

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

**AMENIZAÇÃO DA TOXIDEZ POR FERRO EM PLÂNTULAS DE
AROEIRA (*Schinus terebinthifolius* Raddi) TRATADAS COM
SUBSTÂNCIAS HÚMICAS**

TAMIRES CRUZ DOS SANTOS

VILA VELHA
FEVEREIRO / 2014

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

**AMENIZAÇÃO DA TOXIDEZ POR FERRO EM PLÂNTULAS DE
AROEIRA (*Schinus terebinthifolius* Raddi) TRATADAS COM
SUBSTÂNCIAS HÚMICAS**

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

TAMIRES CRUZ DOS SANTOS

VILA VELHA
FEVEREIRO / 2014

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

S237a Santos, Tamires Cruz dos.

Amenização da toxidez por ferro em plântulas de aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*) tratadas com substâncias húmicas / Tamires Cruz dos Santos. – 2014.

48 f.: il.

Orientador: Leonardo Barros Dobbs.

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) - Universidade Vila Velha, 2014.

Inclui bibliografias.

1. Substâncias húmicas. 2. Plantas – Efeito do ferro. 3. Estresse oxidativo. I. Dobbs, Leonardo. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 571.95

TAMIRES CRUZ DOS SANTOS

**AMENIZAÇÃO DA TOXIDEX POR FERRO EM PLÂNTULAS DE
AROEIRA (*Schinus terebinthifolius* Raddi) TRATADAS COM
SUBSTÂNCIAS HÚMICAS**

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

Aprovada em 28 de fevereiro de 2014,

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Anderson Lopes Peçanha - UFES



Prof.ª Dr.ª Tatiane da Costa Barbé - UFRRJ



Prof. Dr. Leonardo Barros Dobbss - UVV

Orientador

Dedico a todos que me ajudaram nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus “pais científicos”, Leonardo Barros Dobbs (orientador) e Alessandro Coutinho Ramos pela confiança, apoio, dedicação, idéias, puxões de orelha, grande paciência e por me aceitar tão calorosamente em seus grupos.

Aos meus pais (Claudia e Artur), a minha irmã (Taís), e meu namorado (Patrik), pessoas que eu amo muito, por entenderem minha ausência, às vezes em datas importantes, mas que, contudo me apoiaram sempre!

Aos professores da Universidade Vila Velha que passaram seus conhecimentos.

Aos meus muito amados colegas (AMIGOS) do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LMAB)! Em especial Julinha, Sávio, Gabi, Katherine e Nágila.

Um agradecimento em especial à Muriel, por sua grande paciência em me ensinar muita coisas novas e por suas ótimas ideias. À Priscylla Pavione pela amizade por todos esses anos, por me ajudar em seu laboratório, com certeza fizeram uma grande diferença na minha vida.

À FAPES pela bolsa concedida, que foi muito importante para a conclusão deste trabalho.

Obrigada a todos!

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1.INTRODUÇÃO.....	2
2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	5
2.1. Metais pesados ou elementos traço.....	5
2.2. O íon Ferro.....	5
2.3. <i>Schinus terebinthifolius</i>	7
2.4. Efeito Complexante das Substâncias Húmicas.....	8
2.5 Efeitos biológicos das Substâncias Húmicas.....	10
2.6 Estresse oxidativo em plantas.....	11
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Coleta das sementes e cultivo das plântulas de <i>S. terebinthifolius</i>	13
3.2. Extração das SH do vermicomposto.....	13
3.2.1. Composição elementar das SH.....	14
3.2.2. Acidez das SH.....	14
3.2.3. Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (Uv-Vis) das SH...14	
3.3. Experimento de ensaio de doses - avaliação do desenvolvimento inicial de <i>S. terebinthifolius</i> em diferentes concentrações de SH.....	14
3.4. Experimento com diferentes concentrações de Fe em solução nutritiva.....	15
3.5. Cultivo hidropônico utilizando-se ferro combinado ou não com substâncias húmicas.....	15
3.6. Determinação da atividade de enzimas antioxidantes.....	16

3.6.1. Determinação da atividade da catalase (EC 1.11.1.6).....	16
3.6.2. Determinação da atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7).....	17
3.6.3. Determinação da atividade das peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11).....	17
3.7. Delineamento experimental e análise estatística.....	18
4.RESULTADO E DISCUSSÃO.....	19
4.1. Caracterização da SH oriunda de vermicomposto.....	19
4.2. Ensaio de doses - avaliação do desenvolvimento inicial de <i>S. terebinthifolius</i> em diferentes concentrações de SH.....	20
4.3. Efeitos de diferentes concentrações de Fe em solução nutritiva sobre o crescimento de plântulas de <i>S. terebinthifolius</i>	21
4.4. Efeitos da interação Fe-SH em solução nutritiva sobre o crescimento de plântulas de <i>S. terebinthifolius</i>	23
4.5. Ensaio Bioquímico: Atividade das Enzimas Antioxidantes.....	28
5. CONCLUSÕES.....	33
6.REFERÊNCIAS.....	34

RESUMO

SANTOS, TAMIREZ CRUZ DOS, M.Sc, Universidade Vila Velha - ES, fevereiro de 2014. **Amenização da toxidez por ferro em plântulas de aroeira (*Schinus terebinthifolius raddi*) tratadas com substâncias húmicas.** Orientador: Prof. Dr. Leonardo Barros Dobbss.

Esta dissertação investigou a capacidade das substâncias húmicas (SH) da matéria orgânica controlar a toxidez causada por ferro (Fe) em plântulas de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) avaliando o efeito da interação SH-Fe sobre a promoção do crescimento tendo como ponto de partida o reconhecimento das SH como ativadoras biológicas vegetais (com destaque para o incremento ao desenvolvimento radicular) e possuírem capacidade complexante. Esse trabalho se baseou no mecanismo de regulação da atividade das SH sobre as plantas que, devido à presença de vários grupamentos funcionais, pode complexar metais pesados, diminuindo a toxidade dos poluentes disponíveis no ambiente. Para os objetivos propostos serem atendidos foram realizados ensaios para a obtenção de concentrações tanto de SH como de Fe e posteriormente estabelecidos tratamentos onde as SH e o Fe foram utilizados em combinação ou não sobre o crescimento e o metabolismo de plântulas de aroeira. De acordo com os resultados, a espécie estudada se comportou como bioindicadora de poluição por Fe apresentando sintomas típicos que foram progressivamente aumentados de acordo com o fornecimento de concentrações crescentes de Fe à solução nutritiva e posteriormente diminuídos quando do fornecimento da melhor dose de SH aos tratamentos. De uma maneira geral as plantas tiveram um melhor crescimento no tratamento onde foi fornecida a melhor dose de SH. Quando combinado Fe e SH houve a recuperação do crescimento das plântulas, bem como a diminuição da atividade das enzimas catalase, peroxidase e peroxidase do ascorbato, demonstrando que possivelmente as SH são capazes de controlar o estresse oxidativo em plantas de aroeira. Desta forma com essa dissertação pôde-se concluir que as SH se comportaram como um agente mitigador do stress causado pelo excesso de ferro em plântulas de aroeira.

Palavras chaves: restinga, matéria orgânica, complexação, bioatividade e estresse oxidativo.

ABSTRACT

SANTOS, TAMIREZ CRUZ DOS, M.Sc, Universidade Vila Velha - ES, february, 2014. **Iron toxicity alleviation in seedlings of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) treated with humic substances.** Advisor: Prof. Dr. Leonardo Barros Dobbss.

This dissertation investigated the ability of humic substances (HS) of the organic matter control the toxicity caused by iron (Fe) in seedlings of aroeira (*Schinus terebinthifolius*) evaluating the effect of SH-Fe interaction on promoting growth taking as its starting point the SH recognition of biological activators such as vegetables (especially the increment of root development) and having complexing capability. This work was based on the mechanism regulating the activity of HS on plants which, owing to the presence of various functional groups can complexing heavy metals, reducing the toxicity of environmental pollutants available. For the proposed goals be met in order to obtain test concentrations of both as Fe SH and further treatments established where SH and Fe were used alone or in combination on the growth and metabolism of seedlings were held roeira. According to the results, the species studied behaved as a bioindicator of pollution Fe showing typical symptoms were gradually increased according to the supply of Fe increasing concentrations of the nutritive solution and subsequently decreased when the supply of doses of the treatments SH. Generally plants had a better growth treatment which was given the best dose SH. When combined Fe and HS was the recovery of seedling growth as well as decreased activity of catalase, peroxidase and ascorbate peroxidase, possibly indicating that the SH are capable of controlling oxidative stress in plants mastic. Thus with this dissertation we concluded that HS behaved as a mitigating agent of stress caused by excess iron in seedlings of aroeira.

Keywords: restinga, organic matter, complexation, bioactivity and oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO

O crescente número de usinas do setor de mineração e beneficiamento de minério de ferro no litoral brasileiro é responsável pela emissão de diversos poluentes atmosféricos que podem comprometer a sobrevivência de espécies sensíveis (Silva *et al.*, 2006; Kuki *et al.*, 2008, Neves *et al.*, 2009), tal como a aroeira (*Schinus terebinthifolius raddi*), espécie sensível a toxidez pelo íon ferro (Fe) (Santos *et al.*, 2011). Cada espécie vegetal possui variação de sensibilidade a elementos traço (Silva, *et al.*, 2007), sendo que a maioria ao absorvê-los conseguem limitar parte de sua translocação no interior do tecido vegetal (Soares *et al.*, 2001).

Os micronutrientes são de extrema importância para as plantas manterem seu crescimento e têm papel importante na formação de vários complexos enzimáticos (Kirkby & Römheld, 2007), porém o limiar entre a dose ótima e a tóxica desses elementos é bem estreito e sintomas de toxidez são diagnosticados através de um pequeno excesso em suas dosagens (Taiz & Zeiger, 2013).

Dentre os principais agentes poluentes se encontram o dióxido de enxofre (SO₂) e o pó de minério de ferro (Lopes *et al.*, 2000). Quando suspensos na atmosfera esses poluentes se depositam sobre a vegetação como chuva ácida e na forma de material sólido particulado de ferro (MSPFe). A chuva ácida provoca nas plantas um excessivo acúmulo intracelular de H⁺ e outros íons, o que leva à desestruturação da permeabilidade das membranas, aumento da acidez no estroma dos cloroplastos, desacoplamento no transporte de elétrons e consequente redução nos níveis de ATP e NADPH (Velikova *et al.*, 1999, Silva *et al.*, 2005).

A acidez do solo causada pela chuva ácida condiciona baixos valores de pH o que torna o ferro prontamente disponível para as plantas (Hell e Stephan, 2003), podendo levar seu acúmulo a níveis tóxicos nos tecidos vegetais (Silva *et al.*, 2005, Silva *et al.*, 2006). Esta condição potencializa a formação de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo (Becana *et al.*, 1998, Neves *et al.*,

2009). Portanto, os efeitos da chuva ácida junto à deposição de MSPFe sobre a vegetação possuem um efeito sinérgico no qual um, o baixo pH, potencializa o efeito do outro, MSPFe, o que pode levar às comunidades vegetais a uma nova situação antrópica de distúrbio (Kuki *et al.*, 2008).

Atualmente, cada vez mais pesquisas vêm estudando mecanismos de tolerância ao excesso de Fe devido a atividades antrópicas. A possibilidade de selecionar plantas tolerantes à presença deste elemento é bastante estudada. No entanto, empregar mecanismos que não permitam que o Fe atinja as estruturas celulares da planta hospedeira apesar de menos estudado vem sendo uma alternativa viável.

As substâncias húmicas (SH) são formadas pela transformação de biomoléculas, durante o processo de decomposição de resíduos vegetais e animais, e das atividades metabólicas de microrganismos presentes no ambiente (Nomura *et al.*, 2012). São definidas como uma supramolécula de massa molar aparentemente elevada que podem ser desmontada por pequenas quantidades de ácidos orgânicos (Piccolo, 2002; Zandonadi *et al.*, 2007 e Dobbss *et al.*, 2010). Devido à natureza complexa das SH, estas, conferem uma apreciável capacidade de formarem complexos estáveis com cátions de elementos traço. Em função desta propriedade, as SH exercem importante papel na mobilidade, no transporte e na atividade de íons metálicos no meio ambiente (Colombo, 2007). Portanto, devido às suas características estruturais as SH podem interagir com metais, tal como o Fe e também com compostos orgânicos como, por exemplo, pesticidas e herbicidas (Junior, 2001).

De acordo com o exposto, a hipótese metodológica (desta dissertação) é de as SH isoladas de vermicomposto podem promover mudanças no padrão do crescimento da parte aérea e enraizamento, promover controle da toxidez e alterar a atividade de enzimas antioxidantes em plântulas de *S. terebinthifolius* cultivadas em solução nutritiva com excesso de Fe.

A fim de testar tal hipótese o objetivo geral deste trabalho foi testar a espécie *S. terebinthifolius* quanto a sua tolerância a diferentes doses de ferro em combinação ou não com SH oriundas de vermicomposto a fim de obter conhecimentos mais abrangentes sobre acumulação de Fe por essa espécie vegetal, associado a uma nova tecnologia, utilizando SH como composto

complexante e bioestimulante, visando à obtenção de possíveis minimizações a impactos ambientais. Especificamente, pretendeu-se: i) extrair e caracterizar quimicamente as SH oriundas de vermicomposto; ii) avaliar os efeitos das SH sobre o desenvolvimento radicular de plântulas de aroeira-vermelha após realização de ensaios de dose resposta; iii) avaliar o grau de tolerância da espécie, cultivada sob diferentes doses de Fe em solução nutritiva; iv) comprovar a eficiência das SH no controle da toxidez através da avaliação do crescimento radicular e da parte aérea das plantas; v) avaliar a atividade das enzimas do estresse oxidativo: peroxidase (POX); catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. *Schinus terebinthifolius*

A aroeira-vermelha (*Shinus terebinthifolius*) (Figura 2) é também conhecida como aroeira da praia e pimenta rosa (Paiva & Aloufa, 2009). É uma árvore nativa do Brasil da família das Anacardiaceae e está distribuída desde o nordeste até o sul do país, podendo também ocorrer no centro-oeste (Armstrong *et al.*, 1994).



Figura 2. Imagens ilustrativas da espécie vegetal estudada (*S. terebinthifolius*) (Fonte: Santos, T.C. 2012).

A aroeira é conhecida por suas propriedades medicinais (Lucena *et al.*, 2006). A casca e as folhas são as partes mais utilizadas, por apresentarem vários constituintes químicos como taninos e polifenóis (Paiva & Aloufa, 2009). Além de seu uso medicinal, a aroeira também possui também outras várias aplicações tais como: suplemento alimentar de animais e arborização de pastos e urbanização. Por ser resistente a condições adversas aroeira possui grande capacidade de rebrota e resistência ao fogo (Lorenzi, 2002), contudo é altamente sensível a exposição à doses tóxicas do elemento traço ferro (Santos, *et al.*, 2011), o que reforça o seu uso como planta bioindicadora e corrobora sua utilização nessa pesquisa.

Embora seja pouco cultivada no Brasil, a aroeira, como visto anteriormente, tem grande capacidade para a exploração e uso (Lenzi & Orth, 2004; Fernandes *et al.*, 2008). É uma espécie muito procurada por aves, que são possíveis dispersoras de seus frutos, que são do tipo drupa, pequeno, numeroso e de cor vermelha brilhante quando maduros (Lorenzi, 2002; Cesário & Gaglianone, 2008). Por ser considerada altamente pioneira, é indicada para o reflorestamento de áreas em estágio inicial de degradação, em áreas de margem de reservatórios e áreas de pequenos e médios cursos d'água. Devido à grande importância e distribuição de *S. terebinthifolius* na restinga, estas plantas são as mais indicadas para o uso em estudos sobre este ecossistema (Oliveira *et al.*, 2007).

2.2. Metais pesados ou elementos traço

Os metais pesados ou mais propriamente ditos elementos traço (ET), ocorrem naturalmente no ambiente e desempenham papel importante na nutrição de plantas e animais (Mendes *et al.*, 2010). Esses elementos são altamente reativos do ponto de vista químico, que explica o porquê de não serem encontrados puros na natureza (Ramos & Geraldo, 2007). Além disso, os ET podem expressar um potencial poluente diretamente nos organismos e o maior perigo está na transferência para a cadeia alimentar, uma vez que estes são bioacumulativos (Silva *et al.*, 2007) e quando estão presentes em excesso podem inibir o crescimento das plantas e causar alterações nas comunidades vegetais (Bertolazi *et al.*, 2010). Sendo assim, o nível de toxicidade varia de organismo para organismo, que vão depender da concentração e do papel do elemento nos processos bioquímicos em que estão envolvidos (Hall, 2002).

Atividades antrópicas, tais como a mineração, deposição inadequada de resíduos tóxicos e o uso de agrotóxicos em grandes quantidades de ET têm contribuído para o aumento da concentração desses metais no ambiente (Mendes *et al.*, 2010). O transporte destes nos vegetais é essencialmente feito através do xilema e o estágio de crescimento, o tempo de exposição e a concentração dos ET podem causar danos em vários níveis às plantas (Soares *et al.*, 2001).

Os ambientes contaminados por metais podem ser remediados através de técnicas físicas e biológicas de fitorremediação. Grandes esforços têm sido feitos para aumentar os conhecimentos que auxiliam a reabilitação de áreas contaminadas por ET (Guimarães *et al.*, 2008; Bertolazi *et al.*, 2010).

2.3. O íon Ferro

O Ferro (Fe) é um dos minerais mais abundantes na Terra, podendo estar disponível em duas formas: Fe^{2+} e Fe^{3+} . Na forma Fe^{2+} é mais solúvel e mais facilmente absorvido. No entanto em geral o Fe está disponível na forma oxidada (Fe^{3+}), que não é diretamente absorvível pelas plantas (Pereira, 2009).

O Fe é um micronutriente muito importante para as plantas, participando de vários centros de redução de proteínas que são essenciais para a fotossíntese e a respiração (Gross *et al.*, 2003). Este elemento é transportado via xilema até a parte aérea da planta (Schmidt, 2003). Atualmente são conhecidos dois mecanismos relacionados à absorção de Fe pelas raízes e que são ativados de acordo com a necessidade da planta (Kirkby & Römeheld, 2007). O primeiro mecanismo é característico de dicotiledôneas, em que os prótons são bombeados para o meio extraradicular pela enzima H^+ -ATPase, que está localizada na epiderme da raiz, tornando toda rizosfera mais ácida. Posteriormente, esta acidificação irá aumentar a disponibilidade do Fe, já que quanto menor o pH, maior será a solubilidade do Fe para a planta (Schmidt, 2003; Taiz & Zeiger, 2013). No caso do Fe^{3+} , este será reduzido pela enzima Quelato Ferrica Redutase e será transportado através da membrana plasmática da raiz (Schmidt, 2003). O segundo mecanismo, usado pelas gramíneas, envolve um processo de expulsão de sideróforos pelas raízes, formando assim complexos com íons férricos que serão transportados por transportadores específicos que são encontrados na membrana das células das raízes (Taiz & Zeiger, 2013) (Figura 1).

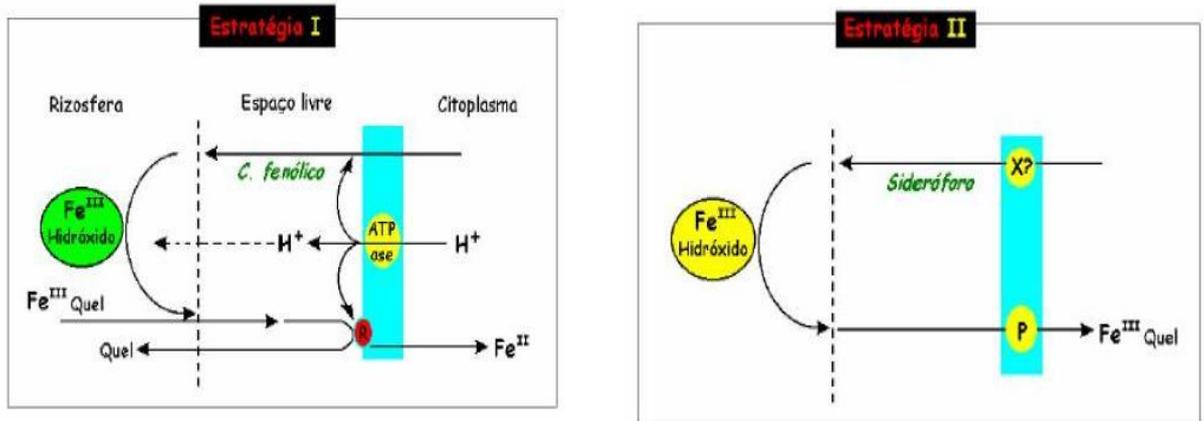


Figura 1. Esquema representativo das estratégias de absorção de ferro. Estratègia I em dicotiledôneas, Estratègias II em gramíneas (Fonte: Santos.T. C., 2011)

Quando o ferro está em excesso no meio, pode induzir a produção de radicais hidroxilas, agentes com maior capacidade de oxidação conhecidos (Gross *et al.*, 2003). A toxidez por ferro pode ocorrer através da absorção ou acúmulo em excesso pelas raízes, podendo formar um precipitado nas raízes que forma uma crosta de óxido de ferro que pode alterar a absorção de outros nutrientes como fósforo, potássio e zinco (Silveira *et al.*, 2007; Pereira, 2009). Para as plantas manterem seu crescimento e evitar a toxicidade por ferro, dependem de ações para armazenagem e remobilização do ferro, levando assim à homeostase (Jeong & Connolly, 2009). A homeostase desse metal é fundamental para o crescimento e desenvolvimento dos vegetais, pois tanto o excesso quanto a deficiência são prejudiciais.

2.4. Efeito Complexante das Substâncias Húmicas

A biodiversidade existente nos solos regula os processos biogeoquímicos formadores e mantenedores dos ecossistemas. Dentre esses processos ecológicos um dos mais importantes é a ciclagem da matéria orgânica que se inicia com a decomposição de resíduos na superfície de solos, águas e sedimentos (Begon, 2007).

As SH são formadas pela transformação de biomoléculas, durante o processo de decomposição de resíduos vegetais e animais, e das atividades metabólicas de micro-organismos presentes no ambiente (Nomura *et al.*, 2012).

São definidas como uma supramolécula de massa molecular aparentemente elevada que podem ser desmontadas por pequenas quantidades de ácidos orgânicos (Piccolo, 2002; Zandonadi *et al.*, 2007 e Dobbss *et al.*, 2010) (Figura 3). Estas substâncias tem papel importante na manutenção das características químicas, físicas e biológicas do solo, principalmente por possuírem grande capacidade de retenção de calor, influência na germinação e formação de raízes, além de estarem diretamente ligadas no transporte de compostos orgânicos no ambiente (Moraes & Rezende, 2004).

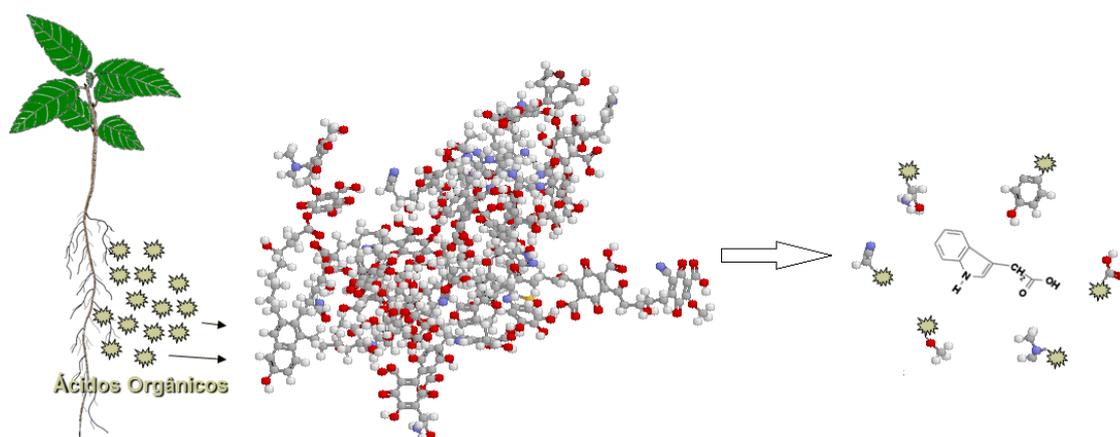


Figura 3. Rompimento do arranjo supraestrutural dos AH (Piccolo, 2002) por exsudados radiculares. Fonte:Modificado de Canellas & Santos (2005).

A maior habilidade de produção de ácidos orgânicos capazes de complexar metais e, com isso, alterar momentaneamente sua biodisponibilidade às plantas pode também ser uma explicação para a tolerância de algumas espécies vegetais. Canellas *et al.* (2008) verificaram que o perfil de exsudação de ácidos orgânicos em plantas tratadas com SH é bastante alterado. A aplicação de SH também parece estimular a expressão de genes envolvidos no transporte de nitratos (Quaggiotti *et al.*, 2004) e acúmulo de metais como ferro (Eyheraguibel *et al.*, 2008). Alguns estudos sobre a interação das SH com íons metálicos (metais pesados ou elementos traço) também vem sendo relacionados com processos de recuperação de ecossistemas naturais (Jerzykiewicz, 2013).

As SH possuem grupamentos ácidos carboxílicos e fenólicos que são capazes de complexar metais formando quelatos, dos quais se formam através do oxigênio do grupamento carboxílico e da hidroxila que estão ligados ao anel benzênico (Colombo *et al.*, 2007). As interações entre as SH e os metais são influenciadas por diversas variáveis, como carga e heterogeneidade químicas do

material húmico. Com isso essas interações dos íons metálicos com as SH estão intimamente ligados a força iônica e não somente à concentração que também estão atrelados com suas funções ligantes de cada metal (Bezerra *et al.*, 2009; Sanchez-Marin, 2007).

2.5. Efeitos biológicos das Substâncias Húmicas

Muitos autores já demonstraram de maneira clara o papel das SH sobre o incremento ao crescimento vegetal (Busato *et al.*, 2010; Canellas *et al.*, 2002; Rodda *et al.*, 2006; Canellas *et al.*, 2010). As SH podem estimular as plantas através aumento da atividade da enzima H⁺-ATPase presente na membrana plasmática (Canellas *et al.*, 2002; Zandonadi *et al.*, 2010) e tal ação sobre a bomba de H⁺ reflete em um aumento da emissão de raízes, na biomassa radicular e da absorção de nutrientes (Pinton *et al.*, 1999; Canellas *et al.*, 2002; Zandonadi *et al.*, 2007).

No entanto, nas últimas décadas, várias pesquisas têm revelado que as bases estruturais e funcionais da ação das SH sobre as plantas, parecem estar mais relacionadas aos reguladores de crescimento presentes em sua estrutura química (Canellas *et al.*, 2006). Desde 1917, Bottomley considerou que os auximônios (fração bioativa da matéria humificada) poderiam regular o crescimento das plantas. Foram publicados, nessa mesma época, os primeiros relatos sobre os hormônios vegetais e ideais muito semelhantes às de Bottomley foram defendidas por Hillitzer, Chaminade e Boucher. Seguindo outra linha de pensamento, Olsen pregava que as SH promoviam o crescimento das plantas por tornarem os micronutrientes mais solúveis e mais disponíveis para a absorção celular. O caso clássico estudado por Olsen em 1930 foi o aumento da absorção de ferro pelas plantas, que inspirou, mais tarde, os trabalhos de Pinton *et al.* (1997 e 1999), Mohamed *et al.* (1998), Cesco *et al.* (2000), Agnolon *et al.* (2002), Nikolic *et al.* (2003) e Chen *et al.* (2004). A forma de ferro absorvida pelas plantas é Fe(II) e Olsen demonstrou que as SH têm poder redutor suficiente para transformar Fe(III) em Fe(II).

Lieske (1931) sugeriu que as SH também poderiam alterar a permeabilidade das membranas das plantas através de sua ação surfactante aumentando a capacidade de absorção de nutrientes. A ação surfactante das SH

e o conseqüente aumento da fluidez das membranas é ainda advogada até hoje como um dos principais efeitos das SH no metabolismo celular (Daur & Bakhashwain 2013; Morard *et al.*, 2010; Samson & Visser, 1989; Visser, 1985 e 1987).

2.5. Estresse oxidativo em plantas

Diferentes tipos de impactos sejam eles antrópicos ou não podem causar o estresse oxidativo em plantas e paralelamente levar ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pelas mesmas (Carrillo & Valle, 2005) e esse sintoma ocorre quando os mecanismos celulares pró-oxidativos superam os antioxidantes (Gratão *et al.*, 2005). Portanto, o estresse oxidativo acontece quando existe uma grande produção de EROs por diferentes organismos.

Wang *et al.* (2009) relataram que a geração de EROs através da formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2); radical hidroxil ($OH\bullet$); oxigênio singlete ($1O_2$) ou ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é o principal causador de injúria nos tecidos das plantas após a exposição a contaminantes e ou outros produtos que causem distúrbios a nível celular. Todas as espécies que são muito reativas devido a sua instabilidade recebem a denominação de EROs.

As EROs desencadeiam reações peroxidativas e causam danos oxidativos significativos às membranas e a outras macromoléculas essenciais por interagirem de forma não específica com muitos componentes celulares (Foyer *et al.*, 1994; Mittler, 2002). As plantas, por sua vez, têm um sistema antioxidante complexo para evitar tais danos que envolvem defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas (Azevedo-Neto *et al.*, 2008). Defesas enzimáticas incluem, por exemplo, as seguintes enzimas: Catalase (CAT), Peroxidase (POX) e Peroxidase do ascorbato (APX), todas utilizadas nessa dissertação. No entanto também existem outras enzimas não estudadas aqui, mas que também são importantes, tais como a superóxido dismutase e outras enzimas ciclo ascorbato-glutationa (Gondim *et al.*, 2010). Dentre as defesas não enzimáticas incluem-se os antioxidantes: ácido ascórbico, glutationa, α -tocoferol e carotenóides.

A POX apresenta um caráter bifuncional no metabolismo oxidativo, pois podem utilizar o H_2O_2 para oxidar vários substratos por meio do seu ciclo

catalítico peroxidativo e também produzir $\text{OH}\cdot$ a partir do H_2O_2 por intermédio do seu ciclo catalítico hidroxílico (Passardi *et al.*, 2004). A CAT nos vegetais é encontrada nos glioxissomos, sendo responsável pela remoção do H_2O_2 gerado em diferentes processos nas plantas. É uma das enzimas chave envolvida na remoção de peróxidos tóxicos nas células quando estes estão em concentrações altas, pois apresenta baixa afinidade pelo H_2O_2 , atuando na decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (Mittler, 2002). Já a APX, de acordo Rizhsky *et al.* (2003), localiza-se primariamente nos cloroplastos e citosol e reduz o H_2O_2 (quando em baixas concentrações na célula) até água usando ascorbato como doador de elétrons, resultando na formação de dehidroascorbato. Este é reciclado a ascorbato usando a GSH como doadora de elétrons e a glutatona oxidada (GSSG) é convertida pela enzima glutatona redutase, dependente de NADPH.

2. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta das sementes e cultivo das plântulas de *S. terebentifolius*

Realizou-se a coleta das sementes das plântulas de aroeira (as sementes de aroeira foram obtidas por coleta na Aldeia Indígena Pau-Brasil, localizada no município de Aracruz-ES há 80 km da capital Vitória) e em seguida iniciou-se o processo da retirada das suas cascas e tegumentos para facilitação do processo de germinação. Após este procedimento as sementes foram secas e postas para germinar em bandejas plásticas num substrato contendo areia e vermiculita (proporção 1:1). As mudas permaneceram nas bandejas até completarem duas semanas e logo após foram transferidas para os tratamentos. Durante todo o cultivo (15 dias) as mudas permaneceram sob condições de fotoperíodo e temperatura controlados (8 horas de luz e 27°C).

3.2. Extração das SH do vermicomposto

200 g de amostras de húmus de minhoca (vermicomposto) obtido comercialmente (Vitaplan®) foram secas ao ar e peneiradas (peneira de malha de 2 mm). Nesta dissertação optou-se em utilizar como fonte de matéria orgânica o vermicomposto devido à comprovada estimulação de suas SH em diferentes espécies vegetais (Canellas et al., 2002; Dobbss et al. (2010); Canellas et al., 2010; Aguiar et al., 2013). A extração das SH foi realizada com NaOH 0,5 mol L⁻¹, na razão solo:solvente de 1:10 (m/v) em atmosfera inerte de N₂. Após 24h de agitação, a suspensão foi centrifugada e o resíduo insolúvel (humina) separado. O pH do sobrenadante foi ajustado para pH 3 com HCl 6 mol L⁻¹, e imediatamente passado em uma coluna preenchida com uma resina XAD-8. O material adsorvido na coluna foi eluído com uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹. O pH da solução eluída foi ajustado para 7 pela adição de algumas gotas de HCl 1 mol L⁻¹. Em seguida, as SH foram dializadas contra água destilada em membranas com poros de 14 kDa e secas por liofilização.

Após o processo de extração, as SH obtidas foram caracterizadas através das seguintes análises:

3.2.1. Composição elementar das SH

Foi realizada em analisador elementar automático Perkin Elmer 2400 com amostras de 4 mg de SH em triplicata. O conteúdo de oxigênio foi determinado por diferença, descontado os teores de cinzas e de umidade.

3.2.2. Acidez das SH

A acidez total foi determinada pelo método do Ba(OH)_2 com titulação do excesso com HCl, a acidez carboxílica (COOH) pelo tratamento com Ca(OAc)_2 e determinação do Ac liberado com NaOH e a acidez fenólica (PhOH) por diferença (Total - COOH) de acordo com método de Schnitzer & Gupta (1965).

3.2.3. Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (Uv-Vis) das SH

Foi obtida num espectrofotômetro Shimadzu 8300, acoplado ao computador para gravação de espectros. A faixa examinada para o ultravioleta foi de 200 a 350 nm, e de 350 a 700 nm para a região do visível. Os espectros foram registrados em uma solução contendo SH diluídas em NaHCO_3 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (20 mg C L^{-1}), com pH e força iônica ajustados para 8,0 e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Para determinação do coeficiente E_4/E_6 , a absorvância em 465 nm foi dividida pela obtida em 665 nm.

3.3. Experimento de ensaio de doses - avaliação do desenvolvimento inicial de *S. terebinthifolius* em diferentes concentrações de SH

Plântulas de aroeira, com o mesmo padrão de crescimento foram retiradas do substrato (areia + vermiculita) e tiveram suas raízes lavadas. Após este procedimento foi montado o experimento que avaliou a resposta das plântulas na presença de diferentes doses de SH extraídas de vermicomposto. Para isso, foram utilizados 3 potes plásticos pretos com capacidade de 1000 ml para cada tratamento (diferentes concentrações de SH) que receberam 20 plântulas que foram submetidas ao sistema hidropônico. Neste experimento foi utilizado o meio mínimo (CaCl_2 $2,0 \text{ mM L}^{-1}$) e as plantas permaneceram aeradas por meio de mini-compressores. As seguintes concentrações de SH foram utilizadas como

tratamentos: 0,0 mM C L⁻¹ (controle); 2,0 mM C L⁻¹; 4,0 mM C L⁻¹; 8,0 mM C L⁻¹; 16,0 mM C L⁻¹. As plântulas foram mantidas por 15 dias nos tratamentos e coletadas para avaliação do número de raízes laterais emergidas (NRL). Após a análise de regressão foi determinada a melhor dose de SH, através da integração da curva de dose resposta.

3.4. Experimento com diferentes concentrações de Fe em solução nutritiva

Para escolha da dose de Fe que foi utilizada nos experimentos combinados com SH, plântulas de aroeira foram cultivadas em hidroponia onde as soluções continham as seguintes doses da fonte de ferro utilizada (FeSO₄) 0 μM L⁻¹; 100 μM L⁻¹; 250,0 μM L⁻¹ e 500 μM L⁻¹. Da mesma maneira que no tópico anterior foi realizada uma triplicata dos vasos de cultivo cada um contendo 20 plântulas e a solução foi aerada constantemente. Após 15 dias de tratamento as plântulas foram coletadas para avaliação das áreas foliar e radicular (utilizando-se o programa *Delta T scan* (Delta-T Devices, Cambridge, UK)). Foi escolhida a concentração de Fe que causava maior toxicidade as plantas, porém onde as mesmas ainda continuavam viáveis.

3.5. Cultivo hidropônico utilizando-se ferro combinado ou não com substâncias húmicas

As condições experimentais deste ensaio também foram às mesmas descritas anteriormente, no entanto, desta vez, foram realizadas 10 repetições em solução nutritiva de Hogland (1950) composta pelos seguintes nutrientes: NaH₂PO₄ (0,56 mM L⁻¹); MgSO₄ (0,6 mM L⁻¹); NH₄NO₃ (0,9 mM L⁻¹); KCl (0,5 mM L⁻¹); KNO₃ (1,3 mM L⁻¹); Ca(NO₃) (2,53 mM L⁻¹). O uso da solução nutritiva neste caso se deveu pelo fato das plântulas terem se desenvolvido por mais tempo nos tratamentos (30 dias). Neste experimento foram utilizadas as concentrações recomendadas (de SH e Fe) obtidas nos experimentos anteriores de dose resposta, totalizando 4 tratamentos (Tabela 1). As soluções foram trocadas a cada 7 dias e seu volume completado diariamente, sendo o pH mantido em 4,5 ± 0,2 com a adição de HCl ou NaOH.

Tabela 1. Descrição dos tratamentos utilizados no cultivo hidropônico de *S. terebinthifolius* combinando-se Fe+SH.

Tratamento 1	Controle	Somente solução nutritiva
Tratamento 2	Dose recomendada de SH	Solução nutritiva + Dose de SH
Tratamento 3	Dose recomendada de Fe	Solução nutritiva + Dose de Fe
Tratamento 4	Uso combinado das doses recomendadas de Fe + SH	Solução nutritiva + Dose de Fe + Dose de SH

Após o tempo de cultivo as plantas foram coletadas para posterior avaliação dos seguintes parâmetros biométricos: número de raízes laterais (NRL); comprimento das raízes principais (CRP); densidade de raízes laterais (NRL/CRP); área radicular e foliar. Para a avaliação das áreas, imagens das amostras das raízes e da parte aérea de *S. terebinthifolius* foram capturadas a 300 dpi e posteriormente processadas no programa *Delta T scan* (Delta-T Devices, Cambridge, UK). Outras amostras de plântulas de aroeira foram utilizadas para a determinação da atividade de enzimas do estresse oxidativo.

3.6. Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

Os extratos enzimáticos foram obtidos pela maceração de aproximadamente 0,2 g de tecido foliar e radicular em N₂ líquido e, então, adicionado 2 mL de meio de homogeneização, constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999). O homogeneizado, depois de filtrado através de quatro camadas de gaze, foi centrifugado a 12.000 g por 15 min, a 4°C, e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático bruto.

3.6.1. Determinação da atividade da catalase (EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM (Havir e Mchale, 1987). O decréscimo na absorbância, no primeiro minuto de reação, foi medido a 240 nm a

25°C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Anderson *et al.*, 1995) e expressa em μmoles de peróxido de hidrogênio $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

3.6.2. Determinação da atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7)

Para ensaios de atividade peroxidásica foi utilizado borato de sódio 10 mM, pH 9,0, NaCl 0,125 M, PMSF 1 mM, na proporção de 1 g de peso fresco para 4 mL do tampão, que permaneceu em agitação em tubos “Eppendorfs” por 3 h a 4°C. Em seguida o material foi centrifugado a $10.000 \times g$, a 4°C, por 10 min., posteriormente o sobrenadante foi coletado e o precipitado descartado, ao sobrenadante foi adicionado polietilenoglicol 14 % (PEG) e em seguida fosfato de potássio a 8,5 % (K_2PO_4), para separação dos pigmentos. Após esta separação das fases, coletou-se a fase inferior (Leon *et al.*, 2002).

A atividade da peroxidase nos tecidos do sistema radicular e foliar foi determinada pelo método de Kar & Mishra (1976). Alíquotas de 100 μL do extrato enzimático diluído 1:20, tanto de raiz quanto de folhas, foram adicionados a 2,9 mL de uma mistura de reação constituída de tampão de fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H_2O_2 20 mM. O acréscimo na absorbância a 420 nm, à temperatura de 25°C, foi medido durante o primeiro minuto de reação pela produção de purpurogalina, sendo, a atividade da POX determinada com base na inclinação da reta nos primeiros segundos, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Chance & Maehley, 1955) e o resultado expresso em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

3.6.3. Determinação da atividade das peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)

A atividade da peroxidase do ascorbato foi determinada de acordo com o método de Nakano & Asada (1981), porém modificado por Koshiba (1993). Alíquotas de 100 μL do extrato enzimático bruto de raiz e de 100 μL do extrato enzimático foliar diluído 1:5, foram adicionados a 2,9 mL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8

mM e H₂O₂ 1 mM. O decréscimo na absorvância a 290 nm, à temperatura de 25°C, foi medido durante o primeiro minuto de reação, sendo, a atividade da APX determinada com base na inclinação da reta nos primeiros segundos, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ (Nakano & Asada, 1981) e o resultado expresso em µmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

3.7. Delineamento experimental e análise estatística

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado. O teste de Kappa2 (p<0,05) foi utilizado para avaliação da normalidade dos dados. Após a constatação de que os dados eram paramétricos foi realizada uma análise de variância ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste Tukey (P<0,05) pelo programa SISVAR da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Para a determinação da melhor dose de SH foi realizada uma análise de regressão. A fim de ser melhor interpretar os dados alguns resultados foram normalizados em relação ao controle e posteriormente estabelecidas às devidas comparações.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização da SH oriunda de vermicomposto

A escolha do solvente de extração é um primeiro passo importante para a caracterização de materiais húmicos uma vez que esses influenciam nas características químicas do mesmo (Dobbss *et al.*, 2006). Nesse trabalho foi escolhido o NaOH devido seu maior rendimento na extração e ser o solvente mais indicado pela Sociedade Internacional das Substâncias Húmicas (IHSS).

A composição elementar, razões molares, acidez total, carboxílica e fenólica, bem com a relação E_4/E_6 das SH apresentadas na Tabela 2. De um modo geral, o comportamento dos valores de todas as características avaliadas é similar a de outros materiais húmicos estudados previamente (Rice & MaCarthy, 1991; Dobbss *et al.*, 2009; 2010). No entanto o conteúdo de O é alto (45,17%) em relação à composição elementar média de outros materiais (Canellas *et al.*, 2005).

Tabela 2. Composição elementar (livre de água e cinzas), relações molares, acidez total, carboxílica e fenólica e relação E_4/E_6 do material húmico estudado.

Composição elementar				Razões molares			Acidez			Relação E_4/E_6
%				-			(cmol _c kg ⁻¹)			-
C	H	N	O	C/N	H/C	O/C	Total	COOH	PhOH	-
46,57	5,72	2,99	45,17	15,56	0,77	0,73	745	351	394	3,47

O valor mais baixo de N (2,99%) e alto de C (46,57%) confere valores altos da relação C/N à SH, o que pode ser mais associado à evolução química do que à estabilização pela atividade biológica (Canellas *et al.*, 2005). A relação O/C baixa (0,73) refletiu numa acidez carboxílica (351,0 cmol_c kg⁻¹) menor que a fenólica (394,0 cmol_c kg⁻¹) (Rice & MacCarthy, 1991). A alta relação C/N (15,56) e a baixa relação H/C (0,77) são consideradas indicadoras de elevado grau de estabilidade do húmus e de quantidades significativas de estruturas condensadas

nas SH (Stevenson, 1994), que têm sido interpretadas tradicionalmente como avanço do grau de humificação.

A acidez total das SH é alta (745,0 cmolc kg⁻¹) e compatível com o grau elevado de oxidação das SH oriundas de vermicomposto e, portanto, com elevado conteúdo de oxigênio. O grau de humificação das SH solúveis pode ser normalmente avaliado pelos valores da relação E₄/E₆ (Kononova, 1966). Neste trabalho o valor desta variável avaliada foi de 3,47. Valores desta relação geralmente são menores que 5 para SH extraídas substratos férteis (Stevenson, 1994), corroborando com o resultado dessa dissertação onde a fonte de matéria orgânica foi o vermicomposto (utilizado como abubo orgânico natural).

4.2. Ensaio de doses - avaliação do desenvolvimento inicial de *S. terebinthifolius* em diferentes concentrações de SH

Um modelo polinomial de segunda ordem descreveu os efeitos das diferentes doses de SH sobre o número de raízes laterais de plântulas de *S. terebinthifolius* (Figura 4 A).

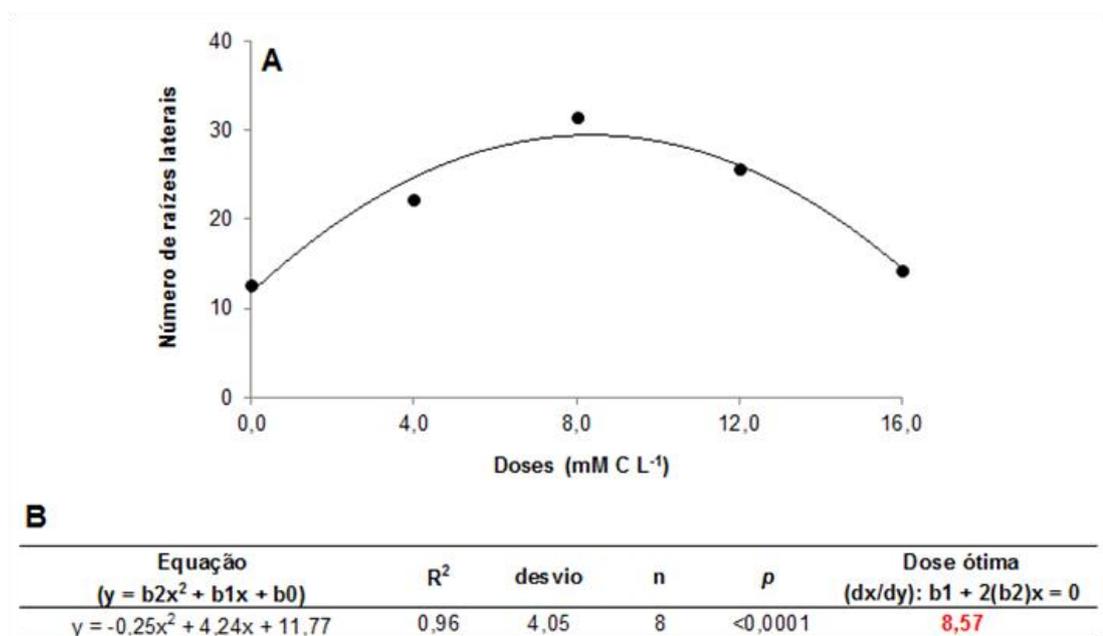


Figura 4. (A) Curva de dose resposta para o número de raízes laterais de plântulas de *S. terebinthifolius*. **(B)** Modelo de dose-resposta, coeficiente de correlação (R²), desvio-padrão da regressão (desvio), número de unidades que integram a amostra (n), nível de significância da regressão (p) e ponto de inflexão

(dose ótima) para o número de raízes laterais após tratamento com as diferentes doses de SH de vermicomposto.

Vários trabalhos descritos na literatura, da mesma maneira, demonstraram esse efeito com outros materiais húmicos e outras espécies vegetais (Aguiar *et al.*, 2009; Canellas *et al.*, 2010; Dobbss *et al.*, 2010). Vaughan & Malcolm (1985) também observaram estímulos ao crescimento radicular com concentrações baixas de SH e inibições com o aumento gradativo destas e atribuíram esse efeito à semelhança com os ensaios com hormônios vegetais onde geralmente o modelo de dose resposta é muito semelhante aos obtidos com SH.

A dose ótima (ponto de inflexão da equação quadrática) encontrada para o número de raízes laterais de plântulas de *S. terebinthifolius* foi de 8,57 mM de C de SH (Figura 4 B). Tal dose encontrada é bem maior do que as frequentemente encontradas em outros trabalhos descritos na literatura. Por exemplo, Dobbss *et al.*, 2010 estudando SH oriundas de vermicomposto e seus derivados químicos encontraram uma dose ótima média de 2,07 mM de C L⁻¹ para o incrementos dos materiais húmicos em plântulas de milho e Aguiar *et al.* (2009) avaliando uma possível relação entre o tamanho molecular de subfrações húmicas e as suas respostas sobre o crescimento radicular de *Arabidopsis thaliana* detectaram a concentração média de 5,11 mM C L⁻¹ como a mais adequada para o estímulo desta espécie vegetal.

4.3. Efeitos de diferentes concentrações de Fe em solução nutritiva sobre o crescimento de plântulas de *S. terebinthifolius*

Plântulas de aroeira se mostraram sensíveis às doses de ferro, tendo um menor crescimento tanto das raízes quanto da parte aérea, conforme demonstrado após a análise das áreas radicular e foliar (Figura 5 A e B). Já na menor na dose de ferro, no período final da condução experimental essa diferença já era significativa havendo uma diminuição de aproximadamente 20% na área radicular em relação às plântulas controle. Com relação às demais doses essa diferença foi ainda maior variando entre 31,81 e 39,39% de decréscimo da área radicular em comparação com o tratamento controle nas doses de 100 e 500 µM L⁻¹ de Fe respectivamente.

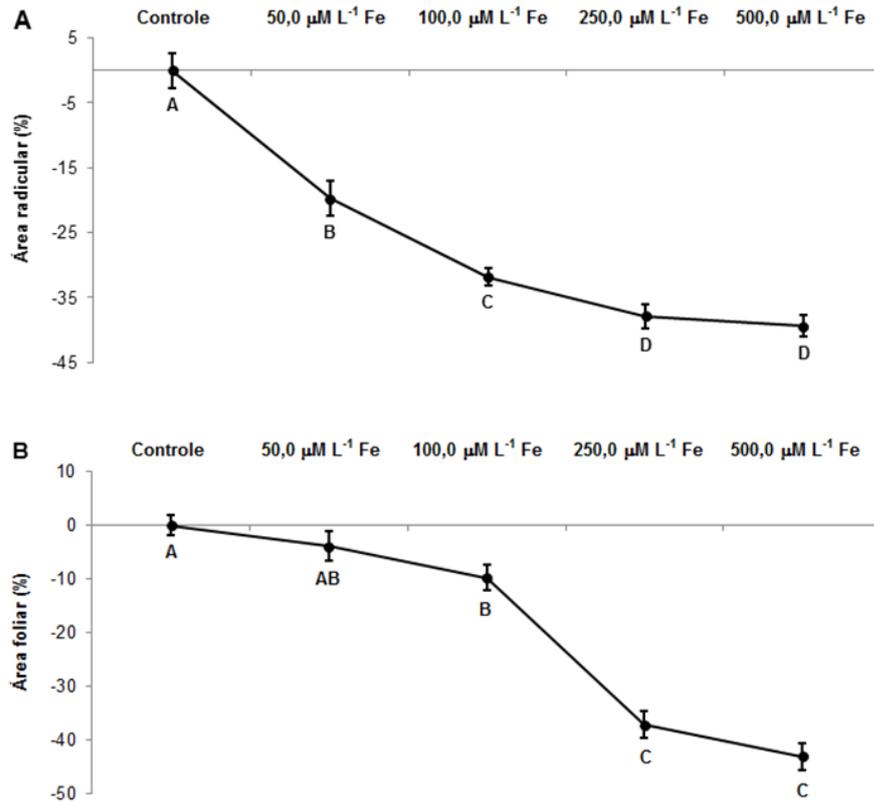


Figura 5. Efeito de diferentes doses de Fe sobre a área radicular **(A)** e foliar **(B)** de plântulas de *S. terebinthifolius*. Letras maiúsculas correspondem às diferenças significativas entre as médias pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Os dados foram normalizados em relação ao controle (Controle=0%) \pm desvio padrão.

Kuki e colaboradores em 2009 observaram que diferentes doses de ferro na forma particulada associada ao baixo pH causavam danos ao crescimento vegetal uma vez que nessas condições, a absorção de Fe pelas raízes é aumentada e prejudica o crescimento inicial dos vegetais.

De acordo com a Figura 5B nas maiores doses de Fe puderam-se ser observadas diferenças significativas em relação ao controle também com relação à área foliar. Quando foi fornecida a dose de 100 µM Fe L⁻¹ o decréscimo da área foliar foi de 9,80% em relação ao controle, no entanto efeitos mais expressivos foram observados na dose de 500 µM Fe L⁻¹ chegando até 43,13%, porém causando a posterior morte das plântulas. Foi possível observar também que desde a primeira dose (50 µM Fe L⁻¹) as plantas já começavam a apresentar sintomas clássicos de intoxicação por ferro (Figura 8 B e C).

Conforme pode ser observado na Figura 5 A e B, tanto para a área radicular quanto para foliar não existem diferenças significativas entre as doses de 250 e 500 $\mu\text{M Fe L}^{-1}$. No entanto, somente até a dose de 250 μM de Fe, as plantas se mantiveram vivas e viáveis até o final do experimento e a partir desta constatação tal dose foi escolhida como a ideal para ser utilizada nos testes comparativos em combinação ou não com a melhor dose de SH.

4.4. Efeitos da interação Fe-SH em solução nutritiva sobre o crescimento de plântulas de *S. terebinthifolius*

A Figura 6 A, B e C apresenta os resultados do uso combinado ou não de Fe com SH sobre a arquitetura radicular de plântulas de aroeira. Com relação ao comprimento das raízes principais pode-se observar que houve diferenças significativas entre os tratamentos com destaque para o tratamento com a melhor dose de SH isoladamente ou em combinação com a dose escolhida de Fe. Não foi observada diferença significativa entre o tratamento com Fe isoladamente e o tratamento controle Figura 6A. Com relação ao número de raízes laterais (Figura 6B) o tratamento com 8,57 mM C L⁻¹ de SH mostrou grande estimulação sendo significativamente diferente em relação a todos os outros tratamentos com média de aproximadamente 30 raízes laterais, mais que o dobro que o tratamento controle. O tratamento com a dose de 250 $\mu\text{M Fe L}^{-1}$ isoladamente apresentou o menor número de raízes laterais, em torno de 11, mostrando o dano que esta dose causa as raízes das plântulas de aroeira. Tanto para o comprimento das raízes principais quanto para o número de raízes laterais, quando se adiciona SH em conjunto com a dose de Fe há uma aparente recuperação do sintoma de toxidez nas plântulas (Figura 8A). Na densidade radicular (Figura 6C) somente o tratamento em que a SH foi adicionada isoladamente à solução de cultivo, conforme esperado, foi significativamente diferente dos demais tratamentos, com o valor de 4,2 raízes laterais por centímetro de raízes principais.

O tratamento com a dose de 250 $\mu\text{M Fe L}^{-1}$ influenciou diretamente na área radicular e foliar (Figura 7 A e B). No tratamento em que é fornecida somente a dose recomendada de Fe, as plantas apresentaram decréscimos destes parâmetros avaliados em relação ao controle, com 37,5% de inibição na a

área radicular e 36,4% na foliar em relação ao tratamento controle (0%), novamente mostrando a sensibilidade da aroeira à referida dose de Fe.

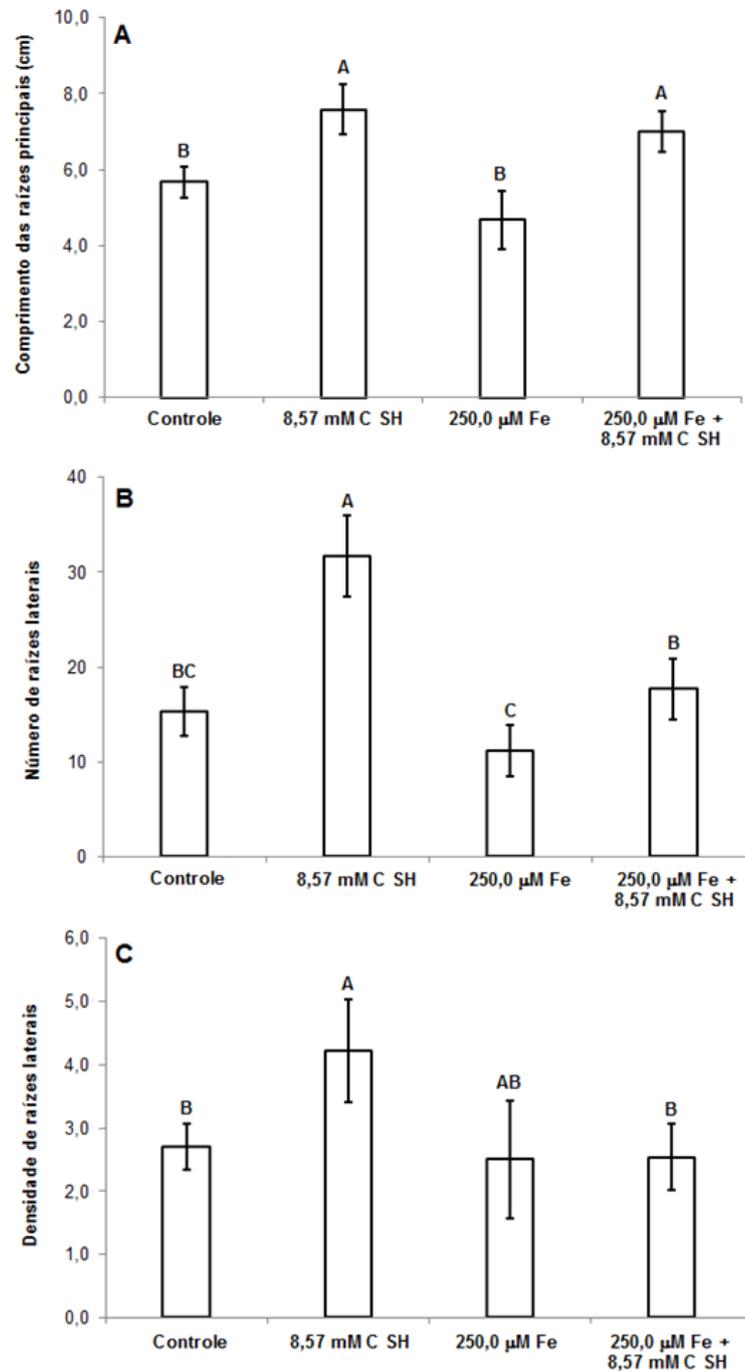


Figura 6. Efeito dos diferentes tratamentos, após ensaio de doses, sobre o crescimento radicular de plântulas de *S. terebinthifolius*. Em **A**: comprimento das raízes principais; **B**: número de raízes laterais emergidas; e **C**: densidade de raízes laterais. Letras maiúsculas correspondem às diferenças significativas entre as médias pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Os valores são representados pelas médias \pm DP.

Enquanto isso a SH isoladamente na dose de 8,57 mM de C L⁻¹ demonstrou possuir um papel fundamental no incremento das áreas radicular e foliar, em plântulas de aroeira. Tal tratamento obteve incrementos significativos em relação ao controle na área radicular (23,43%) e foliar (19,61%) (Figura 7 A e B). É interessante notar que novamente há uma tendência à recuperação das plantas de aroeira ao efeito tóxico do Fe quando se observa o uso conjunto das doses de Fe e SH (Figura 8A). Para a área radicular de um valor negativo com o ferro isoladamente (-37,5%), com a adição de SH a solução este se torna positivo (4,69%). A mesma tendência ocorre na área foliar, porém com valores mais expressivos, onde o valor negativo de -36,47% passa a positivo (13,72%) quando da combinação com a SH.

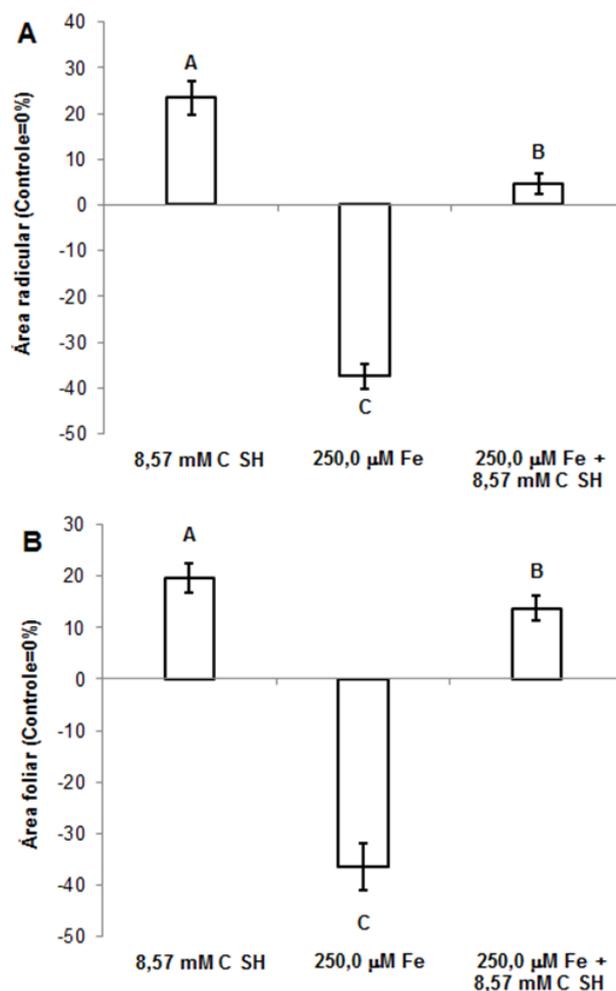


Figura 7. Efeito dos diferentes tratamentos, após ensaio de doses, sobre as áreas: radicular (**A**) e foliar (**B**) de plântulas de *S. terebinthifolius*. Os dados foram normalizados em relação ao controle [(plantas crescidas somente na solução nutritiva (controle=0%)], sendo os valores representados pelas médias \pm DP.

Em trabalho realizado por Santos *et al.* (2011), tal como nesse trabalho, também foram observadas inibições que variaram de 1,76% na menor dose utilizada a 27,53% ao crescimento radicular de plantas de aroeira crescidas em diferentes doses de Fe.

O efeito das substâncias húmicas sobre o crescimento vegetal não é recente. Desde 1917 trabalhos vem verificando uma intensa promoção do crescimento radicular com pequenas concentrações de SH (Bottomley, 1917). E rotineiramente tal efeito tem sido comparado a de hormônios vegetais. Façanha *et al.*, 2002, mostraram que SH oriundas de vermicomposto e lodo da estação de tratamento de esgoto estimulam o crescimento de plantas de milho e café de uma maneira muito semelhante ao fitormônio auxina.

Porém para explicar os efeitos da possível diminuição da toxidez por ferro em plântulas de aroeira não se deve somente levar em conta o papel das SH sobre o crescimento vegetal e desenvolvimento do vegetal como um todo e sim também levar em conta a capacidade complexante das SH, que provavelmente tem forte influência nos resultados aqui apresentados, uma vez que as SH podem com facilidade interagir com íons disponíveis presentes no meio (Bezerra, 2009). Laglera *et al.*, 2011 mostrou que SH são capazes de complexar e adsorver o Fe em doses mais altas, levando a crer que as SH possuem vários sítios de ligações para o ferro, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho e de certa forma provando que as SH se ligam à esses íons metálicos e conseqüentemente diminuem a sua absorção pelas raízes das plântulas de aroeira.

No presente trabalho, todas as plantas expostas ao ferro demonstraram sintomas típicos de intoxicação por ferro nas raízes, que apresentaram uma coloração castanho-escura e consistência quebradiça que provavelmente interferiram no crescimento das mesmas (Figura 8). O excesso de Fe pode causar vários sintomas visíveis nas plantas, como por exemplo, descoloração de partes das folhas deixando visíveis as nervuras (Figura 8C), até secarem completamente. Nas raízes os sintomas são apresentados por baixa quantidade de ramificação e uma coloração típica castanho-escura (Camargo *et al.*, 1983). Isso se deve à toxidez causada pelo ferro, que quando em excesso forma uma

crosta de óxido de ferro (placa de ferro) sobre a raiz (Figura 8B) impedindo absorção de nutrientes e tornando-as mais enfraquecidas (Howeler, 1973).

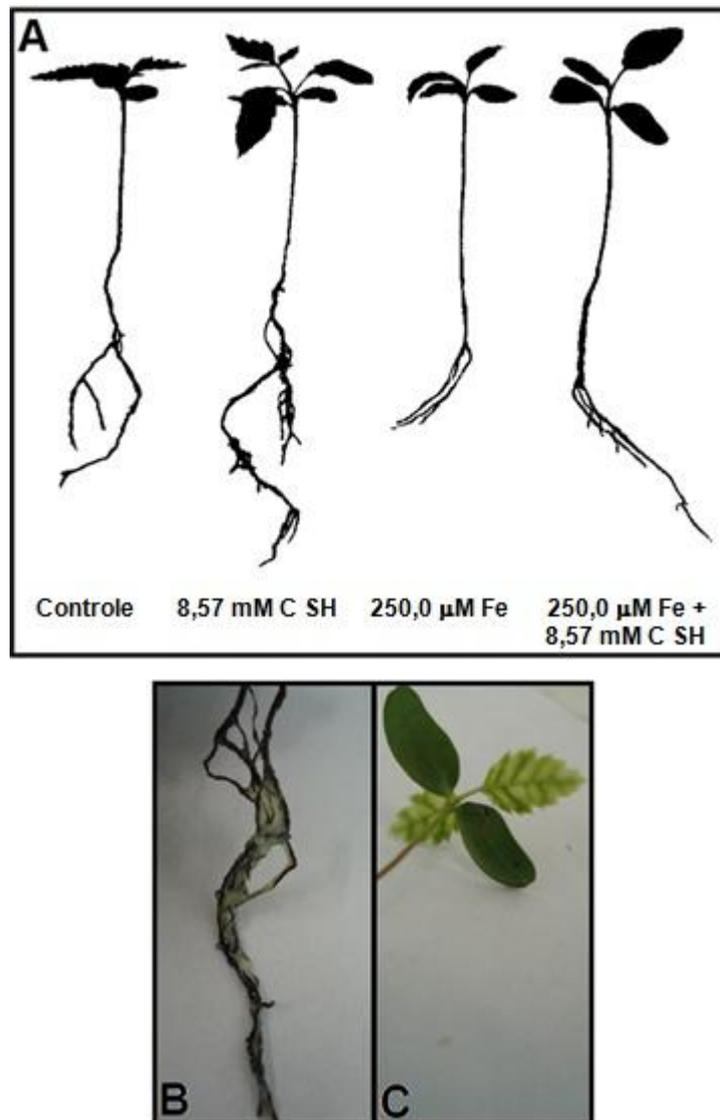


Figura 8. (A) Imagem representativa das plântulas de *S. terebinthifolius* (convertidas a preto e branco 1 bit) crescidas nos diferentes tratamentos ao final do experimento. (B) Formação de placa de ferro no tratamento de 250 $\mu\text{M Fe L}^{-1}$. (C) Sintoma típico de toxidez por ferro no tratamento de 250 $\mu\text{M Fe L}^{-1}$.

Kuki *et al.* (2008) demonstraram que plantas de aroeira quando expostas ao ferro na forma de material particulado, mostrou-se resistente e sem muitas alterações nos padrões das folhas e raízes, no entanto quando expostas diretamente a forma Fe^{+3} os resultados as plantas responderam a toxidez. Nesta mesma linha de pensamento, Oliveira *et al.* (2007) observaram que a aroeira é

realmente resistente ao MSPFe. No entanto quando exposta diretamente ao ferro em solução nutritiva, se mostrou sensível em todas as doses utilizadas.

Para Wolff *et al.*, 2009, a avaliação da contaminação por ET é feita primeiramente no âmbito visual, onde se pode observar seus efeitos negativos sobre a morfologia da planta com os efeitos clássicos de toxicidade desses metais, bem como necrose foliar ou escurecimento foliar e a formação de placa nas raízes. A interação substâncias húmicas e ferro (SH-Fe) ainda não é muito bem difundida na literatura científica. Essa interação pode afetar diretamente a absorção desse elemento pelas plantas quando presentes em solução nutritiva e pode se dar principalmente devido a presença dos grupos OH da estrutura húmica (Schwertmann *et al.*, 2005), como grupos fenólicos ligados às cadeias alquila e a estruturas mais hidrofóbicas (Dobbss *et al.*, 2009).

Pode-se levar também em consideração que pode haver uma pequena resistência das plantas a toxidez produzida pelo ferro que pode primariamente ser determinada por sua habilidade de excluir este elemento pela raiz ou ainda prevenir sua translocação até a parte aérea (Suh *et al.*, 2002) que combinado com a capacidade de complexação das SH pode ter favorecido a “desintoxicação” das plantas. Ademais, alguns tipos de plantas podem reduzir os efeitos tóxicos neutralizando os metais e transformando-os em precipitados insolúveis sobre a superfície radicular (Horne, 2000).

4.5. Ensaio Bioquímico: Atividade das Enzimas Antioxidantes

Os resultados da interação Fe-SH sobre a atividade das enzimas antioxidantes em plântulas de *S. terebinthifolius* é mostrada na Figura 9 A, B e C. De uma maneira geral os resultados das atividades de todas as enzimas avaliadas (POX, CAT e APX) se mostraram bem similares com relação ao efeito dos tratamentos. De uma maneira geral, sempre os tratamentos onde foram utilizados isoladamente as doses recomendadas de SH (8,57 mM C L⁻¹) e Fe (250 mM Fe L⁻¹) tiveram aumentos significativos em relação ao controle na atividade da POX, CAT e APX, mostrando que tais tratamentos promoveram um aumento do estresse oxidativo de plântulas de aroeira.

O efeito de materiais húmicos sobre o mecanismo de defesa antioxidante vegetal já foi relatado anteriormente. Cordeiro *et al.* (2011) observaram aumentos da atividade da CAT e grandes produções de espécie reativas de O₂ após o tratamento de plantas de milho com ácidos húmicos. Provavelmente o aumento da atividade enzimática promovida por SH se deva principalmente pela influência das SH sobre o metabolismo secundário das plantas, aprimorando os mecanismos de defesa para futuras condições de estresse (García *et al.*, 2014; Schiavon *et al.*, 2010).

Da mesma maneira que os materiais húmicos o efeito do Fe sobre a atividade de enzimas do estresse oxidativo também já foi estudada. Jucoski *et al.* (2013) testou efeitos do ferro no metabolismo de *Eugenia uniflora* e obteve aumentos na atividade da POX com doses elevadas de ferro, mostrando como o este elemento causa danos ao metabolismo vegetal. Portanto o aumento da atividade dessa enzima já era esperado, uma vez que a mesma participa ativamente no processo de desintoxicação das EROs (Kuki *et al.*, 2008). Esse tipo de resposta tem sido observado tanto em folhas quanto em raízes de diferentes espécies, após a aplicação de doses tóxicas de diferentes ET (Van Asshe e Clijsters, 1990).

É importante destacar que quando foi combinada a dose de ferro com as SH observou-se uma drástica redução da atividade das três enzimas estudadas, ocasionando uma “recuperação do estresse” causado por ambos quando fornecidos isoladamente às plântulas de aroeira. Essa recuperação às vezes foi até menor que o tratamento controle como, por exemplo, na atividade da POX (Figura 9A). Em geral, a absorção de quantidades tóxicas de ET pelos vegetais leva ao aumento da atividade da POX, conforme observado nesse trabalho. No entanto a “desintoxicação” promovida pela SH neste caso foi notória e surpreendente. Provavelmente tal fato se deva a ação das SH sobre o estímulo a exsudação de ácidos orgânicos pelas plantas que auxilia na capacidade de complexação dos metais (Canellas *et al.*, 2008), diminuindo assim o efeito tóxico desse contaminante. A capacidade das SH formarem complexos com micronutrientes depende do seu conteúdo de grupos funcionais doadores de elétrons (Linehan, 1985). A ordem de estabilidade dos complexos formados entre os ET e AH tem sido determinada através de titulação potenciométrica e segue a série de Irving-Williams ($Pb^{+2} > Cu^{+2} > Ni^{+2} > Co^{+2} > Zn^{+2} > Cd^{+2} > Fe^{+2} > Mn^{+2} >$

Mo⁺²). Por outro lado, como mostrado por van Dijk (1971), a um valor de pH 5, por exemplo, não existe grande diferença na força das ligações entre AH e ET, para Mn⁺², Co⁺², Ni⁺² e Zn⁺², enquanto para Pb⁺², Cu⁺² e Fe⁺³ a força de ligação é bem maior, indicando que a estabilidade dos complexos formados nos solos entre SH e ET são dependes dos valores de pH.

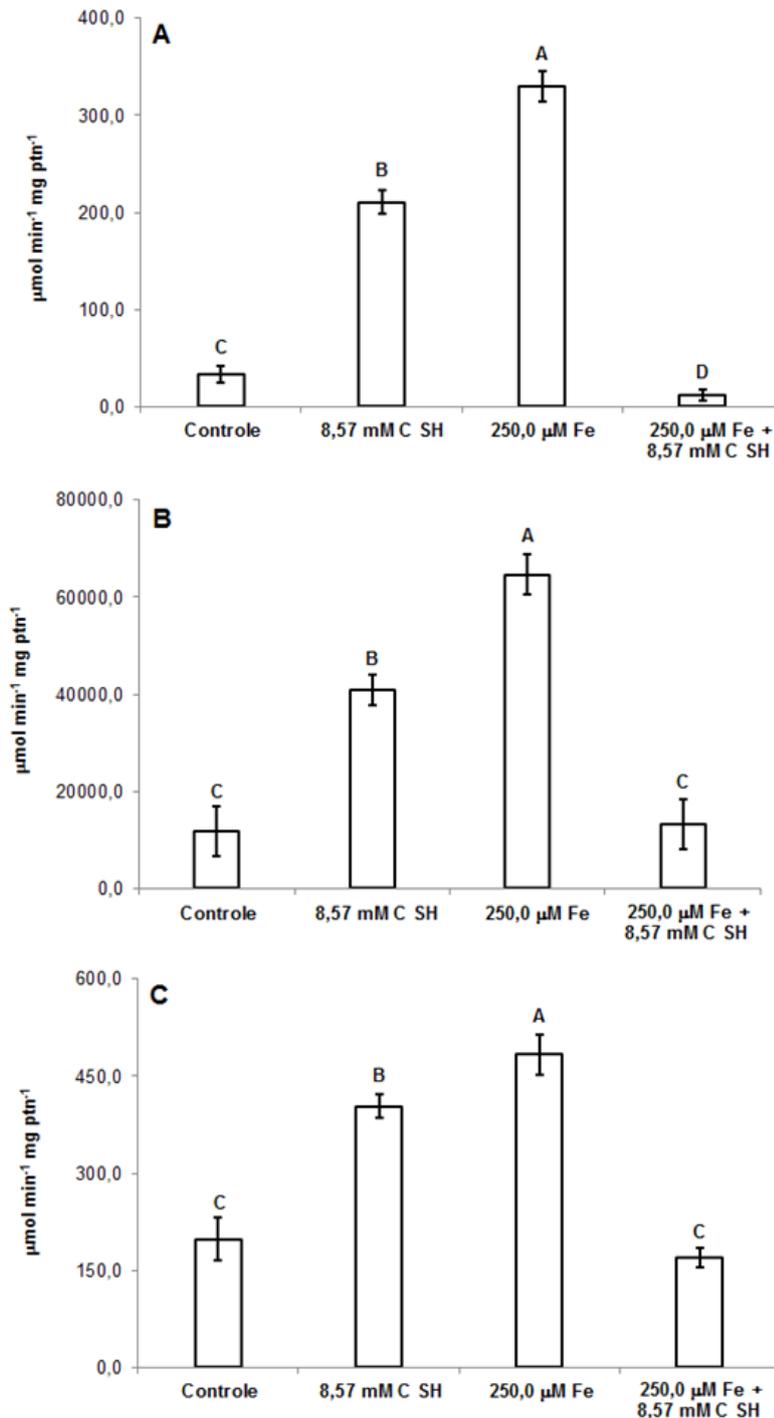


Figura 9. Efeito dos diferentes tratamentos, após ensaio de doses, sobre a atividade de enzimas do estresse oxidativo em plântulas de *S. terebinthifolius*. Em **(A)** Peroxidase (POX); **(B)** Catalase (CAT) e **(C)** Peroxidase do ascorbato

(APX). Letras maiúsculas correspondem às diferenças significativas entre as médias pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Os valores são representados pelas médias \pm (DP).

Conforme observado na Figura 9B, a atividade da catalase foi significativamente aumentada no tratamento com 250 mM Fe L⁻¹. Bottcher *et al.*, (2011) realizaram experimentos com café utilizando doses muito próximas as usadas no presente trabalho, no entanto ao contrário dos resultados aqui apresentados os autores observaram uma diminuição da atividade da catalase na dose de 240 μ M Fe L⁻¹, provavelmente, isso se deva a uma resposta mais lenta do metabolismo do café a altas concentrações de metais, reforçando-se a ideia de que a aroeira pode ser utilizada como uma planta sensível ao estresse por esse elemento (Santos *et al.*, 2011).

Kar e Mishra (1976) explicaram o papel exercido pela APX neutralizando rapidamente o peróxido devido ao seu caráter oxidante. Dessa forma, a liberação de peróxido constitui um sinal sistêmico para a indução da atividade dessa enzima (Morita *et al.*, 1999). Diversos tipos de agentes estressantes já foram estudados sobre a atividade da APX (Jebara *et al.*, 2005; Latef e Chaoxing, 2011; López-Gómez *et al.*, 2009), onde foram observados aumentos da atividade desta enzima principalmente em folhas (Neto *et al.*, 2006). Nesse trabalho a atividade da APX também foi aumentada nos tratamentos onde foram utilizados isoladamente o Fe e a SH (Figura 9C), corroborando com o trabalho de Muneer *et al.* (2012) onde os autores observaram aumentos na atividade da APX em plantas de *Vigna radiata* tratadas com Fe, mostrando novamente que esse elemento quando em excesso é causador de estresse oxidativo em plantas, prejudicando o crescimento radicular e número de folhas, além de alterar a fotossíntese.

Quando em conjunto, todas as atividades enzimáticas avaliadas levam a crer que as SH causam um efeito de estresse oxidativo às plântulas de aroeira, porém paralelamente o material húmico utilizado nesse trabalho também se mostrou amenizador deste estresse quando combinado com a dose utilizada de Fe (250 μ M L⁻¹) (Figura 9 A, B e C). Cordeiro *et al.*, 2011 afirmaram que as SH atuam como aliviadoras do estresse oxidativo em plantas. No entanto, tal efeito é mais pronunciado quando exercem o papel de agente complexante. Quando

utilizadas isoladamente, provavelmente, o estresse oxidativo se deva pelo efeito bioestimulante das SH, que classicamente causam mudanças no metabolismo energético vegetal, gerando um “estresse benéfico” que resultará num maior crescimento e desenvolvimento das plantas (principalmente quando numa fase inicial de crescimento). Tal como nesse trabalho Garcia *et al*, 2014 também observaram aumentos nas atividades das enzimas antioxidantes em plantas de arroz tratadas com SH.

4. CONCLUSÕES

Com as comprovações obtidas por essa dissertação foi possível aceitar a hipótese formulada antes do início da fase experimental desse trabalho. Ou seja, SH de vermicompostagem promovem incrementos ao crescimento radicular e da parte aérea de plântulas de *S. terebinthifolius* e promovem o controle do efeito tóxico do íon Fe em condições de cultivo hidropônico de aroeira.

A partir dos resultados experimentais foi possível chegar as seguintes conclusões:

1. As SH utilizadas nesta dissertação possuem características químicas similares a outros materiais húmicos;
2. A dose ótima de SH de vermicomposto para a emissão de raízes laterais em plântulas de aroeira é de 8,57 mM C L⁻¹;
3. Em aroeira a dose de 250 µM L⁻¹ de Fe foi a que causou o maior dano ao crescimento sem que as plântulas chegassem à morte;
4. O uso da melhor dose obtida para as SH e a escolhida de Fe respectivamente incrementaram e diminuíram o comprimento das raízes principais; número de raízes laterais; densidade de raízes laterais e área foliar e radicular em plântulas de aroeira;
5. As plântulas de aroeira mostraram sintomas típicos de toxidez ao Fe (formação de placa de Fe e descoloração das folhas);
6. Quando fornecidos isoladamente Fe (250 µM L⁻¹) e SH (8,57 mM C L⁻¹) aumentaram a atividade das enzimas POX, CAT e APX;
7. O uso combinado de Fe+SH mitiga o efeito tóxico do íon ferro em plântulas de *S. terebinthifolius*, através da recuperação do crescimento de raízes e da parte aérea e também da diminuição da atividade das enzimas antioxidantes estudadas.

REFERÊNCIAS

Esta dissertação seguiu as normas da revista *Annals of Applied Biology* para a confecção da lista de referências.

Disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1744-7348/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1744-7348/homepage/ForAuthors.html)

Anderson, M. D.; Prasad, T. K.; Stewart, C.R. (1995) Changes in isozyme profile of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol*, **109**, 1247–57.

Agnolon, F.; Santi, S.; Varanini, Z. & Pinton, R. (2002) Enzymatic responses of cucumber roots to different levels of Fe supply. *Plant Soil*, **241**, 35-41.

Aguiar, N.O., Canellas, L.P., Dobbss, L.B., Zandonadi D.B. (2009) Distribuição de massa molecular e bioatividade de ácidos húmicos. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, **33**, 1613-1623.

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. (2013). Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. *Plant and Soil*, **362**, 161-174.

Alscher, R.; Bower, J.; Zipfel, W. (1987) The basis for different sensitivities of photosynthesis to SO₂ in two cultivars of pea. *J Exp Bot*, **38**, 99–108.

Anderson, T.A.; Guthrie, E.A.; Walton, B.T. (1994). Bioremediation in the rhizosphere. *Environmental Science and Technology*, **27**, 2630–2636.

Aydin, A.; Kant, C.; Turan, M. (2012). Humic acid application alleviates salinity stress of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants decreasing membrane leakage. *Afr. J. Agric. Res.* **7**, 1073–1086.

Armstrong, W.; Strange, M.E.; Cringle, S.; Beckett, P.M. (1994) Microelectrode and modeling study of oxygen distribution in roots. *Annals of Botany*, **74**, 287-299.

Armstrong, W.; Brandle, R.; Jackson, M. B. (1994). Mechanisms of flood tolerance in plants. *Acta Bot. Neerl.*, **43**, 307-358.

Azevedo-Neto, A. D.; Gomes-Filho, E.; Prisco, J. T. (2008) Salinity and oxidative stress. In: Khan, N. A.; Singh, S (eds.). *Abiotic stress and plant responses*. New Delhi: I.K. International, 57-82.

Becana, M.; Moran, J.F.; Iturbe-Ormaetxe, I. (1998) Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. *Plant and Soil* **201**, 137-147.

Begon, M.; C. R. Townsend; J. L. Harper (2007). *Ecologia de Indivíduos a Ecossistemas*. 4ªed, Artmed, Porto Alegre.

Bezerra, P. S. S.; Takiyama, L. R.; Bezerra, C. W. B. (2009) Complexação de íons de metais por matéria orgânica dissolvida: modelagem e aplicação em sistemas reais. *Acta Amazônica*, **39**, 639 – 648.

Bertolazi, A. A.; Canton, G. C.; Azevedo, I. G.; Santos, W. O.; Cruz, Z. M.; Soares, D N. E. S.; Conceição, J. M.; Ramos, A. C. (2010) O papel das ectomicorrizas na biorremediação dos metais pesados no solo. *Natureza Online*, **8**, 24 – 31.

Bottcher, A.; Nobile, P. M.; Martins, P. F.; Conte, F. F.; Azevedo, R. A.; Mazzafera, P. (2011) A role for ferritin in the antioxidative system in coffee cell cultures. *Biometals*, **24**, 225-237.

Bottomley, W.B. (1917) Some effects of organic-promotion substances auxinones on the growth of *Lemna minor* in mineral cultural solutions. *Proceedings of the Royal Society of London Biology*, **89**, 481–505.

Busato, J.G., Zandonadi, D. B., Dobbss, L. B., Façanha, A. R., Canellas, L. P. (2010). Humic substances isolated from residues of sugar cane industry as root growth promoter. *Scientia Agricola*, **67**, 206-212.

Camargo, C. E. O.; J. G. (1983) Melhoramento do trigo: III. Evidência de controle genético na tolerância ao manganês e alumínio tóxico em trigo. *Bragantia*, **42**, 91-103.

CAMARGO, C. E. O.; J. G. Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de ferro em solução nutritiva. *Bragantia*, v. 44, p. 65 – 75, 1985.

Canellas, L.P.; Nelson, G.A.S.; Sobrinho, M.B.A.; Moraes, A.A.M.; Rumjamek, V.M. (1999) Adsorção de Cu^{2+} e Cd^{2+} em ácidos húmicos extraídos de resíduos orgânicos de origem urbana. *Ciências do Solo*, **29**, 21 – 26.

Canellas, L.P., Santos, G.A. (eds.) (2005) *In: Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. Campos dos Goytacazes: L.P. Canellas, G.A. Santos, 309p.

Canellas L. P., Olivares F. L., Okorokova-Façanha A. L., Façanha A.R. (2002). Humic Acids Isolated from Earthworm Compost Enhance Root Elongation, Lateral Root Emergence, and Plasma Membrane H^+ -ATPase Activity in Maize Roots. *Plant Physiology*, **130**, 1951-1957.

Canellas, L.P., Zandonadi, D.B., Olivares, F.L., Façanha, A.R. (2006) Efeitos Fisiológicos de Substâncias Húmicas - O estímulo às H^+ ATPases. In: Nutrição Mineral de Plantas. Manlio Silvestre Fernandes. (Org.). *Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*, **1**,175-200.

Canellas, L.P., Teixeira Júnior, L.R.L., Dobbss, L.B., Silva, C.A., Medici, L.O., Zandonadi, D.B., Façanha, A.R. (2008). Humic acids crossinteractions with root and organic acids. *Annals of Applied Biology*, **153**,157-166.

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.

Carrillo, N.; Valle, E. M. El lado oscuro del oxígeno. (2005) *Revista de la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal*, **2**, 204 – 213.

Cesário, L.F.; Gaglianone, M.C. (2008) Biologia floral e fenologia reprodutiva de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em Restinga do Norte Fluminense. *Acta Botânica Brasileira*, **22**, 828 – 833.

Cesco, S., Romheld, V., Varanini, Z., Pinton, R. (2000) Solubilization of iron by water-extractable humic substances. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science.*, **163**, 285-290.

Chance B, Maehley AC. (1955) *Assay of catalase and peroxidase*. In: Colowick S, Kaplan N, editors. *Methods in Enzymology*, **2**. New York, USA: Academic Press.

Chen, Y., Clapp, C.E., Magen, H. (2004) Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: The role of organo-iron complexes. *Soil Science Plant Nutrition*, **50**, 1089-1095.

Colombo, S. M.; Santos, L. B. O.; Masini, J. C.; Abate, G. (2007) Propriedades ácido-base e de complexação de ácidos húmico e fúlvico isolados de vermicomposto. *Quím. Nova [online]*, **30**, 1261-1266.

Cordeiro, F.C., Santa-Catarina, C., Silveira, V., de Souza, S.R., (2011). Humic acid effect on catalase activity and the generation of reactive oxygen species in corn (*Zea Mays* L). *Biosci Biotechnol Biochem Journal*. **75**, 70–74.

Daur, I., Bakhashwain, A.A. (2013) Effect of humic acid on growth and quality of maize fodder production. *Pakistan Journal of Botany*, **45**, 21-25.

Dijk, H. V. (1971) Cation binding of humic acids. *Geoderma*, **5**, 53-67.

Dobbss, L.B., Medici, L. O., Peres, L. E. P., Pino-Nunes, L. E., Rumjanek, V. M., Façanha, A.R., Canellas, L.P. (2007) Changes in root development of *Arabidopsis* promoted by organic matter from oxisols. *Annals of Applied Biology*, **151**, 199-211.

Dobbs, L.B.; Rumjanek, 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. *Revista Brasileira de Ciências do 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 3681-3688.

Duarte, M. R.; Toledo, M. G.; Oliveira, R. La B. (2006) Diagnose morfoanatômica de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae). *Revista Visão Acadêmica*, **7**, 05-13.

Eyheraguibel, B., Silvestre, J.; Morard, P.(2008). Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. *Bioresource Technology*. **99**, 4206–4212.

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. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **37**, 1301-1310.

Fang, W. C; Kao, C. H. (2000) Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess of iron, copper and zinc. *Plant and Science*, **158**, 71–76.

Fernandes, K.H.P.; Mori, E.S.; Silva, M.R.; Pinto, C.S. (2008) Propagação vegetativa de Aroeira- Pimenteira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Revista Brasileira de Fruticultura*, **30**, 853 - 856.

Foyer, C. H.; Lelandais, M.; Kunert, K. J. (1994) Photooxidative stress in plants. *Acta Physiology Plant*, **92**, 696-717.

García, A.C., Berbara, R.L.L., Farias, L.P., Izquierdo, F.G., Hernández, O.L., Campos, R.H., Castro, R.N., (2012) Humic acids of vermicompost as an ecological pathway to increase resistance of rice seedlings to water stress. *African Journal Biotechnology*, **11**, 3125–3134.

García, A. C.; Santos, L. A.; Izquierdo, F. G.; Rumajaneck, V. M.; Castro, R. N.; Santos, F. S.; Souza, L. G. A.; Barbara, R. L. L. (2014) Potentialities of vermicompost humic acids to alleviate water stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Journal of Geochimical Exploration*, **35**, 1645-1657.

Gondim, A. R. O.; Prado, R. M; Alves, A. U.; Fonseca, I. M. (2010) Eficiência nutricional do milho cv. BRS 1030 submetido à omissão de macronutrientes em solução nutritiva. *Revista Ceres*, **57**, 539-544.

Gratão, P. L.; Polle, A.; Lea, P. J.; Azevedo, R. A. (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, **32**, 481-494.

Groppa, M.D.; Tomaro, M.L.; Benavides, M.P. (2001) Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Science*, **161**, 481-488.

Gross J.; Stein R. J.; Fett-Neto A. G.; Fett J. P. (2003) Iron homeostasis related genes in rice. *Genetics and Molecular Biology*, **26**, 477- 497.

Guimarães, M. A., Santana, T. A.; Silva E. V.; Zenzen, I. L., Loureiro M. E. (2008) Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, **3**, 58 – 68.

Hall, J.L.(2002) Cellular mechanisms for heavy metal metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, **53**,1-11.

Havir EA, McHale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, **84** ,450–455.

Hoagland, DR. and Arnon, DI., 1950. *The water-culture method for growing plants without soil*. California: California Agricultural Experimental Station. 32 p.

Horne, AJ (2000) *Phytoremediation by constructed wetlands*. In: Terry N, Bañuelos G (Eds). *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Lewis, Boca Raton, Florida, p.13–40

Howeler RH (1983) *Análisis del tejido vegetal en el diagnóstico de problemas nutricionales en algunos cultivos tropicales*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali.

Inzé D, Montagu MV (1995) Oxidative stress in plants. *Biotechnology*, **6**, 153-158.

Jebara, M.; Limam, F.; Aouani, M. E. (2005) Changes in ascorbate peroxidases, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, **162**, 929-936.

Jeong, J.; Connolly, E. L. (2009) Iron uptake mechanisms in plants: Functions of the FRO family of ferric reductases. *Plant Science*, **176**, 709-714.

Jerzykiewicz, M. (2013) The effect of Hg (II) ions on the free radicals of humic substances and their model compounds. *Chemosphere*, **150**, 01 – 06.

Jucoski, G. O.; Cambraia, J.; Ribeiro, C.; Oliveira, J. A.; Paula, S. O.; Oliva, M. A. (2013) Impact os iron toxicity on oxidative metabolism in Young *Eugenia uniflora* L. plants. *Acta Phisiol plant*, **35**, 1645-1657.

Junior, E. S.; Rocha, J. C.; Zara, L. F.; Santos, A. (2001) Substâncias húmicas aquáticas: Fracionamento molecular e caracterização de rearranjos internos após complexação com íons metálicos. *Química Nova*, **24**, 339-344.

Kar M, Mishra D. (1976) Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, **57**, 315–319.

Kirkby, E. A., & Römheld, V. (2007) na fisiologia de plantas: funções, absorção e mobilidade. Versão em português do boletim Micronutrients in plant physiology: functions, uptake and mobility. *Informações Agronômicas*, n. 118 . *International Plant Nutrition Institute*.

Kononova, M.M. (ed.) (1966) *Soil organic matter*. 2nd ed. New York: Pergamon Press. 555p.

Koshiha T (1993) Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). *Plant Cell Physiology*, **34**, 713-721.

Koricheva J, Roy S, Vranjic JA, Haukioja E, Hughes PR, Hänninen O. (1997) Antioxidant responses to simulated acid rain and heavy metal deposition in birch seedlings. *Environmental Pollution*, **95** ,249–258.

Kuki, K.N.; Oliva, M.A.; Costa, A.C. (2009) The Simulated Effects of Iron Dust and Acidity during the Early Stages of Establishment of Two Coastal Plant Species. *Water Air Soil Pollution*, **196**, 287-295.

Kuki, K.N.; Oliva, M.A.; Pereira, E.G.; Costa, A.C.; Cambraia, J. (2008) Effects of simulated deposition of acid mist and iron ore particulate matter on photosynthesis and the generation of oxidative stress in *Schinus terebinthifolius* Raddi and *Sophora tomentosa* L. *Science of Total Environment*, **403**, 207-214.

Laglera, L. M.; Battaglia, G.; Van de Berg, C. M. C. (2011) Effect of humic substances on the iron speciation in natural Waters by CLE/CSV. *Marine Chemistry*, **127**, 134-143.

Latef, A. A.; Chaoxing, H. (2011) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Scientia Horticulturae*, **127**, 228-233.

Lenzi, M.; Orth, A. I. (2004) Caracterização funcional do sistema reprodutivo da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi), em Florianópolis-SC, Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, **26**, 198 – 201.

Lieske, R. (1931) Untersuchungen uber die verwendbarkeit von kohlen als Dungemittel. *Brennstoffe-Chemie*, **12**, 81-85.

Linehan, D.J. (1985) *Organic matter and trace elements*. In: Vaughan D, Malcolm RE (eds) Soil organic matter and biological activity. Nijhoff Junk, The Hague, 403-421.

Leon, A. M.; Palma, J. M.; Corpas, F. J.; Gomez, M.; Romero-Puertas, M., C; Chatterjee D., Mateos RM, del Rio LA, Sandalio LM (2002) Anti-oxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium. *Plant Physiology Biochemistry*, **40**, 813–820.

Lopes, A.S.; Oliva, M.A.; Martinez, C.A. (2000) *Impacto das imissões de dióxido de enxofre e deposição de material particulado de ferro em espécies vegetais de restinga: avaliação ecofisiológica*. In: Ecotoxicologia - Perspectivas para o século XXI. Espíndola, E.L.G.; Paschoal, C.M.R.; Rocha, O.; Bohrer, M.B.C.; Oliveira Neto, A.L. (eds), RiMa Artes e Textos, São Carlos, 53-71.

Lorenzi, H. (2002) *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 4.ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 368.

Lucena, P. L. H.; Filho, J. R. M.; Mazza, M.; Czezczko, N. G.; Dietz, U. A.; Neto, M. A. C.; Henriques, G. S.; Santos, O. J.; Ceschin, A. P.; Thiele, E. S. (2006) Avaliação da ação da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexigas de ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, **21**, 46 – 51.

Mendes, A. M. S.; Duda, G. P.; Nascimento, C. W. A.; Lima, J. A. G.; Medeiros, A. D. L. (2010) Acúmulo de metais pesados e alterações químicas em Cambiossolo cultivados com meloeiro. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, **14**, 791 – 796.

Linehan, D.J. (1985) *Organic matter and trace elements*. In: Vaughan D, Malcolm RE (eds) Soil organic matter and biological activity. Nijhoff Junk, The Hague, 403-421.

Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, **7**, 405-410.

Mohamed, A., Akhtar, H.K., Shamin, A., Anees, A. (1998) Role of sawdust in the removal of copper from industrial wastes. *Water Res Journal*, **32**, 3085-3091.

Mora, V., Baigorri, R., Bacaicoa, E., Zamarreño, A.M., García-Mina, J.M. (2012) The humic acid-induced changes in the root concentration of nitric oxide, IAA and ethylene do not explain the changes in root architecture caused by humic acid in cucumber. *Environmental Experimental Botany*, **76**, 24–32.

Morard, P., Eyheraguibel, B., Morard, M., Silvestre, J. (2010) Direct effects of humic-like substance on growth, water, and mineral nutrition of various species. *Journal of Plant Nutrition*, **34**, 46-59.

Moraes, S.L.; Rezende, M.O.O. (2004) Determinação da concentração micelar crítica de ácidos húmicos por medidas de condutividade e espectroscopia. *Química Nova*, **27**, 701-705.

Morita S, Kaminaka H, Masumura T, Tanaka K (1999) Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress; the involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signalling. *Plant Cell Physiol*, **40**: 417–422.

Muneer, S.; Kim, T. H.; Qureshi, M. I. (2012) Fe modulates Cd-induced oxidative stress and the expression of stress responsive proteins in the nodules of *Vigna radiate*, **68**, 421-433.

Nakano, Y.; Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant Cell Physiology*, **22**, 867-880.

Neves, N. R.; Oliva, M. A.; Centeno, D. C.; Costa, A. C.; Ribas, R. F; Pereira, E. G. (2009) Photosynthesis and oxidative stress in the restinga plant species *Eugenia uniflora* L. exposed to simulated acid rain and iron ore dust deposition: Potential use in environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*, **407**, 3740–3745.

Nikolic, M.; Cesco, S.; Romheld, V.; Varanini, Z. & Pinton, R. (2003) Uptake of iron (Fe-59) complexed to water-extractable humic substances by sunflower leaves. *J. Plant Nutrition.*, **26**, 2243-2252.

Nomura, E. S.; Junior, E. R. D.; Fuzitani, E. J.; Saes, L. A.; Jensen, E. (2012) Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira 'Grand Naine' com aplicação de biofertilizantes em duas estações do ano. *Revista Ceres*, **59**, 518-529.

Oliveira, C.R.M., Oliva, M.A., Pereira, E.G. (2007) Efeito do material particulado de Ferro no teor de pigmentos de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Revista Brasileira de Biociências*, **5**, 681-683.

Passardi F., Longet D., Penel C., Dunand C. (2004) The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry*, **64**, 1879-1893.

Peixoto PHP, Cambraia J, Sant'Anna R, Mosquim PR, Moreira MA (1999) Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, **11**, 137–143.

Pereira, E.; Oliveira, L. C. A.; Vallone, A.; Sapag, K.; Pereira, M. (2009) Preparação de carvão ativado em baixas temperaturas de carbonização a partir de rejeitos de café: Utilização de FeCl₃ como agente ativante. *Química Nova*, **31**, 1296-1300.

Piccolo, A.; Nardi, S.; Cancheri, G. (1996) Macromolecular changes of soil humic substances induced by interactions with organic acids. *European Journal of Soil Science*, **47**, 319 – 328.

Piccolo, A. (2002) The supramolecular structure of humic substances. A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in Agronomy*, **75**, 57-134.

Pinton, R., Cesco, S., Santi, S., Varanini, Z. (1997) Soil humic substances stimulate proton release by intact oat seedlings roots. *Journal Plant and Nutrition.*, **20**, 857-869.

Pinton, R., Cesco, S., Lacolettig, G., Astolfi, S., Varanini, Z. (1999) Modulation of NO₃ uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H-TPase. *Plant Soil*, **215**, 155–161

Paiva, A. M. S.; Aloufa, M. A. I. (2009) Estabelecimento in vitro de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **11**, 300 – 3004.

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

Ramos, M. G. M.; Geraldo, L. P. (2007) Avaliação das espécies de plantas *Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* e *Rhizophora mangle* como bioindicadoras de poluição por metais pesados em ambientes de mangues. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, **12**, 440 – 445.

Rice, J.A., Macarthy, P. (1991) Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances. *Organic Geochemistry*, **17**, 635-648.

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. I - efeito da concentração. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, **30**, 649-656.

Rizhsky, L.; Liang, H.; Mittler, R. (2003) The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 38921-38925.

Rosa, C. M.; Castilhos, R. M. V.; Vahl, L. C.; Castilhos, D. D.; Pinto, L. F. S.; Oliveira, E. S.; Leal, O. A. (2009) Efeito de Substâncias húmicas na cinética de absorção de Potássio, crescimento de plantas e concentração de nutrientes em *Phaseolus vulgaris* L. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, **33**, 959-967.

Samson, G., Visser, A. (1989) Surface-active effects of humic acids on potato cell-membrane properties *Soil Biol. Biochem.*, **21**, 343-347.

Sanchez-Marín, P.; Lorenzo, J. I.; Blust, R.; Beiras, R. (2007) Humic acids increase dissolved lead bioavailability for marine invertebrates, **41**, 5679 – 5684.

Santos, T.C.; Oliveira, M.L.F.; Alexandre, J.R.; Souza, S.B.; Eutrópio, F.J.; Ramos, A.C. (2011) Crescimento inicial de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e tomate transgênico AVP1OX (*Solanum lycopersicum* L.) sob diferentes níveis de ferro. *Natureza on line*, **9**, 152-156.

Schiavon, M., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vaccaro, S., Francioso, O., Nardi, Serenella (2010) . High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in Maize (*Zea mays* L.). *Journal Chemistry Ecology*, **36**, 662–669

Schmidt, W. (2003) Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *Trends in Plant Science*, **8**, 188 – 193.

Schnitzer, M., Gupta, U.C. (1965) Determination of acidity in soil organic matter. *Soil Science American Society Proceedings.*, **29**, 274-277.

Schwertmann, U.; Wagner, F.; Knicker, H. (2005) Ferrihydrite-Humic associations. *American Society of Agronomy*, **69**, 1009-1015.

Sinha, S., Gupta, M., Chandra, P. (1997) Oxidative stress induced by iron in *Hydrilla verticillata* Royle: Response of antioxidants. *Ecotoxicology Environmental*, **38**, 286–291.

Silva, L.C., Oliva, M. A., Azevedo, A. A., Araújo, J. M., Aguiar, R. M. (2005) Micromorphological and anatomical alterations caused by simulated acid rain in restinga plants: *Eugenia uniflora* and *Clusia hilariana*. *Water Air Soil Pollut*, **168**, 129-43.

Silva, M.A.S.; Mafra, A.L.; Albuquerque, A.; Rosa, J.D.; Bayer, C. & Mielniczuk, J. (2006) Propriedades físicas e teor de carbono orgânico de um Argissolo Vermelho sob distintos sistemas de uso e manejo. *R. Bras. Ci. Solo*, **30**, 329-337.

Silva, S. A.; *et al.* (2007) Toxicidade de alumínio e efeito do ácido giberílico em linhas quase isogênicas de trigo com caráter de permanência verde e maturação sincronizada. *Ciência Rural*, **36**, 765 – 771.

Silveira, V. C. O.; Sperotto, A P.; Espindola, R. A., Amaral, L. S.; Dias, L.; Cunha, J. F.; Fett, J. B; Janette, P. (2007) Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **19**, 127-139.

Soares, C. R. F. S.; *et al.* (2001) Acúmulo e distribuição de metais pesados nas raízes, caules e folhas de mudas de arvores em solos contaminados por rejeitos de industria de zinco. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, **13**, 302 – 315.

Stevenson, J.F. (ed.) (1994) *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd ed., New York: John Wiley & Sons INC., 496p.

Suh HJ, Kim CS, Lee JY, Jung J. (2002) Photodynamic effect of iron excess on photosystem II function in pea plants. *Photochemistry and Photobiology*, **75**, 513–518.

Taiz, L., Zeiger, E. (2004) *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre: Artmed,. 722p.

Van Assche, F., Clijsters, H. (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment*, **13**, 195-206.

Vansuyt G, Lopez F, Inzé D, Briat JF, Fourcroy P. (1997) Iron triggers a rapid induction of ascorbate peroxidase gene expression in *Brassica napus*. *FEBS Lett*; **410**, 1195–200.

Vaughan, D., Malcolm, R.E. (1985) Influence of humic substances on growth and physiological processes. *In: Soil organic matter and biological activity*. D. Vaughan e R. E. Malcolm (eds.). *Dordrecht: Martins Nijhoff Dr W. Junk Publisher*, 37-75

VARANINI, Z.; PINTON, R.; DE BIASI, M.G.; ASTOLFI, S. & MAGGIONI, A. (1993) Low molecular weight humic substances stimulated H⁺-ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from oat (*Avena sativa* L.) roots. *Plant Soil*, 153:61-69.

Velikova V, Tsonev T, Yordanov I. (1999) Light and CO₂ responses of photosynthesis and chlorophyll fluorescence characteristics in bean plants after simulated acid rain. *Physiol Plant*, **107**, 77-83.

Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A.: (2000), 'Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants'. *Plant Science*, **151**, 59–66.

Visser, A. (1985) Effect of humic acids on numbers and activities of microorganisms within physiological groups. *Organic Geochemistry*., **8**, 81-85.

Visser, A. (1987) Effect of humic substances on mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation. *Science of the Total Environmental*., **62**, 347-354.

Wang, C.; Zhang, S. H.; Wang, P. F.; Hou, J.; Zhang, W. J.; LI, W.; Lin; Z. P. (2009) The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. *Chemosphere*, **75**, 1468-1476.

Wolff, G.; Assis, L.R.; Pereira, G.C.; Carvalho, J.G.; Castro, E.M. (2009) Efeitos da toxicidade do zinco em folhas de *Salvinia auriculata* cultivadas em Solução Nutritiva. *Planta Daninha*, **27**, 133-137.

Yu, J.; Hu, S.; Wang, J.; Wong, G. K-S.; Li, S.; Liu, B.; Deng, Y.; Daí, L.; Zhou, Y.; Zhang, X.; Cao, M.; Liu, J.; Sun, J.; Tang, J.; Chen, Y.; Huang, X.; Lin, W.; Ye, C.; Tong, W.; Cong, L.; Geng, J.; Han, Y.; Li, L.; Li, W.; Hu, G.; Huang, X.; Li, W.; Jian, L. L. Z.; Li, L.; Liu, J.; Qi, Q.; Liu, J.; Li, L.; Li, T.; Wang, X.; Lu, H.; Wu, T.; Zhu, M.; Ni, P.; Han, H.; Dong, W.; Ren, X.; Feng, X.; Cui, P.; Li, X.; Wang, H.; Xu, X.; Zhai, W.; Xu, Z.; Zhang, J.; He, S.; Zhang, J.; Xu, J.; Zhang, K.; Zheng, X., Dong, J.; Zeng, W.; Tao, L.; Ye, J.; Tan, J.; Ren, X.; Chen, X.; He, J.; Liu, D.; Tian, W.; Tian, C.; Xia, H.; Bao, Q.; Li, G.; Gao, H.; Cao, T.; Wang, J.; Zhao, W.; Li, P.; Chen, W.; Wang, X.; Zhang, Y.; Hu, J.; Wang, J.; Liu, S.; Yang, J.; Zhang, G.; Xiong, Y.; Li, Z.; Mao, L.; Zhou, C.; Zhu, Z.; Chen, R.; Hao, B.; Zheng, W.; Chen, S.; Guo, W.; Li, G.; Liu, S.; Tao, M.; Wang, J.; Zhu, L.; Yuan, L.; Yang, H. (2002) Adraft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*, **296**, 79-92.

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.

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.