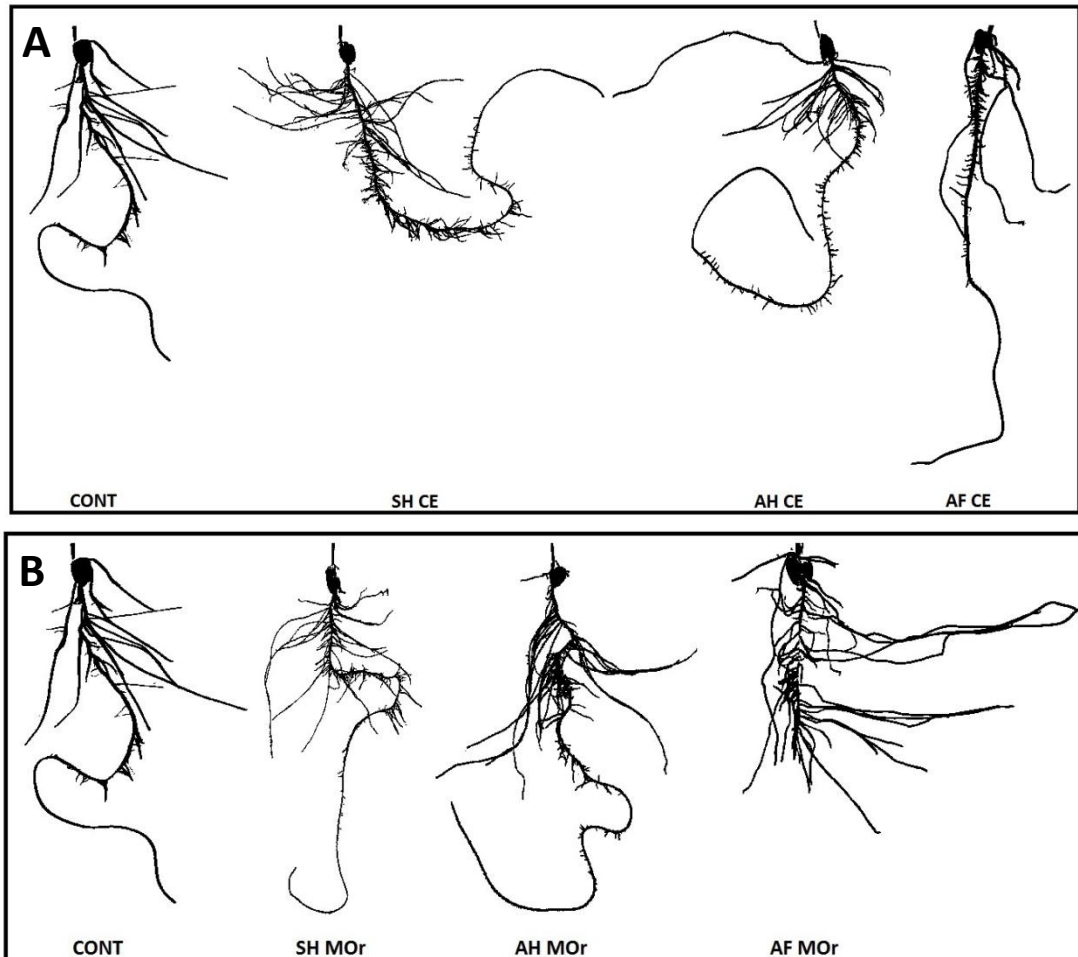


Figura 10. Plântulas de *Zea mays*, tratadas na ausência (CONT) e na presença de SH, AH e AF das duas áreas estudadas. **(A)** Área do Canal dos Escravos - CE. **(B)** área de Maria Ortiz - MOR.

Nos tratamentos com AF, os resultados da promoção do número de raízes laterais, da massa fresca e seca radicular, não apresentaram diferença significativa entre as duas áreas estudadas, porém, há uma tendência de aumento dos valores obtidos para os tratamentos com AF de MOR provavelmente devido as respostas das plantas aos ácidos fúlvicos estarem relacionadas principalmente à dependência da espécie vegetal estudada (Brun, 1993).

Tabela 5. Equações de regressão; coeficientes de determinação da regressão (R^2); desvios padrão da regressão (DP), níveis de significância da regressão (valores- p) e doses ótimas para o número de raízes laterais emergidas em plântulas de *Zea mays* L. (milho) após tratamento com diferentes doses de C (mM C L^{-1}) de AH, AF e SH da área do Canal dos Escravos (CE) e Maria Ortiz (MOr).

Materiais Húmicos	Equações de Regressão	R^2	DP	P	Doses ótimas
	($y = b_2x^2 + b_1x + b_0$)				(dx/dy): $b_1 + 2(b_2)x = 0$
<i>Zea mays</i> L.					
AH CE	$y = -7,52x^2 + 61,40x + 67,35$	0,95	1,46	0,001	4,08
AF CE	$y = -1,22x^2 + 9,83x + 20,93$	0,76	3,41	0,028	4,01
SH CE	$y = -2,47x^2 + 23,28x + 123,50$	0,74	3,35	0,028	4,72
AH MOr	$y = -3,01x^2 + 24,79x + 113,65$	0,97	1,3	0,001	4,12
AF MOr	$y = -1,29x^2 + 10,73x + 22,45$	0,79	2,22	0,013	4,13
SH MOr	$y = -3,74x^2 + 33,40x + 115,94$	0,97	1,24	0,001	4,45

As substâncias húmicas facilitam a respiração das plantas promovendo o desenvolvimento do sistema vascular e estimulando o crescimento tanto do sistema radicular quanto da parte aérea (Sladký, 1962). Os resultados encontrados para a massa fresca e seca da parte aérea (Figura 11C e 11E) de plântulas de milho tratadas com os materiais húmicos isolados da área de CE, apresentaram uma tendência de aumento da atividade biológica, quando comparados com a área MOr. Os resultados corroboram com os encontrados por Silva *et al.* (1999), onde os materiais húmicos com maior grau de humificação apresentaram valores menores para a análise da massa fresca e seca da parte aérea de plântulas de milho.

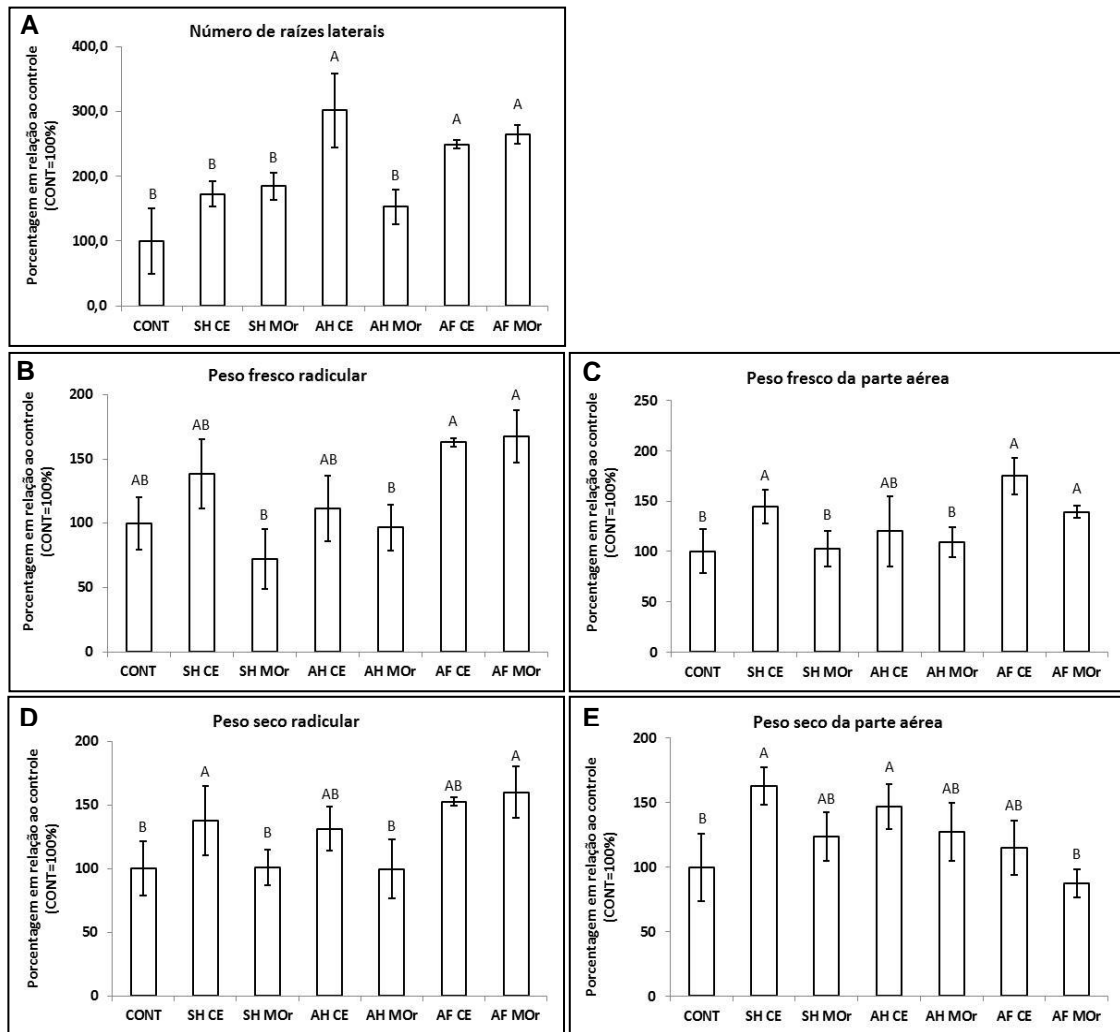


Figura 11. Efeito dos AH ($4,24 \text{ mM C L}^{-1}$), AF ($4,33 \text{ mM C L}^{-1}$) e SH ($4,89 \text{ mM C L}^{-1}$) da área do Canal dos Escravos (CE) e dos AH ($4,57 \text{ mM C L}^{-1}$), AF ($4,51 \text{ mM C L}^{-1}$) e SH ($4,84 \text{ mM C L}^{-1}$) da área de Maria Ortiz (MOr) sobre o sistema radicular de *Zea mays*. Dados do número de raízes laterais **(A)**; peso fresco radicular **(B)**; peso fresco da parte aérea **(C)**; peso seco radicular **(D)** e peso seco da parte aérea **(E)**. Os resultados representam a média de 10 plantas. As medidas foram normalizadas em relação ao controle (CONT=100%). Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste Tukey $P < 0,05$.

6.3. Medida de acidez em solução possivelmente associada à atividade dos AH sobre as H⁺-ATPases

Os resultados da medida de acidez (pH) da solução de cultivo contendo plântulas de milho tratadas com os AH extraídos das florestas de mangue da EEMIL estão apresentados na Figura 12.

Estudos realizados por Cordeiro *et al.* (2010) relatam que o mecanismo de promoção do crescimento celular é mediado pelas H⁺-ATPases num processo conhecido como “teoria do crescimento ácido”. Esta teoria foi estudada em 1992 por Rayle & Cleland. Segundo Aguiar (2011) o aumento da acidez do meio pode ser associado ao aumento da extrusão de H⁺, possivelmente associado à atividade dos AH sobre as H⁺-ATPase se a 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.

Estudos realizados por Rayle e Cleland (1992) demonstraram que as auxinas têm um papel central na promoção do crescimento celular, uma vez que estimulam tanto a transcrição de genes que codificam ATPases, quanto a ativação dessas proteínas. A expansão celular é favorecida pela ação de algumas enzimas específicas que promovem o aumento da plasticidade da parede celular pela liberação momentânea de pequenos segmentos da matriz de glucanos ligados às microfibrilas de celulose. O alongamento celular se dá através do relaxamento da parede celular e do aumento do turgor (Canellas& Santos,2005).

Mesmo não apresentando uma diferença expressiva, o aumento da acidez da solução foi observado nos AH do CE, corroborando com aos resultados encontrados para o número de raízes laterais. Os resultados encontrados para a extrusão de H⁺ por massa seca das raízes (Figura 12B) 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 e que os AH com maior estabilidade estrutural provoca maior estímulo na extrusão de H⁺, quando comparado com o AH de alto grau de humificação.

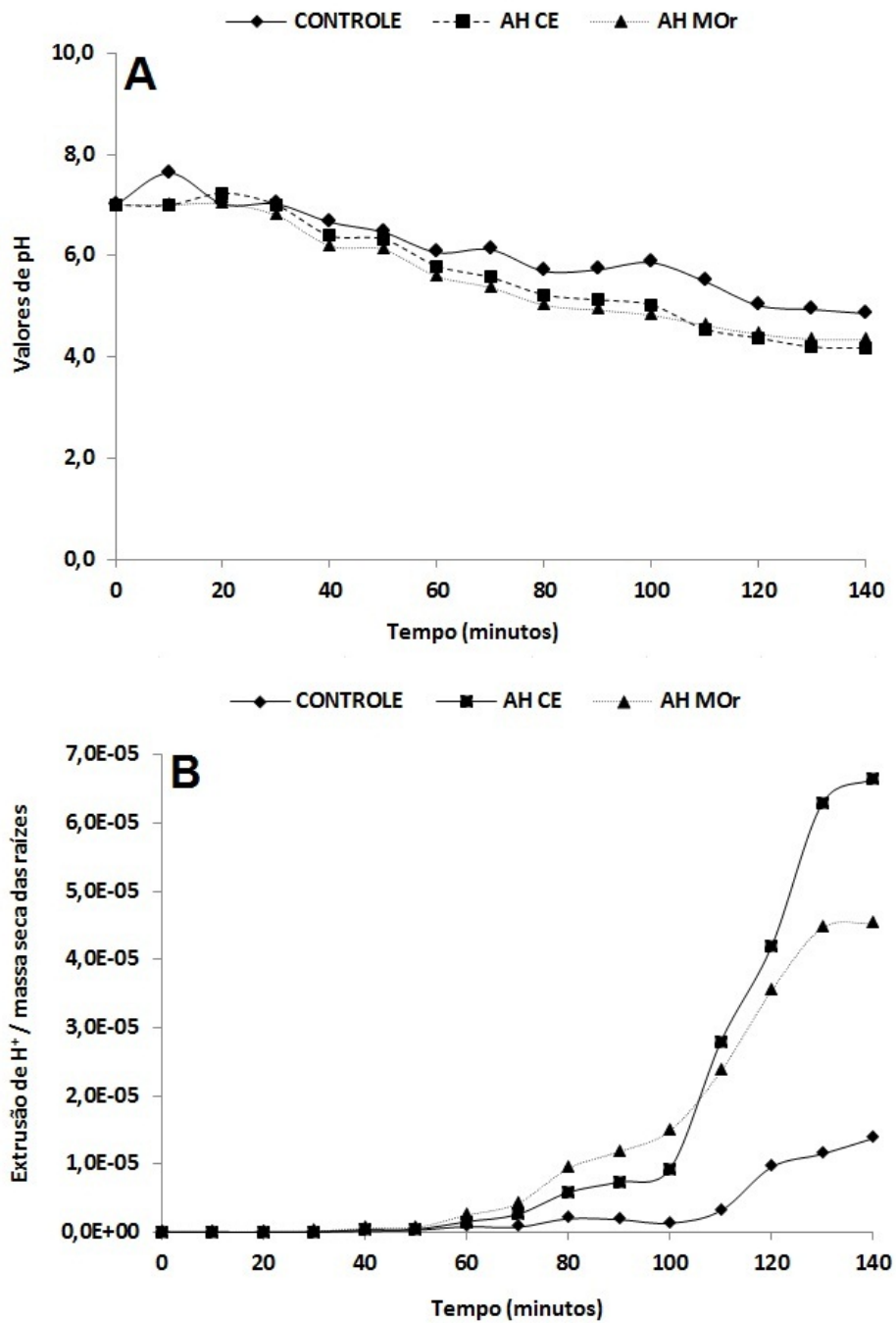


Figura12. (A) Medida de acidez em solução de plântulas de milho tratadas com AH ($4,24 \text{ mg C L}^{-1}$) da área do Canal dos Escravos (CE) e AH ($4,57 \text{ mg C L}^{-1}$) da área de Maria Ortiz (MOr). **(B)** Extrusão de H^+ por grama de massa seca de raiz de plântulas de milho, possivelmente associada ao estímulo das bombas de H^+ pelos AH.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido à complexidade do ecossistema manguezal e a escassez de informações científicas sobre o tema, diversas áreas destruídas permanecem sem um planejamento de recuperação e sem informações das causas da morte do mangue, acabando por sofrer ainda mais interferências (principalmente antrópicas), o que dificulta até mesmo sua regeneração natural. De acordo com os resultados obtidos nesta dissertação, pode-se concluir que há diferenças entre as características químicas (maior estabilidade estrutural e menor grau de humificação na área CE) e a atividade biológica dos diferentes materiais húmicos sobre as plântulas de milho e tomateiro, aumentando o crescimento vegetativo e possivelmente a atividade enzimática (H^+ -ATPase) na área CE. Provavelmente tais diferenças observadas provocam alterações sobre os processos ecológicos que ocorrem nos substratos dos manguezais, alterando o estímulo húmico.

Fica evidenciado que a interferência antrópica presente na área de Maria Ortiz, possivelmente atribuída ao lançamento de esgoto, altera a estrutura e a qualidade da matéria orgânica presente no sedimento do manguezal, dificultando assim o desenvolvimento e a regeneração das florestas de mangue desta área. Com esta dissertação pode-se sugerir, portanto que a origem de materiais húmicos parece ser o fator determinante para o incremento ao crescimento vegetal promovido pela matéria orgânica humificada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adani, F., Genevini, P., Tambone, F., Montoneri, E. (2006). Compost effect on soil humic acid: a NMR study. *Chemosphere*.65:1414–1418.

Aguiar, N.O., Canellas, L.P., Dobbss, L.B., Zandonadi, D.B., Olivares, F.L., Facanha, A.R. (2009). Distribuição de massa molecular de ácidos húmicos e promoção do crescimento radicular. *R. Bras. Ci. Solo*, 33:1613-1623.

Aguiar, N.O. (2011). Características químicas e bioatividade de ácidos húmicos isolados de vermicompostos em diferentes estádios de maturação. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes - Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, p.86.

Aguiar, N.O., Olivares, F.L., Novotny, E.H., Dobbss, L.B., Balmori, D.M., Santos-Júnior, L.G., Chagas, J. G., Façanha, A.R., Canellas, L.P. (2012) Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. *Plant Soil*, 11104-012-1277-5.

Albuzio, A., Ferrari, G., Nardi, S. (1986). Effects of humic substances on nitrate uptake and assimilation in barley seedlings. *Can. J. Soil Sci.* 66:731–736.

Alongi, D.M. (2009) Introduction in the energetics of mangrove forests. Springer Science and Business Media BV, New York.

Barbirato, J.O. (2012). Caracterização da estrutura vegetal e biomonitoramento da qualidade do manguezal da estação ecológica municipal ilha do lameirão - Vitória/ES. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ecossistemas) – Vila Velha, ES - Universidade Vila Velha - UVV, p.49.

Brun, G. (1993). Pouvoir complexant des matières humiques effets sur l'alimentation minerale des vegetaux, Toulouse, France, Institut National Polytechnique de Toulouse, Specialite: Traitement des matières premières vegetales, Thèse (doctorat), p.139.

Cameron, R.S., Thornton, B.K., Swift, R.S., Posner, A.M (1972). Molecular weight and shape of humic acid from sedimentation and diffusion measurements on fraction extracts. *J. Soil Sci.*, 23:394-408.

Canellas, L.P., Santos, G.A., Amaral Sobrinho, N.M.B. Reações da matéria orgânica. In: Santos, G. de A.; Camargo, F.A.O. (eds.) (1999). *Fundamentos da matéria orgânica: ecossistemas tropicais e subtropicais*. Porto Alegre: Gênese, p.69-86.

Canellas, L.P., Santos, G., Moraes, A. A., Rumjanek, V. (2000). Avaliação de características de ácidos húmicos de resíduos sólidos urbanos II. Métodos termodegradativos (pirólise acoplada a cromatografia gasosa – espectrometria de massas). *Ver. Bras. Ci. do Solo*, 24:751-757.

Canellas, L.P., Olivares, F.L., Façanha, A.L.O., Façanha, A.R. (2002). Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol.* 130:1951-1957.

Canellas L.P., Façanha A.R. (2004). Relationship between nature of soil humified fractions and their bioactivity. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39:233–240.

Canellas, L.P., Santos, G.A. (2005). Bioatividade de substâncias húmicas: ação sobre o desenvolvimento e metabolismo das plantas, in: *Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. Campos dos Goytacazes, p.224 – 243.

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. (2008). Bioactivity and chemical characteristics of humic acids from tropical soils sequence. *Soil Sci.* 173:624–637.

Canellas, L. P., Spaccini, R., Piccolo, A., Dobbss, L. B., Okorokova-Façanha, A. L., Santos, G. A., Olivares, F. L., Façanha, A. R. (2009). Relationships between chemical characteristics and root growth promotion of humic acids isolated from Brazilian oxisols. *Soil Sci.* 174:611–620.

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

Caretta, C.A. (1995). Fracionamento de N orgânico, substâncias húmicas e caracterização de ácidos húmicos de solo em sistemas de cultura sob o plantio direto. Tese Doutorado, Porto Alegre: UFRGS, p.150.

Colthup, N.B., Daly, L.H., Wiberley, S.E. (1964). Introduction to infrared and Raman spectroscopy. *Academic Press New York*, p.510.

Cordeiro, F.C., Fernandes, M.S., Souza, S.R. (2010). Influência dos ácidos húmicos no metabolismo vegetal pode ser considerada uma resposta auxínica? *Rev. de Ci. Vida. Seropédica*, 30:111-131.

Cordeiro, F.C., Santa-Catarina, C., Silveira, V., Souza, S.R., (2011). Humic Acid Effect on Catalase Activity and the Generation of Reactive Oxygen Species in Corn (*Zea mays*). *Biosci.Biotechnol.Biochem.*75 (1):100553-1-5.

Curtin, D., Wen, G. (1999) Organic matter fractions contributing to soil nitrogen mineralization potential. *Soil Science Soc. Am. J.*, 63:410-415.

Dobbss, L.B. (2006). Eletroquímica do horizonte superficial de Latossolos e caracterização de suas substâncias Húmicas. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes - Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, p.37.

Dobbss, L.B., Canellas, L.P., Alleoni, L.R.F., Rezende, C.E., Fontes, M.P.F., Velloso, A.C.X., (2008). Eletroquímica de latossolos brasileiros após a remoção da matéria orgânica humificada solúvel. *R. Bras. Ci. Solo.* 32:985-996.

Dobbss, L.B., Rumjaneck, V. M., Baldotto, M. A., Velloso, A. C. X., Canellas, L. P. (2009). Caracterização química e espectroscópica de ácidos húmicos e fúlvicos isolados da camada superficial de latossolos brasileiros. *R. Bras. Ci. Solo*, 33:51-63.

Dobbss, L.B., Canellas, L.P., Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Peres, L.E.P., Azevedo, M., Spaccini, R., Piccolo, A., Façanha, A.R. (2010). Bioactivity of Chemically Transformed Humic Matter from Vermicompost on Plant Root Growth. *J. Agr. Food Chem.* 58:3681-3688.

Dobbss, L.B., (2011). Características químicas e promoção do crescimento radicular de substâncias húmicas. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes - Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, p.112.

Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) (2012). Centro Nacional de Pesquisa de Solos. *Sistema Brasileiro de Classificação de Solos*. Rio de Janeiro, Embrapa Solos, p.412.

Façanha, A.R., Olivares, F.L., Velloso, A.C.X., Braz-Filho, R., Santos, G.A., Canellas, L.P. (2002). Bioatividade de ácidos húmicos: Efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesq. Agropec. Bras.*, 37:1301-1310.

Fisher, F. Schrader, H. (1921). The origin and chemical structure of coal. *Brennstoff Chem*, 2:37-45.

Funchs, W. (1931). *Die Chemie der Kohle*. Berlin, Springer, Bibl. footnotes. P.510.

García, C. (1990). Estudio del compostaje de residuos orgánicos. Valoración agrícola. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Murcia, p.117.

García-Gil, J.C., Ceppi, S.B., Velasco, M.I., Polo, A., Senesi, N. (2004). Long-term effects of amendment with municipal solid waste compost on the elemental and acidic functional group composition and pH-buffer capacity of soil humic acids. *Geoderma*, 121:135-142.

Giri, C., Ochieng, E., Tieszen, L.L., Zhu, Z., Singh, A., Loveland, T., Masek, J., Duke, N. (2011). Status and distribution of mangrove forests of the world using earth

observation satellite data. *Global Ecology and Biogeography, (Global Ecol. Biogeogr.)*,20:154–159.

Hayes, M.H., Malcolm, R. (2001). Humic substances and chemical contaminants.Madson.*Soil Sci. Society of America*, p.3-39.

Hayes, M.H.B., MacCarthy, P., Malcolm, R., Swift, R.S. (1989). Humic substances II.In search of structure.New York, willey, p.764.

Hayes, M.H.B. (1997). Emerging concepts of the compositions and structures of humic substances. In: Humic Substances, peats, and sludges. Health and Environmental Aspects. M.H.B. Hayes and W.S. Wilson (eds), *The Royal Society of Chemistry, Cambridge*. p.3-30.

He, M. C., Shi, Y. H. and Lin, C. Y. (2008). Characterization of humic acids extracted from the sediments of the various rivers and lakes in China. *J. Environ. Sci.* 20:1294–1299.

Jacquin, F., Vong, P.G. (1989).Incorporation of nitrogen fertilizer in the humified compounds of a typic Hapludalf.*The Science of the Total Environment*, 81/82:465-469.

Jesus H.C., Costa E.A., Mendonça A.S.F., Zandonade E. (2004). Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da Ilha de Vitória-ES. *Química Nova*, 27:378-386.

Kononova, M.M. (1982). Matéria orgânica del suelo: su naturaleza, propiedades y método de investigación. Barcelona, *Oikos-Tour*, p.365.

Kumada, K. (1987). Chemistry of soil organic matter. Tokyo: *Japan Scientific Societies Press*, p.241.

Lal, P.N. (2002). Integrated and adaptive mangrove management framework – an action oriented option for the new millennium, in: L.D, Lacerda (Eds.), *Mangrove Ecosystems: Function and Management*. Springer, p.292.

Lu, X. Q., Hanna, J. V., Johnson, W. D. (2000). Source indicators of humic substances: an elemental composition, solid state ^{13}C CP/MAS NMR and Py-GC/MS study. *Appl. Geochem.* 15:1019–1033.

MacCarthy, P., Rice, J.A. (1985). Spectroscopic methods (other than NMR) for determining functionality in humic substance. In: Aiken, G.R.; Mckinght, D.M.; Wershaw, eds. Humic substances in soil, sediment, and water. New York, J. Wiley, p.527-559.

Mendonça, E.S., Rowell, D.L., Martins, A.G., Silva, A.P. (2006). Effect of pH on the development of acidic sites in clayey and sandy loam Oxisol from the Cerrado Region, Brazil. *Geoderma*, 132:131-142.

Milori, D.M.B.P., Martin Neto, L., Bayer, C., Mielniczuck, J., Bagnato, V.S., (2002). Humification degree os soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci.* 167:739-749.

Morsomme, P., Boutry, M. (2000) The plant plasma membrane H^+ -ATPase: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1465:1-16.

Nannipieri, P., Grego, S., Dell'agnola, G., Nardi, S. (1993). Proprietà biochimiche e fisiologiche della sostanza orgânica, in: Nannipieri, P. (eds.). *Ciclo dela sostanza organica nel suolo: aspetti agronomici, chimici, ecologici, ecologici y selvicolturali*. Bologna: Patron, p.67-78.

Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Dalla Vecchia, F., Concheri, G. (1998). Effects of forest humus on biological activity in roots of *Pinus sylvestris* related to chemical humus fraction characteristics. *Fresenius Environmental Bulletin*, 7:203–208.

Nardi, S., Pizzeghello, D., Gessa, C., Ferrarese, L., Trainotti, L., Casadoro, G., (2000). A low molecular weight humic fraction on nitrate uptake and protein synthesis in maize seedlings. *Soil Biol. Biochem.* 32:415-419.

Nardi S., Pizzeghello D., Muscolo A., Vianello A. (2002). Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology & Biochemistry*, 34:1527-1536.

Novo Código Florestal, Lei nº 12.651 de 2012. Disponível em: <<http://www.vitoria.es.gov.br>> .Acesso em: 08 janeiro. 2013.

Piccolo, A., Nardi, S., Concheri, G. (1992). Structural characteristics of humus and biological activity. *Soil Biol.* 24:273-380.

Piccolo, A. (1996). Humus and soil conservation, in: Piccolo, A. (Eds.), Humic substances in Terrestrial Ecosystems Amsterdam. Elsevier, p.225-264.

Piccolo, A., (2002). The supramolecular structure of humic substances: A Novel Understanding of Humic Chemistry and Implications in Soil Science. *Adv. Agron.*, 75:57-134.

Pinton, R., Cesco, S., Santi, S., Agnolon, F., Varanini, Z. (1999). Water extractable humic substances enhance iron deficiency responses by Fe deficient cucumber plants. *Plant and Soil*. 210:145-157.

Prefeitura Municipal de Vitória, (2012). Estação Ecologia Municipal Ilha do Lameirão (EEMIL). Disponível em <<http://www.vitoria.es.gov.br/semmam.php?pagina=estacaoilhadolameirao>> Acesso em: março de 2012.

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.

Rodda, M.R.C., Canellas, L.P., Façanha, A.R., Zandonadi, D.B., Guerra, J.G.M., Almeida, D.L., 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. *R. Bras. Ci. Solo*. 30:657-664.

Schaeffer-Novelli, Y. 1995. Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar. São Paulo, Caribbean Ecological Research.

Senesi, N., Miano, T.M., Provenzano, M.R., Brunetti, G. (1991) Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci.*, 152:259-271.

Sierra, M.M.M., Giovanela, M., Dinard, O.F.X., Belin, C.A. (1996). Utilização da espectroscopia de fluorescência no estudo da matéria orgânica dissolvida em águas naturais: evolução e perspectivas. *Química Nova*, 19:294-301.

Silva, A. C., Canellas, L.P., Olivares, F.L., Dobbss, L.B., Aguiar, N.O., Frade, D.A.R., Rezende, C.E., Peres, L.E.P. (2011). Promoção do crescimento radicular de plântulas de tomateiro por substâncias húmicas isoladas de turfeiras. *R. Bras. Ci. Solo*, 35:1609-1617.

Silva, E.A., Silva, C.A., Silva, I.R., Marques, J.J.G.S.M., Araújo, E.F., Carvalho, S.A., Silva, S.H.G., Curi, N. (2012). Frações de carbono em toposequências de solos sob eucalipto com diferentes históricos de uso. *R. Bras. Ci. Solo*, 36:1167-1178.

Silva, M.A.B., Bernini, E., Carmo, T.M.S. (2005). Características estruturais de bosques de mangue do estuário do rio São Mateus, ES, Brasil. *Acta bot. bras.* 19(3):465-471.

Silva, R. M., Jablonski, A., Siewerdt, L., Silveira Júnior, P. (1999). Crescimento Da Parte Aérea E Do Sistema Radicular Do Milho Cultivado Em Solução Nutritiva Adicionada De Substâncias Húmicas. *Rev. Bras. de Agrociência*, v.5, n.2, p.101-110.

Schulten, H.R., Schnitzer, M. (1997). Chemical model structures for soil organic matter and soils. *Soil Sci.*, Baltimore, v. 162, n.2, p.115-130.

Sladký, Z. (1962). Über den Einfluss einiger Humusfraktionen auf den anatomischen Bau der Pflanzen. In: *Studies About Humus Symposium. Proceedings*. Prague: Czechoslovak Academy of Sciences, p.259-272.

Sorin, C., Bussell, J.D., Camus, I., Ljung, K., Kowalczyk, M., Geiss, G. (2005). Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require Argonaute1. *Plant Cell*, 17:1343-1359.

Stevenson, J.F. (1994). Humus chemistry: Genesis, composition, reactions. 2. ed. New York, John WWiley e Sons.p.496.

Swift, R.S. (1999). Macromolecular proprieties of soil humic substances: fact, fiction, and opnion. *Soil Sci.*,164:790-802.

Torrìco, K.S.N., Arçari, F.S.S., Barbirato, J.O., Tannure, F.P., Zandonadi, D.B., Ramos, A.C., Dobbss, L.B. (2013-No prelo) Bioatividade de substâncias húmicas de manguezal sobre plântulas de *Oryza sativa* e *Laguncularia racemosa*. Revista Ceres.

UNEP (United Nations Environment Programme) (2004) Global environment outlook yearbook 2004.United Nations Environment Programme, Nairobi, Kenya.

Vale, C.C., Ferreira, R.D. (1998). Os manguezais do litoral do Estado do Espírito Santo. Pp. 88-94. In: Anais do Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira. São Paulo, ACIESP, v. I.

Vaughan, D., Malcolm, R.E. (1985). (Ed). Soil organic matter and biological activity.*Dordrecht: Kluwer Academic*, p.37-75.

Vitória. Lei nº 477, de 1965. Disponível em: <<http://www.vitoria.es.gov.br>> . Acesso em: 05 março. 2012

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

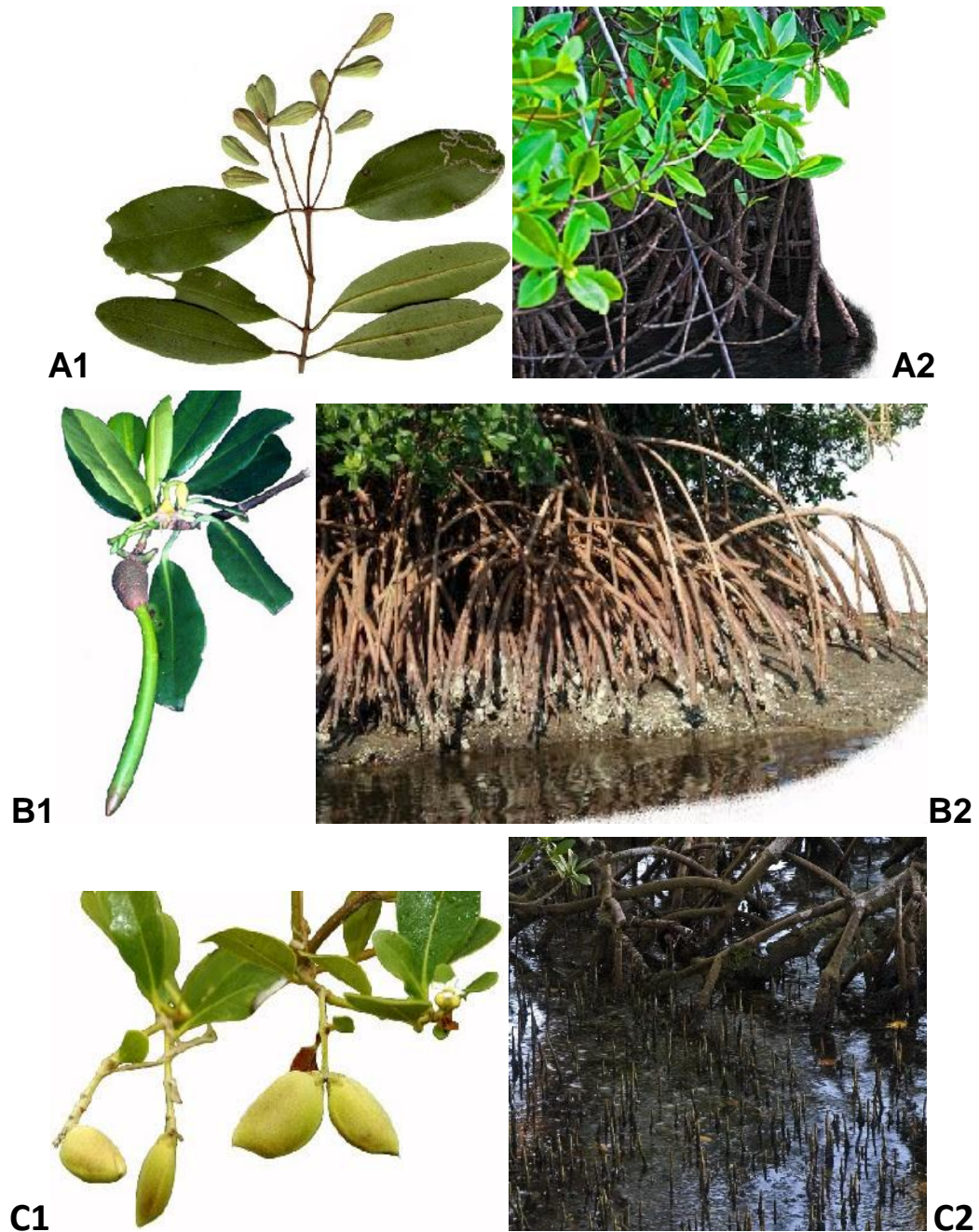
Zandonadi, D.B., Santos, M. P., Dobbss, L.B., Olivares, F.L., Canellas, L.P., Binzel, M.L., Okorokova-Façanha, A.L., Façanha, A.R., (2010). Nitric oxide mediates humic

acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. *Planta*. 231:1025-1036.

Zech, W., Senesi, N., Guggenberger, G., Kaiser, K., Lehmann, J., Miano, T.M., Miltner, A., Schroth, G. (1997). Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *Geoderma*, 79:117-161.

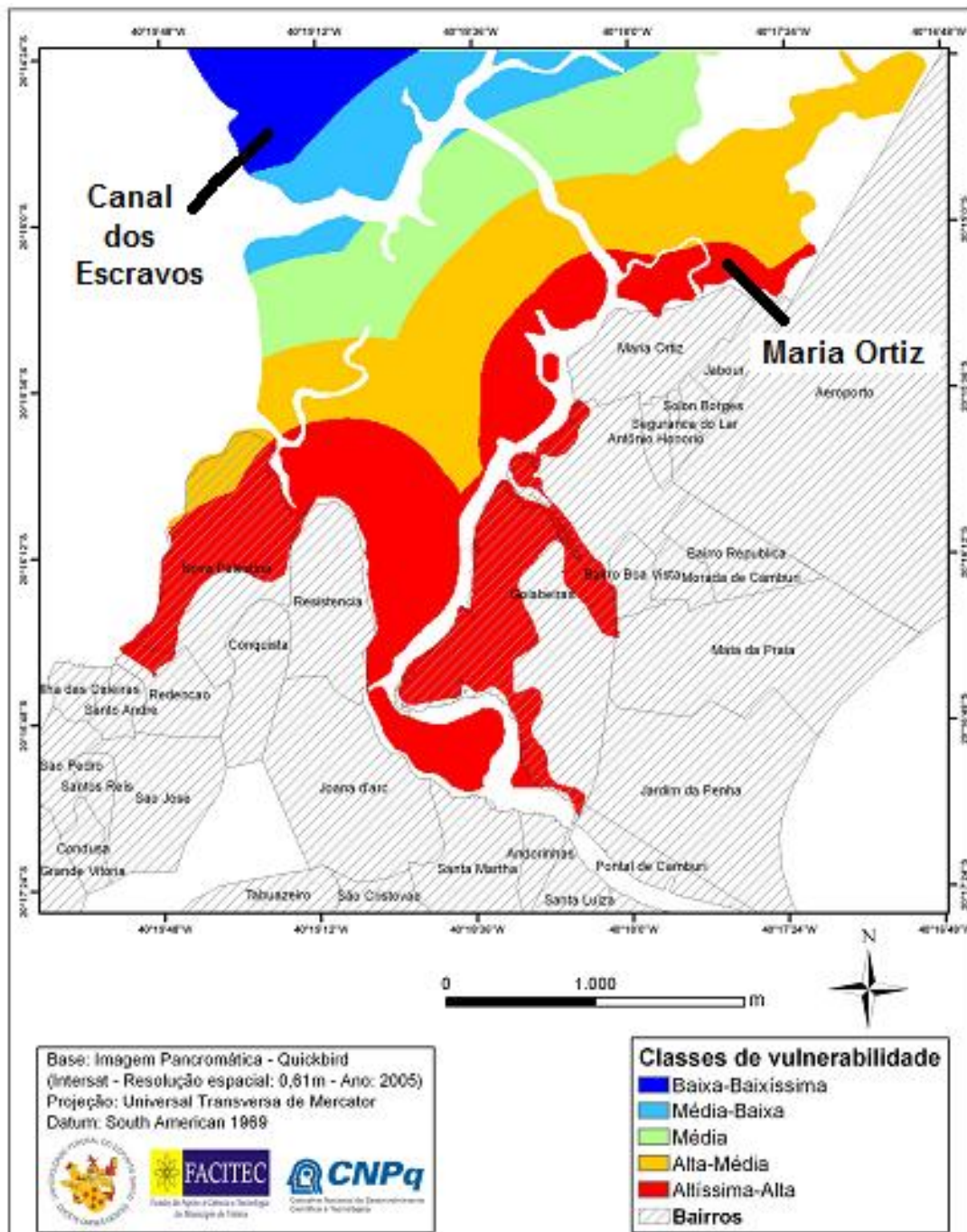
ANEXOS

ANEXO 1 – Espécies do ecossistema Manguezal do município de Vitória.

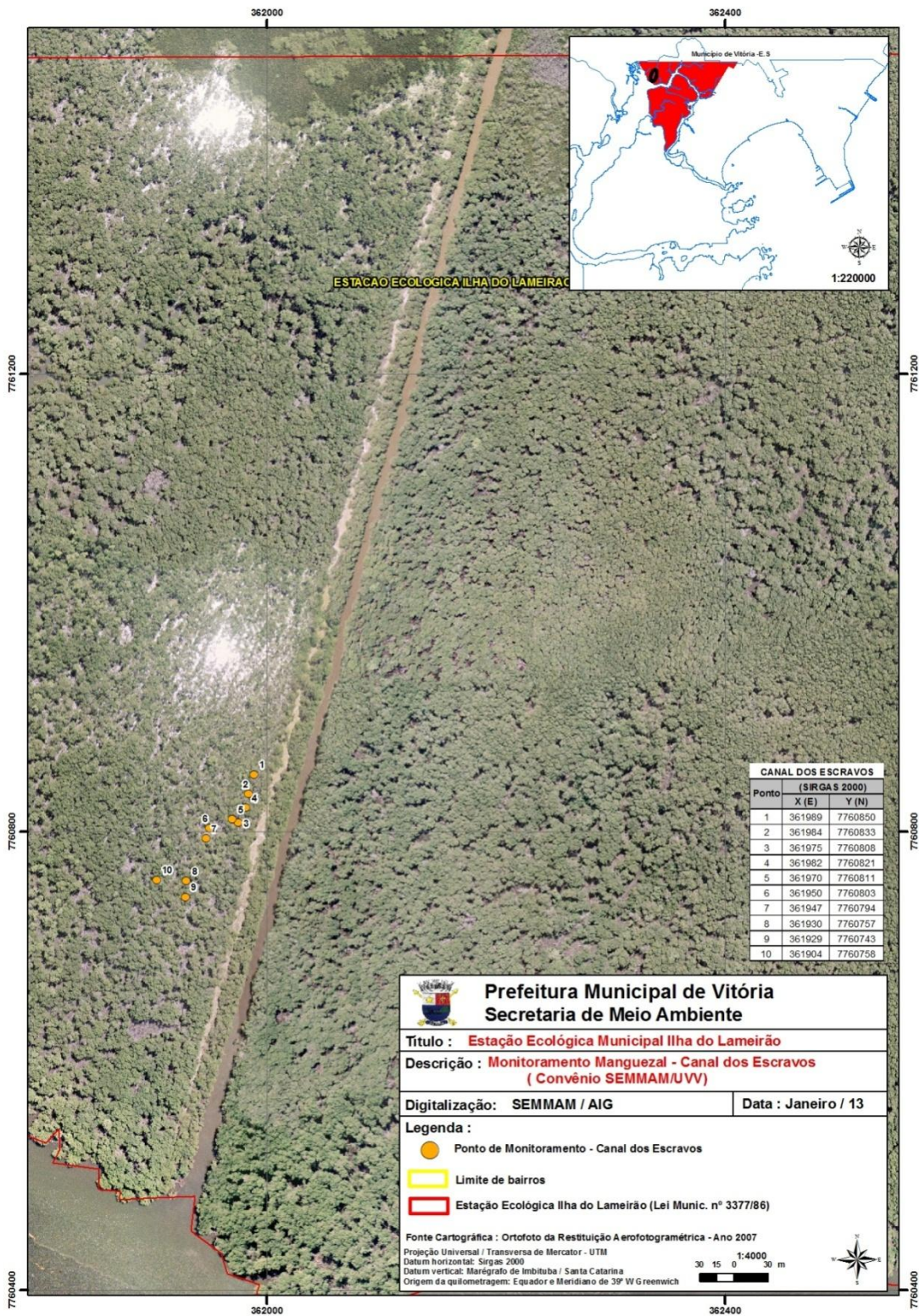


Anexo 4 - A: *Laguncularia racemosa* – A1: detalhe para o propágulo, A2: Estrutura adulta; B: *Rhizophora mangle* – B1: detalhe para o propágulo, B2: Seus rizóforos; C: *Avicennia germinans* – C1: detalhe para os propágulos, C2: pneumatóforos. (Barbirato, 2012).

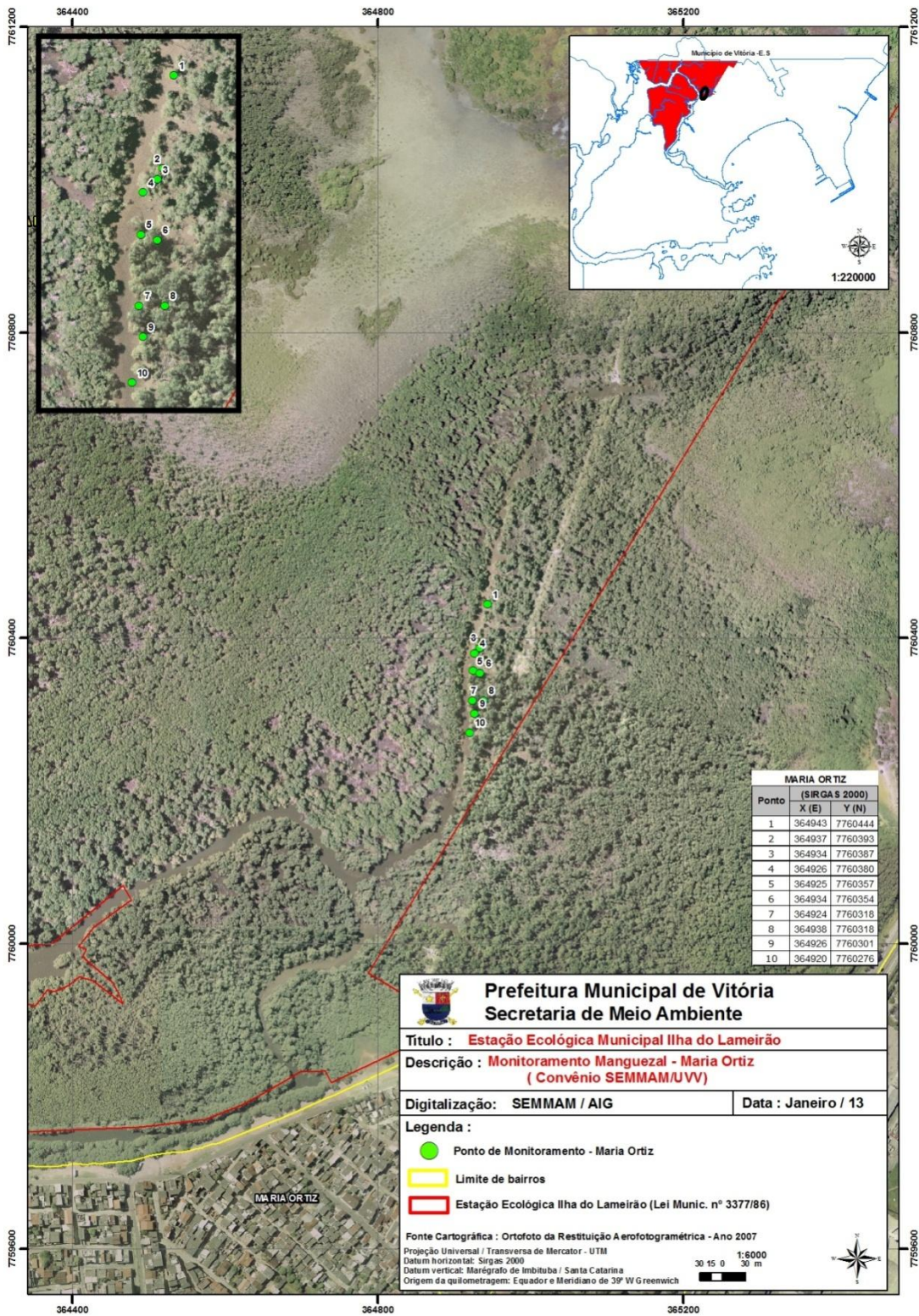
ANEXO 2 – Mapa mostrando as Classes de Vulnerabilidade da Estação Ecológica Municipal Ilha do Lameirão



ANEXO 3 – Mapa da área do Canal dos Escravos e os pontos de coleta de sedimentos



ANEXO 4 – Mapa da área de Maria Ortiz e os pontos de coleta de sedimentos



ANEXO 5 – Análise de determinação de acidez por titulação potenciométrica

ANEXO 6 – Plântulas de milho cultivadas hidroponicamente na presença e ausência dos materiais húmicos estudados



ANEXO 7 – Plântulas de tomate cultivadas hidroponicamente na presença e ausência dos materiais húmicos estudados

