



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

**MARIANA MOROZESK**

**EFEITOS DOS ÁCIDOS HÚMICOS PROVENIENTES DE ATERRO  
SANITÁRIO EM PLANTAS**

VITÓRIA  
2014

MARIANA MOROZESK

**EFEITOS DOS ÁCIDOS HÚMICOS PROVENIENTES DE ATERRO  
SANITÁRIO EM PLANTAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Silvia Tamie Matsumoto  
Co-orientador: Prof. Dr. Leonardo Barros Dobbss

VITÓRIA

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

M871e Morozesk, Mariana, 1990-  
Efeitos dos ácidos húmicos provenientes de aterro sanitário  
em plantas / Mariana Morozesk. – 2014.  
110 f. : il.

Orientador: Silvia Tamie Matsumoto.

Coorientador: Leonardo Barros Dobbss.

Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e  
Naturais.

1. Fisiologia vegetal. 2. Citologia. 3. Anatomia. 4. Stress  
oxidativo. 5. Ácido húmico. 6. Zea mays L. I. Matsumoto, Silvia  
Tamie. II. Dobbss, Leonardo Barros. III. Universidade Federal  
do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV.  
Título.

CDU: 57

---

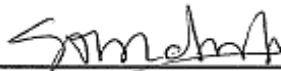
**MARIANA MOROZESK**

**EFEITOS DOS ÁCIDOS HÚMICOS PROVENIENTES DE ATERRO  
SANITÁRIO EM PLANTAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 13 de fevereiro de 2014.

**COMISSÃO EXAMINADORA**




---

**Prof.ª. Dra. Silvia Tamie Matsumoto**  
Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal - UFES  
**Orientadora**



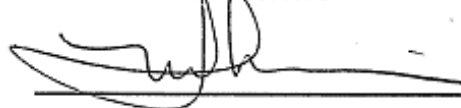
---

**Prof. Dr. Leonardo Barros Dobbss**  
Universidade Vila Velha - UVV  
**Co-orientador**



---

**Prof. Dr. Paulo Cezar Cavatte**  
Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal - UFES  
**Examinador Interno**



---

**Prof.ª. Dra. Maria Aparecida Marin Morales**  
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP  
**Examinador Externo**

*Dedico à minha amada mãe, Edina.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Espírito Santo, pelo ensino e infraestrutura disponibilizados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de mestrado concedida.

À todos os professores e profissionais do Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, pelo conhecimento transmitido, dedicação e valiosas contribuições.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Silvia Tamie Matsumoto, pela amizade, por ter aceitado orientar este trabalho e por todo o apoio durante a minha formação.

Ao Prof. Dr. Leonardo Barros Dobbss, pela co-orientação e por todo o auxílio durante a execução deste trabalho.

Agradeço aos membros da banca, que aceitaram corrigir este trabalho e por todas as contribuições.

Aos velhos companheiros do GEMUT (Marina, Lívia, Ian e Iara), por dividirem cada detalhe deste trabalho comigo, pela força, amor e respeito que recebi de vocês todos esses anos.

Aos colegas do PPGBV, pelo apoio e por todos os momentos excepcionais que passamos juntos.

Ao Henrique, pelo carinho, amor, confiança e apoio emocional neste momento tão complicado da minha vida.

À minha amada família, pela confiança, suporte, amor e carinho.

## RESUMO

O processo de tratamento biológico dos lixiviados de aterros sanitários resulta na geração de grandes quantidades de lodo, caracterizados por conterem altas taxas de matéria orgânica. Por meio do fracionamento químico da matéria orgânica são obtidos os ácidos húmicos (AH), fração de comprovada eficiência sobre o crescimento vegetal, promovendo melhorias no desenvolvimento das plantas. Este trabalho teve como objetivo caracterizar quimicamente os AH extraídos do lodo de lixiviado de aterro sanitário e avaliar os efeitos da aplicação de diferentes doses dos AH por meio de análises biológicas em plantas, visando minimizar os potenciais riscos da utilização do lodo *in natura*. Por meio de caracterizações químicas, o ácido húmico apresentou elevados teores de carbono e nitrogênio, podendo constituir uma importante fonte de nutrientes para as plantas. Além disso, foram observadas alterações nas taxas de absorção, na bioconcentração e na translocação de alguns nutrientes. Com relação à análise das enzimas antioxidantes, foi possível observar aumento na atividade de algumas enzimas com a aplicação de diferentes doses de AH. Além disto, foram constatadas alterações citogenéticas por meio da análise de células meristemáticas e F<sub>1</sub> de *Allium cepa*. Influências sobre o crescimento da planta também são reportadas, por meio de aumentos expressivos na área radicular e na altura de *Zea mays*. Em geral, os dados de crescimento revelaram um maior investimento da planta na parte aérea, provavelmente associado com a melhor eficiência do sistema radicular. Além disso, também foram reportadas alterações na espessura da epiderme. Neste contexto, apesar dos benefícios nutricionais e da comprovada atuação dos AH sobre o metabolismo vegetal, os seus efeitos biológicos sobre enzimas do estresse oxidativo e a sua capacidade citotóxica precisam ser melhor investigados. Devido à complexidade do resíduo, a utilização de análises químicas, genéticas, enzimáticas, fisiológicas e anatômicas foi uma importante ferramenta para a avaliação da possível aplicação dos ácidos húmicos em plantas.

**Palavras-chave:** *Zea mays*; citotoxicidade; teste *Allium cepa*; análise de crescimento e estresse oxidativo.

## ABSTRACT

The process of biological treatment of landfills leachate results in the generation of large amounts of sludge, characterized by containing high levels of organic matter. The chemical fractionation of organic matter results in humic acids (HA) that has been demonstrated with high efficiency on the plant growth promoting improvements on development. This work aimed to evaluate the effects of exposure of plants to different doses of HA extracted from sludge landfill by chemical and biological analysis, to elucidate the effects of this organic material and minimize the potential risks of using sludge *in natura*. Chemical characterization of HA showed high carbon and nitrogen levels, which can consist in an important source of nutrients for plants. Furthermore, effects were observed in the absorption rates and in factors of bioconcentration and translocation of some nutrients. Regarding the analysis of antioxidant, enzymes were possible to observe different effects of HA with the each dose applied. Furthermore, cytogenetic abnormalities were detected in meristematic cells and F<sub>1</sub>. Actions on plant growth are also reported through significant increases in root area and height. In general, growth data showed an investment in the plant shoot, probably associated with the improved efficiency of the root system. Moreover, alterations on thickness of the epidermis were also reported. In this context, despite the evidenced nutritional benefits and the activity of HA on plant metabolism, their biological effects on oxidative stress enzymes and its cytotoxic capacity need to be clarified. Due to the complexity of the compound, the use of chemical, genetic, enzymatic, physiological and anatomical analyzes was an important tool in evaluating the application of humic acids in plants.

**Keywords:** *Zea mays*; cytotoxicity; test *Allium cepa*; growth analysis and oxidative stress.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (Artigo I) – Condutividade elétrica das soluções nutritivas .....	59
Tabela 2 (Artigo I) – Quantificação elementar dos ácidos húmicos .....	59
Tabela 3 (Artigo I) – Análise de metais nas soluções nutritivas .....	60
Tabela 4 (Artigo I) – Análises bioquímicas em <i>Z. mays</i> .....	61
Tabela 5 (Artigo I) – Análises citogenéticas pelo teste <i>A. cepa</i> .....	62
Tabela 1 (Artigo II) – Caracterização elementar dos ácidos húmicos .....	86
Tabela 2 (Artigo II) – Quantificação de nutrientes nas soluções nutritivas .....	87
Tabela 3 (Artigo II) – Teor de pigmentos fotossintéticos em <i>Z. mays</i> .....	89
Tabela 4 (Artigo II) – Análises de crescimento em <i>Z. mays</i> .....	90
Tabela 5 (Artigo II) – Análises anatômicas em <i>Z. mays</i> .....	91

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>12</b>
2.1 RESÍDUOS SÓLIDOS.....	12
2.2 LIXIVIADOS DE ATERROS SANITÁRIOS.....	13
2.3 SUBSTÂNCIAS HÚMICAS.....	15
2.4 SISTEMA-TESTE <i>Allium cepa</i> L. ....	18
2.5 CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE <i>Zea mays</i> L.....	19
2.6 ESTRESSE OXIDATIVO EM PLANTAS .....	20
2.7 IMPORTÂNCIA DAS ANÁLISES FISIOLÓGICAS E ANATÔMICAS .....	22
<b>3 HIPÓTESES</b> .....	<b>24</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
5.1 COLETA DAS AMOSTRAS.....	26
5.2 EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS .....	26
5.3 DETERMINAÇÃO DAS DOSAGENS UTILIZADAS .....	26
5.4 ÁREA DE ESTUDO.....	27
5.5 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	27
5.6 CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE .....	29
5.7 ANÁLISES QUÍMICAS .....	30
5.8 FATORES DE BIOCONCENTRAÇÃO E TRANSLOCAÇÃO .....	31
5.9 ANÁLISES DE CRESCIMENTO .....	31
5.10 ANÁLISES ANATÔMICAS .....	32
5.11 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PIGMENTOS.....	33
5.12 ANÁLISES DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS .....	34
5.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	38
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
6.1 ARTIGO I: Efeitos dos ácidos húmicos de aterro sanitário sobre a citotoxicidade e em enzimas de estresse oxidativo em plantas .....	39
6.2 ARTIGO II: Ácidos húmicos de aterro sanitário: efeitos nutricionais, fisiológicos e anatômicos em plântulas <i>Zea mays</i> L. ....	66
<b>7 CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>95</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>96</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A produção crescente de resíduos sólidos constitui um importante e emergente problema na sociedade atual, sendo os aterros sanitários a forma mais adequada e usual de destinação final destes resíduos (BADERNA et al., 2011). Após o condicionamento dos resíduos nos aterros, ocorrem diversos processos biológicos e químicos naturais que geram um líquido proveniente da digestão de matéria orgânica sólida por ação bacteriana, denominado lixiviado de aterro sanitário ou, genericamente, chorume (CELERE et al., 2007).

Devido às altas taxas de poluentes orgânicos e inorgânicos, presentes no lixiviado, torna-se necessário a implementação de métodos adequados de descarte e tratamento desses lixiviados para evitar que este resíduo represente uma fonte de contaminação de solos e de recursos hídricos (LABANOWSKI et al., 2010). O tratamento biológico é uma prática frequentemente utilizada para lixiviados de aterros sanitários (ATMACA, 2009), onde a remoção de grande parte do material particulado produzido durante o processo forma o lodo de lixiviado (NAGASHIMA et al., 2010). Devido ao alto teor de matéria orgânica presente no lodo, este tem sido foco em diversos trabalhos, que visam a sua utilização para diversos fins (TSUTIYA, 2001; ADANI et al., 2010; BADERNA et al., 2011).

O lodo de aterro sanitário gerado após o processo de tratamento biológico é composto majoritariamente pelo principal componente da matéria orgânica, denominado de substâncias húmicas (SH). Alguns autores relatam a influência das SH no metabolismo vegetal (CANELLAS et al., 2012; D'ORAZIO; SENESI, 2009). Dentre as SH, os ácidos húmicos (AH) são os mais comumente estudados (XIAOLI et al., 2013; ADANI et al., 2010) apresentando diversos efeitos estimulatórios sobre as plantas, por serem moléculas bioativas, que podem acessar receptores dentro ou fora da célula (CANELLAS et al., 2002).

Apesar das vantagens relacionadas à ação das SH, já foram observados efeitos controversos, como a estimulação de enzimas de estresse e a geração de moléculas reativas de oxigênio (CORDEIRO et al., 2011; GARCÍA et al., 2012), afetando o crescimento e desenvolvimento de diferentes espécies vegetais (FOREMAN et al., 2003). Estes compostos modificam o metabolismo das plantas e podem: melhorar o transporte de íons, facilitando a absorção; promover aumento da respiração e da velocidade das reações enzimáticas do ciclo de Krebs, devido a maior produção de ATP; alterar o conteúdo de clorofila; modificar a velocidade de síntese dos ácidos nucléicos e ainda alterar atividade de diversas enzimas (NANNIPIERI et al., 1993). Além disso, já foram observados efeitos na abertura estomática (PALANIVELL et al., 2013) e no desenvolvimento do sistema vascular das plantas, promovendo crescimento tanto do sistema radicular quanto da parte aérea (SILVA et al., 1999). A maioria dos efeitos descritos já foram observados para altas dosagens de substâncias húmicas originadas de diferentes fontes orgânicas (lodo de esgoto, compostos orgânicos, turfa e ácidos húmicos comerciais) (AYUSO et al., 1996).

Por outro lado, por constituírem macromoléculas de massa relativamente elevada, o efeito fisiológico direto das frações humificadas, tais como os ácidos húmicos (AH), é incompatível com seu tamanho e, conseqüentemente, com sua entrada na célula por meio das membranas biológicas. Sendo assim, a promoção no crescimento vegetal não está completamente elucidada e tem sido justificada, pelo aumento da solubilidade de micronutrientes com a formação de complexos solúveis (CHEN et al., 2003; GARCIA-MINA et al., 2004) ou, ainda, pelo aumento da permeabilidade da membrana plasmática (VISSER, 1982).

Dentre as espécies vegetais, o milho tem sido utilizado em diversas pesquisas com SH devido seu elevado potencial produtivo, acentuada habilidade fisiológica na conversão de compostos minerais em orgânicos (SEVERINO et al., 2005; CRUZ et al., 2008) e ser um organismo teste eficiente, por apresentar alta sensibilidade à exposição de substâncias húmicas (PINTON et al. 1999; CANELLAS et al., 2002; QUAGGIOTTI et al., 2004; PALANIVELL et al., 2013).

Devido à complexidade de respostas associadas às SH, a integração de análises químicas, citogenéticas, bioquímicas, fisiológicas e anatômicas configuram dados consistentes para avaliar a resposta das diferentes espécies vegetais frente aos efeitos da aplicação destes compostos. Dessa forma, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos da exposição de plantas à diferentes doses de ácidos húmicos extraídos de lodo de aterro sanitário, por meio da integração de análises químicas e biológicas, visando elucidar os efeitos e potenciais riscos da utilização deste composto.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 RESÍDUOS SÓLIDOS

Uma grande preocupação ambiental da sociedade moderna está relacionada a produção de resíduos sólidos. Com a intensificação do processo industrial, aliada ao crescimento da população e à conseqüente demanda por bens de consumo, são produzidas quantidades significativas de resíduos sólidos, caracterizados por constituírem misturas altamente complexas (CELERE et al., 2007; SOARES et al., 2007).

O sistema de gerenciamento dos resíduos sólidos urbanos (RSU) é composto por atividades de geração, acondicionamento, coleta, transporte, reaproveitamento, tratamento e destinação final. Atualmente, o método de tratamento de RSU mais utilizado e que apresenta menor custo consiste em sua estocagem no solo, em locais apropriados, denominados de aterros sanitários (LEITE et al., 2004).

A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1985) define os aterros sanitários como uma técnica de disposição de resíduos sólidos urbanos no solo, sem causar danos ou riscos à saúde pública e à segurança, minimizando os impactos ambientais.

Após o armazenamento, os resíduos presentes nos aterros sanitários passam por diversos processos biológicos e químicos naturais, gerando, dentre outros, resíduos líquidos provenientes da digestão de matéria orgânica sólida por ação de bactérias endêmicas. Devido à presença de umidade e com a percolação das águas das chuvas nas áreas dos aterros, estes compostos, ricos em matéria orgânica, originam um líquido escuro denominado lixiviado de aterro sanitário ou, mais genericamente, chorume (CELERE et al., 2007; BADERNA et al., 2011).

## 2.2 LIXIVIADOS DE ATERROS SANITÁRIOS

### 2.2.1 Características químicas e biológicas dos lixiviados

Os lixiviados de aterros sanitários são originados da degradação da matéria orgânica sólida, dispostas nestes locais, por meio da ação de exo-enzimas bacterianas, cuja ação leva à solubilização da matéria orgânica e, conseqüentemente, a assimilação desta pelas próprias células bacterianas. Esse processo é influenciado por diversos fatores como a umidade, a temperatura, a topografia do aterro, a geologia local, além do regime e intensidade das chuvas, formando um resíduo de composição física e química variável (PACHECO; PERALTA-ZAMORA, 2004; CELERE et al., 2007).

Segundo Christensen et al. (2001), o lixiviado é considerado um líquido de matriz complexa, composta por quatro frações principais: (I) matéria orgânica dissolvida (formada principalmente por ácidos graxos voláteis, ácidos húmicos e ácidos fúlvicos); (II) compostos orgânicos xenobióticos (representados por hidrocarbonetos aromáticos, compostos de natureza fenólica e compostos organoclorados alifáticos); (III) macro componentes inorgânicos (dentre os quais se destacam Ca, Mg, Na, K,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_4^+$ , Fe, Mn, Cl,  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{HCO}_3^-$ ); e (4) metais potencialmente tóxicos (Cd, Cr, Cu, Pb, Ni e Zn). Além disso, compostos como B, As, Se, Ba, Li, Hg e Co também podem ser encontrados nos lixiviados, porém em menores concentrações.

Dessa forma, o manejo dos lixiviados de aterros sanitários requerem rígidas medidas de segurança, devido a presença de substâncias altamente solúveis e tóxicas que, quando mal administrados, podem alcançar os recursos hídricos superficiais ou até se infiltrar no solo, atingindo as águas subterrâneas, comprometendo a qualidade e os potenciais usos destes mananciais (LABANOWSKI et al., 2010).

### **2.2.2 Processo de produção do lodo de lixiviado de aterro sanitário**

O processo de tratamento dos lixiviados proveniente de aterros sanitários é composto por três unidades: (I) um reator no qual os microrganismos aeróbicos responsáveis pela assimilação da matéria orgânica são mantidos em suspensão sob aeração; (II) o tanque de sedimentação em que ocorre a separação das fases líquidas e sólidas; e (III) um sistema de reciclagem que retorna uma percentagem de sólidos sedimentados na unidade de separação líquido-sólido para o tanque de aeração (MORAIS et al., 2006).

Durante o tratamento, o processo de coagulação/floculação tem por finalidade transformar o material solubilizado e as partículas em suspensão fina ou em estado coloidal, em agregados maiores. A remoção destes agregados ou flocos é responsável pela clarificação do lixiviado, resultando no acúmulo de lodo. Tal resíduo apresenta materiais inorgânicos e orgânicos, derivados do lixiviado, e outros constituintes, resultantes dos compostos químicos aplicados no tratamento do lixiviado. Desta forma, assim como os lixiviados gerados nos aterros sanitários, os lodos gerados pelo tratamento devem estar de acordo com os padrões e normas que regulamentam a disposição de resíduos (NAGASHIMA et al., 2010).

O lodo de aterro sanitário, posteriormente passa por um processo de secagem e, devido ao alto teor de matéria orgânica vêm sendo utilizados em diversas pesquisas, que visam a utilização em áreas agrícolas (TSUTIYA, 2001; ADANI et al., 2010; BADERNA et al., 2011).

### **2.2.3 Utilização e aplicações do lodo de aterro sanitário na agricultura**

A aplicação e reutilização de lodos sanitários têm sido feitas mundialmente por minimizar a exploração de recursos naturais, por reduzir a quantidade de resíduos com restrições ambientais quanto à sua destinação final, por viabilizar a reciclagem de nutrientes, promover melhorias físicas, especialmente na estruturação do solo e por



apresentar uma solução definitiva para a disposição do lodo (ANDREOLI; PEGORINI, 2000).

O aproveitamento de águas residuais ricas em material orgânico tem sido adotado, com frequência, como forma de disposição final adequada desses resíduos, com o objetivo de se obter uma melhoria na qualidade do solo e um consequente aumento na produtividade de muitas culturas agrícolas (MATOS et al., 2008).

Para a aplicação do lodo na agricultura é necessária a avaliação de sua qualidade química e toxicológica, para que seja evitada qualquer contaminação da área destinada à aplicação. Para isso, é importante controlar as possíveis adições de nutrientes e metais pesados ao solo. Nesse contexto, a resolução CONAMA 375/06 (BRASIL, 2006), define critérios e procedimentos para o uso agrícola de lodos e seus produtos derivados e determina a concentração máxima de metais pesados permitida nesses resíduos.

## 2.3 SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

### 2.3.1 Características químicas e estruturais

As SH são tradicionalmente consideradas como macromoléculas que apresentam acidez e elevada massa molecular, sendo extraídas de solos, resíduos/compostos orgânicos e sedimentos, principalmente por soluções alcalinas (TAN, 2003). As SH constituem o principal componente da matéria orgânica dos solos, das águas e dos sedimentos, e por definição, possuem coloração escura originada da oxidação e subsequente polimerização da matéria orgânica, constituindo uma mistura heterogênea de moléculas polidispersas, que apresentam grupos funcionais distintos, sendo responsáveis por inúmeros processos naturais (STEVENSON, 1994).

Com base nas suas solubilidades em meio aquoso, as SH são usualmente classificadas em: (I) ácidos fúlvicos (AF), que constitui a fração solúvel em qualquer valor de pH; (II) ácidos húmicos (AH), que representa a fração solúvel em meio alcalino e insolúvel em meio ácido (pH <2); (III) humina, fração insolúvel em qualquer condição de pH (STEVENSON, 1994).

Atualmente, com o desenvolvimento de novas tecnologias e por meio da utilização de análises químicas e espectroscópicas de maior eficiência, o conceito de SH foi redefinido, como uma associação supramolecular de pequenas moléculas heterogêneas, estabilizadas por ligações fracas, que podem ser desmontadas, por exemplo, por ácidos orgânicos exsudados das raízes das plantas. Nesse sentido, os ácidos fúlvicos (AF) foram definidos como uma associação de pequenas macromoléculas hidrofílicas que apresentam uma quantidade de grupamentos funcionais ácidos suficientemente grandes, para se manter dispersos em qualquer valor de potencial hidrogeniônico (pH). A fração de ácidos húmicos (AH), por sua vez, foi definida como associações de materiais humificados, onde predominam compostos hidrofóbicos (cadeias polimetilênicas, ácidos graxos, esteroides), que são estabilizados em pH neutro por forças hidrofílicas dispersivas (PICCOLO, 2002).

### **2.3.2 Atividade biológica**

O efeito das substâncias húmicas sobre o metabolismo das plantas foi resumido por Nannipieri et al. (1993) como resultado (I) da influência positiva sobre o transporte de íons, facilitando a absorção; (II) do aumento da respiração e da velocidade das reações enzimáticas do ciclo de Krebs, resultando em maior produção de ATP; (III) do aumento no conteúdo de clorofila; (IV) do aumento na velocidade e síntese de ácidos nucléicos; (V) do efeito seletivo sobre a síntese protéica e (VI) do aumento ou inibição da atividade de diversas enzimas.

Por constituírem macromoléculas de massa relativamente elevada, o efeito fisiológico direto das frações humificadas, tais como os ácidos húmicos (AH), é incompatível com

seu tamanho e, conseqüentemente, com sua entrada na célula através das membranas biológicas. Sendo assim, a promoção no crescimento vegetal tem sido justificada, pelo aumento da solubilidade de micronutrientes com a formação de complexos solúveis (CHEN et al., 2003; GARCIA-MINA et al., 2004) ou, ainda, pelo aumento da permeabilidade da membrana plasmática (MP), já que as SH têm um conhecido efeito surfactante e, portanto, são capazes de dissolver a camada lipídica das membranas biológicas (VISSER, 1982). Por outro lado, o aumento da permeabilidade das membranas biológicas, por meio da dissipação de potencial, provocado pela abertura dos poros das camadas lipídicas, sem dúvida, altera a sua permeabilidade, mas acarreta perdas na seletividade da membrana. Essa condição é essencial para a homeostase celular, pois, apesar de facilitar a entrada dos íons na célula, a saída desse é igualmente facilitada.

Outros trabalhos indicam que as SH também podem atuar no metabolismo vegetal da mesma forma como os hormônios, ou seja, mediante processos de sinalização molecular. Bottomley (1917) verificou intensa promoção de crescimento com pequenas concentrações de SH. Sistemáticamente vem sendo encontrada atividade hormonal em SH de baixa massa molecular (AF) (PIZZEGHELLO et al., 2001; NARDI et al., 2000), substâncias húmicas solúveis em água (QUAGGIOTTI et al., 2004) e substâncias húmicas extraídas com ácidos orgânicos (NARDI et al., 2005). Além disso, os efeitos fisiológicos diretos de AH foram, há bastante tempo, avaliados por pesquisas com radioisótopos, mostrando haver evidências da absorção de AH pelas células (FLAIG, 1968; KONONOVA, 1982).

Neste contexto, acredita-se que os AH tenham efeitos estimulatórios sobre as plantas devido à liberação de moléculas bioativas, que podem acessar os receptores dentro ou fora da célula. Estudos anteriores já detectaram a atuação destes compostos na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática em plantas de milho, exercendo um papel no crescimento de células vegetais (CANELLAS et al., 2002). Todos esses efeitos estão associados à ação da auxina, um hormônio vegetal que ativa a H<sup>+</sup>-

ATPase (MORSOMME et al., 2000), corroborando assim a atividade tipo-hormonal dos ácidos húmicos.

Outros efeitos atribuídos as SH são a estimulação da absorção e do transporte de nutrientes e efeitos na abertura estomática (PALANIVELL et al., 2013). Além disso, estes compostos promovem o desenvolvimento do sistema vascular, levando a uma melhor absorção de nutrientes, e estimulam o crescimento tanto do sistema radicular quanto da parte aérea (SILVA et al., 1999). Estes efeitos já foram observados também para dosagens elevadas de SH originadas de diferentes fontes orgânicas (lodo de esgoto, compostos orgânicos, turfa e ácidos húmicos comerciais) (AYUSO et al., 1996).

#### 2.4 SISTEMA-TESTE *Allium cepa* L.

Bioensaios vegetais são mais sensíveis e mais simples em relação à maioria dos métodos utilizados para detectar efeitos genotóxicos de poluentes ambientais, e têm sido validados, em nível internacional, por vários estudos que corroboram sua eficiência (YI et al., 2007; BIANCHI et al., 2011). Dentre eles, os vegetais mais usados para este fim, são da espécie *Allium cepa* L. (Liliaceae) tem se mostrado um eficiente organismo teste, pela sua sensibilidade e confiabilidade na avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico de substâncias químicas, obtidos por meio de alterações na atividade mitótica e de aberrações cromossômicas em células meristemáticas e F<sub>1</sub> das raízes dessa espécie (VIDAKOVIC-CIFREK et al., 2002; TABREZ; AHMAD, 2011).

Espécimes de *A. cepa* possuem cromossomos grandes e em número reduzido ( $2n = 16$ ), sendo este fator fundamental para estudos de avaliação de danos cromossômicos e/ou de distúrbios do ciclo de divisão celular. Pelo teste de aberrações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* pode ser quantificada uma série de parâmetros morfológicos e citogenéticos, dentre eles a morfologia e o crescimento da raiz, o índice mitótico, a indução de micronúcleos e de anormalidades no ciclo celular, como C-

metáfases, aderências cromossômicas, pontes e fragmentações cromossômicas, entre outras (GRANT, 1994; EGITO et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

A alta sensibilidade dessa espécie se deve, ao maior comprimento total dos cromossomos diplóides e ao maior número de cromossomos metacêntricos. Assim, o teste do *Allium* revelou ser confiável para o monitoramento de substâncias químicas causadoras de citotoxicidade e genotoxicidade (FENANDES, et al., 2009; FATIMA; AHMAD, 2006; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; SIDDIQUI et al., 2011). Além disso, a espécie tem sido indicada por outras vantagens, como baixo custo e fácil manuseio (LEME et al., 2008).

Além destas vantagens, o teste *A. cepa* é especialmente útil para estabelecer os danos induzidos pela EROS (espécies reativas de oxigênio) ao nível cromossômico (FATIMA; AHMAD, 2005), onde as células apresentam sistema de enzimas oxidases capazes de metabolizar hidrocarbonetos policíclicos e, apesar de outros sistemas-teste se mostrarem mais sensíveis a esta detecção, os resultados gerados pelo teste de *A. cepa* devem ser considerados como um alerta para outros organismos (FISKESJO, 1985).

## 2.5 CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE *Zea mays* L.

*Z. mays* (milho) é uma espécie anual, cespitosa, ereta, com baixo afilamento, classificada no grupo das plantas C4, com ampla adaptação a diferentes condições de ambiente. A espécie é um membro da família Poaceae, e constitui a segunda planta cultivada mais importante no mundo, perdendo para as culturas de trigo. A espécie possui elevado potencial produtivo e acentuada habilidade fisiológica na conversão de compostos minerais em orgânicos (SEVERINO et al., 2005; CRUZ et al., 2008). Atualmente, é utilizada amplamente em diversos ensaios fisiológicos, para detecção de poluentes e para detecção das atividades biológicas das SH, apresentando notável

sensibilidade à estes compostos (TAN; NOPAMORN BODI, 1979; SILVA et al., 1999; GRANT; OWENS, 2006; PALANIVELL et al., 2013).

## 2.6 ESTRESSE OXIDATIVO EM PLANTAS

Diferentes situações podem causar estresse nas plantas, sejam elas de origens naturais ou antrópicas e com isso levar a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (CARRILLO; VALLE, 2005). O estresse oxidativo corresponde a um estado em que há uma elevada produção de EROs, onde os mecanismos celulares pró-oxidativos superam os antioxidantes (GRATÃO et al., 2005).

As espécies reativas de oxigênio são também denominadas de radicais livres que, embora não possuam elétrons desemparelhados, são muito reativas em decorrência de sua instabilidade. A geração de EROs, tais como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) tem demonstrado serem agentes causadores de injúrias nos tecidos vegetais, depois da exposição das plantas a diferentes estresses (WANG et al., 2009). As EROs podem interagir com muitos componentes celulares de forma não específica, desencadeando reações peroxidativas e causando danos às membranas e a outras macromoléculas essenciais, tais como os pigmentos fotossintéticos, as proteínas, os ácidos nucleicos e os lipídios (FOYER et al., 1994; MITTLER, 2002).

As plantas, por sua vez, têm um sistema antioxidante complexo para evitar o dano oxidativo das EROs que envolve ambas as defesas antioxidantes não-enzimáticas e enzimáticas (AZEVEDO-NETO et al., 2008). Defesas não enzimáticas incluem antioxidantes tais como ácido ascórbico, a glutathione,  $\alpha$ -tocoferol e carotenóides. Defesas enzimáticas incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX) e outras enzimas ciclo ascorbato-glutathione (GONDIM et al., 2010).

A SOD catalisa a conversão de  $O_2^{\cdot-}$ , gerado por meio de diferentes processos do metabolismo celular, tais como o transporte de elétrons na mitocôndria e cloroplastos, à  $H_2O_2$ . A redução na atividade da SOD ocorre com um aumento simultâneo da acumulação de  $O_2^{\cdot-}$ . O radical  $O_2^{\cdot-}$  é um dos principais oxidantes responsáveis pela peroxidação de lipídios e o consequente aumento na permeabilidade das membranas (APEL; HIRT, 2004).

A catalase (CAT) é responsável pela remoção do  $H_2O_2$ , gerado em diferentes processos nas plantas. Esta enzima é responsável pela remoção de peróxidos tóxicos nas células, quando estes estão em concentrações altas, pois apresenta baixa afinidade pelo  $H_2O_2$ , atuando na decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (MITTLER, 2002).

Outra importante enzima do sistema de defesa antioxidante é a peroxidase do ascorbato (APX). Primariamente localizada em cloroplastos e no citosol, esta enzima reduz o  $H_2O_2$  até água, usando ascorbato como doador de elétrons. Este é reciclado a ascorbato, por meio da utilização da glutathiona reduzida, a GSH, como doadora de elétrons (RIZHSKY et al., 2003).

Alguns compostos também possuem um papel importante na proteção das plantas, como os carotenoides, que atuam protegendo o pigmento clorofila sob condições de estresse e são conhecidos por manter as reações fotodinâmicas, minimizando os efeitos da peroxidação lipídica e impedindo o colapso da membrana dos cloroplastos (SCANDALIOS, 1993).

A enzima Glutathiona S-transferase (GST) tem ação desintoxicante em plantas, devido sua capacidade de metabolizar uma grande variedade de compostos exógenos tóxicos. Esta enzima catalisa o tripeptídeo de glutathiona (GSH) com uma grande variedade de substratos hidrofóbicos, eletrofílicos, e geralmente citotóxicos, produzindo conjugados solúveis em água com menores níveis de toxicidade (KREUZ et al., 1996). Dessa

forma, as taxas de glutathione encontradas nas plantas são usualmente correlacionadas como um efeito da tolerância a xenobióticos (CATANEO et al., 2002).

## 2.7 IMPORTÂNCIA DAS ANÁLISES FISIOLÓGICAS E ANATÔMICAS

A análise de desenvolvimento e crescimento de espécies vegetais consiste em uma forma de conhecer o funcionamento e as estruturas das plantas, bem como a contribuição dos diferentes órgãos no seu crescimento total (CONCEIÇÃO et al., 2005). Assim como outros parâmetros fisiológicos, a análise de crescimento é, também, um instrumento que tem sido usado com o objetivo primordial de obter informações claras do padrão de crescimento da planta ou de partes dela, permitindo comparações entre situações distintas, que podem ser aplicadas às mais diversas modalidades de estudos (NOGUEIRA; CONCEIÇÃO, 2000).

A análise de crescimento constitui o meio mais acessível e bastante preciso para avaliar o crescimento e inferir a comportamento vegetal (BENINCASA, 1988; SHARMA et al., 1993), constitui um método que segue a dinâmica da produção fotossintética, sendo empregado para determinar a produção líquida das plantas, derivadas do processo fotossintético, como resultado do desempenho do sistema assimilatório, durante determinado período de tempo (CARDOSO et al., 1987).

A análise de crescimento não destrutiva visa estudar o desenvolvimento das plantas permitindo a mensuração dos indivíduos durante o ciclo biológico, tendo como valores primários a altura, o diâmetro caulinar e a área foliar da planta. Esse método tem sido bastante utilizado para investigação do efeito de fenômenos ecológicos sobre o crescimento na adaptabilidade de espécies em ecossistemas diversos, efeito de competição de cultivares e influência de práticas agronômicas sobre o crescimento (CARDOSO, 2006).



Além das análises já citadas, os estudos anatômicos assumem grande importância quando associados aos aspectos ecológicos e fisiológicos, pois fornecem detalhes da resposta estrutural da planta a determinado fator, contribuindo com informações adicionais e relevantes, que auxiliam na interpretação de outros dados obtidos e no comportamento da planta (SEGATTO et al., 2004).

### 3 HIPÓTESES

Com essa dissertação foi possível delinear duas hipóteses metodológicas:

H1 – Os ácidos húmicos provocarão alterações citogenéticas nas células das raízes de *Allium cepa* L.;

H2 – As diferentes concentrações de ácidos húmicos afetarão a bioquímica (enzimas do estresse oxidativo), a fisiologia e a anatomia de plântulas de *Zea mays* L.;

H0 – Não serão constatadas mudanças citológicas, fisiológicas e anatômicas após a aplicação de ácido húmico.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos dos AH, provenientes do lodo de lixiviado de aterro sanitário, sobre os aspectos químicos, bioquímicos, fisiológicos e anatômicos em plantas de *Z. mays* e genéticos em células das raízes de *A. cepa*.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Caracterizar quimicamente os AH, provenientes do lodo de lixiviado de aterro sanitário;
- b. Investigar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos dos AH em *A. cepa*;
- c. Avaliar possíveis alterações na taxa de crescimento e no teor de pigmentos fotossintetizantes, causadas por diferentes concentrações de AH em plantas de *Z. mays*;
- d. Avaliar as respostas enzimáticas em *Z. mays* causadas pela aplicação de ácido húmico;
- e. Analisar, quantitativamente, as alterações na anatomia de espécimes de *Z.* submetidas a diferentes concentrações de AH;
- f. Quantificar a absorção e o teor de nutrientes nos órgãos vegetativos de *Z. mays*, submetidas às diferentes concentrações de AH.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Amostras de lodo de lixiviado de aterro sanitário foram coletadas após tratamento biológico realizado no Centro de tratamento de resíduos de Vila Velha, Espírito Santo, Brasil (20°27'28"S e 40°23'21"O) conforme os procedimentos de amostragem e condicionamento especificados na Norma Brasileira para Amostragem de Resíduos Sólidos ABNT NBR: 10007 (ABNT, 2004).

### 5.2 EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS

Após a secagem e peneiramento do lodo proveniente de aterro sanitário, foram realizadas as extrações das substâncias húmicas alcalino solúveis pelo método recomendado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS). Foi utilizada uma solução de NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup>, na razão sólido/ solvente de 1:10 (m:v). A separação dos ácidos húmicos foi realizada pela redução do pH da solução até 1, com HCl 6 mol<sup>-1</sup>. Em seguida, os ácidos húmicos foram lavados com água deionizada, dializados em membranas com poros 14 kDa e, posteriormente, liofilizados. As amostras de ácido húmico provenientes do vermicomposto passaram pela mesmo processo de extração e foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da Universidade Vila Velha, ES, Brasil. Neste trabalho este composto foi utilizado como um comparativo de ação, sendo sua bioatividade atestada em plântulas de milho por Dobbss et al. (2010).

### 5.3 DETERMINAÇÃO DAS DOSAGENS UTILIZADAS

Para a determinação das dosagens, foi realizada a análise da composição elementar dos materiais húmicos, por meio do analisador elementar automático (Leco, CHNS – 932, Alemanha). Foram determinados os percentuais de carbono total, hidrogênio total e nitrogênio total, sendo o conteúdo de oxigênio aferido pela diferença destes resultados com o valor de 100 (AYUSO et al., 1996).

Após a análise do teor de carbono (C), foram determinadas quatro concentrações de AH em mM de C por litro (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0) baseadas em doses relatadas na literatura para ácidos húmicos (CANELLAS et al., 2010; CANELLAS et al., 2012). A concentração de 2,0 mM C L<sup>-1</sup> foi utilizada para o AH proveniente do vermicomposto, conforme Dobbss et al. (2010).

#### 5.4 ÁREA DE ESTUDO

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação e em laboratório no Setor de Botânica (-20° 16' 29.46"S e -40° 18' 17.04"O), Departamento de Ciências Biológicas, localizados no campus de Goiabeiras da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, ES.

#### 5.5 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

##### **5.5.1 Ensaio com *Allium cepa* L.**

Os testes de aberrações cromossômicas e de micronúcleos em células meristemáticas de *A. cepa*, foram realizados com base no protocolo estabelecido por Grant (1982). Para avaliação citogenética foi realizado um tratamento contínuo com sementes de *A. cepa* L., variedade Baia periforme de mesmo lote. As sementes foram germinadas nas diferentes soluções e concentrações de AH até que as raízes atingissem

aproximadamente 1 cm de comprimento. Como controle negativo foi utilizado água deionizada e como controle positivo metil metano sulfonato (MMS), na concentração de  $4 \times 10^{-4}$  M.

As raízes foram coletadas e fixadas em Carnoy, etanol/ácido acético (3:1), por 24 h. Em seguida, foram submetidas à hidrólise ácida em HCl 1N a 60° C por 7 minutos e lavadas em água destilada. A coloração foi realizada de acordo com a metodologia convencional de Feulgen, na qual as raízes foram expostas ao reativo de Schiff por duas horas em local escuro.

Para confecção das lâminas, foram isolados o meristema e a região F<sub>1</sub> das raízes. Os materiais receberam uma gota de carmim acético e foram recobertos com lamínula, passando pelo método de esmagamento suave. Para o preparo das lâminas permanentes, as lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas com Bálsamo do Canadá. Foram analisadas, em microscópio de luz, aproximadamente 1000 células de cada região (meristemática e F<sub>1</sub>) por lâmina, totalizando cinco lâminas para cada tratamento.

### **5.5.2 Ensaio com *Zea mays* L.**

Sementes de *Z. mays* (Híbrido Embrapa - BR 206) foram desinfestadas, por 30 minutos, por meio da imersão em uma solução de NaClO (1,0%). Posteriormente, foram mantidas em água destilada por 3 horas. Em seguida, as sementes foram acondicionadas em papel-filtro para germinação no escuro em temperatura média de 28°C. Quatro dias após a germinação das sementes, plântulas de milho com aproximadamente 0,5 cm, foram transferidas para vasos (cinco vasos por tratamento) contendo solução de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950) modificada para ¼ de força molar, na presença ou ausência (controle) das diferentes concentrações de AH. Para o tratamento controle, as plantas foram submetidas somente à solução nutritiva. O pH das soluções foi ajustado para 5,8 - 6,0 e as condutividades elétricas foram mensuradas.

Para a condução do experimento, foi montado um sistema de hidropônia com aeração constante, utilizando compressores de ar (Gong Yang Bang, HP-400, China). A exposição aos diferentes tratamentos foi realizada por um período de 10 dias, em casa de vegetação localizada no campus de Goiabeiras da Universidade Federal do Espírito Santo/UFES (20° 16' 29.97"S e 40° 18' 21.19"O), com temperatura média de 27 °C e umidade relativa média de 77%. Durante o experimento o pH das soluções foi ajustado diariamente.

## 5.6 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE

Após a análise da região meristemática das raízes de *A. cepa* foram calculados o índice mitótico, o índice de alterações nucleares, o índice de aberrações cromossômicas e o índice de mutagenicidade. Para a região F<sub>1</sub> foi calculado apenas o índice de mutagenicidade. O índice mitótico (IM) foi calculado por meio da relação entre o número de células em divisão e o total de células analisadas:

$$IM = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células em divisão}}{\text{n}^\circ \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

O índice de aberrações (IA) cromossômicas foi obtido por meio da frequência de células em divisão portadoras de alterações cromossômicas: células binucleadas, C-metáfase, micronúcleo, microcito, perda, aderência cromossômica, anáfases multipolares bem como pontes e atrasos na anáfase e na telófase. Sendo o índice de aberrações cromossômicas obtido por meio da seguinte fórmula:

$$IA = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células com aberrações cromossômicas}}{\text{n}^\circ \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

O índice de alterações nucleares (IAN) foi obtido por meio da frequência de células portadoras de alterações nucleares: broto interfásico e broto nuclear sincrônico.

$$\text{IAN} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células com alterações nucleares}}{\text{n}^\circ \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

O índice de mutagenicidade (IMUT) foi obtido por meio da frequência de células portadoras de micronúcleos e quebras cromossômicas, por meio da seguinte fórmula:

$$\text{IMUT} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células com micronúcleo e quebra}}{\text{n}^\circ \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

## 5.7 ANÁLISES QUÍMICAS

Após o término do experimento com plântulas de milho, amostras de solução nutritiva, raízes e parte aérea das plantas foram coletadas para avaliação química. Para a realização das análises, amostras de solução nutritiva foram acidificadas com ácido nítrico à 5% (Merck Química, Argentina) e as amostras de raiz e folha foram digeridas utilizando ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) e clorídrico (HCl) destilados em temperatura de 70° C por 3 horas. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata. Foram realizadas duas diferentes metodologias de análises químicas:

A quantificação elementar, utilizada no Artigo I, foi realizada no Laboratório de Análises Químicas e Elementos Traços da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil. A análise de Mg, Fe, Mn, Zn, Ni, Ba, Cd, Cu, Mo e Pb foi realizada, após digestão, em Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES), (PerkinElmer, EUA), conforme descrito por USEPA (2009). As concentrações dos elementos foram determinadas em triplicata, onde a repetibilidade das medições do ICP-OES foram geralmente de ≥ 93%.



Já a quantificação elementar, utilizada no Artigo II, foi realizada no Centro de análises químicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Campus Leonel Miranda, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil). As quantificações dos teores nutricionais foram realizadas em triplicata conforme Malavolta et al. (1997), para a quantificação de N foi utilizado o método semi-micro-Kjeldahl; para a quantificação de P, o método de colorimetria do metavanadato; para quantificação de S, o método de turbidimetria do sulfato de bário; para a quantificação de K foi utilizado a fotometria de chama de emissão (B462, Micronal, Brasil); para quantificação de B, o método de colorimetria da curcumina e as quantificações de Ca, Mg, Fe, Cu, Zn e Mn foram feitas por espectrofotometria de absorção atômica (Spectraa 55 B, Varian Inc., EUA).

## 5.8 ABSORÇÃO, BIOCONCENTRAÇÃO E TRANSLOCAÇÃO DE NUTRIENTES

Após a obtenção dos resultados das análises químicas foram calculadas as taxas de absorção e o fator de bioconcentração e translocação de cada elemento. Para o cálculo da taxa de absorção foram utilizados os valores quantificados na solução nutritiva inicial e final de cada tratamento. O fator de bioconcentração (FBC) foi calculado para comparar os níveis de nutrientes presentes nas soluções nutritivas que foram acumulados nos tecidos de raiz. O fator de translocação (FT) foi utilizado para avaliar as concentrações de nutrientes na parte aérea e suas correlações com os valores encontrados nas raízes. Os valores de bioconcentração e translocação foram considerados significativos somente com resultados maiores que 1, como descrito por Ali et al. (2013).

## 5.9 ANÁLISES DE CRESCIMENTO

Após os 10 dias de condução experimental, foram coletadas aleatoriamente cinco espécimes de *Z. mays* de cada repetição, totalizando 25 indivíduos por tratamento, a

fim de realizar medidas de altura; da área foliar total, (Area Meter, LI-COR 3100, USA), da massa fresca e seca (estufa 60° C) de todas os órgãos das plantas, de comprimento das raízes e contagem do número de folhas. A partir dessas medidas foram obtidas médias da razão de área foliar por número folhas (AF/NF); razão de raiz/ parte aérea (MSR/MSPA); área foliar específica (AF/MSPA); área radicular específica (AR/MSR); razão de área foliar (AF/MST); comprimento específico da raiz (CR/MSR). Com os dados de massas secas, da parte aérea e das raízes, foi possível calcular também a proporção de alocação de biomassa na parte aérea (MSPA/MST) e na raiz (MSR/MST) (HUNT, 1978; ROCHA et al., 2009).

Onde, AF: área foliar; AR: área radicular; CR: comprimento da raiz; MSR: massa seca radicular; MSPA: massa seca da parte aérea; MFPA: massa fresca da parte aérea; MST: massa seca total.

## 5.10 ANÁLISES ANATÔMICAS

Para cada tratamento foram retiradas amostras das raízes e de folhas de dez indivíduos de *Z. mays*. Para a análise quantitativa, as amostras foram fixadas e armazenadas em álcool etílico 70%. Destes materiais, foram realizados cortes à mão livre das raízes na região de 1 cm a partir do ápice/base caulinar. Das amostras de folhas foram realizadas impressões abaxiais em adesivos próprios, conforme descrito abaixo, do terço mediano da região internervural.

Os cortes foram corados com azul de astra e safranina a 1% (BUKATSCH, 1972). As lâminas foram analisadas fotografadas em fotomicroscópio Nikon E200 (Nikon Instruments Inc., Japão). As fotos foram analisadas por intermédio do programa Nikon NIS-Elements (Nikon Instruments Inc., Japão). A densidade estomática (mm<sup>2</sup>) foi realizada utilizando uma gota de adesivo instantâneo universal éster de cianoacrilato (Super-Bonder, EUA), em uma lâmina histológica. Cinco campos ópticos aleatórios foram analisados por indivíduo, totalizando 50 campos ópticos por tratamento. Já para

determinação das medidas da raiz, foram realizadas dez medições, em  $\mu\text{m}$ , por indivíduo, totalizando cem medições por tratamento.

### 5.11 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PIGMENTOS

Os teores de pigmentos foram determinados usando o método de extração com DMSO (ARGENTA et al., 2001). A folha basal mais desenvolvida foi coletada de cinco plantas de cada tratamento, no início da manhã. Um disco de cerca de  $1,00 \text{ cm}^2$  foi retirado de cada folha, imerso em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e incubado à  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 minutos, no escuro (HISCOX e ISRAELSTAM, 1979). A leitura do extrato foi realizada em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, EUA) nas absorvâncias de 480, 645, 663 nm. Os cálculos os teores de pigmentos foram baseados nas equações de Lichtenthaler e Welbum (1983) pelas seguintes fórmulas:

$$\text{Chl } a = [(12,7.A663) - (2,69.A645)].V/(1000.M)$$

$$\text{Chl } b = [(22,9.A645) - (4,68.A663)].V/(1000.M)$$

$$\text{Chl. total} = [(20,2.A663) - (2,69.A645)].V/(1000.M)$$

$$\text{Carot} = [(1000.A470) - (1,82.\text{Chl } a - 85,02.\text{Chl } b)].V/(198.1000.M)$$

Onde,

Chl e Carot. significam clorofila e carotenóides, respectivamente. A663, A645 e A470 representam os valores das absorvâncias; V é o volume de DMSO (em mL) utilizado para a extração e M é a massa fresca dos discos.

A determinação da concentração relativa de clorofila também foi determinada utilizando um método não destrutivo, por meio do medidor de clorofila SPAD (Soil Plant Analysis Development) (SPAD-502, Minolta, Japão), sendo realizada também na folha basal mais desenvolvida. Foram realizadas duas medições por planta e foram avaliadas trinta plantas por tratamento.

## 5.12 ANÁLISES DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

### 5.12.1 Concentração de proteína

A concentração de proteína das amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976) adaptado para microplaca, onde 10  $\mu\text{L}$  do homogeneizado foi adicionado em 200  $\mu\text{L}$  de Coomassie Blue. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a  $\lambda = 595$  nm, utilizando-se, como padrão, a curva de albumina sérica bovina.

### 5.12.2 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi realizada por espectrofotometria com base no protocolo descrito por McCord & Fridovich (1969), no qual o radical superóxido é gerado por meio do sistema xantina/xantina oxidase e a redução do citocromo c foi monitorada a 550 nm.

Foram pesados 0,3 g de amostra vegetal (folha e raiz) e adicionados 900  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato com PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) a 1 mM. A mistura foi homogeneizada (ULTRA-TURRAX, IKA, China), centrifugada a 10000 g por 10 minutos a 4° C e o sobrenadante aliquoteado para análise. Para leitura da atividade em microplaca foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  do sobrenadante a 288  $\mu\text{L}$  de meio de reação (Xantina 50  $\mu\text{M}$ , KCN 20  $\mu\text{M}$ , Citocromo c 10  $\mu\text{M}$ , EDTA 100  $\mu\text{M}$ ) em cada poço. Para o branco, utilizou-se 2  $\mu\text{L}$  de meio de reação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro durante um minuto em intervalos de 15 segundos (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation, EUA). O volume de xantina oxidase foi determinado a partir da leitura do branco, com uma leitura a cada sete amostras lidas. A atividade enzimática foi expressa por unidade de SOD, sendo que uma unidade de SOD corresponde a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da redução do citocromo c por minuto por mg de proteína a 25 °C e pH 7,8.

### **5.12.3 Atividade da enzima catalase (CAT)**

A atividade da CAT foi determinada pelo método descrito por Beutler (1976), no qual a decomposição enzimática de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é medida pelo decaimento da absorbância a 240 nm.

O extrato foi preparado com 0,2 g de amostra vegetal (folha e raiz) e adicionados 600  $\mu\text{L}$  de tampão de homogeneização (Tris-base 20 mM, EDTA 1mM, Sacarose 0,5 M e Ditioneitol - DTT 1 mM) com PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) a 1 mM. A mistura foi homogeneizada (ULTRA-TURRAX, IKA, China), centrifugada a 9000 g por 30 minutos a 4° C e o sobrenadante aliquoteado para análise. Para leitura da atividade em microplaca foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  do sobrenadante a 250  $\mu\text{L}$  de meio de reação (45  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 47 mL de água destilada e 2,5 mL de tampão de reação - Tris-base 1 M, EDTA 5 mM). Para o branco, utilizou-se 5  $\mu\text{L}$  de tampão de homogeneização. A leitura foi realizada em espectrofotômetro durante dois minutos em intervalos de 15 segundos (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation, EUA). A atividade específica foi expressa em  $\text{nmol mg}^{-1}$  de proteína  $\text{min}^{-1}$ .

### **5.12.4 Atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX)**

A atividade da APX foi determinada pelo método descrito por Nakano e Asada (1981) com adaptações, no qual a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dependente de ascorbato foi determinada por uma diminuição do valor de absorbância a 290 nm, usando o coeficiente de extinção molar  $2,8 \text{ mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ .

O extrato foi preparado com 0,3 g de amostra vegetal (folha e raiz) e adicionados 900  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato (200 mM, pH 7,0) com PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) a 1 mM. A mistura foi homogeneizada (ULTRA-TURRAX, IKA, China), centrifugada a 10000 g por 10 minutos a 4° C e o sobrenadante aliquoteado para análise. Para leitura da atividade em microplaca, foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  do sobrenadante a 125  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato, 12  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico, 96,9  $\mu\text{L}$  de água destilada, 12,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Para o branco, utilizou-se 3,1  $\mu\text{L}$  de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro durante três minutos em intervalos de 15 segundos (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation, EUA). A atividade específica foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de ácido ascórbico  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína.

#### **5.12.5 Atividade da enzima glutathione S-transferase (GST)**

A atividade da GST foi determinada pelo método descrito por Habig e Jakobi (1981) com adaptações de Gallagher et al. (1992), no qual a unidade da atividade da enzima foi definida como a relação da taxa inicial da reação, com o valor do coeficiente de extinção molar para o CDNB de  $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , com valor de absorbância a 340 nm.

O extrato foi preparado com 0,3 g de amostra vegetal (folha e raiz) e adicionados 900  $\mu\text{L}$  de tampão de homogeneização (Tris-HCl 100 mM, EDTA 2 mM e  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$  5 mM) com PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) a 1 mM. A mistura foi homogeneizada (ULTRA-TURRAX, IKA, China), centrifugada a 10000 g por 10 minutos a  $4^\circ \text{C}$  e o sobrenadante aliquoteado para análise. Para leitura da atividade em microplaca foram adicionados 15  $\mu\text{L}$  do sobrenadante a 235  $\mu\text{L}$  de meio de reação (tampão fosfato e CDNB 0,05 M) e 10  $\mu\text{L}$  de GSH a 25 mM. Para o branco, utilizou-se 15  $\mu\text{L}$  de tampão de homogeneização. A leitura foi realizada em espectrofotômetro durante quatro minutos em intervalos de 30 segundos (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation, EUA). A atividade específica foi definida como a unidade da atividade da enzima por mg de proteína.

#### **5.12.6 Quantificação da glutathione reduzida (GSH)**

A quantificação de GSH foi realizada como descrito por White et al. (2003) com modificações por Gallagher et al. (1992). A determinação da concentração de GSH se dá pela separação dos dipeptídeos através de centrifugação e a posterior reação dos complexos dipeptídicos com o 2,3 naftalenedicarboxialdeído (NDA), o qual gera um complexo fluorescente, que é medido a 528 nm após excitação a 472 nm.

O extrato foi preparado com 0,3 g de amostra vegetal (raiz) e adicionados 900  $\mu$ L de tampão de homogeneização (Tris-HCl 100 mM, EDTA 2 mM e  $MgCl_2 \times 6 H_2O$  5 mM) com PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) a 1 mM. A mistura foi homogeneizada (ULTRA-TURRAX, IKA, China), centrifugada a 10000 g por 10 minutos a 4° C e o sobrenadante aliqotado para análise. Para leitura da atividade, inicialmente foram adicionados 20  $\mu$ L do sobrenadante a 20  $\mu$ L de ácido sulfosalicílico (200 mM) em microplaca para centrifugação e incubados por 20 minutos. Após esse período, a placa foi centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos. Em seguida, 20  $\mu$ L do sobrenadante foram transferidos para microplaca branca, adicionados 180  $\mu$ L de solução fluorescente (Tris-base 50 mM, NaOH 500 mM e 2,3-naftalenedicarboxialdeído - NDA 10 mM) e a placa foi incubada por 30 minutos. Para o branco, utilizou-se 20  $\mu$ L de tampão de homogeneização. Utilizou-se, para confecção da curva padrão, diferentes diluições de GSH (40, 20, 10, 5 e 2,5 nM). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation, EUA). A quantidade de GSH foi expressa por  $\mu$ M do composto por mg de proteína.

#### **5.12.7 Atividade da enzima H<sup>+</sup>-ATPase**

A atividade da H<sup>+</sup>-ATPase foi determinada pelo método descrito por Gibbs e Somero (1989) com adaptações de Kultz e Somero (1995) e Gonzales et al. (2005), no qual os ensaio foi baseado na defosforilação do ATP para a oxidação do NADH, onde a fração sensível ao NEM (inibidor da H<sup>+</sup>-ATPase) foi utilizada para avaliar a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase, com valor de absorbância a 340 nm.

O extrato foi preparado com 0,2 g de amostra vegetal (folha e raiz) e adicionados 600  $\mu$ L de tampão de homogeneização (Sacarose 150 mM, Imidazol 50 mM, EDTA 10 mM), com betamercaptanol. A mistura foi homogeneizada (ULTRA-TURRAX, IKA, China), centrifugada duas vezes a 3000 rpm por 7 minutos a 4° C e o sobrenadante aliqotado para análise. Para a leitura da atividade total da ATPase, foram adicionados em microplaca 5  $\mu$ L do sobrenadante a 200  $\mu$ L de meio de reação (Imidazol 30 mM, NaCl

45 mM, KCl 15mM, MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 3mM, KCN 0,4 mM, ATP 1 mM, NADH 0,2 mM, PK 3 u/mL, LDH 3 u/mL, Frutose 1,6-difosfato 0,1 mM, PEP 2 mM). Para leitura da atividade da H<sup>+</sup>-ATPase, foram adicionados, em microplaca, 5 µL do sobrenadante a 200 µL de meio de reação e solução de NEM 2 mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro durante quinze minutos em intervalos de 30 segundos (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation, EUA). A atividade específica foi definida como a unidade da atividade da enzima por mg de proteína.

### 5.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Infostat (DI RIENZO et al., 2010). Em todas as avaliações foi realizada uma análise de variância (ANOVA), para averiguação da normalidade dos dados, seguido por teste de médias Tukey ( $P < 0.05$ ).



## 6 RESULTADOS

### 6.1 ARTIGO I

Após tradução este artigo científico será submetido à revista Chemosphere,  
ISSN 0045-6535.

### **Caracterização química dos ácidos húmicos de aterro sanitário e seus efeitos sobre a citotoxicidade e em enzimas do estresse oxidativo em plantas**

Mariana Morozesk<sup>a</sup>, Marina Marques Bonomo<sup>a</sup>, Iara da Costa Souza<sup>b</sup>, Lívia Dorsch Rocha<sup>a</sup>, Ian Drumond Duarte<sup>a</sup>, Leonardo Barros Dobbss<sup>c</sup>, Eustáquio Vinicius Ribeiro de Castro<sup>d</sup>, Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro Lima<sup>d</sup>, Marisa Narciso Fernandes<sup>b</sup> e Silvia Tamie Matsumoto<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari, 514, 29075-910, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, Av. Washington Luiz, Km 235, 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brasil.

<sup>c</sup> Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, Universidade de Vila Velha, Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, 29102-770, Vila Velha, Espírito Santo, Brasil.

<sup>d</sup> Departamento de Química, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari, 514, 29075-910, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

\* Correspondência do autor: 55 27 33357251, siltamie@gmail.com.

## Resumo

O processo de tratamento biológico dos lixiviados de aterros sanitários resulta em grandes quantidades de lodo, caracterizados por conterem altas taxas de matéria orgânica. Por meio do fracionamento químico da matéria orgânica são obtidos os ácidos húmicos (AH), fração de comprovada eficiência sobre o crescimento vegetal. A bioestimulação vegetal pelos AH ocorre por meio da ativação de diversas enzimas do metabolismo energético, resultando em melhorias no crescimento e desenvolvimento de diversas plantas. Este trabalho teve como objetivo caracterizar o AH extraído de lodo de aterro sanitário e avaliar os efeitos da exposição deste em diferentes doses em plantas, por meio de análises químicas e biológicas, visando elucidar os efeitos desse material orgânico e minimizar os potenciais riscos da utilização do lodo *in natura*. O AH apresentou teores de carbono e nitrogênio, compatíveis com outros materiais húmicos descritos na literatura, podendo constituir uma importante fonte de nutrientes para as plantas. Com relação à análise das enzimas antioxidantes, foi possível observar um efeito variável dependente da dose utilizada de AH. Além disso, foram notados incrementos significativos na atividade da H<sup>+</sup>-ATPase, principalmente na dose de 2.0 mM C L<sup>-1</sup>. Adicionalmente, foram constatadas alterações citogenéticas por meio da análise de células meristemáticas e F<sub>1</sub>. Neste contexto, apesar dos benefícios nutricionais e da comprovada atuação dos AH sobre o metabolismo vegetal, os efeitos biológicos deste composto precisam ser melhor investigados sobre enzimas do estresse oxidativo, bem como sua capacidade citotóxica. Devido à complexidade do resíduo, a utilização de análises químicas, genéticas e enzimáticas foi uma importante ferramenta na avaliação dos efeitos da aplicação dos ácidos húmicos em plantas.

**Palavras-chave:** *Zea mays* L.; *Allium cepa* L.; H<sup>+</sup>-ATPase; mutagenicidade, análise enzimática.

## 1. Introdução

A produção crescente de resíduos sólidos constitui um importante e emergente problema na sociedade atual, sendo os aterros sanitários a forma mais adequada e usual de destinação final destes resíduos (Baderna et al., 2011). Após o condicionamento dos resíduos nos aterros, ocorrem diversos processos biológicos e químicos naturais que geram um líquido proveniente da digestão de matéria orgânica sólida por ação bacteriana, denominado lixiviado de aterro sanitário, ou genericamente, chorume (Celere et al., 2007).

Devido às altas taxas de poluentes orgânicos e inorgânicos presente nos lixiviados torna-se necessário a implantação de métodos adequados de descarte e tratamento desses lixiviados, para evitar que este resíduo represente uma fonte de contaminação de solos e de recursos hídricos (Labanowski et al., 2010). O tratamento biológico é uma prática frequentemente utilizada para lixiviados de aterros sanitários (Atmaca, 2009), onde a remoção de grande parte do material particulado produzido durante o processo forma o lodo de lixiviado (Nagashima et al., 2010). Devido ao alto teor de matéria orgânica presente no lodo, este tem sido foco em diferentes trabalhos, que visam a sua utilização para diversos fins (Adani et al., 2010; Baderna et al., 2011; Xiaoli et al., 2013).

O lodo de aterro sanitário gerado após o processo de tratamento biológico é composto principalmente por substâncias húmicas (SH). Alguns autores relatam a influência das substâncias húmicas no metabolismo vegetal (Loffredo e Senesi, 2009; Canellas et al., 2012; D’Orazio e Senesi, 2009). Dentre as substâncias húmicas, os ácidos húmicos são comumente estudados (Xiaoli et al., 2013; Adani et al., 2010) apresentando diversos efeitos estimulatórios sobre as plantas devido à liberação de moléculas bioativas, que podem acessar receptores dentro ou fora da célula (Canellas et al., 2002).

Apesar das vantagens relacionadas à ação das SH, efeitos controversos já foram observados, como a estimulação de enzimas de estresse e a geração de moléculas reativas de oxigênio (Cordeiro et al., 2011; García et al., 2012), influenciando o crescimento e desenvolvimento das plantas (Foreman et al., 2003).

A integração de análises químicas com bioensaios permite uma interpretação mais acurada dos riscos potenciais e da possível toxicidade de compostos ambientais (Geiszinger et al., 2009). Nesse contexto, a investigação do potencial tóxico de poluentes ambientais pode ser realizada com a utilização de diversos biomarcadores, onde a avaliação de danos citogenéticos representa uma importante ferramenta para análises toxicológicas (Fenech et al., 2003; Caritá e Marin-Morales, 2008). Adicionalmente, a avaliação da atividade de enzimas relacionadas à biotransformação e aos processos antioxidantes tem sido amplamente utilizada em estudos ambientais como um eficiente biomarcador bioquímico (Atli et al., 2006; Sakuragui et al., 2013).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar quimicamente os AH extraídos de lixiviado de aterro sanitário e avaliar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos da exposição de plantas a doses crescentes deste composto e sobre as principais enzimas de estresse do metabolismo vegetal, visando investigar potenciais riscos de sua utilização.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Coleta do lodo de aterro sanitário

Amostras de lodo de lixiviado de aterro sanitário foram coletadas no Centro de tratamento de resíduos de Vila Velha, ES, Brasil (20°27'28"S e 40°23'21"O) após tratamento biológico deste composto, conforme os procedimentos de amostragem e condicionamento especificados na Norma Brasileira para Amostragem de Resíduos Sólidos ABNT NBR: 10007 (ABNT, 2004).

### 2.2 Extração dos ácidos húmicos

Após a secagem e peneiramento do lodo proveniente de aterro sanitário, foram realizadas as extrações das substâncias húmicas alcalino solúveis pelo método recomendado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS). Foi utilizado uma solução de NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup>, na razão sólido: solvente de 1:10 (m:v). A separação dos ácidos húmicos foi obtida com a redução do pH da solução até 1 com HCl 6 mol<sup>-1</sup>, em seguida, os ácidos húmicos foram lavados com água deionizada, dializados em membranas com poros 14 kDa e posteriormente liofilizados. As amostras de ácido húmico provenientes do vermicomposto passaram pelo mesmo processo de extração e foram cedidas pela Universidade Vila Velha, ES, Brasil. Neste trabalho este composto foi utilizado como um comparativo de ação, sendo sua bioatividade atestada por Dobbss et al. (2010) em plântulas de milho.

### 2.3 Caracterização dos ácidos húmicos e determinação das dosagens

Para a determinação das dosagens, foi realizada a análise da composição elementar dos materiais húmicos por meio do analisador elementar automático (Leco, CHNS-932, Alemanha). Foram determinados os percentuais de carbono total, hidrogênio total e nitrogênio total, sendo o conteúdo de oxigênio aferido pela diferença destes resultados com o valor de 100 (Ayuso et al., 1996). Além disso, foram

calculadas as relações entre os elementos para realizar a caracterização dos compostos.

Após a análise, foram determinadas quatro concentrações de ácido húmico derivado de aterro sanitário baseadas nos teores de carbono C (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mM C L<sup>-1</sup>) e uma concentração de ácido húmico proveniente do vermicomposto (2,0 mM C L<sup>-1</sup>), sendo estes valores baseados na literatura (Canellas et al., 2010; Canellas et al., 2012; Dobbss et al. 2010).

#### 2.4 Ensaio em *Zea mays* L.

Sementes de *Z. mays* (Híbrido Embrapa - BR 206) foram desinfestadas, por 30 minutos, por meio de imersão em uma solução de NaClO (1 %). Posteriormente, foram mantidas em água destilada por 3 horas. Em seguida, as sementes foram acondicionadas em papel-filtro para germinação no escuro em temperatura média de 28 °C. Quatro dias após a germinação das sementes, plântulas de milho com aproximadamente 0,5 cm, foram transferidas para vasos (cinco vasos por tratamento) contendo solução de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950) modificada para ¼ de força molar, onde os tratamentos consistiram na adição de diferentes dosagens de ácido húmico. Para o tratamento controle negativo, as plantas foram submetidas somente à solução nutritiva. O pH das soluções foi ajustado para 5,8-6,0 e as condutividades foram mensuradas (Tabela 1).

Para a condução do experimento, foi montado um sistema hidropônico com aeração constante, utilizando compressores de ar (Gong Yang Bang, HP-400, China). A exposição aos diferentes tratamentos foi realizada por um período de 10 dias, em casa de vegetação localizada no campus de Goiabeiras da Universidade Federal do Espírito Santo/UFES (20° 16' 29.97"S e 40° 18' 21.19"O), com temperatura média de 27 °C e umidade relativa média de 77%. O pH das soluções foi ajustado diariamente.

#### 2.5 Análise de metais

Após 10 dias de cultivo das plantas às concentrações de AH, amostras solução nutritiva foram coletadas, antes e após o período de exposição, e acidificadas com ácido nítrico à 5 % (Merck Química, Argentina). A análise de metais (Mg, Fe, Mn, Zn, Ni, Ba, Cd, Cu, Mo, Pb) foi realizada em triplicata em Espectrômetro de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES, PerkinElmer, EUA), conforme descrito por USEPA (2009). As concentrações dos elementos também foram determinadas em triplicata, sendo a repetitividade das medições do ICP-OES de  $\geq$  93%. Após a obtenção dos resultados foram calculadas as taxas de absorção de cada elemento com base na quantificação de nutrientes na solução nutritiva inicial e final de cada tratamento.

## 2.6 Análise enzimática

O extrato enzimático foi preparado a partir de amostras de folha e raiz de *Z. mays* coletadas após 10 dias de exposição. A concentração de proteína total em cada amostra foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976) à 595 nm, utilizando albumina bovina sérica para determinação da curva padrão em microplaca (Dynex Technologies Ltd., EUA). Para avaliação enzimática, foram avaliados seis biomarcadores: superóxido dismutase (SOD), como descrito por McCord e Fridovich (1969); catalase (CAT), conforme descrito por Beutler (1995); glutathione-S-transferase (GST), descrito por Habig e Jakoby (1981); o metabólito glutathione reduzida (GSH), descrito por White et al. (2003). Adicionalmente, foi realizada a análise da peroxidase do ascorbato (APX) conforme Nakano e Asada (1981) e da ATPase total/ H<sup>+</sup>-ATPase segundo metodologia de Gibbs e Somero (1989) com adaptações (Kultz e Somero, 1995; Gonzales et al., 2005). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e adaptados para microplaca.

## 2.7 Ensaio *Allium cepa*

Para a avaliação citogenética, sementes de *A. cepa* foram expostas às concentrações de AH, proveniente de lodos de aterro sanitário, e ácido húmico,

derivado de vermicompostos, diluídos em água deionizada. O ensaio com *A. cepa* foi realizado com base no protocolo estabelecido por Grant (1982), com adaptações, utilizando sementes da variedade Baia Periforme de mesmo lote. Como controle negativo foi utilizado água deionizada e como controle positivo metil metano sulfonato (MMS) na concentração de  $4 \times 10^{-4}$  M.

Após as medições das radículas, foram confeccionadas lâminas das regiões meristemáticas e  $F_1$ . A análise foi realizada em microscópio de luz. Aproximadamente 1000 células de cada região foram contabilizadas por lâmina, totalizando cinco lâminas para cada tratamento para o cálculo dos índices mitótico, índice de aberrações cromossômicas (índice de genotoxicidade), índice de alterações nucleares e índice mutagênico.

## 2.8 Análises estatísticas

Para todos os dados foi aplicada a análise estatística ANOVA, seguido de teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), para comparação das médias utilizando o programa Infostat (Di Rienzo et al., 2010).



### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Análises químicas

Os resultados da análise da composição elementar dos ácidos húmicos avaliados neste trabalho estão apresentados na Tabela 2 e 3. Os teores de carbono e nitrogênio presentes nos AH provenientes de lodo de aterro sanitário foram maiores do que os valores quantificados no vermicomposto, indicando maior grau de evolução destes materiais húmicos (Kononova, 1982; Adani et al., 2006). As relações entre C/N são muitas vezes utilizadas para monitorar as alterações estruturais das frações húmicas das substâncias húmicas de diferentes fontes (Adani et al., 2006), indicando o grau de incorporação do nitrogênio e o grau de humificação na estrutura das SH (Stevenson, 1994; Lu et al., 2000). Neste trabalho, os valores da razão C/N e O/C foram menores no ácido húmico oriundo de lodo de aterro sanitário, devido aos altos teores de nitrogênio observados neste composto (Tabela 2). O teor de nitrogênio elevado encontrado nos materiais húmicos, indica que estes constituem uma fonte importante de compostos nitrogenados (Stevenson, 1994).

Os resultados da quantificação de metais na solução nutritiva inicial e final revelaram que não houve alterações significativas nas concentrações destes de elementos analisados (Mg, Fe, Mn, Zn, Ni, Ba, Cd, Cu, Mo, Pb), em relação ao controle (Tabela 3). Estes dados indicam que o processo de extração dos ácidos húmicos, provavelmente reduz os níveis de metais contaminantes usualmente documentados para o lodo de aterro sanitário (Labanowski et al., 2010; Baderna et al., 2011; Xiaoli et al., 2013).

Diversos estudos relatam que a ação benéfica das SH no desenvolvimento da planta está, frequentemente associada a aumentos significativos nas taxas de absorção de diversos nutrientes pelas raízes (Chen e Aviad, 1990; Chen et al, 2003). Este efeito está relacionado com a origem da SH, o tipo e a concentração na solução nutritiva e da espécie e variedade de planta tratada (Ayuso et al., 1996). Neste trabalho não foram detectadas alterações nas taxas de absorção para os elementos analisados, exceto para o Cd que teve sua absorção reduzida em todos os tratamentos com AH-

LS. Estes resultados podem estar relacionados com a capacidade das SH de se complexar com o alguns metais, alterando as taxas de absorção deste elemento para a planta (García-Mina et al., 2004).

### 3.2 Biomarcadores bioquímicos

Neste trabalho foi observado um aumento da atividade da CAT para as dosagens de 0.5 e 2 mM C L<sup>-1</sup> na parte aérea (Tabela 4). A influência de ácidos húmicos nos mecanismos de defesa antioxidante em plantas já foi relatada (Cordeiro et al., 2011), por meio da estimulação da atividade da catalase e da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). A ativação do sistema antioxidante por AH provavelmente ocorre devido a sua influência sobre o metabolismo secundário das plantas, proporcionando um aperfeiçoamento dos mecanismos de defesa para futuras condições de estresse (García et al., 2014; Schiavon et al., 2010).

Neste trabalho não foram observadas diferenças significativas nas raízes de *Z. mays* para GSH com as diferentes concentrações de AH (Tabela 4). Resultados semelhantes foram observados para a atividade da GST nesse mesmo órgão. Em contrapartida, os valores de GST observados na parte aérea indicaram uma maior atividade enzimática para o tratamento AH-VC (Tabela 4), estando esses resultados relacionados com efeitos deste composto na ativação de enzimas do estresse oxidativo (Cordeiro et al., 2011; García et al., 2012). A enzima Glutathione S-transferase (GST) tem ação desintoxicante em plantas, devido a sua capacidade de metabolizar uma grande variedade de compostos exógenos tóxicos. Esta enzima catalisa o tripeptídeo de glutathione (GSH) com uma grande variedade de substratos hidrofóbicos, eletrofílicos, e geralmente citotóxicos, produzindo conjugados solúveis em água com menores níveis de toxicidade (Kreuz et al., 1996). Assim, as taxas de GST encontradas nas plantas são usualmente correlacionadas a um efeito da tolerância a xenobióticos (Cataneo et al., 2002).

Considerando a alta toxicidade do peróxido para a integridade celular, devido ao seu caráter oxidante, ele necessita de uma rápida neutralização, sendo este papel exercido pela ação da APX (Mishra et al., 2006). Dessa forma, a liberação de peróxido

constitui um sinal sistêmico para a indução da atividade dessa enzima (Morita et al., 1999). A influência da salinidade sobre a atividade da APX já foi relatado por diversos trabalhos (Jebara et al., 2005; Latef e Chaoxing, 2011; López-Gómez et al., 2007), levando a um aumento nos valores da atividade na parte aérea e ausência de efeitos significativos nas raízes (Neto et al., 2006). Bernstein et al. (2010) relatam a alta sensibilidade de plantas de milho à salinidade, sendo que os efeitos mais expressivos são vistos na parte aérea em comparação as raízes. Neste estudo, foi observado um padrão similar, onde, maiores valores de condutividade (Tabela 1) ocorreram com o aumento das dosagens de ácido húmico, o que pode justificar a maior atividade da APX observada na parte aérea (Tabela 4), considerando a correlação entre condutividade e salinidade (Pawlowicz et al., 2010).

A SOD constitui a primeira linha de defesa contra a presença de radicais livres, convertendo-os rapidamente em  $O_2$  e  $H_2O_2$  (Alscher et al., 2002). Os tratamentos com AH apresentaram aumento na atividade da SOD, independente da dose utilizada, em ambos os órgãos vegetais (Tabela 4). Segundo García et al. (2012) a exposição de raízes a AH desencadeia eventos bioquímicos similares às condições de estresse, o que leva a um estímulo da produção de EROs na planta e a ativação de enzimas de estresse oxidativo.

Outras características dos AH são suas influências no crescimento celular e na entrada de nutrientes na planta, por meio da formação de complexos solúveis com diversos íons (Pinton et al., 1999), além de promover um aumento da energia celular pela indução da síntese das  $H^+$ -ATPases (Canellas et al., 2010). As ATPases possuem um importante papel na geração do gradiente de prótons na membrana plasmática, provendo energia para os processos celulares e o desenvolvimento do organismo (Morsomme and Boutry, 2000; Astolfi et al., 2005).

Os efeitos estimulatórios promovidos pelos AH em plantas são constantemente considerados similares ao hormônio vegetal auxina (Canellas et al., 2010; Schiavon et al., 2010; Canellas et al., 2012), o qual leva à ativação da enzima  $H^+$ -ATPase. Em geral, os resultados do presente estudo mostraram um aumento da atividade das ATPases totais e  $H^+$ -ATPases para o tratamento com AH proveniente do vermicomposto e também para as maiores concentrações de AH oriundo de lodo de

aterro sanitário. Os valores encontrados para as raízes foram mais expressivos que os observados na parte aérea. Dessa forma, esses resultados confirmam a bioatividade dos ácidos húmicos derivados de aterros sanitários sobre plântulas de milho, demonstrando que estes possuem efeitos similares a compostos orgânicos naturais, tal como o vermicomposto.

### 3.3 Análise *Allium cepa*

Os resultados da exposição de *A. cepa* a diferentes tratamentos com AH estão apresentados na Tabela 5. A avaliação da frequência de germinação e do comprimento da raiz não mostrou diferença entre os tratamentos, sendo o mesmo resultado observado para o índice mitótico. A taxa de crescimento radicular está correlacionada ao índice mitótico, o qual reflete diretamente os níveis de proliferação celular (Seth et al., 2008).

Apesar de relatos indicando a influência dos ácidos húmicos no crescimento radicular de diferentes espécies vegetais (Canellas et al., 2012; Dobbss et al., 2010), no presente trabalho não foram encontradas diferenças para este parâmetro em *A. cepa* (Tabela 5). Feretti et al. (2012), comparando AH oriundos de diferentes substâncias, não observaram influência dos AH no desenvolvimento da radícula, corroborando os nossos resultados apresentados na Tabela 5.

As células meristemáticas de plantas expostas às diferentes concentrações de AH não apresentaram mudanças nos seus índices de alterações genotóxicas e mutagênicas. Em contrapartida, valores expressivos de alterações nucleares foram observadas para todos os tratamentos com AH (Tabela 5; Figura 1). Essas alterações foram descritas por Fenech (2000) como indicativo de instabilidades genômicas, sendo passíveis de reparo. O mesmo autor descreve brotos como um mecanismo celular de eliminação de ampliações de DNA, podendo levar à formação de micronúcleos e ao aumento do índice de mutagenicidade, fato confirmado por Fernandes et al. (2009), cujos estudos foram desenvolvidos com o organismo teste *A. cepa*.

Alguns autores relatam a influência das substâncias húmicas na permeabilidade da membrana celular (Samson e Visser, 1989; Pinton et al., 1992;

Ayuso et al., 1996). Serrano e Monteiro-Montoya (2001) associa a presença de brotos a modificações na estrutura da membrana nuclear, indicando que esta alteração não leva a modificações genéticas das células, constituindo apenas de uma modificação morfológica.

Para as células da região  $F_1$ , foi observado um aumento do índice de mutagenicidade em todas as concentrações de AH testadas. Por derivarem de células meristemáticas, as alterações em  $F_1$  são indícios de danos não reparados após o término da divisão mitótica (Ma e Xu, 1986; Mazzeo et al., 2011). Neste estudo, os efeitos genotóxicos observados nas células meristemáticas (alterações nucleares) podem justificar as altas taxas de micronúcleos observadas nas células  $F_1$ .

#### **4. Conclusão**

Diferentes abordagens foram utilizadas para caracterizar e verificar os efeitos da exposição de plantas a diferentes concentrações de AH provenientes de lodo de aterro sanitário. Por meio de caracterizações físicas e químicas, o ácido húmico apresentou elevados teores de carbono e nitrogênio, podendo constituir uma importante fonte de nutrientes para as plantas. Além disso, a ausência de metais contaminantes nas soluções nutritivas sugere a possibilidade de utilização agrícola do AH oriundo de aterro sanitário. Foi verificado o aumento da atividade de diversas enzimas antioxidantes após a aplicação dos ácidos húmicos e valores expressivos de atividade das ATPases. A bioestimulação destes compostos também foi atestada por análises citogenéticas de alta sensibilidade, onde foi verificada a presença de alterações nucleares nas células meristemáticas e de micronúcleos nas células diferenciadas (F<sub>1</sub>). Assim, mesmo com todos os benefícios nutricionais e a comprovada atuação destes compostos no sistema antioxidante das plantas, os efeitos biológicos dos ácidos húmicos precisam ser melhor investigados, tendo em vista os níveis de mutagenicidade verificados neste estudo. Devido à complexidade do resíduo, a utilização de análises químicas, genéticas e enzimáticas foi uma importante ferramenta na avaliação dos efeitos da aplicação dos ácidos húmicos em *Z. mays*.

#### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de mestrado concedidas.

## Referências bibliográficas

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), 2004. NBR - 10007 - Amostragem de resíduos sólidos. ABNT, Rio de Janeiro, 2004.
- Adani, F., Genevini, P., Tambone, F., Montoneri, E., 2006. Compost effect on soil humic acid: A NMR study. *Chemosphere* 65, 1414–1418.
- Adani, F., Tambone, F., Davoli, E., Scaglia, B., 2010. Surfactant properties and tetrachloroethene (PCE) solubilisation ability of humic acid-like substances extracted from maize plant and from organic wastes: A comparative study. *Chemosphere* 78, 1017–1022.
- Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S., 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53, 1331–1341.
- Astolfi, S., Zuchi, S., Passera, C., 2005. Effect of cadmium on H<sup>+</sup> ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from roots of different S-supplied maize (*Zea mays* L.) plants. *Plant Sci.* 169, 361–368.
- Atli, G.L.Z., Alptekin, O., Tükel, S., Canli, M., 2006. Response of catalase activity to Agp, Cd2p, Cr6p, Cu2p and Zn2p in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & Pharmacology* 143, 218–224.
- Atmaca, E., 2009. Treatment of landfill leachate by using electro-Fenton method. *J. Hazard. Mater.* 163, 109–114.
- Ayuso, M., Hernandez, T., Garcia, C., Pascual, J.A., 1996. Stimulation of barley growth and nutrient absorption by humic substances originating from various organic materials. *Bioresour, Technol.* 57, 251-257.
- Baderna, D., Maggioni, S., Boriani, E., Gemma, S., Molteni, M., Lombardo, A., Colombo, A., Bordonali, S., Rotella, G.; Lodi, M., Benfenati, E., 2011. A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: Chemical analyses, risk assessment and *in vitro* assays. *Environ. Res.* 111, 603–613.
- Beutler, E., 1975. The preparation of red cells for assay. In: Beutler, E. (Ed.), *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. Grune & Straton, New York, pp. 8–18.

- Bernstein, N., Shoresh, M., Xu, Y., Huang, B., 2010. Involvement of the plant antioxidative response in the differential growth sensitivity to salinity of leaves vs roots during cell development. *Free Radical Bio. Med.* 49, 1161–1171.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Façanha, A.L., Façanha, A.R., 2002. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol.* 130, 1951–1957.
- Canellas, L.P., Piccolo, A., Dobbss, L.B., Spaccini, R., Olivares, F.L., Zandonadi, D.B., Façanha, A.R., 2010. Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. *Chemosphere* 78, 457–466.
- Canellas, L.P., Dobbss, L.B., Chagas, J.G., Aguiar, N.O., Rumjanekc, V.M., Novotny, E. H., Olivares, F.L., Spaccini, R., 2012. Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. *Eur. J. Soil Sci.* 63, 315–324.
- Caritá, R., Marin-Morales, M.A., 2008. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. *Chemosphere* 72, 722–725.
- Celere, M.S., Oliveira, A.S., Trevilato, T.M.B., Segura-Munoz, S.I., 2007. Metais presentes no chorume coletado no aterro sanitário de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, e sua relevância para saúde pública. *Cad. Saúde Pública*, 23, 939–947.
- Chen, Y., Aviad, T., 1990. Effects of humic substances on plant growth. In: *Humic Substances in Soil and Crop Sciences: Selected Readings*, eds. MacCarthy, P., Clapp, C.E., Malcolm, R.L., Bloom, P.R. Soil. Sci. Soc. Am., Madison, Wisconsin, USA, pp. 161-186.
- Chen, J., Gu, B., Royer, R.A., Burgos, W.D., 2003. The roles of natural organic matter in chemical and microbial reduction of ferric ion. *Sci. Total Environ.* 307, 167–178.
- Cordeiro, F.C., Santa-Catarina, C., Silveira, V., Souza, S.R. 2011. Humic acid effect on catalase activity and the generation of reactive oxygen species in corn (*Zea mays* L.). *Biosci. Biotech. Bioch.* 75, 70–74.



- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C. W. InfoStat versión 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2010.
- Dobbss, L.B., Canellas, L.P., Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Peres, L.E.P., Azevedo, M., Spaccini, R., Piccolo, A., Façanha, A.R., 2010. Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth. *J. Agr. Food Chem.* 58, 3681–3688.
- D’Orazio, V., Senesi, N., 2009. Spectroscopic properties of humic acids isolated from the rhizosphere and bulk soil compartments and fractionated by size-exclusion chromatography. *Soil Biol. Biochem.* 41, 1775–1781.
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* 455, 81–95.
- Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E., 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 534, 65–75.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H.F., Mylona, P., Miedema, H., Torresk, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jonathan, D., Jonesk, G., Davies, J.M., Dolan, L., 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422, 442–445.
- Feretti, D., Ceretti, E., Gustavino, B., Zerbini, I., Zani, C., Monarca, S., Rizzoni, M., 2012. Ground and surface water for drinking: a laboratory study on genotoxicity. *J. Public Health Res.* 7, 31–37.
- Fernandes, T.C.C., Mazzeo, D.E.C., Marin-Morales, M.A. 2009. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent — Trifluralin herbicide. *Ecotox. Environ. Safe.* 72, 1680–1686.
- García, A.C., Santos, L.A., Izquierdo, F.G., Sperandio, M.V.L., Castro, R.N., Berbara, R.L.L., 2012. Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress. *Ecol. Eng.* 47, 203–208.
- 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., 2014. Potentialities of vermicompost humic acids

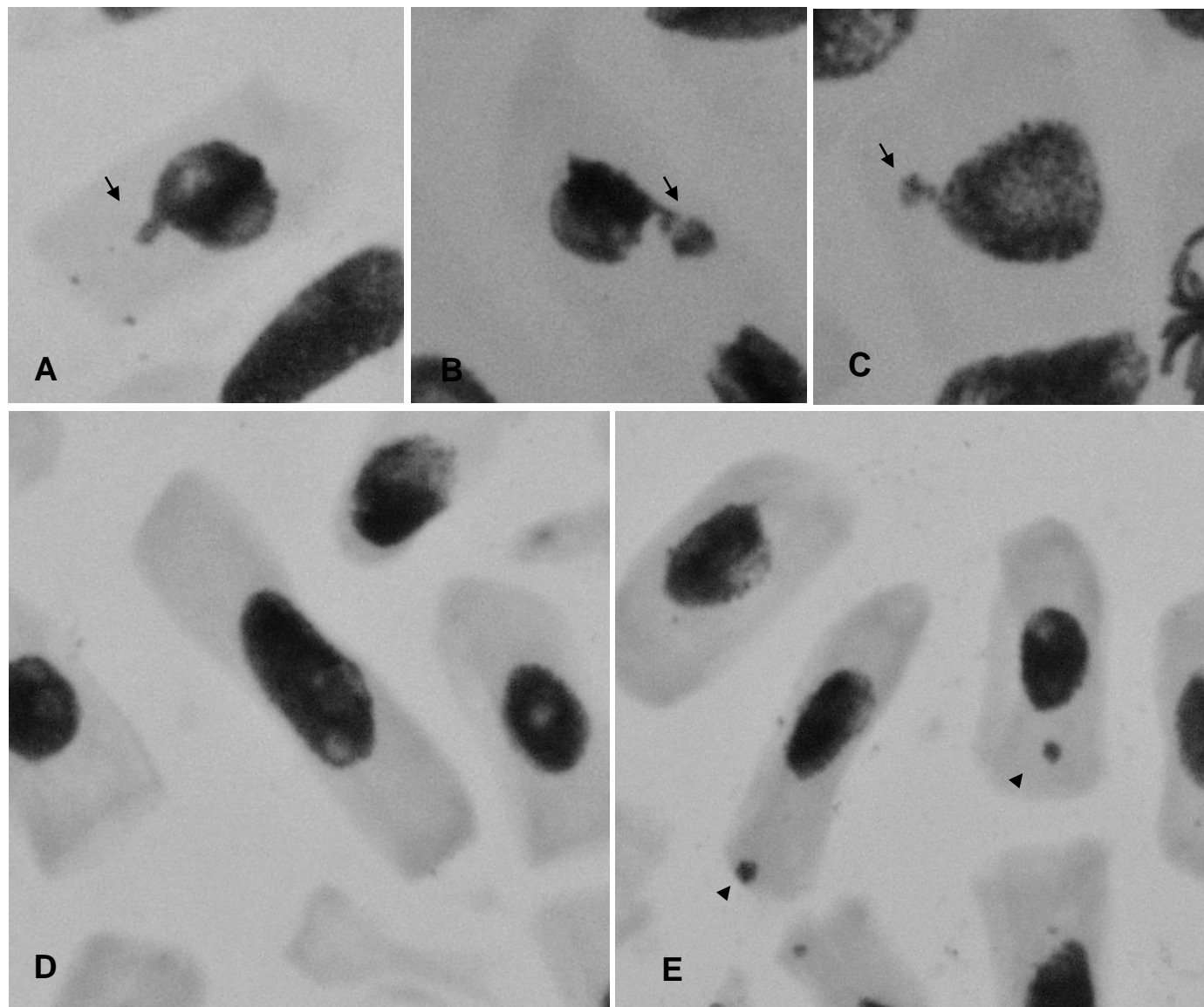
- to alleviate water stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). J. Geochem. Explor. 136, 48–54.
- Garcia-Mina, J.M., Antolin, M.C., Sanchez-Diaz, M., 2004. Metal-humic complexes and plant micronutrient uptake: a study based on different plant species cultivated in diverse soil types. Plant Soil 258, 57–68.
- Geiszinger, A., Bonnineau, C., Faggiano, L., Guasch, H., López-Doval, J.C., Proia, L., Ricart, M., Romaní, A., Rotter, S., Muñoz, I., Schmitt-Jansen, M., Sabater, S., 2009. The relevance of the community approach linking chemical and biological analyses in pollution assessment. TrAC-Trend. Anal. Chem. 28, 619–626.
- Gibbs, A., Somero, G.N., 1989. Pressure adaptation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in gills of marine teleosts. J. Experim. Biol. 143, 475–492.
- Gonzalez, R.J., Cooper, J., Head, D., 2005. Physiological responses to hyper-saline waters in sailfin mollies (*Poecilia latipinna*). Comp. Biochem. Physiol. A 142, 397–403.
- Grant, W.F., 1982. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the US Environmental Agency Gene - Toxicology Program. Mut. Res. 99, 273–291.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. Met. Enzym. 77, 398–405.
- Hoagland, D. R., Arnon, D. I., 1950. The Water Culture Method for Growing Plants Without Soil, California Agricultural Experiment Station, Berkeley, CA, USA, p.347.
- Jebara, S., Jebara, M., Limam, F., Aouani, M.E., 2005. Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. J. Plant Physiol. 162, 929–936.
- Kononova, M.M., 1982. Matéria orgânica del suelo: su naturaleza, propiedades y métodos de investigación. Barcelona: Oikos-Tou, 365p.
- Kreuz, K., Tommasini, R., Martinoia, E., 1996. Old enzymes for a new job: Herbicide detoxification in plants. Plant Physiol. 111, 349–353.
- Kültz, D., Somero, G.N., 1995. Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. J. Exp. Biol. 198, 1883–1894.

- Labanowski, J., Pallier, V., Feuillade-Cathalifaud, G. 2010. Study of organic matter during coagulation and electrocoagulation processes: Application to a stabilized landfill leachate. *J. Hazard. Mater.* 179, 166–172, 2010.
- Latef, A.A.H.A., Chaoxing, H., 2011. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Sci. Hortic-Amsterdam* 127, 228–233.
- Loffredo, E., Senesi, N., 2009. In vitro and in vivo assessment of the potential of compost and its humic acid fraction to protect ornamental plants from soil-borne pathogenic fungi. *Sci. Hortic-Amsterdam* 122, 432–439.
- López-Gómez, E. San Juan, M.A., Diaz-Vivancos, P., Mataix Beneyto, J., García-Legaz, M.F., Hernández, J.A., 2007. Effect of rootstocks grafting and boron on the antioxidant systems and salinity tolerance of loquat plants (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Environmen. Expe. Bot.* 60, 151–158.
- Lu, X.Q., Hanna, J.V., Johnson, W.D., 2000. Source indicators of humic substances: an elemental composition, solid state <sup>13</sup>C CP/MAS NMR and Py-GC/MS study. *Appl. Geochem.* 15, 1019–1033.
- Ma, T.H., Xu, Z., 1986. Validation of a new protocol of the *Allium* micronucleus test for clastogens. *Environ. Mutagen.* 8, 65–66.
- Mazzeo, D.E.C., Fernandes, T.C.C., Marin-Morales, M.A., 2011. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. *Chemosphere* 85,13–18.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Kumar, R., Seth, C.S., Gupta, D.K., 2006. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatin and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere* 65, 1027–1039.
- Morita, S., Kaminaka, H., Masumura, T., Tanaka, K., 1999. Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress signaling. *Plant Cell Physiol.* 40, 417–422.

- Morsomme, P., Boutry, M., 2000. The plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: structure, function and regulation. *BBA – Biomembranes* 1465, 1-16.
- Nagashima, L.A., Júnior, C.B., Fujimura, A.S., Recanello, T.D., 2010. Caracterização do lodo gerado no tratamento de lixiviado de aterro sanitário com coagulante à base de tanino. *Semina: Tech. Ex.* 29, 37-50.
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867-880.
- Neto, A.D.A.; Prisco, J.T.; Enea-Filho, J., Abreu, C.E.B., Gomes-Filho, E., 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environ. Exp. Bot.* 56, 87–94.
- Pawlowicz, R.; Wright, D.G.; Millero, F.J. The effects of biogeochemical processes on oceanic conductivity/salinity/density relationships and the characterization of real seawater. *Ocean Science Discussions* 7: 773-836, 2010.
- Pinton, R., Cesco, S., Iacoletti, G., Astolfi, S., Varanini, Z., 1999. Modulation of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Soil* 215, 155-161.
- Sakuragui, M.M., Paulino, M.G., Pereira, C.D.S., Carvalho, C.S., Sadauskas-Henrique, H., Fernandes, M.M., 2013. Integrated use of antioxidant enzymes and oxidative damage in two fish species to assess pollution in man-made hydroelectric reservoirs. *Environ. Pollut.* 178, 41-51.
- Schiavon, M., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vaccaro, S., Francioso, O., Nardi, S., 2010. High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). *J. Chem. Ecol.* 36, 662-669.
- Serrano, L., Monteiro-Montoya, R., 2001. Micronuclei and heterochromatid buds are the results of related genotoxic events. *Environ. Mol. Mutagen.* 38, 38-45.
- Seth, C.S., Misra, V., Chauhan, L.K.S., Singh, R.R., 2008. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 711-716.
- Stevenson, J.F., 1994. Humus chemistry: genesis, composition, reactions. New York, John Wiley & Sons INC., 496 p.

- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2009. Risk-Based Concentration Table. Philadelphia PA, United States Environmental Protection Agency: Washington, DC.
- Visser, S.A., 1982. Surface active phenomena by humic substances of aquatic origin. *Rev. Fr. Sci. Eau* 1, 285-295.
- Xiaoli, C., Yongxia, H., Guixiang, L., Xin, Z., Youcai, Z., 2013. Spectroscopic studies of the effect of aerobic conditions on the chemical characteristics of humic acid in landfill leachate and its implication for the environment. *Chemosphere* 91, 1058-1063.
- White, C.C., Viernes, H., Krejsa, C.M., Botta, D., Kavabagg, D.T.J., 2003. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate–cysteine ligase activity. *Anal. Biochem.* 318, 175-180.

## Figuras e Tabelas



**Figura 1.** Principais alterações observadas pelo teste *A. cepa*. **A, B e C:** brotos nucleares nas células meristemáticas; **D:** célula F<sub>1</sub> sem alteração e **E:** células F<sub>1</sub> com micronúcleo. Seta: brotos nucleares; ponta de seta: micronúcleo.

**Tabela 1.** Condutividade elétrica das soluções nutritivas utilizadas neste estudo.

<b>Tratamentos</b>	<b>Condutividade (<math>\mu\text{S}</math>)</b>
Controle negativo	505 $\pm$ 22 <sup>a</sup>
AH-VC (2 mM C L <sup>-1</sup> )	512 $\pm$ 80 <sup>a</sup>
AH-LS (0,5 mM C L <sup>-1</sup> )	523 $\pm$ 31 <sup>a</sup>
AH-LS (1 mM C L <sup>-1</sup> )	527 $\pm$ 31 <sup>a</sup>
AH-LS (2 mM C L <sup>-1</sup> )	545 $\pm$ 51 <sup>a</sup>
AH-LS (4 mM C L <sup>-1</sup> )	550 $\pm$ 57 <sup>a</sup>

AH: ácido húmico; VC: vermicomposto; LS: lodo de aterro sanitário. Valores expressos por média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente (Teste de Tukey;  $P < 0,05$ ).

**Tabela 2.** Composição elementar dos ácidos húmicos utilizados neste estudo.

	AH - VC	AH - LS
	g Kg <sup>-1</sup>	
<b>Elementos</b>		
Carbono (C)	309,23 ± 1,20 <sup>a</sup>	398,47 ± 9,31 <sup>b</sup>
Hidrogênio (H)	37,30 ± 2,45 <sup>a</sup>	70,60 ± 3,59 <sup>b</sup>
Nitrogênio (N)	27,96 ± 0,16 <sup>a</sup>	59,78 ± 1,79 <sup>b</sup>
Oxigênio (O)	625,50 ± 1,48 <sup>a</sup>	471,15 ± 14,29 <sup>b</sup>
<b>Relações</b>		
C/N	83,16 ± 5,97 <sup>a</sup>	56,50 ± 1,92 <sup>b</sup>
H/C	1,21 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,77 ± 0,06 <sup>b</sup>
O/C	20,23 ± 0,07 <sup>a</sup>	11,83 ± 0,62 <sup>b</sup>

AH: ácido húmico; VC: vermicomposto; LS: lodo de aterro sanitário. Valores expressos por média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente (Teste de Tukey;  $P < 0,05$ ).



**Tabela 3.** Metais presentes nas soluções nutritivas dos tratamentos com diferentes concentrações de ácidos húmicos (AH) provenientes de vermicomposto (VC) e de lodo de aterro sanitário (LS).

	Metais									
	Mg mg/L	Fe	Mn	Zn	Ni	Ba	Cd	Cu	Mo	Pb
<b>Solução nutritiva (Inicial)</b>										
Controle negativo	12,44 ± 0,07 <sup>a,b</sup>	0,49 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,080 ± 0,002 <sup>b</sup>	0,079 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,069 ± 0,010 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,124 ± 0,001 <sup>a</sup>
AH-VC (2 mM C L <sup>-1</sup> )	11,66 ± 0,36 <sup>a</sup>	0,49 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,080 ± 0,002 <sup>b</sup>	0,079 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,069 ± 0,010 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,124 ± 0,001 <sup>a</sup>
AH-LS (0,5 mM C L <sup>-1</sup> )	12,02 ± 0,25 <sup>a,b</sup>	0,49 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,070 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,077 ± 0,007 <sup>a</sup>	0,059 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,123 ± 0,002 <sup>a</sup>
AH-LS (1 mM C L <sup>-1</sup> )	12,59 ± 0,33 <sup>a,b</sup>	0,48 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,071 ± 0,004 <sup>a,b</sup>	0,078 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,059 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,121 ± 0,002 <sup>a</sup>
AH-LS (2 mM C L <sup>-1</sup> )	12,91 ± 0,24 <sup>b</sup>	0,54 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,073 ± 0,005 <sup>a,b</sup>	0,078 ± 0,006 <sup>a</sup>	0,061 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,027 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,123 ± 0,002 <sup>a</sup>
AH-LS (4 mM C L <sup>-1</sup> )	12,23 ± 0,58 <sup>a,b</sup>	0,57 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,074 ± 0,005 <sup>a,b</sup>	0,079 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,061 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,027 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,121 ± 0,002 <sup>a</sup>
<b>Solução nutritiva (Final)</b>										
Controle negativo	1,79 ± 1,39 <sup>b</sup>	0,40 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,065 ± 0,011 <sup>a</sup>	0,050 ± 0,014 <sup>a</sup>	0,078 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,058 ± 0,017 <sup>a</sup>	0,025 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,107 ± 0,009 <sup>a</sup>
AH-VC (2 mM C L <sup>-1</sup> )	0,75 ± 0,09 <sup>a,b</sup>	0,40 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,066 ± 0,011 <sup>a</sup>	0,051 ± 0,014 <sup>a</sup>	0,078 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,058 ± 0,017 <sup>a</sup>	0,025 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,107 ± 0,009 <sup>a</sup>
AH-LS (0,5 mM C L <sup>-1</sup> )	0,41 ± 0,35 <sup>a,b</sup>	0,29 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,068 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,045 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,075 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,047 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,116 ± 0,005 <sup>a</sup>
AH-LS (1 mM C L <sup>-1</sup> )	0,62 ± 0,39 <sup>a,b</sup>	0,31 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,069 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,046 ± 0,007 <sup>a</sup>	0,081 ± 0,006 <sup>a</sup>	0,044 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,027 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,108 ± 0,010 <sup>a</sup>
AH-LS (2 mM C L <sup>-1</sup> )	1,64 ± 0,26 <sup>a,b</sup>	0,34 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,068 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,055 ± 0,006 <sup>a</sup>	0,073 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,045 ± 0,006 <sup>a</sup>	0,028 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,111 ± 0,007 <sup>a</sup>
AH-LS (4 mM C L <sup>-1</sup> )	0,10 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,068 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,056 ± 0,006 <sup>a</sup>	0,081 ± 0,006 <sup>a</sup>	0,044 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,028 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,029 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,108 ± 0,010 <sup>a</sup>
<b>Taxa de absorção</b>										
Controle negativo	0,99 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>a</sup>	-	-	0,17 ± 0,03 <sup>a</sup>
AH-VC (2 mM C L <sup>-1</sup> )	0,99 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>a</sup>	-	-	0,17 ± 0,03 <sup>a</sup>
AH-LS (0,5 mM C L <sup>-1</sup> )	0,99 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,01 <sup>c</sup>	-	-	0,05 ± 0,02 <sup>a</sup>
AH-LS (1 mM C L <sup>-1</sup> )	0,99 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,06 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>b</sup>	-	-	0,10 ± 0,08 <sup>a</sup>
AH-LS (2 mM C L <sup>-1</sup> )	0,99 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,01 <sup>c</sup>	-	-	0,09 ± 0,05 <sup>a</sup>
AH-LS (4 mM C L <sup>-1</sup> )	0,99 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,47 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,01 <sup>c</sup>	-	-	0,10 ± 0,08 <sup>a</sup>

Valores expressos por média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente (Teste de Tukey;  $P < 0,05$ ). LDI (Limite de detecção): Mg (0,0006 mg L<sup>-1</sup>); Fe (0,0089 mg L<sup>-1</sup>); Mn (0,0001 mg L<sup>-1</sup>); Zn (0,0005 mg L<sup>-1</sup>); Ni (0,0012 mg L<sup>-1</sup>); Ba, Cd e Cu (0,0002 mg L<sup>-1</sup>); Cr (0,0003 mg L<sup>-1</sup>); Mo (0,0007 mg L<sup>-1</sup>); Pb (0,0032 mg L<sup>-1</sup>).

**Tabela 4.** Análises bioquímicas realizadas em *Z. mays* para os tratamentos com diferentes concentrações de ácidos húmicos (AH) provenientes de vermicomposto (VC) e de lodo de aterro sanitário (LS). Valores expressos por média  $\pm$  desvio padrão.

	Tratamentos					
	Controle negativo	AH – VC (2 mM C L <sup>-1</sup> )	AH – LS (0,5 mM C L <sup>-1</sup> )	AH – LS (1 mM C L <sup>-1</sup> )	AH – LS (2 mM C L <sup>-1</sup> )	AH – LS (4 mM C L <sup>-1</sup> )
<b>CAT</b> ( $\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ mg Pt}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )						
Raiz	2,25 $\pm$ 0,49 <sup>a</sup>	2,25 $\pm$ 0,99 <sup>a</sup>	2,07 $\pm$ 0,74 <sup>a</sup>	2,00 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>	1,37 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	2,16 $\pm$ 0,69 <sup>a</sup>
Folha	2,12 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup>	1,92 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	3,61 $\pm$ 0,84 <sup>b</sup>	2,40 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>	3,86 $\pm$ 0,66 <sup>b</sup>	1,94 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup>
<b>GST</b> ( $\mu\text{M mg Pt}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )						
Raiz	26,54 $\pm$ 5,69 <sup>b</sup>	23,27 $\pm$ 3,06 <sup>b</sup>	20,59 $\pm$ 4,14 <sup>a,b</sup>	18,94 $\pm$ 7,24 <sup>a,b</sup>	18,66 $\pm$ 6,32 <sup>a,b</sup>	11,94 $\pm$ 3,53 <sup>a</sup>
Folha	5,39 $\pm$ 1,11 <sup>a,b</sup>	16,36 $\pm$ 6,43 <sup>c</sup>	8,90 $\pm$ 1,83 <sup>b</sup>	1,18 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>	4,47 $\pm$ 1,76 <sup>a,b</sup>	2,41 $\pm$ 0,62 <sup>a</sup>
<b>APX</b> ( $\mu\text{M Ac. A. mg Pt}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )						
Raiz	6,43 $\pm$ 2,04 <sup>a</sup>	10,17 $\pm$ 2,94 <sup>a</sup>	17,74 $\pm$ 4,97 <sup>b</sup>	8,98 $\pm$ 1,88 <sup>a</sup>	9,21 $\pm$ 3,74 <sup>a</sup>	6,19 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>
Folha	6,34 $\pm$ 1,48 <sup>a</sup>	5,28 $\pm$ 0,94 <sup>a</sup>	4,24 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>	7,16 $\pm$ 1,57 <sup>a,b</sup>	10,29 $\pm$ 1,33 <sup>b,c</sup>	11,58 $\pm$ 2,94 <sup>c</sup>
<b>SOD</b> (U mg Pt <sup>-1</sup> )						
Raiz	0,40 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	1,38 $\pm$ 0,71 <sup>a,b</sup>	3,36 $\pm$ 1,06 <sup>a,b</sup>	4,16 $\pm$ 1,30 <sup>b</sup>	9,91 $\pm$ 3,23 <sup>c</sup>	1,64 $\pm$ 1,37 <sup>a,b</sup>
Folha	0,92 $\pm$ 0,76 <sup>a</sup>	4,48 $\pm$ 2,41 <sup>b</sup>	3,38 $\pm$ 0,97 <sup>a,b</sup>	2,25 $\pm$ 1,41 <sup>a,b</sup>	3,62 $\pm$ 1,27 <sup>a,b</sup>	4,24 $\pm$ 1,67 <sup>b</sup>
<b>ATPase total</b> ( $\mu\text{M Pi mg Pt}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )						
Raiz	12,36 $\pm$ 1,36 <sup>a</sup>	25,70 $\pm$ 5,65 <sup>b</sup>	12,26 $\pm$ 1,44 <sup>a</sup>	18,72 $\pm$ 5,93 <sup>a,b</sup>	24,34 $\pm$ 7,72 <sup>b</sup>	18,84 $\pm$ 2,87 <sup>a,b</sup>
Folha	1,04 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	4,19 $\pm$ 1,28 <sup>c</sup>	1,65 $\pm$ 0,28 <sup>a,b</sup>	1,46 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	1,93 $\pm$ 0,35 <sup>a,b</sup>	2,68 $\pm$ 0,51 <sup>b</sup>
<b>H<sup>+</sup> - ATPase</b> ( $\mu\text{M Pi mg Pt}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )						
Raiz	9,75 $\pm$ 0,55 <sup>a,b</sup>	18,78 $\pm$ 2,80 <sup>c</sup>	9,19 $\pm$ 1,12 <sup>a</sup>	15,30 $\pm$ 5,56 <sup>a,b,c</sup>	21,55 $\pm$ 6,34 <sup>c</sup>	17,17 $\pm$ 2,42 <sup>b,c</sup>
Folha	0,84 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	3,32 $\pm$ 1,28 <sup>c</sup>	1,24 $\pm$ 0,19 <sup>a,b</sup>	1,13 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	1,55 $\pm$ 0,20 <sup>a,b</sup>	2,33 $\pm$ 0,37 <sup>b,c</sup>
<b>GSH</b> ( $\mu\text{M mg Pt}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )						
Raiz	241,11 $\pm$ 79,47 <sup>a</sup>	304,47 $\pm$ 130,09 <sup>a</sup>	170,41 $\pm$ 56,74 <sup>a</sup>	211,92 $\pm$ 65,80 <sup>a</sup>	187,96 $\pm$ 65,98 <sup>a</sup>	154,14 $\pm$ 48,37 <sup>a</sup>

Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente (Teste de Tukey;  $P < 0,05$ ).

**Tabela 5.** Análises realizadas pelo teste de *Allium cepa* para os tratamentos com diferentes concentrações de ácidos húmicos (AH) proveniente de vermicomposto (VC) e de lodo de aterro sanitário (LS). ME: meristema.

	Tratamentos						
	Controle negativo	Controle positivo	AH – VC (2 mM C L <sup>-1</sup> )	AH – LS (0,5 mM C L <sup>-1</sup> )	AH – LS (1 mM C L <sup>-1</sup> )	AH – LS (2 mM C L <sup>-1</sup> )	AH – LS (4 mM C L <sup>-1</sup> )
Frequência de germinação	21,00 ± 1,00 <sup>a</sup>	20,40 ± 1,14 <sup>a</sup>	21,20 ± 1,64 <sup>a</sup>	20,80 ± 1,64 <sup>a</sup>	22,20 ± 2,17 <sup>a</sup>	19,80 ± 1,10 <sup>a</sup>	20,00 ± 0,71 <sup>a</sup>
Comprimento da raiz	1,82 ± 0,40 <sup>a</sup>	1,66 ± 0,30 <sup>a</sup>	1,28 ± 0,29 <sup>a</sup>	1,62 ± 0,34 <sup>a</sup>	1,70 ± 0,33 <sup>a</sup>	1,42 ± 0,38 <sup>a</sup>	1,56 ± 0,29 <sup>a</sup>
<b>Meristema</b>							
Índ. mitótico	6,45 ± 0,84 <sup>a</sup>	6,33 ± 0,78 <sup>a</sup>	6,93 ± 0,69 <sup>a</sup>	6,79 ± 1,06 <sup>a</sup>	6,45 ± 1,00 <sup>a</sup>	5,84 ± 0,63 <sup>a</sup>	7,08 ± 0,90 <sup>a</sup>
Índ. de alterações cromossômicas	0,05 ± 0,8 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,11 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,07 <sup>a</sup>
Índ. de alterações nucleares	0,05 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,30 ± 0,08 <sup>c</sup>	0,43 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,37 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,62 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,38 ± 0,15 <sup>b</sup>
Índ. de mutagenicidade	0,86 ± 0,19 <sup>a,b</sup>	2,20 ± 0,14 <sup>c</sup>	1,05 ± 0,13 <sup>b</sup>	1,19 ± 0,29 <sup>b</sup>	0,91 ± 0,18 <sup>a,b</sup>	0,92 ± 0,14 <sup>a,b</sup>	0,64 ± 0,09 <sup>a</sup>
<b>F<sub>1</sub></b>							
Índ. de mutagenicidade	0,21 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,55 ± 0,09 <sup>d</sup>	0,90 ± 0,06 <sup>b,c</sup>	0,87 ± 0,25 <sup>b,c</sup>	0,93 ± 0,28 <sup>b,c</sup>	1,20 ± 0,14 <sup>c</sup>	0,74 ± 0,11 <sup>b</sup>

Valores expressos por média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente (Teste de Tukey;  $P < 0,05$ ).

## 6.2 ARTIGO II

Após tradução este artigo científico será submetido à revista  
Environmental and Experimental Botany, ISSN 0098-8472.

### **Ácidos húmicos de aterro sanitário: efeitos nutricionais, fisiológicos e anatômicos em plântulas de *Zea mays* L.**

Mariana Morozesk<sup>a</sup>, Marina Marques Bonomo<sup>a</sup>, Lívia Dorsch Rocha<sup>a</sup>, Ian Drumond Duarte<sup>a</sup>, Camilla Rozindo Dias Milanez<sup>a</sup>, Leonardo Barros Dobbss<sup>b</sup> e  
Silvia Tamie Matsumoto<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari, 514, 29075-910, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

<sup>b</sup> Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, Universidade de Vila Velha, Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, 29102-770, Vila Velha, Espírito Santo, Brasil.

\* Correspondência do autor: 55 27 33357251, siltamie@gmail.com.

## Resumo

Lodos provenientes do processo de tratamento biológico dos lixiviados de aterros sanitários possuem altas taxas de matéria orgânica, de onde podem ser extraídos ácidos húmicos (AH), substâncias caracterizadas por influenciar diversos aspectos do metabolismo vegetal e promover melhorias no desenvolvimento das plantas. Visando investigar os efeitos da exposição de plantas aos AH de lodo de aterro sanitário, primeiramente foram realizadas análises de caracterização química do material, para posterior análises nutricionais, fisiológicas e anatômicas em *Zea mays* L. De acordo com os resultados da caracterização química, o AH apresentou elevados teores de carbono e nitrogênio, podendo constituir uma importante fonte de nutrientes para as plantas. Além disso, foram notados, em plântulas de milho, efeitos nas taxas de absorção, bioconcentração e translocação de alguns nutrientes em plântulas de milho. Alterações no teor de pigmentos não foram observadas para o AH proveniente de aterro sanitário. Influências sobre o crescimento da planta também foram reportados, por meio de aumentos expressivos da área radicular e da altura do vegetal. Em geral, os dados de crescimento mostraram um maior investimento da planta na parte aérea, provavelmente associado com a melhor eficiência do sistema radicular. Em adição, também foram notadas modificações na espessura da epiderme das plantas tratadas com AH. Devido à complexidade do resíduo, a correlação entre análises químicas, fisiológicas e anatômicas foi uma importante ferramenta na avaliação integrada dos efeitos deste composto.

**Palavras-chave:** translocação; bioconcentração; análise nutricional; análise de crescimento; análises anatômicas.

## 1. Introdução

O condicionamento de resíduos sólidos em aterros sanitários é uma prática crescente em diversos países (Baderna et al., 2011). Porém, com o armazenamento destes compostos, ocorrem diversos processos biológicos e químicos naturais que levam à geração de um líquido de coloração escura proveniente da digestão de matéria orgânica sólida por ação bacteriana, denominado lixiviado de aterro sanitário (Celere et al., 2007).

O tratamento biológico é uma prática frequentemente utilizada para lixiviados de aterros sanitários (Atmaca, 2009), onde a remoção de grande parte do material particulado, durante o processo, leva à formação do lodo de lixiviado (Nagashima et al., 2010). Devido ao alto teor de matéria orgânica presente no lodo, este tem sido foco de vários trabalhos, que buscam principalmente a utilização em áreas agrícolas (Adani et al., 2010; Baderna et al., 2011; Palanivell et al., 2013; Xiaoli et al., 2013).

O lodo de aterro sanitário gerado após o processo de tratamento biológico é composto, principalmente, por substâncias húmicas (SH). Alguns autores relatam a influência das SH no metabolismo vegetal (Loffredo e Senesi, 2009; Canellas et al., 2012; D’Orazio e Senesi, 2009). Dentre as SH, os ácidos húmicos (AH) são os mais estudados (Xiaoli et al., 2013; Adani et al., 2010), onde foi constatado que esses AH apresentam diversos efeitos estimulatórios sobre as plantas devido à liberação de suas moléculas bioativas, pela exsudação de ácidos orgânicos das raízes, que podem acessar receptores dentro ou fora da célula (Canellas et al., 2002).

Estes compostos modificam o metabolismo das plantas e podem, influenciar o transporte de íons, facilitando a absorção; promover aumento da respiração e da velocidade das reações enzimáticas do ciclo de Krebs, devido a maior produção de ATP; alterar o conteúdo de clorofila; modificar a velocidade de síntese dos ácidos nucléicos e ainda alterar atividade de diversas enzimas (Nannipieri et al. 1993). Além disso, já foram observados efeitos na abertura estomática (Palanivell et al., 2013) e no desenvolvimento do sistema vascular das plantas, promovendo crescimento tanto do sistema radicular quanto da parte aérea (Silva et al., 1999). Estes efeitos já foram observados também para dosagens elevadas de SH originadas de diferentes fontes

orgânicas (lodo de esgoto, compostos orgânicos, turfa e ácidos húmicos comerciais) (Ayuso et al., 1996).

Por outro lado, por serem consideradas uma supramolécula com massa aparentemente elevada, o efeito fisiológico direto das frações humificadas, tais como os ácidos húmicos (AH), é incompatível com seu tamanho e, conseqüentemente, com sua entrada na célula por meio das membranas biológicas. Sendo assim, a sua promoção ao crescimento vegetal não está completamente elucidada e tem sido justificada, pelo aumento da solubilidade de micronutrientes com a formação de complexos solúveis (Chen et al., 2003; Garcia-Mina et al., 2004) ou, ainda, pelo aumento da permeabilidade da membrana plasmática (Visser, 1982).

Dentre as espécies vegetais, o milho tem sido utilizado em diversos trabalhos devido seu elevado potencial produtivo e acentuada habilidade fisiológica na conversão de compostos minerais em orgânicos (Severino et al., 2005; Cruz et al., 2008). Além disso, a espécie representa um organismo teste eficiente, apresentando alta sensibilidade a exposição de SH (Pinton et al. 1999; Canellas et al., 2002; Quaggiotti et al., 2004; Palanivell et al., 2013).

Devido à complexidade de efeitos associados à ação dos AH, a integração de análises químicas a avaliações de efeitos biológicos permite uma interpretação mais acurada das implicações relacionadas à utilização destes compostos na agricultura (Geiszinger et al., 2009). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de AH sobre *Z. mays*, por meio de análises nutricionais, fisiológicas e anatômicas, visando contribuir para uma melhor elucidação sobre os efeitos da aplicação destes materiais húmicos em plantas.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Coleta do lodo de aterro sanitário

Amostras de lodo de aterro sanitário foram coletadas no Centro de Tratamento de Resíduos de Vila Velha, ES, Brasil (20°27'28"S e 40°23'21"O) após tratamento biológico, conforme os procedimentos de amostragem e condicionamento especificados na norma brasileira para amostragem de resíduos sólidos ABNT NBR: 10007 (ABNT, 2004).

### 2.2 Extração de ácido húmico

Após a secagem e peneiramento do lodo proveniente de aterro sanitário, foram realizadas as extrações das substâncias húmicas alcalino solúveis pelo método recomendado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS). Foi utilizado uma solução de NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup>, na razão sólido: solvente de 1:10 (m:v). A separação dos ácidos húmicos foi obtida com o redução do pH da solução até 1 com HCl 6 mol<sup>-1</sup>, em seguida, os ácidos húmicos foram lavados com água deionizada, dializados em membranas com poros 14 kDa e posteriormente liofilizados. As amostras de ácido húmico provenientes do vermicomposto passaram pela mesmo processo de extração e foram cedidas pela Universidade Vila Velha, ES, Brasil. Neste trabalho este composto foi utilizado como um comparativo de ação, sendo sua bioatividade atestada por Dobbss et al. (2010) em plântulas de milho.

### 2.3 Determinação das dosagens utilizadas

Para a determinação das dosagens, foi realizada a análise da composição elementar dos materiais húmicos por meio do analisador elementar automático (CHNS-932, Leco, Alemanha). Foram determinadas os percentuais de carbono total, hidrogênio total e nitrogênio total, sendo o conteúdo de oxigênio aferido pela diferença destes



resultados por 100 (Ayuso et al., 1996). Além disso, foram calculadas as relações entre os elementos, a fim de realizar a caracterização dos compostos.

Após a análise, foram determinadas quatro concentrações de ácido húmico derivado de aterro sanitário baseadas nos teores de carbono C (0,5; 1; 2 e 4 mM C L<sup>-1</sup>) e uma concentração de ácido húmico proveniente do vermicomposto (2 mM C L<sup>-1</sup>), sendo estes valores baseados na literatura (Canellas et al., 2010; Canellas et al., 2012; Dobbss et al. 2010).

#### 2.4 Ensaio em *Zea mays* L.

Sementes de *Z. mays* (Híbrido Embrapa - BR 206, Brasil) foram desinfestadas por meio de imersão em uma solução de NaClO (1 %) por 30 minutos. Posteriormente, foram mantidas em água destilada por 3 horas. Em seguida, as sementes foram acondicionadas em papel-filtro para germinação no escuro em temperatura média de 28 °C. Quatro dias após a germinação das sementes, plântulas de milho com aproximadamente 0.5 cm, foram transferidas para vasos (cinco vasos por tratamento) contendo solução de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950) modificada para ¼ de força molar. Para o tratamento controle negativo, as plantas foram submetidas somente à solução nutritiva e os tratamentos restantes consistiram na adição de diferentes dosagens de ácido húmico. O pH das soluções foi ajustado para 5,8-6,0 e as condutividades foram mensuradas.

Para a condução do experimento, foi montado um sistema hidropônico com aeração constante utilizando compressores de ar (Gong Yang Bang, HP-400, China). A exposição aos diferentes tratamentos foi realizada por um período de 10 dias, em casa de vegetação localizada no campus de Goiabeiras da Universidade Federal do Espírito Santo/UFES (20° 16' 29.97"S e 40° 18' 21.19"O), com temperatura média de 27 °C e umidade relativa média de 77%. O pH das soluções foi ajustado diariamente.

#### 2.5 Análise nutricional

Decorrido o tempo experimental, amostras de solução nutritiva, raízes e parte aérea foram coletadas para avaliação química. Para a realização das análises, amostras de solução nutritiva foram acidificadas com ácido nítrico à 5% (Merck Química, Argentina) e as amostras de raiz e folha foram digeridas, utilizando ácido nítrico e clorídrico destilados. As quantificações dos teores nutricionais foram realizadas em triplicata, conforme Malavolta et al. (1997), e foi utilizado o método semi-micro-Kjeldahl para a quantificação de N, o método de colorimetria do metavanadato para a quantificação de P, o método de turbidimetria do sulfato de bário para a quantificação de S, a fotometria de chama de emissão para a quantificação de K, o método de colorimetria da curcumina para quantificação de B e espectrofotometria de absorção atômica para a quantificação de Ca, Mg, Fe, Cu, Zn e Mn.

Para o cálculo da taxa de absorção foram utilizados os valores quantificados na solução nutritiva inicial e final de cada tratamento. O fator de bioconcentração (FBC) foi calculado para comparar os níveis de nutrientes presentes na soluções nutritivas que foram acumulados nos tecidos de raiz. O fator de translocação (FT) foi utilizado para avaliar as concentrações de nutrientes presentes na parte aérea e as correlações com os valores encontrados nas raízes. Os valores de bioconcentração e translocação foram considerados significativos, somente com resultados maiores que 1, como descrito por Ali et al. (2013).

## 2.6 Teor de pigmentos fotossintéticos

Os teores de pigmentos foram determinados pelo o método de extração com DMSO (Argenta et al., 2001). A folha basal mais desenvolvida foi coletada de cinco plantas de cada tratamento, no período da manhã. Um disco de cerca de 1 cm<sup>2</sup> foi retirado de cada folha, imerso em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e incubado à 70 °C por 30 minutos, no escuro (Hiscox e Israelstam, 1979). A leitura do extrato foi realizada em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, EUA) nas absorvâncias de 480, 645, 663 nm. A quantificação dos teores de pigmento foi realizada conforme as equações de Lichtenthaler e Welbum (1983). A determinação da concentração relativa de clorofila também foi determinada utilizando um método não destrutivo por meio do

medidor de clorofila SPAD (Soil Plant Analysis Development) (Minolta, SPAD-502, Japão) sendo realizada também na folha basal mais desenvolvida. Foram realizadas duas medições por planta e foram avaliadas trinta plantas por tratamento.

## 2.7 Análises de crescimento

Após o término do experimento, foram selecionados aleatoriamente cinco plântulas de *Z. mays* de cada repetição, totalizando 25 indivíduos por tratamento, a fim de realizar medidas de altura, da área foliar total, (Area Meter, LI-COR 3100, USA), da área radicular (Scanner Photosmart D110, Hewlett-Packard Development Company, EUA), massa fresca e seca (estufa 60° C) de todos os órgãos, medidas de diâmetro, área e comprimento das raízes e contagem do número de folhas. A partir dessas medidas foram obtidas médias da razão de área foliar por número folhas, razão de raiz por parte aérea, massa foliar específica, área foliar específica, área radicular específica, razão de área foliar e comprimento específico da raiz. Além disso, com os valores das massas secas da parte aérea e das raízes foi possível calcular a proporção de alocação de biomassa da planta (Hunt, 2002; Rocha et al., 2009).

## 2.8 Análises anatômicas

Para cada tratamento foram retiradas amostras das raízes e de folhas de dez plântulas de *Z. mays*. Para a análise quantitativa as amostras foram fixadas e armazenadas em álcool etílico 70%. Destes materiais, foram feitos cortes à mão livre das raízes na região de 1 cm a partir do ápice radicular (base caulinar). Das amostras de folhas, foram realizadas impressões abaxiais, do terço mediano da região internervural. Os cortes foram corados com azul de astra e safranina a 1% (Bukatsch, 1972). As lâminas foram analisadas em fotomicroscópio Nikon E200 (Nikon Instruments Inc., Japão) e as fotos obtidas foram analisadas por intermédio do programa Nikon NIS-Elements (Nikon Instruments Inc., Japão). A densidade estomática (mm<sup>2</sup>) foi realizada utilizando uma gota de adesivo instantâneo universal éster de cianoacrilato (Super-Bonder, EUA) em uma lâmina histológica. Cinco campos ópticos aleatórios foram

analisados por indivíduo, totalizando 50 campos ópticos por tratamento. Já para determinação das medidas da raiz, foram realizadas dez medições, em  $\mu\text{m}$ , por indivíduo, totalizando cem medições por tratamento.

## 2.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Infostat (Di Rienzo et al., 2010). Em todas as avaliações foi realizada uma análise de variância (ANOVA), para averiguação da normalidade dos dados, seguido por teste de médias Tukey ( $P < 0.05$ ).

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Caracterização química dos ácidos húmicos

Os resultados da análise de composição elementar dos ácidos húmicos estão dispostos na Tabela 1. Os teores de carbono e nitrogênio no ácido húmico proveniente de lodo de aterro sanitário foram maiores do que os valores quantificados no vermicomposto, indicando maior grau de evolução destes materiais húmicos (Kononova, 1982; Adani et al., 2006). Os altos teores de oxigênio observados indicam a predominância de grupos funcionais oxigenados nos ácidos húmicos, usualmente classificados como carboxílicos (COOH), hidroxilas (OH), carbonilas (C=O), metóxilas (OCH<sub>3</sub>) e ocasionalmente ésteres (COOR) e éteres (COC) (Hayes et al., 1989; Silva et al., 1999). As relações entre C/N são muitas vezes utilizadas para monitorar as alterações estruturais das frações húmicas das substâncias húmicas de diferentes fontes (Adani et al., 2006), indicando o grau de incorporação do nitrogênio e o grau de humificação na estrutura das substâncias húmicas (Stevenson, 1994; Lu et al., 2000). O teor de nitrogênio elevado encontrado nos materiais húmicos, indica os tais como uma fonte importante de compostos nitrogenados (Stevenson, 1994).

#### 3.2 Análise de nutrientes

Os resultados da quantificação de nutrientes na solução nutritiva inicial revelaram que houve um aumento na quantidade de nitrogênio total na solução em decorrência da adição de AH (Tabela 2). Além disso, foram observados maiores valores de potássio para o tratamento AH-VC e de cálcio para o tratamento AH-LS 4 mM C L<sup>-1</sup>, em relação ao controle, sugerindo que a adição de ácidos húmicos disponibiliza uma maior quantidade destes nutrientes para a planta.

Em relação às taxas de nutrientes observadas na solução nutritiva final, foram notados valores maiores de nitrogênio para os tratamentos AH-LS com 2 e 4 mM C L<sup>-1</sup>. Estes resultados corroboram os valores deste nutriente observados na solução nutritiva inicial, indicando que durante o tratamento o mesmo não foi totalmente absorvido. A

análise das concentrações de cálcio após os tratamentos revelaram que a exposição ao tratamento com AH promoveu uma redução deste nutriente, indicando uma melhor absorção deste elemento, dado corroborado pelas taxas de absorção observadas. Por outro lado, os níveis de ferro detectados em algumas soluções foram maiores que o tratamento controle (Tabela 2). Os valores de Fe encontrados neste trabalho provavelmente estão associados a capacidade das SH formarem complexos estáveis com metais (neste caso o ferro), alterando as taxas de absorção deste elemento para a planta (García-Mina et al., 2004).

Em relação a quantificação de nutrientes na composição no tecido radicular das plântulas, os teores nutricionais observados não foram significativos, porém foram observados quantidades maiores de N e S com a adição de maiores dosagens de AH (Tabela 2). Eyheraguibel et al. (2008) também investigaram a absorção de nutrientes em plantas de milho e verificaram que as maiores quantidades destes compostos encontrados nos órgãos das plantas estavam associadas com ao crescimento radicular promovido pelas SH.

Na parte aérea foi encontrado um maior valor na quantidade de fósforo para o tratamento AH-VC (Tabela 2). A absorção de fósforo pode ser esclarecida pela capacidade dos AH de formarem fosfohumatos, composto que pode ser facilmente absorvido pelas plantas, porém, em concentrações altas, podem causar fitotoxicidade (Raina e Goswami, 1988; Ayuso et al., 1996). Na análise da composição foliar também foram notadas menores quantidades de Cu, Mn e B para alguns tratamentos com AH. Ácidos húmicos apresentam diferentes composições, que varia com a fonte de matéria orgânica e interagem com diversos elementos químicos. Estas interações podem promover alterações na biodisponibilidade dos nutrientes para as plantas, podendo aumentar ou reduzir a capacidade de absorção (García-Mina et al., 2004; Eyheraguibel et al., 2008) e, conseqüentemente, a composição química dos órgãos da mesma.

O efeito que as SH possuem sobre a absorção de nutrientes geralmente depende de sua origem, tipo e concentração na solução nutritiva e da espécie e variedade de planta tratada (Ayuso et al., 1996). Maggioni et al. (1987) indicaram que os AH podem influenciar a absorção de nutrientes via efeito enzimático, por meio do aumento da atividade de ATPásica dependente de  $K^+$  e  $Mg^{2+}$ . Além disso, Samson e

Visser (1989) demonstraram que a permeabilidade da membrana plasmática pode ser alterada pela ação destes ácidos. As taxas de absorção encontradas neste trabalho revelaram maior absorção de N para o tratamento de AH-LS 4 mM C L<sup>-1</sup> e de Ca e Mg para a maioria das concentrações testadas (Tabela 2).

Diversos estudos relatam que a ação benéfica das substâncias húmicas no desenvolvimento da planta está frequentemente associada com aumentos significativos nas concentrações de vários nutrientes minerais nas raízes (Chen e Aviad, 1990; Ayuso et al., 1996; Chen et al., 2003). Por meio da análise bioconcentração foram observados taxas elevadas de P, Fe, Cu, Zn, Mn e B nos tecidos de plântulas de *Z. mays* para todos os tratamentos, onde maiores valores de Mn foram encontrados para o tratamento AH-VC e para o Cu nos tratamentos com 0,5 e 2 mM C L<sup>-1</sup> de AH-LS, em relação ao controle. Por outro lado, menores valores foram observados para o Fe no tratamento de 4 mM C L<sup>-1</sup> e para o N nas diferentes concentrações de AH-LS testadas (Tabela 2). Nesse contexto, dos 11 elementos avaliados neste estudo apenas 2 foram aumentados pela ação dos tratamentos com ácidos húmicos. Estes resultados corroboram os descritos por Mora et al. (2010), onde a adição de ácidos húmicos naturais não promoveu aumento do FBC em pepino.

Neste trabalho foi observado translocação para o N, P, K, Cu e Zn (Tabela 2), porém não foram encontradas diferenças significativas em relação ao controle para este fator nos diferentes tratamentos com ácidos húmicos. Estes dados indicam a ausência de efeitos das substâncias testadas no sistema vascular da parte aérea das plantas.

### 3.3 Teor de pigmentos fotossintéticos

Um dos efeitos relacionados ao tratamento de plantas com SH é o aumento no teor de clorofila, influenciando diretamente as taxas fotossintéticas das plantas (Nardi et al., 2002; Ertani et al., 2013). Os resultados da análise de pigmentos mostraram que por meio das medições realizadas com o SPAD não houveram diferenças significativas entre os tratamentos. Por outro lado, na análise das concentrações dos pigmentos isolados pôde-se verificar um aumento na concentração das clorofilas *a*, *b*, total e carotenóides para o tratamento AH-VC e um aumento não significativo e menos

expressivo, em relação ao controle, para o tratamento com 0,5 mM C L<sup>-1</sup> de AH-LS (Tabela 3). Os níveis de metabólitos nitrogenados na planta estão diretamente associados com as taxas de pigmentos fotossintéticos (Debaeke et al., 2006; Ertani et al., 2013). Neste estudo, foram encontradas para os tratamentos com maiores quantidades de pigmentos as maiores taxas de bioconcentração e translocação de nitrogênio, respectivamente. Isso sugere que a alteração da entrada de N pelos os diferentes tratamentos com SH promove mudanças no teor de pigmentos e conseqüentemente alteram a fotossíntese das plantas. Adicionalmente, Kitajima e Hogan (2003) evidenciam que a relação clorofila *a/b* deve aumentar com a menor disponibilidade de N. Porém, não foram observadas diferenças estatísticas entre as relações de clorofila *a/b* e clorofila total/carotenoides neste trabalho.

### 3.4 Análise de crescimento

Diversos estudos relatam o papel das substâncias húmicas (SH) no crescimento das plantas (Canellas et al., 2002; Nardi et al., 2009; Canellas et al., 2010). Estes efeitos positivos são explicados por uma interação entre as SH e os processos fisiológicos e metabólicos das plantas (Trevisan et al., 2010). As SH podem estimular a absorção de nutrientes (Piccolo et al., 1992) e influenciar na permeabilidade celular (Visser, 1982; Pinton et al., 1992; Ayuso et al., 1996) e vários autores sugerem a ação destes compostos na regulação do mecanismos envolvidos na estimulação do crescimento vegetal (Dobbss et al., 2007; Palanivell et al., 2013). Neste estudo, foi observado que os tratamentos com 2 e 4 mM C L<sup>-1</sup> de AH-LS promoveram um aumento na altura das plantas. Além disso, o tratamento com 2 mM C L<sup>-1</sup> de AH-LS aumentou as medidas de área foliar (AF), relação entre a AF e o número de folhas e área foliar específica (AF/ MST) (Tabela 4).

O desenvolvimento radicular é um requisito fundamental para a capacidade das plantas de se adaptar e sobreviver em condições adversas, e, portanto, o número de raízes laterais e o posicionamento destas são de fundamental importância para as plantas (Leyser e Fitter, 1998; Canellas et al., 2010). As análises de crescimento mostraram que o comprimento da raiz principal não foi alterado com os diferentes



tratamentos. Por outro lado, verificou-se um aumento na área radicular nos tratamentos com 2 e 4 mM C L<sup>-1</sup> de AH-LS e AH-VC, e a área radicular específica (AR/ MST) foi maior em todos os tratamentos em relação ao controle (Tabela 4; Figura 1). Canellas et al. (2010) observaram que as SH podem até inibir o crescimento da raiz principal, em virtude de aumentar o desenvolvimento das raízes laterais, fenômenos característicos do hormônio vegetal auxina (Bhalerao et al., 2002; Dobbss et al., 2007).

Uma outra característica marcante das SH é a sua capacidade de induzir a um aumento no peso fresco e seco de tecidos vegetais, tal efeito varia de acordo com o tipo e a concentração do material húmico, da espécie estudada, da idade e do órgão analisado (Nardi et al., 2009; Ertani et al., 2013). Neste trabalho, todos os tratamentos promoveram aumento na razão de massa da parte aérea (MSPA/MST) em relação ao tratamento controle, entretanto, a razão de massa radicular foi menor em todos os tratamentos, bem como a razão MSR/MSPA (Tabela 4). A promoção do desenvolvimento das raízes laterais pelas SH influencia a absorção de nutrientes pelos vegetais (Nardi et al., 2002; Palanivell et al., 2013). Nesse contexto, os menores valores da razão de massa radicular encontrados podem estar associados a melhor captação de nutrientes pela planta, devido a presença de um sistema radicular mais eficiente, levando a um conseqüente maior investimento da planta na parte aérea.

### 3.5 Análises anatômicas

A capacidade dos AH alterarem o sistema vascular das plantas, afetando principalmente as raízes e levando à melhor absorção de nutrientes foi documentada em diversos trabalhos (Ayuso et al., 1996; Silva et al., 1999; Schmidt et al., 2007). Neste estudo, por meio das análises anatômicas da raiz de *Z. mays* não foram observadas diferenças significativas dos tratamentos em relação ao controle na espessura da raiz e do córtex, no número de vasos do metaxilema e do diâmetro do cilindro vascular. A ausência de efeitos pode decorrer do curto período de exposição das plantas as SH (10 dias), visto que a ocorrência de alterações anatômicas requer grandes períodos de exposição. Entretanto, ao analisar a razão córtex/ cilindro vascular algumas alterações foram observadas, como a redução dos valores desta relação no

tratamento AH-VC e o aumento pelo tratamento 4 mM C L<sup>-1</sup> de AH-LS, sugerindo que os AH interferem na anatomia radicular e que após um maior período de exposição, diferenças anatômicas possivelmente poderão ser melhor documentadas.

A proteção das plantas contra patógenos e microrganismos também está associada com aos efeitos benéficos proporcionados pelos AH (Shehata et al., 2013). O processo de suberização radicular está relacionado a uma reação à defesa contra microrganismos, podendo também proteger a planta quanto a presença de substâncias tóxicas (Rioux; Bayen 1997; Silva et al., 2005). Ao investigar a camada de suberização neste trabalho não foram notadas diferenças dos tratamentos em relação ao controle. Porém, na análise da epiderme foi observado um aumento na espessura após os tratamentos com 1 e 2 mM C L<sup>-1</sup> de AH-LS. A epiderme também está associada com a proteção da planta contra fatores prejudiciais externos (Mansour, 1998; Cunha et al., 2008). Com base no exposto, pode-se sugerir que o processo de proteção da planta pelos AH ocorra majoritariamente devido a modificações na epiderme da raiz do que na camada de suberização.

Palanivell et al., 2013, mostraram que materiais húmicos com diferentes massas moleculares promoveram aumentos na quantidade de estômatos e alterações no mecanismo de abertura e fechamento estomático, no entanto, no presente trabalho, diferentemente de Palanivell et al., 2013, não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos no que se diz respeito a densidade estomática.

#### **4. Conclusão**

Visando investigar os efeitos da exposição de plantas ao ácido húmico proveniente de lodo de aterro sanitário foram realizadas análises de caracterização química, análises nutricionais, fisiológicas e anatômicas em *Z. mays*. Por meio de caracterizações físicas e químicas o ácido húmico apresentou elevados teores de carbono e nitrogênio, podendo constituir uma importante fonte de nutrientes para as plantas. Além disso, efeitos nas taxas de absorção, na bioconcentração e na translocação de alguns nutrientes foram observadas, sendo os resultados mais expressivos na raiz do que na parte aérea das plantas. Não foram verificadas mudanças relevantes no teor de pigmentos para as dosagens de ácido húmico proveniente de lodo de aterro sanitário testadas. Em relação as análises de crescimento, as alterações mais relevantes notadas em *Z. mays* foram em relação ao aumento da área radicular e da altura. Em geral, os dados de crescimento mostraram um maior investimento da planta na parte aérea, provavelmente associado com a melhor eficiência do sistema radicular. Na análise anatômica foi observado alterações na epiderme, após o tratamento com as concentrações medianas de ácido húmico, este resultado pode estar relacionado com o mecanismo de proteção da planta pelos ácidos húmicos. Por fim, foram reportados os efeitos benéficos da exposição ao ácido húmico proveniente de lodo tratado de aterro sanitário em *Z. mays* e devido à complexidade do resíduo, a correlação entre análises químicas, fisiológicas e anatômicas foi uma importante ferramenta na avaliação integrada dos efeitos deste composto.

#### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento parcial do trabalho, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de mestrado concedidas.

## Referências

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), 2004. NBR - 10007 - Amostragem de resíduos sólidos. ABNT, Rio de Janeiro, 2004.
- Adani, F., Genevini, P., Tambone, F., Montoneri, E., 2006. Compost effect on soil humic acid: A NMR study. *Chemosphere* 65, 1414–1418.
- Adani, F., Tambone, F., Davoli, E., Scaglia, B., 2010. Surfactant properties and tetrachloroethene (PCE) solubilisation ability of humic acid-like substances extracted from maize plant and from organic wastes: A comparative study. *Chemosphere* 78, 1017–1022.
- Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A., 2013. Phytoremediation of heavy metals - Concepts and applications. *Chemosphere*, 91, 869-881.
- Argenta, G., Silva, P.R.F., Bortolin, C.G., Forsthofer, E.L., Strieder, M.L., 2001. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 13, 158-167.
- Atmaca, E., 2009. Treatment of landfill leachate by using electro-Fenton method. *J. Hazard. Mater.* 163, 109–114.
- Ayuso, M., Hernandez, T., Garcia, C., Pascual, J.A., 1996. Stimulation of barley growth and nutrient absorption by humic substances originating from various organic materials. *Bioresour, Technol.* 57, 251-257.
- Baderna, D., Maggioni, S., Boriani, E., Gemma, S., Molteni, M., Lombardo, A., Colombo, A., Bordonali, S., Rotella, G.; Lodi, M., Benfenati, E., 2011. A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: Chemical analyses, risk assessment and in vitro assays. *Environ. Res.* 111, 603–613.
- Bhalerao, R.P., Eklof, J., Ljung, K., Marchant, A., Bennett, M., Sandberg, G., 2002. Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* 29, 325–332.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Façanha, A.L., Façanha, A.R., 2002. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol.* 130, 1951–1957.

- Canellas, L.P., Piccolo, A., Dobbss, L.B., Spaccini, R., Olivares, F.L., Zandonadi, D.B., Façanha, A.R., 2010. Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. *Chemosphere* 78, 457–466.
- Canellas, L.P., Dobbss, L.B., Chagas, J.G., Aguiar, N.O., Rumjanekc, V.M., Novotny, E. H., Olivares, F.L., Spaccini, R., 2012. Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. *Eur. J. Soil Sci.* 63, 315–324.
- Cataneo, A.C., Chamma, K.L., Ferreira, L.C., Déstro, G.F.G., Carvalho, J.C., Novelli, E. L.B., 2002. Glutathione S Glutathione S-transferase activity in acetochlor, atrazine and transferase activity in acetochlor, atrazine and oxyfluorfen metabolization in maize (*Zea mays* L.), sorghum (*Sorghum bicolor* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) (Poaceae). *Acta. Sci. Agron.* 24, 619–623.
- Celere, M.S., Oliveira, A.S., Trevilato, T.M.B., Segura-Munoz, S.I., 2007. Metais presentes no chorume coletado no aterro sanitário de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, e sua relevância para saúde pública. *Cad. Saúde Pública*, 23, 939–947.
- Chen, Y., Aviad, T., 1990. Effects of humic substances on plant growth. In: *Humic Substances in Soil and Crop Sciences: Selected Readings*, eds. MacCarthy, P., Clapp, C.E., Malcolm, R.L., Bloom, P.R. Soil. Sci. Soc. Am., Madison, Wisconsin, USA, pp. 161–186.
- Chen, J., Gu, B., Royer, R.A., Burgos, W.D., 2003. The roles of natural organic matter in chemical and microbial reduction of ferric ion. *Sci. Total Environ.* 307, 167–178.
- Cruz, S.C.S., Pereira, F.R.S., Santos, J.R., Albuquerque, A.W., Silva, E.T., 2008. Parcelamento da adubação nitrogenada na cultura do milho irrigado em sistema plantio direto. *R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental* 12, 370–375.
- Cunha, K.P.V., Nascimento, C.W.A., Pimentel, R.M.M., Ferreira, C.P., 2008. Cellular localization of cadmium and structural changes in maize plants grown on a cadmium contaminated soil with and without liming. *J. Hazard. Mater.* 160, 228–234.
- Debaeke, P., Rouet, P., Justes, E., 2006. Relationship between the normalized SPAD index and the nitrogen nutrition index. Application to durum wheat. *J. Plant Nutrit.* 1, 75–92.

- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C. W. InfoStat versión 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2010.
- Dobbss, L.B., Medici, L.O., Peres, L.E.P., Pino-Nunes, L.E., Rumjanek, V.M., Façanha, A.R., Canellas, L.P., 2007. Changes in root development of *Arabidopsis* promoted by organic matter from oxisols. *Ann. Appl. Biol.* 151, 199–211.
- Dobbss, L.B., Canellas, L.P., Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Peres, L.E.P., Azevedo, M., Spaccini, R., Piccolo, A., Façanha, A.R., 2010. Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth. *J. Agr. Food Chem.* 58, 3681–3688.
- D’Orazio, V., Senesi, N., 2009. Spectroscopic properties of humic acids isolated from the rhizosphere and bulk soil compartments and fractionated by size-exclusion chromatography. *Soil Biol. Biochem.* 41, 1775–1781.
- Ertani, A., Pizzeghello, D., Cadili, V., Tambone, F., Gennarib, M., Nardi, S., 2013. Humic-like substances from agro-industrial residues affect growth and nitrogen assimilation in maize (*Zea mays* L.) plantlets. *J. Geochem. Explor.* 129, 103–111.
- Eyheraguibel, B., Silvestre, J., Morard, P., 2008. Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. *Bioresour. Technol.* 99, 4206–4212.
- Garcia-Mina, J.M., Antolin, M.C., Sanchez-Diaz, M., 2004. Metal-humic complexes and plant micronutrient uptake: a study based on different plant species cultivated in diverse soil types. *Plant Soil* 258, 57–68.
- Geiszinger, A., Bonnineau, C., Faggiano, L., Guasch, H., López-Doval, J.C., Proia, L., Ricart, M., Romani, A., Rotter, S., Muñoz, I., Schmitt-Jansen, M., Sabater, S., 2009. The relevance of the community approach linking chemical and biological analyses in pollution assessment. *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 28, 619–626.
- Hayes, M.H.B., Maccarthy, P., Malcolm, R.L., Swift, R.S., 1989. Humic Substances II. In *Search of Structure*. West Sussex, UK, John Wiley & Sons Ltd., 733 p.
- Hiscox, J.D., Israelstam, G.F. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* 57, 1332-1334.

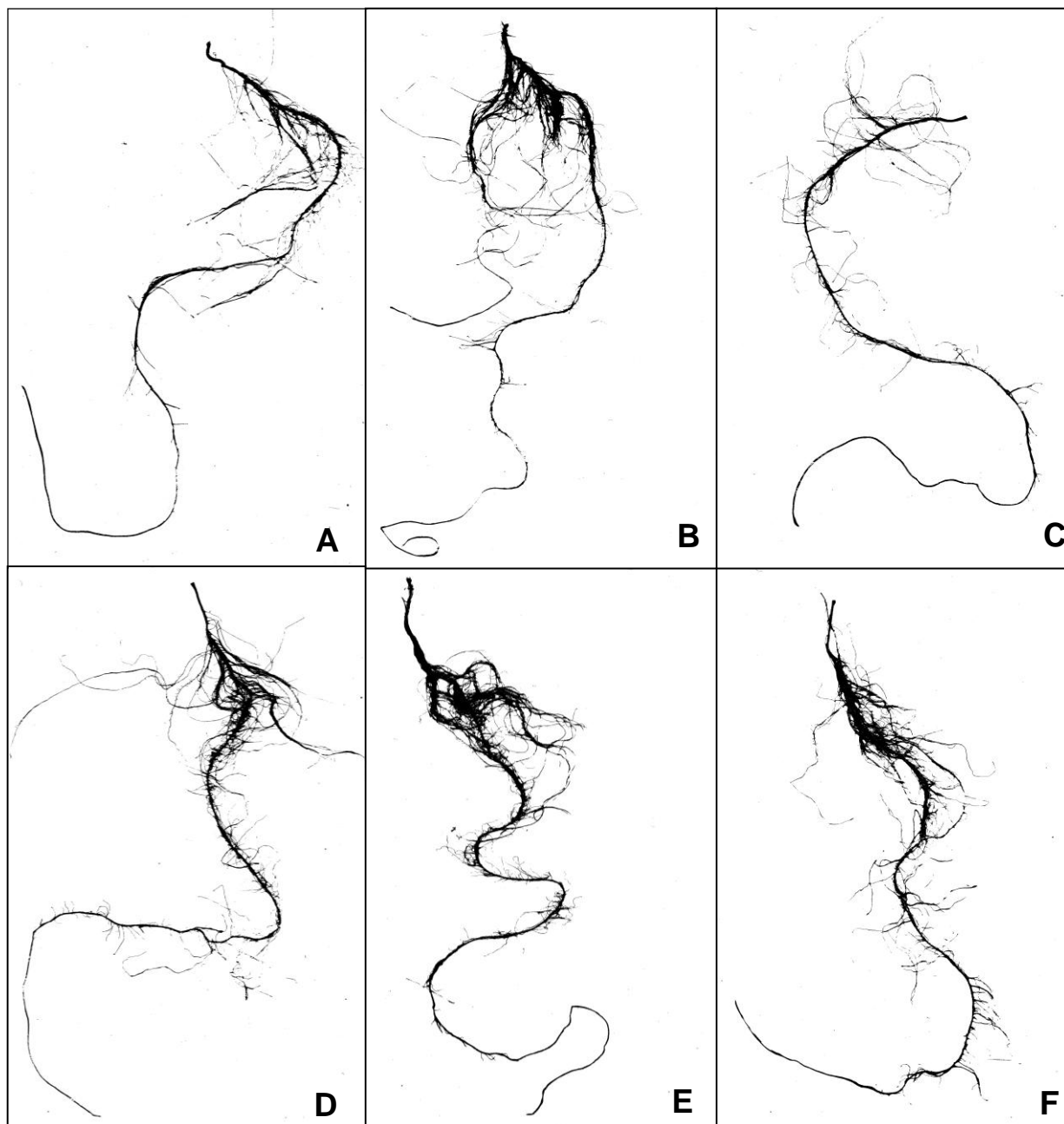
- Hoagland, D. R., Arnon, D. I., 1950. *The Water Culture Method for Growing Plants Without Soil*, California Agricultural Experiment Station, Berkeley, CA, USA, 347 p.
- Hunt, R., 1978. *Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis*. London, Edward Arnold Publishers, 80 p.
- Kitajima, K., Hogan, K.P., 2003. Increases of chlorophyll a/b ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. *Plant Cell Environ.* 26, 857–865.
- Kononova, M.M., 1982. *Matéria orgânica del suelo: su naturaleza, propiedades y métodos de investigación*. Barcelona: Oikos-Tou, 365p.
- Leyser, O., Fitter, A., 1998. Roots are branching out in patches. *Trends Plant Sci.* 3, 203–204.
- Lichtenthaler, H.K., Welburn, A.R., 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 11, 591–592.
- Loffredo, E., Senesi, N., 2009. In vitro and in vivo assessment of the potential of compost and its humic acid fraction to protect ornamental plants from soil-borne pathogenic fungi. *Sci. Hortic-Amsterdam* 122, 432–439.
- Lu, X.Q., Hanna, J.V., Johnson, W.D., 2000. Source indicators of humic substances: an elemental composition, solid state  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR and Py-GC/MS study. *Appl. Geochem.* 15, 1019–1033.
- Maggioni, A., Varanini, Z., Nardi, S., Pinton, R., 1987. Action of soil humic matter on plant roots: stimulation of ion uptake and effects on  $(\text{Mg}^{2+} \text{ K}^+)$  ATPase activity. *Sci. Total Environ.* 62, 355-363.
- Malavolta, E., Vitti, G.C., Oliveira, S.A., 1997. *Avaliação nutricional das plantas: princípios e aplicações*. Associação Brasileira para Pesquisa do Potássio e do Fósforo, Piracicaba, São Paulo, 319 p.
- Mansour, M.M.F. 1998. Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycinebetaine and proline against NaCl stress. *Plant Physiol. Biochem.* 36, 767–772.
- Mora, V., Bacaicoa, E., Zamarreño, A., Aguirre, E., Garnica, M., Fuentesb, M., García-Mina, J., 2010. 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. *J. Plant Physiol.* 167, 633–642.
- Nannipieri, P., Grego, S., Dell'agnola, G., Nardi, S. 1993. Proprietà biochimiche e fisiologiche della sostanza organica. In: P. Nannipieri (ed.). *Ciclo della sostanza organica nel suolo: aspetti agronomici, chimici, ecologici, ecologici y selvicolturali*. Bologna: Patron, 67-78.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A. Vianello, A., 2002. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biol. Biochem.* 34, 1527–1536.
- Nardi, S., Carletti, P., Pizzeghello, D., Muscolo, A., 2009. Biological activities of humic substances. In: Senesi, N., Xing, B., Huang, P.M. (eds.). *Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Nonliving Organic Matter in Environmental Systems. PART I. Fundamentals and impact of mineral-organic-biota interactions on the formation, transformation, turnover, and storage of natural nonliving organic matter (NOM)*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, pp. 305–339.
- Palanivell, P., Susilawati, K., Ahmed, O.H., Majid, N.M., 2013. Compost and crude humic substances produced from selected wastes and their effects on *Zea mays* L. nutrient uptake and growth. *ScientificWorldJournal* ID. 276235.
- Piccolo, A., Nardi, S., Concheri, G., 1992. Structural characteristics of humus and biological activity. *Soil Biol. Biochem.* 24, 273–380.
- Pinton, R., Varanini, Z., Vizzotto, G., Maggioni, A., 1992. Soil humic substances affect transport properties of tonoplast vesicles isolated from oat roots. *Plant Soil* 142, 203– 210.
- Pinton, R., Cesco, S., Iacoletti, G., Astolfi, S., Varanini, Z., 1999. Modulation of NO<sub>3</sub>-uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Soil* 215, 155–161.
- Quaggiotti, S., Ruperti, B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tugnoli, V., Nardi, S., 2004. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.* 55, 803-813.
- Raina, J.N., Goswami, K.P., 1988. Effect of fulvic acids on the growth and nutrient uptake by maize plant. *J. Indian Soc. Soil* 36, 264-268.



- Rioux, D., Bayen, R.P., 1997. A suberized perimedullary reaction zone in *Populus balsamifera* novel for compartmentalization in trees. *Trees: Struct. Funct.* 11, 389–403.
- Rocha, A.C., Canal, E.C., Campostrini, E., Reis, F.O., Cuzzuol, G.R.F., 2009. Influence of chromium in *Laguncularia racemosa* (L). Gaertn f. physiology. *Braz. J. Plant Physiol.* 21, 87-94.
- Samson, G., Visser, S.A., 1989. Surface-active effect of humic acids on potato cell membrane properties. *Soil Biol. Biochem.* 21, 343-347.
- Schmidt, W., Santi, S., Pinton, R., Varanini, Z., 2007. Water-extractable humic substances alter root development and epidermal cell pattern in *Arabidopsis*. *Plant Soil* 300, 259–267.
- Shehata, A.A., Kühnertd, M., Haufed, S., Krügera, M., 2013. Neutralization of the antimicrobial effect of glyphosate by humic acid in vitro. *Chemosphere [In press]*.
- Silva, R. M., Jablonski, A., Siewerdt, L., Silveira Júnior, P., 1999. Crescimento da parte aérea e do sistema radicular do milho cultivado em solução nutritiva adicionada de substâncias húmicas. *Rev. Bras. Agric.* 5, 101–110.
- Silva, L.M., Alquini, Y., Cavallet, V.J., 2005. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. *Acta Bot. Bras.* 19, 183-194.
- Stevenson, J.F., 1994. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2. ed., New York, John Wiley & Sons INC., 496 p.
- Severino, F.J., Carvalho, S.J.P., Christoffoleti, P.J., 2005. Mutual Interferences among Corn Crop, Forage Species and Weeds under a Consortium System - Implications on Corn Crop (*Zea mays*). *Planta Daninha* 23, 589–596.
- Sara Trevisan, S., Francioso, O., Quaggiotti, S., Nardi, S., 2010. Humic substances biological activity at the plant-soil interface. *Plant Signal. Behav.* 5, 635-643.
- Visser, S.A., 1982. Surface active phenomena by humic substances of aquatic origin. *Rev. Fr. Sci. Eau* 1, 285-295.
- Xiaoli, C., Yongxia, H., Guixiang, L., Xin, Z., Youcai, Z., 2013. Spectroscopic studies of the effect of aerobic conditions on the chemical characteristics of humic acid in landfill leachate and its implication for the environment. *Chemosphere* 91, 1058–1063.

## Figuras e Tabelas



**Figura 1.** Morfologia das raízes de *Z. mays* após a exposição aos diferentes tratamentos. **A:** controle negativo; **B:** AH-VC (2 mM C L<sup>-1</sup>); **C:** AH-LS (0,5 mM C L<sup>-1</sup>); **D:** AH-LS (1 mM C L<sup>-1</sup>); **E:** AH-LS (2 mM C L<sup>-1</sup>); **F:** AH-LS (4 mM C L<sup>-1</sup>).

**Tabela 1.** Caracterização elementar dos ácidos húmicos utilizados neste estudo.

	<b>AH - VC</b>	<b>AH - LS</b>
<b>Elementos</b>		
Carbono (C) (g Kg <sup>-1</sup> )	309,2 ± 1,2 <sup>a</sup>	398,8 ± 9,3 <sup>b</sup>
Hidrogênio (H) (g Kg <sup>-1</sup> )	37,3 ± 2,5 <sup>a</sup>	70,6 ± 3,6 <sup>b</sup>
Nitrogênio (N) (g Kg <sup>-1</sup> )	30,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	59,8 ± 1,8 <sup>b</sup>
Oxigênio (O) (g Kg <sup>-1</sup> )	625,5 ± 1,5 <sup>a</sup>	471,2 ± 14,3 <sup>b</sup>
<b>Relações</b>		
C/N	83,2 ± 6,0 <sup>a</sup>	56,5 ± 1,9 <sup>b</sup>
H/C	1,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,1 <sup>b</sup>
O/C	20,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	11,8 ± 0,6 <sup>b</sup>

AH: ácido húmico; VC: vermicomposto; LS: lodo de aterro sanitário. Valores expressos por média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente (Teste de Tukey;  $P < 0,05$ ).

**Tabela 2.** Quantificação de nutrientes nas soluções nutritivas, raízes e folhas de *Z. mays* para os tratamentos com diferentes concentrações de ácidos húmicos (AH) provenientes de vermicomposto (VC) e de lodo de aterro sanitário (LS).

	Elementos										
	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B
<b>Solução nutritiva (Inicial) (mg/L)</b>											
Controle negativo	2,51 ± 0,11 <sup>a,b</sup>	0,01 ± 0,00 <sup>a</sup>	66,0 ± 1,1 <sup>a</sup>	44,0 ± 0,4 <sup>b</sup>	10,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	8,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>b</sup>
AH-VC (2 mM C L <sup>-1</sup> )	2,42 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>	70,8 ± 1,1 <sup>b</sup>	42,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	9,6 ± 0,4 <sup>a</sup>	8,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,02 <sup>a,b</sup>
AH-LS (0,5 mM C L <sup>-1</sup> )	2,82 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>	65,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	43,7 ± 0,3 <sup>b</sup>	10,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,8 ± 0,7 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>b</sup>
AH-LS (1 mM C L <sup>-1</sup> )	2,79 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>	66,2 ± 0,8 <sup>a</sup>	44,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	10,6 ± 0,4 <sup>a</sup>	8,6 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>b</sup>
AH-LS (2 mM C L <sup>-1</sup> )	3,55 ± 0,13 <sup>c</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>	65,4 ± 0,7 <sup>a</sup>	43,9 ± 0,2 <sup>b</sup>	10,5 ± 0,6 <sup>a</sup>	8,1 ± 0,6 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>a</sup>
AH-LS (4 mM C L <sup>-1</sup> )	8,01 ± 0,18 <sup>d</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>	65,9 ± 0,8 <sup>a</sup>	46,5 ± 0,2 <sup>c</sup>	10,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,8 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>a,b</sup>
<b>Solução nutritiva (Final) (mg/L)</b>											
Controle negativo	1,52 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	37,3 ± 1,2 <sup>d</sup>	1,4 ± 0,5 <sup>b</sup>	7,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	0,23 ± 0,02 <sup>a,b</sup>	0,01 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>a</sup>
AH-VC (2 mM C L <sup>-1</sup> )	1,40 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	28,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	6,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,01 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>a,b</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>b</sup>
AH-LS (0,5 mM C L <sup>-1</sup> )	1,75 ± 0,01 <sup>a,b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	34,1 ± 0,9 <sup>b,c</sup>	0,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	6,5 ± 0,7 <sup>a,b</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>a,b</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>a,b</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>a,b</sup>
AH-LS (1 mM C L <sup>-1</sup> )	1,75 ± 0,00 <sup>a,b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	35,6 ± 0,7 <sup>c,d</sup>	0,8 ± 0,3 <sup>a,b</sup>	7,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>a,b,c</sup>	0,00 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>a,b</sup>	0,01 ± 0,00 <sup>a,b</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>a,b</sup>
AH-LS (2 mM C L <sup>-1</sup> )	2,18 ± 0,24 <sup>b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	32,6 ± 1,2 <sup>b</sup>	1,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	6,9 ± 0,3 <sup>a,b</sup>	0,26 ± 0,03 <sup>b,c</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>a,b</sup>	0,00 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>a,b</sup>
AH-LS (4 mM C L <sup>-1</sup> )	3,47 ± 0,35 <sup>c</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	29,6 ± 0,9 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,0 <sup>a</sup>	6,8 ± 0,2 <sup>a,b</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>b,c</sup>	0,01 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>a,b</sup>
<b>Raiz (g/Kg)</b>											
Controle negativo	20,8 ± 1,7 <sup>b</sup>	3,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	9,1 ± 2,1 <sup>a</sup>	8 ± 1 <sup>a</sup>	6,9 ± 0,9 <sup>a</sup>	6,3 ± 0,5 <sup>a,b</sup>	205 ± 5 <sup>a</sup>	19,0 ± 6,6 <sup>a</sup>	63 ± 23 <sup>a</sup>	205 ± 57 <sup>a</sup>	88 ± 44 <sup>a</sup>
AH-VC (2 mM C L <sup>-1</sup> )	22,9 ± 1,3 <sup>b</sup>	3,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	8,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	8 ± 2 <sup>a</sup>	6,5 ± 0,6 <sup>a</sup>	6,3 ± 0,5 <sup>a,b</sup>	163 ± 36 <sup>a</sup>	15,3 ± 5,0 <sup>a</sup>	96 ± 8 <sup>a</sup>	176 ± 39 <sup>a</sup>	102 ± 25 <sup>a</sup>
AH-LS (0,5 mM C L <sup>-1</sup> )	17,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	6,3 ± 1,7 <sup>a</sup>	9 ± 2 <sup>a</sup>	6,2 ± 0,8 <sup>a</sup>	6,1 ± 0,6 <sup>a</sup>	148 ± 21 <sup>a</sup>	21,3 ± 6,1 <sup>a</sup>	99 ± 12 <sup>a</sup>	187 ± 24 <sup>a</sup>	88 ± 32 <sup>a</sup>
AH-LS (1 mM C L <sup>-1</sup> )	22,3 ± 1,3 <sup>b</sup>	3,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	7,9 ± 1,9 <sup>a</sup>	10 ± 2 <sup>a</sup>	7,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	8,0 ± 0,9 <sup>b</sup>	139 ± 45 <sup>a</sup>	16,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	77 ± 23 <sup>a</sup>	155 ± 8 <sup>a</sup>	65 ± 19 <sup>a</sup>
AH-LS (2 mM C L <sup>-1</sup> )	22,0 ± 0,7 <sup>b</sup>	3,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	7,4 ± 1,5 <sup>a</sup>	10 ± 2 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,8 <sup>a,b</sup>	144 ± 21 <sup>a</sup>	16,0 ± 4,0 <sup>a</sup>	63 ± 10 <sup>a</sup>	149 ± 40 <sup>a</sup>	92 ± 43 <sup>a</sup>
AH-LS (4 mM C L <sup>-1</sup> )	23,7 ± 0,8 <sup>b</sup>	3,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	6,6 ± 1,5 <sup>a</sup>	10 ± 1 <sup>a</sup>	6,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,5 <sup>a,b</sup>	121 ± 38 <sup>a</sup>	16,7 ± 1,2 <sup>a</sup>	65 ± 5 <sup>a</sup>	164 ± 41 <sup>a</sup>	107 ± 29 <sup>a</sup>

	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B
<b>Folha (g/Kg)</b>											
Controle negativo	36,3 ± 1,3 <sup>a</sup>	3,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	47,8 ± 1,3 <sup>a</sup>	7,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,05 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,90 ± 0,11 <sup>a</sup>	85 ± 6 <sup>a</sup>	22,0 ± 2,0 <sup>b</sup>	83 ± 9 <sup>a</sup>	71 ± 5 <sup>c</sup>	62 ± 3 <sup>b</sup>
AH-VC (2 mM C L <sup>-1</sup> )	30,5 ± 5,5 <sup>a</sup>	5,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	49,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,08 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,86 ± 0,72 <sup>a</sup>	91 ± 5 <sup>a</sup>	18,0 ± 3,5 <sup>a,b</sup>	91 ± 11 <sup>a</sup>	43 ± 6 <sup>a</sup>	48 ± 5 <sup>a,b</sup>
AH-LS (0,5 mM C L <sup>-1</sup> )	39,0 ± 0,6 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	49,0 ± 2,7 <sup>a</sup>	7,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,54 ± 0,13 <sup>a</sup>	2,15 ± 0,14 <sup>a</sup>	88 ± 3 <sup>a</sup>	22,0 ± 2,0 <sup>b</sup>	93 ± 3 <sup>a</sup>	62 ± 3 <sup>b,c</sup>	58 ± 13 <sup>a,b</sup>
AH-LS (1 mM C L <sup>-1</sup> )	39,0 ± 2,3 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	43,4 ± 5,8 <sup>a</sup>	7,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,44 ± 0,22 <sup>a</sup>	2,13 ± 0,04 <sup>a</sup>	85 ± 5 <sup>a</sup>	20,0 ± 0,1 <sup>a,b</sup>	91 ± 10 <sup>a</sup>	57 ± 6 <sup>a,b,c</sup>	38 ± 12 <sup>a</sup>
AH-LS (2 mM C L <sup>-1</sup> )	38,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	3,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	39,8 ± 4,0 <sup>a</sup>	7,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	4,54 ± 0,33 <sup>a</sup>	1,89 ± 0,17 <sup>a</sup>	81 ± 3 <sup>a</sup>	16,7 ± 1,2 <sup>a,b</sup>	71 ± 4 <sup>a</sup>	51 ± 2 <sup>a,b</sup>	48 ± 7 <sup>a,b</sup>
AH-LS (4 mM C L <sup>-1</sup> )	33,9 ± 8,3 <sup>a</sup>	3,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	38,1 ± 12,0 <sup>a</sup>	7,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,51 ± 0,08 <sup>a</sup>	2,15 ± 0,07 <sup>a</sup>	79 ± 5 <sup>a</sup>	16,0 ± 2,0 <sup>a</sup>	73 ± 12 <sup>a</sup>	55 ± 10 <sup>a,b,c</sup>	41 ± 4 <sup>a,b</sup>
<b>Taxa de absorção</b>											
Controle negativo	0,39 ± 0,10 <sup>a</sup>	1 ± 0 <sup>a</sup>	1 ± 0 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,87 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,74 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,10 ± 0,08 <sup>b</sup>
AH-VC (2 mM C L <sup>-1</sup> )	0,42 ± 0,05 <sup>a,b</sup>	1 ± 0 <sup>a</sup>	1 ± 0 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,94 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,26 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,27 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,38 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
AH-LS (0,5 mM C L <sup>-1</sup> )	0,38 ± 0,02 <sup>a</sup>	1 ± 0 <sup>a</sup>	1 ± 0 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,02 <sup>b,c</sup>	0,95 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,67 ± 0,29 <sup>a</sup>	0,43 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,97 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,05 ± 0,04 <sup>b</sup>
AH-LS (1 mM C L <sup>-1</sup> )	0,37 ± 0,01 <sup>a</sup>	1 ± 0 <sup>a</sup>	1 ± 0 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>a,b</sup>	0,93 ± 0,02 <sup>a,b</sup>	0,15 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,29 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
AH-LS (2 mM C L <sup>-1</sup> )	0,38 ± 0,08 <sup>a</sup>	1 ± 0 <sup>a</sup>	1 ± 0 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,86 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,25 <sup>a</sup>	0,51 ± 0,22 <sup>a</sup>	0,98 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
AH-LS (4 mM C L <sup>-1</sup> )	0,57 ± 0,05 <sup>b</sup>	1 ± 0 <sup>a</sup>	1 ± 0 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,98 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,14 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
<b>Fator de bioconcentração</b>											
Controle negativo	8,31 ± 0,94 <sup>c</sup>	335 ± 67 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,66 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,04 <sup>a</sup>	649 ± 39 <sup>b</sup>	644 ± 171 <sup>a</sup>	1639 ± 625 <sup>a,b</sup>	974 ± 255 <sup>a</sup>	641 ± 301 <sup>a</sup>
AH-VC (2 mM C L <sup>-1</sup> )	9,55 ± 1,33 <sup>c</sup>	231 ± 90 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,06 <sup>a</sup>	486 ± 75 <sup>a,b</sup>	567 ± 88 <sup>a</sup>	2689 ± 681 <sup>b</sup>	6233 ± 4136 <sup>b</sup>	803 ± 177 <sup>a</sup>
AH-LS (0,5 mM C L <sup>-1</sup> )	6,25 ± 0,19 <sup>b</sup>	229 ± 86 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,06 <sup>a</sup>	486 ± 54 <sup>a,b</sup>	1333 ± 306 <sup>b</sup>	2160 ± 440 <sup>a,b</sup>	860 ± 92 <sup>a</sup>	637 ± 255 <sup>a</sup>
AH-LS (1 mM C L <sup>-1</sup> )	7,97 ± 0,49 <sup>b,c</sup>	215 ± 111 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,69 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,93 ± 0,08 <sup>a</sup>	448 ± 126 <sup>a,b</sup>	622 ± 154 <sup>a</sup>	1647 ± 382 <sup>a,b</sup>	737 ± 29 <sup>a</sup>	463 ± 134 <sup>a</sup>
AH-LS (2 mM C L <sup>-1</sup> )	6,19 ± 0,38 <sup>b</sup>	219 ± 85 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,86 ± 0,11 <sup>a</sup>	464 ± 85 <sup>a,b</sup>	889 ± 278 <sup>a,b</sup>	1269 ± 189 <sup>a</sup>	718 ± 227 <sup>a</sup>	852 ± 372 <sup>a</sup>
AH-LS (4 mM C L <sup>-1</sup> )	2,95 ± 0,03 <sup>a</sup>	200 ± 117 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,59 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,89 ± 0,11 <sup>a</sup>	372 ± 103 <sup>a</sup>	644 ± 139 <sup>a</sup>	1400 ± 92 <sup>a</sup>	819 ± 195 <sup>a</sup>	817 ± 197 <sup>a</sup>
<b>Fator de translocação</b>											
Controle negativo	1,76 ± 0,20 <sup>a,b</sup>	1,19 ± 0,26 <sup>a,b</sup>	5,4 ± 1,1 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,59 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,29 ± 0,61 <sup>a</sup>	1,43 ± 0,50 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,37 <sup>a</sup>
AH-VC (2 mM C L <sup>-1</sup> )	1,34 ± 0,31 <sup>a</sup>	1,53 ± 0,01 <sup>b</sup>	6,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,63 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,32 ± 0,65 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,49 ± 0,11 <sup>a</sup>
AH-LS (0,5 mM C L <sup>-1</sup> )	2,21 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,14 ± 0,06 <sup>a</sup>	8,2 ± 2,4 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,74 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,08 ± 0,25 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,69 ± 0,13 <sup>a</sup>
AH-LS (1 mM C L <sup>-1</sup> )	1,75 ± 0,03 <sup>a,b</sup>	1,11 ± 0,07 <sup>a</sup>	5,6 ± 0,7 <sup>a</sup>	0,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,30 <sup>a</sup>	1,25 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,27 ± 0,44 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,23 <sup>a</sup>
AH-LS (2 mM C L <sup>-1</sup> )	1,74 ± 0,07 <sup>a,b</sup>	1,14 ± 0,07 <sup>a</sup>	5,5 ± 1,2 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,09 ± 0,27 <sup>a</sup>	1,16 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,25 <sup>a</sup>
AH-LS (4 mM C L <sup>-1</sup> )	1,44 ± 0,37 <sup>a</sup>	1,18 ± 0,11 <sup>a</sup>	6,1 ± 2,4 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,30 <sup>a</sup>	0,97 ± 0,18 <sup>a</sup>	1,13 ± 0,23 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,10 <sup>a</sup>

Valores expressos por média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente (Teste de Tukey;  $P < 0,05$ ).

**Tabela 3.** Teor de pigmentos fotossintéticos em *Z. mays* para os tratamentos com diferentes concentrações de ácidos húmicos (AH) provenientes de vermicomposto (VC) e de lodo de aterro sanitário (LS).

	Tratamentos					
	Controle negativo	AH – VC (2 mM C L <sup>-1</sup> )	AH – LS (0,5 M C L <sup>-1</sup> )	AH – LS (1 mM C L <sup>-1</sup> )	AH – LS (2 mM C L <sup>-1</sup> )	AH – LS (4 mM C L <sup>-1</sup> )
SPAD	29 ± 2 <sup>a</sup>	29 ± 1 <sup>a</sup>	30 ± 2 <sup>a</sup>	30 ± 2 <sup>a</sup>	30 ± 1 <sup>a</sup>	30 ± 2 <sup>a</sup>
Clorofila <i>a</i> (mg g <sup>-1</sup> )	31 ± 4 <sup>a,b</sup>	41 ± 14 <sup>c</sup>	39 ± 11 <sup>b,c</sup>	29 ± 6 <sup>a</sup>	28 ± 6 <sup>a</sup>	31 ± 4 <sup>a</sup>
Clorofila <i>b</i> (mg g <sup>-1</sup> )	5,8 ± 0,9 <sup>a,b,c</sup>	7,2 ± 2,3 <sup>c</sup>	6,8 ± 1,8 <sup>b,c</sup>	5,1 ± 1,2 <sup>a</sup>	5,4 ± 1,5 <sup>a,b</sup>	5,7 ± 1,0 <sup>a,b,c</sup>
Clorofila total (mg g <sup>-1</sup> )	50 ± 6 <sup>a,b</sup>	67 ± 23 <sup>c</sup>	64 ± 18 <sup>b,c</sup>	47 ± 10 <sup>a</sup>	46 ± 10 <sup>a</sup>	50 ± 6 <sup>a</sup>
Carotenóides (mg g <sup>-1</sup> )	26 ± 4 <sup>a,b</sup>	39 ± 20 <sup>c</sup>	34 ± 15 <sup>b,c</sup>	22 ± 7 <sup>a</sup>	22 ± 8 <sup>a</sup>	24 ± 5 <sup>a,b</sup>
Clr, <i>a</i> / Clr, <i>b</i>	5,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,7 ± 0,3 <sup>a,b</sup>	5,8 ± 0,3 <sup>b</sup>	5,7 ± 0,4 <sup>a,b</sup>	5,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	5,4 ± 0,5 <sup>a,b</sup>
Clr, total/ Carot,	2,0 ± 0,2 <sup>a,b</sup>	1,9 ± 0,4 <sup>a</sup>	2 ± 0,3 <sup>a,b</sup>	2,2 ± 0,2 <sup>b</sup>	2,2 ± 0,3 <sup>a,b</sup>	2,1 ± 0,2 <sup>a,b</sup>

Valores expressos por média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente (Teste de Tukey; *P* <0,05).

**Tabela 4.** Resultado da análise de crescimento de *Z. mays* para os tratamentos com diferentes concentrações de ácidos húmicos (AH) provenientes de vermicomposto (VC) e de lodo de aterro sanitário (LS).

	Tratamentos					
	Controle negativo	AH – VC (2 mM C L <sup>-1</sup> )	AH – LS (0,5 mM C L <sup>-1</sup> )	AH – LS (1 mM C L <sup>-1</sup> )	AH – LS (2 mM C L <sup>-1</sup> )	AH – LS (4 mM C L <sup>-1</sup> )
Altura (cm)	24 ± 2 <sup>a,b</sup>	23 ± 2 <sup>a</sup>	25 ± 2 <sup>b,c</sup>	24 ± 1 <sup>a,b</sup>	27 ± 2 <sup>c</sup>	26 ± 2 <sup>c</sup>
CR (cm)	41 ± 6 <sup>a</sup>	41 ± 6 <sup>a</sup>	39 ± 6 <sup>a</sup>	40 ± 4 <sup>a</sup>	42 ± 4 <sup>a</sup>	42 ± 5 <sup>a</sup>
AF (cm <sup>2</sup> )	49 ± 4 <sup>b</sup>	42 ± 5 <sup>a</sup>	46 ± 4 <sup>a,b</sup>	46 ± 5 <sup>a,b</sup>	55 ± 8 <sup>c</sup>	49 ± 6 <sup>b</sup>
AR (cm <sup>2</sup> )	9 ± 2 <sup>a</sup>	11 ± 3 <sup>b,c</sup>	9 ± 1 <sup>a</sup>	10 ± 2 <sup>a,b</sup>	11 ± 2 <sup>b,c</sup>	12 ± 2 <sup>c</sup>
NF	3,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	3,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	3,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	3,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	3,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,5 <sup>a</sup>
AF/ NF (cm <sup>2</sup> )	15 ± 2 <sup>b</sup>	13 ± 1 <sup>a</sup>	15 ± 1 <sup>b,c</sup>	15 ± 2 <sup>b</sup>	17 ± 3 <sup>c</sup>	14 ± 1 <sup>a,b</sup>
MSR/ MSPA (g)	0,45 ± 0,05 <sup>c</sup>	0,40 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,33 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,05 <sup>a,b</sup>	0,35 ± 0,04 <sup>a,b</sup>	0,36 ± 0,04 <sup>a,b</sup>
AF/MSPA (cm <sup>2</sup> g)	4,6 ± 0,4 <sup>b,c</sup>	4,4 ± 0,2 <sup>a,b</sup>	4,9 ± 0,5 <sup>c</sup>	4,6 ± 0,2 <sup>b</sup>	4,6 ± 0,3 <sup>b,c</sup>	4,2 ± 0,2 <sup>a</sup>
AR/ MSR (cm <sup>2</sup> g)	2,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,0 ± 0,4 <sup>b</sup>	2,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,7 ± 0,2 <sup>c</sup>	2,7 ± 0,2 <sup>b</sup>
AF/MST (cm <sup>2</sup> g)	319 ± 27 <sup>a,b</sup>	315 ± 13 <sup>a,b</sup>	370 ± 34 <sup>d</sup>	333 ± 12 <sup>b,c</sup>	344 ± 16 <sup>c</sup>	302 ± 21 <sup>a</sup>
CR/ MSR (cm g)	994 ± 231 <sup>a</sup>	1092 ± 139 <sup>a,b</sup>	1225 ± 162 <sup>b</sup>	1079 ± 150 <sup>a,b</sup>	1056 ± 209 <sup>a,b</sup>	914 ± 130 <sup>a</sup>
MSPA/ MST (g)	0,69 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,75 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,73 ± 0,03 <sup>b,c</sup>	0,74 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,74 ± 0,02 <sup>b,c</sup>
MSR/ MST (g)	0,31 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,28 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,25 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,03 <sup>a,b</sup>	0,26 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,02 <sup>a,b</sup>

CR: comprimento da raiz; AF: área foliar; AR: área radicular; MSR: massa seca radicular; MSPA: massa seca da parte aérea; MFPA: massa fresca da parte aérea; MST: massa seca total. Valores expressos por média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente (Teste de Tukey;  $P < 0,05$ ).

**Tabela 5.** Análises anatômicas em *Z. mays* para os tratamentos com diferentes concentrações de ácidos húmicos (AH) provenientes de vermicomposto (VC) e de lodo de aterro sanitário (LS).

	Tratamentos					
	Controle negativo	AH – VC (2 mM C L <sup>-1</sup> )	AH – LS (0,5 M C L <sup>-1</sup> )	AH – LS (1 mM C L <sup>-1</sup> )	AH – LS (2 mM C L <sup>-1</sup> )	AH – LS (4 mM C L <sup>-1</sup> )
Espessura da raiz (mm)	641 ± 31 <sup>a</sup>	642 ± 51 <sup>a</sup>	615 ± 44 <sup>a</sup>	615 ± 28 <sup>a</sup>	658 ± 51 <sup>a</sup>	619 ± 48 <sup>a</sup>
Espessura da epiderme (mm)	26 ± 1 <sup>b</sup>	28 ± 3 <sup>a,b,c</sup>	28 ± 3 <sup>a,b</sup>	31 ± 3 <sup>c</sup>	30 ± 2 <sup>b,c</sup>	28 ± 2 <sup>a,b</sup>
Espessura do córtex (mm)	330 ± 24 <sup>a,b</sup>	345 ± 37 <sup>b</sup>	322 ± 27 <sup>a,b</sup>	317 ± 21 <sup>a,b</sup>	341 ± 32 <sup>a,b</sup>	313 ± 31 <sup>a</sup>
Diâmetro do cilindro vascular (mm)	570 ± 27 <sup>b,c</sup>	538 ± 32 <sup>a,b,c</sup>	529 ± 40 <sup>a,b</sup>	535 ± 27 <sup>a,b</sup>	575 ± 48 <sup>c</sup>	557 ± 37 <sup>a,b,c</sup>
Espessura de suberização (mm)	97 ± 23 <sup>a</sup>	113 ± 20 <sup>a</sup>	98 ± 11 <sup>a</sup>	90 ± 24 <sup>a</sup>	109 ± 34 <sup>a</sup>	107 ± 29 <sup>a</sup>
Nº de vasos do metaxilema	5,6 ± 0,4 <sup>a</sup>	5,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	5,9 ± 0,7 <sup>a</sup>	5,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	5,5 ± 1,0 <sup>a</sup>	5,6 ± 0,9 <sup>a</sup>
Razão córtex/ cilindro vascular	1,7 ± 0,1 <sup>b,c</sup>	1,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,6 ± 0,1 <sup>a,b</sup>	1,7 ± 0,1 <sup>a,b,c</sup>	1,7 ± 0,2 <sup>a,b,c</sup>	1,8 ± 0,1 <sup>c</sup>
Densidade estomática (mm <sup>2</sup> )	13,0 ± 1,7 <sup>a,b</sup>	14,1 ± 0,9 <sup>b</sup>	13,0 ± 1,0 <sup>a,b</sup>	13,0 ± 1,6 <sup>a,b</sup>	12,9 ± 1,4 <sup>a,b</sup>	12,5 ± 1,0 <sup>a</sup>

Valores expressos por média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente (Teste de Tukey;  $P < 0,05$ ).



## 7 CONCLUSÕES GERAIS

As evidências experimentais obtidas nesse estudo permitiram aceitar as hipóteses formuladas nesta dissertação. A partir dos resultados as principais conclusões que puderam ser obtidas foram:

- 1) Os AH provenientes de aterro sanitário apresentaram elevados teores de carbono e nitrogênio, podendo constituir uma importante fonte de nutrientes para as plantas;
- 2) A ausência de metais contaminantes nas soluções nutritivas com adição de AH oriundos de aterro sanitário sugerem a possibilidade de utilização agrícola do composto;
- 3) Os AH afetam a atividade de diversas enzimas antioxidantes e promovem aumentos expressivos na atividade das ATPases;
- 4) Os AH testados promovem alterações citogenéticas, verificada por meio de alterações nucleares nas células meristemáticas e de micronúcleos nas células diferenciadas (F<sub>1</sub>);
- 5) Os AH afetam as taxas de absorção, bioconcentração e translocação de alguns nutrientes de forma mais expressiva na raiz do que na parte aérea das plantas;
- 6) O teor de pigmentos não foi afetado pelas dosagens de AH oriundos de lodo de aterro sanitário testadas;
- 7) Os AH afetam as medidas de crescimento das plantas, sendo os resultados mais expressivos notados na área radicular e na altura. Além disso, os AH promovem o desenvolvimento da parte aérea da planta, fato possivelmente associado com a melhor eficiência do sistema radicular;
- 8) Os tratamentos com AH promovem alterações na espessura da epiderme de *Z. mays*, fato provavelmente associado a alterações no mecanismo de proteção da planta.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADANI, F.; TAMBONE, F.; DAVOLI, E.; SCAGLIA, B. Surfactant properties and tetrachloroethene (PCE) solubilisation ability of humic acid-like substances extracted from maize plant and from organic wastes: A comparative study. **Chemosphere**, v. 78, p. 1017-1022, 2010.

ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals - Concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, p. 869-881, 2013.

ANDREOLI, C. V.; PEGORINI, E. S. Gestão Pública do Uso Agrícola do Lodo de Esgoto. In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A (eds.). **Impacto Ambiental do Uso Agrícola do Lodo de Esgoto**. Jaquariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.

ARGENTA, G.; SILVA, P. R. F.; BORTOLINI, C. G.; FORSTHOFER, E. L.; STRIEDER, M. L. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 158-167, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 8849: Apresentação de Projetos de aterros controlados de resíduos sólidos urbanos**. Procedimento. Rio de Janeiro: ABNT, 1985.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 10007: Amostragem de resíduos sólidos**. Rio de Janeiro: ABNT, 2004.

ATMACA, E. Treatment of landfill leachate by using electro-Fenton method. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, p.109-114, 2009

AYUSO, M.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C.; PASCUAL, J. A. Stimulation of barley growth and nutrient absorption by humic substances originating from various organic materials. **Bioresource and Technology**, v. 57 n. 3, p. 251-257, 1996.

AZEVEDO-NETO, A. D.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J. T. Salinity and oxidative stress. In: KHAN, N. A.; SINGH, S (eds.). **Abiotic stress and plant responses**. New Delhi: I.K. International, p.57-82, 2008.

BADERNA, D.; MAGGIONI, S.; BORIANI, E.; GEMMA, S.; MOLTENI, M.; LOMBARDO, A.; COLOMBO, A.; BORDONALI, S.; ROTELLA, G.; LODI, M.; BENFENATI, E. A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: Chemical analyses, risk assessment and *in vitro* assays. **Environmental Research**, v. 111, p. 603-613, 2011.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas**. Jaboticabal: FUNEP, p.43, 1988.

BEUTLER, E. The preparation of red cells for assay. In: BEUTLER, E (ed.). **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. New York: Grune & Stratton, p. 8-18, 1976.

BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E. L. G.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 826-833, 2011.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução CONAMA Nº 375/2006, de 29 de agosto de 2006**. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. Brasília, 2006.

BOTTOMLEY, W. B. Some effects of organic-promotion substances (auxinones) on the growth of *Lema minor* in mineral cultural solutions. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 89, p. 481-507, 1917.

BUKATSCH, F. Bermerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos**, v. 61, p. 255, 1972.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; FAÇANHA, A. L. O.; FAÇANHA, A. R. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in maize roots. **Plant Physiology**, v. 130, n.1951-1957, 2002.

CANELLAS, L. P.; PICCOLO, A.; DOBBSS, L. B.; SPACCINI, R.; OLIVARES, F. L.; ZANDONADI, D. B.; FAÇANHA, A. R. Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. **Chemosphere**, v. 78, p. 457-466, 2010.

CANELLAS, L. P.; DOBBSS, L. B.; OLIVEIRA, A. L.; CHAGAS, J. G.; AGUIAR, N. O.; RUMJANEKC, 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**, v. 63, p. 315-324, 2012.

CARDOSO, M. J.; FONTES, L. A. N.; LOPES, N. F.; GALVÃO, J. D. Partição de assimilados e produção de matéria seca de milho em dois sistemas de associação com feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Ceres**, v. 34, n. 191, p. 71-89, 1987.

CARDOSO, G. D.; ALVES, P. L. C. A.; BELTRÃO, N. E. M.; BARRETO, A. F. Uso da análise de crescimento não destrutiva como ferramenta para avaliação de cultivares de mamoneira. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, v. 6, n. 2, p. 79-84, 2006.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v.72, p. 722-725, 2008.

CARRILLO, N.; VALLE, E. M. El lado oscuro del oxígeno. **Revista de la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal**, v. 2, n. 2, 2005.

CATANEO, A. C.; CHAMMA, K. L.; FERREIRA, L. C. DÉSTRO, G. F. G.; CARVALHO, J. C.; NOVELLI, E. L. B. Glutathione S Glutathione S- -- -transferase activity in acetochlor, atrazine and transferase activity in acetochlor, atrazine and oxyfluorfen metabolization in maize (*Zea mays* L.), sorghum (*Sorghum bicolor* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) (Poaceae). **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p. 619-623, 2002.

CELERE, M. S.; OLIVEIRA, A. S.; TREVILATO, T. M. B.; SEGURA-MUNOZ, S. I. Metais presentes no chorume coletado no aterro sanitário de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, e sua relevância para saúde pública. **Caderno Saúde Pública**, v. 23, n. 4, p. 939-947, 2007.

CHEN, J.; GU, B.; ROYER, R. A.; BURGOS, W. D. The roles of natural organic matter in chemical and microbial reduction of ferric ion. **Science of Total Environment**, v. 307, p. 167-178, 2003.

CHRISTENSEN, T. H.; KJELDSSEN, P.; BJERG, P. L.; JENSEN, D. L.; CHRISTENSEN, J. B.; BAUN, A.; ALBRECHTSEN, H.; HERON, G. Biogeochemistry of landfill leachate plumes. **Applied Geochemistry**, v. 16, p. 659-718, 2001.

CONCEIÇÃO, M. K.; LOPES, N. F.; FORTES, G. R.L. Análise de crescimento de plantas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) LAM) cultivares abóbora e da costa. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 11, n. 3, p. 273-278, 2005.

CORDEIRO, F. C.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; 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, n. 1, 70-74, 2011.

CRUZ; S. C. S., PEREIRA; F. R. S., SANTOS; J. R., ALBUQUERQUE; A. W., SILVA; E. T. Parcelamento da adubação nitrogenada na cultura do milho irrigado em sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, p. 370-375, 2008.

DI RIENZO, J. A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M. G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C. W. InfoStat versión 2010. **Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina**, 2010.

DOBBSS, L. B.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; AGUIAR, N. O.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, M. SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; FAÇANHA, A. R. Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, p. 3681-3688, 2010.

D'ORAZIO, V.; SENESI, N. Spectroscopic properties of humic acids isolated from the rhizosphere and bulk soil compartments and fractionated by size-exclusion chromatography. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p.1775-1781, 2009.

EGITO, L. C. M.; MEDEIROS, M. G.; MEDEIROS, S. R. B.; AGNEZ-LIMA, L. F. Cytotoxic and genotoxic potencial os surface water from the Pitimbu river,northeastern/RN Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 425-441, 2007.

FATIMA, R. A.; AHMAD, M. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 346, p. 256-273, 2005.

FATIMA, R. A.; AHMAD, M. Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: A comparison of three bioassays. **Mutation Research**, v. 609, p. 81-91, 2006.

FERNANDES, T. C.; MAZZEO, D. E.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent - Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1680-1686, 2009.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring, **Hereditas**, v.102, p. 99-112, 1985.

FLAIG, W. **Uptake of organic substances from soil organic matter by plants, study week on organic matter and soil fertility**. New York: Wiley-Interscience, 1968, p.723-776.

FOREMAN, J.; DEMIDCHIK, V.; BOTHWELL, J. H. F.; MYLONA, P.; MIEDEMA, H.; TORRESK, M.A.; LINSTED, P.; COSTA, S.; BROWNLEE, C.; JONATHAN, D.; JONESK, G.; DAVIES, J. M.; DOLAN, L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. **Nature**, v. 422, p. 442-445, 2003.

FOYER, C. H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K. J. Photooxidative stress in plants. **Acta Physiology Plant**, v. 92, p. 696-717, 1994.

GALLAGHER, E. P.; CANADÁ, A. T.; DI GIULIO, R. T. The protective role of glutathione in chlorothanil - induced toxicity to channel catfish. **Aquatic Toxicology**, v. 23, p.155-168, 1992.

GARCIA-MINA, J. M.; ANTOLIN, M. C.; SANCHEZ-DIAZ, M. Metal-humic complexes and plant micronutrient uptake: a study based on different plant species cultivated in diverse soil types. **Plant and Soil**, v. 258, p. 57-68, 2004.

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. **Ecological Engineering**, v. 47, p. 203-208, 2012.

GIBBS, A.; SOMERO, G. N. Pressure adaptation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in gills of marine teleosts. **The Journal of Experimental Biology**, v. 143, p. 475-492, 1989.

GONDIM, A. R. O.; PRADO, R. M.; ALVES, A. U.; FONSECA, I. M. Eficiência nutricional do milho cv. BRS 1030 submetido à omissão de macronutrientes em solução nutritiva. **Revista Ceres**, v. 57, n. 4, p. 539-544, 2010.

GONZALEZ, R. J.; COOPER, J.; HEAD, D. Physiological responses to hyper-saline waters in sailfin mollies (*Poecilia latipinna*). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.142, p. 397-403. 2005.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the US Environmental Agency Gene - Toxicology Program. **Mutation Research**, v. 99, p. 273- 291, 1982.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v.310, p.175-185, 1994.

GRANT, W. F.; OWENS, E. T. *Zea mays* assays of chemical/radiation genotoxicity for the study of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 613, p.17-64, 2006.

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, n. 6, p. 481-494, 2005.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 398-405, 1981.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, p.1332-1334, 1979.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. California Agricultural Experiment Station, Berkeley, CA, USA, 1950, p.347.



HUNT, R. **Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis**. London: Edward Arnold Publishers, 1978, 80 p.

KONONOVA, M.M. **Matéria orgânica del suelo: su naturaleza, propiedades y métodos de investigación**. Barcelona: Oikos-Tou, 1982, 365p.

KREUZ, K.; TOMMASINI, R.; MARTINOIA, E. Old enzymes for a new job: Herbicide detoxification in plants. **Plant Physiology**, v. 111, p. 349-353, 1996.

KÜLTZ, D.; SOMERO, G. N. Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 198, p. 1883-1894, 1995.

LABANOWSKI, J.; PALLIER, V.; FEUILLADE-CATHALIFAUD, G. Study of organic matter during coagulation and electrocoagulation processes: Application to a stabilized landfill leachate. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, p. 166-172, 2010.

LEITE, C. M. B.; BERNARDES, R. S.; OLIVEIRA, S. A. Método Walkley-Black na determinação da matéria orgânica em solos contaminados por chorume. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, v. 8, n. 1, p.111-115, 2004.

LEME, D. M.; ANJELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v. 88, p. 214-219, 2008.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71-81, 2009.

LICHTENTHALER, H.K.; WELBURN, A. R. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, v.11, p. 591-

592, 1983.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação nutricional das plantas: princípios e aplicações.** Associação Brasileira para Pesquisa do Potássio e do Fósforo, Piracicaba, São Paulo, 319 p, 1997.

MATOS, A. T.; CARVALHO, A. L.; AZEVEDO, I. C. D. Viabilidade do aproveitamento agrícola de percolados de resíduos sólidos urbanos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, n. 4, p. 435-440, 2008.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MORAIS, J. L.; SIRTORI, C.; PERALTA-ZAMORA, P. G. Tratamento de chorume de aterro sanitário por fotocatalise heterogênea integrada a processo biológico convencional. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 20-23, 2006.

MORSOMME, P.; BOUTRY, M. The plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: structure, function and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v.1465, n.1-2, p. 1-16, 2000.

NAGASHIMA, L. A.; JÚNIOR, C. B., FUJIMURA, A. S.; RECANELLO, T. D. Caracterização do lodo gerado no tratamento de lixiviado de aterro sanitário com coagulante à base de tanino. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 29, n. 1, p. 37-50, 2010.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, p. 867-880, 1981.

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 y selvicoltureali**. Bologna: Patron, 1993, p. 67-78.

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; GESSA, C.; FERRARESE, L.; TRAINOTTI, L.; CASADORO, G. A low molecular weight humic fraction on nitrate uptake and protein synthesis in maize seedlings. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p. 415-419, 2000.

NARDI, S.; L'OSONI, M.; PIZZEGHELLO, D.; PROVENZANO, M. R.; CILENTI, A.; STURARO, A.; RELLA, R.; VIANELLO, A. Chemical characteristics and biological activity of organic substances extracted from soils by root exudates. **Soil Science Society of America Journal**, v. 369, p. 312-2019, 2005.

NOGUEIRA, O. L.; CONCEIÇÃO, H. E. O. Análise de crescimento de açazeiros em áreas de várzea do estuário amazônico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 11, p. 2167-2173, 2000.

PACHECO, J. R.; PERALTA-ZAMORA, P. G. Integração de processos físico-químicos e oxidativos avançados para remediação de percolado de aterro sanitário (chorume). **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 9, n.4, p. 306-311, 2004.

PALANIVELL, P.; SUSILAWATI, K.; AHMED, O. H.; MAJID, N. M. Compost and crude humic substances produced from selected wastes and their effects on *Zea mays* L. nutrient uptake and growth. **Scientific World Journal**, v. 2013, ID. 276235, 2013.

PICCOLO, A. The Supramolecular Structure of Humic Substances: A Novel Understanding of Humus Chemistry and Implications in Soil Science. **Advances in Agronomy**, v. 75, p. 57-134, 2002.

PINTON, R.; CESCO, S.; IACOLETTIG, G.; ASTOLFI, S.; VARANINI, Z. Modulation of NO<sub>3</sub>-uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. **Plant Soil**, v. 215, p.155-161.

PIZZEGHELLO, O.; NICOLINI, G.; NARDI, S. Hormone-like activity of humic substances in *Fagus sylvaticae* forests. **New Phytologist**, v. 151, p. 647-657, 2001.

QUAGGIOTTI, S.; RUPERTI, B.; PIZZEGHELLO, D.; FRANCIOSO, O.; TUGNOLI, V.; NARDI, S. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 803-813, 2004.

RIZHSKY, L.; LIANG, H.; MITTLER, R. The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n.40, p. 38921-38925, 2003.

ROCHA, A. C.; CANAL, E. C.; CAMPOSTRINI, E.; REIS, F. O.; CUZZUOL, G. R. F. Influence of chromium in *Laguncularia racemosa* (L). Gaertn f. physiology. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 21. n. 2, p. 87-94, 2009.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v.101, n. 1, p. 7-12, 1993.

SEGATTO, F. B.; BISOGNIN, D. A.; BENEDETTI, M.; COSTA, L. C.; RAMPELOTTO, M. V.; NICOLOSO, F. T. Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1597-1561, 2004.

SEVERINO, F. J.; CARVALHO, S. J. P.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Mutual Interferences among Corn Crop, Forage Species and Weeds under a Consortium System - Implications on Corn Crop (*Zea mays*). **Planta Daninha**, v. 23, p. 589-596, 2005.

SHARMA, B. D.; KAUL, H. N.; SINGH, M. Growth analysis of potato varieties in autumn in subtropical conditions. **New Botanist**, v. 20, n. 54, p. 55-64, 1993.

SIDDIQUI, A. H.; TABREZ, S.; AHMAD, M. Validation of plant based bioassays for the toxicity testing of Indian waters. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 179, p. 241-253, 2011.

SILVA, R. M.; JABLONSKI, A.; SIEWERDT, L.; SILVEIRA JÚNIOR, P. Crescimento da parte aérea e do sistema radicular do milho cultivado em solução nutritiva adicionada de substâncias húmicas. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 5, n. 2, p. 101-110, 1999.

SOARES, L. G. C.; SALGUEIRO, A. A.; GAZINEU, M. H. P. Educação ambiental aplicada aos resíduos sólidos na cidade de Olinda, Pernambuco - um estudo de caso. **Revista Ciências & Tecnologia**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2007.

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

TABREZ, S.; AHMAD, M. Oxidative stress-mediated genotoxicity of wastewaters collected from two different stations in northern India. **Mutation Research**, v. 726, p.15- 20, 2011.

TAN, K. H.; NOPAMORNBOI, V. Effect of different levels of humic acids on nutrient content and growth of corn (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, v.51, n. 2, p. 283-287, 1979.

TAN, K.H. **Humic Matter in Soil and the Environment: Principles and Controversies**. New York: Marcel Dekker, INC., 2003, 386 p.

TSUTIYA, M. T. Alternativas de disposição final de biossólidos. In: TSUTIYA, M. T.; COMPARINI, J. B.; SOBRINHO, P. A.; MELO, A. J; MARQUES, M. O. (Eds.) **Biossólido na agricultura**. São Paulo: SABESP, p.133-178, 2001.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Risk-Based Concentration Table**. Philadelphia PA. United States Environmental Protection Agency: Washington, DC, 2009.

VIDAKOVIC-CIFREK, Z.; PAVLICA, M.; REGULA, I.; PAPES, D. Cytogenetic damage in Shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry - high-density brines. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.43, p. 284-291, 2002.

VISSER, S. A. Surface active phenomena by humic substances of aquatic origin. **Revue des Sciences de l'Eau**, v. 1, p. 285-295, 1982.

WANG, C.; ZHANG, S. H.; WANG, P. F.; HOU, J.; ZHANG, W. J.; LI, W.; LIN; Z. P. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. **Chemosphere**, v. 75, n. 11, p. 1468-1476, 2009.

XIAOLI, C.; YONGXIA, H.; GUIXIANG, L.; XIN, Z.; YOUCAI, Z. Spectroscopic studies of the effect of aerobic conditions on the chemical characteristics of humic acid in landfill leachate and its implication for the environment. **Chemosphere**, v. 91, p.1058-1063, 2013.

YI, H.; SI, L. Vicia root-mirconucleus and sister chromatid exchange assays on the genotoxicity of selenium compounds. **Mutation Research: Genetic Toxicology Environment Mutagenic**, v. 630, p. 92-96, 2007.

WHITE, C. C.; VIERNES, H.; KREJSA, C. M.; BOTTA, D.; KAVABAGG, D. T. J. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 318, n. 175-180, 2003.