

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO

DISSERTAÇÃO

**Relação Estrutura-Propriedade-Bioatividade de
Diferentes Ácidos Húmicos em Plantas de Arroz
(*Oryza sativa* L.)**

Tadeu Augusto van Tol de Castro

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA –
CIÊNCIA DO SOLO**

**RELAÇÃO ESTRUTURA-PROPRIEDADE-BIOATIVIDADE DE
DIFERENTES ÁCIDOS HÚMICOS EM PLANTAS DE ARROZ
(*ORYZA SATIVA L.*)**

TADEU AUGUSTO VAN TOL DE CASTRO

Sob Orientação do Professor
Ricardo Luis Louro Berbara

e Co-orientação do Professor
Andrés Calderín García

Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre, no Programa de Pós-Graduação
em Agronomia – Ciência do Solo, Área
de Concentração em Biologia do Solo.

Seropédica, RJ
Setembro de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central/Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
Com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C355r	Castro, Tadeu Augusto van Tol de, 1993- Relação estrutura-propriedade-bioatividade de diferentes ácidos húmicos em plantas de arroz (<i>Oryza sativa L.</i>)/Tadeu Augusto van tol de Castro. – Seropédica, 2019. 103 f. : il.
<p>Orientador: Ricardo Luis Louro Berbara. Dissertação (Mestrado). – – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, 2019.</p> <p>1. Substâncias húmicas. 2. Caracterização. 3. Atividade biológica. 4. Estresse hídrico. I. Berbara, Ricardo Luis Louro, 1957-, orient. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo III. Título.</p>	

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.



HOMOLOGAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N° 9 / 2024 - CPGACS (12.28.01.00.00.00.27)

Nº do Protocolo: 23083.009719/2024-14

Seropédica-RJ, 27 de fevereiro de 2024.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO**

TADEU AUGUSTO VAN TOL DE CASTRO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo, Área de Concentração em Biologia do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 02/09/2019.

Ricardo Luiz Louro Berbara. Ph.D. UFRRJ

(Orientador)

Leandro Azevedo Santos. Dr. UFRRJ

Ednaldo da Silva Araújo. Dr. Embrapa Agrobiologia

(Assinado digitalmente em 29/02/2024 09:46)
LEANDRO AZEVEDO SANTOS
COORDENADOR CURS/POS-GRADUACAO
CPGACS (12.28.01.00.00.00.27)
Matrícula: 2626406

(Assinado digitalmente em 27/02/2024 21:00)
RICARDO LUIZ LOURO BERBARA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptS (12.28.01.00.00.00.33)
Matrícula: 387406

(Assinado digitalmente em 28/02/2024 07:59)
EDNALDO DA SILVA ARAÚJO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 750.960.133-91

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp>
informando seu número: 9, ano: 2024, tipo: **HOMOLOGAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**, data de emissão: **27/02/2024** e o código de verificação: **14746d3bbc**

DEDICATÓRIA

À Deus, por tudo.

À minha família, que sempre me deu todo o amor e carinho.
E aos meus amigos, pelos sorrisos e apoio.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre estar ao meu lado, dando-me forças para seguir sempre, nunca deixando me faltar nada.

Agradeço a minha família, em especial meus pais Victor Geraldo Soares de Castro e Regina Maria van Tol de Almeida Castro, por todo amor, respeito, educação e paciência que me foram dados ao longo destes anos.

Agradeço à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, aonde nasci e cresci, por ser ontem, hoje e sempre meu lar, por ter sido fundamental na minha educação e por ter me mostrado que sempre vale a pena perseverar.

Agradeço ao Professor Andrés Calderín García e Ricardo Luis Louro Berbara pela oportunidade, confiança, orientação e todos os ensinamentos que me fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente.

Agradeço ao Laboratório de Química Biológica do Solo e a todos os colegas de trabalho, ao Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas e ao Laboratório de Estudos da Relação Solo-Planta, por toda estrutura e amparo fornecidos.

Agradeço à minha companheira Rafaela, por toda força, compreensão, apoio e horas compartilhadas para a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos por todas as horas de estudos, risadas, conselhos e apoio.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Se teus projetos são para um ano, semeia o grão.
Se são para dez anos, planta uma árvore.
Se são para cem anos, instrua o povo.
Semeando uma vez o grão, colherás uma vez;
plantando uma árvore, colherás dez vezes;
instruindo o povo, colherás cem vezes.
Se deres um peixe a um homem, ele comerá uma vez;
se o ensinares a pescar; ele comerá a vida inteira.”*

Kuan-Tzu
(Sábio chinês, século VII a.C.)

RESUMO GERAL

CASTRO, Tadeu Augusto van Tol. **Relação estrutura-propriedade-bioatividade de diferentes ácidos húmicos em plantas de arroz (*Oryza sativa L.*).** 2019. 103f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

O estudo teve como objetivo estudar três ácidos húmicos (AH) extraídos de diferentes materiais, de vermicomposto (AHVC), de horizonte superficial de um Organossolo (AHSOLO) e de sedimentos do Rio Negro - AM (AHRN), avaliando suas estruturas, propriedades e funções sobre o metabolismo e desenvolvimento de plantas de arroz em condições normais de crescimento e sob estresse hídrico. No capítulo I foram apresentados os resultados referentes à caracterização físico-química (ressonância magnética nuclear no estado sólido - ^{13}C NMR CP/MAS e espalhamento dinâmico da luz - DLS) dos três tipos de ácidos húmicos. O AHSOLO apresentou características mais aromáticas do que o AHRN e AHVC, conferindo portanto maior hidrofobicidade. O AHVC apresentou o maior índice de polaridade e menor hidrofobicidade. O AHSOLO e AHRN apresentaram as maiores populações de partículas a pH 7,0 entre 0 e 500 nm de diâmetro hidrodinâmico, em relação ao ácido húmico proveniente de vermicomposto. Entretanto, o diâmetro médio das partículas a pH=7 demonstra que o AHVC apresentou partículas de maior tamanho em comparação aos demais. O objetivo do capítulo II foi avaliar e discutir os efeitos dos três AH, anteriormente caracterizados, na morfologia, crescimento e metabolismo de plantas de arroz (*Oryza sativa L.*) da variedade BRS. Esmeralda, assim como estabelecer uma relação entre a suas estruturas e propriedades físicas e químicas com a bioatividade exercida nas plantas. Foi observado aumento no desempenho fotossintético das plantas tratadas com os AH extraídos de diferentes materiais após um decréscimo inicial, com a finalidade de acelerar as atividades metabólicas visando aclimatação e proteção vegetal. De maneira geral, todos os ácidos húmicos estimularam o metabolismo e desenvolvimento das plantas, porém de forma diferenciada, sendo a atividade exercida dependente das suas características estruturais e propriedades dos AH. Ocorreram modificações diferenciadas nas estruturas presentes nas raízes por efeito dos AH, associadas ao desenvolvimento da parede celular vegetal, como comprovado pela caracterização das raízes mediante ^{13}C NMR CP/MAS e técnicas quimiométricas (PCA- ^{13}C NMR). O AHVC foi considerado o que exerceu uma maior bioatividade, uma vez que foi responsável pelo aumento mais intenso na produção de biomassa fresca e seca nas raízes, bainhas e folhas das plantas, além de apresentar maior estímulos na emissão de raízes e no aumento do volume radicular. Os teores de metabólitos solúveis indicam que as plantas tratadas com AHVC foram as mais eficientes no uso do nitrogênio para seu desenvolvimento. O capítulo III mostra os resultados obtidos pela aplicação do AHVC em plantas de arroz (*Oryza sativa L.*) da variedade BRS. Esmeralda, submetidas à deficiência hídrica. O AHVC preservou o índice de desempenho fotossintético em plantas sob estresse hídrico. O AH também foi responsável por estimular a quantidade, comprimento, área, volume e diâmetro de raízes das plantas cultivadas em condições de estresse hídrico, além das plantas tratadas com AH+PEG apresentarem maior biomassa fresca dos que as tratadas apenas com PEG. Os teores de metabólitos solúveis e a massa seca dos diferentes órgãos vegetais demonstram que o AH contribuiu para o balanço osmótico das plantas submetidas ao estresse.

Palavras-chave: Substâncias húmicas. Caracterização. Atividade biológica. Estresse hídrico.

GENERAL ABSTRACT

CASTRO, Tadeu Augusto van Tol. **Structure-property-bioactivity relationship of different humic acids and their effects in rice plants (*Oryza sativa* L).** 2019. 103p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

The study aimed to study three humic acids (HA) extracted from different source materials, vermicompost (HAVC), surface horizon of a Histosol (HASOIL) and sediments from Rio Negro - AM (HARN), evaluating their structures, properties and functions in the metabolism and development of rice plants under normal growing conditions and under water stress. Chapter I presents the results concerning the physicochemical characterization (solid state nuclear magnetic resonance - ^{13}C NMR CP / MAS and dynamic light scattering - DLS) of the three types of humic acids. HASOIL presented more aromatic characteristics than HARN and HAVC, thus conferring greater hydrophobicity. HAVC had the highest polarity index and lowest hydrophobicity. HASOIL and HARN showed the largest particle populations at pH 7.0 between 0 and 500 nm in hydrodynamic diameter, in relation to humic acid from vermicompost. However, the average particle diameter at pH = 7 shows that HAVC had larger particles compared to the others. The objective of Chapter II was to evaluate and discuss the effects of the three HA, previously characterized, on the morphology, growth and metabolism of rice (*Oryza sativa* L.) plants of the BRS Emerald variety, as well as establish a relationship between their structures and physical-chemical properties with the bioactivity they exert. An increase in photosynthetic performance was observed in plants treated with HA extracted from different materials after an initial decrease in order to accelerate metabolic activities aiming at acclimatization and plant protection. In general, all humic acids stimulated the metabolism and development of plants, but in a different way, being the activity exerted dependent on their structural characteristics and properties. There were different modifications in the structures present in the roots by the effect of humic acids, associated with the development of the plant cell wall. The HAVC was considered the best bioactivity, as it was responsible for the most intense increase in the production of fresh and dry biomass in the roots, sheaths and leaves of the plants, besides presenting greater stimuli in the emission of roots and increase in root volume. The levels of soluble metabolites also indicate that the plants treated with this HA were the most efficient in using nitrogen for its development. Chapter III shows the results obtained by the application of vermicompost humic acid in rice (*Oryza sativa* L.) plants of the BRS Emerald variety subjected to water deficiency. HAVC preserved the photosynthetic performance index in plants under water stress. HA was also responsible for stimulating the quantity, length, area, volume and diameter of roots of plants cultivated under water stress conditions, besides the plants treated with HA + PEG presented higher fresh biomass than those treated with PEG alone. Soluble metabolite contents and dry mass of different plant organs show that HA contributed to the osmotic balance of plants subjected to stress.

Keywords: Humic substances. Characterization. Biological activity. Hydrical stress.

LISTA DE ABREVIASÕES E SÍMBOLOS

AH - Ácidos húmicos

AHRN - Ácido húmico extraído de sedimentos do Rio Negro-AM

AHSOLO - Ácido húmico extraído de Organossolo

AHVC - Ácido húmico de vermicomposto

AF - Ácidos fúlvicos

CP MAS¹³ C RMN - Ressonância magnética nuclear do isótopo do ¹³C em polarização cruzada e rotação no ângulo mágico

DLS - Espalhamento dinâmico de luz

EROs - Espécies reativas de oxigênio

MP - Membrana plasmática

PEG - Polietilenoglicol

SH - Substâncias húmicas

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principais vias de formação das substâncias húmicas, adaptado de Stevenson, 1994. Fonte: SANTOS, 2014.	7
Figura 2. Esquema ilustrativo da evolução contínua das substâncias húmicas de acordo com Stevenson (1994).	9
Figura 3. Estrutura bidimensional do ácido húmico elaborada por Schnitzer. Fonte: PINHEIRO, 2010.	10
Figura 4. Etapas de extração dos ácidos húmicos utilizando KOH.	21
Figura 5. Etapas de purificação dos ácidos húmicos.	22
Figura 6. Espectros ^{13}C NMR CP MAS de ácidos húmicos obtidos de sedimentos do Rio Negro - AM (AHRN: linha preta), vermicomposto (AHVC: linha vermelha) e Organossolo (AHSOLO: linha azul).	24
Figura 7. Quantidade relativa de estruturas e grau de propriedade obtidos a partir dos espectros de ^{13}C NMR CP/MAS dos ácidos húmicos de diferentes ambientes de formação. *HB/HL = Índice de hidrofobicidade.	26
Figura 8. Determinações por espalhamento dinâmico de luz (DLS) realizadas nos diferentes tipos de ácidos húmicos. A) Potencial zeta (ζ) dos três ácidos húmicos em solução aquosa em função do valor de pH. B) População de partículas com diâmetro hidrodinâmico entre 0 - 500 nm em uma solução aquosa a valores de pH=7. C) Diâmetro médio das partículas em solução aquosa a valores de pH=7.	28
Figura 9. Ensaio experimental na câmara de crescimento.	34
Figura 10. Parâmetros do Teste JIP obtidos de arroz (<i>Oryza Sativa L.</i>) da var. BRS Esmeralda submetido a três ácidos húmicos de diferentes fontes de origem (vermicomposto, Organossolo e sedimentos do Rio Negro-AM), em relação aos valores do tratamento controle.	41
Figura 11. A) Massa fresca (g) em diferentes órgãos vegetais de plantas arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de diferentes ácidos húmicos. B) Massa seca (g) em diferentes órgãos vegetais de plantas arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de diferentes ácidos húmicos.	44
Figura 12. Parte aérea e raízes de plantas de arroz da variedade BRS Esmeralda cultivadas sem e com diferentes tipos de ácidos húmicos.	44
Figura 13. Efeitos dos ácidos húmicos provenientes de diferentes ambientes de formação em alguns parâmetros do desenvolvimento radicular de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda.	46
Figura 14. Efeitos dos ácidos húmicos provenientes de diferentes ambientes de formação na quantidade de raízes de arroz da var. BRS Esmeralda de diferentes diâmetros (mm/10).	47
Figura 15. Sistema radicular de plantas de arroz da variedade BRS Esmeralda cultivadas sem e com diferentes tipos de ácidos húmicos.	48
Figura 16. Teores de pigmentos fotossintéticos (ug.g^{-1} de massa fresca) em folhas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidos a aplicação de diferentes ácidos húmicos.	49
Figura 17. Teores de N-NH_4^+ (umoles. g^{-1} de massa fresca) em tecidos de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de diferentes ácidos húmicos.	50

Figura 18. Teores de N-NO ₃ ⁻ (umoles.g ⁻¹ de massa fresca) em tecidos de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de diferentes ácidos húmicos.....	51
Figura 19. Teores de N-amino livre (umoles.g ⁻¹ de massa fresca) em tecidos de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de diferentes ácidos húmicos.....	52
Figura 20. Teores de açucares solúveis (umoles.g ⁻¹ de massa fresca) em tecidos de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de diferentes ácidos húmicos.....	53
Figura 21. Espectros ¹³ C NMR CP MAS de raízes de plantas de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) da var. BRS Esmeralda tratadas com ácidos húmicos extraídos de sedimentos do Rio Negro-AM (AHRN), vermicomposto (AHVC) e Organossolo (AHSOLO).	54
Figura 22. A) Análise das componentes principais dos espectros puros obtidos por ¹³ C NMR CP MAS de raízes de plantas de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) da var. BRS Esmeralda cultivadas em condição normal (controle) e sob aplicação de AHRN, AHVC e AHSOLO. B) Análise das componentes principais para a distribuição relativa de tipos de carbono em raízes de plantas de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) da var. BRS Esmeralda cultivadas em condição normal (controle) e sob aplicação de AHRN, AHVC e AHSOLO.....	56
Figura 23. Análise das componentes principais para as nove variáveis radiculares mensuradas e para as massas frescas e secas (g) das raízes, bainhas e folhas de arroz da var. BRS Esmeralda em condição normal (controle) e sob aplicação de AHRN, AHVC e AHSOLO.	57
Figura 24. Análise das componentes principais para os teores de metabólitos solúveis e de pigmentos fotossintéticos de arroz da var. BRS Esmeralda em condição normal (controle) e sob aplicação de AHRN, AHVC e SOLO.	58
Figura 25. Ensaio experimental na casa de vegetação.	64
Figura 26. Parâmetros do Teste JIP obtidos de arroz (<i>Oryza Sativa</i> L.) da var. BRS Esmeralda submetido a aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG-6000) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG), em relação aos valores do tratamento controle.....	71
Figura 27. A) Massa fresca (g) produzida em diferentes órgãos vegetais de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG-6000) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG). B) Massa seca (g) produzida em diferentes órgãos vegetais de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG-6000) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG).	73
Figura 28. Parte aérea e raízes de plantas de arroz da variedade BRS Esmeralda cultivadas em condições normais e sob estresse hídrico, com e sem aplicação de ácido húmico de vermicomposto.	74
Figura 29. Efeitos da aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG-6000) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG) em alguns parâmetros do desenvolvimento radicular de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda....	75
Figura 30. Efeitos da aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG-6000) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG) na quantidade de raízes de arroz da var. BRS Esmeralda de diferentes diâmetros (mm/10).....	76

Figura 31. Sistema radicular de plantas de arroz da variedade BRS Esmeralda cultivadas em condições normais e sob estresse hídrico, com e sem aplicação de ácido húmico de vermicomposto.	76
Figura 32. Teores de pigmentos fotossintéticos (ug.g^{-1} de massa fresca) em folhas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG-6000) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG).	78
Figura 33. Teores de N-NH_4^+ (umoles. g^{-1} de massa fresca) em tecidos de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG-6000) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG).	79
Figura 34. Teores de N-NO_3^- (umoles. g^{-1} de massa fresca) em tecidos de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG-6000) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG).	80
Figura 35. Teores de N-amino livre (umoles. g^{-1} de massa fresca) em tecidos de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG-6000) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG).	81
Figura 36. Teores de açúcares solúveis (umoles. g^{-1} de massa fresca) em tecidos de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG-6000) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG).	82
Figura 37. Análise das componentes principais para as nove variáveis radiculares mensuradas e para as massas seca (g) das raízes de arroz da var. BRS Esmeralda em condição normal (controle) e sob aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG).	83
Figura 38. Análise das componentes principais para a massa seca (g) das bainhas e folhas e para a massas fresca (g) das raízes, bainhas e folhas de arroz da var. BRS Esmeralda em condição normal (controle) e sob aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG).	84
Figura 39. Análise das componentes principais dos teores de metabólitos solúveis e pigmentos fotossintéticos de arroz da var. BRS Esmeralda em condição normal (controle) e sob aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG).	85
Figura 40. Efeito de diferentes doses de ácido húmico obtido de vermicomposto (AHVC) em alguns parâmetros do desenvolvimento radicular em plantas de arroz da var. BRS Esmeralda.	101
Figura 41. Efeito de diferentes doses de ácido húmico obtido de vermicomposto (AHVC) no aumento do número de raízes de diferentes diâmetros.	101
Figura 42. Efeito de diferentes doses de ácido húmico obtido de Organossolos (AHSOLO) em alguns parâmetros do desenvolvimento radicular em plantas de arroz da var. BRS Esmeralda.	102
Figura 43. Efeito de diferentes doses de ácido húmico obtido de Organossolo (AHSOLO) no aumento do número de raízes de diferentes diâmetros.	102

Figura 44. Efeito de diferentes doses de ácido húmico obtido de sedimento do Rio Negro (AHRN) em alguns parâmetros do desenvolvimento radicular em plantas de arroz da var. BRS Esmeralda.....103

Figura 45. Efeito de diferentes doses de ácido húmico obtido de sedimento do Rio Negro (AHRN) no aumento do número de raízes de diferentes diâmetros.....103

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Características da cultivar BRS Esmeralda em comparação às testemunhas BRS Primavera, BRS Sertaneja e AN Cambará, avaliadas em 108 ensaios, conduzidos nos anos agrícolas 2003/2004 a 2011/12.....	6
Tabela 2. Distribuição relativa de tipos de carbono (%) nos espectros ^{13}C NMR CP MAS em função da área total.....	25
Tabela 3. Principais parâmetros do teste JIP (Adaptada de YUSUF et al., 2010).....	35
Tabela 4. Parâmetros da fluorescência transiente da clorofila <i>a</i> obtidos de arroz (<i>Oryza Sativa</i> L.) da var. BRS Esmeralda submetida a três ácidos húmicos de diferentes fontes de origem (vermicomposto, Organossolo e sedimentos do Rio Negro-AM)	41
Tabela 5. Distribuição relativa de tipos de carbono (%) nos espectros ^{13}C NMR CP MAS em raízes de plantas de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) submetidas a diferentes ácidos húmicos.	55
Tabela 6. Principais parâmetros do teste JIP (Adaptada de YUSUF et al., 2010).....	65
Tabela 7. Parâmetros da fluorescência transiente da clorofila <i>a</i> obtidos de arroz (<i>Oryza Sativa</i> L.) da var. BRS Esmeralda submetido a aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG-6000) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG)	71

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Arroz (<i>Oryza sativa L.</i>).....	4
2.2 Matéria Orgânica Humificada	6
2.3 Ácidos Húmicos.....	9
2.4 Bioatividade dos Ácidos Húmicos.....	11
2.5 Déficit Hídrico	14
3. CAPÍTULO I OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS DE DIFERENTES AMBIENTES DE FORMAÇÃO	16
3.1 RESUMO.....	17
3.2 ABSTRACT.....	18
3.3 INTRODUÇÃO	19
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.4.1 Material de partida para obtenção das substâncias húmicas	20
3.4.2 Fracionamento e purificação das substâncias húmicas	20
3.4.3 Caracterização espectroscópica por ressonância magnética nuclear em estado sólido do isótopo do ^{13}C em polarização cruzada e rotação no ângulo mágico (CP MAS $^{13}\text{C-NMR}$).....	22
3.4.4 Caracterização físico-química por espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	23
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
3.5.1 Características estruturais dos ácidos húmicos isolados de vermicomposto, solo orgânico e sedimentos do Rio Negro mediante ^{13}C NMR-CP/MAS	24
3.5.2 Características físico-químicas dos diferentes ácidos húmicos pela dinâmica das partículas em solução (Dynamic Light Scattering -DLS)	27
3.6 CONCLUSÕES	29
4.CAPÍTULO II RELAÇÃO ESTRUTURA-PROPRIEDADE-FUNÇÃO DE ÁCIDOS HÚMICOS DE DIFERENTES ORIGENS EM PLANTAS DE ARROZ (<i>Oryza sativa L.</i>)...30	30
4.1 RESUMO.....	31
4.2 ABSTRACT.....	32
4.3 INTRODUÇÃO	33
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.4.1 Localização e caracterização do experimento.....	34
4.4.2 Aplicação dos ácidos húmicos de diferentes ambientes de formação.....	34
4.4.3 Avaliação da cinética de emissão da fluorescência transiente da clorofila <i>a</i>	35
4.4.4 Avaliação da massa fresca e seca da parte aérea e radicular.....	36
4.4.5 Análise da morfologia e desenvolvimento radicular.....	37

4.4.6 Determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos.....	37
4.4.7 Extração alcoólica do material fresco e dosagem das frações solúveis	37
4.4.8 Determinação dos teores de N-NO ₃ ⁻	38
4.4.9 Determinação dos teores de N-NH ₄ ⁺	38
4.4.10 Determinação dos teores de açúcares solúveis.....	38
4.4.11 Determinação dos teores de N-amino livre	39
4.4.12 Caracterização espectroscópica das raízes mediante ressonância magnética nuclear do isótopo do ¹³ C por polarização cruzada com rotação no ângulo mágico	39
4.4.13 Análises estatísticas.....	39
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.5.1 Avaliação da cinética de emissão da fluorescência transiente da clorofila <i>a</i>	40
4.5.2 Produção de massa fresca e seca das plantas	42
4.5.3 Indicadores morfológicos radiculares	44
4.5.4 Teores de pigmentos fotossintéticos	48
4.5.5 Teores de metabólitos solúveis	49
4.5.6 Caracterização espectroscópica das raízes de plantas de arroz mediante ¹³ C NMR CP/MAS submetidas à diferentes tipos de ácidos húmicos	53
4.5.7 Análises de componentes principais	56
4.6 CONCLUSÕES	59
5. CAPÍTULO III EFEITO DE ÁCIDO HÚMICO DE VERMICOMPOSTO EM PLANTAS DE ARROZ (<i>Oryza sativa L.</i>) SOB CONDIÇÃO HÍDRICA ADVERSA	60
5.1 RESUMO	61
5.2 ABSTRACT	62
5.3 INTRODUÇÃO	63
5.4 MATERIAL E MÉTODOS	64
5.4.1 Localização e caracterização do experimento.....	64
5.4.2 Aplicação dos tratamentos	64
5.4.3 Avaliação da cinética de emissão da fluorescência transiente da clorofila <i>a</i>	65
5.4.4 Avaliação da massa fresca e seca da parte aérea e radicular.....	66
5.4.5 Análise da morfologia e desenvolvimento radicular.....	66
5.4.6 Determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos.....	67
5.4.7 Extração alcoólica do material fresco e dosagem das frações solúveis	67
5.4.8 Determinação dos teores de N-NO ₃ ⁻	68
5.4.9 Determinação dos teores de N-NH ₄ ⁺	68
5.4.10 Determinação dos teores de açúcares solúveis.....	68
5.4.11 Determinação dos teores de N-amino livre	68
5.4.12 Análises estatísticas.....	69

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
5.5.1 Avaliação da cinética de emissão da fluorescência transiente da clorofila <i>a</i>	70
5.5.2 Produção de massa fresca e seca das plantas	72
5.5.3 Indicadores morfológicos radiculares	74
5.5.4 Teores de pigmentos fotossintéticos	77
5.5.5 Teores de metabólitos solúveis	78
5.5.6 Análises de componentes principais	82
5.6 CONCLUSÕES	86
6. CONCLUSÕES GERAIS	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
8. ANEXOS	101

1. INTRODUÇÃO GERAL

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais de maior importância social e econômica para o mundo, sendo o terceiro mais produzido. É responsável pela alimentação de dois terços da população mundial e fornece aproximadamente 20% da energia e 15% da proteína necessárias ao ser humano. Estudos relacionados às alternativas que afetem positivamente a produção e desenvolvimento da cultura em diferentes condições vêm aumentando nas últimas décadas (LAFITTE, ISMAIL & BENNETT, 2004; CORDEIRO et al., 2010).

De acordo com Muscolo et al. (2007), as substâncias húmicas (SH) são geradas por alteração química e biológica de material animal e vegetal, apresentando uma estrutura supramolecular composta por moléculas heterogêneas, de coloração escura, e elevada estabilidade e peso molecular, interagindo de acordo com seu tamanho, forma, afinidade química e hidrofobicidade.

O interesse na utilização de SH em áreas cultivadas vêm aumentando entre os agricultores. Essas supramoléculas possuem importância ecológica, pois atuam na regulação de diversos processos químicos e biológicos ocorridos em ecossistemas naturais. Nas plantas, alteram a morfologia, crescimento e a arquitetura das raízes, atuam sobre o desenvolvimento vegetal, aumentam a taxa respiratória, e estimulam o ciclo de Krebs, a fotossíntese, a produção de adenosina trifosfato e aminoácidos, alteram a expressão e/ou supressão de genes e influenciam na atividade de determinadas enzimas. No solo, as reações dos ácidos húmicos resultam nas conhecidas melhorias dos aspectos físicos, químicos e biológicos do sistema, como os aumentos da agregação, da porosidade, da capacidade de troca iônica, da complexação de íons tóxicos e da fertilidade (TREVISAN et al., 2009; MORA et al., 2012; JANNIN et al., 2012).

Os efeitos no desenvolvimento do sistema radicular de plantas pela aplicação de ácidos húmicos (AH) são os mais observados e estudados por diversos autores (SILVA et al., 2000; TREVISAN et al., 2009; CANELLAS et al., 2011; BALDOTTO et al., 2012; TAVARES, 2014; GARCÍA, 2016b; GARCÍA, 2018). Autores como Trevisan et al. (2009) e Muscolo, Sidari & Nardi (2013) relataram a presença de auxinas na estrutura dos ácidos húmicos, sendo uma possível justificativa para o estímulo ao desenvolvimento radicular. García et al. (2016 a) obtiveram resultados indicando que as diferenças nas estruturas predominantes dos ácidos húmicos determinam diferentes efeitos nas raízes, observando o estímulo à emissão de novas raízes pelos AH em que predominam compostos alifáticos e oxigenados e pelo estímulo ao desenvolvimento de raízes mais compridas pelo caráter mais aromático dessas substâncias.

A compreensão das características responsáveis pela atividade biológica das substâncias húmicas é essencial para uma melhor explicação dos mecanismos pelos quais exercem seus efeitos no organismo vegetal. Diversos autores vêm desenvolvendo trabalhos ao longo dos anos envolvendo ácidos húmicos em plantas sob diferentes tipos de estresses, como o estresse salino, toxidez por metais pesados, por alumínio, por efeito de herbicidas e pesticidas, estresse hídrico, entre outros (BURNS et al., 1986; ÇIMRİN et al., 2010; GARCÍA et al., 2012; OUNI et al., 2014; GARCÍA et al., 2014; BÜYÜKKESKIN et al., 2015). Os ácidos húmicos têm demonstrado, em alguns estudos, capacidade de reduzir os malefícios resultantes da baixa disponibilidade de água, através dos efeitos no sistema oxidativo, nos teores de pigmentos fotossintéticos e nos teores de prolina (GARCÍA et al., 2012, 2014; AGUIAR et al., 2016).

Asli & Neumann (2010) propuseram que as substâncias húmicas desencadeiam suas ações em plantas através de interações com raízes, denominado estresse coloidal, onde ocorrem modificações na taxa transpiratória e na condutividade hidráulica. Cordeiro et al. (2011) observaram efeitos das SH nos mecanismos oxidativos, pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). O papel regulatório nos níveis de EROs pelas SH vem sendo elucidado em plantas de arroz, onde a aplicação de AH via radicular demonstra capacidade em aumentar a expressão de genes e a atividade de enzimas do sistema antioxidativo dessa espécie (García et al., 2012; 2014).

A utilização de técnicas de caracterização físico-química referente a moléculas de maior tamanho vem sendo implementada em trabalhos envolvendo substâncias húmicas. Os estudos envolvendo essas supramoléculas vão desde a extração, fracionamento e purificação até a caracterização estrutural (CANELLAS et al., 2012). Segundo García (2013), as técnicas de caracterização mais comuns para essas substâncias são: espectrofotometria (UV-vis e Fluorescência), espectroscopia (FTIR, RMN¹³C e ¹H), espectrometria (de massas), cromatografia (HPSEC) e microscopia (MEV).

Apesar das substâncias húmicas serem utilizadas desde o último século, somente nas últimas décadas houve uma crescente atenção aos mecanismos pelos quais atuam. Devido à elevada complexidade molecular, ainda não foram desenvolvidas técnicas produtivas capazes de regular a atividade dessas substâncias. O estabelecimento de relações entre estrutura e atividade biológica das SH é fundamental para desenvolver recursos que possam ser utilizados na agricultura (CANELLAS et al., 2012; AGUIAR et al., 2013).

No capítulo I foram apresentados os resultados referentes à caracterização físico-química (ressonância magnética nuclear no estado sólido - ¹³C NMR CP/MAS e espalhamento dinâmico da luz - DLS) dos três tipos de ácidos húmicos (AHVC, AHSOLO e AHRN). O objetivo do capítulo II foi avaliar e discutir os efeitos dos três AH, anteriormente caracterizados, na morfologia, crescimento e metabolismo de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) da variedade BRS. Esmeralda, assim como estabelecer uma relação entre a suas estruturas e propriedades físico-químicas com a bioatividade exercida nas plantas. O capítulo III mostra os resultados obtidos pela aplicação do AHVC em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) da variedade BRS. Esmeralda, submetidas à deficiência hídrica.

Assim, o presente trabalho tem como **hipótese científica**:

H0: não existe uma relação entre a estrutura dos AH e seus efeitos em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.), assim como não apresentam potencial para amenizar os prejuízos decorrentes do estresse hídrico em plantas;

H1: ácidos húmicos regulam, em função de sua estrutura, o crescimento, desenvolvimento e metabolismo de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.), além de exercer efeito positivo em plantas submetidas à deficiência hídrica.

O **objetivo geral** proposto por este trabalho foi:

Estudar a relação entre as características estruturais de ácidos húmicos extraídos de diferentes fontes e os efeitos da aplicação em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) em condições normais de crescimento e sob estresse hídrico.

Os **objetivos específicos** da dissertação foram:

- a. Isolar e purificar os ácidos húmicos de três materiais de origem diferentes: vermicomposto, Organossolo e sedimentos do Rio Negro – AM;

- b. Caracterizar químico-física e espectroscopicamente (Ressonância magnética nuclear no estado sólido e Espalhamento dinâmico de luz) os três ácidos húmicos que são objetos de estudo;
- c. Avaliar o efeito dos ácidos húmicos em plantas de arroz por meio da produção de biomassa vegetal, modificações morfológicas e anatômicas das raízes e alterações no metabolismo fotossintético e nos metabólitos solúveis;
- d. Determinar, pelo comportamento morfo-fisiológico e pelo desenvolvimento vegetal, os efeitos e mecanismos desencadeados pela aplicação de ácidos húmicos em arroz sob condição hídrica adversa induzida por PEG-6000;
- e. Estabelecer relação entre as estruturas e propriedades dos AH com a bioatividade execida em plantas de arroz, através de resultados obtidos pela caracterização estrutural mediante ^{13}C NMR CP/MAS e DLS, e pelas análises relacionadas à morfologia, crescimento e metabolismo vegetal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Arroz (*Oryza sativa* L.)

O arroz é o produto de maior importância para economia de muitos países em desenvolvimento, sendo o principal alimento para mais da metade da população mundial. É a terceira maior cultura cerealífera do mundo, sendo apenas ultrapassado pelo milho e trigo. Desempenha papel estratégico, tanto em nível social quanto econômico, para as nações mais populosas da África, Ásia e América Latina (WALTER, MARCHEZAN & AVILA, 2008; SANTOS, 2017).

A Ásia é o continente com maior produção e consumo mundial de arroz, abrangendo os oito países que mais o produzem. Na primeira posição encontra-se a China, posteriormente a Índia, Indonésia, Bangladesh, Vietnam, Tailândia, Myanmar e Filipinas. A nona posição é ocupada pelo Brasil (CORDEIRO et al., 2010; SILVA, 2017).

A origem do arroz ainda não é certa, no entanto acredita-se que é originário do sudeste da Ásia (EMBRAPA Arroz e Feijão, 2008). Segundo Lourenço (2009) “diversos cientistas e historiadores classificam o sudeste da Ásia como o local de origem do arroz. Alguns autores apontam o Brasil como o primeiro país a cultivar esse cereal no continente americano”. A introdução no Brasil ocorreu por volta de 1530 pelos comandados de Cabral, disseminando-se mais tarde por outras regiões da costa litorânea brasileira, principalmente na região do Nordeste, em pequenos cultivos de subsistência (PEREIRA, 2002).

De acordo com a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento, 2015) “a produção mundial de arroz estimada é maior que 475 milhões de toneladas, sendo 8,3 milhões de toneladas produzidas no país”. “No Brasil há três principais polos produtivos: a região Sul, com destaque para o Rio Grande do Sul; a região Central, abrangendo São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso; e o Maranhão” (FERREIRA, WANDER & SILVA, 2017).

Nacionalmente o arroz é cultivado em vários sistemas e diferentes ecossistemas, destacando-se os de terras altas (sequeiro) e de várzea (irrigado). O cultivo de várzea é caracterizado pela condição de desenvolvimento da raiz em anaerobiose. A maior parcela da produção é proveniente do sistema irrigado, responsável por aproximadamente 75% da produção nacional (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2013; SANTOS, 2017).

O arroz é uma planta herbácea da família *Gramineae*, monocotiledônea da ordem *Glumifloreae*, e que possui cerca de vinte espécies, tendo como a mais cultivada a *Oryza sativa* (CONAB, 2015). É classificado como uma espécie de ciclo anual, pertencente ao grupo das plantas C3, adaptada ao ambiente aquático devido à presença de aerênquima no colmo e nas raízes da planta, possibilitando assim a passagem de oxigênio do ar para a camada da rizosfera (LOURENÇO, 2009).

O ciclo da cultura pode durar em torno de três a seis meses, dependendo da cultivar e do ambiente de cultivo, sendo dividido em fase vegetativa 1 e 2 e fase reprodutiva. A primeira fase compreende da semeadura até a emergência, a segunda fase vai da emergência até o aparecimento do colar no colmo principal da última folha bandeira, e a terceira vai da diferenciação da panícula à maturação fisiológica (COUNCE apud STRECK et al., 2007).

A cultura possui sistema radicular fasciculado, sendo o surgimento da radícula seguido por uma ou duas raízes seminais secundárias, que permanecerão por um curto período e serão substituídas pelas raízes adventícias do sistema secundário. Estas últimas raízes são fibrosas e possuem muitas ramificações e pêlos radiculares. A primeira folha difere do restante pelo formato cilíndrico e por não apresentar lâmina. As folhas posteriores possuem disposição alternada no colmo, apresentando bainha, lâmina, colar, aurículas e lígula. O caule é composto por um colmo principal, que por perfilhamento origina uma quantidade variável de

colmos primários e secundários. A inflorescência da planta é do tipo panícula, localizada sobre o último entrenó do caule e composta por ráquis, de onde saem ramificações primárias e secundárias que darão origem as espiguetas (HEINEMANN & PINHEIRO, 2017).

O arroz apresenta predominantemente carboidratos na sua constituição, possuindo também proteínas, lipídios, vitaminas e minerais. As condições de cultivos apresentam efeitos diretos nas concentrações de minerais encontradas nas plantas. As vitaminas B1, B2 e B3 são encontradas em maior quantidade neste cereal, também havendo alterações em seus conteúdos pelas condições de cultivo e trato pós-colheita (GRIST, 1978; NAVES, 2007).

A cultura do arroz demonstra características particulares de susceptibilidade e tolerância a estresses abióticos quando comparado a outras culturas. Há tolerância a solos encharcados e submersão em níveis que matariam outras espécies, é tolerante em diferentes níveis à salinidade e à acidez do solo dependendo da cultivar ou variedade, entretanto é sensível à seca e ao frio. Conhecimentos sobre como os genes de arroz respondem às condições adversas vêm aumentando significativamente. Diversos estudos relatam alterações na expressão de genes quando a planta passa por estresses bióticos e abióticos (LAFITTE, ISMAIL & BENNETT, 2004).

Conforme Cruz & Milach (2000) abordam, é difícil controlar a ocorrência de estresse por temperaturas em plantas de arroz, devido à imprevisibilidade e a natureza abiótica deste fator. Temperaturas baixas no início do desenvolvimento podem causar problemas no estabelecimento da lavoura e, posteriormente, podem resultar em espiguetas estéreis, reduzindo o rendimento de grãos.

Entre as alterações químicas ocorrentes nos solos resultantes da redução do pH destacam-se a solubilização do alumínio (Al), manganês (Mn) e ferro (Fe) atingindo níveis tóxicos, e a complexação de elementos essenciais, sendo o fósforo (P) o mais afetado. Teores de Al tóxicos no solo inibem o crescimento e o desenvolvimento das raízes, modificando a absorção de água e nutrientes. Em estudo com genótipos de arroz cultivados em sistema hidropônico sob tratamentos com Al, foi observado redução significativa na absorção dos macronutrientes fósforo (P), magnésio (Mg), cálcio (Ca) e potássio (K). Determinadas cultivares de arroz, tolerantes à toxidez por alumínio, são capazes de aumentar o pH da solução nutritiva e, assim, reduzem a solubilidade deste elemento (FREITAS et al., 2006; FERREIRA, MOREIRA & RASSINI, 2006; HARTWIG et al., 2007).

A cultura do arroz apresenta diferentes níveis de tolerância à salinidade de acordo com a cultivar ou variedade, sendo classificada como espécie glicófita. Sob condições de estresse salino plantas de arroz acumulam diversos osmoprotetores, como a sacarose, frutose, glicose, malato e ascorbato. Esses solutos orgânicos podem se concentrar em diferentes partes da planta, apresentando efeitos distintos na fisiologia vegetal. Sendo assim, enquanto alguns protegem enzimas e órgãos vegetais específicos, outros contribuem evitando o acúmulo de sais através de um balanço osmótico parcial na planta. (MARCONDES & GARCIA, 2009).

Em consequência ao estresse hídrico ocorre redução na condutância estomática, no potencial hídrico da folha, na taxa de assimilação de CO₂ e na taxa de transpiração. Nesta condição o arroz reage com reduções na área foliar e na produção de biomassa, redução na altura da planta, abortamento de perfilhos, atraso do estádio reprodutivo e alterações na profundidade de enraizamento e massa seca das raízes. Quando a deficiência hídrica ocorre de forma gradual, a partição de assimilados entre parte aérea e raiz não é afetada. No entanto, a parte aérea cessa o seu crescimento quando submetida a estresse severo (GUIMARÃES et al., 2011).

A Embrapa tem desenvolvido nas últimas décadas diversas cultivares de arroz com intuito de obter maior produtividade e tolerância a estresses. Uma das cultivares desenvolvidas que apresentou destaque foi a BRS Esmeralda (Tabela 1), caracterizada pela

alta produtividade, pela vigorosidade das plantas, arquitetura e senescência tardia. Seus grãos são longos e finos. Trata-se de uma cultivar de ampla adaptação e estabilidade nas principais regiões produtoras do Brasil, sendo registrada para plantio nos seguintes estados: GO, MT, RO, PA, RR, TO, MA, PI, RJ e MG (CASTRO et al., 2014).

Tabela 1. Características da cultivar BRS Esmeralda em comparação às testemunhas BRS Primavera, BRS Sertaneja e AN Cambará, avaliadas em 108 ensaios, conduzidos nos anos agrícolas 2003/2004 a 2011/12.

Característica	BRS Esmeralda	BRS Sertaneja	BRS Primavera	AN Cambará
Produtividade de grãos (kg ha ⁻¹)	3985 a	3797 ab	3496 bc	3245 c
Ciclo do plantio à floração (dias)	77	78	73	77
Altura da planta (cm)	103	106	110	102
Acamamento (notas 1 – 9) *	2,1	2,4	3,9	2,0
Brusone nas panículas (notas 1 – 9) *	2,2	3,6	4,5	4,2
Mancha parda (notas 1 – 9) *	0,7	0,7	0,7	0,7
Escaldadura (notas 1 – 9) *	4,0	4,1	3,8	4,5
Mancha-dos-grãos (notas 1 – 9) *	2,9	2,8	2,9	3,0
Rendimento de grãos inteiros quando colhida no estágio adequado	Alto	Alto	Médio	Alto
Pegajosidade dos grãos cozidos aos 60 dias após a colheita	Solto	Solto	Solto	Solto

* notas de incidência/severidade, portanto notas menores indicam maior resistência. Fonte: Adaptado de Castro et al. (2014).

2.2 Matéria Orgânica Humificada

A matéria orgânica possui fundamentalmente dois grupos, o das substâncias não-humificadas e o das substâncias húmicas (SH). O primeiro é formado por compostos quimicamente definidos, geralmente incolores, simples e de baixo peso molecular, utilizados como substrato por microrganismos, sendo assim, de existência transitória. Alguns exemplos são os aminoácidos, proteínas, álcoois, ligninas e aldeídos. As SH constituem aproximadamente 60% da matéria orgânica, sendo amplamente distribuídas no planeta, estando presentes no solo, na água e nos sedimentos, e representam o maior reservatório de carbono orgânico da Terra (MUSCOLO et al., 2007; MUSCOLO & SIDARI, 2009).

Muscolo et al. (2007) afirmam que as SH são formadas por transformação química e biológica de matéria vegetal e animal, e de metabolismo microbiano, resultando em uma estrutura supramolecular composta por moléculas heterogêneas, de coloração escura e maior estabilidade e peso molecular, interagindo em função do seu tamanho, forma, afinidade química e hidrofobicidade.

Piccolo (2016) caracteriza o processo de humificação como dinâmico, ocorrendo interação por forças covalentes, forças de van der waals, ligações π-π e CH-π, entre biomoléculas, lipídeos, polissacarídeos, DNA, RNA, entre outros, originando uma molécula supraestrutural.

Os principais componentes moleculares das substâncias húmicas são os ácidos alifáticos, os éteres, os ésteres, os álcoois, os anéis aromáticos, os polissacarídeos e os polipeptídeos. Embora as ações funcionais dessas substâncias sofram influência direta pela configuração química que apresentam em solução, as relações entre atividade e estrutura não são claras (MORA et al., 2010; CANELLAS et al., 2012).

Existem pelo menos quatro vias principais responsáveis pela formação das substâncias húmicas: a partir de açúcares, polifenóis, lignina e ligninas modificadas; sendo o grau de ocorrência de cada uma dependente das características predominantes do ambiente durante o processo de decomposição. As quatro vias podem ocorrer simultaneamente, porém não com a mesma intensidade. Todos os mecanismos de formação envolvem ação microbiana sobre o resíduo inicial e posterior incorporação de compostos nitrogenados (Figura 1) (ROSA, 2001; SANTOS, 2014).

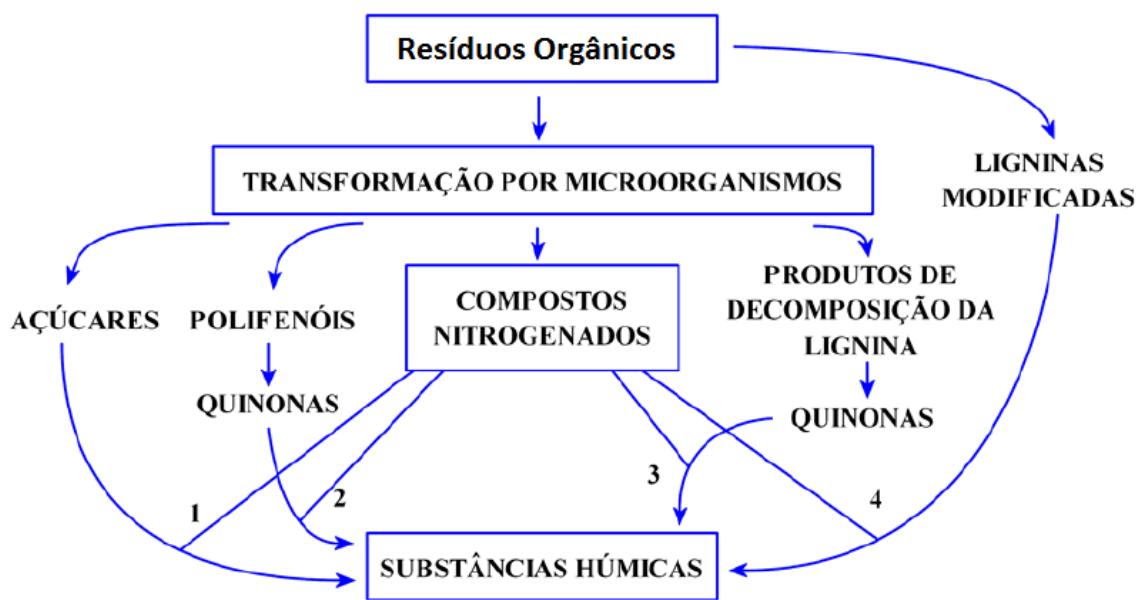


Figura 1. Principais vias de formação das substâncias húmicas, adaptado de Stevenson, 1994.
Fonte: SANTOS, 2014.

A matéria orgânica humificada é dividida classicamente em três principais frações com distintas características físico-químicas, baseando-se em suas propriedades de solubilidade. São usualmente classificadas como: ácido fúlvico (AF), fração solúvel em meios alcalino e ácido; ácido húmico (AH), fração solúvel em meio alcalino e insolúvel em meio ácido ($\text{pH} < 2$); e humina, fração insolúvel em qualquer condição de pH (BOTERO, 2010).

No entanto, alguns autores defendem que as huminas não satisfazem a definição clássica de substâncias húmicas, pois estas parecem estar compostas por uma mistura complexa de agregados estáveis de biomoléculas e não de material humificado, podendo corresponder basicamente a fragmentos de ácidos húmicos fortemente ligados à fração mineral do solo (SIMPSOM et al., 2007; GARCÍA et al., 2016b).

A possibilidade de isolar a partir da matéria orgânica humificada as frações fundamentais das substâncias húmicas, permitiu o avanço no estudo e conhecimento sobre suas estruturas, propriedades e funções, sendo os ácidos húmicos e ácidos fúlvicos os maiores alvos de interesse e pesquisa. As características relacionadas a estrutura das frações húmicas são dependentes da fonte de origem e do período de formação ou transformação (GARCÍA, 2013).

Processos químicos, físicos e espectroscópicos aplicados com êxito em pesquisas envolvendo macromoléculas têm sido utilizados para estudos com substâncias húmicas, visando estabelecer a composição e estrutura geral da molécula, assim como justificar as diversas propriedades que elas apresentam. Os estudos dessas substâncias vão desde os métodos de extração, fracionamento e purificação até a caracterização. Os métodos de

extração mais utilizados são Kononova, Dabin, Danneberg & Ullah, Schnitzer, Swift, Benites e os de purificação são os com ácido fluorídrico (HF), resina DAX-8 e diálise, além do processo de liofilização (PRIMO, MENEZES & SILVA, 2011; CANELLAS et al., 2012). Segundo García (2013) dentre as técnicas de caracterização estruturais mais utilizadas estão: as espectrofotométricas (UV-vis e Fluorescência), as espectroscópicas (FTIR, RMN¹³C e ¹H), as espectrométricas (espectrometria de massas), as cromatográficas (HPSEC) e as microscópicas (MEV), assim como as diferentes combinações destas.

Mesmo com todas as contradições existentes em relação ao modelo estrutural, algumas características das SH já estão esclarecidas: a) os ácidos húmicos e ácidos fúlvicos são misturas heterogêneas de moléculas polidifusas, com intervalos de massa molar variando de algumas centenas até milhares (STEVENSON, 1982); b) existem alterações na razão entre ácido húmico e ácido fúlvico em função do material de origem. Essa razão está associada ao grau de humificação do mesmo (ROCHA, et al. 1998).

Segundo Sposito (2004), as substâncias húmicas possuem quatro principais propriedades de acordo com a estrutura que apresentam: polifuncionalidade, caracterizada por um grande número de grupos funcionais que proporcionam amplo espectro de reatividade; carga macromolecular negativa, que permite maior reatividade com outras moléculas; hidrofilicidade, que corresponde a tendência de formar fortes pontes de hidrogênio com a água; e maleabilidade estrutural, que diz respeito a capacidade de associação intermolecular e alteração na conformação da molécula em função da variação de pH, dos valores de redox, da concentração eletrolítica e da ligação com grupamentos funcionais.

Diversos estudos relatam a capacidade de SH de diferentes origens em aumentar a agregação do solo, retenção de água, trocas iônicas e complexação de íons tóxicos no solo. São substâncias consideradas bioestimulantes por promoverem o desenvolvimento vegetal por meio de pequenas quantidades. Nas plantas modificam a morfologia, crescimento e a arquitetura das raízes, atuam sobre o desenvolvimento da planta, aumentam a taxa respiratória e estimulam o ciclo de Krebs, a fotossíntese e a produção de adenosina trifosfato e aminoácidos (MUSCOLO et al., 2007; TREVISAN et al., 2009; JANNIN et al., 2012).

A aplicação de substâncias húmicas em cultivos e sua capacidade para atuarem como promotores de crescimento em plantas têm criado progressivamente maior interesse na agricultura. Essas moléculas possuem importância ecológica, pois regulam uma série de processos químicos e biológicos ocorrentes em ecossistemas naturais. Ainda não foram desenvolvidas, devido à complexidade molecular, técnicas de produção capazes de controlar a atividade dessas substâncias. O estabelecimento de relações entre estrutura e bioatividades das SH é fundamental para desenvolver recursos que possam ser utilizados na produção e desenvolvimento agrícola (MORA et al., 2012; CANELLAS et al., 2012; AGUIAR et al., 2013).

2.3 Ácidos Húmicos

Os efeitos desencadeados pelos ácidos orgânicos, principalmente pelos ácidos húmicos, direcionaram a atenção da comunidade científica a partir da década de 40, quando o Dr. Leonard constatou as excelentes características agronômicas resultantes de minerais lignitos, com elevado grau de oxidação, para o solo e plantas. Estes minérios apresentavam abundância na quantidade de ácidos húmicos, que posteriormente passou a ser conhecido como leonardita (FILHO & SILVA, 2017).

Os ácidos húmicos (AH) englobam a maior fração das substâncias húmicas, sendo o principal foco de estudos na área. Estruturalmente, as três frações húmicas possuem similaridades, diferindo principalmente em peso molecular e grupos funcionais. Os AH são insolúveis em meio fortemente ácido, pois com a protonação dos grupamentos funcionais ocorre o colapso da estrutura e a precipitação das moléculas. Essa substância representa a fração reativa mais estável da matéria orgânica humificada (CANELLAS et al., 2001; JANNIN et al., 2012).

A relação carbono/nitrogênio dos ácidos húmicos é superior em 50% à média encontrada na matéria orgânica, o que lhe atribui maior estabilidade no ambiente. Possuem maior conteúdo de carbono e nitrogênio e menor conteúdo de oxigênio quando comparados aos ácidos fúlvicos, resultando em uma maior massa molecular (FILHO & SILVA, 2017). É possível constatar um estágio de humificação mais avançado devido ao grau de polimerização relativamente maior dos AH, como é demonstrado na Figura 2 através do esquema da evolução contínua das substâncias húmicas, demonstrando a menor estabilidade dos ácidos fúlvicos e maior estabilidade das huminas quando comparados ao AH.

Substâncias húmicas				
ácidos fúlvicos	ácidos húmicos	huminas		
Amarelo claro	Amarelo escuro	marrom	Cinza/preto	preto
-----aumento da intensidade de coloração-----	-----aumento da intensidade de coloração-----	-----aumento da intensidade de coloração-----	-----aumento da intensidade de coloração-----	-----aumento da intensidade de coloração-----
-----aumento do grau de polimerização-----	-----aumento do grau de polimerização-----	-----aumento do grau de polimerização-----	-----aumento do grau de polimerização-----	-----aumento do grau de polimerização-----
-----aumento da massa molecular-----	-----aumento da massa molecular-----	-----aumento da massa molecular-----	-----aumento da massa molecular-----	-----aumento da massa molecular-----
-----aumento no conteúdo de C-----	-----aumento no conteúdo de C-----	-----aumento no conteúdo de C-----	-----aumento no conteúdo de C-----	-----aumento no conteúdo de C-----
-----diminuição do conteúdo de O-----	-----diminuição do conteúdo de O-----	-----diminuição do conteúdo de O-----	-----diminuição do conteúdo de O-----	-----diminuição do conteúdo de O-----
-----decréscimo na acidez trocável-----	-----decréscimo na acidez trocável-----	-----decréscimo na acidez trocável-----	-----decréscimo na acidez trocável-----	-----decréscimo na acidez trocável-----
-----decréscimo na solubilidade-----	-----decréscimo na solubilidade-----	-----decréscimo na solubilidade-----	-----decréscimo na solubilidade-----	-----decréscimo na solubilidade-----

Figura 2. Esquema ilustrativo da evolução contínua das substâncias húmicas de acordo com Stevenson (1994).

No contexto químico, os ácidos húmicos são extremamente complexos, integrados por polímeros compostos de cadeias aromáticas e alifáticas com alto peso molecular, e elevada capacidade de troca catiônica (FILHO & SILVA, 2017).

A composição média de uma unidade básica para o ácido húmico, em termo de fórmulas químicas médias é $C_{187} H_{186} O_{89} N_9 S$. Esta composição depende da origem, mas geralmente está nas faixas de 53,8 – 58,7% de carbono; 32,8 – 38,3% de oxigênio; 3,2 – 6,2% de hidrogênio; 0,8 – 4,3% de nitrogênio; e 0,4 – 1,0% de enxofre. Apesar da estrutura dos AH não estar completamente elucidada, sabe-se que são formados por agregados heterogêneos,

estabilizados por ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Figura 3) (SANTOS & CAMARGO, 1999; PICCOLO, 2001; PINHEIRO, 2010).

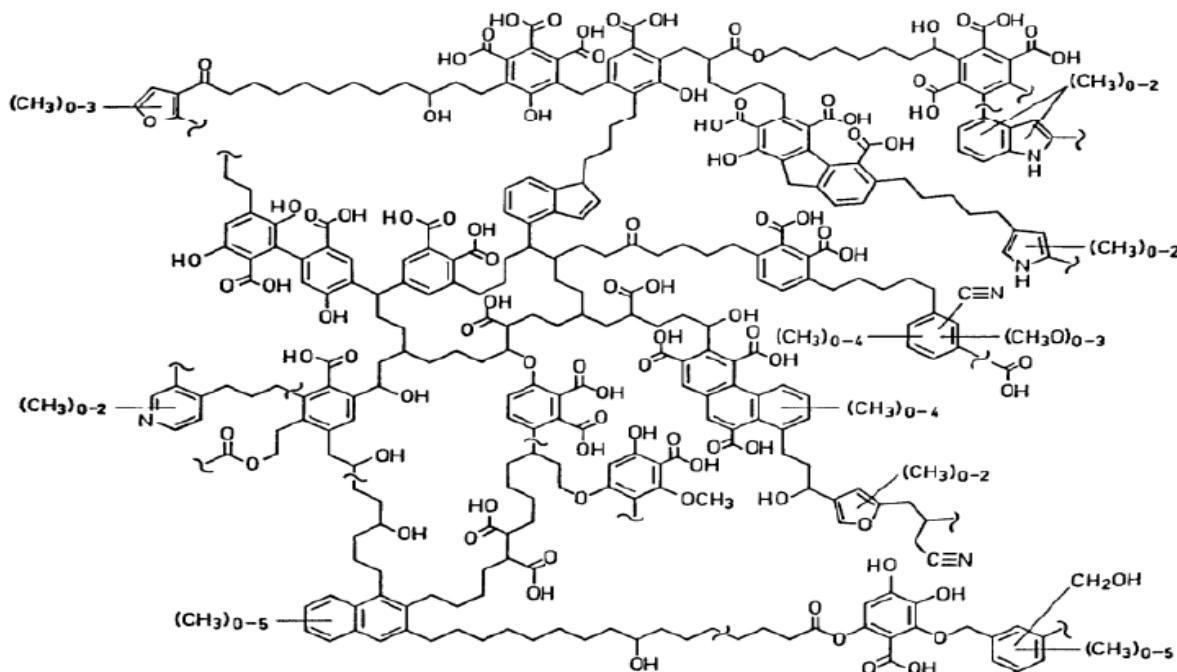


Figura 3. Estrutura bidimensional do ácido húmico elaborada por Schnitzer. Fonte: PINHEIRO, 2010.

A proeminência dos grupamentos funcionais carboxílicos e de OH-fenólicos exerce significativa responsabilidade na acidez dos ácidos húmicos. Essas moléculas apresentam saldo de carga negativo mesmo em pH ácido, por conta principalmente da ocorrência de dissociação de grupos carboxílicos ($pK < pH$ do solo). Sendo assim, a acidez total dos grupos funcionais encontrados nos ácidos húmicos é normalmente calculada pela soma dos grupamentos carboxílicos e fenólicos (SUTTON & SPOSITO, 2005; SPOSITO, 2008).

Segundo Baldotto & Baldotto (2014) dentre as fontes mais comuns para a extração de ácidos húmicos estão “a leonardita, o carvão, o solo, os resíduos de animais, os compostos orgânicos feitos de húmus de minhoca (vermicomposto), de torta de filtro, de esterco bovino, de cama-de-frango, de resíduos de alimentos, de lixo urbano, de lodo e de sedimentos”. Independente da fonte utilizada, é comum observar que concentrações menores de AH apresentam atividade estimulante na fisiologia vegetal, e que elevadas concentrações resultam em inibição do crescimento e desenvolvimento das plantas (BALDOTTO et al., 2009).

Devido à sensibilidade e alterações no sistema, relacionadas à concentração e às características químicas, os ácidos húmicos tem sido predominantemente escolhidos para avaliar a reatividade da matéria orgânica humificada no ambiente, através da qualidade e quantidade de grupos funcionais presentes em sua estrutura e pela capacidade de prover substâncias bioativas (PICCOLO, 2001; NARDI et al., 2002; CANELLAS et al., 2008).

O custo dos AH é considerado baixo, uma vez que são extraídos de compostos orgânicos e aplicados em baixas concentrações. Seu potencial de uso na conservação e manejo dos ecossistemas naturais e agrários é promissor, sendo necessários estudos que definam as concentrações a serem aplicadas, os métodos de aplicação e as propriedades a serem avaliadas para sua produção e comercialização (ARANCON et al., 2006; AMERI & TEHRANIFAR, 2012).

2.4 Bioatividade dos Ácidos Húmicos

Os ácidos húmicos possuem atividade biológica bastante complexa, apresentando diferentes efeitos sobre o metabolismo das plantas nos sistemas em que foram testados. Com a decomposição dos resíduos orgânicos não ocorre destruição total das substâncias bioativas, podendo ocorrer modificação destas, e formação de novas moléculas estabilizadas junto às substâncias húmicas. Notadamente, os AH alteram o desenvolvimento das plantas. Estas substâncias interferem indiretamente nas plantas pelos efeitos ocasionados no solo, e diretamente pelas alterações na arquitetura e no metabolismo vegetal (MUSCOLO et al., 2007; BALDOTTO & BALDOTTO, 2014).

No solo, os ácidos húmicos interferem no matiz e no croma, fazendo com que apresente coloração mais escura, o que auxilia na retenção de calor e favorece a germinação, o crescimento e a atividade microbiana. Atuam como agente cimentante formando complexos organo-minerais com argilas, aumentando a estabilidade dos agregados e favorecendo a aeração e manutenção da estrutura do solo. Possuem elevada capacidade de retenção de umidade, auxiliando na proteção contra a erosão e beneficiando as plantas pela liberação gradual de água. Ao ocorrer associação de AH com materiais minerais e sais solúveis, formam-se estruturas insolúveis, evitando a perda de nutrientes por lixiviação. Apresentam função tamponante em amplos intervalos de pH, ajudando a manter o equilíbrio da solução do solo. A degradação destas substâncias promove a liberação de íons e moléculas, fornecendo nutrientes para o crescimento das plantas. São responsáveis pelo incremento da capacidade de troca catiônica e aniónica, protegendo e disponibilizando os íons para as plantas. Além de exercerem função na formação de complexos com espécies metálicas e nutrientes presentes no solo, resultando na detoxificação de íons tóxicos e no aumento da mobilidade de íons (CANELLAS & SANTOS, 2005; SANTOS, 2014; FILHO & SILVA, 2017).

No corpo da planta, os ácidos húmicos exercem influência em níveis distintos de organização e em diversas etapas envolvidas na fisiologia vegetal, como expressão de genes, presença de organelas, metabolismo primário e secundário, crescimento e desenvolvimento, e produção de flores, frutos e sementes (TREVISAN, 2011; JANNIN et al., 2012). Segundo Nannipieri et al.(1993), os efeitos diretos dos AH sobre o metabolismo das plantas, que estimulam o crescimento e desenvolvimento vegetal, são resultados: da influência positiva sobre o transporte de íons, facilitando a absorção de nutrientes; do aumento da respiração e da velocidade das reações enzimáticas no ciclo de Krebs, aumentando a produção de ATP; do aumento do conteúdo de clorofila; do aumento da síntese de ácidos nucleicos; do efeito seletivo sobre a síntese proteica; e do estímulo ou inibição da atividade de diversas enzimas.

Em estudos realizados por Ali & Neumann (2009) e García et al. (2012, 2014) os autores demonstraram que após a aplicação de ácidos húmicos parece ocorrer um tipo de “estresse coloidal”, havendo aglomeração de fragmentos húmicos com estruturas mais flexíveis, depositando-se na superfície das raízes e causando entupimento dos poros, implicando assim em alterações metabólicas na planta. Foi demonstrado que este processo resulta na regulação dos níveis de EROs e na atividade de enzimas associadas ao metabolismo oxidativo.

Em consequência ao estresse ocasionado pela aglomeração das substâncias húmicas em raízes foram registrados aumento no desenvolvimento e crescimento radicular, e interpretados como um processo de adaptação ao estresse (FERNANDES, SOUZA & SANTOS, 2018). Petrov et al. (2015) afirmam que em determinadas situações alguns níveis de estresse podem resultar em melhorias nas funções metabólicas das plantas, fenômeno conhecido como “eustresse”.

Os efeitos mais observados dos AH nas plantas estão associados ao sistema radicular, através da formação de raízes laterais, adventícias e de pêlos radiculares, e promoção do alongamento da raiz. Estudos realizados por diversos autores demonstraram a expressão desses efeitos no desenvolvimento radicular pela aplicação de substâncias húmicas (SILVA et al., 2000; TREVISAN et al., 2009; CANELLAS et al., 2011; BALDOTTO et al., 2012; TAVARES, 2014; GARCÍA, 2016b; GARCÍA, 2018). Todas essas alterações na morfologia das raízes aumentam a massa e área de superfície radicular, melhorando a eficiência na absorção de água e nutrientes, além de favorecer a interação planta-microrganismo, devido ao aumento dos locais de ligação e infecção das raízes. Os mecanismos de atuação dos ácidos húmicos nas raízes ainda não foram totalmente esclarecidos (BALDOTTO & BALDOTTO, 2014).

A concepção do arranjo supraestrutural dos AH preconiza que compostos de reconhecida capacidade em regular e estimular o crescimento vegetal estejam unidos à supraestrutura (ROSA et al., 2009). Puglisi et. al (2008) observaram aumento na exsudação de ácido orgânico em plantas de milho submetidas à aplicação de substâncias húmicas. A liberação de prótons e ácidos orgânicos na rizosfera resultam em alteração de pH neste meio, possibilitando a dissociação das supraestruturas húmicas e subsequente disponibilização das frações bioativas, de outra forma indisponíveis (RUSSELL et al., 2006).

As propriedades que as substâncias húmicas apresentam são dependentes de suas estruturas, e possuem influência direta na atividade biológica que exercem em plantas (BERBARA & GARCÍA, 2014). Em trabalho realizado por García et al. (2016a) em plantas de arroz, os autores observaram, entre outros fatores, que as estruturas de AH contendo cadeias alifáticas não funcionalizadas, carbonilas e carboxilas, estão correlacionadas com o número e alongamento de raízes de menor diâmetro, enquanto estruturas aromáticas funcionalizadas e não-funcionalizadas e cadeias alifáticas funcionalizadas associaram-se ao alongamento de raízes de maior diâmetro.

García et al. (2012, 2014) mostraram que estruturas alifáticas e funcionalizadas com oxigênio em ácidos húmicos de vermicomposto parecem ser responsáveis pelos efeitos protetores em plantas de arroz submetidas a déficit hídrico. A melhoria na germinação de sementes de algumas espécies foi observada pela aplicação de substâncias húmicas com maior teor de fenólicos, hidroxilas e oxigênio (TRAVERSA et al., 2014).

Plantas de milho tiveram o crescimento radicular e atividade enzimática estimulados por fragmentos húmicos mais hidrofílicos e menos complexos (VACCARO et al., 2009). Já Canellas et al. (2012) constataram relação entre a hidrofobicidade dos ácidos húmicos com sua bioatividade. Uma correlação positiva foi observada entre a presença de grupamentos metoxi, cadeias aromáticas substituídas e carboxilas, com o efeito desencadeado em plantas (AGUIAR et al., 2013).

Autores como Trevisan et al. (2009) e Muscolo, Sidari & Nardi (2013) relataram a presença de auxinas na estrutura dos ácidos húmicos. Porém, os estímulos ao crescimento e desenvolvimento do sistema radicular, em resposta à aplicação de ácidos húmicos, não se devem somente aos efeitos hormonais.

Estudos apontam, quanto à atuação celular e molecular dos ácidos húmicos, para um estímulo da atividade e síntese de enzimas H^+ -ATPases (bombas de prótons) da membrana plasmática (MP), em um efeito semelhante ao auxínico (FAÇANHA et al., 2002; JINDO et al., 2012). Façanha et al. (2002) demonstraram que a aplicação de ácidos húmicos promoveu o desenvolvimento radicular e estimulou a atividade das bombas de prótons da MP em plantas.

A extrusão de prótons pelas H^+ ATPases membranares, gerando um gradiente eletroquímico entre o citosol e o apoplasto, está envolvida diretamente em dois mecanismos

essenciais para o desenvolvimento das plantas: a energização de sistemas secundários de transportes de íons, fundamental para absorção de nutrientes; e o aumento da plasticidade da parede celular, fator essencial para o processo de alongamento celular. Relacionado ao primeiro mecanismo, Nardi et al. (2002) constataram um incremento de mais de 89% no transporte de nitrato, quando comparado ao controle, em plantas tratadas com SH. O segundo mecanismo está relacionado com a teoria do crescimento ácido, que postula que a acidificação do apoplasto, através do bombeamento de prótons pelas H⁺-ATPases da membrana plasmática, ativa enzimas específicas que atuam sobre a parede celular, permitindo que ocorra o alongamento (RAYLE & CLELAND, 1992; FAÇANHA et al. 2002; SONDERGAARD, SCHULZA & PALMGREN, 2004).

Além dos efeitos dos AH nas raízes, pode-se destacar também efeitos positivos na parte aérea, como aumento no teor de nutrientes nas folhas, estímulo na biossíntese de clorofila e carotenóides, e incremento na presença de cloroplastos e no processo fotossintético. Esses fatores contribuem para o aumento da biomassa vegetal e produção de flores, de frutos e de sementes (MORA et al., 2010; JANNIN et al., 2012; BALDOTTO & BALDOTTO, 2014). Mora et al. (2010) trataram plantas de pepino com ácido húmico via radicular e verificaram alterações na distribuição de nitrato entre parte aérea e raiz. Os autores concluíram que o aumento da concentração deste ânion na parte aérea está relacionado com o aumento na concentração de citocininas e poliaminas, estimulando o crescimento.

Enzimas ligadas à assimilação do nitrogênio, como a nitrato redutase e glutamina sintetase, foram estimuladas por adição de AH em diferentes condições de cultivo. Após aplicação da SH houve diminuição pela metade no teor de carboidratos totais das folhas, em comparação com as plantas controle. Enquanto nas plantas aplicadas com essa substância houve redução nas taxas de glicose e frutose, também ocorreu aumento na concentração de amido (CANELLAS et al., 2013). Pizzeghello, Nicolini & Nardi (2001) observaram aumento na atividade da enzima invertase, favorecendo a formação de hexose a partir da hidrólise de sacarose, originando um substrato disponível para células em desenvolvimento.

A aplicação de diferentes doses de AH no sistema radicular de plantas de arroz sob déficit hídrico, demonstrou efeitos de proteção antiestresse, comprovando-se pela baixa atividade das peroxidases (POX), baixo níveis de peróxido de hidrogênio e de malondialdeído quando comparadas às plantas estressadas sem aplicação de AH. Os ácidos húmicos influenciam na atividade das enzimas POX e superoxidodismutase do sistema antioxidativo, regulando os níveis de EROS e os efeitos na peroxidação de lipídeos (GARCÍA, 2013).

As SH podem melhorar os efeitos negativos do estresse salino em plantas, estimulando o desenvolvimento de raízes, modificando a captação de minerais e reduzindo o tamanho da membrana plasmática. A aplicação de ácido húmico interferiu positivamente nos parâmetros de produção de plantas cultivadas em condições salinas (PARKSOY, TÜRKMEN & DURSUN, 2010).

Os sistemas endógenos de defesa das plantas podem ser reforçados pela aplicação de SH. Para lidar com os efeitos negativos dos metais pesados nas plantas diversos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos são mobilizados, visando eliminar espécies reativas de oxigênio (CANELLAS et al., 2015). Sergiev et al. (2013) constataram que após aplicação simultânea de AH e metais pesados, a atividade de enzimas envolvidas na eliminação oxidativa foi diminuída, quando comparado a plantas tratadas apenas com metal pesado.

É indiscutível a ocorrência de diversos efeitos positivos acarretados pelas SH, tanto no solo como nas plantas. Cada vez mais estudos têm sido realizados nesta área, visando compreender os mecanismos pelos quais os AH exercem sua bioatividade. A atividade biológica destas supramoléculas está diretamente associada à sua origem, tamanho molecular, composição, estrutura e concentração. É essencial uma melhor compreensão da relação entre

a bioatividade e as características físico-químicas dessas substâncias, para que assim haja uma aplicação efetiva e objetiva na produção e desenvolvimento agrícola.

2.5 Déficit Hídrico

As condições adequadas de crescimento vegetal podem ser descritas como aquelas que possibilitam que a planta atinja o máximo crescimento e potencial de reprodução, mensurados através da massa, altura e número de sementes, que em conjunto compõe a biomassa total da planta. O estresse vegetal pode ser definido como uma condição ambiental que impossibilite a planta de atingir seu máximo potencial genético (TAIZ et al., 2017).

Alguns outros autores caracterizam o estresse vegetal como um excesso de pressão resultante de algum fator adverso que apresente tendência de inibição na funcionalidade normal dos sistemas, ou ainda, como qualquer fator externo que influencie negativamente a planta, desencadeando respostas reversíveis ou irreversíveis nos diferentes níveis do organismo (LECHINOSKI et al., 2007; SALAMONI, 2008).

Os estresses abióticos correspondem as causas primárias de decréscimo na taxa de crescimento e produtividade das plantas. Os mais frequentes estresses desse tipo são ocasionados por seca, temperatura, salinidade, alagamento, poluição, toxidez por alumínio e radiação (LAWLOR & CORNIC, 2002). De acordo com Vellini et al. (2008), a disponibilidade de água é o fator ambiental que mais limita a sustentabilidade dos sistemas agrícolas, afetando cerca de 64% de toda região cultivável do planeta (CRAMER et al., 2011).

Aproximadamente 90% da massa de material verde vegetal é composta por água, sendo considerado o principal constituinte das plantas. Entre os diversos recursos que as plantas utilizam para o crescimento e funcionamento, o mais abundante e limitante para a produção agrícola é a água, uma vez que esta constitui a matriz e o meio onde ocorre a maior parte dos processos químicos necessários para a vida (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Segundo a teoria de Dixon (1894), existe uma coluna de água contínua que vai desde o sistema radicular até as folhas. Quando ocorre a transpiração vegetal a água, em forma de vapor, difunde das folhas para a atmosfera via estômatos, gerando uma tensão foliar (pressão hidrostática negativa) responsável por “puxar” a água das raízes pelo xilema, distribuindo-a para as demais partes da planta e resultando em absorção da água presente na rizosfera (TAIZ e ZIEIGER, 2009; SOUZA, 2014).

Em torno de 97% da água absorvida pelas espécies vegetais são perdidos para a atmosfera, principalmente por transpiração, 2% são direcionados para incremento de volume ou alongamento celular, e 1% para processos metabólicos, predominantemente para a fotossíntese (TAIZ et al., 2017). Durante o estresse hídrico ocorre maior direcionamento de energia para que a planta sobreviva do que para a produção. Após um primeiro período de instabilidade, ocorrem eventos de sinalização que estimulam processos de adaptação fisiológica (FERREIRA, 2017).

Segundo TAIZ et al. (2017) o déficit hídrico pode ocasionar transtornos fisiológicos e bioquímicos em plantas em nível primário e secundário. Os efeitos primários são a diminuição do potencial hídrico, desidratação celular e resistência hidráulica. Já os efeitos secundários, desencadeados por consequência dos efeitos primários, são redução da expansão celular e foliar, diminuição das atividades celulares e metabólicas, fechamento estomático, inibição fotossintética, abscisão foliar, alteração na partição de carbono, citorrise, cavitação, desestabilização de membranas e proteínas, produção de EROs, citotoxicidade iônica e morte celular.

Quando o déficit hídrico ocorre de forma leve, a queda na fotossíntese é resultado do aumento da resistência à difusão de CO₂ pelos estômatos e mesofilo. Já nos casos em que o

estresse é mais acentuado, a diminuição da taxa fotossintética passa a ser regulada pela eficácia dos cloroplastos em fixar CO₂ (GÁLMES et al., 2011; BATISTA, 2012).

Visando a redução da perda de água para atmosfera, as plantas desencadeiam algumas respostas para adaptação frente ao estresse hídrico, como redução na taxa de crescimento, diminuição no tamanho das folhas e senescência foliar. Em condições de déficit hídrico as plantas desenvolvem mecanismos fisiológicos como o ajuste osmótico, responsável por regular o acúmulo de soluto nos diferentes órgãos, sendo uma estratégia adaptativa do vegetal. A absorção e assimilação de nutrientes também é limitada pela disponibilidade de água no meio, o que também interfere de forma indireta no processo fotossintético (PIMENTEL, 2004; CHAVES et al., 2009; BATISTA, 2012).

A redução na disponibilidade de água para a planta afeta o transporte de nutrientes via xilema, e reduz a absorção de N e a taxa de CO₂ disponível para a fotossíntese, devido a relação de condutância estomática com a oferta de água no meio, resultando em alterações no metabolismo do carbono e do nitrogênio (SINGH e GHOSH, 2013).

Ainda segundo Pimentel (2004), as raízes das plantas atuam como um sensor primário, percebendo o estresse hídrico em razão da redução de disponibilidade de água, iniciando assim os processos de sinalizações que desencadeiam as respostas adaptativas. Na ocorrência de déficit hídrico, o sistema radicular das plantas pode sofrer modificações, reduzindo, aumentando ou mantendo o comprimento, a área e o volume (SOUZA, 2014).

O déficit hídrico é responsável pelo aprofundamento das raízes em busca de água, pela redução do índice de área foliar e, consequentemente, pela queda da captação de energia luminosa e produção de fotoassimilados. Potenciais hídricos menores resultam em redução na alocação de biomassa para as folhas, restringindo o desenvolvimento foliar (FERNANDES, 2005; MENESES, 2006).

De acordo com Ferreira (2017), o estímulo ao crescimento radicular em profundidade parece atuar como alternativa protetora ao estresse hídrico em plantas de arroz. Em estudo realizado por JI et al. (2012), foi observado que a variedade de arroz IRAT 109 em condições de deficiência hídrica durante 20 dias apresentou aumento no comprimento das raízes e nos valores de massa seca. Desta forma as plantas podem melhorar a capacidade de absorver água e, assim, diminuir as perdas de produtividade ocasionadas pelo déficit hídrico.

Diversos estudos vêm sendo realizados visando entender o comportamento e o efeito de algumas biomoléculas em plantas submetidas a estresse hídrico. Os ácidos húmicos e fúlvicos têm demonstrado capacidade de reduzir os efeitos negativos resultantes da baixa disponibilidade de água em diferentes espécies de plantas. A aplicação de SH em plantas submetidas a essas condições exerce influência no sistema de defesa oxidativo, nos teores de pigmentos fotossintéticos e nos teores de prolina (GARCÍA et al., 2012, 2014; AGUIAR et al., 2016).

Os efeitos de proteção das substâncias húmicas contra o estresse em plantas ocorrem por meio da regulação das enzimas do sistema oxidativo, responsáveis por balancear os níveis endógenos de EROs em folhas e raízes. As SH evitam que ocorra um acúmulo de espécies reativas de oxigênio ao ponto de desencadear peroxidação e desnaturação dos tecidos vegetais. As alterações nos níveis de EROs durante o estágio inicial de resposta ao estresse levam a fosforilação e desfosforilação de fatores de transcrição diferentes, podendo atuar como fator de sinalização para aclimatação frente ao estresse (TAIZ et al., 2017; FERNANDES, SOUZA & SANTOS, 2018).

3. CAPÍTULO I

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS DE DIFERENTES AMBIENTES DE FORMAÇÃO

3.1 RESUMO

Diversos processos químicos, físicos e espectroscópicos vêm sendo utilizados em estudos envolvendo substâncias húmicas, com intuito de estabelecer a composição e estrutura geral da molécula, assim como justificar as diversas propriedades que estas apresentam. A caracterização das substâncias húmicas também se faz importante para o estabelecimento de relações entre as características estruturais dessas supramoléculas com as funções que desencadeiam, tanto em solos quanto em plantas. Estas substâncias encontram-se vastamente distribuídas no mundo, sendo as maiores constituintes da matéria orgânica e classificadas em: ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) e huminas, apresentando complexa estrutura química e uma série de compostos heterogêneos. Sendo assim, este capítulo teve como objetivo estudar algumas características físico-químicas de ácidos húmicos extraídos de vermicomposto (AHVC), de horizonte superficial de Organossolo (AHSOLO) e de sedimentos do Rio Negro – AM (AHRN). Os AH foram obtidos seguindo a metodologia da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (SISH). Posteriormente, os AH foram dialisados com água deionizada utilizando membrana SPECTRA/POR® 7 dialysis tubing, 1 kD, até a condutividade eléctrica da água deionizada não apresentar valores superiores a 1 μS . Após este processo, foram congelados em freezer a -80°C e posteriormente liofilizados. A caracterização espectroscópica se deu por ressonância magnética nuclear do isótopo do ^{13}C em polarização cruzada e rotação no ângulo mágico (CP MAS ^{13}C -NMR), realizada no aparelho Bruker AVANCE II RMN a 400 MHz. Foi realizada a caracterização físico-química por espalhamento dinâmico de luz, onde os tamanhos hidrodinâmicos e o portencial zeta (ζ -potencial) foram determinados usando uma nanopartícula SZ-100 (HORIBA, Japão). O AHRN apresentou predomínio de carbonos alifáticos não substituídos e substituídos, elevada quantidade de carbonilas e quantidade relativamente abundante de estruturas aromáticas substituídas. O AHVC possui predomínio de carbonos alifáticos funcionalizados, assim como de carbono aromático ligado a oxigênio. O AHSOLO apresentou predomínio estrutural de carbonos alifáticos ligado a oxigênio e de carbonos aromáticos não-substituídos, além de apresentar uma elevada quantidade relativa de carboxilas. Os resultados obtidos sobre as características estruturais dos AH revelam que o AHSOLO é mais aromático e mais hidrofóbico que os AHRN e AHVC, apresentando elevado grau de recalcitrância. O AHRN também possui uma elevada quantidade de estruturas recalcitrantes, porém com predomínio de carbonos alifáticos não funcionalizados. Já o AHVC é o mais polar, explicado pela elevada funcionalização dos carbonos alifáticos e aromáticos. Devido as diferentes características estruturais e propriedades dos AH, suas partículas se comportaram de maneira distinta em solução, sendo que o AHSOLO e AHRN apresentaram maiores populações de partículas do que o AHVC, a pH 7,0 na faixa de tamanho entre 0 e 500 nm. O diâmetro médio das partículas a pH=7 demonstra que o AHVC apresentou partículas de maior tamanho em comparação aos outros dois.

Palavras-chave: Substâncias húmicas. Ressonância magnética nuclear. Espalhamento dinâmico de luz.

3.2 ABSTRACT

Several chemical, physical and spectroscopic processes have been used in studies involving humic substances, in order to establish the composition and general structure of the molecule, as well as justify the various properties they present. The characterization of humic substances is also important for the establishment of relationships between the structural characteristics of these supramolecules with the functions they trigger in both soils and plants. These substances are widely distributed in the world, being the largest constituents of organic matter and classified into: humic acids (HA), fulvic acids (FA) and humines, presenting complex chemical structure and a series of heterogeneous compounds. Therefore, the objective of this chapter was to study some physico-chemical characteristics of humic acids extracted from vermicompost (HAVC), surface horizon of a Histosol (HASOIL) and Rio Negro - AM sediments (HARN). The HA were obtained following the methodology of the International Humic Substances Society (SISH). Subsequently, the HA were dialysed with deionized water using SPECTRA / POR® 7 dialysis tubing membrane, 1 kD, until the electrical conductivity of the deionized water did not show values greater than 1 μ S. After this process, they were frozen in freezer at -80 °C and then lyophilized. The spectroscopic characterization was by nuclear magnetic resonance of the ^{13}C isotope in cross polarization and rotation in the magical angle (CP MAS ^{13}C -NMR), realized in Bruker AVANCE II NMR apparatus at 400 MHz. The physicochemical characterization was performed by dynamic light scattering, where hydrodynamic sizes and zeta (ζ -potential) were determined using a SZ-100 nanoPartica (HORIBA, Japan). HARN has a predominance of unsubstituted and substituted aliphatic carbons, high amount of carbonyls and relatively abundant amount of substituted aromatic structures. The HAVC has a predominance of functionalized aliphatic carbons, as well as aromatic carbon bound to oxygen. HASOIL exhibits structural predominance of aliphatic carbons bound to oxygen and unsubstituted aromatic carbons, in addition to having a high relative amount of carboxylates. The results obtained on the structural characteristics of HA reveal that the HASOIL is more aromatic and more hydrophobic than the HARN and HAVC, presenting a high degree of recalcitrance. HARN also has a high amount of recalcitrant structures, but with predominance of nonfunctionalized aliphatic carbons. HAVC is the most polar, explained by the high functionalization of the aliphatic and aromatic carbons. Due to the different structural characteristics and properties of HA, its particles behaved differently in solution, with HASOIL and HARN having higher particle populations than HAVC, at pH 7.0 in the size range between 0 and 500 nm. The mean diameter of the particles at pH = 7 shows that the HAVC showed larger particles compared to the other two.

Keywords: Humic substances. Nuclear magnetic resonance. Dynamic Light Scattering.

3.3 INTRODUÇÃO

A matéria orgânica do solo possui fundamentalmente dois grupos, o das substâncias não-húmicas e o das substâncias húmicas (SH). As SH constituem aproximadamente 60% da matéria orgânica e estão amplamente distribuídas no planeta, estando presentes no solo, na água e nos sedimentos, representando o maior reservatório de carbono orgânico da Terra (MUSCOLO et al., 2007; MUSCOLO & SIDARI, 2009).

Segundo Baldotto & Baldotto (2014), as fontes mais utilizadas para a extração de substâncias húmicas são “a leonardita, o carvão, o solo, os sedimentos, os resíduos de animais e os compostos orgânicos feitos de húmus de minhoca (vermicomposto), de torta de filtro, de esterco bovino, de cama-de-frango, de resíduos de alimentos, de lixo urbano e de lodo”.

As substâncias húmicas, devido sua organização estrutural, são caracterizadas como supramoléculas, apresentando estruturas hidrofóbicas e hidrofílicas. Se entende que o arranjo estrutural supramolecular destas substâncias é o resultado da organização desuniforme de moléculas heterogêneas, que interagem de acordo com seu tamanho, forma, afinidade química e hidrofobicidade (GARCÍA, 2013).

Os principais componentes moleculares das substâncias húmicas são os ácidos alifáticos, os éteres, os ésteres, os álcoois, os anéis aromáticos, os polissacarídeos e os polipeptídeos. Embora as ações funcionais dessas substâncias sofram influência direta pela configuração química que apresentam em solução, as relações entre atividade e estrutura não são totalmente claras (MORA et al., 2010; CANELLAS et al., 2012).

Diversos processos químicos, físicos e espectroscópicos aplicados com êxito em pesquisas envolvendo macromoléculas têm sido utilizados para estudos com substâncias húmicas, objetivando estabelecer a estrutura e composição geral da molécula, assim como justificar as diversas propriedades que elas apresentam. Os estudos dessas substâncias vão desde os métodos de extração, fracionamento e purificação até a caracterização. Os métodos de extração mais utilizados são Kononova, Dabin, Danneberg & Ullah, Schnitzer, Swift, Benites, e os de purificação são os com ácido fluorídrico (HF), resina DAX-8, diálise e liofilização (PRIMO, MENEZES & SILVA, 2011; CANELLAS et al., 2012). Segundo García (2013) dentre as técnicas de caracterização estruturais mais utilizadas estão: as espectrofotométricas (UV-vis e Fluorescência), as espectroscópicas (FTIR, RMN¹³C e ¹H), as espectrométricas (espectrometria de massas), as cromatográficas (HPSEC) e as microscópicas (MEV), assim como as diferentes combinações destas.

Desde o último século a matéria orgânica humificada vêm sendo utilizada na agricultura, porém apenas nas últimas décadas houve maior atenção para entender os mecanismos pelos quais atuam, sendo necessário o desenvolvimento de técnicas produtivas capazes de regular a atividade dessas substâncias conforme o desejado. Identificar e determinar as estruturas das SH é indispensável para o desenvolvimento de recursos que possam ser implementados no desenvolvimento agrícola (MORA et al., 2012; CANELLAS et al., 2012; AGUIAR et al., 2013).

É de suma importância a caracterização estrutural das substâncias húmicas, dentre outros fatores, para o maior esclarecimento da relação entre as suas características físico-químicas e ação que desencadeam. Desta maneira, o objetivo deste capítulo foi extrair e caracterizar ácidos húmico provenientes de diferentes ambientes de formação, oriundos de vermicomposto (AHVC), Organossolo (AHSOLO) e sedimentos do Rio Negro – AM (AHRN).

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Material de partida para obtenção das substâncias húmicas

As frações húmicas utilizadas no estudo foram obtidas a partir de vermicomposto (AHVC), sedimentos do Rio Negro (AHRN) e material do horizonte superficial de um Organossolo (AHSOLO). O AHVC foi obtido a partir de vermicomposto de esterco bovino processado por minhocas vermelhas africanas (*Eudrilus eugena*e spp.) durante aproximadamente 90 dias, na Fazendinha Agroecológica do km 47, Seropédica-RJ. O AHRN foi obtido a partir de sedimentos orgânicos coletados de uma estação de tratamento de água do Rio Negro – AM. O AHSOLO foi extraído de um Organossolo situado no bairro de Santa Cruz – RJ.

3.4.2 Fracionamento e purificação das substâncias húmicas

Os AH foram obtidos seguindo a metodologia da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (SISH) e de acordo com o protocolo metodológico descrito por Swift (1996). Resumidamente, para a obtenção das frações húmicas a partir dos materiais de origem, após pré-tratamento com HCl, uma dissolução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ foi adicionada à uma massa do material em proporções de 10:1 (v:m) sob atmosfera de N₂ e em agitação por 24 h. Em seguida o material foi centrifugado a 10.000 g durante 30 minutos e recolhido o sobrenadante que contém as frações de substâncias húmicas correspondentes aos ácidos húmicos e aos ácidos fúlvicos. Para a separação por precipitação do AH, a um volume de SH (AF+AH) obtida no passo anterior, lhe foi ajustado o pH até 2,0 mediante gotejamento de uma dissolução de HCl (6 mol. L⁻¹) e mantido em repouso durante 16 horas, após este período o material foi centrifugado a 5.000 g por 10 min e o sobrenadante foi sifonado, este processo foi repetido por três vezes. Para remover os sólidos solúveis em suspensão, os AH foram redissolvidos em uma dissolução de KOH (0,1 mol. L⁻¹) e adicionado KCl até atingir-se uma concentração de 0,3 mol. L⁻¹ de K⁺, e em seguida centrifugado a 4.000 g durante 15 min (Figura 4).

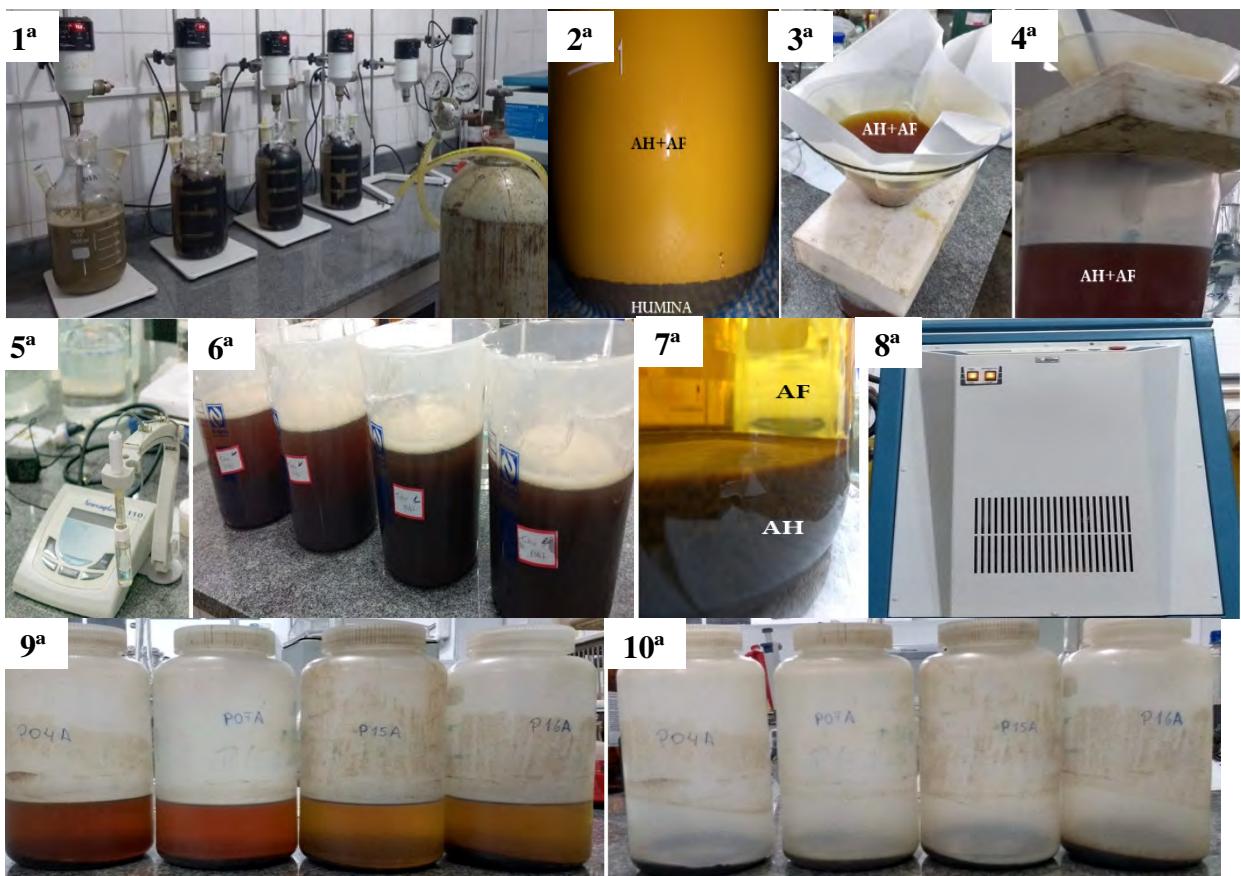


Figura 4. Etapas de extração dos ácidos húmicos utilizando KOH.

Posteriormente, a purificação foi realizada mediante adição aos AH de uma dissolução de HF (0,3 mol. L⁻¹) + HCl (0,1 mol. L⁻¹) e agitação por 24 horas a 5.000 g, este processo foi repetido até atingir um conteúdo de cinzas menor que 1% (Schnitzer, 1982). Em seguida, os AH foram dialisados utilizando água deionizada usando membrana SPECTRA/POR® 7 dialysis tubing, 1 kD, até a condutividade eléctrica da água deionizada não apresentar valores superiores a 1 μ S. Após este processo, os AH foram congelados em freezer a -80 °C e posteriormente liofilizados (Figura 5).

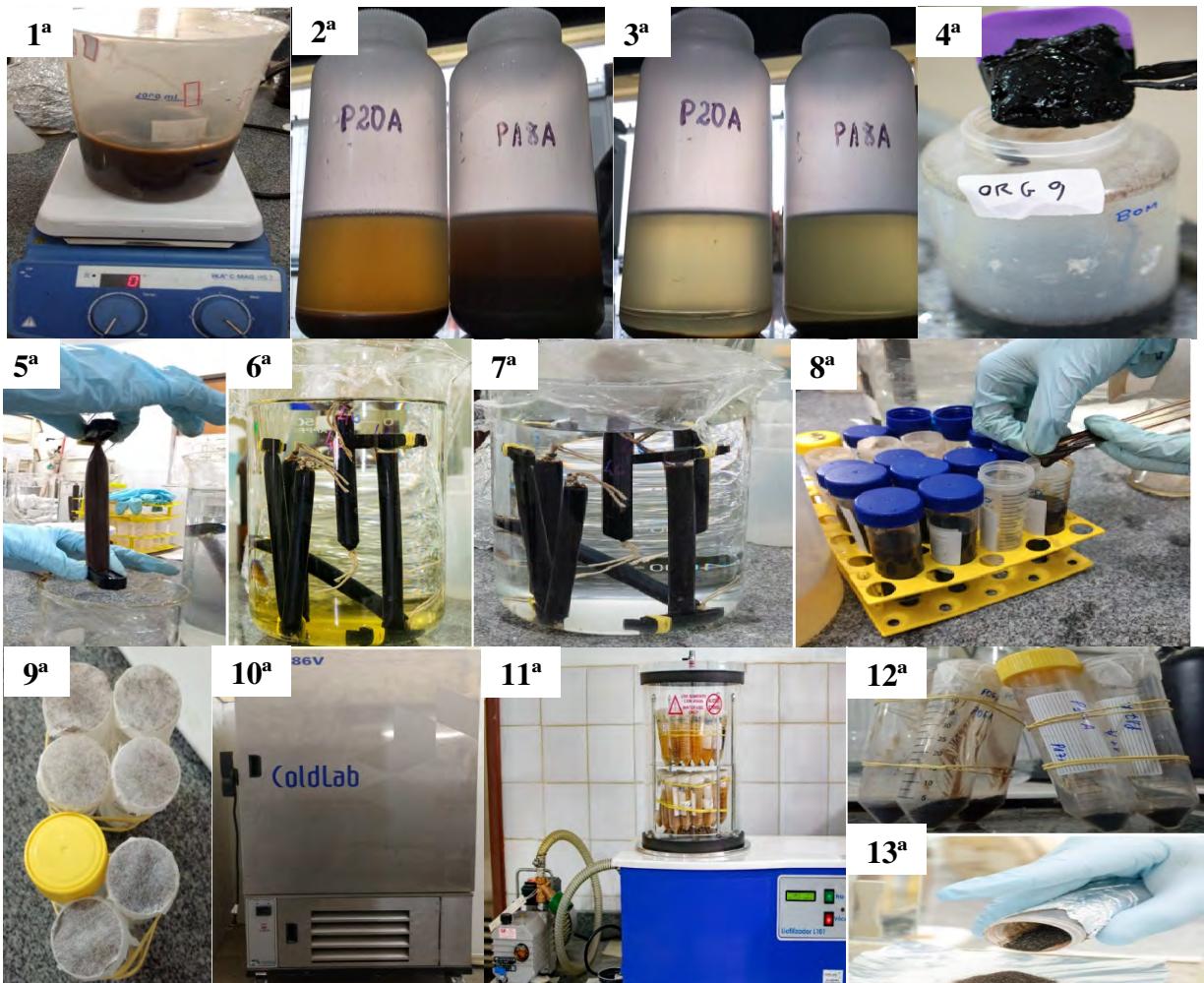


Figura 5. Etapas de purificação dos ácidos húmicos.

3.4.3 Caracterização espectroscópica por ressonância magnética nuclear em estado sólido do isótopo do ^{13}C em polarização cruzada e rotação no ângulo mágico (CP MAS ^{13}C -NMR)

As substâncias húmicas foram caracterizadas pela espectroscopia por ressonância magnética nuclear do isótopo do ^{13}C em polarização cruzada e rotação no ângulo mágico (CP MAS ^{13}C -NMR), realizada no aparelho Bruker AVANCE II RMN a 400 MHz, equipado com probe de 4 mm Narrow MAS e operando em sequência de ressonância de ^{13}C a 100.163 MHz. Para a obtenção dos espectros, as amostras dos materiais humificados foram colocadas em um rotor (porta-amostra) de Dióxido de zircônio (ZrO_2) com tampas de Kel-F sendo a frequência de giro de 8 ± 1 kHz. Os espectros foram obtidos pela coleta de 2048 data points para o mesmo número de scans a um tempo de aquisição de 34 ms e com recycle delay de 5s. O tempo de contato para a sequência em rampa de 1H ramp foi de 2 ms. A coleta e elaboração espectral foram realizadas utilizando o Software Bruker Topspin 2.1. Os decaimentos livres de indução (DLI) foram transformados aplicando um zero filling igual a 4 k e posteriormente um ajuste por função exponencial (line broadening) de 70 Hz.

As regiões dos espectros foram integradas para a obtenção da quantidade relativa de estruturas, assim as regiões foram divididas em: alquil – C (CAlq-H,R): 0–46 ppm; metoxilas e N–alquil C (CAlq-O,N): 46–59 ppm; O–alquil C (CAlq-O): 59–91 ppm; di–O–alquil C

(carbono anoméricos) (CAlq-di-O): 91–110 ppm; carbono aromático (CAr-H,R): 110–142 ppm; O-aromatico C (CAr-O): 142–156 ppm; carboxila C (CCOO-H,R): 156–186 ppm e carbonilas C (CC=O): 186–230 ppm.

A aromaticidade foi calculada segundo a fórmula: (CAr-H,R) + (CAr-O) *100/ área total, assim a alifaticidade foi calculada como: 100-Aromaticidade (%). O índice de hidrofobicidade (HB/HI) foi calculado como segue: (0 ppm-46 ppm) + (110 ppm-156 ppm) / (46 ppm-110 ppm) + (156 ppm-186 ppm). Para o índice de polaridade foi utilizada a formula a seguir: (CCOO-H,R) + (CC=O) + (CAlq-O,N) / (CAr-H,R) + (CAlq-H,R). O trabalho com os espectros foi realizado utilizando o Software ACD/Labs v.12.01.

3.4.4 Caracterização físico-química por espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Os tamanhos hidrodinâmicos e o potencial zeta (ζ -potencial) foram determinados usando uma nanopartícula SZ-100 (HORIBA, Japão). Para avaliar o efeito do pH nos tamanhos hidrodinâmicos e ζ -potencial dos ácidos húmicos, as amostras foram preparadas em água e ajustadas para diferentes valores de pH (2,0 - 9,0), com uma concentração de ácido húmico de 2 mg.mL^{-1} . Os valores de pH foram ajustados usando soluções de HCl e NaOH (0,01 M).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Características estruturais dos ácidos húmicos isolados de vermicomposto, solo orgânico e sedimentos do Rio Negro mediante ^{13}C NMR-CP/MAS

A Figura 6 mostra os espectros ^{13}C NMR em estado sólido dos ácidos húmicos obtidos a partir de diferentes materiais de origem: sedimentos do Rio Negro -AM, vermicomposto e Organossolo. De maneira geral os AH apresentam semelhança estrutural em termos de presença de fragmentos registrados nas diferentes regiões dos espectros. A assinatura espectral mostra a presença de carbonos alifáticos funcionalizados e não funcionalizados na região entre 0-110 ppm. Os carbonos aromáticos aparecem na região entre 110-156 ppm. Os carbonos carboxílicos foram registrados na região entre 156-186 ppm e os carbonos carbonílicos na região de 186-230 ppm.

Os picos presentes em ~ 26 ppm e ~ 39 ppm, corresponde à presença de carbonos metilas $-\text{CH}_3$ ($^{*}\text{CH}_3-\text{R}$, $\text{R}=\text{alquil}$) e metilenos $-\text{CH}_2$ ($\text{R}-^{*}\text{CH}_2-\text{R}'$, $\text{R}, \text{R}'=\text{alquil}$) respetivamente. Os três AH registraram picos em ~ 52 ppm, que são característicos de carbonos metoxila $-\text{CH}_3-\text{O}$ ($^{*}\text{CH}_3-\text{O}-\text{R}$, $\text{R}=\text{alquil}$). Os picos em volta de ~ 78 ppm pertencem a carbonos CH_2 ($\text{R}-^{*}\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{R}=\text{monossacarídeo}$) e os picos em ~ 114 ppm correspondem a carbonos anoméricos de unidades de monossacarídeo. Os picos entorno de ~ 124 ppm pertencem a carbonos de anéis aromáticos com baixa funcionalização (fenil- R , $\text{R}=\text{H}$) e os picos entorno a 149 ppm corresponde com carbonos aromáticos funcionalizados. Picos em ~ 167 - 170 ppm são atribuídos a COO ($\text{RO}-^{*}\text{CO}-\text{R}'$, $\text{R}=\text{H}$ e $\text{R}'=\text{arilo}$) e em ~ 204 ppm a C=O ($\text{R}-^{*}\text{CO}-\text{R}'$, $\text{R}'=\text{alquil}$) (Figura 6).

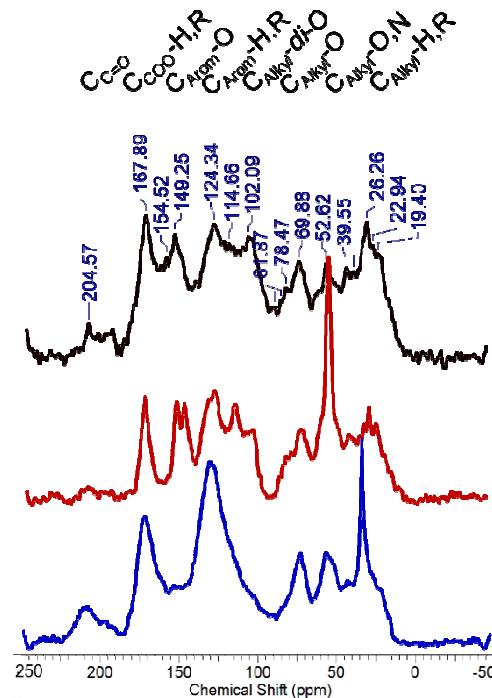


Figura 6. Espectros ^{13}C NMR CP MAS de ácidos húmicos obtidos de sedimentos do Rio Negro - AM (AHRN: linha preta), vermicomposto (AHVC: linha vermelha) e Organossolo (AHSOLO: linha azul).

O AH de origem aquática, extraído de sedimentos do Rio Negro (AHRN), apresenta predomínio de estruturas $C_{Alquil\text{-}}(H,R)$ (20%): carbonos alifáticos não substituídos, $C_{Alquil\text{-}}O$: metoxilas e $C_{Alquil\text{-}}di\text{-}O$: carbonos anoméricos de carboidratos. Todas estas estruturas em seu conjunto podem ser provenientes de lipídeos de plantas, tecidos lenhosos e biopoliesteres, assim como de estruturas lignínicas e carboidratos. O AHRN também apresenta elevada quantidade de carbonos carbonílicos ($C=O$) e quantidade relativamente abundante de estruturas $C_{Aromático\text{-}}O$: carbono aromático ligado a oxigênio (Tabela 2 e Figura 7).

O AH extraído a partir de vermicomposto (AHVC) possui predomínio de estruturas $C_{Alquil\text{-}}(O,N)$ e $C_{Alquil\text{-}}di\text{-}O$: carbonos alifáticos funcionalizados pertencentes a lipídeos, estruturas proteicas e carbonos anoméricos de carboidratos. A estrutura também possui predomínio de $C_{Aromático\text{-}}O$: carbono aromático ligado a oxigênio proveniente de estruturas lignínicas (Tabela 2 e Figura 7).

O AH extraído de solo orgânico (AHSOLO) apresenta predomínio estrutural de $C_{Alquil\text{-}}O$: metoxilas pertencentes a estruturas de lignina. São predominantes também as estruturas $C_{Aromático\text{-}}(H,R)$: carbono aromático não substituído pertencentes também a estruturas de lignina. Este AH apresenta também uma elevada quantidade relativa de carbonos carboxílicos (-COOH) (Tabela 2 e Figura 7).

Tabela 2. Distribuição relativa de tipos de carbono (%) nos espectros ^{13}C NMR CP MAS em função da área total.

	$C_{Alk\text{-}}H,R$	$C_{Alk\text{-}}O,N$	$C_{Alk\text{-}}O$	$C_{Alk\text{-}}di\text{-}O$	$C_{Ar\text{-}}H,R$	$C_{Ar\text{-}}O$	$C_{coo\text{-}}H,R$	$C_{C=O}$
	0-46	46-59	59-91	91-110	110-142	142-156	156-186	186-230
----- % -----								
AHRN	20,00	9,00	11,00	13,00	20,00	10,00	13,00	4,00
AHVC	18,18	19,19	10,10	13,13	17,17	12,12	8,08	2,02
AHSOLO	18,69	12,15	11,21	6,54	28,04	5,61	16,82	0,93
----- AHRN AHVC AHSOLO -----								
Aromat.	30,00	29,29	33,64					
Alifat.	70,00	70,71	66,36					
IP	0,65	0,83	0,62					
HB/HF	0,66	0,54	0,87					

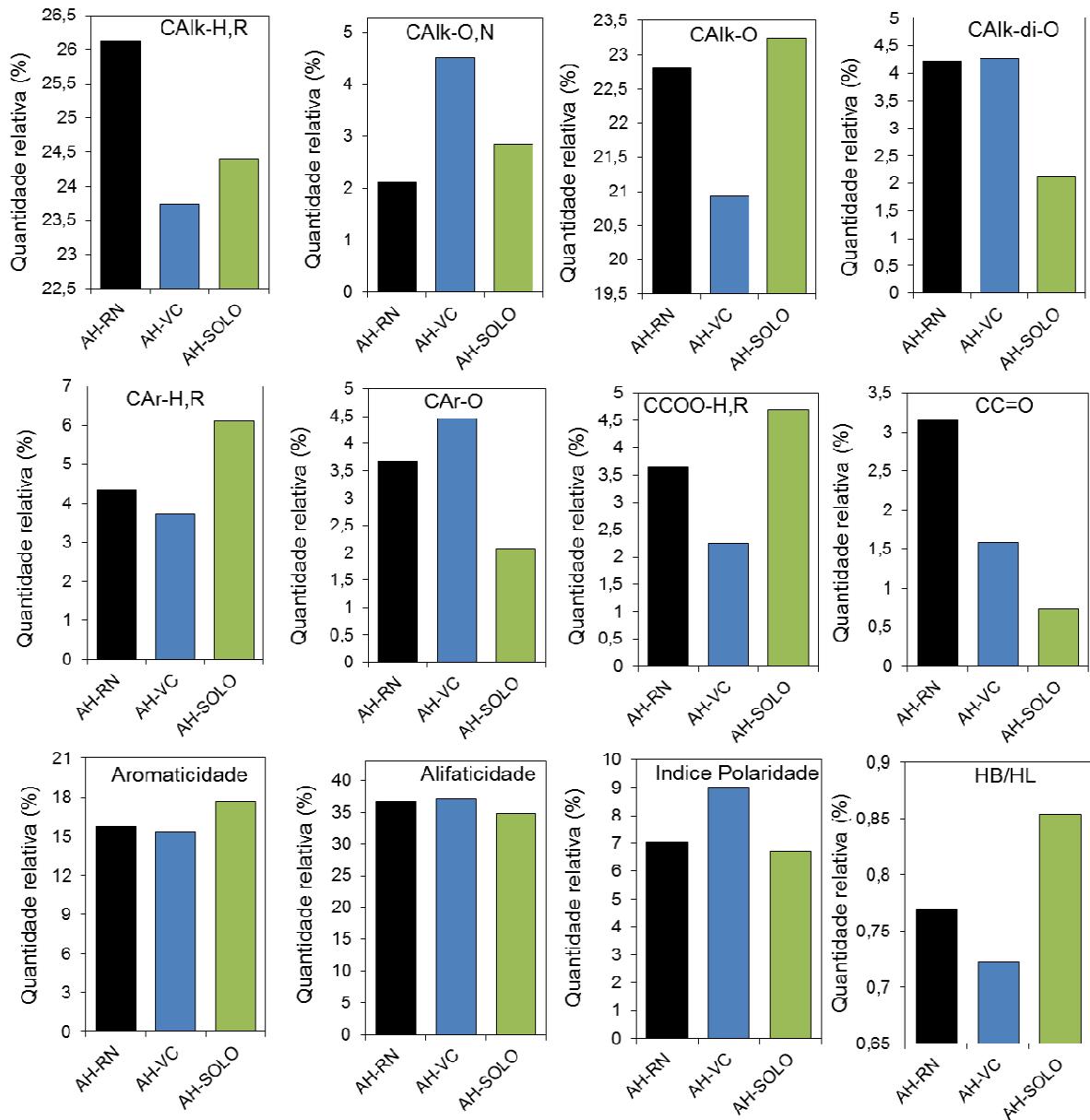


Figura 7. Quantidade relativa de estruturas e grau de propriedade obtidos a partir dos espectros de ^{13}C NMR CP/MAS dos ácidos húmicos de diferentes ambientes de formação. *HB/HL = Índice de hidrofobicidade.

A espectroscopia de ^{13}C NMR CP/MAS permitiu observar que na formação dos AHRN e AHVC há uma elevada contribuição de material lignínico e de carboidratos, enquanto, no AHSOLO houve preservação de estruturas com características fundamentalmente lignínicas.

A ordem de aromaticidade comparada entre os AH resultou em: AHSOLO>AHRN>AHVC, sendo grande responsável pela ordem no índice de hidrofobicidade: AHSOLO>AHRN>AHVC. Isto pode se justificar pelo carácter aromático predominante em AHSOLO, como resultado da preservação de fragmento de lignina durante o processo de humificação. Por outro lado, o AHVC apresentou um índice de polaridade superior aos outros, seguido pelo AHRN. O predomínio de carbonos alifáticos e aromáticos

funcionalizados na estrutura contribuiu para um rearranjo estrutural que gera uma propriedade de maior polaridade nos AHVC.

Por mais que a quantidade relativa de cada estrutura encontrada nos ácidos húmicos extraídos de sedimentos do Rio Negro – AM, de vermicomposto e de Organossolo, sejam diferentes, o padrão estrutural proposto pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (SISH) foi preservado. A SISH demonstra que ácidos húmicos de diversas fontes de origem apresentam predomínio de estruturas com cadeias aromáticas e alifáticas, substituídas e não substituídas, além de carboxilas, condizendo com os picos espectrais observados pela técnica de ressonância magnética nuclear utilizada nos três tipos de ácidos húmicos avaliados neste capítulo.

3.5.2 Características físico-químicas dos diferentes ácidos húmicos pela dinâmica das partículas em solução (Dynamic Light Scattering -DLS)

A Figura 8 mostra as características químico-físicas dos diferentes AH, o que explica a sua dinâmica em solução. O comportamento da variação do potencial zeta (ζ) dos três AH em função dos valores de pH foi semelhante (Figura 8A). O potencial ζ é uma medida da estabilidade dos sistemas coloidais e depende da geração de carga superficial das partículas coloidais (HUNTER, 1988), nos AH esta geração de carga superficial é uma consequência da presença de grupamentos funcionalizados com carga relativa negativa e depende da disposição destes grupos funcionais para a superfície.

Neste sentido, o comportamento semelhante dos AH mostra que em valores de pH entre 6-7, o sistema é estável (sem mudanças na distribuição de partículas dissolvidas), no entanto o ponto de inflexão a pH=5 indica que neste valor acontecem mudanças estruturais nas supramoléculas, presumivelmente, o aumento da concentração de H^+ pode protonar grupos mais superficiais e perturbar as características coloidais do sistema. Em valores de pH=4, o sistema alcança a sua maior estabilidade, onde o AHVC apresentou a maior estabilidade seguido pelo AHRN e AHSOLO, respectivamente. Valores mais negativos de ζ indicam que na solução as forças de repulsão das partículas são elevadas superando a agregação e, portanto, o sistema possui partículas dissolvidas. O potencial ζ foi menor em valores de pH<4 e, portanto, as partículas experimentam uma tendência à floculação e aglomeração, este resultado é lógico tendo em conta que os AH precipitam em solução a partir destes valores de pH (Figura 8A).

A Figura 8B mostra a população de partículas com diâmetro hidrodinâmico entre 0 e 500 nm em solução com valor de pH=7. O AHSOLO e AHRN possuem as maiores populações de partículas com tamanho até 500 nm a pH=7, enquanto os AHVC possuem a menor população. No entanto, o diâmetro médio das partículas a pH=7 indica que o AHVC apresenta as partículas de maior tamanho enquanto os AHSOLO possuem partículas de menores diâmetros (Figura 8C).

As características químicas e físicas dos AH em solução são o resultado das suas estruturas. A maior estabilidade dos AHVC em solução pode ser o resultado da maior quantidade de estruturas funcionalizadas, que geram propriedades acentuadas de maior polaridade e menor hidrofobicidade. Contrariamente, o AHSOLO que possui propriedades hidrofóbicas e apolares mais acentuadas, podem apresentar em solução seus fragmentos termodinamicamente mais repelidos pela água e, por tanto, maior possibilidade à agregação. Isto foi registado na elevada população de partículas mostradas a pH=7, assim, as interações hidrofóbicas que regem estas agregações parecem produzir partículas de menor tamanho, porém abundantes em quantidade, de maneira geral.

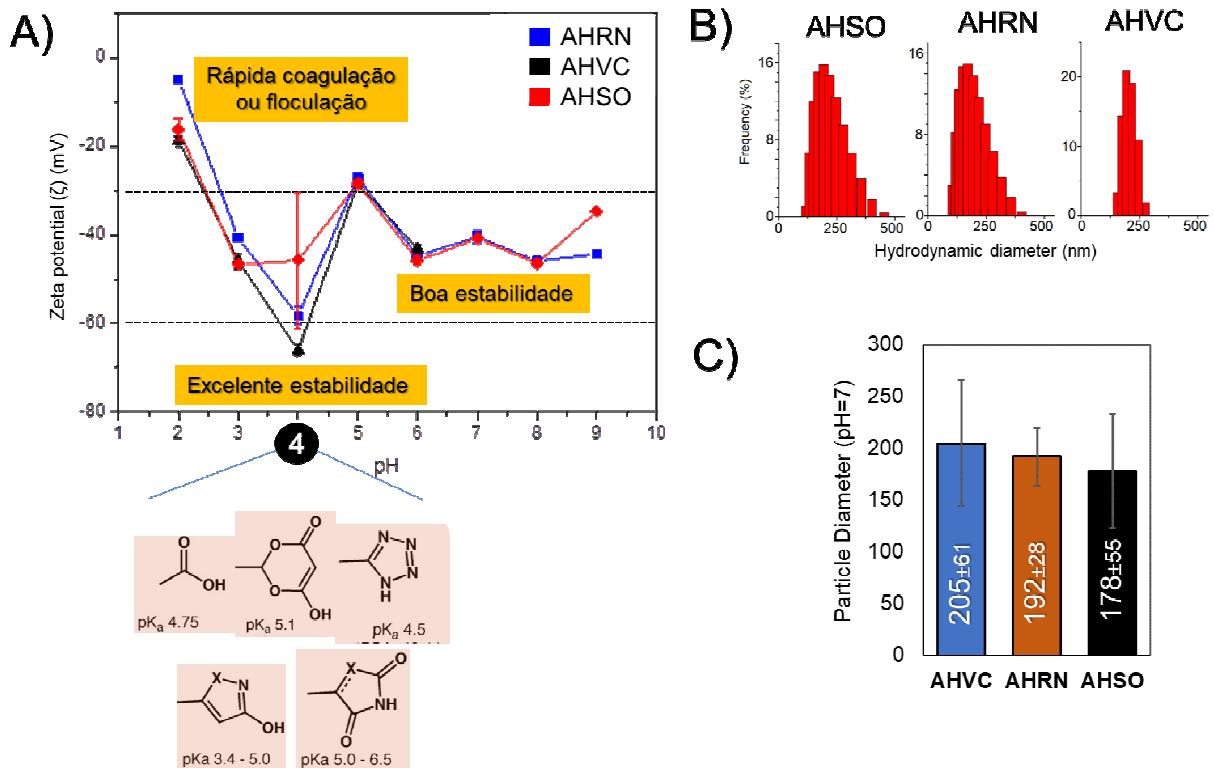


Figura 8. Determinações por espalhamento dinâmico de luz (DLS) realizadas nos diferentes tipos de ácidos húmicos. A) Potencial zeta (ζ) dos três ácidos húmicos em solução aquosa em função do valor de pH. B) População de partículas com diâmetro hidrodinâmico entre 0 - 500 nm em uma solução aquosa a valores de pH=7. C) Diâmetro médio das partículas em solução aquosa a valores de pH=7.

3.6 CONCLUSÕES

O AH extraído de solo orgânico é mais aromático do que os AH extraídos de sedimento do Rio Negro e de vermicomposto, conferindo-o maior hidrofobicidade. O AH de vermicomposto é o mais polar e menos hidrofóbico. O AHSOLO foi formado por estruturas predominantemente provenientes de fragmentos de lignina enquanto os AHRN e AHVC possuem, além da lignina, contribuição de fragmentos de carboidratos.

Em valores de pH da solução situados entre 6-7, o sistema não apresenta mudanças na distribuição de partículas dissolvidas. O AHSOLO e AHRN apresentaram as maiores populações de partículas a pH 7,0 na faixa de tamanho avaliada, em relação ao ácido húmico proveniente de vermicomposto. O diâmetro médio das partículas a pH=7 demonstra que o AHVC apresentou partículas de maior tamanho em comparação aos demais.

4.CAPÍTULO II

RELAÇÃO ESTRUTURA-PROPRIEDADE-FUNÇÃO DE ÁCIDOS HÚMICOS DE DIFERENTES ORIGENS EM PLANTAS DE ARROZ (*ORYZA SATIVA L.*)

4.1 RESUMO

É reconhecida na literatura a influência das substâncias húmicas no desenvolvimento vegetal, seja de forma direta pelos efeitos desencadeados na arquitetura e no metabolismo vegetal, ou indiretamente pelas melhorias no solo. Os efeitos mais observados e estudados dos ácidos húmicos nos últimos anos estão principalmente correlacionados ao sistema radicular das plantas, porém também foram registrados por alguns autores modificações nos teores de pigmentos fotossintéticos, na produção de biomassa, no metabolismo de nitrogênio e na fotossíntese de espécies submetidas a aplicação dessas substâncias. A bioatividade destas supramoléculas está diretamente associada à sua origem, composição, estrutura, tamanho molecular e concentração, portanto a caracterização das substâncias húmicas é um processo de suma importância para o entendimento das diferentes funções e propriedades destes compostos. Neste contexto, o objetivo deste capítulo foi avaliar os efeitos de AH extraídos de diferentes fontes de origem: Organossolo (AHSOLO), vermicomposto (AHVC) e sedimento do Rio Negro-AM (AHRN) na morfologia, crescimento e metabolismo de plantas de arroz, além de se obter um maior entendimento entre a relação da atividade biológica dessas substâncias com suas estruturas e propriedades físico-químicas. A espécie utilizada no estudo foi o arroz (*Oryza sativa* L.) da variedade BRS Esmeralda, cultivado em câmara de crescimento localizada no Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Visando estabelecer a concentração a ser aplicada dos diferentes AH foram testadas doses crescentes (0, 2, 5, 10, 30 e 50 mg de AH.L⁻¹), e avaliada qual resultou no maior estímulo ao desenvolvimento das plantas, sendo 5 mg.L⁻¹ para o AHVC, 2 mg.L⁻¹ para o AHSOLO e 30 mg.L⁻¹ AHRN. As plantas de arroz foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland a ½ força iônica e N-NO₃⁻ a 2 mM, com pH ajustado a 5,6. Doze dias após o transplantio se iniciou a aplicação dos ácidos húmicos, após nove dias de tratamento as plantas foram coletadas. Foram adotados quatro tratamento (Controle; AHVC; AHSOLO; AHRN) e vinte repetições, em um delineamento experimental inteiramente casualizado. As análises estatísticas foram realizadas no programa Statgraphic plus v.5.5 e no software estatístico R, os testes de médias foram feitos por tukey ($p<0,05$) e a ordenação dos dados foi realizada pela análise de componentes principais. Foram avaliados parâmetros do metabolismo fotossintético, desenvolvimento radicular, acúmulo de biomassa, pigmentos fotossintéticos, metabólitos solúveis e anatomia radicular. Foi perceptível, após um decréscimo inicial, a ocorrência de aumento no desempenho fotossintético das plantas tratadas com os diferentes tipos de AH, com a finalidade de acelerar as atividades metabólicas visando aclimatação e proteção vegetal. De maneira geral, os três ácidos húmicos estimularam a produção de biomassa, o desenvolvimento radicular, o metabolismo fotossintético e os teores de metabólitos solúveis nas plantas, no entanto diferenciadamente, de acordo com as suas características estruturais e das propriedades que apresentam. Houve modificações diferenciadas nas características anatômicas das raízes por efeito dos ácidos húmicos, associadas ao desenvolvimento da parede celular vegetal. Pelo conjunto dos efeitos desencadeados e pelo desenvolvimento das plantas, o AHVC foi considerado o que melhor exerceu bioatividade em arroz da variedade BRS Esmeralda.

Palavras-chave: Substâncias húmicas. Bioativade. Morfologia. Metabolismo.

4.2 ABSTRACT

The influence of humic substances on plant development is undeniable, either directly by the effects triggered on plant architecture and metabolism, or indirectly by soil improvements. The most observed and studied effects of humic acids in the last years are mainly correlated to the root system of the plants, but some authors have also registered changes in the photosynthetic pigment content, biomass production, nitrogen metabolism and photosynthesis of submitted species. the application of these substances. The bioactivity of these supramolecules is directly associated with their origin, composition, structure, molecular size and concentration, so the characterization of humic substances is a process of paramount importance for understanding the different functions and properties of these compounds. In this context, the objective of this chapter was to evaluate the effects of HA extracted from different sources of origin: Histosol (HASOIL), vermicompost (HAVC) and Rio Negro-AM sediment (HARN) on the morphology, growth and metabolism of rice plants. besides obtaining a better understanding between the relation of the biological activity of these substances with their structures and physicochemical properties. The species used in the study was rice (*Oryza sativa L.*) of the BRS Esmeralda variety, grown in a growth chamber located in the Soil Department of the Federal Rural University of Rio de Janeiro. In order to establish the concentration to be applied of the different HA, increasing doses were tested (0, 2, 5, 10, 30 and 50 mg of HA.L⁻¹), and evaluated which resulted in the greatest stimulus to plant development, being 5 mg.L⁻¹ for HAVC, 2 mg.L⁻¹ for HASOIL and 30 mg.L⁻¹ HARN. Rice plants were grown in Hoagland nutrient solution at $\frac{1}{2}$ ionic strength and 2 mM N-NO₃⁻ with pH adjusted to 5.6. Twelve days after transplanting, humic acids were applied, after nine days of treatment the plants were collected. Four treatments (Control; HAVC; HASOIL; HARN) and twenty replications were adopted in a completely randomized experimental design. Statistical analyzes were performed using Statgraphic plus v.5.5 software and R statistical software, averaging tests were performed by tukey ($p < 0.05$) and data ordering was performed by principal component analysis. Photosynthetic metabolism parameters, root development, biomass accumulation, photosynthetic pigments, soluble metabolites and root anatomy were evaluated. It was noticeable, after an initial decrease, the increase in photosynthetic performance of plants treated with different types of HA, in order to accelerate metabolic activities aiming at acclimatization and plant protection. In general, the three humic acids stimulated biomass production, root development, photosynthetic metabolism and soluble metabolite levels in plants, however differentially, according to their structural characteristics and their properties. There were different modifications in the anatomical characteristics of the roots by the effect of humic acids, associated with the development of the plant cell wall. Due to the set of effects triggered and the development of plants, HAVC was considered the one that best exerted bioactivity in rice of the BRS Esmeralda variety.

Keywords: Humic substances. Bioactivity. Morphology. Metabolism.

4.3 INTRODUÇÃO

As substâncias húmicas possuem atividade biológica bastante complexa, apresentando diferentes efeitos sobre o desenvolvimento das plantas, interferindo indiretamente nas plantas pelos efeitos ocasionados no solo, e diretamente pelas alterações na arquitetura e no metabolismo vegetal (MUSCOLO et al., 2007; BALDOTTO & BALDOTTO, 2014).

No corpo da planta, os ácidos húmicos exercem influência em níveis distintos de organização e em diversas etapas envolvidas na fisiologia vegetal, como expressão de genes, presença de organelas, metabolismo primário, metabolismo secundário, crescimento e desenvolvimento, e produção de flores, frutos e sementes (TREVISAN, 2011; JANNIN et al., 2012).

Os efeitos mais observados dos AH nas plantas estão associados ao sistema radicular, por alterações na quantidade, comprimento, diâmetro, área e volume de raízes. Estudos realizados por diversos autores demonstraram a expressão desses efeitos no desenvolvimento radicular pela aplicação de substâncias húmicas (SILVA et al., 2000; TREVISAN et al., 2009; CANELLAS et al., 2011; BALDOTTO et al., 2012; TAVARES, 2014; GARCÍA, 2016b; GARCÍA, 2018).

Além dos efeitos dos AH nas raízes, pode-se destacar também efeitos positivos na parte aérea, como aumento da taxa de nutrientes nas folhas, estímulo na biossíntese de clorofilas *a* e *b* e carotenóides, e incremento na presença de cloroplastos e fotossíntese. Esses fatores contribuem para o aumento da biomassa vegetal e da produção de flores, de frutos e de sementes (MORA et al., 2010; JANNIN et al., 2012; BALDOTTO & BALDOTTO, 2014). Mora et al. (2010) trataram plantas de pepino com ácido húmico em seu sistema radicular e verificaram alterações na distribuição de nitrato entre parte aérea e raiz.

As estruturas que as substâncias húmicas possuem determinam suas propriedades, sendo responsáveis pelos efeitos dessas supramoléculas em plantas (BERBARA & GARCÍA, 2014). García et al. (2016 a) observaram em plantas de arroz que a aplicação de ácidos húmicos com predomínio estrutural de cadeias alifáticas não funcionalizadas, carbonilas e carboxilas, estão associadas ao estímulo na quantidade de raízes de menor diâmetro, enquanto estruturas aromáticas substituídas e não-substituídas e cadeias alifáticas substituídas associaram-se ao comprimento de raízes de maior diâmetro. Canellas et al. (2012) constataram uma correlação entre a hidrofobicidade dos ácidos húmicos com sua atividade biológica. Foi observada por Aguiar et al. (2013) associação positiva entre a presença de grupamentos metoxi, cadeias aromáticas funcionalizadas e carboxilas, com a bioatividade dessas moléculas.

Ainda não foram desenvolvidas, devido à complexidade molecular, técnicas de produção capazes de controlar a atividade dessas substâncias. A atividade biológica destas supramoléculas está diretamente associada à sua origem, tamanho molecular, composição, estrutura e concentração. O estabelecimento de relações entre estrutura e bioatividade das SH é fundamental para desenvolver recursos que possam ser utilizados no desenvolvimento da agricultura (MORA et al., 2012; CANELLAS et al., 2012; AGUIAR et al., 2013).

Dentro deste contexto, este capítulo teve como objetivo discutir os efeitos dos ácidos húmicos de vermicomposto (AHVC), de Organossolo (AHSOLO) e do Rio Negro – AM (AHRN) na morfologia, crescimento e metabolismo de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) da variedade BRS. Esmeralda, assim como estabelecer uma relação entre a suas estruturas e propriedades com a bioatividade nas plantas.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Localização e caracterização do experimento

O experimento foi conduzido no Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizada em Seropédica-RJ. As atividades ocorreram no Laboratório de Química Biológica do Solo, no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas e no Laboratório de Estudos das Relações Solo-Planta. A espécie utilizada no estudo foi o arroz (*Oryza sativa* L.) da variedade BRS Esmeralda, cultivado em câmara de crescimento nas seguintes condições: ciclo luminoso de 14/10 h (luz/escuro), fluxo de fótons de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 70% de umidade relativa e temperatura de 26 °C (Figura 9).

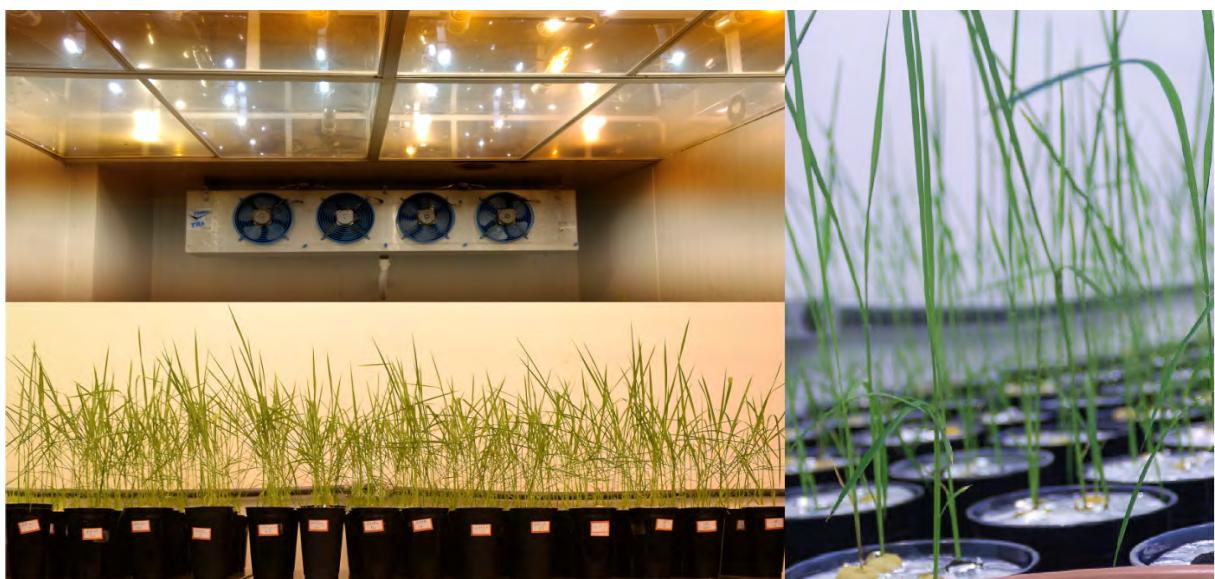


Figura 9. Ensaio experimental na câmara de crescimento.

As sementes de arroz foram desinfestadas previamente com hipoclorito de sódio (2%) por 10 minutos e posteriormente lavadas com água destilada. Em seguida, foram transferidas a potes com gaze que continham somente água destilada. Quatro dias após a germinação das sementes, as plântulas receberam uma solução de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950) modificada a 1/8 da força iônica total. Após dois dias foi trocada a solução de Hoagland para 1/4 da força iônica total, e novamente trocada depois de dois dias para 1/2 força iônica total. Dois dias após a última troca de solução, as plantas foram transplantadas para potes de 0,7L contendo solução de Hoagland a 1/2 força iônica total. Todas as soluções preparadas tinham como fonte de nitrogênio N-NO_3^- a 2mM e pH ajustado a 5,6. Doze dias após o transplantio se iniciou a aplicação dos ácidos húmicos, após nove dias de tratamento as plantas foram coletadas.

4.4.2 Aplicação dos ácidos húmicos de diferentes ambientes de formação

Foi realizado um ensaio experimental ocorrendo aplicação de ácidos húmicos (AH) de diferentes origens, caracterizados por técnicas espectroscópicas e físico-químicas discutidas no capítulo anterior, via sistema radicular de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda, sendo: AH extraído de vermicomposto (AHVC), de solo orgânico (AHSOLO) e de sedimento do Rio Negro – Amazonas (AHRN).

Para estabelecer a concentração a ser utilizada dos diferentes ácidos húmicos foram aplicadas, durante nove dias, doses crescentes (0, 2, 5, 10, 30 e 50 mg de AH.L⁻¹), em experimentos prévios, e selecionada a dose de cada AH que mais estimulou o desenvolvimento de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda. De acordo com a análise dos resultados obtidos pelos experimentos de dose vs. resposta dos três diferentes tipos de ácidos húmicos, tem-se que a dose de 5 mg de AH.L⁻¹ para o AHVC (Figura A1 e A2), de 2 mg de AH.L⁻¹ para o AHSOLO (Figura A3 e A4) e de 30 mg de AH.L⁻¹ para o AHRN (Figura A5 e A6), foram as que estimularam em maior intensidade o desenvolvimento das plantas e, portanto, as concentrações selecionadas e utilizadas neste experimento.

Os AHVC (5 mg.L⁻¹), AHSOLO (2 mg.L⁻¹) e AHRN (30 mg.L⁻¹), após o início do tratamento foram dissolvidos diariamente durante nove dias na própria solução nutritiva de Hoagland a ½ força iônica e N-NO₃⁻ a 2 mM, o pH foi ajustado a 5,6. A cada três dias ocorreu a troca de solução nutritiva acrescida com os respectivos AH.

4.4.3 Avaliação da cinética de emissão da fluorescência transiente da clorofila *a*

A fluorescência transiente da clorofila *a* foi medida utilizando-se um fluorômetro portátil (HandyPEA, Hanstech, King's Lynn, Norkfolk, UK). Os clipe utilizados para estas medições foram colocados no terço médio de folhas jovens completamente expandidas, durante nove dias após o início dos tratamentos, às 7:00, e as medições foram realizados 20 minutos após a adaptação das folhas ao escuro. A emissão de fluorescência foi induzida em uma área de 4mm de diâmetro da folha pela exposição da amostra a um pulso de luz saturante numa intensidade de 3.000μmol m⁻² s⁻¹, sendo o intervalo entre os pulsos de 500 ms. A partir da curva de emissão de fluorescência transiente obtida, as intensidades determinadas a 50 μs (fluorescência inicial - F₀), 100, 300μs, 2 e 30 ms e FM (fluorescência máxima), foram utilizadas para o cálculo dos parâmetros estabelecidos pelo Teste JIP (STRASSER & STRASSER, 1995) (Tabela 3).

Tabela 3. Principais parâmetros do teste JIP (Adaptada de YUSUF et al.,2010).

Parâmetros de fluorescência calculados a partir dos dados primários obtidos	
$F_V = F_M - F_0$	Fluorescência variável
F_V/F_M	Rendimento quântico máximo do FSII
$V_t V_j$	Fluorescência variável relativa em um tempo "t"
V_i	Fluorescência variável relativa em relação ao nível J
$M_0 = 4(F_{300\mu s} - F_0)/(F_M - F_0)$	Fluorescência variável relativa em relação ao nível I
$S_s = V_j/M_0$	Declive inicial aproximado (em ms ⁻¹) da fluorescência transiente $V = f (t)$
$S_m = (Area)/(F_M - F_0)$	Área total normalizada complementar correspondente apenas a fase OJ (reflete um único volume de eventos de redução de Q _A)
$N = S_m/S_s$	Área total normalizada complementar acima da curva OJIP (reflete múltiplos eventos de redução da Q _A)
Número total de elétrons transferidos para a cadeia de transporte de elétrons entre o tempo de 0 et (necessário para atingir F _M)	

Continua...

Continuação da Tabela 3.

Atividade específica por centro de reação (RC)	
$ABS/RC = M_0 (1/V_J) (1/\phi_{Po})$	Medida do tamanho aparente do sistema antena ou o fluxo de absorção por RC
$TR_0/RC = M_0 (1/V_J)$	Máxima taxa pela qual um exciton é capturado pelo RC resultando em uma redução da plastoquinona (QA ⁻)
$ET_0/RC = M_0 (1/V_J) \Psi_0$	Reoxidação da QA ⁻ via transporte de elétrons em um RC ativo
$DI_0/RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)$	Razão de dissipação total de energia de excitação não capturada do total de RC, sendo a dissipação neste caso à perda de energia na forma de calor
RE_0/RC	Redução do acceptor final de elétrons no lado do acceptor de elétrons do FSI por RC
Rendimentos energéticos ou taxas de fluxo	
$\phi_{P0} = TR_0/ABS = F_v/F_M$	Rendimento quântico máximo fotoquímico
$\phi_{E0} = ET_0/ABS$	Rendimento quântico de transporte de elétrons de QA ⁻ para o intersistema de acceptores de elétrons
$\phi_{D0} = 1 - \phi_{Po} = (F_0/F_M)$	Rendimento quântico para dissipação de energia
$\phi_{R0} = RE_0/ABS$	Rendimento quântico de transporte de elétrons de QA ⁻ para o acceptor final de elétrons do FSI
Eficiências	
$\psi_{E0} = ET_0/TR_0$	Eficiência com que um exciton capturado no RC pode mover um elétron de QA ⁻ para o intersistema de acceptores de elétrons
$\rho_0 = RE_0/TR_0$	Eficiência com que um exciton capturado no RC pode mover um elétron dentro da cadeia de transporte de elétrons de QA ⁻ para os acceptores finais de elétrons do FSI
$\delta R_0 = RE_0/ET_0$	Eficiência com que um elétron pode mover o intersistema de acceptores de elétrons reduzidos no intersistema para o acceptor final de elétrons do FSI
Índices de desempenho	
$PI_{ABS} = (RC/ABS) B$ $(\phi_{Po}/10S\phi_{P0}) 0Si (\Psi_0/10\Psi_0) =$ $(RC/ABS) B (TR_0/DI_0) \times$ $(ET_0/1TSET_0)$	Índice de desempenho fotossintético (conservação de energia a partir do exciton para a redução dos acceptores de elétrons do intersistema)
$PI_{total} = PI_{ABS} BS (\delta 0/1B\delta_0)$	Índice de desempenho fotossintético total (conservação de energia a partir de exciton para a redução de acceptores finais do FSI)

4.4.4 Avaliação da massa fresca e seca da parte aérea e radicular

Para avaliação da massa fresca das plantas, após a coleta foram separadas e pesadas as folhas, bainhas e o sistema radicular de cada planta individualmente, utilizando balança digital de precisão. Em seguida, as plantas foram armazenadas em envelopes de papel e transferidas para estufa secadora, permanecendo assim por 72 horas à 60 °C. Passado esse período, pesou-se a massa seca do sistema radicular e das partes aéreas de cada planta em balança digital de precisão.

4.4.5 Análise da morfologia e desenvolvimento radicular

A avaliação do desenvolvimento das raízes das plantas mediante os diferentes parâmetros foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Tavares (2014). Resumidamente, o sistema radicular das plântulas de arroz foi uniformemente distribuído em uma camada de água em bandeja transparente de acrílico (30 cm x 20 cm) para a digitalização em resolução de 600 dpi. Utilizou-se um sistema de digitalização Epson Expression 10000XL com uma unidade de luz adicional (ULA) onde as imagens das raízes foram convertidas para um formato em tons de cinza de oito bits. Os limites das imagens foram definidos e então importados para o software WinRHIZO, 2012b (Régent Instruments, Quebec, Canadá Inc.) para análise das variáveis morfológicas das raízes e sua quantificação. As imagens foram analisadas usando um grid de calibração com uma escala de referência, e alteraram-se as configurações de entrada para raízes pálidas em um fundo preto (WinRhizo Arabidopsis 2012b). Em seguida os dados foram gerados por meio do software XLRhizo (Régent Instruments, Quebec, Canadá Inc.).

Foram analisados e quantificados cinco parâmetros radiculares: número de raízes, comprimento médio (mm), área de superfície (mm^2), diâmetro médio (mm) e volume (mm^3). Também foi definido e medido o número de raízes mediante classificação em classes quanto ao diâmetro: superfíneas ($< 0,5$ mm), finas (0,5 - 1,5 mm), médias (1,5 - 3,5 mm) e grossas ($> 3,5$ mm).

4.4.6 Determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos

A determinação dos teores de clorofitas *a* e *b* e de carotenóides ocorreu de acordo com Lichtenthaler (1987). Em frascos tipo falcon contendo 10 mL de acetona 80%, foram adicionados 100 mg de folhas frescas fragmentadas. Os tubos foram levados para agitação sob baixa temperatura durante 72 horas, sempre no escuro. Após esse período, as amostras foram levadas para a leitura espectrofotométrica, sendo o espectrofotômetro zerado com a solução cetônica. Os comprimentos de onda utilizados para a leitura foram de 661,6 nm para clorofila *a* (Ca), 644,8 nm para clorofila *b* (Cb) e de 470 nm para carotenóides (caroteno + xantofilas).

O cálculo da concentração da clorofila *a*, da clorofila *b* e dos carotenóides foi realizado de acordo com as equações abaixo, e expressas em ug por mL de extrato: Clorofila *a* = 11,24 [A661,6] - 2,04 [A644,8]; Clorofila *b* = 11,24 [A661,6] - 2,04 [A644,8]; e Carotenóides = (1000 [A470] - 1,90Ca - 63,14Cb)/214.

Considerando o volume total colocado nos 0,100 g iniciais de material fresco sendo 10 mL, cada mL de extrato corresponde a 0,01 g (0,100/10,00) de massa fresca (MF). Nesse caso o resultado final foi em $\mu\text{g}/\text{mL} \times 0,01 = \mu\text{g}/\text{g MF}$.

4.4.7 Extração alcoólica do material fresco e dosagem das frações solúveis

A extração alcoólica e partição com clorofórmio foram realizadas segundo Fernandes (1984), como descritas a seguir:

Após determinar a massa fresca, um grama de material vegetal foi colocado em 20 mL de etanol 80% e armazenado em frascos do tipo falcon para posterior extração das frações solúveis. As amostras armazenadas em etanol foram fragmentadas em um triturador (TECNAL TE-102), e filtradas em camadas de gaze e papel filtro. Posteriormente, foram transferidas para funil de separação onde se adicionou igual volume de clorofórmio. Após agitação suave, permaneceu em repouso por 40 minutos até a separação das frações por polaridade, a fração apolar foi descartada. A fração polar (sobrenadante) foi recolhida e

elevada a um volume final de 25 mL com etanol 80%, sendo em seguida armazenada para as análises posteriores conforme descrito a seguir.

4.4.8 Determinação dos teores de N-NO₃⁻

A determinação dos teores de N na forma de nitrato foi realizada segundo Miranda et al. (2001) e Doane & Horwáth (2003). Para uma maior precisão na determinação de nitrato a partir de soluções com baixas concentrações foi utilizado o protocolo proposto por Miranda et al. (2001), sendo necessários ajustes pois o protocolo foi inicialmente proposto para a determinação simultânea de nitrato e nitrito em plasma sanguíneo. A técnica é baseada na redução de nitrato a nitrito pelo cloreto de vanádio III (VCL₃), combinado com a detecção por meio da reação de Griess.

Foram realizados vários testes (dentre eles testes alterando a concentração dos reagentes, das amostras, etc) até que os devidos ajustes foram feitos para uma melhor eficiência na determinação de nitrato. Em uma microplaca de 96 poços, foram pipetados 30 µL da amostra e 60 µL de uma solução resultante da mistura de VCL₃ 0,5% (m/v) em HCl 1M + sulfanilamida 0,4% (m/v) em HCl 1M + N-(1-naftil) etilenodiamônio dihidroclorido (0,02% (m/v) em H₂O ultrapura), na proporção de 2:1:1. Em seguida as amostras foram colocadas em estufa a 40°C por 50 minutos para acelerar o desenvolvimento da coloração, após o aquecimento foram adicionados 110 µL de H₂O ultrapura e realizada a leitura a 540nm.

4.4.9 Determinação dos teores de N-NH₄⁺

A determinação de N na forma de amônio foi realizada pelo método de Felker (1977). Na determinação foram utilizadas duas soluções, sendo a “solução A” constituída de 1% de fenol e 0,005% de nitroprussiato de sódio, e a “solução B” composta de 3% de NaOH e 0,062% de dicloroisocianurato de sódio. Uma alíquota de 0,5 mL da solução obtida do extrato alcoólico (diluída quando necessário) foi acrescentada a 2,5 mL de cada solução, após homogeneização e descanso por 1h 30min, as amostras foram lidas em espectrofotômetro. O NH₄Cl (0,0; 10; 25; 50; 100; 200; 300; 400 nmoles de NH₄⁺ / 0,5 mL) foi utilizado para confecção da curva padrão.

4.4.10 Determinação dos teores de açúcares solúveis

A determinação dos teores de açúcares solúveis foi realizada segundo Yemm & Willis (1954). Em tubos de ensaio de 2,5 cm de diâmetro imersos em banho de gelo, foram adicionados 5 mL do reagente de antrona (2% em H₂SO₄ 5:2), e após 5 minutos de repouso, adicionou-se lentamente 1 mL da solução obtida do extrato alcoólico (diluída quando necessário), deixando-se em repouso por 5 minutos a 0°C. Em seguida, as amostras foram colocadas em banho-maria a 100°C por 10 minutos para o desenvolvimento da coloração esverdeada característica. Após resfriamento em água corrente, as leituras espectrofotométricas foram realizadas. A glicose (0, 20, 40, 50, 80 e 100 µg mL⁻¹) foi utilizada como padrão.

4.4.11 Determinação dos teores de N-amino livre

A determinação foi realizada de acordo com Yemm & Cocking (1955). Em tubo de ensaio foi adicionado 0,5 mL de tampão citrato a 0,2 M, com pH 5,0; 1 mL da solução obtida do extrato alcoólico (diluída quando necessário); e 1,2 mL do reagente metil celossolve 100% + 0,01M KCN + Ninidrina 5%. A mistura foi agitada e todos os tubos foram fechados com papel alumínio e aquecidos em banho-maria a 100°C por 15 minutos. Após esse período, os tubos com as amostras foram resfriados em água corrente durante 5 minutos, quando então se adicionou 3 mL de etanol 60%. A mistura foi homogeneizada e levada para a leitura espectrofotométrica. A leucina (0; 0,04; 0,08; 0,16; 0,20; 0,24; 0,32 mM) foi utilizada como padrão.

4.4.12 Caracterização espectroscópica das raízes mediante ressonância magnética nuclear do isótopo do ^{13}C por polarização cruzada com rotação no ângulo mágico

As amostras de raízes foram coletadas e armazenadas separadamente em frascos tipo falcon, em seguida foram congeladas em freezer a -80 °C e posteriormente submetidas a liofilização, até as amostras estarem preparadas para a caracterização espectroscópica.

O órgão das plantas de arroz da var. BRS Esmeralda foram caracterizadas pela espectroscopia por ressonância magnética nuclear do isótopo do ^{13}C em polarização cruzada e rotação no ângulo mágico (^{13}C NMR CP/MAS), realizada no aparelho Bruker AVANCE II RMN a 400 MHz, equipado com probe de 4 mm Narrow MAS e operando em sequência de ressonância de ^{13}C a 100.163 MHz. Para a obtenção dos espectros, as amostras dos materiais humificados foram colocadas em um rotor (porta-amostra) de Dióxido de zircônio (ZrO_2) com tampas de Kel-F sendo a frequência de giro de 8 ± 1 kHz. Os espectros foram obtidos pela coleta de 2048 data points para igual número de scans a um tempo de aquisição de 34 ms e com recycle delay de 5s. O tempo de contato para a sequência em rampa de ^1H ramp foi de 2 ms. A coleta e elaboração espectral foram realizadas utilizando o Software Bruker Topspin 2.1. Os decaimentos livres de indução (DLI) foram transformados aplicando um zero filling igual a 4 k e posteriormente um ajuste por função exponencial (line broadening) de 70 Hz.

As regiões dos espectros foram integradas para a obtenção da quantidade relativa de estruturas, assim as regiões foram divididas como segue: alquil – C ($\text{C}_{\text{Alq-H,R}}$): 0–46 ppm; metoxilas e N–alquil C ($\text{C}_{\text{Alq-O,N}}$): 46–59 ppm; O–alquil C ($\text{C}_{\text{Alq-O}}$): 59–91 ppm; di–O–alquil C (carbono anoméricos) ($\text{C}_{\text{Alq-di-O}}$): 91–110 ppm; carbono aromático ($\text{C}_{\text{Ar-H,R}}$): 110–142 ppm; O–aromatico C ($\text{C}_{\text{Ar-O}}$): 142–156 ppm; carboxila C ($\text{C}_{\text{COO-H,R}}$): 156–186 ppm e carbonilas C ($\text{C}_{\text{C=O}}$): 186–230 ppm. A aromaticidade foi calculada segundo a fórmula: $(\text{C}_{\text{Ar-H,R}}) + (\text{C}_{\text{Ar-O}}) * 100 / \text{área total}$, assim a alifaticidade foi calculada como: 100–Aromaticidade (%). O índice de hidrofobicidade (HB/HI) foi calculado como segue: $(0 \text{ ppm}-46 \text{ ppm}) + (110 \text{ ppm}-156 \text{ ppm}) / (46 \text{ ppm}-110 \text{ ppm}) + (156 \text{ ppm}-186 \text{ ppm})$. Para o índice de polaridade foi utilizada a formula a seguir: $(\text{C}_{\text{COO-H,R}}) + (\text{C}_{\text{C=O}}) + (\text{C}_{\text{Alq-O,N}}) / (\text{C}_{\text{Ar-H,R}}) + (\text{C}_{\text{Alq-H,R}})$.

4.4.13 Análises estatísticas

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, utilizando um total de quatro tratamentos (Controle, AHVC, AHSOLO e AHRN) e vinte repetições, sendo quatro plantas por pote. As análises estatísticas foram realizadas no programa Statgraphic plus v.5.5 e no software estatístico R, os testes de médias foram feitos por tukey ($p < 0,05$) e a ordenação dos dados foi realizada pela análise de componentes principais, os gráficos foram elaborados no programa SigmaPlot 10.0 e Microsoft Excel 2016. O trabalho com os espectros foi realizado utilizando o Software ACD/Labs v.12.01.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Avaliação da cinética de emissão da fluorescência transiente da clorofila *a*

Com a avaliação da cinética de emissão da fluorescência transiente da clorofila *a* é possível inferir sobre a vitalidade de plantas submetidas a diversas condições ambientais desfavoráveis. O estresse a que uma planta é submetida, direta ou indiretamente, afeta o seu metabolismo fotossintético que, consequentemente, irá alterar o rendimento da fluorescência da clorofila *a* (BAKER, 2008; GOVINDJEE, 2011; KALAJI et al., 2014). Foram observadas alterações significativas nos parâmetros estabelecidos pelo Teste-JIP (Figura 10 e Tabela 4) derivados da fluorescência transiente da clorofila *a* (STRASSER & STRASSER, 1995). Apesar do AHSOLO ter provocado um aumento significativo no índice de desempenho fotossintético (Piabs e Pitotal) 24 horas após ter sido aplicado, todos os ácidos húmicos provocaram uma redução do desempenho fotossintético da planta até as 96 horas após a sua aplicação. Devido aos processos de emissão da fluorescência, dissipação de calor e produção de energia fotoquímica ocorrerem em competição direta, o aumento da perda de energia na forma de calor (Dio/RC) levou a uma intensa redução do desempenho fotossintético provocado pelo AHVC e pelo AHSOLO. Em decorrência, esses tratamentos foram os que apresentaram aumento estatístico significativo no tamanho do sistema antena (ABS/RC) quando comparado com o controle. Contudo, após 144 horas de aplicação dos ácidos húmicos, as plantas demonstraram um incremento significativo do índice de desempenho fotossintético (Piabs e Piabs total), e uma redução significativa na perda de energia na forma de calor (Dio/RC) e no tamanho aparente do sistema antena (ABS/RC), quando comparado ao controle. Após 196 horas da aplicação de AH nas plantas, observou-se que estas reestabeleceram suas atividades fotossintéticas, não diferindo estatisticamente do controle em nenhum dos parâmetros analisados (Figura 10 e Tabela 4).

As alterações fotossintéticas observadas quatro dias após a aplicação dos AHs (96 horas) demonstram que, inicialmente, essas substâncias atuaram como um fator de estresse na planta. Oukarroum et al. (2007) salienta que os índices de desempenho fotossintético são considerados mais sensíveis à detecção e quantificação de estresse nas plantas do que o próprio rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m ou ϕ_{Po}). Isto ocorre, porque os índices de desempenho relacionam a eficiência de absorção, captura e transferência de energia de excitação pelo fotossistema II proporcionando uma visão maior do grau de efeito do ambiente estressante (GONÇALVES, 2005). A diminuição nos índices de desempenho, indicam perda de eficiência fotoquímica pelas plantas (THACH et al., 2007). Entretanto, esse estresse não foi intenso o suficiente para causar injúrias na planta. Pelo contrário, com a finalidade de acelerar suas atividades metabólicas provavelmente visando ativar algum mecanismo de aclimatação e de proteção da planta, foi observado incremento do desempenho fotossintético seis dias após o tratamento (144 horas) (Figura 10 e Tabela 4).

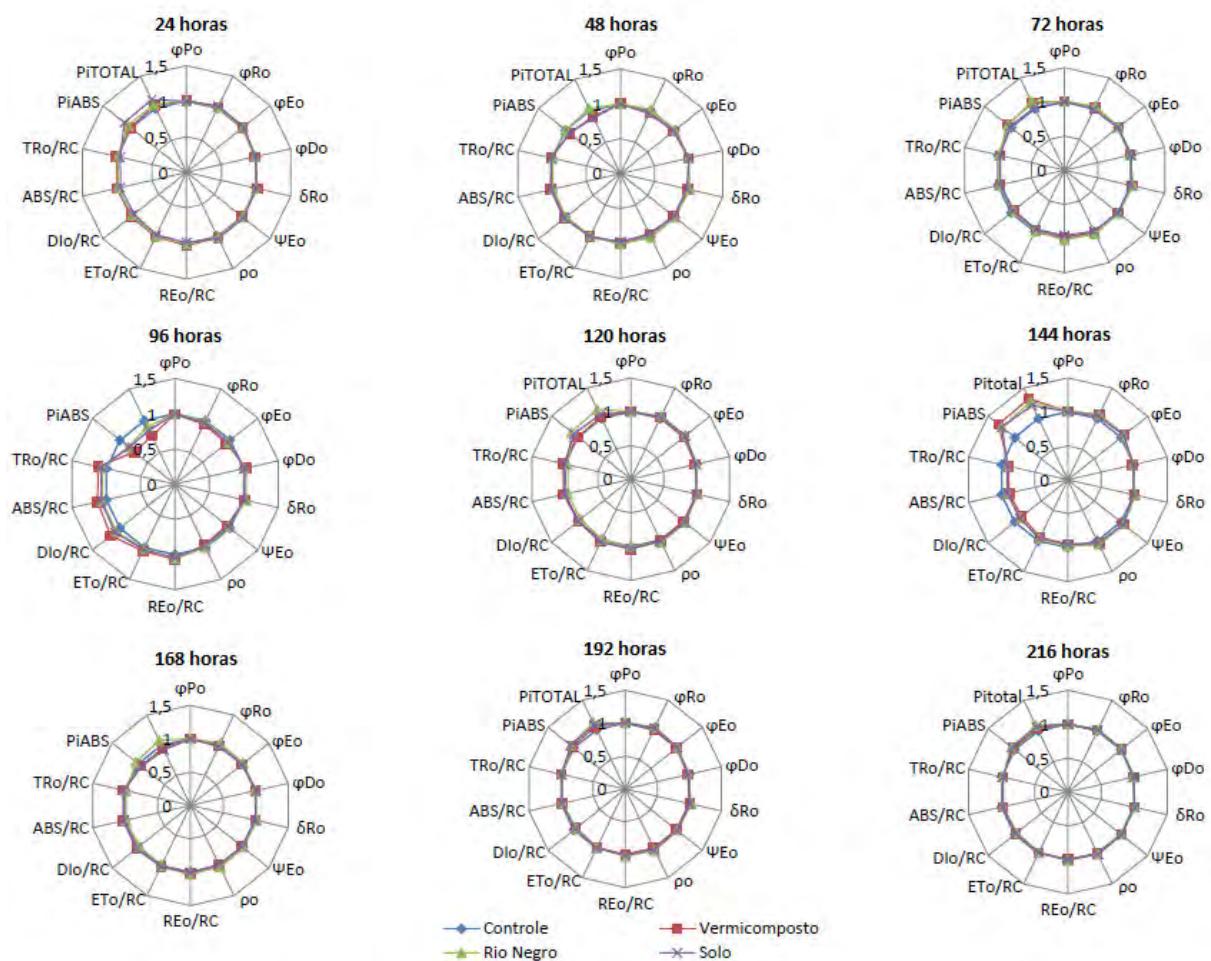


Figura 10. Parâmetros do Teste JIP obtidos de arroz (*Oryza Sativa L.*) da var. BRS Esmeralda submetido a três ácidos húmicos de diferentes fontes de origem (vermicomposto, Organossolo e sedimentos do Rio Negro-AM), em relação aos valores do tratamento controle.

Tabela 4. Parâmetros da fluorescência transiente da clorofila *a* obtidos de arroz (*Oryza Sativa L.*) da var. BRS Esmeralda submetida a três ácidos húmicos de diferentes fontes de origem (vermicomposto, Organossolo e sedimentos do Rio Negro-AM).

	Tratamento	ABS/RC	TR ₀ /RC	ET ₀ /RC	DI ₀ /RC	PI _{ABS}	PI _{TOTAL}
24 Horas	Controle	2,25 a	1,78 a	1,01 NS	0,47 NS	2,23 b	1,60 b
	AHVC	2,27 a	1,80 a	1,01	0,47	2,22 b	1,73 b
	AHRN	2,23 ab	1,77 a	1,00	0,46	2,27 b	1,67 ab
	SOLO	2,11 b	1,67 b	0,97	0,44	2,54 a	1,89 a
	CV (%)	4,77	4,52	3,63	6,03	11	12,21
	Controle	2,27 NS	1,79 NS	1,03 NS	0,48 NS	2,27 NS	1,83 NS
48 Horas	AHVC	2,31	1,83	1,02	0,49	2,1	1,67
	AHRN	2,29	1,81	1,03	0,49	2,17	1,88
	SOLO	2,22	1,75	1,02	0,47	2,35	1,94
Continua...							

Continuação da Tabela 4.

	Tratamento	ABS/RC	TR ₀ /RC	ET ₀ /RC	Di ₀ /RC	PI _{ABS}	PI _{TOTAL}
48 Horas	CV (%)	5,74	5,5	4,05	6,9	11,76	13,06
	Controle	2,30 NS	1,82 NS	1,06 NS	0,48 NS	2,29 NS	1,93 NS
72 Horas	AHVC	2,22	1,76	1,03	0,46	2,47	2,1
	AHRN	2,26	1,8	1,05	0,47	2,4	2,11
	SOLO	2,22	1,75	1,02	0,47	2,35	1,94
	CV (%)	5,57	5,36	3,95	6,65	12,8	14,7
	Controle	2,17 b	1,72 b	1,01 b	0,45 c	2,51 a	2,03 a
96 Horas	AHVC	2,45 a	1,92 a	1,06 a	0,53 a	1,86 b	1,54 c
	AHRN	2,30 ab	1,82 ab	1,03 ab	0,48 bc	2,15 b	1,86 b
	SOLO	2,35 a	1,84 a	1,04 ab	0,49 ab	2,11 b	1,71 bc
	CV (%)	5,67	5,48	3,22	6,5	12,39	13,16
	Controle	2,22 NS	1,75 ab	1,00 ab	0,48 NS	2,21 NS	1,84 NS
120 Horas	AHVC	2,27	1,79 a	1,02 ab	0,48	2,22	1,88
	AHRN	2,13	1,68 a	0,98 b	0,46	2,46	2,08
	SOLO	2,24	1,76 ab	1,03 a	0,47	2,38	1,93
	CV (%)	5,41	5,35	3,64	5,88	12,31	10,74
	Controle	2,27 a	1,79 a	1,02 ab	0,48 a	2,19 b	1,85 b
144 Horas	AHVC	2,03 b	1,61 b	0,96 b	0,41 b	2,88 a	2,47 a
	AHRN	2,08 b	1,65 b	0,98b	0,43 b	2,75 a	2,38 a
	SOLO	2,08 b	1,65 b	0,99 b	0,43 b	2,73 a	2,25 a
	CV (%)	4,54	4,53	2,96	4,81	9,92	13,65
	Controle	2,07 NS	1,64 NS	0,99 NS	0,43 NS	2,82 ab	2,35 ab
168 Horas	AHVC	2,13	1,69	1,01	0,44	2,71 ab	2,29 ab
	AHRN	2,05	1,63	0,99	0,42	2,96 a	2,59 a
	SOLO	2,13	1,68	1,00	0,44	2,65 b	2,18 b
	CV (%)	4,26	4,18	2,96	4,91	8,95	12,73
	Controle	2,10 NS	1,65 NS	0,97 NS	0,45 NS	2,55 NS	2,17 NS
192 Horas	AHVC	2,08	1,65	0,97	0,43	2,62	2,27
	AHRN	2,07	1,64	0,97	0,43	2,71	2,42
	SOLO	2,08	1,65	0,98	0,44	2,70	2,31
	CV (%)	5,45	5,43	4,3	6,31	11,49	13,65
	Controle	2,15 NS	1,69 NS	1,00 NS	0,45 NS	2,55 NS	2,07 NS
216 Horas	AHVC	2,12	1,68	0,99	0,44	2,6	2,1
	AHRN	2,11	1,68	0,99	0,43	2,7	2,22
	SOLO	2,10	1,66	0,99	0,44	2,65	2,17
	CV (%)	6,26	6,29	4,21	6,43	12,49	15,31

4.5.2 Produção de massa fresca e seca das plantas

Os três ácidos húmicos de diferentes origens aplicados via radicular estimularam o aumento na produção de biomassa fresca (g) em pelo menos um dos órgãos vegetais avaliados. O AHVC foi o que resultou em maior indução no aumento de massa fresca (g) das raízes, bainhas e folhas, diferindo dos demais tratamentos. Os órgãos vegetais das plantas

tratadas com AHRN apresentaram valores estatisticamente maiores do que as do controle, porém quando comparado ao observado pela aplicação de AHSOLO ocorreu alteração significativa apenas na massa fresca (g) foliar, havendo maior acúmulo de biomassa (g). As plantas tratadas com AHSOLO não diferiram do controle em massa fresca (g) de raízes e bainhas, apresentando incremento significativo na produção de biomassa apenas nas folhas (Figura 11A).

De acordo com a Figura 11B é possível afirmar que as plantas submetidas aos AHVC e AHRN apresentaram valores de massa seca(g) das raízes estatisticamente superiores aos obtidos pelos demais tratamentos, não diferindo entre si. A massa seca (g) das raízes tratadas com AHSOLO foi a única que não apresentou superioridade significativa em comparação ao controle. O estímulo na massa seca (g) das bainhas e das folhas pela aplicação dos AH foram similares, o AHVC foi o que apresentou maior estímulo na massa seca (g) desses órgãos, sendo estatisticamente superior aos demais tratamentos. O AHRN resultou em valores maiores que os observados em plantas sem aplicação de AH, porém não diferiu do tratamento com AHSOLO. E por fim, o AHSOLO foi único que não resultou em diferenças na massa seca (g) de bainha e de folhas em relação ao controle.

Os efeitos positivos no crescimento vegetal pela aplicação de ácidos húmicos, por meio do aumento da massa fresca e seca de plantas de arroz, também foram observados por diversos autores nesta década, que atribuem o acúmulo de biomassa em plantas tratadas com AH como resposta aos efeitos estimulantes que exercem na absorção de nutrientes, nos pigmentos fotossintetizantes, no desenvolvimento radicular, no aumento na atividade de H^+ -ATPases radiculares e no processo fotossintético (MORA et al., 2010; GARCÍA, 2013; WANGEN et al., 2013; BALDOTTO et al., 2014).

Através do exposto pela Figura 11, constatou-se que embora todos os ácidos húmicos estimularam em pelo menos um órgão vegetal a produção de biomassa, a intensidade desse efeito variou entre eles. Aparentemente, substâncias húmicas que apresentaram maior grau de labilidade, resultante do balanço da quantidade relativa de estruturas responsáveis por gerar maior polaridade, exerceram efeitos mais significativos no aumento da biomassa de plantas de arroz, sendo o AHVC o que mais estimulou esses parâmetros. Já ácidos húmicos com propriedades mais recalcitrantes e maior hidrofobicidade, parecem ser os que induzem em menor intensidade a produção de biomassa, como observado pelo AHSOLO. Estes resultados contradizem o observado por Canellas et al. (2012).

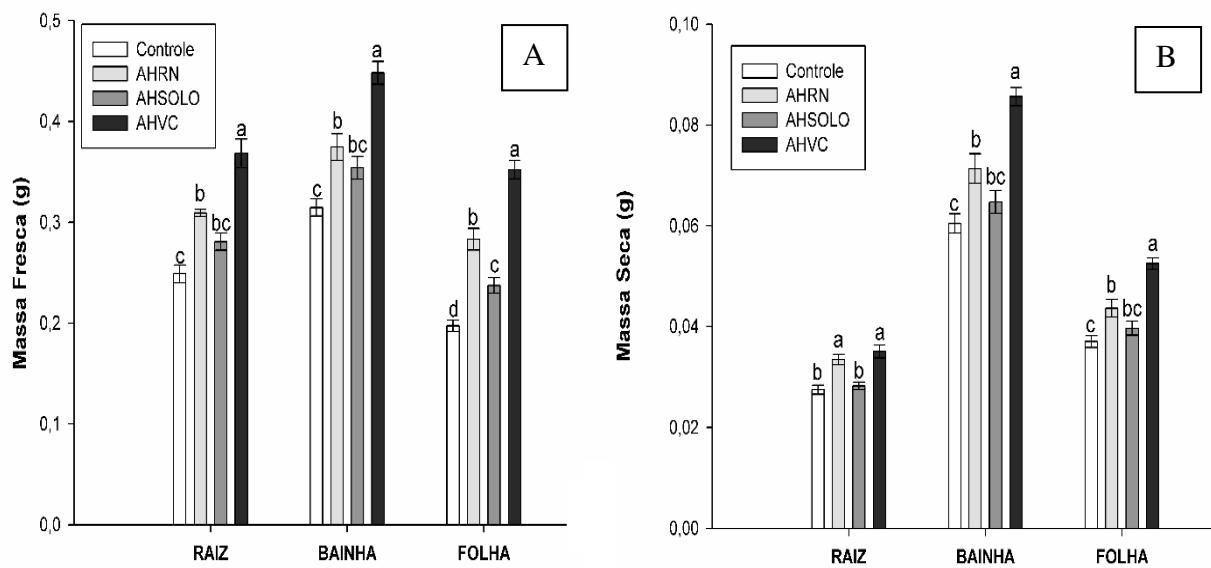


Figura 11. A) Massa fresca (g) em diferentes órgãos vegetais de plantas arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de diferentes ácidos húmicos. B) Massa seca (g) em diferentes órgãos vegetais de plantas arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de diferentes ácidos húmicos.



Figura 12. Parte aérea e raízes de plantas de arroz da variedade BRS Esmeralda cultivadas sem e com diferentes tipos de ácidos húmicos.

4.5.3 Indicadores morfológicos radiculares

A Figura 13 demonstra os efeitos observados em alguns parâmetros radiculares pela aplicação dos ácidos húmicos de diferentes origens. Analisando o primeiro indicador morfológico, todos os AH estimularam a quantidade média de raízes em relação ao controle, porém os AHVC e AHRN apresentaram valores significativamente maiores do que o AHSOLO. O comprimento médio (mm) radicular também foi estimulado pela aplicação de todos os tipos de AH, no entanto para este indicador o AHSOLO foi o que apresentou os maiores valores, diferindo estatisticamente dos outros dois.

O AHRN não apresentou alterações na área superficial radicular (mm^2) quando comparado ao tratamento testemunha e ao AHVC. Os tratamentos com AHSOLO e AHVC resultaram em aumento da área superficial em relação ao controle, sendo ainda o valor observado para o AHSOLO significativamente maior do que para o AHVC. Apenas o AHVC

mostrou um estímulo significativo no volume (mm^3) radicular em comparação ao controle (Figura 13).

Os três ácidos húmicos aplicados resultaram em efeitos distintos para o diâmetro médio das raízes ($\text{mm}/10$). O AHVC foi o único que não diferiu do controle, enquanto o AHRN e o AHSOLO reduziram e aumentaram, respectivamente, os valores de diâmetro médio ($\text{mm}/10$) (Figura 13).

É indiscutível a ocorrência de diversos benefícios no sistema radicular de plantas submetidas a aplicação de ácidos húmicos. A bioatividade dessas substâncias sobre raízes correspondem aos efeitos mais abordados e estudados na literatura, exercendo estímulos em diversos parâmetros radiculares de acordo com as características das frações húmicas (SILVA et al., 2000; TREVISAN et al., 2009; CANELLAS et al., 2011; BALDOTTO et al., 2012; TAVARES, 2014; GARCÍA, 2016b; GARCÍA, 2018).

As diferenças nos efeitos observados pela aplicação dos três tipos de ácidos húmicos no sistema radicular de plantas de arroz, parecem ser dependentes das características estruturais dessas substâncias. Os ácidos húmicos que apresentaram maior alifaticidade e menor aromaticidade (AHVC e AHRN) estimularam em maior intensidade a emissão radicular, resultando em aumento no número de raízes. Já o ácido húmico de maior aromaticidade e menor alifaticidade (AHSOLO) foi responsável por apresentar maior estímulo no alongamento das raízes (mm), na área superficial (mm^2) e no diâmetro médio radicular ($\text{mm}/10$).

García et al. (2016 b) obtiveram resultados que corroboram com o observado neste trabalho, indicando que as diferenças nas estruturas predominantes dos ácidos húmicos determinam diferentes efeitos nas raízes. Estes autores observaram estímulo à emissão de novas raízes pelos AH em que predominam compostos alifáticos e oxigenados e pelo estímulo ao desenvolvimento de raízes mais compridas pelo caráter mais aromático dessas substâncias.

O AHVC foi a supramolécula que apresentou propriedade de maior polaridade e menor hidrofobicidade, responsável pelo maior volume radicular (mm^3) observado entre as plantas, sem alterar o diâmetro médio das raízes ($\text{mm}/10$) em relação ao controle. A substância mais hidrofóbica (AHSOLO) resultou no maior diâmetro médio radicular ($\text{mm}/10$). O AHRN foi responsável pelo menor diâmetro médio ($\text{mm}/10$), podendo este efeito estar relacionado ao predomínio de estruturas $\text{C}_{\text{C}=\text{O}}$ (carbonilas) e $\text{C}_{\text{Alquil}-\text{H},\text{R}}$ (carbono alifático não funcionalizado), em comparação às outras substâncias húmicas.

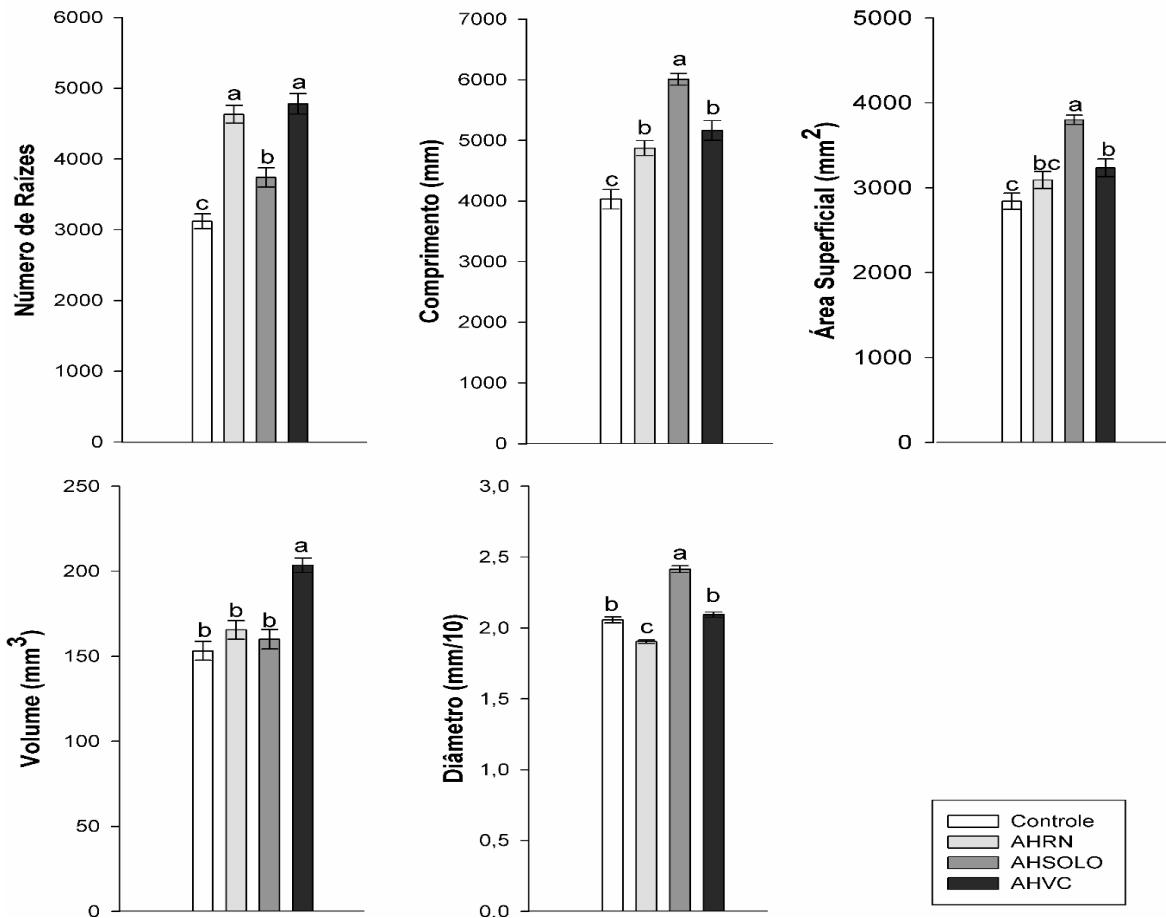


Figura 13. Efeitos dos ácidos húmicos provenientes de diferentes ambientes de formação em alguns parâmetros do desenvolvimento radicular de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda.

Nas plantas em que foram aplicadas o AHSOLO a quantidade de raízes de menor diâmetro (superfinas e finas) não diferiu significativamente do tratamento controle. O tratamento com AHRN foi o que resultou em maior estímulo na emissão de raízes de menor diâmetro (mm/10), seguido pelas plantas tratadas com AHVC, que também apresentaram valores significativamente superiores ao controle. A quantidade de raízes superfinais não diferiu entre as plantas tratadas com AHSOLO e AHVC (Figura 14).

A quantidade de raízes médias, pela aplicação de AHVC e AHSOLO, foram superiores ao encontrado em raízes de outros tratamentos. As plantas tratadas com AHRN não apresentaram diferenças no número de raízes médias em comparação ao controle. O AHVC foi o único que apresentou valores significativamente maiores no número de raízes grossas, quando comparado as plantas testemunha (Figura 14).

Analizando separadamente a quantidade de raízes detectadas por classes de diferentes diâmetros, é possível inferir sobre o comportamento contrastante no diâmetro médio (mm/10) pelos efeitos dos diferentes ácidos húmicos. É provável que o AHRN tenha resultado no menor diâmetro radicular médio (mm/10) e o AHSOLO no maior diâmetro radicular médio (mm/10) devido ao fato do primeiro ser o que resultou em maior estímulo de raízes superfinais e finas, enquanto o segundo não diferiu do controle na emissão de raízes nestas duas classes (superfinas e finas). O diâmetro médio (mm/10) também foi influenciado pela quantidade de raízes de maior diâmetro, uma vez que o AHRN não resultou em incremento no número de

raízes médias e grossas, já o AHSOLO apresentou valores maiores no número de raízes médias.

A emissão de raízes de maior diâmetro (mm/10) em plantas sob aplicação de AHSOLO parece ter sofrido influência do caráter mais aromático deste ácido húmico, sendo definido principalmente pelo predomínio de $C_{\text{Aromático}}\text{-H,R}$ (carbonos aromáticos não funcionalizados). Todavia, o estímulo na emissão de raízes de menor diâmetro (mm/10) pelo efeito do AHRN indica ser responsivo a abundância de estruturas $C_{\text{C=O}}$ (carbonilas) e $C_{\text{Alquil-H,R}}$ (carbonos alifáticos não substituídos). Resultados similares aos observados entre o efeito na emissão de raízes de diferentes diâmetros (mm/10) e o predomínio estrutural e propriedades dos ácidos húmicos foram encontrados por García et al. (2016a), onde os autores avaliaram os efeitos de ácidos húmicos de vermicomposto extraídos por diferentes métodos, apresentando relações estruturais distintas, sobre o sistema radicular de plantas de arroz.

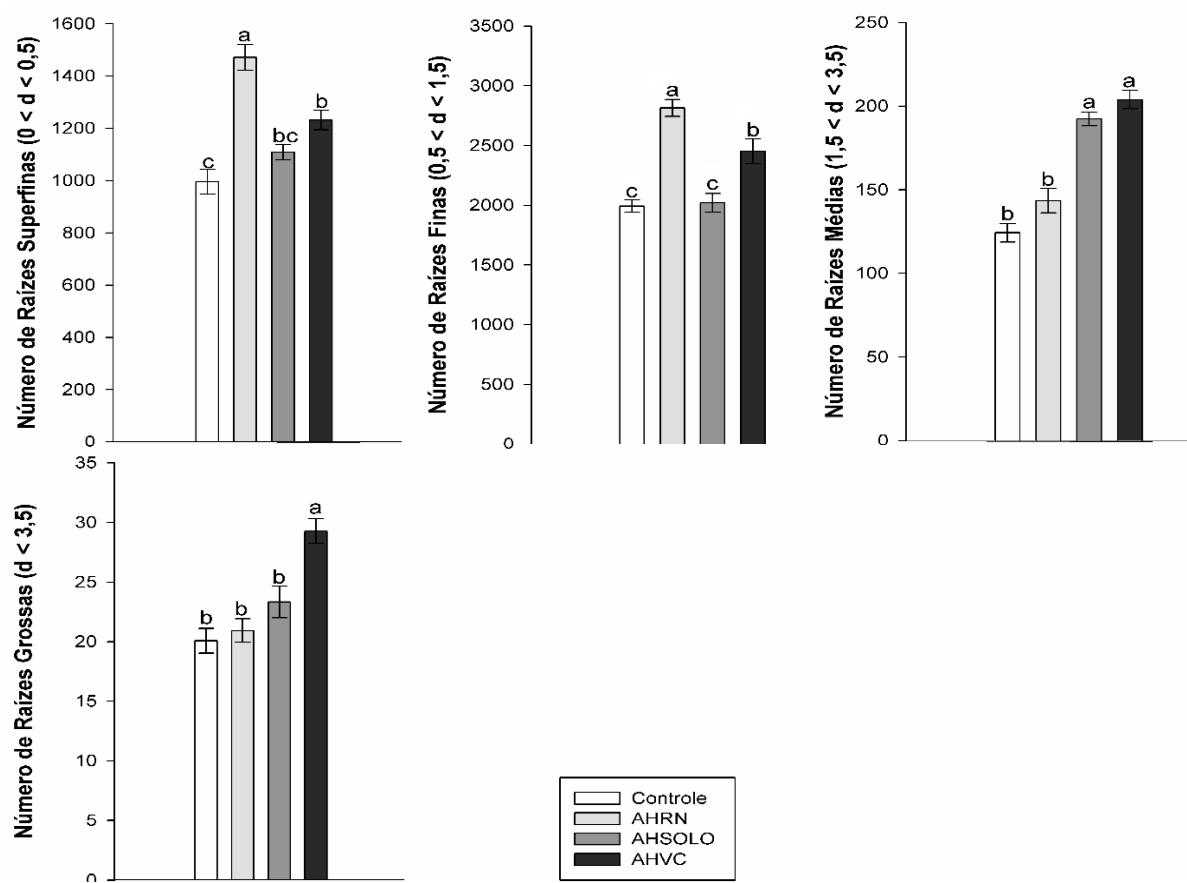


Figura 14. Efeitos dos ácidos húmicos provenientes de diferentes ambientes de formação na quantidade de raízes de arroz da var. BRS Esmeralda de diferentes diâmetros (mm/10).

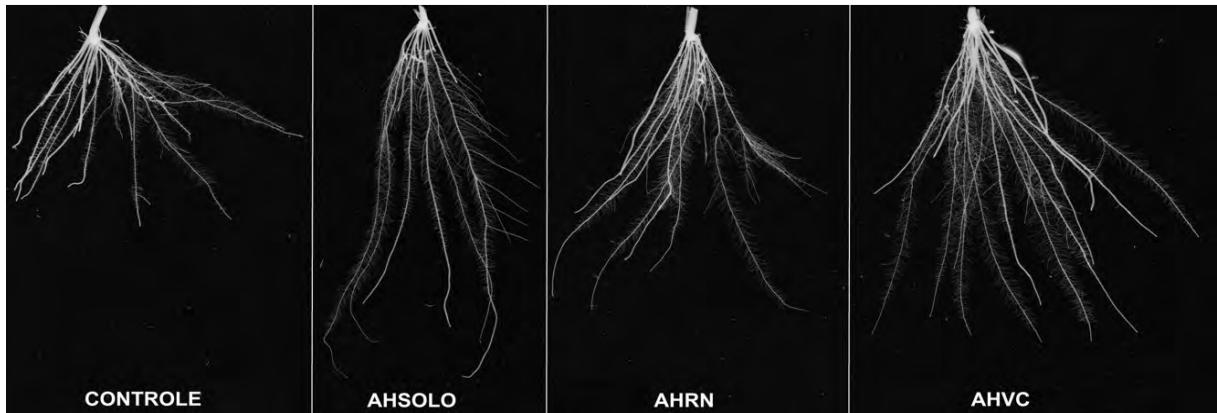


Figura 15. Sistema radicular de plantas de arroz da variedade BRS Esmeralda cultivadas sem e com diferentes tipos de ácidos húmicos.

4.5.4 Teores de pigmentos fotossintéticos

Analizando os resultados obtidos sobre os pigmentos fotossintéticos presentes nas folhas é possível observar que todos os tratamentos com ácidos húmicos apresentaram incremento significativo no teor de clorofila *a*. O teor de clorofila *b* nas folhas de arroz foram significativamente maiores em plantas submetidas a aplicação de AHRN e AHSOLO quando comparados ao controle. O AHVC não resultou em teor de clorofila *b* significativamente maior do que o teor encontrado nas plantas controle, no entanto também não diferiu dos outros tratamentos com ácido húmico (Figura 16).

O teor de carotenóides foi o que apresentou o comportamento mais diferenciado. Enquanto as plantas em que foram aplicados AHRN tiveram aumento significativo no teor, as plantas sob efeito do AHVC tiveram redução do teor de carotenóides, em relação ao controle. O teor de carotenóides em folhas de arroz tratado com AHSOLO não diferiu do observado nas plantas controle e nas plantas submetidas ao AHVC (Figura 16).

Em trabalho realizado por Baldotto et al. (2009) foram observados incrementos nos teores de clorofila *a* e *b* em folhas de abacaxi ‘Vitoria’ submetidas à aplicação de ácidos húmicos. No entanto, os autores notaram que o teor de carotenóides em folhas de plantas tratadas com componentes húmicos sofreram tanto aumento quanto redução em comparação às plantas controle, dependendo da concentração e do material de origem do AH. Os resultados obtidos por estes autores reforçam os aqui observados.

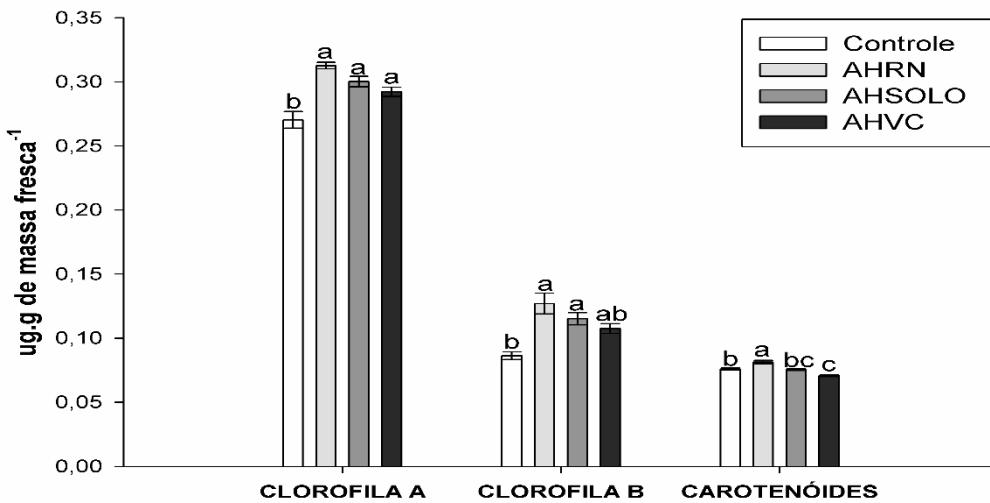


Figura 16. Teores de pigmentos fotossintéticos ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa fresca) em folhas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidos a aplicação de diferentes ácidos húmicos.

4.5.5 Teores de metabólitos solúveis

A Figura 17 mostra que o teor de N-NH_4^+ presente nas raízes de plantas de arroz foi significamente maior pela aplicação de AHRN. As plantas controle e as tratadas com AHVC foram as que apresentaram os menores teores neste órgão, e não diferiram entre si. O teor encontrado em raízes sob aplicação de AHSOLO foi o único que não diferiu significativamente de nenhum outro.

O teor de N-NH_4^+ na bainha sofreu redução significativa nas plantas em que foram aplicados AHSOLO e AHVC, já em plantas que se encontravam sob aplicação de AHRN não houve alterações com significância, quando comparadas às plantas controle (Figura 17).

Nas folhas, o teor de N-NH_4^+ apresentou o mesmo comportamento observado nas raízes. O AHRN resultou em aumento do teor nas folhas em relação ao controle, as plantas submetidas ao AHVC foram as que apresentaram o menor efeito sob o teor de N-NH_4^+ das folhas. As folhas de plantas tratadas com AHSOLO não apresentaram teor de N-NH_4^+ significativamente diferente do observado por qualquer outro tratamento (Figura 17).

Os ácidos húmicos exerceram diferentes efeitos sobre o teor de N-NH_4^+ observado nos órgãos vegetais. O AHRN, talvez pelas suas diferenças estruturais, contribuiu para a manutenção ou aumento do teor nos órgãos vegetais em relação ao controle. Este efeito pode estar associado à expressão de algum transportador de baixa afinidade para amônio, resultando em maior influxo, ou associado à baixa atividade da enzima glutamina sintetase, responsável pela redução de NH_4^+ a glutamina (TAIZ et al., 2017).

O AHVC resultou em plantas com os menores teores de N-NH_4^+ observados, como estas plantas apresentaram maior crescimento e biomassa em relação as outras, é possível que tenha ocorrido uma maior taxa de assimilação de amônio. O observado neste estudo reforça os resultados encontrados por Tavares (2014), onde o autor observou que apenas quando as plantas eram submetidas a maiores doses de NH_4^+ (2,0 mM), o ácido húmico de vermicomposto foi responsável por aumentar o influxo de amônio.

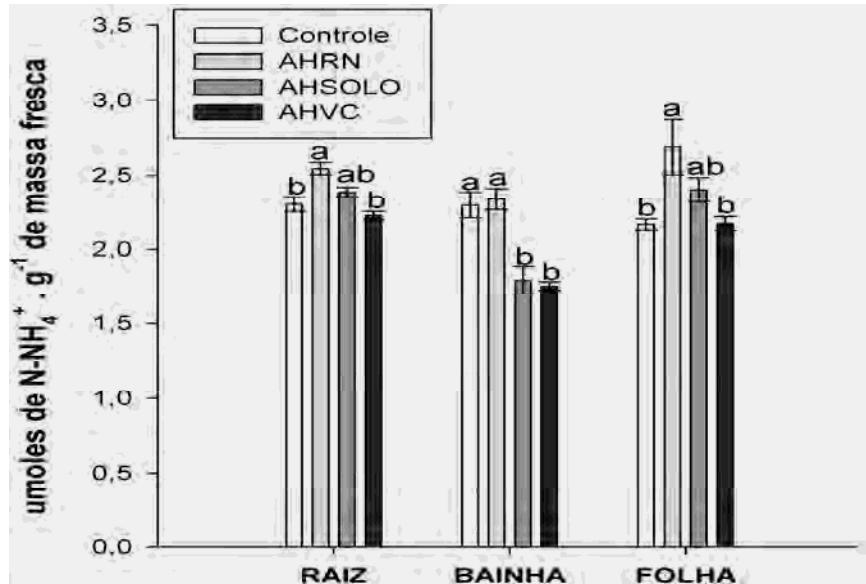


Figura 17. Teores de N-NH₄⁺ (umoles.g⁻¹ de massa fresca) em tecidos de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de diferentes ácidos húmicos.

O teor de N-NO₃⁻ nas raízes foi menor em nível de significância nas plantas tratadas com AHRN e AHSOLO, as raízes tratadas com AHVC apresentaram teor maior do que as plantas controle, no entanto sem diferença significativa (Figura 18).

Na bainha, houve incremento no teor de N-NO₃⁻ significativamente apenas em plantas tratadas com AHVC. Os outros ácidos húmicos não exerceram bioatividade que resultasse em alterações significativas no teor de N-NO₃⁻ neste órgão vegetal (Figura 18).

A aplicação de AHSOLO aumentou o teor de N-NO₃⁻ de maneira significativa nas folhas, enquanto os AHRN e AHVC reduziram este teor nas folhas em relação ao controle, porém, sem diferença estatística com o controle (Figura 18).

Diferentemente do observado para os teores de amônio, a aplicação de AHVC resultou nos maiores teores de N-NO₃⁻ em raízes e bainhas, quando comparado as plantas submetidas aos demais ácidos húmicos. Este efeito pode ser explicado pelo observado por Tavares (2014), em que o autor constatou que a aplicação de ácido húmico de vermicomposto aumenta a expressão de transportadores de NO₃⁻ e isoformas de H⁺-ATPase, contribuindo para o aumento na absorção deste ânion.

O maior teor de N-NO₃⁻ encontrado nas folhas de plantas de arroz pela aplicação de AHSOLO provavelmente está associado a alguma deficiência na assimilação desta molécula na folha, sendo uma justificativa para estas plantas terem apresentado o menor incremento de biomassa (g) entre as plantas tratadas com substâncias húmicas.

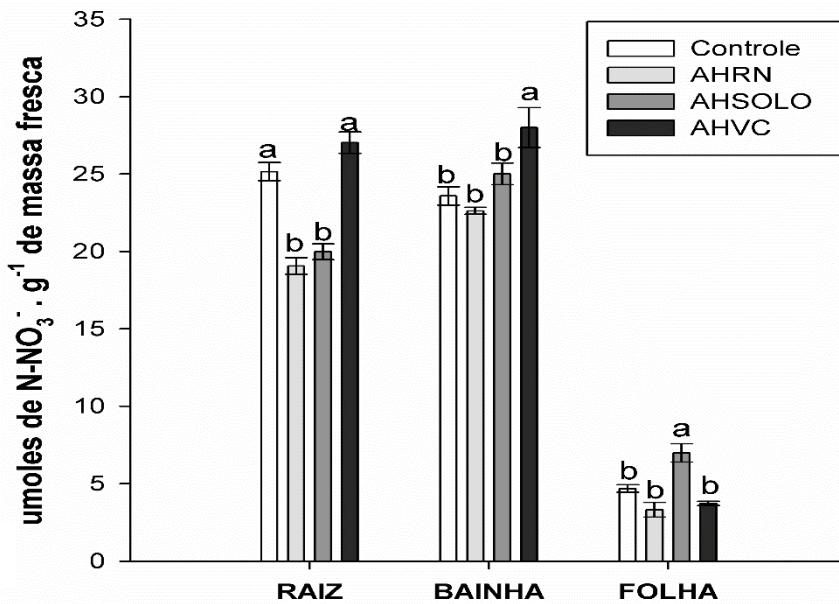


Figura 18. Teores de N-NO_3^- (umoles. g^{-1} de massa fresca) em tecidos de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de diferentes ácidos húmicos.

Os diferentes ácidos húmicos aplicados reduziram o teor de N-amino nas raízes, no entanto a redução no teor por efeito do AHRN não foi o suficiente para diferir significativamente do controle. O teor de N-amino nas raízes de plantas submetidas ao AHVC foi significativamente menor do que o das plantas controle, mas não diferiram das raízes de plantas com AHRN. O AHSOLO resultou no menor teor neste órgão, apresentando diferença significativa com todos os outros tratamentos (Figura 19). Como as raízes de plantas tratadas com o AHSOLO apresentaram as menores biomassas, pode ser que os aminoácidos presentes nas raízes foram utilizados para síntese de proteínas necessárias para regulação de algum processo metabólico.

O efeito no teor de N-Amino na bainha das plantas de arroz foi similar para todos os ácidos húmicos aplicados. Os três tipos diferentes de ácidos húmicos resultaram em redução deste teor em relação com o encontrado na bainha de plantas em condições normais (Figura 19).

Nas folhas houve redução significativa no teor de N-Amino apenas em plantas cultivadas sob aplicação de AHVC, não diferindo os demais tratamentos com ácidos húmicos das plantas testemunhas (Figura 19). O menor teor em folhas pela aplicação deste ácido húmico pode estar associado ao maior crescimento e desenvolvimento destas plantas, sendo um indício de que houve maior consumo de aminoácidos para produção de biomassa.

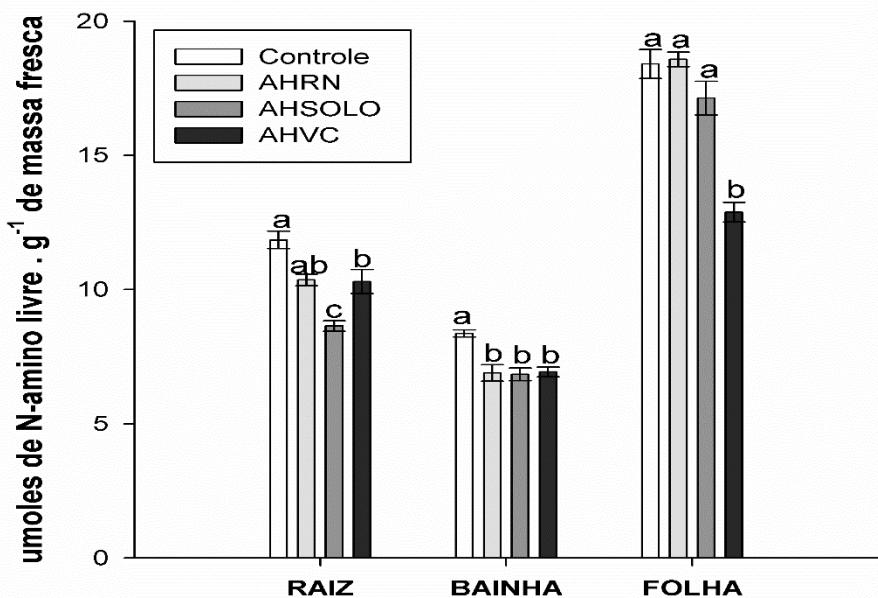


Figura 19. Teores de N-amino livre (umoles.g^{-1} de massa fresca) em tecidos de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de diferentes ácidos húmicos.

O teor de açúcares solúveis na raiz apresentou o mesmo comportamento em todas as plantas submetidas a aplicação de ácidos húmicos, onde todos os tratamentos com presença dessas substâncias resultaram em aumento no teor deste órgão (Figura 20). Segundo Souza (1999), os teores de açúcares solúveis nos tecidos de plantas são indicadores de energia prontamente disponível para o metabolismo das células, sendo assim é possível que haja uma correlação entre o teor encontrado em raízes de plantas tratadas com ácidos húmicos com o seu maior desenvolvimento do sistema radicular.

Na bainha os efeitos desencadeados pelos ácidos húmicos foram distintos, os AHRN e AHSOLO resultaram em diminuição no teor de açúcares solúveis, enquanto o AHVC desencadeou aumento (Figura 20).

Em relação ao controle, o teor de açúcares solúveis nas folhas de plantas tratadas com AHRN foi o único que apresentou aumento significativo. O AHVC apresentou o menor incremento neste teor entre os ácidos húmicos, não diferindo estatisticamente das folhas de plantas controle. O AHSOLO não resultou em diferenças significativas quando comparado com os demais tratamentos, apresentando teor maior do que em plantas com AHVC e menor do que em plantas com AHRN (Figura 20).

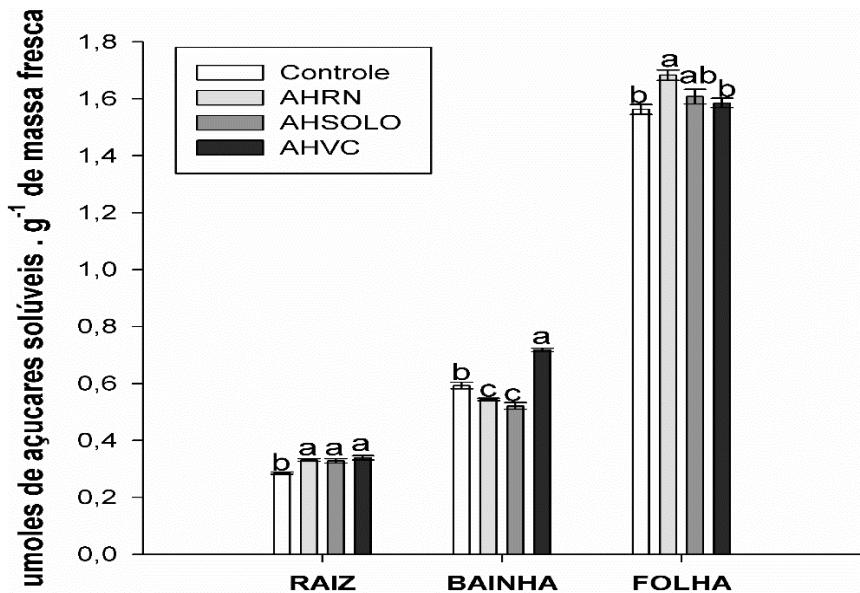


Figura 20. Teores de açucares solúveis (umoles.g⁻¹ de massa fresca) em tecidos de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de diferentes ácidos húmicos.

4.5.6 Caracterização espectroscópica das raízes de plantas de arroz mediante ¹³C NMR CP/MAS submetidas à diferentes tipos de ácidos húmicos

Através dos resultados obtidos pela ressonância magnética nuclear das raízes, pode-se observar que os espectros das diferentes amostras tiveram picos em regiões similares, indicando que no geral não houve alterações perceptíveis nos tipos de carbono presentes nas estruturas radiculares pela aplicação dos ácidos húmicos, havendo então um padrão estrutural nas raízes. No entanto, a quantidade relativa das diferentes estruturas encontradas nestas raízes sofreu alteração (Figura 21 e Tabela 5).

As raízes de plantas tratadas com AHSOLO apresentaram as menores quantidades de estruturas de C_{Alquil}-H,R (carbonos alifáticos não funcionalizados) e de C_{Alquil}-O,N (carbonos alifáticos funcionalizados), sendo os últimos relacionados a estruturas proteicas. O AHVC também levou a um decréscimo na quantidade de carbonos alifáticos não substituídos. As quantidades de C_{Alquil}-O (metoxilas associadas a estruturas lignínicas), foram menores em raízes tratadas com AHRN e AHVC, enquanto as expostas ao AHSOLO mativeram as mesmas quantidades que as plantas controle. A aplicação de AHSOLO foi responsável pelas raízes com as maiores quantidades de C_{Alquil}-di-O (carbono alifático funcionalizado) associados a lipídeos, C_{Aromático}-H,R (carbono aromático não funcionalizado) e C_{Aromático}-O (carbono aromático funcionalizado), pertencentes predominantemente a estruturas lignínicas. Também foi observado relativo aumento na quantidade de carbonos aromáticos não substituídos em raízes submetidas ao AHVC. As quantidades de carboxilas não sofreram alterações pelos diferentes testes aplicados (Figura 21 e Tabela 5).

Umas das mais importantes características da célula vegetal é a presença da parede, que envolve externamente a membrana plasmática e o conteúdo celular, sendo as principais substâncias orgânicas encontradas na parede celular a lignina, proteínas e lipídeos. A parede primária possui alto teor de água, cerca de 65% e o restante, correspondente à matéria seca, é de 90% de polissacarídeos (30% celulose, 30% hemicelulose e 30% pectina) e 10% de proteínas. Já a parede secundária possui um teor de água reduzido devido à deposição de lignina que é um polímero hidrofóbico, sua matéria seca é constituída de 65 a 85% de

polissacarídeos (50 a 80% de celulose e 5 a 30% de hemicelulose) e entre 15 e 35% de lignina (GLORIA & GUERREIRO, 2006).

Desta maneira é possível inferir, através das diferentes quantidades de estruturas observadas no sistema radicular, que o AHRN e AHVC resultaram em raízes com maior proporção de proteínas e maior permeabilidade em relação as demais, sendo provavelmente a formação da parede celular primária favorecida por essas duas substâncias. Por sua vez, o AHSOLO parece ter originado raízes com maiores quantidades de estruturas lignínicas, resultando em menor permeabilidade e em maior rigidez radicular, favorecendo provavelmente a formação da parede secundária. O incremento de lignina e o estímulo ao desenvolvimento da parede secundária em raízes submetidas ao AHSOLO podem estar associados aos maiores diâmetros radiculares observados em plantas tratadas com este ácido húmico.

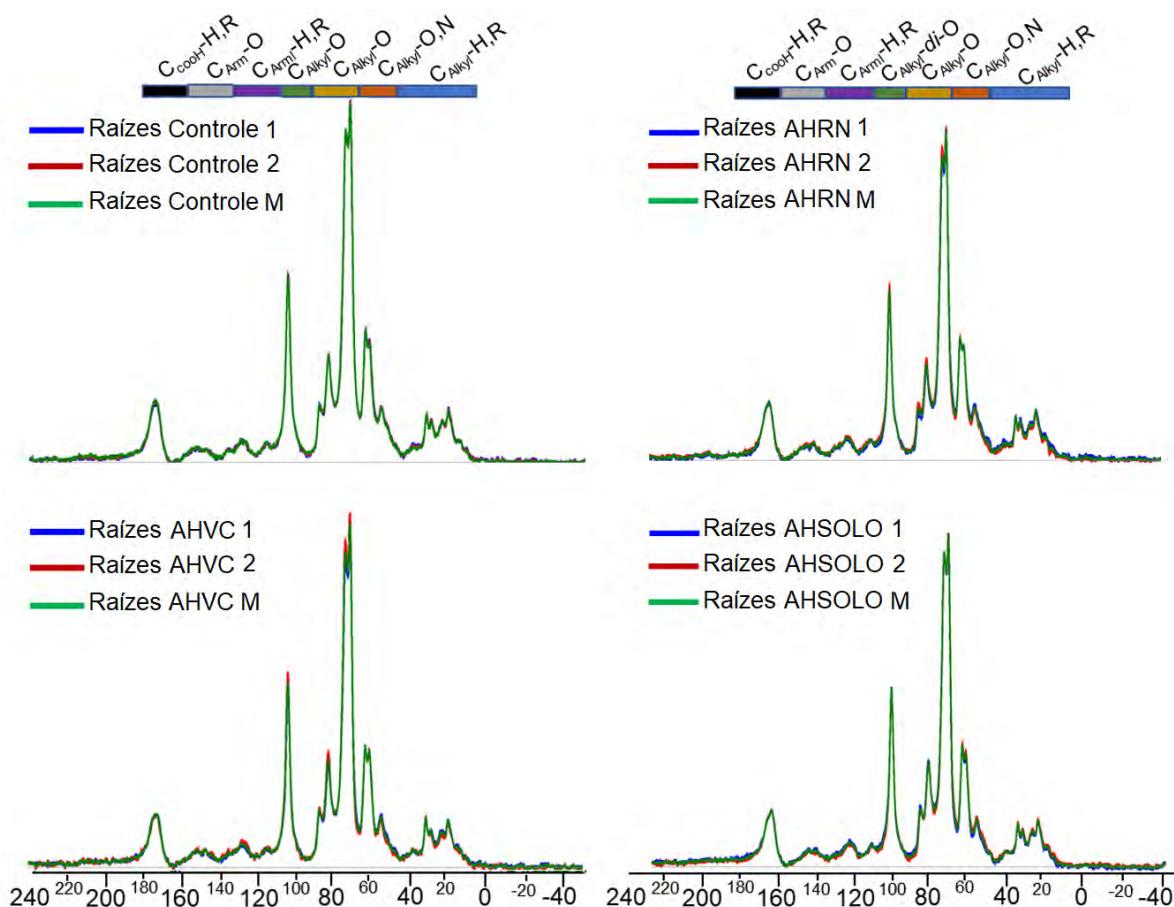


Figura 21. Espectros ^{13}C NMR CP MAS de raízes de plantas de arroz (*Oryza sativa L.*) da var. BRS Esmeralda tratadas com ácidos húmicos extraídos de sedimentos do Rio Negro-AM (AHRN), vermicomposto (AHVC) e Organossolo (AHSOLO).

Tabela 5. Distribuição relativa de tipos de carbono (%) nos espectros ^{13}C NMR CP MAS em raízes de plantas de arroz (*Oryza sativa L.*) submetidas a diferentes ácidos húmicos.

	$\text{C}_{\text{Alq}}\text{-H,R}$ 0-46	$\text{C}_{\text{Alq}}\text{-O,N}$ 46-59	$\text{C}_{\text{Alq}}\text{-O}$ 59-91	$\text{C}_{\text{Alq}}\text{-di-O}$ 91-110	$\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H,R}$ 110-142	$\text{C}_{\text{Ar}}\text{-O}$ 142-156	$\text{C}_{\text{coo}}\text{-H,R}$ 156-186
----- ppm -----							
CONTROLE	13,0208	5,2083	52,0833	12,5000	5,7292	3,1250	8,3333
AHRN	13,1579	5,7895	51,5789	12,1053	5,7895	3,1579	8,4211
AHVC	12,3711	5,1546	51,5464	12,3711	6,7010	3,6082	8,2474
AHSOLO	10,4167	4,1667	52,0833	13,5417	7,2917	4,1667	8,3333

A Figura 22A foi elaborada a partir da análise qualitativa dos espectros puros trabalhados no Software ACD/Labs v.12.01 e obtidos pela ^{13}C NMR CP MAS de raízes de plantas de arroz (*Oryza sativa L.*) da var. BRS Esmeralda cultivadas em condição normal (controle) e sob aplicação de AHRN, AHVC e AHSOLO. Este gráfico demonstra as diferenças existentes entre os espectros das amostras submetidas aos diferentes tratamentos, as quais não são totalmente perceptíveis apenas observando os picos espectrais.

A análise das componentes principais, representada na Figura 22A, explicou 85% da variabilidade total dos dados. A primeira componente principal (CP-1) foi responsável por explicar 70% da variação, enquanto a segunda componente (CP-2) explicou 15%. A média amostral das raízes tratadas com o AHRN correlacionou-se negativamente com as duas primeiras componentes, enquanto em contrapartida, a média das amostras radiculares submetidas ao AHVC correlacionou-se positivamente com ambas as dimensões. Já as raízes controle apresentaram correlação positiva com a segunda componente, porém negativa com a primeira, sendo o oposto observado na média das raízes em que foram aplicadas AHSOLO.

Pela análise geral desta Figura, fica evidente as alterações no perfil metabólico das raízes mediante os diferentes ácidos húmicos aplicados. É possível perceber, apesar das diferenças, que as raízes de plantas submetidas ao AHSOLO e AHVC apresentaram espectros que demonstram certa semelhança nos seus perfis metabólicos, uma vez que estas estão associadas positivamente a primeira componente principal, responsável por explicar o maior percentual de variabilidade dos dados. Enquanto as raízes tratadas com AHRN aparecem como as que apresentaram os espectros menos distintos em comparação aos obtidos em raízes de plantas sem aplicação de ácido húmico.

A análise das componentes principais baseada distribuição relativa dos tipos de carbono em raízes de plantas de arroz (*Oryza sativa L.*) da var. BRS Esmeralda cultivadas em condição normal (controle) e sob aplicação de AHRN, AHVC e AHSOLO, representada na Figura 22B, justificou 86% da variabilidade nas duas primeiras componentes, sendo 76% da variação justificada pela componente principal 1 (CP-1). Já a componente principal 2 (CP-2) explicou 10% da variabilidade dos dados.

As estruturas de carbono $\text{C}_{\text{Alquil}}\text{-H,R}$ e $\text{C}_{\text{Alquil}}\text{-O,N}$ apresentam alta correlação entre si, estando positivamente correlacionadas ao primeiro componente e correlacionadas de maneira negativa ao segundo componente. As estruturas anteriormente citadas apresentam correlação negativa com as estruturas do tipo $\text{C}_{\text{Alquil}}\text{-O}$, sendo esta positivamente correlacionada com a segunda componente, e negativamente correlacionada com a primeira componente. Já os tipos de carbono responsáveis por estruturas aromáticas ($\text{C}_{\text{Arom}}\text{-O,N}$ e $\text{C}_{\text{Arom}}\text{-H,R}$) possuem elevada correlação entre si, e estão associados negativamente tanto ao primeiro quanto ao segundo componente.

As raízes de plantas que não foram submetidas a aplicação de ácidos húmico apresentam as correlações positivas mais baixas com as quantidades de estruturas de carbono analisadas. As raízes de plantas tratadas com AHRN apresentam forte correlação

positiva com as estruturas $C_{Alkyl}-H,R$ e $C_{Alkyl}-O,N$. A aplicação de AHVC e de AHSOLO resultou em raízes que apresentam alta correlação com as estruturas de carbono do tipo $C_{Alquil}-O$, $C_{Alquil}-di-O$, $C_{Arom}-O,N$ e $C_{Arom}-H,R$, demonstrado as similaridades observadas no perfil metabólico dessas raízes. Porém, as raízes tratadas com AHSOLO estão mais fortemente correlacionadas as estruturas aromáticas observadas, enquanto as tratadas com AHVC apresentam maior correlação com as estruturas alifáticas funcionalizadas (Figura 22B).

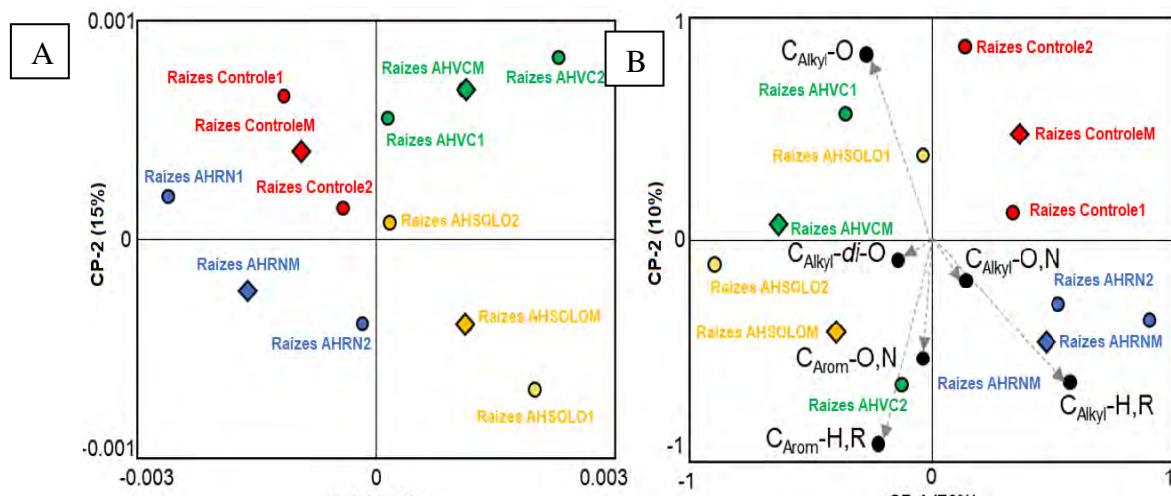


Figura 22. A) Análise das componentes principais dos espectros puros obtidos por ^{13}C NMR CP MAS de raízes de plantas de arroz (*Oryza sativa L.*) da var. BRS Esmeralda cultivadas em condição normal (controle) e sob aplicação de AHRN, AHVC e AHSOLO. B) Análise das componentes principais para a distribuição relativa de tipos de carbono em raízes de plantas de arroz (*Oryza sativa L.*) da var. BRS Esmeralda cultivadas em condição normal (controle) e sob aplicação de AHRN, AHVC e AHSOLO.

4.5.7 Análises de componentes principais

A análise de componentes principais baseada nos parâmetros morfológicos radiculares, na biomassa fresca e seca de raízes, bainhas e folhas, explicou 62,4 % da variabilidade total nas duas primeiras componentes, sendo que 41,9% da variância foi explicada pela componente principal 1 (Dim1), estando positivamente ligado a maioria das variáveis. A componente principal 2 (Dim2) explicou 20,5% da variabilidade dos dados, sendo o diâmetro radicular positivamente correlacionado à esta componente, e negativamente correlacionado a primeira componente (Figura 23).

As variáveis comprimento, área e, principalmente, diâmetro radicular são as mais positivamente correlacionadas ao tratamento com AHSOLO. O diâmetro radicular está negativamente associado às variáveis: quantidade de raízes finas, massa seca radicular e quantidade geral de raízes. O volume e quantidade de raízes e a massa fresca e seca de todos os órgãos vegetais estão correlacionados de forma positiva à aplicação de AHVC. As variáveis massa fresca de raízes e de folhas, e massa seca de bainhas e de folhas, estão correlacionadas de forma extremamente positiva. A maioria das variáveis estão negativamente relacionadas às amostras sem aplicação de ácido húmico (Figura 23).

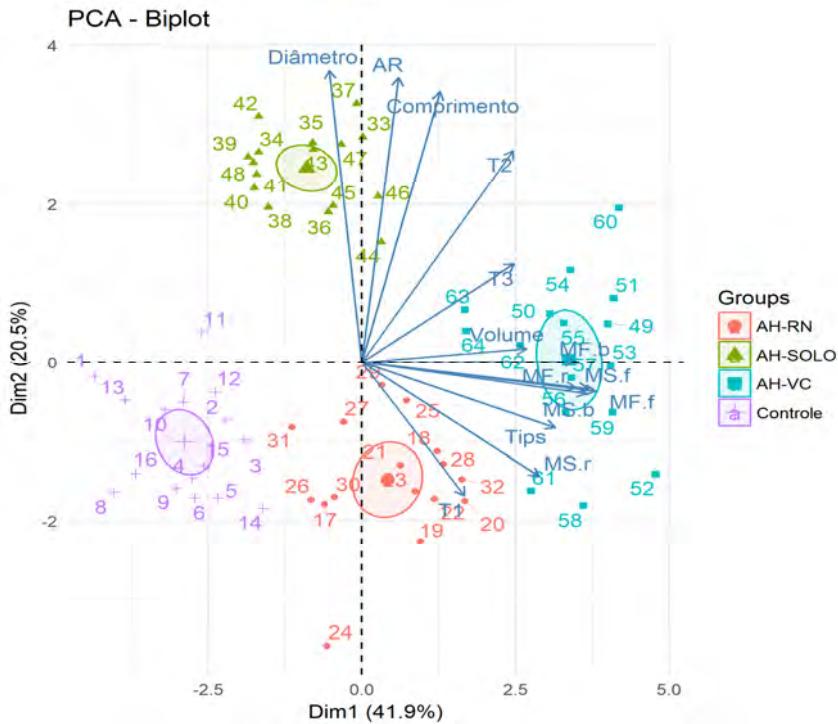


Figura 23. Análise das componentes principais para as nove variáveis radiculares mensuradas e para as massas frescas e secas (g) das raízes, bainhas e folhas de arroz da var. BRS Esmeralda em condição normal (controle) e sob aplicação de AHRN, AHVC e AHSOLO.

A partir da Figura 24, é possível afirmar que as duas primeiras componentes principais explicaram 67,4 % da variabilidade total dos dados, baseados nos teores de metabólitos solúveis em raízes, bainhas e folhas, e nos teores de pigmentos fotossintéticos. A primeira componente principal (Dim1) foi responsável por explicar 39,2% da variação, enquanto a segunda componente (Dim2) explicou 28,2% da variância.

O controle está associado fortemente, de forma positiva, à componente principal 2, estando os teores de amino livre em bainhas e raízes correlacionados positivamente a este tratamento. Os teores de clorofila *a* e *b*, e o teor de açucares solúveis em raízes, estão correlacionados positivamente ao teste com AHSOLO. O AHRN está positivamente ligado ao teor de carotenóides e ao teor de NH_4^+ em raízes e folhas. Já o teor de NO_3^- e de açucares solúveis na bainha apresentou correlação positiva com o teste contendo AHVC (Figura 24).

Os teores de amino livre nas raízes e bainhas apresentam uma alta correlação positiva entre si, estando relacionados de forma negativa aos teores de açucares solúveis em raízes, e de clorofilas *a* e *b*. Os teores de NH_4^+ e de NO_3^- nas bainhas, assim como os teores de NO_3^- nas raízes e de NH_4^+ nas folhas e raízes, correlacionaram-se de maneira negativa (Figura 24).

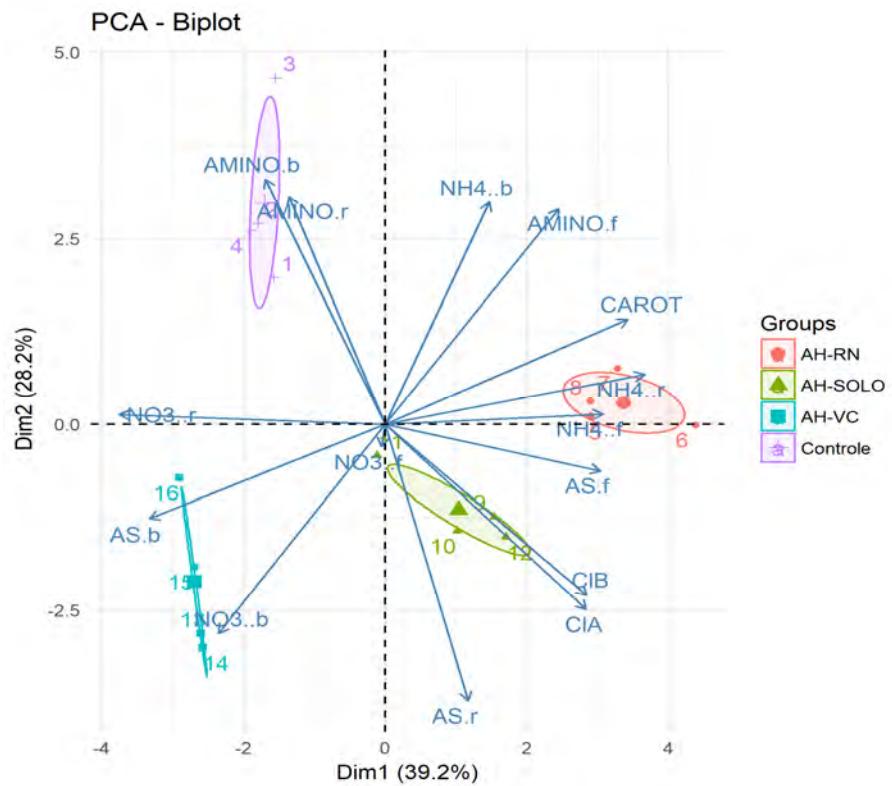


Figura 24. Análise das componentes principais para os teores de metabólitos solúveis e de pigmentos fotossintéticos de arroz da var. BRS Esmeralda em condição normal (controle) e sob aplicação de AHRN, AHVC e SOLO.

4.6 CONCLUSÕES

As plantas tratadas com os AH extraídos de diferentes materiais apresentaram aumento no desempenho fotossintético 144 horas após aplicação, tendo ocorrido inicialmente um decréscimo. A redução inicial na eficiência fotossintética atuou como um fator de sinalização para as plantas, o que posteriormente levou ao aumento do desempenho vegetal.

Os ácidos húmicos com maior alifaticidade, AHVC e AHRN, foram responsáveis por um maior incremento na produção de biomassa fresca e seca das plantas, assim como no número de raízes. Já o ácido húmico que apresentou maior grau de aromaticidade estimulou em maior intensidade o aumento do comprimento e do diâmetro médio das raízes.

Houve modificações diferenciadas nas características estruturais das raízes por efeito dos ácidos húmicos, associadas ao desenvolvimento da parede celular vegetal. O AHSOLO, mais hidrofóbico, resultou em raízes de plantas com maior quantidade de estruturas associadas a presença de lignina, havendo estimulado o aumento na quantidade de raízes de maior diâmetro.

O AH de maior polaridade foi responsável pelo maior teor de NO_3^- nas raízes, enquanto os demais resultaram em maior teor de NH_4^+ . As plantas tratadas com o AH mais hidrofóbico apresentaram o menor teor de aminoácidos livres nas raízes, enquanto o mais polar apresentou o menor teor deste metabólito solúvel nas folhas.

5. CAPÍTULO III

EFEITO DE ÁCIDO HÚMICO DE VERMICOMPOSTO EM PLANTAS DE ARROZ (*ORYZA SATIVA L.*) SOB CONDIÇÃO HÍDRICA ADVERSA

5.1 RESUMO

As substâncias húmicas são responsáveis por diversos efeitos positivos em condições adversas, tanto no solo quanto nas plantas. Diversos estudos têm sido realizados nesta área, visando compreender os mecanismos pelos quais os AH exercem sua bioatividade. Os ácidos húmicos extraídos de vermicomposto têm sido os mais utilizados e promissores, sendo uma alternativa para a produção vegetal sustentável. A disponibilidade de água é o fator ambiental que mais limita a sustentabilidade dos sistemas agrícolas, uma vez que a maior parte da biomassa fresca das plantas é composta por água, correspondendo ao principal constituinte vegetal. Devido aos efeitos benéficos evidenciados dos ácidos húmicos em condições de menor disponibilidade de água, o objetivo deste capítulo foi avaliar os efeitos de AH extraído vermicomposto (AHVC) no desenvolvimento, morfologia e metabolismo de plantas de arroz submetidas a estresse hídrico. A espécie utilizada no estudo foi o arroz (*Oryza sativa L.*) da variedade BRS Esmeralda, cultivado em casa de vegetação climatizada, localizada no Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Visando estabelecer a dose de melhor resposta do AH, foram previamente testadas concentrações crescentes (0, 2, 5, 10, 30 e 50 mg de AH.L⁻¹), e avaliada qual a que mais estimulou o desenvolvimento das plantas, sendo a de 5 mg de AHVC.L⁻¹. As plantas foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland a ½ força iônica e N-NO₃⁻ a 2 mM, e o pH ajustado a 5,6. Quinze dias após o transplantio se iniciou a aplicação do ácido húmico de vermicomposto, após cinco dias de tratamento as plantas foram coletadas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (Controle; AH; PEG-6000; AH+PEG-6000) e vinte repetições, sendo o estresse hídrico induzido de forma gradual. As análises estatísticas foram realizadas no programa Statgraphic plus v.5.5 e no software estatístico R, os testes de médias foram feitos por tukey ($p<0,05$) e a ordenação dos dados foi realizada pela análise de componentes principais. Foram avaliados parâmetros do metabolismo fotossintético, desenvolvimento radicular, acúmulo de biomassa, pigmentos fotossintéticos e metabólitos solúveis. A aplicação de AHVC em plantas sob estresse hídrico foi eficiente para a manutenção do índice de desempenho fotossintético, impedindo que o desempenho fosse abaixo do observado em plantas cultivadas em condições normais e ao de plantas submetidas ao PEG-6000. O ácido húmico desencadeou efeito protetor no metabolismo e crescimento vegetal em condições de baixa disponibilidade de água, amenizando as reduções na biomassa das plantas, e na emissão, comprimento, área, volume e diâmetro das raízes, uma vez que as plantas tratadas com AH+PEG apresentaram valores maiores de biomassa fresca e de todos os parâmetros relacionados ao sistema radicular do que as plantas submetidas apenas ao PEG-6000. Os teores de metabólitos solúveis, assim como a biomassa seca das plantas, demonstraram que este AH atuou na regulação osmótica das plantas, auxiliando na proteção ao estresse.

Palavras-chave: Substância húmica. Bioatividade. Proteção. Estresse Hídrico.

5.2 ABSTRACT

Humic substances are responsible for several positive effects on soil and plants under adverse conditions. Several studies have been conducted in this area, aiming to understand the mechanisms by which HA exert their bioactivity. Humic acids extracted from vermicompost have been the most used and promising, being an alternative for sustainable crop production. Water availability is the environmental factor that most limits the sustainability of agricultural systems, since most of the fresh plant biomass is composed of water, corresponding to the main plant constituent. Due to the evidenced beneficial effects of humic acids in conditions of less water availability, the objective of this chapter was to evaluate the effects of vermicompost extracted HA (HAVC) on the development, morphology and metabolism of water stress-conditioned rice plants. The species used in the study was the rice (*Oryza sativa* L.) of the BRS Esmeralda variety, grown under a greenhouse, located in the Department of Soils of the Federal Rural University of Rio de Janeiro. In order to establish the dose of better AH response, increasing concentrations (0, 2, 5, 10, 30 and 50 mg of HA.L⁻¹) were previously tested, and the most stimulated the development of the plants was evaluated, with 5 mg of HAVC.L⁻¹. The plants were cultured in Hoagland nutrient solution at ½ ionic strength and 2 mM N-NO₃-, and the pH adjusted to 5.6. Fifteen days after transplanting, the humic acid of vermicompost was started, after five days of treatment the plants were collected. The experimental design was completely randomized, with four treatments (Control, HA, PEG-6000, HA + PEG-600) and twenty repetitions, with water stress being gradually induced. Statistical analyzes were performed in the Statgraphic plus v.5.5 program and in the R statistical software, mean tests were done by tukey ($p < 0.05$) and the ordering of the data was performed by principal components analysis. The parameters of photosynthetic metabolism, root development, biomass accumulation, photosynthetic pigments and soluble metabolites were evaluated. The parameters of photosynthetic metabolism, root development, biomass accumulation, photosynthetic pigments and soluble metabolites were evaluated. The application of AHVC in plants under water stress was efficient to maintain the photosynthetic performance index, preventing the performance to be below that observed in plants grown under normal conditions and those submitted to PEG-6000. Humic acid triggered a protective effect on metabolism and plant growth under conditions of low water availability, softening reductions in plant mass, and on emission, length, area, volume and diameter of roots, since plants treated with AH + PEG showed higher values of fresh biomass and all root system related parameters than plants submitted only to PEG. The soluble metabolites contents, as well as the dry biomass of the different plant parts, demonstrated that this HA acted in the osmotic regulation of the plants, helping in the protection against stress.

Key words: Humic substance. Bioactivity. Protection. Water stress.

5.3 INTRODUÇÃO

As substâncias húmicas influenciam diretamente a estrutura física, química e microbiológica dos ambientes onde estão presentes, assim como afetam o metabolismo e o crescimento das plantas. Uma das principais vantagens dessas substâncias é que são compostos produzidos como resultado de processos naturais. As SH obtidas a partir de vermicomposto constituem as mais usadas e promissoras, e seu uso na produção de plantas pode ser uma via para o desenvolvimento sustentável (CANELLAS et al., 2005).

Entender as relações entre estrutura-propriedade-função das substâncias húmicas se faz importante para explicar os mecanismos pelos quais atuam no organismo vegetal. Os efeitos dos ácidos húmicos no sistema de defesa das plantas têm sido grande alvo de pesquisas nas últimas décadas (GARCÍA, 2013). Diversos estudos demonstram os benefícios dos ácidos húmicos em plantas submetidas a diferentes estresses, como o estresse salino, toxidez por metais pesados, por alumínio, por efeito de herbicidas e pesticidas, estresse hídrico, entre outros (BURNS et al., 1986; ÇIMRIN et al., 2010; GARCÍA et al., 2012; OUNI et al., 2014; GARCÍA et al., 2014; BÜYÜKKEŞİN et al., 2015).

De forma geral, os estresses abióticos têm grande influência negativa nos rendimentos vegetais, ainda mais se acontecerem combinações destes, o que em muitos casos são fatais para o desenvolvimento das culturas (MITTLER, 2006). Em consequência da baixa disponibilidade de água ocorre redução na condutância estomática, alteração no potencial hídrico dos órgãos vegetais, na taxa de assimilação de CO₂ e na taxa de transpiração (TAIZ et al., 2017). Assim como outras espécies, o arroz reage ao déficit hídrico com reduções na área foliar e na produção de biomassa, redução na altura da planta, abortamento de perfilhos, atraso do estágio reprodutivo, e alterações na profundidade de enraizamento e massa seca das raízes (GUIMARÃES et al., 2011).

Sabe-se que o estresse hídrico acelera a produção de EROS nas plantas. As EROS nem sempre constituem espécies nocivas pois naturalmente as plantas produzem quantidades de O₂⁻ de 140 µM.s⁻¹ e 0,5 µM.s⁻¹ de H₂O₂ em cloroplastos. No entanto, a presença de um estresse quebra a homeostase e acrescenta esses conteúdos até 720 µM.s⁻¹ de O₂⁻ e 15 µM.s⁻¹ de H₂O₂ (MITTLER, 2002; MITTLER et al., 2004).

Os ácidos húmicos têm demonstrado capacidade de reduzir os efeitos negativos resultantes da baixa disponibilidade de água em diferentes espécies de plantas. A aplicação de SH em plantas submetidas a essas condições exerce influência no sistema de defesa oxidativo, nos teores de pigmentos fotossintéticos e nos teores de prolina. Foi demonstrado que o “estresse coloidal” resultante do acúmulo de ácidos húmicos nas raízes, o que causa entupimento dos poros, é responsável por alterações metabólicas e pela regulação dos níveis de EROS e atividade de enzimas anti-oxidativas (ALI & NEUMANN, 2009; GARCÍA et al., 2012, 2014; AGUIAR et al., 2016).

Devido a série de efeitos benéficos evidenciados dos ácidos húmicos em plantas sob condições adversas, este capítulo teve como objetivo discutir as respostas morfológicas, metabólicas e no crescimento de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) da variedade BRS. Esmeralda pela aplicação de ácido húmico de vermicomposto submetidas a estresse hídrico.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Localização e caracterização do experimento

O experimento foi conduzido no Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizada em Seropédica-RJ. As atividades ocorreram no Laboratório de Química Biológica do Solo, no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas e no Laboratório de Estudos das Relações Solo-planta. A espécie utilizada no estudo foi o arroz (*Oryza sativa L.*) da variedade BRS Esmeralda, cultivado em casa de vegetação climatizada (Figura 25).



Figura 25. Ensaio experimental na casa de vegetação.

As sementes de arroz foram desinfestadas previamente com hipoclorito de sódio (2%) por 10 minutos e posteriormente lavadas com água destilada. Em seguida, as sementes foram transferidas a potes com gaze que continham somente água destilada. Quatro dias após a germinação das sementes, as plântulas receberam uma solução de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950) modificada a 1/8 da força iônica total. Após dois dias foi trocada a solução de Hoagland para 1/4 da força iônica total, e novamente trocada depois de mais dois dias para 1/2 força iônica total. Dois dias após a última troca de solução, as plantas foram transplantadas para potes de 0,7L contendo solução de Hoagland a 1/2 força iônica total. Todas as soluções preparadas tinham como fonte de nitrogênio N-NO₃⁻ a 2mM e pH ajustado a 5,6. Quinze dias após o transplantio foi iniciada a aplicação dos tratamentos, e cinco dias após o início dos testes ocorreram as coletas.

5.4.2 Aplicação dos tratamentos

Foi realizado um ensaio experimental onde ocorreu aplicação de ácido húmico via sistema radicular em plantas de arroz da var. BRS Esmeralda sob condições normais e de déficit hídrico induzido por polietileno glicol (PEG-6000). Adotaram-se quatro tratamentos: controle; AH (5 mg.L⁻¹); PEG-6000; AH (5 mg.L⁻¹) + PEG-6000. As plantas foram submetidas ao estresse hídrico de forma gradual, no início dos tratamentos a indução ao estresse se deu por PEG-6000 aos 15%, um dias após a aplicação do PEG a concentração foi alterada para

20%, e passados mais dois dias foi aplicado PEG aos 25%, permanecendo nesta concentração até o momento da coleta.

O ácido húmico selecionado e utilizado foi o extraído de vermicomposto, uma vez que pela avaliação dos dados e resultados obtidos no capítulo 2 deste documento, de uma forma geral, este AH apresentou os melhores efeitos no desenvolvimento e metabolismo das plantas de arroz da var. BRS Esmeralda em comparação com as demais substâncias húmicas testadas. A dose de AHVC aplicada neste experimento foi a mesma utilizada anteriormente, selecionada por ser a melhor concentração obtida em resultados de experimento prévio (Figura A1 e A2), sendo 5 mg de AHVC.L⁻¹, diluída diariamente na solução.

5.4.3 Avaliação da cinética de emissão da fluorescência transiente da clorofila *a*

A fluorescência transiente da clorofila *a* foi medida utilizando-se um fluorômetro portátil (HandyPEA, Hanstech, King's Lynn, Norkfolk, UK). Os clipe utilizados para estas medições foram colocados no terço médio de folhas jovens completamente expandidas, durante os cinco dias após o início dos tratamentos, às 7:00, e as medições foram realizados 20 minutos após a adaptação das folhas ao escuro. A emissão de fluorescência foi induzida em uma área de 4 mm de diâmetro da folha pela exposição da amostra a um pulso de luz saturante numa intensidade de 3.000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sendo o intervalo entre os pulsos de 500ms. A partir da curva de emissão de fluorescência transiente obtida, as intensidades determinadas a 50 μs (fluorescência inicial - F_0), 100, 300 μs , 2 e 30 ms e F_M (fluorescência máxima), foram utilizadas para o cálculo dos parâmetros estabelecidos pelo Teste JIP (STRASSER e STRASSER, 1995) (Tabela 6).

Tabela 6. Principais parâmetros do teste JIP (Adaptada de YUSUF et al., 2010).

Parâmetros de fluorescência calculados a partir dos dados primários obtidos	
$F_V = F_M - F_0$	Fluorescência variável.
F_V/F_M	Rendimento quântico máximo do FSII.
$V_t V_j$	Fluorescência variável relativa em um tempo "t".
V_i	Fluorescência variável relativa em relação ao nível J.
$M_0 = 4(F300\mu\text{s} - F_0)/(F_M - F_0)$	Declive inicial aproximado (em ms^{-1}) da fluorescência transiente $V = f(t)$.
$S_s = V_j/M_0$	Área total normalizada complementar correspondente apenas a fase OJ (reflete um único volume de eventos de redução de Q_A).
$S_m = (\text{Area})/(F_M - F_0)$	Área total normalizada complementar acima da curva OJIP (reflete múltiplos eventos de redução da Q_A).
$N = S_m/S_s$	Número total de elétrons transferidos para a cadeia de transporte de elétrons entre o tempo de 0 et (necessário para atingir F_M).
Atividade específica por centro de reação (RC)	
$ABS/RC = M_0 (1/V_j) (1/\phi Po)$	Medida do tamanho aparente do sistema antena ou o fluxo de absorção por RC.

Continua...

Continuação da **Tabela 6.**

Atividade específica por centro de reação (RC)	
$TR_0/RC = M_0 (1/V_J)$	Máxima taxa pela qual um exciton é capturado pelo RC resultando em uma redução da plastoquinona (QA^-).
$ET_0/RC = M_0 (1/V_J) \Psi_0$	Reoxidação da QA^- via transporte de elétrons em um RC ativo.
$DI_0/RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)$	Razão de dissipação total de energia de excitação não capturada do total de RC, sendo a dissipação neste caso à perda de energia na forma de calor.
RE_0/RC	Redução do aceptor final de elétrons no lado do aceptor de elétrons do FSI por RC.
Rendimentos energéticos ou taxas de fluxo	
$\phi P_0 = TR_0/ABS = F_v/F_M$	Rendimento quântico máximo fotoquímico.
$\phi E_0 = ET_0/ABS$	Rendimento quântico de transporte de elétrons de QA^- para o intersistema de aceptores de elétrons.
$\phi D_0 = 1 - \phi P_0 = (F_0/F_M)$	Rendimento quântico para dissipação de energia.
$\phi R_0 = RE_0/ABS$	Rendimento quântico de transporte de elétrons de QA^- para o aceptor final de elétrons do FSI.
Eficiências	
$\psi E_0 = ET_0/TR_0$	Eficiência com que um exciton capturado no RC pode mover um elétron de QA^- para o intersistema de aceptores de elétrons.
$\rho_0 = RE_0/TR_0$	Eficiência com que um exciton capturado no RC pode mover um elétron dentro da cadeia de transporte de elétrons de QA^- para os aceptores finais de elétrons do FSI.
$\delta R_0 = RE_0/ET_0$	Eficiência com que um elétron pode mover o intersistema de aceptores de elétrons reduzidos no intersistema para o aceptor final de elétrons do FSI.
Índices de desempenho	
$PI_{ABS} = (RC/ABS) B (\phi_{P0}/10S\phi_{P0})$	Índice de desempenho fotossintético (conservação de energia a partir do exciton para a redução dos aceptores de elétrons do intersistema).
$0Si (\Psi_0/10\Psi_0) = (RC/ABS) B (TR_0/DI_0) \times (ET_0/1TSET_0)$	Índice de desempenho fotossintético total (conservação de energia a partir de exciton para a redução de aceptores finais do FSI).
$PI_{total} = PI_{ABS} BS (\delta 0/1B\delta_0)$	

5.4.4 Avaliação da massa fresca e seca da parte aérea e radicular

Para avaliação da massa fresca das plantas, após a coleta foram separadas e pesadas as folhas, bainhas e raízes de cada planta individualmente, utilizando balança digital com precisão de quatro casas decimais.

Em seguida, as plantas foram armazenadas em envelopes de papel e transferidas para estufa secadora, permanecendo assim por 72 horas à 60 °C. Passado esse período pesou-se a massa seca do sistema radicular e dos órgãos da parte aérea de cada planta, utilizando balança digital de precisão.

5.4.5 Análise da morfologia e desenvolvimento radicular

A avaliação do desenvolvimento do sistema radicular das plantas mediante os diferentes caracteres morfológicos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Tavares (2014). Resumidamente, o sistema radicular das plântulas de arroz foi uniformemente distribuído em uma camada de água em bandeja transparente de acrílico (30 cm x 20 cm) para

a digitalização em resolução de 600 dpi (Figura 9. C). Utilizou-se um sistema de digitalização Epson Expression 10000XL com uma unidade de luz adicional (ULA), onde as imagens das raízes foram convertidas para um formato em tons de cinza de oito bits. Os limites das imagens foram definidos e então importados para o software WinRHIZO, 2012b (Régent Instruments, Quebec, Canadá Inc.) para análise dos caracteres da raiz e para sua quantificação. As imagens foram analisadas usando um grid de calibração com uma escala de referência e alteraram-se as configurações de entrada para raízes pálidas em um fundo preto (WinRhizo Arabidopsis 2012b). Em seguida os dados foram gerados através do software XLRhizo (Régent Instruments, Quebec, Canadá Inc.).

Foram analisados e quantificados cinco parâmetros radiculares: número de raízes, comprimento médio (mm), área de superfície (mm^2), diâmetro médio (mm) e volume (mm^3). Também foi definido e medido o número de raízes mediante classificação em classes quanto ao diâmetro: superfinas ($< 0,5 \text{ mm}$), finas ($0,5 - 1,5 \text{ mm}$), médias ($1,5 - 3,5 \text{ mm}$) e grossas ($> 3,5 \text{ mm}$).

5.4.6 Determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos

A determinação dos teores de clorofilas *a* e *b* e de carotenóides ocorreu de acordo com Lichtenthaler (1987). Em frascos tipo falcon contendo 10 mL de acetona 80%, foram adicionados 100 mg de folhas frescas fragmentadas. Os tubos foram levados para agitação sob baixa temperatura durante 72 horas, sempre no escuro. Após esse período, as amostras foram levadas para a leitura espectrofotométrica, sendo o espectrofotômetro zerado com a solução cetônica. Os comprimentos de onda utilizados para a leitura foram de 661,6 nm para clorofila *a* (Ca); 644,8 nm para clorofila *b* (Cb); e de 470 nm para carotenóides (caroteno + xantofilas).

O cálculo da concentração da clorofila *a*, da clorofila *b* e dos carotenóides foi realizado de acordo com as equações abaixo, e expressas em ug por mL de extrato: Clorofila *a* = 11,24 [A661,6] - 2,04 [A644,8]; Clorofila *b* = 11,24 [A661,6] - 2,04 [A644,8]; e Carotenóides = (1000 [A470] - 1,90Ca - 63,14Cb)/214.

Considerando o volume total colocado nos 0,100 g iniciais como sendo 10 mL, cada mL de extrato corresponde a 0,01 g (0,100/10,00) de massa fresca (MF). Nesse caso o resultado final foi em $\mu\text{g}/\text{mL} \times 0,01 = \mu\text{g}/\text{g MF}$.

5.4.7 Extração alcoólica do material fresco e dosagem das frações solúveis

A extração alcoólica e partição com clorofórmio foram realizadas segundo Fernandes (1984), como descritas a seguir:

Após determinar a massa fresca, um grama de material vegetal foi colocado em 20 mL de etanol 80% e armazenado em frascos do tipo falcon para posterior extração das frações solúveis. As amostras armazenadas em etanol foram fragmentadas em um triturador (TECNAL TE-102), e filtradas em camadas de gaze e papel filtro. Posteriormente, foram transferidas para funil de separação onde se adicionou igual volume de clorofórmio. Após agitação suave, permaneceu em repouso por 40 minutos até a separação das frações por polaridade, a fração apolar foi descartada. A fração polar (sobrenadante) foi recolhida e elevada a um volume final de 25 mL com etanol 80%, sendo em seguida armazenada para as análises posteriores conforme descrito a seguir.

5.4.8 Determinação dos teores de N-NO₃⁻

A determinação dos teores de N na forma de nitrato foi realizada segundo Miranda et al, (2001) e Doane & Horwáth (2003). Para uma maior precisão na determinação de nitrato a partir de soluções com baixas concentrações foi utilizado o protocolo proposto por Miranda et al. (2001), sendo necessários ajustes pois o protocolo foi inicialmente proposto para a determinação simultânea de nitrato e nitrito em plasma sanguíneo. A técnica é baseada na redução de nitrato a nitrito pelo cloreto de vanádio III (VCL₃), combinado com a detecção por meio da reação de Griess.

Foram realizados vários testes (dentre eles testes alterando a concentração dos reagentes, das amostras, etc) até que os devidos ajustes foram feitos para uma melhor eficiência na determinação de nitrato em solução. Em uma microplaca de 96 poços, foram pipetados 30µL da amostra e 60 µL de uma solução resultante da mistura de VCL₃ 0,5% (m/v) em HCl 1M + sulfanilamida 0,4% (m/v) em HCl 1M + N-(1-naftil) etilenodiamônio dihidroclorido (0,02% (m/v) em H₂O ultrapura), na proporção de 2:1:1. Em seguida as amostras foram colocadas em estufa a 40°C por 50 minutos, para acelerar o desenvolvimento da cor, e após o aquecimento foram adicionados 110 µL de H₂O ultrapura e realizada a leitura a 540 nm.

5.4.9 Determinação dos teores de N-NH₄⁺

A determinação de N na forma de amônio foi realizada pelo método de Felker (1977). Na determinação foram utilizadas duas soluções, sendo a “solução A” constituída de 1% de fenol e 0,005% de nitroprussiato de sódio e a “solução B” composta de 3% de NaOH e 0,062% de dicloroisocianurato de sódio. Uma alíquota de 0,5 mL da solução obtida do extrato alcoólico (diluída quando necessário) foi acrescentada a 2,5 mL de cada solução, após homogeneização e descanso por 1h 30min, as amostras foram lidas em espectrofotômetro. O NH₄Cl (0,0; 10; 25; 50; 100; 200; 300; 400 nmoles de NH₄⁺ / 0,5 mL) foi utilizado para confecção da curva padrão.

5.4.10 Determinação dos teores de açúcares solúveis

A determinação dos teores de açúcares solúveis foi realizada segundo Yemm & Willis (1954). Em tubos de ensaio de 2,5 cm de diâmetro imersos em banho de gelo foram adicionados 5 mL do reagente de antrona (2% em H₂SO₄ 5:2), e após 5 minutos de repouso, adicionou-se lentamente 1 mL da solução obtida do extrato alcoólico (diluída quando necessário), deixando-se em repouso por 5 minutos a 0°C. Em seguida, as amostras foram colocadas em banho-maria a 100°C por 10 minutos para o desenvolvimento da coloração esverdeada característica. Após resfriamento em água corrente, as leituras espectrofotométricas foram realizadas. A glicose (0, 20, 40, 50, 80 e 100µg mL⁻¹) foi utilizada como padrão.

5.4.11 Determinação dos teores de N-amino livre

A determinação foi realizada de acordo com Yemm & Cocking (1955). Em tubo de ensaio foi adicionado 0,5 mL de tampão citrato 0,2 M com pH 5,0; 1 mL da solução obtida do extrato alcoólico (diluída quando necessário); e 1,2 mL do reagente metil celossolve 100% + 0,01M KCN + Ninidrina 5%. A mistura foi agitada e todos os tubos foram fechados com papel alumínio e colocados para aquecer em banho-maria a 100°C por 15 minutos. Após esse

período, os tubos com as amostras foram resfriados em água corrente por 5 minutos, quando então se adicionou 3 mL de etanol 60%. A mistura foi homogeneizada e levada para a leitura espectrofotométrica. A leucina (0; 0,04; 0,08; 0,16; 0,20; 0,24; 0,32 mM) foi utilizada como padrão.

5.4.12 Análises estatísticas

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, utilizando um total de quatro tratamentos (Controle, AH, PEG e AH+PEG) e vinte repetições, contendo quatro plantas por pote. As análises estatísticas foram realizadas no programa Statgraphic plus v.5.5 e no software estatístico R, os testes de médias foram feitos por tukey ($p<0,05$) e a ordenação dos dados foi realizada pela análise de componentes principais, os gráficos foram elaborados no programa SigmaPlot 10.0 e Microsoft Excel 2016.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.5.1 Avaliação da cinética de emissão da fluorescência transiente da clorofila *a*

Nas primeiras 24 horas após o início dos testes não foram observadas alterações significativas nos parâmetros fotossintéticos avaliados. Após 48 horas foi observado redução no índice de desempenho fotossintético (PIabs e PItotal) em plantas submetidas a aplicação de ácido húmico de vermicomposto, em relação aos tratamentos controle, PEG e AH+PEG. Provavelmente este comportamento das plantas tratadas com AH foi influenciado pelo aumento na perda de energia na forma de calor (D_{Io}/RC) e redução na taxa de reoxidação da plastoquinona (E_{To}/RC), também observados neste momento (Tabela 7 e Figura 26).

A partir das 72 horas após aplicação dos testes, as plantas tratadas com AH passaram à apresentar o maior índice de desempenho fotossintético total (PItotal), enquanto as plantas submetidas ao estresse hídrico (PEG-6000) tiveram os menores valores desse índice, assim como a maior perda de energia na forma de calor (D_{Io}/RC) e a maior taxa de redução da plastoquinona (TRo/RC), resultando em diferenças significativas entre esses dois tratamentos. O teste contendo AH+PEG proporcionou estabilização no desempenho fotossintético em relação ao controle (Tabela 7 e Figura 26).

Depois de 96 horas sob as condições experimentais, a aplicação de AH em plantas submetidas ao estresse hídrico (AH+PEG) resultou no maior índice de desempenho fotossintético (PIabs e PItotal), enquanto as plantas que se encontravam em condições de baixa disponibilidade de água (PEG-6000) apresentaram os menores valores, ocasionando em diferenças significativas entre esses tratamentos. As plantas em que foram aplicadas apenas AH tiveram diminuição no desempenho em relação ao registrado no momento anterior, ficando mais próximo ao visto em plantas controle (Tabela 7 e Figura 26).

Por fim, após 120 horas de contato das plantas com os testes, o estresse hídrico continuou resultando no menor desempenho fotossintético total (PItotal) observado entre as plantas, diferindo significativamente das amostras que receberam substância húmica. Ambos tratamentos contendo ácido húmico de vermicomposto apresentaram índice de desempenho fotossintético similares, sendo maiores do que o encontrado em plantas controle (Tabela 7 e Figura 26).

Com os resultados obtidos, pode-se verificar que a partir das 72 horas após início dos tratamentos houve uma tendência no aumento do complexo antena (ABS/RC) de plantas submetidas ao déficit hídrico (PEG), sendo provavelmente uma resposta com objetivo de aumentar a captação luminosa visando aumentar a taxa fotossintética. Também foi observado, aumento na perda de energia em forma de calor (D_{Io}/RC), aumento na taxa de reoxidação da plastoquinona (E_{To}/RC) e diminuição na taxa de redução da plastoquinona (TRo/RC).

Inicialmente a aplicação do AH desencadeou um estresse no metabolismo vegetal, sendo detectado primeiro do que o estresse desencadeado pelo déficit hídrico. Após o estresse inicial originado pela substância húmica de vermicomposto foi observado aumento no desempenho fotossintético das plantas, sendo um indício que este distúrbio inicial possa ter resultado em aumento e melhoria do metabolismo vegetal, tendo a planta acelerado e estimulado suas atividades metabólicas como forma de aclimatação frente ao “estresse” detectado, alguns autores denominam esse processo como eustresse (PETROV et al., 2015).

A aplicação de AH de vermicomposto em plantas sob condições de baixa disponibilidade hídrica (AH+PEG) preservou o índice de desempenho fotossintético, resultando em proteção contra o estresse hídrico, impedindo que o desempenho fosse abaixo do observado nas plantas testemunha, e resultando em maior desempenho do que o observado em plantas tratadas apenas com PEG-6000.

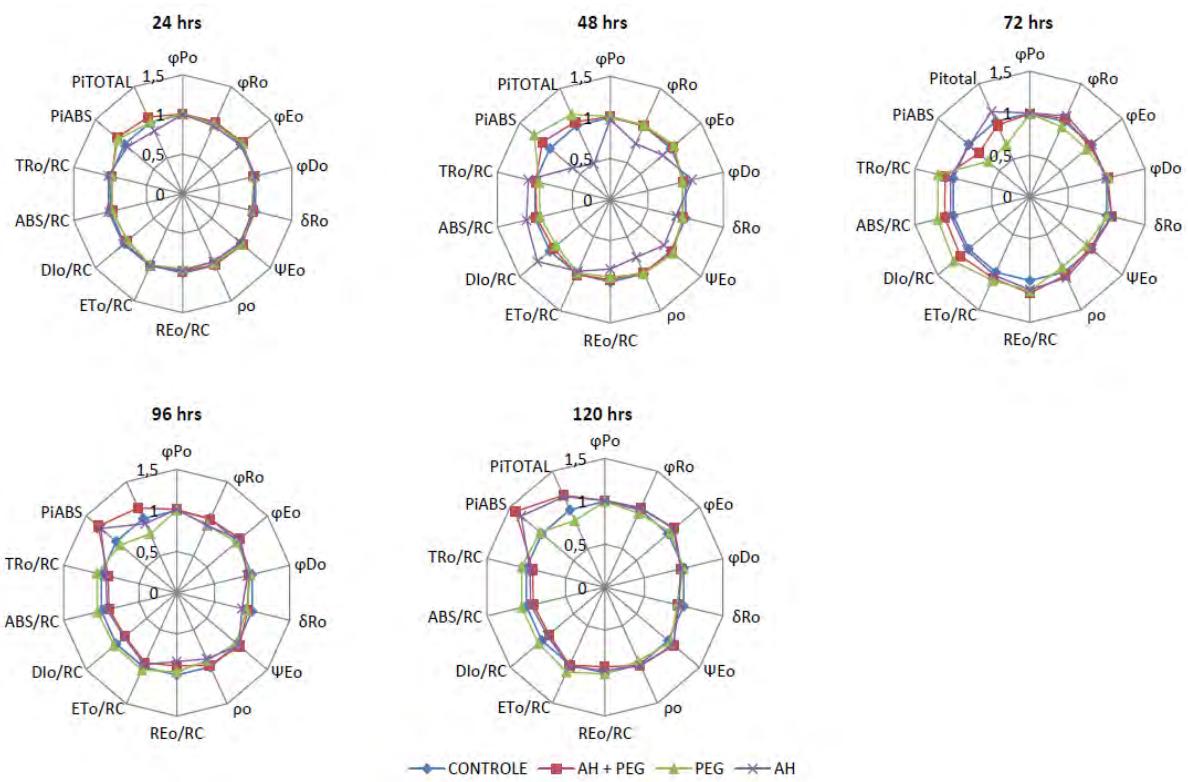


Figura 26. Parâmetros do Teste JIP obtidos de arroz (*Oryza Sativa L.*) da var. BRS Esmeralda submetido a aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG-6000) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG), em relação aos valores do tratamento controle.

Tabela 7. Parâmetros da fluorescência transiente da clorofila *a* obtidos de arroz (*Oryza Sativa L.*) da var. BRS Esmeralda submetido a aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG-6000) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG).

	Tratamento	PHI Po	ABS/RC	TRo/RC	ETo/RC	DIo/RC	Piabs	PItotal
24 Horas	Controle	0,79 ^{NS}	2,25 ^{NS}	1,78 ^{NS}	1,01 ^{NS}	0,47 ^{NS}	2,22 ^{NS}	1,6 ^{NS}
	AH + PEG	0,79	2,25	1,78	0,99	0,47	2,16	1,59
	PEG	0,79	2,21	1,75	0,99	0,46	2,3	1,72
	AH	0,79	2,27	1,8	1,01	0,47	2,19	1,71
	C.V (%)	0,64	5,79	5,39	4,1	7,5	13,16	15,82
48 Horas	Controle	0,78 ab	2,46 ab	1,92 ab	1,11 a	0,54 ab	2,06 ab	2,02 a
	AH + PEG	0,79 a	2,42 ab	1,90 ab	1,12 a	0,52 b	2,38 a	2,11 a
	PEG	0,79 a	2,30 b	1,82 b	1,10 a	0,48 b	2,56 a	2,24 a
	AH	0,76 b	2,75 a	2,08 a	1,04 b	0,67 a	1,43 b	1,05 b
	C.V	2,27	11,23	9,03	3,48	19,45	29,78	29,63

Continua...

Continuação da Tabela 7.

Tratamento		PHI Po	ABS/RC	TRo/RC	ETo/RC	DIo/RC	Piabs	PItotal
72 Horas	Controle	0,77 ^{NS}	2,42 c	1,85 c	1,07 c	0,56 c	1,87 a	1,87 ab
	AH + PEG	0,76	2,71 b	2,07 b	1,18 ab	0,64 b	1,57 b	1,89 ab
	PEG	0,76	2,93 a	2,23 a	1,20 a	0,70 a	1,26 c	1,34 b
	AH	0,77	2,51 c	1,93 c	1,12 bc	0,59 c	1,84 a	2,20 a
	C.V	1,03	4,62	4,39	4,71	6,31	9,1	22,45
96 Horas	Controle	0,787 c	2,47 a	1,95 b	1,13 ab	0,52 a	2,11b	2,61 ab
	AH + PEG	0,797 ab	2,21 b	1,76 c	1,07 c	0,45 b	2,76 a	3,07 a
	PEG	0,792 bc	2,59 a	2,06 a	1,17 a	0,54 a	1,99 b	2,14 b
	AH	0,800 a	2,28 b	1,83 c	1,09 bc	0,45 b	2,64 a	2,43 ab
	C.V	0,61	4,34	4,14	2,83	5,57	10,9	21,57
120 Horas	Controle	0,78 ^{NS}	2,46 ab	1,93 ab	1,08 b	0,53 ab	1,93 b	2,44 ab
	AH + PEG	0,79	2,25 c	1,77 c	1,09 b	0,47 c	2,66 a	2,84 a
	PEG	0,78	2,60 a	2,04 a	1,18 a	0,56 a	1,93 b	2,07 b
	AH	0,79	2,32 bc	1,84 bc	1,10 b	0,48 bc	2,48 a	2,75 a
	C.V	1,09	5,29	4,86	4,8	8,22	14,04	18,66

5.5.2 Produção de massa fresca e seca das plantas

A Figura 27A mostra as alterações na produção de biomassa fresca (g) das plantas de arroz submetidas a diferentes tratamentos. A aplicação de AHVC ocasionou em aumento significativo da massa fresca vegetal (g) das raízes, enquanto o estresse hídrico levou a redução. Em plantas submetidas ao estresse com aplicação concomitante de ácido húmico (AH+PEG) não houve raízes com massa fresca(g) significativamente diferentes das avaliadas em plantas testemunha.

As bainhas e folhas apresentaram o mesmo comportamento, todos os tratamentos resultaram em órgãos vegetais com massa fresca (g) estatisticamente diferentes entre si. Assim como para as raízes, a aplicação de ácido húmico resultou nos maiores valores de massa fresca (g) dos outros órgãos. O déficit hídrico resultou nos menores valores de biomassa fresca (g) na bainha e nas folhas. O tratamento contendo o ácido húmico e o indutor de estresse hídrico (AH+PEG) foi responsável por uma produção de massa fresca (g) significativamente menor do que a de plantas controle, porém maior do que o observado em plantas submetidas apenas ao estresse (Figura 27A).

A Figura 27A demonstra claramente o efeito protetor do ácido húmico de vermicomposto na manutenção hídrica das plantas submetidas ao estresse, principalmente nas raízes, onde não houve diferenças na massa fresca (g) em relação ao controle, indicando que a absoção de água em condições de baixa disponibilidade hídrica foi favorecida pela aplicação do AHVC.

Em relação a massa seca (g) das raízes, as plantas tratadas com PEG apresentaram estatisticamente os maiores valores. O ácido húmico proporcionou o aumento da massa seca (g), porém sem diferir significativamente dos valores observados nas raízes dos demais testes. O estresse em conjunto com o ácido húmico (AH+PEG) não resultou em diferenças significativas com o controle (Figura 27B).

As plantas submetidas a aplicação do AHVC foram as únicas que apresentaram aumento significativo na massa seca (g) da bainha em relação ao controle. O tratamento com PEG e com AH+PEG não resultaram em bainhas com massa seca (g) significativamente

diferente dos outros testes, porém os valores foram maiores do que os encontrados em bainhas controle (Figura 27B).

A massa seca (g) das folhas apresentou o mesmo efeito observado para a massa fresca (g) deste órgão. Comparado ao controle, o déficit hídrico resultou nos menores valores de biomassa seca das folhas, já o AH resultou em aumento significativo. O tratamento contendo ácido húmico e o indutor de estresse hídrico (AH+PEG) resultou em massa fresca (g) significativamente menor do que das plantas testemunha, porém maior do que o observado em plantas submetidas apenas ao estresse (Figura 27B).

O efeito dos tratamentos sobre a massa seca (g) das plantas está provavelmente associado a um processo denominado ajuste osmótico, sendo uma regulação fisiológica desencadeada pela planta visando adaptação frente ao déficit hídrico (TAIZ et al., 2017). Como observado na Figura 27B, as raízes de plantas submetidas ao estresse por PEG-6000 apresentaram os maiores valores de massa seca, possivelmente influenciado pela quantidade de solutos concentrados neste órgão. Uma vez que o potencial hídrico da solução de cultivo encontrava-se reduzido por efeito do PEG, ocorreu acúmulo de solutos visando a redução do potencial osmótico e, consequentemente, hídrico das raízes no intuito de gerar um gradiente favorável à absorção de água.

Por sua vez, é provável que tenha ocorrido remobilização dos solutos presentes nas folhas para as raízes, justificando a menor massa seca nesta parte da planta. Segundo Batista (2012), algumas respostas desencadeadas por plantas sob estresse hídrico são redução no crescimento, diminuição na área foliar e senescência das folhas, sendo mecanismos que diminuem a perda de água para a atmosfera.

Ao observar os efeitos dos diferentes testes na massa seca (g) das folhas também fica nítido o efeito de proteção e regulação desencadeado pelo ácido húmico de vermicomposto em plantas submetidas a condições de baixa disponibilidade de água (AH+PEG).

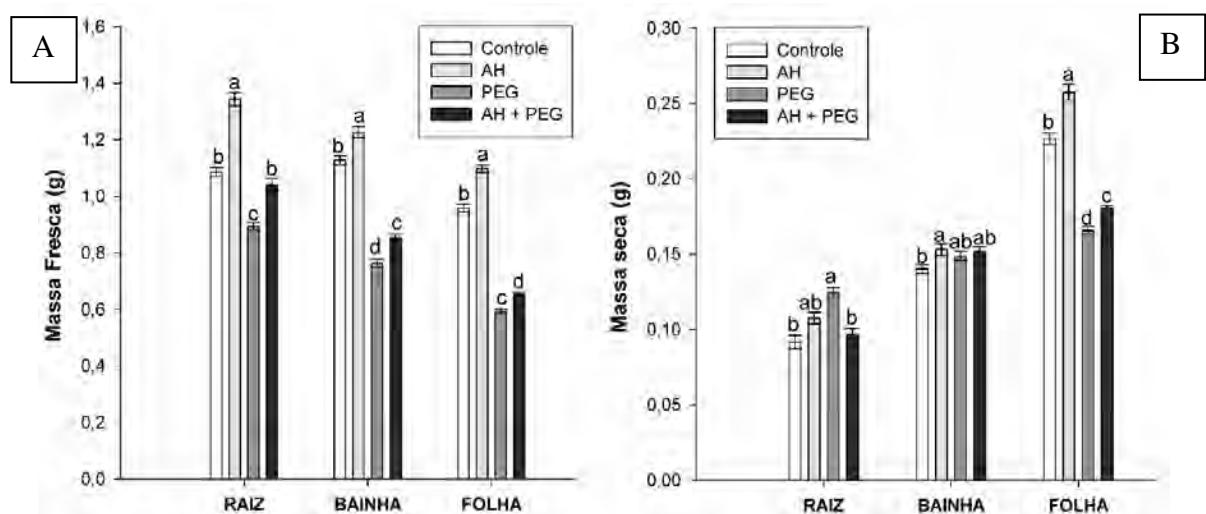


Figura 27. A) Massa fresca (g) produzida em diferentes órgãos vegetais de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG-6000) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG). B) Massa seca (g) produzida em diferentes órgãos vegetais de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG-6000) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG).

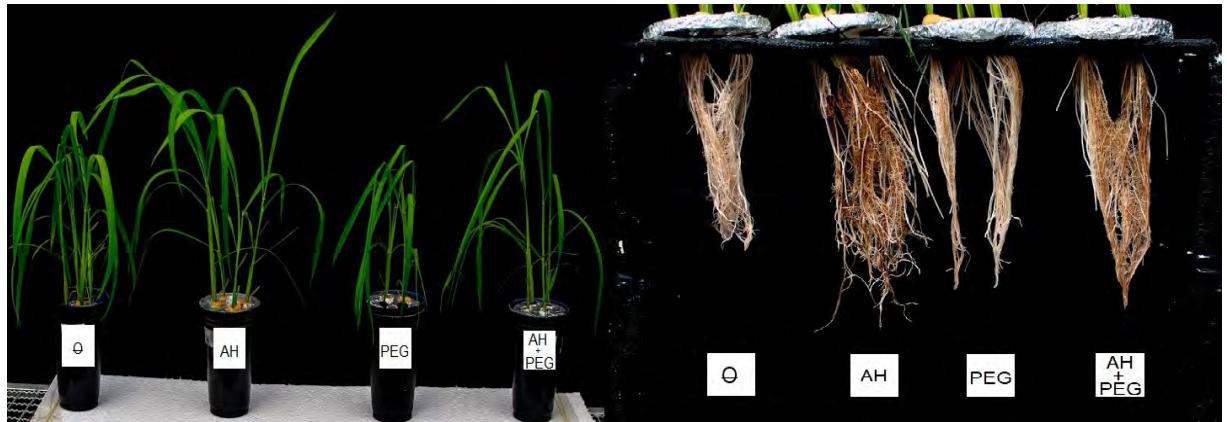


Figura 28. Parte aérea e raízes de plantas de arroz da variedade BRS Esmeralda cultivadas em condições normais e sob estresse hídrico, com e sem aplicação de ácido húmico de vermicomposto.

5.5.3 Indicadores morfológicos radiculares

A Figura 29 revela que o efeito resultante dos diferentes testes foi similar nas alterações de quantidade e de comprimento radicular (mm), havendo diferenças significativas entre as raízes de todos os tratamentos. Ambos os parâmetros foram estimulados em maior intensidade pelo teste com aplicação de AH, apresentando superioridade significativa aos demais tratamentos. O estresse hídrico também resultou em aumento significativo na quantidade e comprimento (mm) das raízes em relação ao controle, no entanto com menor intensidade. As raízes tratadas com AH+PEG apresentaram número e comprimento significativamente maiores que o tratamento com PEG, porém inferiores aos obtidos em raízes submetidas apenas ao AH.

A área radicular (mm^2) e o diâmetro médio ($\text{mm}/10$) apresentaram comportamento semelhante frente aos diferentes testes. As plantas submetidas ao déficit hídrico foram as únicas que não apresentaram diferenças significativas com o controle para estes indicadores morfológicos. Assim como para a quantidade e comprimento (mm) de raízes, a aplicação de AH resultou nos maiores valores de área (mm^2) e diâmetro médio ($\text{mm}/10$) radicular. As plantas submetidas ao teste contendo AH+PEG demonstraram maior estímulo para estes parâmetros do que as raízes de plantas controle e de plantas submetidas somente ao estresse hídrico, todavia demonstraram menor estímulo do que as plantas tratadas somente com AH (Figura 29).

As raízes de plantas tratadas com PEG e com AH+PEG apresentaram volume (mm^3) estatisticamente diferente entre si, porém ambas não diferiram do controle, embora o tratamento com estresse tenha resultado em menor volume e o tratamento com AH+PEG em maior volume do que as plantas testemunhas. A aplicação do ácido húmico de vermicomposto resultou em valores significativamente maiores deste parâmetro em comparação aos outros testes (Figura 29).

Analizando a Figura 29 fica evidenciado que o estresse hídrico levou ao aumento da quantidade e comprimento (mm) de raízes em comparação com plantas cultivadas em condições normais. A explicação para este efeito pode ser atribuída ao exposto por alguns autores, onde afirmam que para evitar o estresse hídrico as plantas desenvolvem estratégias para aumentar a captação de água em profundidade, através do aumento na emissão de raízes e do alongamento radicular (HENRY, 2013; FERREIRA, 2017).

A aplicação de AHVC em condições de estresse (AH+PEG) resultou em plantas com quantidade e comprimento (mm) de raízes maiores do que em plantas apenas sob estresse hídrico, além de apresentarem maior área (mm^2), volume (mm^3) e diâmetro ($\text{mm}/10$) radicular. Logo, a substância húmica contribuiu para o desenvolvimento do sistema radicular de plantas nesta condição adversa.

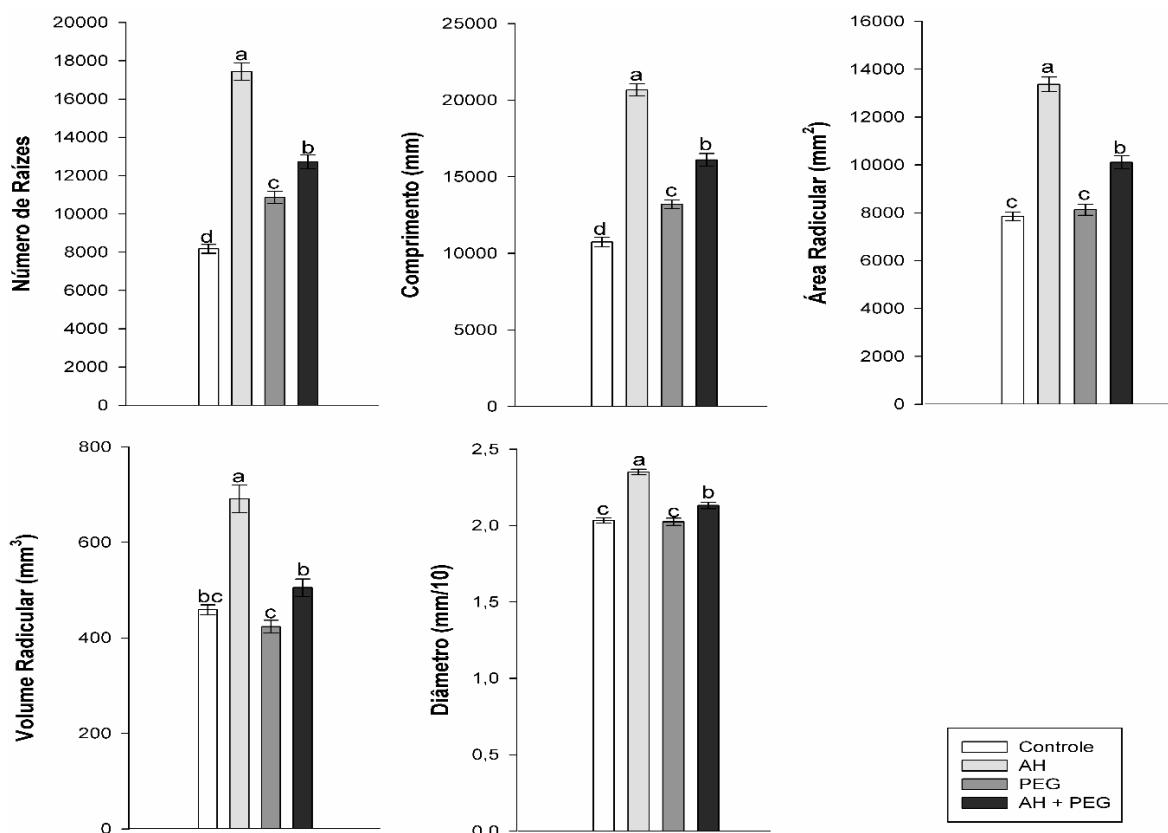


Figura 29. Efeitos da aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG-6000) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG) em alguns parâmetros do desenvolvimento radicular de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda.

As plantas de arroz submetidas ao tratamento com AH apresentaram o maior estímulo na emissão de raízes em todas as classes de diâmetro observadas. As raízes superfinais e médias foram estimuladas de maneira similar pelos diferentes testes utilizados, nestas classes de diâmetro as raízes submetidas ao estresse por PEG foram as únicas que não diferiram das raízes controle. A aplicação do ácido húmico em plantas submetidas ao estresse (AH+PEG) resultou em aumento significativo na quantidade de raízes superfinais e médias quando comparado as raízes controle e sob estresse hídrico (PEG), sendo significativamente menores apenas do que as encontradas em plantas sob aplicação de AH (Figura 30).

O número de raízes finas foi significativamente distinto em todos os testes adotados, sendo o controle aquele que apresentou a menor quantidade dessas raízes. A ordem crescente do número de raízes finas observado pelos efeitos dos tratamentos foi: Controle < PEG < AH+PEG < AH. Nas raízes de maior diâmetro (grossas), os dois tratamentos onde havia indução ao estresse hídrico pela presença de PEG não resultaram em número radicular significativamente diferente do controle. As plantas submetidas ao AH foram as únicas que apresentaram respostas significativas no aumento da quantidade de raízes grossas (Figura 30).

De acordo com Herder et al. (2010), o desenvolvimento de raízes mais finas é um mecanismo desencadeado por plantas em situação de estresse hídrico com objetivo de aumentar a absorção de água, uma vez que raízes de menor diâmetro são mais eficientes neste processo. A afirmação do autor corrobora com os resultados observados na Figura 30, em que apenas a emissão de raízes finas foi estimulada pelo déficit hídrico, em relação as raízes de plantas testemunha, sendo um indício de que as raízes com diâmetro (mm/10) entre 0,5 e 1,5 são importantes para a absorção de água. As raízes de plantas sob condições de estresse e aplicação de AHVC (AH+PEG) apresentaram melhores respostas no estímulo a emissão de raízes de todos os diâmetros, com excessão das raízes grossas, evidenciando o efeito protetor do ácido húmico.

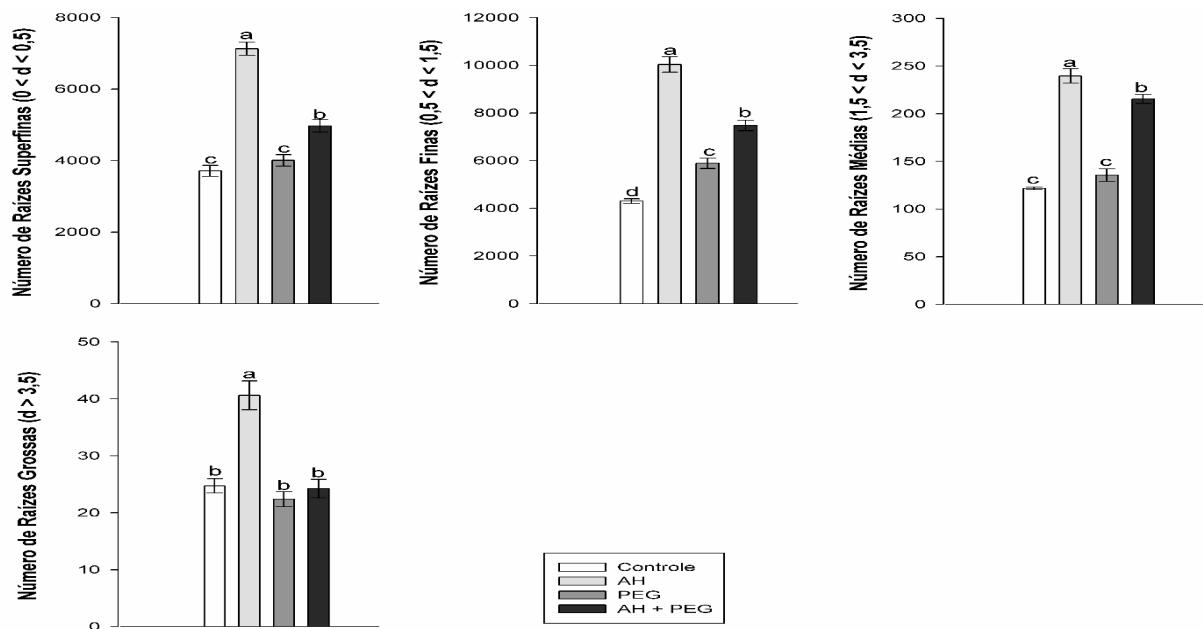


Figura 30. Efeitos da aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG-6000) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG) na quantidade de raízes de arroz da var. BRS Esmeralda de diferentes diâmetros (mm/10).

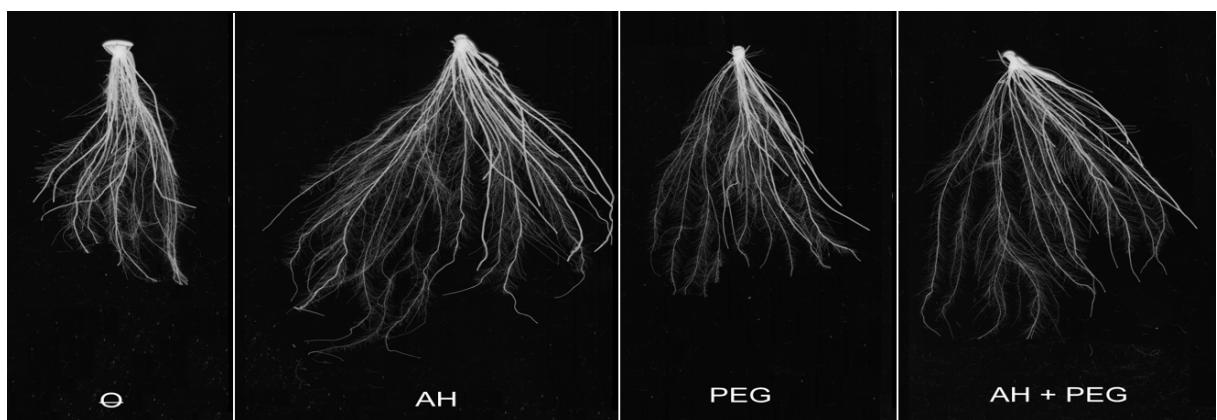


Figura 31. Sistema radicular de plantas de arroz da variedade BRS Esmeralda cultivadas em condições normais e sob estresse hídrico, com e sem aplicação de ácido húmico de vermicomposto.

5.5.4 Teores de pigmentos fotossintéticos

Como demonstrado na Figura 32, os pigmentos fotossintéticos avaliados apresentaram diferentes respostas em seus teores pela aplicação dos testes. Um efeito ocorrido nos teores de todos os pigmentos foi o valor significativamente maior em plantas tratadas com AH+PEG em comparação ao controle.

O teor de clorofila *a* das plantas controle foi o menor entre todos, não diferindo significativamente apenas das plantas sob estresse hídrico (PEG). As plantas submetidas a aplicação de AH apresentaram folhas com teor deste pigmento significativamente maior que o controle, porém não resultou em diferenças com as plantas tratadas com PEG. O teste contendo AH+PEG resultou no maior teor de clorofila *a*, sendo significativamente maior do que o observado nos demais testes (Figura 32).

As plantas controle apresentaram o menor teor de clorofila *b*, porém sem diferir com significância das plantas tratadas com AH e das plantas sob déficit hídrico (PEG). O tratamento de AH+PEG resultou no maior teor de clorofila *b* entre todos os testes, diferindo significativamente apenas das plantas controle (Figura 32).

A aplicação de AH resultou em folhas com o menor teor de carotenóides, no entanto, estatisticamente sem diferenças com o controle. Os teores de carotenóides encontrados nas plantas tratadas com PEG e com AH+PEG não apresentaram diferenças significativas entre si. Os tratamentos onde ocorreram indução ao estresse hídrico (PEG e AH+PEG) resultaram em teores de carotenóides significativamente maiores do que os observados nos outros testes (Figura 32).

Autores como Marques et al. (2011), Oliveira et al. (2015) e Moro, Broetto & Moro (2015), observaram que plantas em estágio de desenvolvimento avançado e submetidas à estresse hídrico de forma prolongada apresentaram reduções nos teores de pigmentos fotossintéticos. No entanto, foi observado no presente trabalho que as plantas de arroz em estágio inicial de desenvolvimento e submetidas a curto período de déficit hídrico tiveram aumento nos teores de pigmentos fotossintetizantes, podendo esta ser uma resposta fisiológica inicial, desencadeada pelas plantas como forma de melhorar a eficiência fotossintética em condição adversa.

No geral, os maiores teores de pigmentos foram observados em plantas submetidas concomitantemente ao ácido húmico de vermicomposto e ao estresse hídrico (AH+PEG). Este efeito pode estar associado aos maiores valores no índice de desempenho fotossintético em plantas sob este tratamento, sendo um possível mecanismo para melhoria da taxa fotossintética de plantas em condições hídricas desfavoráveis.

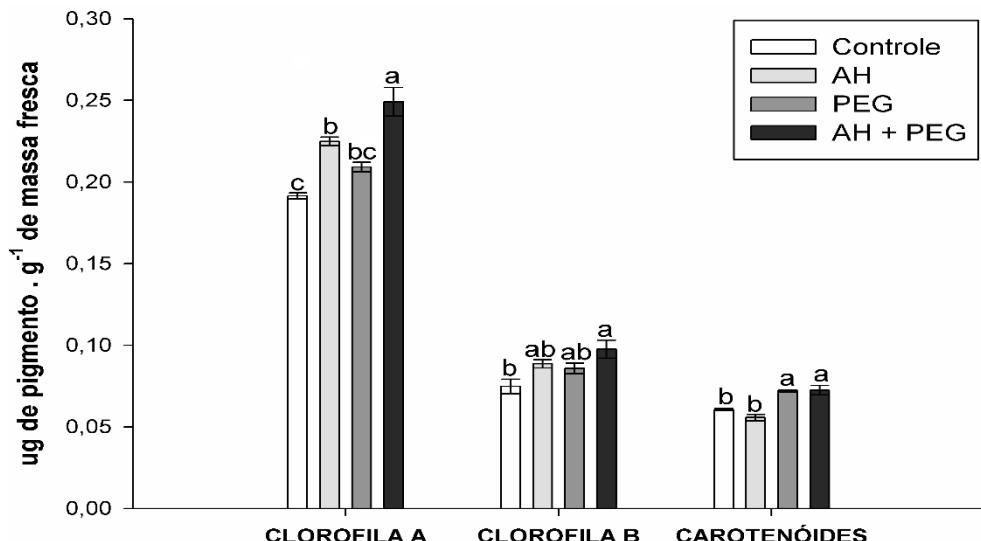


Figura 32. Teores de pigmentos fotossintéticos (ug.g^{-1} de massa fresca) em folhas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG-6000) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG).

5.5.5 Teores de metabólitos solúveis

A Figura 33 mostra que nas raízes, todos os testes adotados promoveram redução no teor de N-NH_4^+ quando comparado ao tratamento testemunha. As raízes submetidas à aplicação de AH e as raízes sob estresse por PEG não apresentaram teores de N-NH_4^+ que diferissem entre si, sendo significativamente menores do que o controle. Já o teor de N-NH_4^+ nas raízes tratadas com AH+PEG diferiu de todos os outros observados, sendo o menor entre os tratamentos.

Na bainha apenas a aplicação de AH+PEG resultou em teor que diferisse estatisticamente do controle, havendo redução significativa também quando comparado aos demais tratamentos. Os outros testes adotados não apresentaram raízes com teor de N-NH_4^+ significativamente diferente ao controle (Figura 33).

Nas folhas, todos os tratamentos envolvendo ácido húmico de vermicomposto e/ou estresse hídrico (AH, PEG e AH+PEG) resultaram em diminuição do teor de NH_4^+ , em comparação com as folhas de plantas controle, no entanto a aplicação de AH e de AH+PEG não ocasionaram em teores significativamente diferentes do observado nas folhas controle. O teor de N-NH_4^+ das folhas de plantas sob estresse hídrico (PEG) foram os menores observados, diferindo estatisticamente do controle (Figura 33).

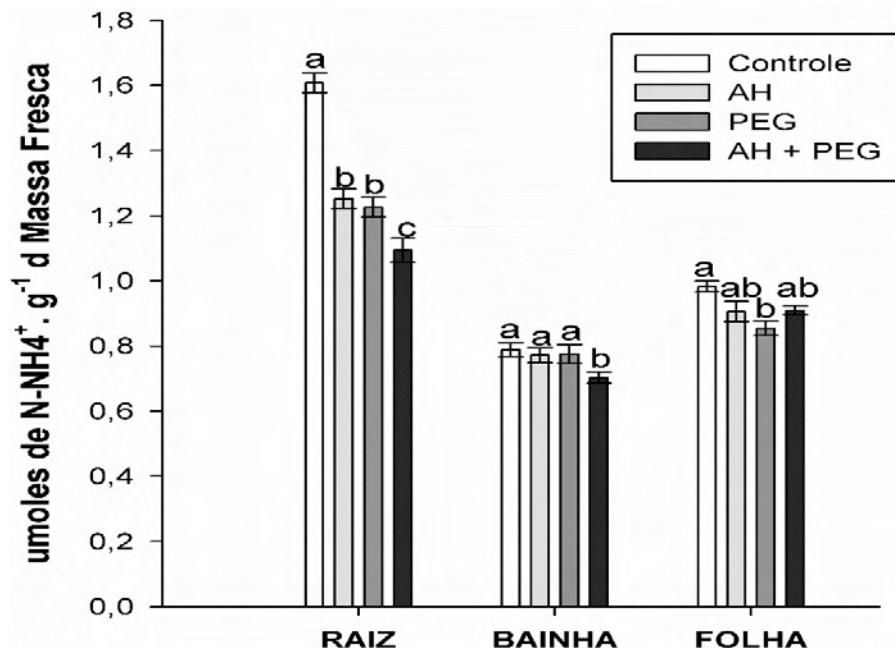


Figura 33. Teores de N-NH₄⁺ (umoles.g⁻¹ de massa fresca) em tecidos de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG-6000) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG).

De acordo com a Figura 34, os tratamentos em que houve indução ao estresse hídrico (PEG e AH+PEG) resultaram em redução significativa do teor de N-NO₃⁻ das raízes quando comparado ao controle. Por mais que a aplicação de AH foi responsável por um aumento no teor de N-NO₃⁻, comparando com as raízes de plantas do tratamento testemunha, não foi o suficiente para apresentar diferenças significativas.

O ácido húmico de vermicomposto exerceu efeito significativo na bainha das plantas, aumentando o teor de N-NO₃⁻ em relação ao observado em plantas não tratadas. Os tratamentos de PEG e AH+PEG não resultaram em teores radiculares de N-NO₃⁻ estatisticamente diferentes do controle, porém, mesmo assim é possível notar que houve redução (Figura 34).

Nas folhas, o teste contendo AH não apresentou mudanças significativas no teor de N-NO₃⁻ quando equiparado às plantas controle. Já os tratamentos em que houve indução ao estresse hídrico, contendo ácido húmico ou não (PEG e AH+PEG), levaram a redução neste teor de maneira estatisticamente relevante (Figura 34).

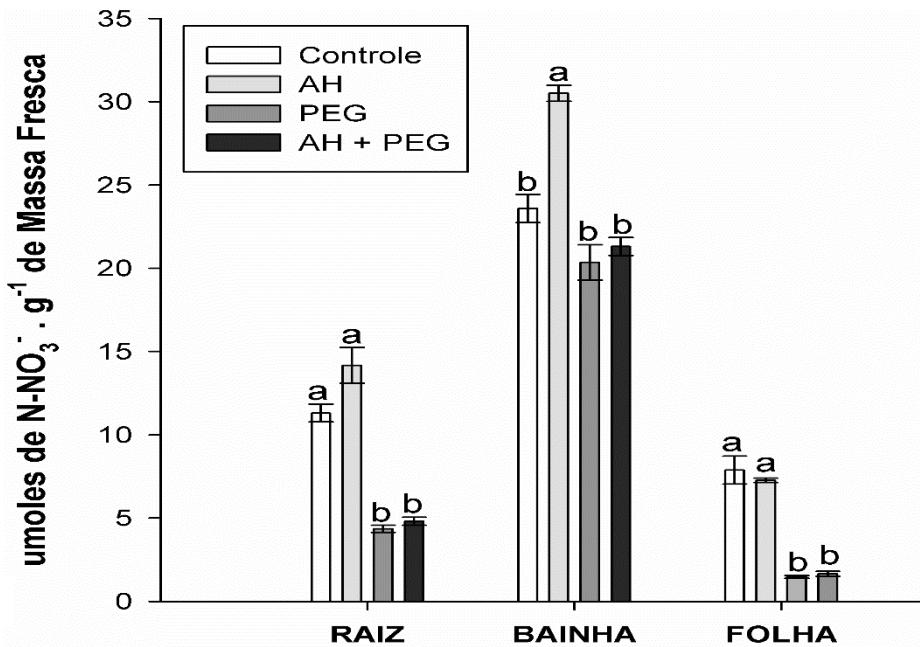


Figura 34. Teores de N-NO₃⁻ (umoles.g⁻¹ de massa fresca) em tecidos de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG-6000) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG).

A aplicação de AH resultou no menor teor de N-amino observado nas raízes, porém sem diferir significantemente das plantas controle e das plantas em que foram aplicados AH+PEG. As raízes de plantas submetidas ao estresse hídrico (PEG) apresentaram o maior teor de N-amino, entretanto, também não houve mudanças com significância estatística em relação as raízes controle e as tratadas com AH+PEG. A indução ao estresse hídrico (PEG) e o teste contendo ácido húmico (AH) foram os únicos que resultaram em raízes com teores significativamente diferentes entre si (Figura 35).

Na bainha, assim como nas raízes, as plantas que sofreram aplicação de AH tiveram o menor teor de N-amino, enquanto as que passaram pelo déficit hídrico (PEG) demonstraram o maior teor. A bainha de plantas submetidas ao AH não apresentaram teor de N-amino significativamente diferente do observado nas plantas não tratadas. Foi possível observar um aumento no teor da bainha pela adoção do teste contendo AH+PEG, porém sem que houvesse alterações significativas com o controle. A aplicação apenas de ácido húmico (AH) resultou em teor de N-amino na bainha estatisticamente superior ao encontrado no controle, todavia sem diferir do observado em plantas que receberam ácido húmico associado ao estresse hídrico (AH+PEG) (Figura 35).

A indução ao estresse hídrico por PEG foi responsável pelo maior teor de N-amino observado em folhas, significantemente diferente do observado em plantas controle. Os tratamentos com AH e AH+PEG resultaram em plantas com teor de N-amino nas folhas em que não houve diferenças significativas com os demais testes, mesmo apresentando valores menores do que o observado em plantas sob estresse hídrico (PEG), e maiores do que os encontrados em plantas testemunha (Figura 35).

Os menores teores observados nas amostras dos tratamentos com AH, de maneira geral, é um indício de que essas plantas utilizaram maior quantidade de aminoácidos livres para o seu desenvolvimento, o que reflete em uma maior produção de biomassa. Possivelmente, as plantas submetidas ao estresse hídrico apresentaram os maiores teores de

N-Amino livre devido a ocorrência de um ajuste osmótico. De acordo com Lisar et al. (2012), o acúmulo de solutos pela planta é uma resposta adaptativa de algumas espécies em condição de inadequada disponibilidade de água. Grant (2012) afirma que várias moléculas estão associadas ao mecanismo de ajuste osmótico, incluindo diversos tipos de aminoácidos.

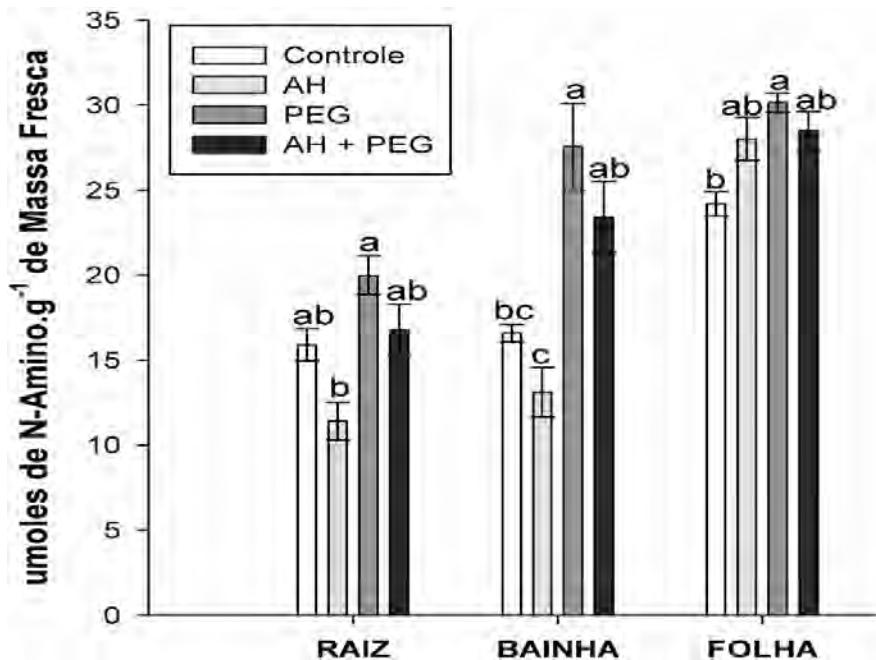


Figura 35. Teores de N-amino livre (umoles.g^{-1} de massa fresca) em tecidos de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG-6000) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG).

A Figura 36 mostra que todos os testes com ácido húmico e/ou estresse hídrico (AH, PEG e AH+PEG) resultaram em aumento significativo no teor de açúcares solúveis das raízes em relação ao controle. Os tratamentos em que houve indução ao estresse hídrico, com e sem ácido húmico (PEG e AH+PEG), resultaram em valores no teor de açúcares solúveis das raízes significativamente maiores aos demais, não diferindo entre si. Assim como os outros testes, a aplicação de AH levou a um aumento significativo no teor das raízes em relação ao controle, porém também resultou em teor significativamente menor do que o resultante dos testes contendo estresse hídrico (PEG e AH+PEG).

Na bainha, a aplicação de AH não exerceu alterações significativas no teor de açúcares solúveis, quando equiparado ao de plantas testemunha. As plantas submetidas ao estresse hídrico induzido por PEG apresentaram bainhas com o maior teor entre todos, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Já nas plantas onde houve aplicação de ácido húmico concomitante ao estresse hídrico (AH+PEG), o teor dos açúcares solúveis foi significativamente menor do que o encontrado em plantas submetidas apenas ao estresse hídrico e maior do que o observado nos outros testes (Figura 36).

As plantas controle apresentaram o menor teor de açúcares solúveis foliar, apresentando diferença estatística quando comparado aos demais tratamentos. O estresse hídrico ao qual as plantas foram submetidas resultou no maior teor de açúcares solúveis verificado nas folhas, diferindo do teor das folhas nos demais testes. Os tratamentos contendo ácido húmico, com e sem estresse hídrico (AH e AH+PEG), não resultaram em diferenças entre si no teor de açúcares, porém foram significativamente distintos aos demais (Figura 36).

O ajuste osmótico por meio do acúmulo de solutos orgânicos nas plantas, entre eles carboidratos, é uma forma de assegurar a turgescência e o conteúdo de água nas células (PAIXÃO et al., 2014), sendo esta uma resposta observada nas plantas em condições de déficit hídrico. Também é possível observar que houve contribuição do AH para o balanço osmótico em plantas sob estresse.

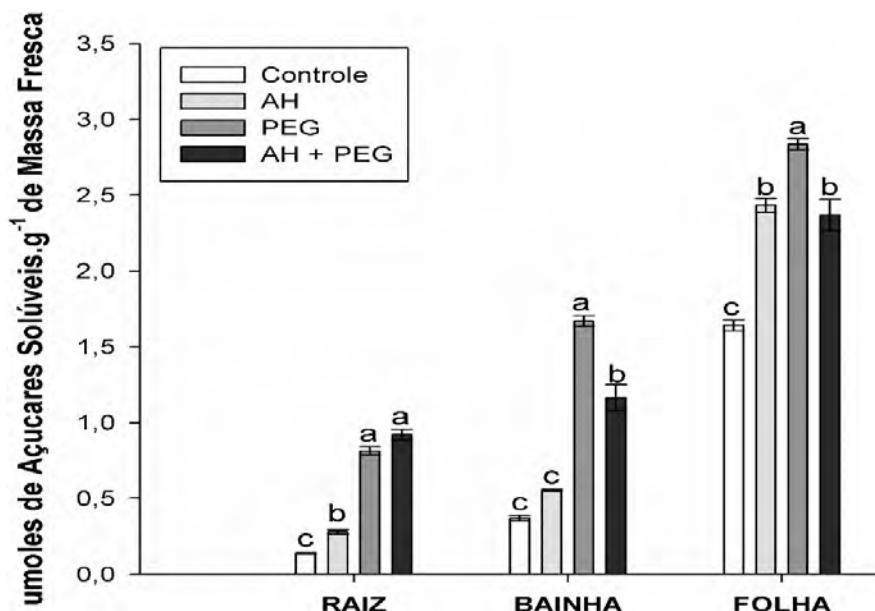


Figura 36. Teores de açúcares solúveis (umoles.g^{-1} de massa fresca) em tecidos de plantas de arroz da var. BRS Esmeralda submetidas a aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG-6000) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG).

5.5.6 Análises de componentes principais

A análise de componentes principais baseada nos parâmetros morfológicos radiculares e na massa seca radicular explicou 86,9 % da variabilidade total nas duas primeiras componentes, sendo que 75,1% da variância foi explicada pela componente principal 1 (Dim1), estando correlacionada positivamente à todas as variáveis envolvendo os parâmetros radiculares. Já a componente principal 2 (Dim2) explicou 11,8% da variabilidade dos dados, sendo a massa seca das raízes positivamente correlacionada à esta componente, e negativamente correlacionada a primeira componente (Figura 37).

O tratamento com ácido húmico de vermicomposto apresentou a maior correlação com as variáveis radiculares, evidenciando o estímulo dessa substância no desenvolvimento radicular. Através da análise também fica evidente o efeito protetor do AH no desenvolvimento e morfologia das raízes sob estresse (AH+PEG), estando relacionado à estas variáveis. O teste no qual foi induzido o estresse hídrico (PEG) está associado às plantas com maior massa seca de raízes (Figura 37).

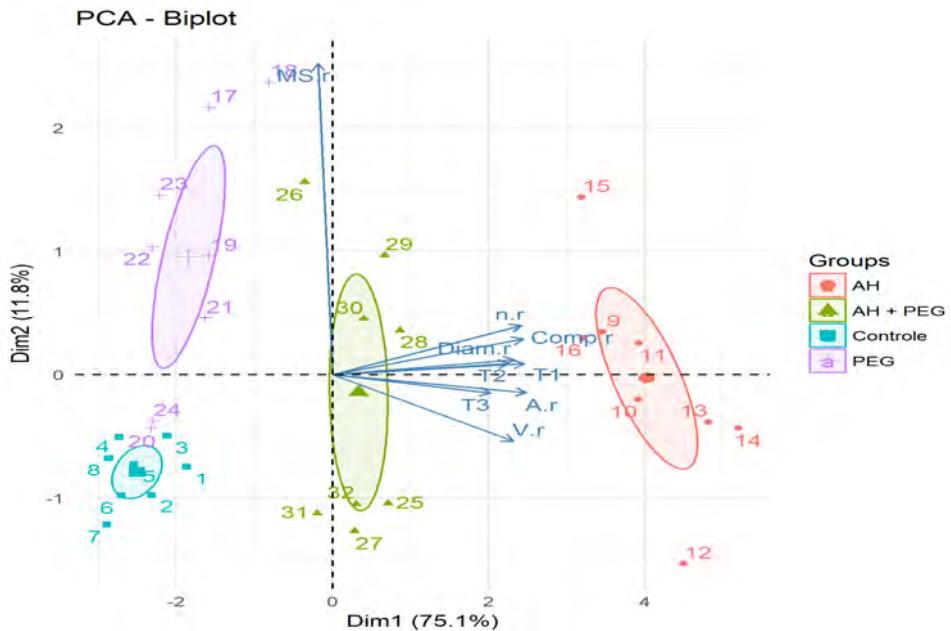


Figura 37. Análise das componentes principais para as nove variáveis radiculares mensuradas e para as massas seca (g) das raízes de arroz da var. BRS Esmeralda em condição normal (controle) e sob aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG).

A partir da Figura 38, é possível afirmar que as duas primeiras componentes principais explicaram 93,1% da variabilidade total dos dados, baseados nas massas frescas de todos os órgãos vegetais e nas massas frescas de raízes e folhas. A primeira componente principal (Dim1) foi responsável por explicar 72,8% da variação, enquanto a segunda componente (Dim2) explicou 20,3%.

Todas as variáveis estão associadas positivamente à componente principal 1, e correlacionaram-se positivamente com o teste contendo AH. Os tratamentos envolvendo estresse hídrico (PEG e AH+PEG) correlacionaram-se negativamente às variáveis, no entanto, é possível observar que esta correlação negativa entre as variáveis e o teste de AH+PEG foi menos intensa do que quando comparada ao observado com o PEG, indicando que por mais que à aplicação de ácido húmico em plantas sob estresse (AH+PEG) resultou em massa vegetal abaixo do encontrado em plantas controle, ainda assim, o AH exerceu um efeito positivo em plantas submetidas ao estresse hídrico.

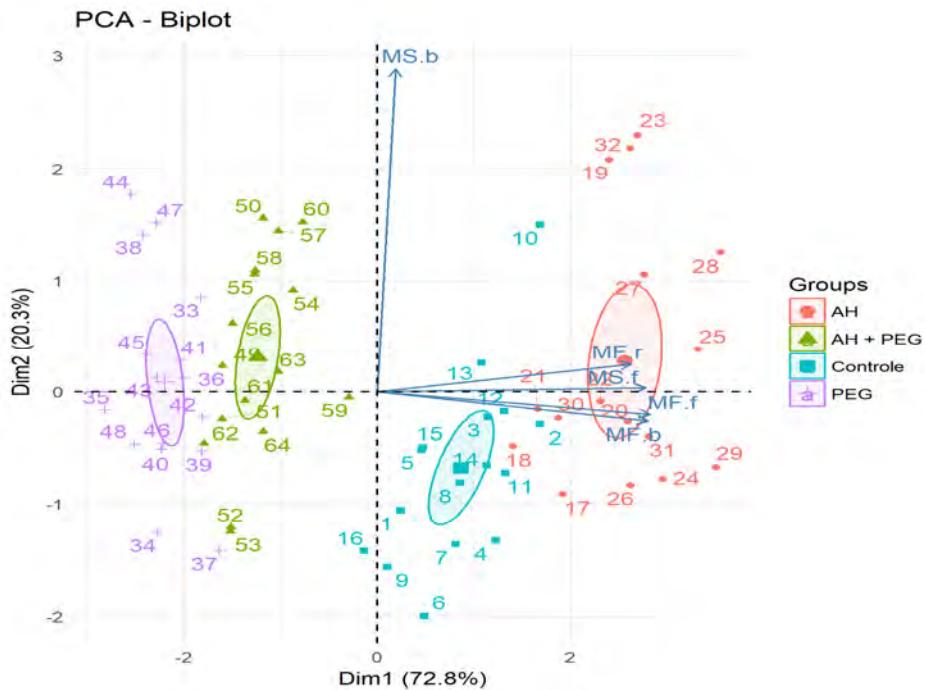


Figura 38. Análise das componentes principais para a massa seca (g) das bainhas e folhas e para a massas fresca (g) das raízes, bainhas e folhas de arroz da var. BRS Esmeralda em condição normal (controle) e sob aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG).

A análise de componentes principais, representada na Figura 39, baseada nos teores de metabólitos solúveis em raízes, bainhas e folhas, e nos teores de pigmentos fotossintetizantes justificou 71,3% da variabilidade nas duas primeiras componentes, estando 54% da variação justificada pela componente principal 1 (Dim1). Já a componente principal 2 (Dim2) explicou 17,3% da variabilidade dos dados.

Os maiores teores de NO_3^- em raízes, bainhas e folhas, estão correlacionados à aplicação de AH de vermicomposto. As plantas referentes ao tratamento controle correlacionaram-se positivamente aos teores de NH_4^+ em todos os órgãos vegetais. O estresse hídrico (PEG) está associado aos teores de amino em raízes e bainhas, de açúcares solúveis em bainhas e de carotenóides. Já o teste contendo AH+PEG está ligado de forma positiva aos teores de clorofila *a* e *b*, de N-amino em folhas e de açúcares solúveis em raízes e folhas. Os teores de amônio em todas as partes das plantas estão fortemente correlacionados de forma negativa aos teores de clorofila *a* e *b*, assim como os teores de NO_3^- em todos os órgãos vegetais também estão negativamente correlacionados aos teores de amino em raízes e bainhas, de açúcares solúveis em bainhas e de carotenóides (Figura 39).

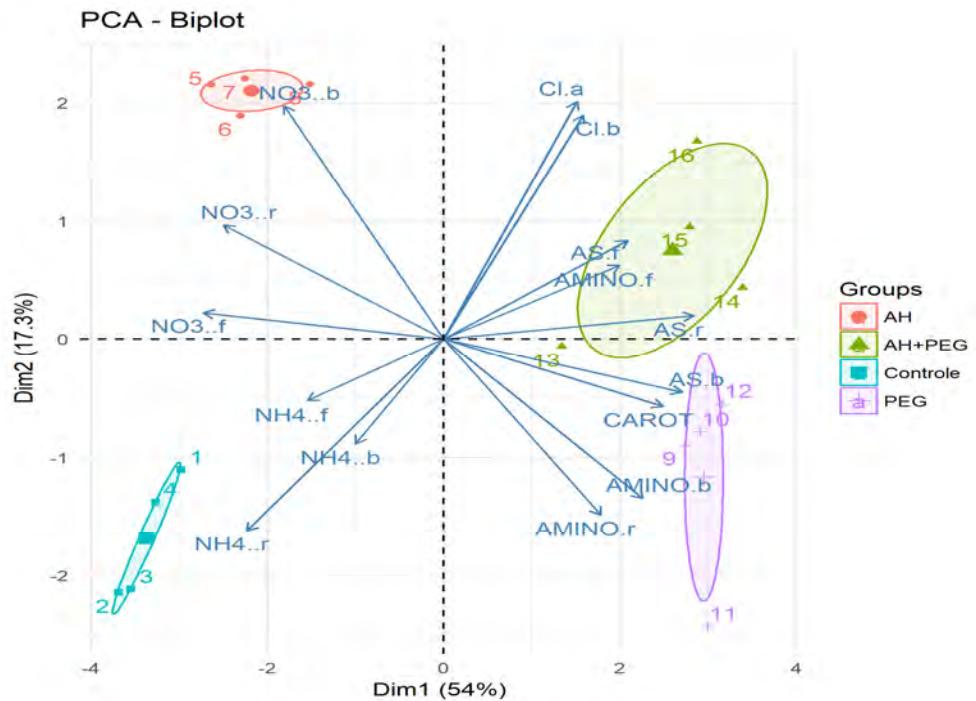


Figura 39. Análise das componentes principais dos teores de metabólitos solúveis e pigmentos fotossintéticos de arroz da var. BRS Esmeralda em condição normal (controle) e sob aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH), estresse hídrico (PEG) e ácido húmico em conjunto com estresse hídrico (AH+PEG).

5.6 CONCLUSÕES

A aplicação de AH de vermicomposto em plantas sob estresse hídrico preservou o índice de desempenho fotossintético. O AH foi responsável por uma queda inicial no desempenho antes de haver aumento. Os mecanismos de sinalização para o AH foram mais rápidos do que os mecanismos de sinalização para o estresse hídrico.

O déficit hídrico exerceu grande influência na redução de biomassa das plantas, sendo este efeito amenizado pela aplicação da substância húmica. O AH também foi responsável por estimular a quantidade, comprimento, área, volume e diâmetro de raízes das plantas cultivadas em condições de estresse hídrico.

A massa seca e os teores de metabólitos solúveis dos diferentes órgãos vegetais demonstram que o AH contribuiu para o balanço osmótico das plantas submetidas ao estresse hídrico.

6. CONCLUSÕES GERAIS

As características relacionadas às estruturas e propriedades dos ácidos húmicos diferiram de acordo com o material de origem de onde foram extraídos. Sendo a ordem de aromaticidade: AHSOLO>AHRN≥AHVC, resultando na ordem do índice de hidrofobicidade em: AHSOLO>AHRN>AHVC. Desta maneira, o AHVC apresentou grau de alifaticidade e índice de polaridade superiores aos demais.

Os ácidos húmicos de diferentes ambientes de formação exerceram seus efeitos no metabolismo, morfologia e desenvolvimento de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) da variedade BRS. Esmeralda, de forma e intensidade distintas, variando de acordo com o predomínio estrutural e as propriedades resultantes deste.

O AHVC foi responsável pelo aumento mais intenso na produção de biomassa dos diferentes órgãos vegetais, assim como estimulou em maior grau a emissão de raízes e o volume radicular. Os teores de metabólitos solúveis demonstram as que plantas tratadas com AHVC foram mais eficientes na absorção e assimilação de nitrogênio.

O ácido húmico de vermicomposto exerceu efeito protetor e regulatório em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) da variedade BRS. Esmeralda sob condição de estresse hídrico, sendo uma alternativa viável e sustentável para melhorar a produção vegetal neste tipo de ambiente desfavorável, contribuindo para o metabolismo fotossintético, biomassa, desenvolvimento radicular e regulação osmótica de plantas cultivadas em baixa disponibilidade de água.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, N. O.; MEDICI, L. O.; OLIVARES, F. L.; DOBBS, L. B.; TORRES-NETTO, A.; SILVA, S. F.; NOVOTNY, E. H.; CANELLAS, L. P. Metabolic profile and antioxidant responses during drought stress recovery in sugarcane treated with humic acids and endophytic diazotrophic bacteria. **Annals of Applied Biology**, 2016.
- AGUIAR, N.O.; NOVOTNY, E.H.; OLIVEIRA, A.L.; RUMJANEK, V.M.; OLIVARES, F.L.; CANELLAS, L.P. Prediction of humic acids bioactivity using spectroscopy and multivariate analysis. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 129, p. 95-102, jun. 2013.
- 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. Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. **Plant and Soil**, v. 362, n. 1/2, p. 161-174, 2012.
- AMERI, A.; TEHRANIFAR, A. Effect of humic acid on nutrient uptake and physiological characteristic *Fragaria ananassa* var: camarosa. **Journal of Biological Environmental Science**, v. 6, p. 77-79, 2012.
- ARANCON, N. Q.; EDWARDS, C. A.; LEE, S.; BYRNE, R. Effects of humic acids from vermicomposts on plant growth. **European Journal of Soil Biology**, v. 42, p. 65-69, nov. 2006.
- ASLI, S.; NEUMANN, P. M. Rhizosphere humic acid interacts with root cell walls to reduce hydraulic conductivity and plant development. **Plant Soil**, v. 336, p. 313-322, 2010.
- ASLI, S.; NEUMANN, P. M. Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. **Plant, Cell & Environment**, 2009.
- BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B. Ácidos húmicos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 7, p. 856-881, nov./dez. 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rceres/v61s0/11.pdf>>. Acesso em: 4 mai. 2017.
- BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; GIRO, V. B.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; BRESSAN-SMITH, R. Desempenho do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante aclimatação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 979-990, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v33n4/22.pdf>>. Acesso em: 13 mai. 2017.
- BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; SOARES, R. R.; MARTINEZ, H. E. P.; VENEGAS, V. H. A. Adventitious rooting in cuttings of croton and hibiscus in response to indolbutyric acid and humic acid. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 4, p. 476-483, jul./ago. 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rceres/v59n4/07.pdf>>. Acesso em: 14 mai. 2017.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; GONTIJO, J. B.; OLIVEIRA, F. M.; GONÇALVES, J. Aclimatização de orquídea (*Cymbidium* sp.) em resposta à aplicação de ácidos húmicos. **Ciência Rural**, v. 44, p. 830-833, 2014.

BATISTA, E. L. S. **Efeito do estresse hídrico sobre o crescimento de cultivares de cana-de-açúcar**. 2012. 97 p. Tese (Meteorologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2012.

BERBARA, R. L.; GARCÍA, A. C. In: PARVAIZ, A.; MOHD, R. W. (Eds) **Humic substances and plant defense metabolism**. Springer, New York, p. 297-319, 2014.

BOTERO, W. G. **Substâncias húmicas: interações com nutrientes e contaminantes**. 2010. 75 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/105692/botero_wg_dr_araiq.pdf?sequence=1>. Acesso em: 29 abr. 2017.

BUCHER, C. A. **Expressão de genes relacionados à absorção e metabolismo de nitrogênio em arroz sob alto e baixo suprimento de nitrato**. 2001. 81f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

BURNS, R. G.; DELLÁGNOLA, G.; MIELE, S.; NARDI, S.; SAVOINI, G.; SCHNITZER, M.; SEQUI, P.; VAUGHAN, D.; VISSER, S. A. **Humic substances: effects on soil and plants**. 1986.

BÜYÜKKESKIN, T.; AKINCI, S. EROGLU, A.E. Effects of humic acid on root development and nutrient uptake of *Vicia faba* L. (Broad Bean) seedlings grown under alumminium toxicity. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 46, p. 277-292, 2015.

CALDERONI, G.; SCHNITZER, M. Effects of age on the chemical structure of paleosol humic acids and fulvic acids. **Geochemistry Cosmochim. Acta.**, v. 48, p. 2045-2051, 1984.

CANELAS, L. P.; DANTAS, D. J.; AGUIAR, N. O.; PERES, L. E. P.; ZSOGON, A.; OLIVARES, F. L.; DOBBSS, L. B.; FAÇANHA, A. R.; NEBBIOSO, A.; PICCOLO, A. Probing the hormonal activity of fractionated molecular humic components in tomato auxin mutants. **Annals of Applied Biology**, v. 159, p. 202-211, set. 2011.

CANELAS, L. P.; DOBBSS, L. B.; OLIVEIRA, A. L.; CHAGAS, J. G.; AGUIAR, N. O.; RUMJANEK, V. M.; NOVOTNY, E. H.; OLIVARES, F. L.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. **European Journal of Soil Science**, p.1-10, abr. 2012.

CANELAS, L. P.; MARTÍNEZ-BALMORI, D.; MÉDICI, L.O.; AGUIAR, N.O.; CAMPOSTRINI, E.; ROSA, R.C. C.; FAÇANHA, A. R.; OLIVARES, F.L. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, v. 366, p. 119-132, mai. 2013.

CANELAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; AGUIAR, N. O.; JONES, D. L.; NEBBIOSO, A.; MAZZEI, P.; PICCOLO, A. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 15-27, nov. 2015.

CANELAS, L. P.; SANTOS, G. A. **Humosfera**: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas. 1. ed. Campo dos Goytacazes: UENF, 2005. 309 p. Disponível em: <http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/LSOL_2727_1154716116.pdf>. Acesso em: 14 mai. 2017.

CANELAS, L. P.; SANTOS, G. A.; RUMJANEK, V. M.; MORAES, A. A.; GURIDI, F. Distribuição da matéria orgânica e características de ácidos húmicos em solos com adição de resíduos de origem urbana. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 12, p. 1529-1538, dez. 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v36n12/7495.pdf>>. Acesso em: 4 mai. 2017.

CANELAS, L. P.; ZANDONADI, D. B.; BUSATO, J. G.; BALDOTTO, M. A.; SIMOES, M. L.; MARTIN-NETO, L.; FAÇANHA, A. R.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Bioactivity and chemical characteristics of humic acids from tropical soils sequence. **Soil Science**, v. 173, n. 9, p. 624-637, set. 2008. Disponível em: <<http://www.suprahumic.unina.it/home/images/pdf/Soil%20Science-Canellas%202008.pdf>>. Acesso em: 13 mai. 2017.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 103, p. 551-560, 2009.

ÇIMRIN, K.M.; TURKMEN, Ö.; TURN, M.; TUER, B. Phosphorus and humic acid application alleviate salinity stress on pepper seedling. **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, v. 9, n. 36; p. 58-45-5856.

CORDEIRO, A. C. C.; SUHRE, E.; MEDEIROS, R. D.; VILARINHO, A. A. Sistemas de Cultivo e Manejo de água na Produção de Diferentes Genótipos de Arroz em Várzea, no Estado de Roraima. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 40, n. 3, p. 362-369, jul./set. 2010. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/869789/1/7979002.pdf>>. Acesso em: 8 abr. 2017.

CORDEIRO, F. C.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; DE SOUZA, S. R. Humic acid effect on catalase activity and the generation of reactive oxygen species in corn (*Zea Mays* L.). **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.75, p. 70-74, 2011.

CONAB, (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **A Cultura do Arroz**. Organizador Aroldo Antonio de Oliveira Neto. Brasília, 2015. 14 p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_03_01_16_56_00_a_cultura_do_arroz_-_conab.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2017.

CRAMER, G. R.; URANO, K.; DELROT, S.; PEZZOTTI, M.; SHINOZAKI, K. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 163, 2011.

CRUZ, R. P.; MILACH, S. C. K. Melhoramento genético para tolerância ao frio em arroz irrigado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 5, p. 909-917, set./out. 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v30n5/a31v30n5.pdf>>. Acesso em: 16 abr. 2017.

DOANE, T. A.; HORWÁTH, W. R. Spectrophotometric Determination of Nitrate with a Single Reagent. **Analytical Letters**, v. 36, n. 12, p. 2713-2722, 2003.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. Arroz: O produtor pergunta, a Embrapa responde (Coleção 500 perguntas e 500 respostas). 2 ed. Brasília, DF: Embrapa: Carlos Martins Santiago, Heloisa Célis de Paiva, Breseghezzo e Carlos Magri Ferreira, 2013. 13 p. Disponível em: <<http://mais500p500r.sct.embrapa.br/view/pdfs/90000023-ebook-pdf.pdf>>. Acesso em: 9 abr. 2017.

FAÇANHA, A. R.; FAÇANHA, A. L. O.; OLIVARES, F. L.; GURIDI, F.; SANTOS G. A.; VELLOSO, A. C. X.; RUMJANEK, V. M.; BRASIL, F.; SCHRIJIPSEMA, J.; BRAZ-FILHO, R.; OLIVEIRA, M. A.; CANELLAS, L. P. Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 37, n. 9, p. 1301-1310, set. 2002. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/pab/v37n9/13205.pdf>>. Acesso em: 14 mai. 2017.

FELKER, P. Micro determination of nitrogen in seed protein extracts. **Analytical Chemistry**, v. 49. 1977.

FERNANDES, M. S. N-carriers, light and temperature influences on uptake and assimilation of nitrogen by rice. **Turrialba**, v. 34, p. 9-18, 1984.

FERNANDES, P. D. Metabolismo do algodoeiro em ambientes adversos In: V Congresso Brasileiro de Algodão, Salvador, **Anais...** 2005.

FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R.; SANTOS, L. A. (Ed.). **Nutrição Mineral de Plantas**. 2. Ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2018.

FERREIRA, L. M. **Características morfológicas, fisiológicas e transcriptoma em variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) contrastantes quanto a tolerância ao estresse hídrico.** 2017. 110 p. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2017.

FERREIRA, C. M.; WANDER, A. E.; SILVA, O. F. **Mercado, Comercialização e Consumo** - EMBRAPA. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fok5vmke02wyiv80bhgp5prthhx4.html>>. Acesso em: 8 abr. 2017.

FERREIRA, R. P; MOREIRA, A.; RASSINI, J. B. **Toxidez de alumínio em culturas Anuais.**

São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2006. 13-14 p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Documentos, 63).

FILHO, A. V. S.; SILVA, M. I. V. Importância das Substâncias Húmicas para a Agricultura. Disponível em:

<http://audienciapublica.ana.gov.br/arquivos/Aud_38_363_importancia%20da%20subst%20humicas.pdf>. Acesso em: 4 mai. 2017.

FREITAS, F. A.; KOPP, M. M.; SOUSA, R. O.; ZIMMER, P. D.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C. Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n. 1, p. 72-79, jan./fev. 2006. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/cr/v36n1/a11v36n1.pdf> >. Acesso em: 16 abr. 2017.

GÁLMES, J.; RIBAS-CARBÓ, M.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Rubisco activity in mediterranean species is regulated by the chloroplastic CO₂ concentration under water stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 2, p. 653-665, 2011.

GARCÍA, A. C. **Frações sólidas humidificadas de vermicomposto: seus efeitos em plantas e capacidade de retenção de metais pesados.** 2013. 130 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2013. Disponível em: <[http://www.ia.ufrrj.br/cpacs/arquivos/teses_dissert/373_\(DO2013\)_Andres_Calderin_Garcia.pdf](http://www.ia.ufrrj.br/cpacs/arquivos/teses_dissert/373_(DO2013)_Andres_Calderin_Garcia.pdf)>. Acesso em: 14 mai. 2017.

GARCÍA, A. C.; SANTOS, L. A.; IZQUIERDO, F. G.; SPERANDIO, M. V. L.; CASTRO, R. N.; BERBARA, R. L. L. Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress. **Journal of Ecological Engineering**, 2012.

GARCÍA, A. C.; SANTOS, L. A.; IZQUIERDO, F. G.; RUMJANEK, V. M.; CASTRO, R. N.; SANTOS, F. S.; SOUZA, L. G. A.; BERBARA, R. L. L. Potentialities of vermicompost humic acids to alleviate water stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). **Journal of Geochemical Exploration**, 2014.

GARCÍA, A. C.; SOUZA, L. G. A.; PEREIRA, M. G.; CASTRO, R. N.; GARCÍA-MINA, J. M.; ZONTA, E.; LISBOA, F. J. G.; BERBARA, R. L. L. Structure-property-function relationship in humic substances to explain the biological activity in plants. **Scientific Reports**, fev. 2016 b.

GARCÍA, A. C.; TAVARES, O. C. H.; BALMORI, D. M.; ALMEIDA, V. S.; CANELLAS, L. P.; GARCÍA-MINA, J. M.; BERBARA, R. L. L. Structure-function relationship of vermicompost humic fractions for use in agriculture. **Journal of Soils and Sediments**, 2016 a.

GARCÍA, A. C.; TAVARES, O. C. H.; BALMORI, D. M.; ALMEIDA, V. S.; CABELLAS, L. P.; GARCÍA-MINA, J.; BERBARA, R. L. L. Structure-function relationship of vermicompost humic fractions for use in agriculture. **Journal of Soils and Sediments**, 2018.

GLORIA, A.; GUERREIRO, C. (Ed.). **Anatomia Vegetal**. 2. Ed. UFV: Universidade Federal de Viçosa, 2006.

GONÇALVES, J. F. C.; SANTOS JR., U. M. Utilization of the chlorophyll a fluorescence technique as a tool for selecting tolerant species to environments of high irradiance. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 17, p. 307-313. 2005.

GUIMARÃES, C. M.; STONE, L. F.; OLIVEIRA, J. P.; RANGEL, P. H.N.; RODRIGUES, C. A. P. Sistema radicular do arroz de terras altas sob deficiência hídrica. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 1, p. 126-134, jan./mar. 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pat/v41n1/a16v41n1.pdf>>. Acesso em: 16 abr. 2017.

GRANT, O. M. Understanding and exploiting the impact of drought stress on plant physiology. In: AHMAD, P.; PRASAD, M. N. V. (Ed.). **Abiotic Stress Responses in Plants**, Springer, New York, p. 89-104, 2012.

HARTWIG, I.; OLIVEIRA, A. C.; CARVALHO, F. I. F.; BERTAN, I.; SILVA, J. A. G.; SCHMIDT, D. A. M.; VALÉRIO, I. P.; MAIA, L. C.; FONSECA, D. A. R.; REIS, C. E. S. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 219-228, abr./jun. 2007. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/viewFile/3431/2790>>. Acesso em: 16 abr. 2017.

HEINEMANN, A. B.; PINHEIRO, B. S. **Características da Planta** - EMBRAPA. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fe75wint02wx5eo07qw4xeclygdut.html>>. Acesso em: 15 abr. 2017.

HENRY, A. IRRI's drought stress research in rice with emphasis on roots: accomplishments over the last 50 years. **Plant Root**, v. 7, p. 5-19, 2013

HERDER, G. D.; VAN ISTERDAEL, G.; BEECKMAN, T.; DE SMET, I. The roots of a new green revolution. **Trends in plant science**, v. 15, n. 11, p. 600-607, 2010.

HOAGLAND, D. R. & ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. California Agricultural Experiment Station, Berkeley, Calif., US., 347P, 1950.

HUNTER, R. J. (Ed.). **Zeta potential in colloid science: Principles and Applications**. 3 Ed. Academic Press: School of Chemistry, University of Sydney, 1988.

JANNIN, L.; ARKOUN, M.; OURRY, A.; LAÎNÉ, P.; GOUX, D.; GARNICA, M.; FUENTES, M.; FRANCISCO, S. S.; BAIGORRI, R.; CRUZ, F.; HOUDUSSE, F.; GARCIA-MINA, J. M.; YVIN, J. C.; ETIENNE, P. Microarray analysis of humic acid effects on Brassica napus growth: Involvement of N, C and S metabolisms. **Plant and Soil**, v. 359, p. 297-319, mar. 2012.

JI, K.; WANG, Y.; SUN, W.; LOU, Q.; MEI, H.; SHEN, S.; CHEN, H. Drought-responsive mechanisms in rice genotypes with contrasting drought tolerance during reproductive stage. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 4, p. 336-344, 2012.

JINDO, K.; MARTIM, A.S.; NAVARRO, E. C.; PÉREZ-ALFOCEA, F.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C.; AGUIAR, N. O.; CANELLAS, L. P. Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. **Plant Soil**, v. 353, p. 209-220, 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Keiji_Jindo/publication/268980723_Root_growth_promotion_by_humic_acids_from_composted_and_nonzomposted_urban_organic_wastes/links/547cd5530cf285ad5b0886ec.pdf?origin=publication_list>. Acesso em: 14 mai. 2017.

KRAMER, E.M. Auxin-regulated cell polarity: an inside job? **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 242-247, 2009.

LAFITTE, H. R.; ISMAIL, A.; BENNETT, J. Abiotic stress tolerance in rice for Asia: Progress and the future. In: NEW DIRECTIONS FOR A DIVERSE PLANET: PROCEEDINGS FOR THE 4th INTERNATIONAL CROP SCIENCE CONGRESS, 2004, **Annals...** Brisbane. Electronic records. Brisbane, Austrália: Crop Science Society of America, 2004. p. 1-17. Disponível em: <www.cropscience.org.au>. Acesso em: 16 abr. 2017.

LOURENÇO, G. F. **O Arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2009. 103 f. Dissertação de Mestrado-Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/PGBB_6650_1241463290.pdf>. Acesso em: 5 abr. 2017.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 2, p. 275-294, 2002.

LECHINOSKI, A.; FREITAS, J. M. N.; CASTRO, D. S.; LOBATO, A. K. S.; NETO, C. F. O.; CUNHA, R. L. M. Influência do estresse hídrico nos teores de proteínas e aminoácidos solúveis totais em folhas de Teca (*Tectona grandis* L. f.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre. v. 5, p. 927-929, jul. 2007.

LISAR, S. Y. S.; MOTAFAKKERAZAD, R.; HOSSAIN, M. M.; RAHMAN, I. M. M. Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses. In: RAHMAN, I. MD. M.; HASEGAWA, H. (Ed.) **Water stress**, Intech, p. 1-14, 2012.

LIVAK, K. J.; CHMITTGEN, T. D.; Analysis of relative gene expression. Data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408. 2001.

MARCONDES, J.; GARCIA, A. B. Aspectos Citomorfológicos do Estresse Salino em Plântulas de Arroz (*Oryza sativa* L.). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 2, p. 187-194, abr./jun. 2009. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v76_2/marcondes.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2017.

MARQUES, R. P.; FREIRE, C. S.; NASCIMENTO, H. H. C.; NOGUEIRA, R. J. M. C. Relações hídricas e produção de pigmentos fotossintéticos em mudas de *Eugenia uniflora* L. sob condições de salinidade. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 3, p. 497-509, 2011.

MENESES, C. H. S. G.; LIMA, L. H. G. M.; LIMA, M. M. A.; VIDAL, M. S. Aspectos Genéticos e Moleculares de Plantas Submetidas ao Déficit Hídrico. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v.10, p.1039-1072, 2006.

MICHAEL, T. P.; MOCKLER, T. C.; BRETON, G.; MCENTEE, C.; BYER, A.; TROUT, J.D.; HAZEN, S.P.; SHEN, R.; PRIEST, H.D.; SULLIVAN, C. M. Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules. **PLoS Genetics**, v.ay modules. **PLoS Genetics**, v.4: e14. 2008.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **TRENDS in Plant Science**. Vol.7, No.9, September. 2002.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; BREUSEGEM, F. V. Reactive oxygen gene network of plants. **TRENDS in Plant Science**. Vol., No.10, October. 2004.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **TRENDS in Plant Science**. Vol.11, No.1, January. 2006.

MORA, V.; BACAICOA, E.; ZAMARREÑO, AM.; AGUIRRE, E.; GARNICA, M.; FUENTES, M.; GARCÍA-MINA, JM. Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 633-642, 2010.

MORA, V.; BAIGORRI, R.; BACAICOA, E.; ZAMARREÑO, AM.; GARCÍA-MINA, JM. 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 and Experimental Botany**, v.76, p. 24-32, fev. 2012.

MUSCOLO, A.; SIDARI, M. Carboxyl and phenolic humic fractions affect *Pinus nigra callus* growth and metabolism. **Soil Science Society of America Journal**, v. 73, n. 4, p. 1119-1129, jul./ago. 2009.

MORO, A. L.; BROETTO, F.; MORO, E. Relação hídrica e teor de clorofila em dois cultivares de arroz submetido à deficiência hídrica e adubação silicatada. **Irriga**, Botucatu, v. 20, n. 3, p. 570-586, jul./set. 2015.

MUSCOLO, A.; SIDARI, M.; ATTINÀ, E.; FRANCIOSO, O.; TUGNOLI, V.; NARDI, S. Biological activity of humic substances is related to their chemical structure. **Soil Science Society of America Journal**, v. 71, n. 1, p. 75-85, jan./fev. 2007.

MUSCOLO, A.; SIDARI, M.; NARDI, S. Humic substance: relationship between structure and activity. Deeper information suggests univocal findings. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 129, p. 57-63, jun. 2013.

NANNIPIERI, P.; GREGO, S.; DELL'AGNOLA, G.; NARDI, S. Proprietà biochimiche e fisiologiche della sostanza organica. In: NANNIPIERI, P. (Ed.). **Ciclo della sostanza organica nel suolo: aspetti agronomici, chimici, ecologici, ecologici & selvicolturali**. Bologna: Patron, 1993. p. 67-78.

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A.; VIANELLO, A. Physiological effects of humic substances on higher plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, p. 1527-1536, nov. 2002.

OLIVEIRA, C.; ZANDONÁ, R. R.; SILVA, B. M.; GARCIA, J. R.; AGOSTINETTO, D. **Estresse oxidativo em plantas de arroz, arroz-vermelho e capim-arroz submetidas a déficit hídrico**. 2015.

OUKARROUM A, MADIDI SE, SCHANSKER G, STRASSER RJ (2007) Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re- watering. **Environ Experim Bot**, v. 60, p. 438–446, 2007.

OUNI, Y.; GHNAYA, T.; MONTEMURRO, F.; ABDELLY, C.; LAKHADAR, A. The role of humic substances in mitigating the harmful effects of soil salinity and improve plant productivity. **International Journal of Plant Productivity**, Berlin, v. 8, n. 3, p. 353-374, 2014.

PAIXÃO, C. L.; JESUS, D. S.; COSTA, D. P.; PEREIRA, P. P. A.; NETO, A. D. A. Caracterização fisiológica e bioquímica de genótipos de girassol com tolerância diferenciada ao estresse hídrico. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 10, n. 19, p. 2012, 2014.

PAKSOY, M.; TÜRKMEN, Ö.; DURSUN, A. Effects of potassium and humic acid on emergence, growth and nutrient contents of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) seedling under saline soil conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 33, p. 5343-5346, ago. 2010. Disponível em: <<https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/92077/81520>>. Acesso em: 14 mai. 2017.

PETROV, V.; HILLE, J.; MUELLER-ROEBER, B.; GECHEV, T. S. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. **Frontiers in Plant Science**, 2015.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. **Soil Science**, v. 166, n. 11, p. 810-832, nov. 2001. Disponível em: <<http://www.suprahumic.unina.it/home/images/pdf/Soil%20Science%202002supramolecular.pdf>>. Acesso em: 13 mai. 2017.

PICCOLO, A. In memoriam Prof. F. J. Stevenson and the Question of humic substances in soil. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**. 2016.

PIMENTEL, C.; **A relação da planta com a água**. Seropédica: Edur, 2004. 191p.

PINHEIRO, F. R. **Estudo das interações entre substâncias húmicas e os íons Ca (II), Mg (II) e Mn (II)**. 2010. 31 p. Relatório (Disciplina Estágio Supervisionado II- QMC 5512)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

PIZZEGHELLO, D.; NICOLINI, G.; NARDI, S. Hormone-like activity of humic substances in *Fagus sylvatica* forests. **New Phytologist**, v. 151, p. 647-657, set. 2001. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.0028-646x.2001.00223.x/epdf>>. Acesso em: 14 mai. 2017.

PRIMO, D. C.; MENEZES, R. S. C.; SILVA, T. O. Substâncias húmicas da matéria orgânica do solo: uma revisão de técnicas analíticas e estudos no nordeste brasileiro. **Scientia Plena**, v. 7, n. 5, p. 1-13, 2011. Disponível em: <<https://www.scientiaplena.org.br/sp/article/view/342>>. Acesso em: 29 abr. 2017.

PUGLISI, E.; FRAGOULIS, G.; DEL RE, A. A.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; GIGLIOTTI, G.; SAID-PULLICINO, D.; TREVISAN, M. Carbon deposition in soil rhizosphere following amendments with compost and its soluble fractions, as evaluated by combined soil-plant rhizobox and reporter gene systems. **Chemosphere**, v. 73, p. 1292-1299, nov. 2008.

RAYLE, D. L.; CLELAND, R. E. The Acid Growth Theory of auxin induced cell elongation is alive and well. **Plant Physiology**, v. 99, p. 1271-1274, ago. 1992. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1080619/>>. Acesso em: 14 mai. 2017.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; FURLAN, M. An alternative methodology for the extraction of humic substances from organic soils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, p.51-56, 1998.

ROSA, A. H. **Substâncias húmicas: extração, caracterização, novas perspectivas e aplicações**. 2001. 87 p. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/105759/rosa_ah_dr_araiq.pdf?sequence=1>. Acesso em: 29 abr. 2017.

ROSA, C. M.; CASTILHOS, R. M. V.; VAHL, L. C.; CASTILHOS, D. D.; PINTO, L. F. S.; OLIVEIRA, E. S.; LEAL, O. A. 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**, Viçosa, v. 33, n. 4, p. 959-967, jul./ago. 2009. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v33n4/20.pdf>>. Acesso em: 14 mai. 2017

RUSSELL, L.; STOKES, A. R.; MACDONALD, H.; MUSCOLO, A.; NARDI, S. Stomatal responses to humic substances and auxin are sensitive to inhibitors of phospholipase A₂. **Plant and Soil**, v. 283, p. 175-185, mai. 2006.

SALAMONI, A. T. **Apostila de aulas teóricas de Fisiologia Vegetal**. Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, sem. 2, 2008.

SANTOS, A. B. **Arroz, Sistema de Cultivo** - EMBRAPA. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000g1wcnzza02wx5ok0ha2lipwbeel46.html#>>. Acesso em: 8 abr. 2017.

SANTOS, C. A. **Substância húmica e seu efeito em atributos químicos e biológicos do solo e na produção vegetal**. 2014. 92 p. Tese (Doutorado em Ciências- Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2014. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11140/tde-05052014-164113/pt-br.php>>. Acesso em: 29 abr. 2017.

SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. **Fundamentos da matéria orgânica do solo**. Porto Alegre: Genesis, 1999. 491 p

SANTOS, J. B.; PROCÓPIO, S. O.; PIRES, F. R., SILVA, A.A.; SANTOS, E.A. Fitorremediação de solo contaminado com trifloxsulfuron-sodium por diferentes densidades

populacionais de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* (L). DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, p. 444-449, 2006.

SERGIEV, I.; TODOROVA, D.; MOSKOVA, I.; GEORGIEVA, N.; NIKOLOVA, A.; SIMOVA, S.; POLIZOEV, D.; ALEXIEVA, V. Protective effect of humic acids against heavy metal stress in triticale. **Comptes rendus de l'Académie des sciences**, v. 66, n. 1, p. 53-60, out. 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/261363964_Protective_Effect_of_Humic_Acids_Against_Heavy_Metal_Stress_in_Triticale>. Acesso em: 14 mai. 2017.

SCHNITZER, M. Organic matter characterization. 2.ed. In: PAGE, A. L., (ed.) **Methods of soil analysis**. Part 2. Chemical and microbiological properties. Madison, ASA/SSSA, 1982. p.581-593.

SILVA, O. F. **Arroz, Estatísticas de Produção** - EMBRAPA. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fe7457q102wx5eo07qw4xezy8czjj.html>>. Acesso em: 8 abr. 2017.

SILVA, R. M.; JABLONSKI, A.; SIEWERDT, L.; JÚNIOR, P. S. Desenvolvimento das raízes do azevém cultivado em solução nutritiva completa, adicionada de substâncias húmicas, sob condições de casa de vegetação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 1623-1631, 2000. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v29n6/5688.pdf>>. Acesso em: 14 mai. 2017.

SIMPSON, A. J.; SONG, G.; SMITH, E.; LAM, B.; NOVOTNY, E. H.; HAYES, M. H. B. Unravelling the structural components of soil humin by use of solution-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Environment Science Technology**, v. 41, p. 883, 2007.

SONDERGAARD, T. E.; SCHULZA, A.; PALMGREN, M. G. Energization of transport processes in plants. Roles of plasma membrane H⁺- ATPase. **Plant Physiology**, v. 136, n.1, p. 2475-2482, set. 2004. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/content/136/1/2475.full.pdf+html>>. Acesso em: 14 mai. 2017.

SOUZA, A. M. S. **Estresse hídrico e expressão de genes no início de crescimento de algodoeiros naturalmente coloridos**. 2014. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S.; MAGALHÃES, J. R. Effects of supplemental nitrogen on nitrogen-assimilation enzymes, free amino nitrogen, soluble sugars, and crude protein of rice. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 5-6, n. 30, p. 711-724, 1999.

SPOSITO, G. **The chemistry of soils**. New York: Oxford University Press, 2004. 277p.

SPOSITO, G. **The chemistry of soils**. 2nd ed. New York, Oxford, 2008. 330p.

STEVENSON, F. J. In: **Humus Chemistry: Genesis, Composition and Reaction**, 1^a Ed., John Wiley & Sons, New York, 1982.

STEVENSON, F. J. **Humus chemistry: genesis, composition, reactions.** 2.ed. New York: Wiley, 1994. 496 p.

STRASSER, B. J.; STRASSER, R. J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental question: The JIP test. In: MATHIS, P. (Ed.), **Photosynthesis: From Light to Biosphere.** Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, vol. V, p. 977–980, 1995.

SUTTON, R.; SPOSITO, G. Molecular structure in soil humic substances: the new view. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 9009-9015, 2005.

SWIFT, R. S. Organic matter characterization. In: SPARKS, D. L.; PAGE, A. L.; HELMKE, P. A.; LOEPPERT, R. H.; SOLTANPOUR, P.N.; TABATABAI, M. A.; JOHNSTON, C. T.; SUMNER, M. E. (Ed.). **Methods of soil analysis.** Madison: Soil Science Society American, 1996. p.1011-1020

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 3^a edição. Porto Alegre – RS. Ed. Artmed, 2004. 719 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 4^a edição. Porto Alegre – RS. Ed. Artmed, 2009. 820 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal.** 6^a edição. Artmed. 2017.

TAVARES, O. C. H. **Efeito dos ácidos húmicos sobre as H⁺-ATPASE, transportadores de N-NO³⁻ e N-NH₄⁺, e sobre o crescimento em arroz.** 2014. 118 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2014.

THACH, L. B.; SHAPCOTT, A.; SCHMIDT, S.; CRITCHLEY, C. The OJIP fast fluorescence rise characterizes *Graptophyllum* species and their stress responses. **Photosynthesis Research**, v. 94, p. 423-436. 2007.

TRAVERSA, A.; LOFFREDO, E.; GATTULLO, C. E.; PALAZZO, A. J.; BASHORE, T. L.; SENESI, N. Comparative evaluation of compost humic acids and their effects on the germination of switchgrass (*Panicum vigatum* L.). **Journal Soils Sediments**, v. 14, p. 432-440, 2014.

TREVISAN, S.; BOTTON, A.; VACCARO, S.; VEZZARO, A.; QUAGGIOTTI, S.; NARDI, S. Humic substances affect *Arabidopsis* physiology by altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development. **Environmental and Experimental Botany**, v. 74, p. 45-55, dez. 2011.

TREVISAN, S.; PIZZEGHELLO, D.; RUPERTI, B.; FRANCIOSO, O.; SASSI, A.; PALME, K.; QUAGGIOTTI, S.; NARDI, S. Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in *Arabidopsis*. **Journal of Plant Biology**, v. 12, p. 604-614, 2009.

VACCARO, S.; MUSCOLO, A.; PIZZEGHELLO, D.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; NARDI, S. Effect of a compost and its water-soluble fractions on key enzymes of nitrogen metabolism in maize seedlings. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 57, p. 11267-11276, 2009.

VELLINI, A. L. T. T.; PAULA, N. F.; ALVES, P. L. C. A.; PAVANI, L. C.; BONINE, C. A. V.; SCARPINATI, E. A.; PAULA, R. C. Respostas fisiológicas de diferentes clones de eucalipto sob diferentes regimes de irrigação. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 651-663, 2008.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. Arroz: Composição e Características Nutricionais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 4, p. 1184-1192, jul. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v38n4/a49v38n4.pdf>>. Acesso em: 8 abr. 2017.

WANGEN, D. R. B.; MENDES, L. F.; SAGATA, E.; SILVA, H. C.; SHIMAMOTO G. F. Fertilizante orgânico na produção de couve-da-malásia, *Brassica chinensis* var. parachinensis (Bailey) Sinskaja. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, p. 1429-1435, 2013.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino-acid with ninhydrin, **Analytical Biochemistry**. 80: p. 209-213. 1955.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plants extracts by anthrone, **Biochemistry**, vol 57, p.508-514. 1954.

YUSUF, M.A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE; SARIN, N.B. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p. 1428-1438, 2010.

8. ANEXOS

8.1 Resultados de diferentes doses de ácido húmico

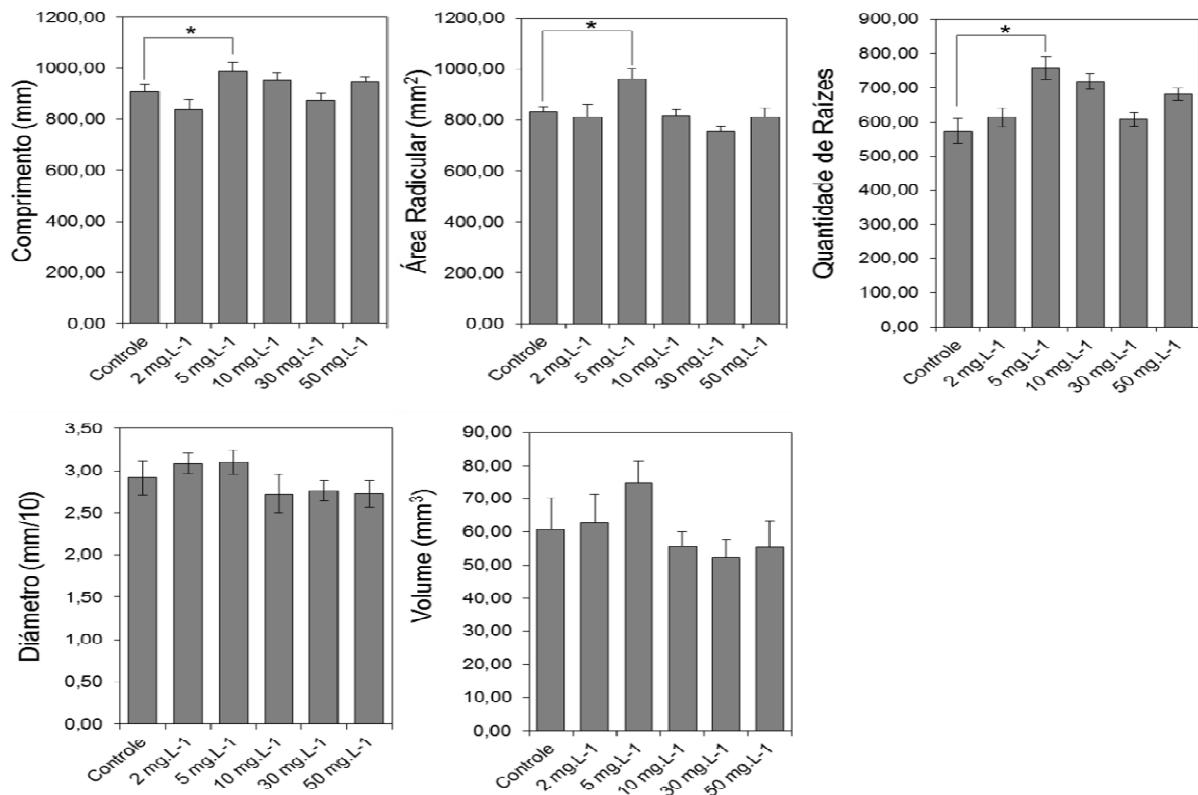


Figura 40. Efeito de diferentes doses de ácido húmico obtido de vermicomposto (AHVC) em alguns parâmetros do desenvolvimento radicular em plantas de arroz da var. BRS Esmeralda.

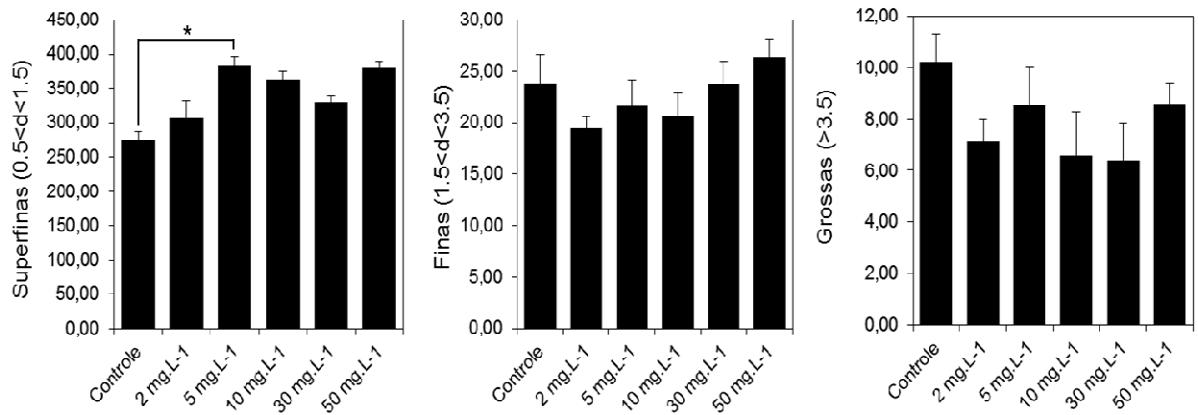


Figura 41. Efeito de diferentes doses de ácido húmico obtido de vermicomposto (AHVC) no aumento do número de raízes de diferentes diâmetros.

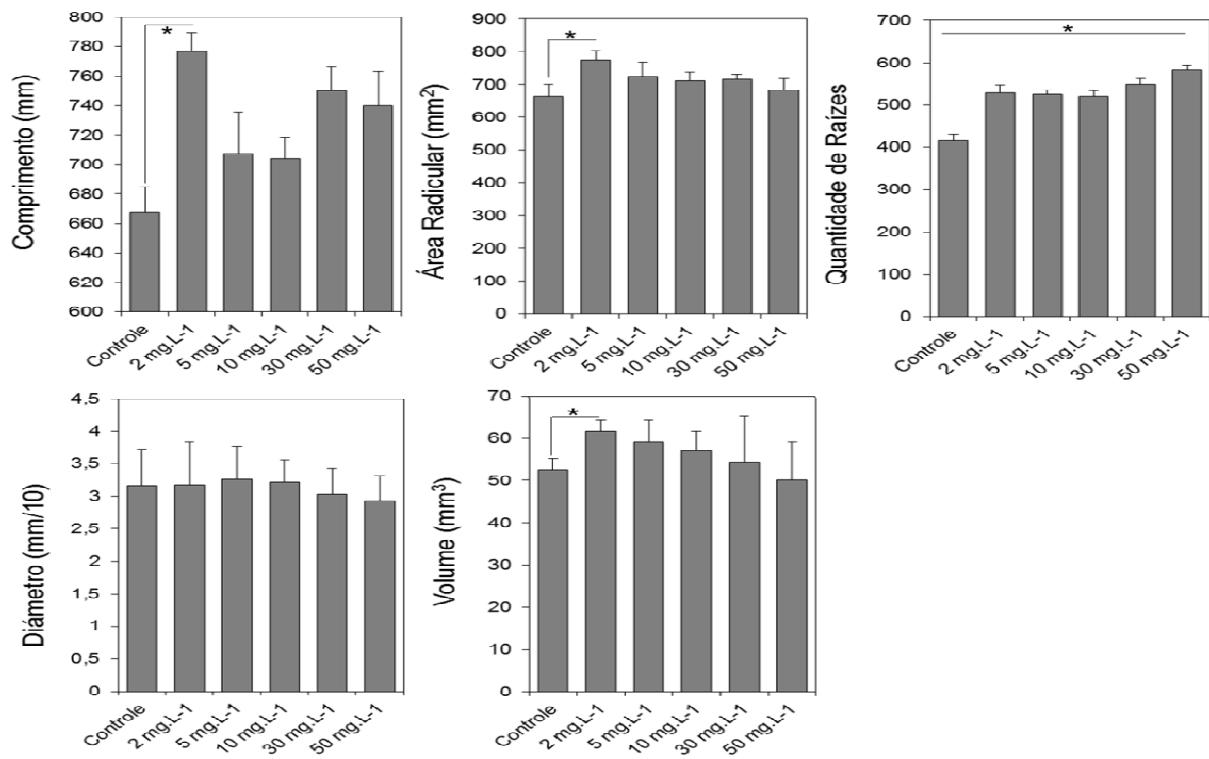


Figura 42. Efeito de diferentes doses de ácido húmico obtido de Organossolos (AHSOLO) em alguns parâmetros do desenvolvimento radicular em plantas de arroz da var. BRS Esmeralda.

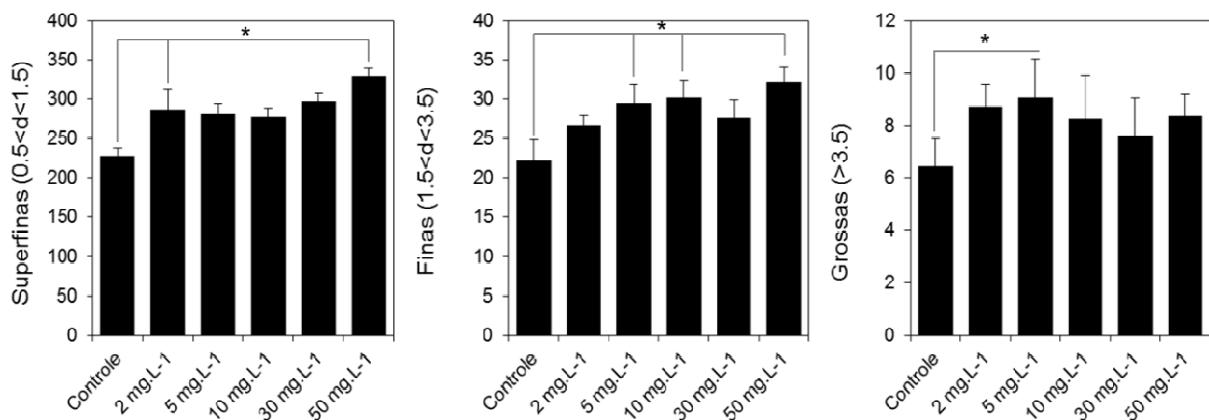


Figura 43. Efeito de diferentes doses de ácido húmico obtido de Organossolo (AHSOLO) no aumento do número de raízes de diferentes diâmetros.

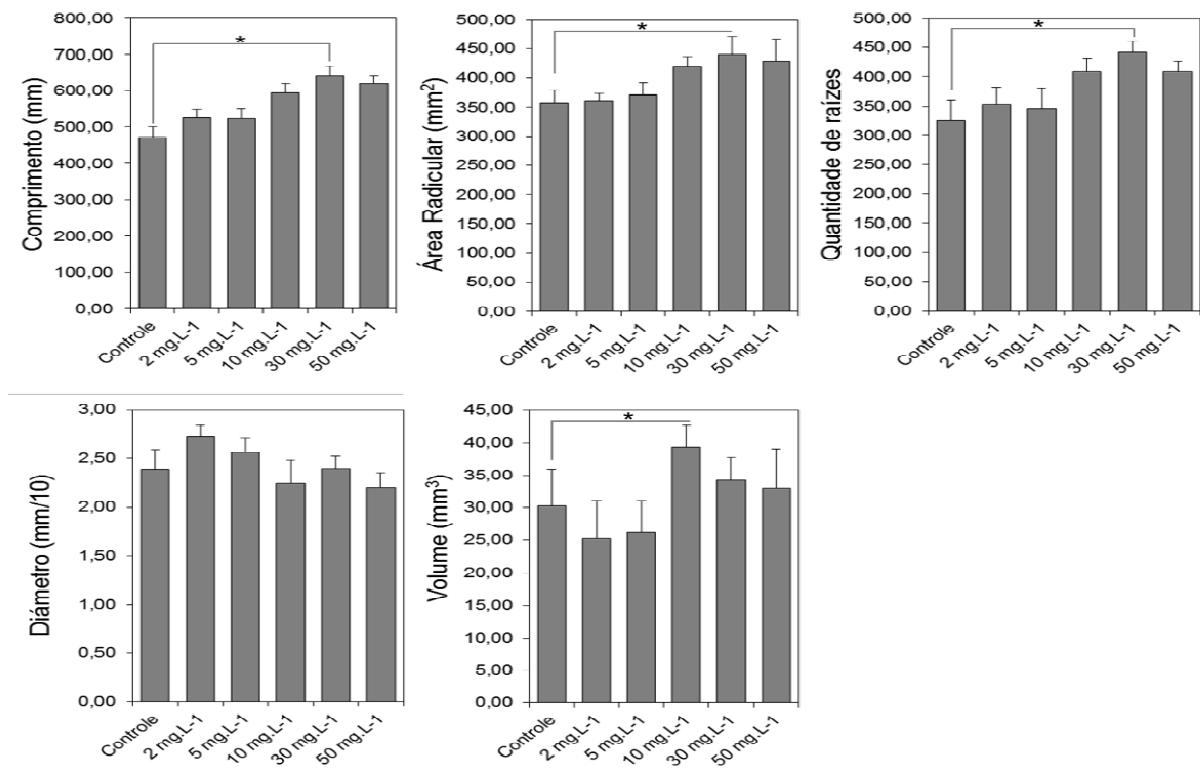


Figura 44. Efeito de diferentes doses de ácido húmico obtido de sedimento do Rio Negro (AHRN) em alguns parâmetros do desenvolvimento radicular em plantas de arroz da var. BRS Esmeralda.

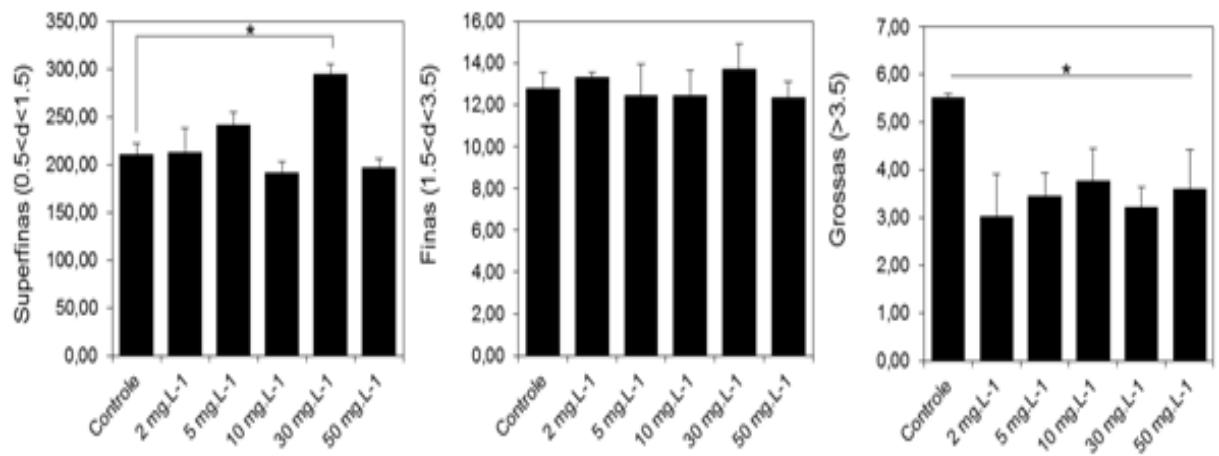


Figura 45. Efeito de diferentes doses de ácido húmico obtido de sedimento do Rio Negro (AHRN) no aumento do número de raízes de diferentes diâmetros.