



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

LÍVIA DORSCH ROCHA

**ÁCIDO HÚMICO EXTRAÍDO DO LODO DE ESGOTO
SANITÁRIO E SEUS EFEITOS EM PLANTAS**

VITÓRIA

2014

LÍVIA DORSCH ROCHA

**ÁCIDOS HÚMICOS EXTRAÍDOS DO LODO DE ESGOTO
SANITÁRIO E SEUS EFEITOS EM PLANTAS**

Dissertação 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^a Dr^a Sílvia Tamie Matsumoto

Co-orientador: Prof Dr Leonardo Barros Dobbss

VITÓRIA

2014

LÍVIA DORSCH ROCHA

**ÁCIDOS HÚMICOS EXTRAÍDOS DO LODO DE ESGOTO
SANITÁRIO E SEUS EFEITOS 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 27 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. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol

Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal - UFES
Universidade Federal do Espírito Santo

Dr^a Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
UNESP
Examinador Externo

Dedico à minha família, professores, colegas e amigos.

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^a. 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 Lara), 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.

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

RESUMO

O lodo de esgoto possui alto teor de matéria orgânica porém, também estão presentes diferentes poluentes e patógenos. Desta forma, neste trabalho foi extraído ácido húmico (AH) o qual é um composto resultante do fracionamento de substâncias húmicas que compreendem um grupo de compostos de carbono gerados na decomposição de resíduos orgânicos que sofrem ressíntese formando o húmus. O ácido húmico promove diversos benefícios nos vegetais, como crescimento, alongação celular, tolerância a estresses e aumento da permeabilidade da membrana plasmática. Com base nestas características, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos citogenéticos (ensaio *Allium cepa*), fisiológicos, anatômicos e bioquímicos do ácido húmico do lodo de esgoto sanitário. Foi realizada caracterização elementar do material para a definição das doses. Após 20 dias de tratamento, foram realizadas coletas do material e, posteriormente, analisadas. A caracterização química do AH indicou-o como bom condicionador para culturas apresentando elevadas taxas de C, H e N. Não foi observado efeito de toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do AH. Foi verificado aumento expressivo de todos os pigmentos fotossintéticos vegetais nas concentrações mais altas (2 mM C L⁻¹ e 4 mM C L⁻¹). Houve aumento da expressão da ATPase em todos os tratamentos e das enzimas do estresse oxidativo (CAT, SOD, APX, GST) em diferentes concentrações. A integração destas análises permitiu concluir que o ácido húmico do lodo de esgoto pode ser utilizado como adubo orgânico, pois foi observado benefícios no vegetal tais como maior crescimento vegetal e aumento da atividade nas enzimas do estresse oxidativo.

Palavras-chave: ácido húmico; *Allium cepa*; crescimento vegetal; enzimas do estresse oxidativo; *Oryza sativa*.

ABSTRACT

The final disposal of sewage sludge has been presented as an environmental and public health problem. The sewage sludge is rich in organic matter but it also presents pollutants and pathogens. Thus, this work was extracted humic acid (HA) which is a compound resulting from the fractionation of humic substances that comprises a carbon group generated by the decomposition of organic waste that suffer resynthesis forming humus. Humic acid promotes many benefits in plants, such as growth cell elongation, stress tolerance, increased plasma membrane permeability. Based on these features, the present study aimed to evaluate the cytogenetic effects (*Allium cepa* test), physiological and biochemical in *Oryza sativa* culture treated with different concentrations of humic acids derived from sewage sludge. Elemental characterization of HA was performed to define the doses (0,5; 1, 2 e 4 mM C L⁻¹). After 20 days of treatment, samples of the material were taken and subsequently analyzed. The chemical characterization of HA indicated it as a good conditioner for cultures showing high rates of Carbon, Hydrogen and Nitrogen. No effect of toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of HA was observed. The results have shown significant increase of plant photosynthetic pigments on higher concentrations (2 mM C L⁻¹ and 4 mM C L⁻¹). In general the higher concentrations have presented more growth. Furthermore, there was an increase of ATPase expression in all treatments. And enzymes of oxidative stress increased relatively in different concentrations. By the integration of these analyzes it was possible conclude that the humic acid from sewage sludge can be used as organic fertilizer as observed by the plant benefits showed in this work. Moreover, HA offers a good alternative for the disposal of sewage sludge residue, recycling the organic matter.

Keywords: *Allium cepa*; humic acid; enzymes of oxidative stress; *Oryza sativa*; plant growth.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização química do lodo de esgoto bruto	74
Tabela 2. Caracterização elementar e nutricional do ácido húmico	76
Tabela 3. Avaliação citogenética de diferentes concentrações do ácido húmico	77
Tabela 4. Teor de pigmentos fotossintéticos em <i>O. sativa</i>	78
Tabela 5. Análise de crescimento e anatômica de <i>O. sativa</i>	79
Tabela 6. Análises bioquímicas realizadas em plântulas de <i>O. sativa</i>	80

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Lodo de esgoto sanitário	12
2.2 Ácido húmico extraído do lodo de esgoto sanitário	13
2.3 <i>Oryza sativa</i> como planta teste	15
2.4 Teste citogenético em <i>Allium cepa</i> L.....	16
2.5 Importância de análises fisiológicas e anatômicas	17
2.6 Biomarcadores bioquímicos.....	18
3 OBJETIVOS	21
4 METODOLOGIA	22
4.1 Coleta do lodo de esgoto	23
4.2 Extração dos ácidos húmicos	23
4.3 Determinação das dosagens utilizadas	23
4.4 Área de estudo	23
4.5 Condições experimentais	24
4.6 Análises de crescimento.....	26
4.7 Densidade estomática	26
4.8 Determinação do teor de pigmentos	26
4.9 Análises das atividades enzimáticas	27
4.10 Análises estatísticas	31
5 REFERÊNCIAS	32
6 RESULTADOS	42
Artigo 1: Efeito do ácido húmico de lodo de esgoto em <i>Oryza sativa</i> L. sobre aspecto fisiológico e bioquímico, e citogenético em <i>Allium cepa</i> L.	42

1 INTRODUÇÃO

Lodo de esgoto sanitário (LES) é definido como o resíduo gerado nos processos de tratamento de efluente sanitário, constituindo-se de uma fonte de matéria orgânica e de nutrientes com alto potencial de riscos à saúde pública e ao ambiente devido a chance de proliferação de vetores de moléstias e organismos nocivos (Resolução CONAMA 375/2006).

O Brasil produz, anualmente, cerca de 150 a 220 mil toneladas de matéria seca de LE (Pedroza, 2010) sendo que apenas 37,9% da população urbana têm seu esgoto devidamente coletado e tratado (SNIS, 2010).

Até a década de 60, a disposição final do lodo, resultante de sistemas de tratamento de efluentes, era feita em aterros sanitários. Mas, devido ao aumento na geração deste resíduo, tal alternativa passou a ser ineficaz do ponto de vista físico e ambiental (GEYER, 2001). Mundialmente, têm-se aplicado diferentes métodos de reaproveitamento deste material, variando conforme as características intrínsecas de cada caso.

O lodo de esgoto tem sido fortemente sugerido para a aplicação na agricultura como condicionador e fertilizante do solo pois apresenta em sua composição altos teores de matéria orgânica (BETTIOL e CAMARGO, 2006; LIMA et al., 2011). Entretanto, como o lodo pode conter elevadas concentrações de contaminantes, essa prática pode levar à adição direta de diversos patógenos e substâncias químicas não desejadas ao solo agriculturável e, conseqüentemente, na cadeia alimentar. Outro fator de preocupação é a composição variável do resíduo nas diferentes regiões e épocas do ano, dificultando o monitoramento dos contaminantes (SAITO, 2005).

A presença de elevada carga orgânica presente neste resíduo sólido permite a possibilidade de extração de substâncias húmicas do resíduo adicionalmente, a extração do ácido húmico para sua aplicação em solos agricultáveis. Os AH (ácidos húmicos) favorecem a agregação de complexos organominerais (OADES, 1984), contribuem para a solubilização de P (fósforo) e diminuição da energia de fixação nos óxidos (SANTOS, 1984) apresentam capacidade de adsorção de metais pesados (CANELLAS et al., 2002) e servem de forte poder tampão da solução do solo

(SIQUEIRA et al., 1990). Além de servir como reserva de nutrientes às plantas (STEVENSON, 1994) e portanto, podem fornecer estratégias para melhorar a qualidade do solo e restaurar sua sustentabilidade, que ao ser extraída dos resíduos, constitui uma forma de reutilização, representando uma alternativa para reciclagem agrícola.

A promoção do crescimento radicular pelas substâncias húmicas tem sido relacionada à sua concentração e origem e, ainda, com a espécie da planta utilizada (NARDI et al., 1996; DOBBSS et al., 2010). Os mecanismos fisiológicos responsáveis pela estimulação no crescimento vegetal incluem a formação de complexos mais solúveis com micronutrientes (CHEN et al., 2003) e a interação com constituintes enzimáticos da membrana plasmática de forma análoga à ação dos hormônios vegetais (CANELLAS et al., 2000).

Apesar das diversas vantagens, é necessário que a utilização de derivados residuais, provenientes de compostos com comprovada toxicidade, esteja relacionada a análises de impacto ambiental, de forma a detectar poluentes e sua possível periculosidade. Testes de toxicidade e genotoxicidade auxiliam nestas análises, avaliando o potencial tóxico de sedimentos (MOZETO et al., 2006), expondo plantas a várias concentrações de substâncias para avaliar a influência genética de cada interação.

Sistemas-testes vegetais têm sido empregados na avaliação de impactos ambientais sobre os sistemas biológicos (HOSHINA, 2009). Dentre eles, o *Allium cepa* L. (Liliaceae) tem se mostrado eficaz pela sua sensibilidade e confiabilidade na avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico de substâncias químicas por meio das alterações na atividade mitótica e aberrações cromossômicas em células meristemáticas de suas raízes (SIDDIQUI et al., 2011).

A utilização de resíduos em cultivos vegetais deve ser acompanhada de análises do crescimento da planta. Tais análises podem incluir na atividade de enzimas do estresse oxidativo pois uma modificação direta da expressão delas pode estar envolvidas na resposta antioxidante e, portanto, pode indicar efeito importante na tolerância à poluição (ALLEN; WEBB; SCHAKE, 1997).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LODO DE ESGOTO SANITÁRIO

O constante desenvolvimento de áreas urbanas e o conseqüente aumento da produção de efluentes sanitários correspondem aos principais agentes poluidores de recursos hídricos. Projetos de implantação de estações de tratamento de esgoto têm sido alvos de investimento de companhias de saneamento ambiental, visando atender à crescente demanda e à legislação vigente (BETTIOL; CAMARGO, 2006; LIMA et al., 2011).

A composição média dos efluentes aponta para uma mistura de água (99,9 %) e sólidos (0,1%) sendo que, do total de sólidos, 70% são orgânicos (proteínas, carboidratos, gorduras) e 30% inorgânicos (partículas minerais, sais e metais). Durante o processo de tratamento, ocorre a separação por decantação das frações sólidas e líquidas, onde a fase líquida é composta por efluentes domésticos, águas de infiltração e despejos industriais e a sólida é denominada de lodo de esgoto, rico em nutrientes e matéria orgânica (MELO; MARQUES, 2000; FERNANDES, 2000).

Lodo de esgoto sanitário é definido como o resíduo gerado nos processos de tratamento de efluente sanitário, constituindo-se de uma fonte de matéria orgânica e de nutrientes com alto potencial de riscos à saúde pública e ao ambiente devido a chance de proliferação de vetores de moléstias e organismos nocivos (Resolução CONAMA 375/2006).

Até a década de 60, a disposição final do lodo, resultante de sistemas de tratamento de efluentes, era feita em aterros sanitários, mas devido ao aumento na geração deste resíduo, tal alternativa passou a ser ineficaz do ponto de vista físico e ambiental (GEYER, 2001). Mundialmente, têm-se aplicado diferentes métodos de reaproveitamento deste material, variando conforme as características intrínsecas de cada caso.

A escolha da alternativa de disposição final do lodo de esgoto deve passar por avaliações de ordem técnica, econômica e ambiental e, mesmo assim, cada uma delas apresenta potenciais impactos ao ambiente (ALAMINO, 2010). Dentre as alternativas de destinação final destaca-se a compostagem que é o processo no qual a matéria orgânica de origem animal ou vegetal é decomposta por meio de um processo

biológico, obtendo-se como resultado um composto apto a ser utilizado no solo porém, o custo de manutenção é relativamente alto (OLIVEIRA, 2000). Outra alternativa é a incineração que se trata de uma tecnologia térmica que consiste na queima de materiais em altas temperaturas (900 °C) o que reduz o volume do lixo e destrói bactérias, vírus e descontamina o solo (OLIVEIRA, 2000). Dentre os tratamentos de resíduos, a reciclagem vem sendo o método mais eficaz de tratamento e destinação final dos resíduos depois da redução na fonte geradora.

O lodo de esgoto tem sido fortemente sugerido para a aplicação na agricultura como condicionador e fertilizante do solo pois apresenta em sua composição altos teores de matéria orgânica (BETTIOL; CAMARGO, 2006; LIMA et al., 2011). Entretanto, como o lodo pode conter elevadas concentrações de contaminantes, essa prática pode levar à adição direta de diversos patógenos e substâncias químicas não desejadas ao solo agriculturável e conseqüentemente na cadeia alimentar. Outro fator de preocupação é a composição variável do resíduo nas diferentes regiões e épocas do ano, dificultando o monitoramento dos contaminantes (SAITO, 2005).

2.2 ÁCIDO HÚMICO EXTRAÍDO DO LODO DE ESGOTO SANITÁRIO

As substâncias húmicas (SH) compreendem um grupo de compostos de carbono gerados na decomposição da matéria orgânica que sofrem ressíntese, formando um material denominado de húmus (STEVENSON, 1994). Elas desempenham um papel muito importante, contribuindo na fertilidade do solo e outros benefícios incluindo um aumento da estabilidade estrutural, na permeabilidade para água e gás, na capacidade de retenção de água, na atividade biológica, na disponibilidade de nutrientes; de tamponamento do pH e na capacidade de troca catiônica, carbono sequestro e interações com contaminantes (FRIMMEL; ABBT-BRAUN, 2006; PERMINOVA; KULIKOVA, 2008; GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2010).

De acordo com Atiyeh (2002), as SH estão relacionadas com diversas atividades no metabolismo vegetal como: aumento da matéria seca de mudas de milho e aveia (LEE; BARTLETT, 1976; ALBUZIO et al., 1994); números e comprimentos raízes de tabaco (MYLONAS; MCCANTS, 1980); peso seco da parte aérea, raízes e nódulos de soja, de

amendoim e plantas de trevo (TAN; TANTIWIRAMANOND, 1983); aumento do crescimento vegetativo de plantas de chicória (VALDRIGHI et al., 1996); indução da formação de parte aérea e raízes em culturas tropicais crescidas em cultura de tecidos (GOENADI; SUDHARAMA, 1995) e têm um conhecido efeito surfactante capazes assim de dissolver a camada lipídica das membranas biológicas aumentando desta forma a permeabilidade da membrana plasmática (VISSER, 1982).

Também foi comprovado que concentrações elevadas de SH promovem uma redução no crescimento de plantas (CHEN; AVIAD, 1990). Diante destes trabalhos, pode-se confirmar um efeito tipo-hormonal dessas substâncias sobre as plantas considerando também seu envolvimento com o substrato (CASENAVE DE SANFILIPPO et al., 1990; CHEN; AVIAD, 1990; MUSCOLO et al., 1993, 1996, 1999). Mecanismos que explicam o crescimento da planta é o aumento da captação de íons metálicos e aumento da permeabilidade celular (CHEN; AVIAD, 1990). 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, promovendo melhor absorção de nutrientes, e estimulam o crescimento tanto do sistema radicular quanto da parte aérea (SILVA et al., 1999).

As SH são fracionadas em três diferentes compostos, cada um com características diferentes, sendo eles: ácido húmico, ácido fúlvico e humina. Piccolo (2002) definiu ácidos fúlvicos (AF) como sendo a associação de pequenas moléculas hidrofílicas com uma quantidade de grupamentos funcionais ácidos suficientemente grandes para manter os agrupamentos de AF dispersos em qualquer valor de pH. Os ácidos húmicos (AH), por sua vez, são compostos por associações onde predominam compostos hidrofóbicos (cadeias polimetilênicas, ácidos graxos, esteróides) que são estabilizados em pH neutro por forças hidrofóbicas dispersivas. De acordo com a conceituação de Piccolo, a conformação dos AH cresce progressivamente de tamanho quando as forças oriundas das ligações hidrogênio são progressivamente aumentadas até um valor baixo de pH, onde os ácidos húmicos floculam. As huminas (H) continuam a denominar a fração alcalino insolúvel dos compostos orgânicos do solo (DOBBSS, 2006).

O ácido húmico é intermediário de complexidade entre AF e humina e é capaz de interagir com os poluentes orgânicos persistentes- POPs e PAHs (hidrocarboneto policíclicos aromáticos), devido à sua característica estrutural que possuem cavidades hidrofóbicas que apresentam uma tendência alta na captura de contaminantes no meio ambiente (MCAIN, 2003; LAOR, 2002). Conte e colaboradores (2005) relatam que o material de compostagem humificada pode também ser um recurso importante em processos de remediação de solos contaminados. Ele tem sido amplamente usado como substituto para matéria orgânica de solo e é o componente mais extraído das substâncias húmicas (BUURMAN et al., 2009).

Recentemente, trabalhos têm relatado o aumento do crescimento de plantas cultivadas no plantio com ácidos húmicos extraídos de vermicomposto (ARANCON, 2003; ATIVEH, 2002). Também foi observado que os AH são capazes de alterar o padrão de enraizamento de *Arabidopsis thaliana*, proporcionando desenvolvimento de maior número de raízes laterais bem como de raízes laterais mais desenvolvidas em relação às plantas-controle (DOBBSS, 2006). Façanha et al. (2002) e Canellas et al. (2002) demonstraram que AH de massa aparentemente elevada (maior que 14 kDa) isolados de vermicomposto, apresentaram estímulos sobre a atividade de hidrólise e transporte de H⁺ das H⁺-ATPases de MP isoladas de raízes de plantas mono e dicotiledôneas. Foi observado o aumento na síntese de H⁺-ATPase, induzido por AH, e por meio deste estudo, foi proposto que os AH atuam por um mecanismo pós-transcricional via ativação de genes Mha1 e Mha2, da mesma forma como as auxinas disparam a síntese das H⁺-ATPases de MP em hipocótilos de milho (FRIAS et al., 1996). Adicionalmente, Zandonadi (2006), utilizando plantas mutantes de tomateiro (mutante diageotópica), que possuem um gene formado pouco sensível à auxina confirmou que os AH possuem uma atividade tipo auxínica.

2.3 *Oryza sativa* COMO PLANTA TESTE

O. sativa (arroz) pertence à família Poaceae e gênero *Oryza*. É um dos cereais mais cultivado no mundo, sendo amplamente utilizado na alimentação humana, portanto

desempenhando, portanto, papel estratégico tanto no aspecto econômico quanto social (HENRIQUES, 2008). Adicionalmente, corresponde a uma cultura extremamente versátil, que se adapta a diferentes condições de solo e clima, sendo considerada a espécie que apresenta maior potencial para o combate a fome no mundo (AGRIANUAL, 1998).

O arroz é o alimento básico para 2,5 bilhões de pessoas. Além de sua importância agrônômica, *O. sativa* é também um importante modelo biológico de espécies de plantas monocotiledôneas e está entre as principais culturas de cereais, como o milho, trigo, cevada e sorgo.

O arroz é cultivado em muitas condições e sistemas de produção diferentes, mas submerso em água é o método mais comum usado no mundo inteiro. É o único cereal que pode crescer por longos períodos de tempo em água parada (OUYANG et al., 2007). Proporcionalmente, 57 % do arroz é cultivado em terras irrigadas, 25% na várzea de sequeiro, 10% sobre as terras altas, 6% em águas profundas, e 2% em pântanos de maré (ZHAO et al., 2010). A plantação de arroz inundada é um campo da biodiversidade aquática, fornecendo uma moradia para peixes, plantas, anfíbios, répteis, moluscos e crustáceos, que muitos dos podem ser usados como um meio de incorporar proteína em dietas de pessoas pobres e subnutridas em países de renda média que o arroz quinta (MCNALLY et al., 2009). Como o arroz pode ser cultivado em muitos ambientes com diversas características, faz-se uma variedade muito popular em todo o mundo.

2.4 TESTE CITOGENÉTICO EM *Allium cepa* L.

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 por meio de aberrações cromossômicas em células meristemáticas das raízes dessa espécie (VIDAKOVIC-CIFREK et al., 2002). Esta planta teste é bastante

utilizada devido a características tais como presença de cromossomos grandes e em número reduzido ($2n = 16$) (FACHINETTO, 2007), sendo este fator fundamental para estudos de avaliação de danos cromossômicos e/ou de distúrbios do ciclo de divisão celular, incluindo riscos de aneuploidia.

Por meio do teste de aberrações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* pode ser quantificada uma série de variáveis morfológicas e citogenéticas, incluindo 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 (EVSEEVA et al., 2003; EGITO et al., 2007). O teste genotóxico que utiliza o *Allium* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (BAGATINI et al., 2007).

2.5 IMPORTÂNCIA DE ANÁLISES FISIOLÓGICAS E ANATÔMICAS

Análises de crescimento são de grande importância para estudos com plantas pois, fatores ambientais, como luz, temperatura, concentração de CO_2 e disponibilidade de água e nutrientes, próprios de cada local, afetam sensivelmente vários índices fisiológicos, a exemplo da razão de área foliar, da taxa assimilatória líquida e da taxa de crescimento relativa, dentre outros (PEIXOTO, 2006). Estes estudos possibilitam acompanhar o desenvolvimento das plantas como um todo e a contribuição dos diferentes órgãos no crescimento total (LIEDGENS, 1993), permitindo conhecer suas estratégias de adaptações às variações ambientais como os poluentes orgânicos..

A análise de crescimento é um método que descreve as condições morfofisiológicas da planta em diferentes intervalos de tempo entre amostras sucessivas (MAGALHÃES, 1979). Assim como outras medidas fisiológicas, a análise de crescimento é também um instrumento que tem sido usado com o objetivo primordial de gerar uma descrição clara do padrão de crescimento da planta ou de partes dela, permitindo comparações entre

situações distintas, podendo ser aplicada às mais diversas modalidades de estudos (NOGUEIRA; CONCEIÇÃO, 2000).

Segundo Benincasa (2003), esse tipo de análise baseia-se fundamentalmente no fato de que cerca de 90%, em média, da matéria seca acumulada pelas plantas, ao longo do seu crescimento, resultam da atividade fotossintética, e o restante pela absorção de nutrientes minerais. Podendo esse acúmulo de fitomassa ser estudada por medidas lineares (altura de planta, comprimento e diâmetro do caule, comprimento e largura de folha, comprimento de raiz, etc.); número de unidades estruturais (folhas, flores, frutos, raízes, e outros) e medidas de superfície (principalmente pela medição da superfície da lâmina foliar).

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).

2.6 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Enzimas do estresse oxidativo evidenciam a resposta da planta/organismo frente a um estresse. Os vegetais são expostos a diversos fatores externos e internos: radiação UV, luminosidade intensa, herbicidas, ataque de patógenos, certas injúrias, hiperoxia, ozônio, flutuações na temperatura, seca, metais pesados, concentração elevada de sais, extremos de temperatura, poluição do ar (SCANDALIOS, 1993; MALLICK e MOHN, 2000). Estas situações podem promover diversos estresses no vegetal e, conseqüentemente, o aumento da produção de ERO's (espécies reativas de oxigênio). Como exemplos de ERO's, temos o radical superóxido (O_2^-), dotado de baixa capacidade oxidativa, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), capaz de romper a membrana nuclear e causar danos ao DNA, radical hidroxil ($\bullet OH$), com baixa capacidade de

difusão, porém alta reatividade, provocando lesões em uma série de moléculas em meio celular e o oxigênio “singlet” (O_2^1) (SCANDALIOS, 2000).

Os EROs possuem alta reatividade e alta citotoxicidade, pois em altas quantidades, interferem no ciclo de Calvin (inibindo a fixação de C) e, portanto, não permitem a realização da fotossíntese, devido à oxidação do aparato fotossintético. Radicais do tipo O_2 e H_2O_2 não são tão reativos, mas na presença de íons metálicos (ex.: Fe) eles ativam reações que levam a formação de $\bullet OH$ na reação de Haber-Weiss (BOWLER et al., 1992). Este $\bullet OH$ possui grande potencial oxidativo degradando macromoléculas levando a sérios danos celulares (SCANDALIOS, 2000) tais como: peroxidação lipídica, desnaturação protéica e mutação no DNA (BOWLER et al., 1992) causando disfunções metabólicas irreparáveis e morte celular (SCANDALIOS, 2000).

Para inativar este complexo de ERO's são necessárias a ação conjunta das enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), dehidroascorbato redutase (DHAR), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), glutathiona redutase (GR), glutathiona peroxidase (GPx) (ROSSI, 2008).

A SOD (superóxido dismutase) é considerada a primeira linha de defesa com os danos causados pelas ERO's atuando na dismutação de $O_2^{\bullet -}$ em H_2O_2 (ALSCHER et al., 2002), desta forma, interferindo na concentração das duas ERO's envolvidas na reação de Haber-Weiss, fazendo parte do mecanismo central de defesa dos organismos, evitando a formação do radical $\bullet OH$ – ERO mais reativa (LEÓN et al., 2002).

A ascorbato peroxidase (APX) é responsável pela degradação do H_2O_2 utilizando o ascorbato como substrato e agindo na defesa de tecidos fotossintéticos contra o estresse fotooxidativo. A APX é encontrada também no citosol das células não fotossintetizantes, atuando na redução dos níveis de ERO's (ASADA, 1999).

A catalase (CAT) é responsável pela inativação do H_2O_2 formado durante a conversão do glicolato a glioxalato, que ocorre durante a fotorrespiração, onde o peróxido é convertido pela enzima em H_2O e O_2 (IGAMBERDIEV; LEA, 2002). A catalase pode

também, decompor o peróxido formado durante a oxidação de ácidos graxos nos glioxissomos em tecidos de armazenamento de gordura (HOLTMAN et al., 1994). A enzima é preferencialmente encontrada nos peroxissomos, mas também podem estar presentes em mitocôndrias e no citoplasma (MONTAVON et al., 2006).

Conforme relatado em diversos estudos (FAÇANHA et al., 2002; CANELLAS et al., 2002; ZANDONADI et al., 2007 e CANELLAS et al., 2010) os AH de massa elevada (maior que 14 kDa) isolados de vermicomposto apresentaram estímulos sobre a atividade de hidrólise e transporte de H^+ das H^+ -ATPases de MP isoladas de raízes de plantas mono e dicotiledôneas. As H^+ -ATPases têm papel central no balanço energético celular e na promoção do enraizamento, uma vez que fornecem energia para os transportadores de íons localizados na membrana plasmática e geram o gradiente eletroquímico responsável pela polarização da membrana plasmática (DOBBSS, 2010). Esse gradiente favorecerá, termodinamicamente, a absorção de íons e energizará o transporte transmembranar (GIANNINI; BRISKIN, 1987). Esse mecanismo complexo e intrincado de promoção do crescimento celular mediado pelas H^+ -ATPases é conhecido como “a teoria do crescimento ácido” (RAYLE; CLELAND, 1992). As auxinas assumem papel central nesse mecanismo, uma vez que promovem tanto a transcrição de genes codificando ATPases, quanto a ativação dessas proteínas (RAYLE; CLELAND, 1992) determinando desta forma a característica tipo-hormonal do ácido húmico.

A GSH (glutathiona S-transferase) é uma molécula importante dentro do sistema celular, participando inclusive do ciclo ascorbato-glutathiona (NOCTOR et al., 2002), ou ainda da síntese de fitoquelatinas (GRATÃO et al., 2005). As glutathionas S-transferases são enzimas que catalisam a conjugação de GSH à substratos hidrofóbicos eletrofílicos, como xenobióticos (DIXON et al., 2002), sendo essas proteínas encontradas preferencialmente no citoplasma (MARRS, 1996).

A glutathiona S-transferase (GST) catalisa a conjugação da glutathiona reduzida a uma variedade de substratos hidrofóbicos e eletrofílicos, que são geralmente citotóxicos (WILCE; PARKER, 1994; KREUZ et al., 1996), produzindo conjugados solúveis em

água destes xenobióticos, o que reduz sua toxicidade (COLE, 1994; KREUZ et al., 1996). As GSTs também promovem a conjugação de glutathione reduzida com produtos endógenos causadores de danos oxidativos, como radicais hidroxila citotóxicos, peróxidos de lipídios de membrana e produtos de degradação oxidativa do DNA, visando sua desintoxicação (DUDLER et al., 1991; BARTLING et al., 1993).

A enzima H⁺-ATPase, situada na membrana plasmática, tem como atividade a clivagem de moléculas de ATP para geração de um gradiente eletroquímico que fornece energia para os transportes secundários da célula, promovendo a força necessária para a entrada e fluxo de íons e metabólitos na membrana (SZE, 1985; CANELLAS et al., 2012). A enzima tem atividade influenciada por contextos temporais e espaciais, bem como por mudanças químicas e ambientais e é codificada por uma família de multigenes (NIU et al., 1996; HASEGAWA et al., 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos dos ácidos húmicos provenientes de lodo de esgoto sanitário sobre as plantas, no aspecto citogenético no sistema de *Allium cepa* e fisiológico e bioquímico em *Oryza sativa* L.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Caracterização química do lodo de esgoto bruto e do ácido húmico;
- b. Avaliar os efeitos de toxicidade e citogenéticos (citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade) do ácido húmico sobre o *A. cepa*;
- c. Investigar a taxa de crescimento e o teor de pigmentos fotossintetizantes em *O. sativa* após tratamento com ácido húmico extraído do lodo de esgoto;
- d. Analisar a densidade estomática de *O. sativa* expostas às diferentes concentrações do ácido húmico proveniente do lodo de esgoto sanitário;
- e. Investigar atividade enzimática de *O. sativa* expostas à diferentes concentrações de ácido húmico do lodo de esgoto.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta do lodo de esgoto

O lodo utilizado neste trabalho, foi cedido pela Companhia Espírito Santense de Saneamento (CESAN), onde uma amostra foi coletada para análise química (Centro Tecnológico de Análises – CETAN, Vitória/ES).

4.2 Extração dos ácidos húmicos

As substâncias húmicas alcalino solúveis foram extraídas de acordo com o método recomendado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS), onde foi adicionado 40mL de NaOH 0,5 mol L⁻¹ em 4g de lodo de esgoto para extração da substância húmica (SH). Posteriormente a SH extraída foi acidificada com HCl 6 mol⁻¹ até atingir o pH= 1 para o isolamento do ácido húmico. O ácido húmico isolado foi lavado em água deionizada, dializado em membrana com poros 14 KDa e liofilizadas.

4.3 Determinação das dosagens utilizadas

Para a determinação das concentrações, foi realizada a análise da composição elementar dos materiais húmicos por meio do analisador elementar automático (Leco, CHNS – 932). 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). Após a análise do teor de C, foram determinadas quatro concentrações de AH em mM de C por litro (0,5; 1,0; 2,0; 4,0) baseadas em doses relatadas na literatura para ácidos húmicos (CANELLAS et al., 2010; CANELLAS et al., 2012).

4.4 Área de estudo

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação e 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.

4.5 Condições experimentais

4.5.1 Ensaio *Allium cepa*

Os testes de aberrações cromossômicas e de micronúcleos em células meristemáticas de *Allium 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. 100 sementes foram germinadas nas diferentes 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 4×10^{-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 acondicionadas em reativo de Schiff por duas horas em local escuro.

Para a análise de toxicidade e citológicas, as lâminas foram confeccionadas pelo método de esmagamento suave com a adição de uma gota de carmim acético 1%. 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 por lâmina da região meristemática, totalizando cinco lâminas para cada tratamento.

A toxicidade foi determinada pela taxa de germinação:

$$\text{Taxa de germinação} = \frac{\text{número de sementes germinadas}}{\text{total de sementes analisadas}}$$

O índice mitótico (IM) foi calculado por meio da relação entre o número de células em divisão e o total de células analisadas:

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

O índice de aberrações cromossômicas (AC) foi obtido por meio da frequência de células portadoras de alterações cromossômicas no ciclo celular: células binucleadas, micronúcleo, micrócito, brotamento, C-metáfase, perda, aderência cromossômica, anáfases mutipolares bem como pontes e atrasos na anáfase e na telófase. O índice de aberrações cromossômicas foi obtido por meio da seguinte fórmula:

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

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

$$\text{Índice de mutagenicidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células com micronúcleo e quebras}}{\text{n}^\circ \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

4.5.2 Ensaio com *Oryza sativa* L.

Sementes de *O. sativa* L. (BRS-Primavera, 2012, semente certificada Roraima), foram disponibilizadas pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo. As sementes foram germinadas em placa de Petri contendo papel-filtro com água destilada durante sete dias. Após a emergência da radícula, com média de 1 a 3 cm, estas foram transferidas para vasos com volume total de 1100 mL, contendo solução de CaCl₂ com diferentes concentrações de AH. CaCl₂ consiste em um meio mínimo de nutrientes necessário para o crescimento de uma planta (Pinton et al.,1999).

Para o tratamento controle, as plantas foram submetidas somente à solução nutritiva CaCl_2 . O pH das soluções foram ajustados para 5.8 - 6.0. A exposição aos diferentes tratamentos foi realizada por um período de 20 dias, em casa de vegetação, com temperatura média de 27 °C e umidade relativa média de 77%. O pH das soluções foi ajustado diariamente.

4.6 Análises de crescimento

Após os 10 dias de condução experimental, foram coletadas aleatoriamente cinco indivíduos de *O. sativa* de cada repetição, totalizando 25 indivíduos por tratamento, a fim de realizar medidas de altura; massa fresca e seca (estufa 60° C) de todas os órgãos das plantas, medidas de diâmetro e comprimento das raízes e contagem do número de folhas. A partir dessas medidas foram obtidas médias da razão de raiz parte aérea (MSR/MSPA) e comprimento específico da raiz (CR/MSR). Com os dados de massas secas 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, CR: comprimento da raiz; MSR: massa seca radicular; MSPA: massa seca da parte aérea; MFPA: massa fresca da parte aérea; MST: massa seca total.

4.7 Densidade estomática

Para cada tratamento foram coletadas amostras das raízes e de folhas de dez indivíduos de *O. sativa* e foram analisados doze campos por lâmina. Para a análise quantitativa, as amostras foram fixadas e armazenadas em álcool etílico 70%. Das amostras de folhas foram realizadas impressões abaxiais, do terço mediano da região internervural. A densidade estomática (mm^2) foi realizada utilizando uma gota de adesivo instantâneo universal éster de cianoacrilato (Super-Bonder®) em uma lâmina histológica. Doze campos ópticos aleatórios foram analisados por indivíduo, totalizando 60 campos ópticos por tratamento.

4.8 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. Amostras de 0,1g do material foliar, por indivíduo, foi imerso em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e incubado à 70 °C por 120 minutos, no escuro (HISCOX e ISRAELSTAM, 1979). A leitura do extrato foi realizada em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific) 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.

4.9 Análises das atividades enzimáticas

4.9.1 Concentração de proteína

A concentração de proteína das amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976) adaptado para microplaca, onde 10 µL do homogeneizado foi adicionado em 200

μL de Coomassie Blue. Em seguida, foi realizada a leitura da absorvância a $\lambda = 595 \text{ nm}$, utilizando-se, como padrão, curva de albumina sérica bovina.

4.9.2 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi realizada por espectrofotometria com base no protocolo descrito por McCord e 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 μL de tampão fosfato com PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) 1 mM. A mistura foi homogeneizada (ULTRA-TURRAX, IKA, China), centrifugada 10000 g por 10 minutos 4° C e o sobrenadante aliquoteado para análise. Para leitura da atividade em microplaca foram adicionados 10 μL do sobrenadante a 288 μL de meio de reação (Xantina 50 μM , KCN 20 μM , Citocromo c 10 μM , EDTA 100 μM) em cada poço. Para o branco, utilizou-se 2 μL de meio de reação. A leitura foi realizada durante um minuto em intervalos de 15 segundos em espectrofotômetro (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.

4.9.3 Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada pelo método descrito por Beutler (1976), no qual a decomposição enzimática de H_2O_2 é medida pelo decaimento da absorvância a 240 nm. O extrato foi preparado com 0,2 g de amostra vegetal (folha e raiz) e adicionados 600 μL de tampão de homogeneização (Tris-base 20 mM, EDTA 1mM, Sacarose 0,5 M e Ditioneitol - DTT 1 mM) com PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) 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 μL do sobrenadante e 250 μL de meio de reação (45

μL de H_2O_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 μL de tampão de homogeneização. A leitura foi realizada durante dois minutos em intervalos de 15 segundos em espectrofotômetro (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation, EUA). A atividade específica foi expressa em nmol mg^{-1} de proteína min^{-1} .

4.9.4 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 H_2O_2 dependente de ascorbato foi determinada por uma diminuição do valor de absorvância 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 μL 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 μL do sobrenadante a 125 μL de tampão fosfato, 12 μL de ácido ascórbico, 96,9 μL de água destilada, 12,5 μL de H_2O_2 . Para o branco, utilizou-se 3,1 μL de água destilada. A leitura foi realizada durante três minutos em intervalos de 15 segundos em espectrofotômetro (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation, EUA). A atividade específica foi expressa em μmol de ácido ascórbico $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

4.9.5 Atividade da enzima glutatona 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 absorvância a 340 nm. O extrato foi preparado com 0,3 g de amostra vegetal (folha e raiz) e adicionados 900 μL 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°C e o

sobrenadante aliquotado para análise. Para leitura da atividade em microplaca foram adicionados 15 μL do sobrenadante em 235 μL de meio de reação (tampão fosfato e CDNB 0,05 M) e 10 μL de GSH a 25 mM. Para o branco, utilizou-se 15 μL de tampão de homogeneização. A leitura foi realizada durante quatro minutos em intervalos de 30 segundos em espectrofotômetro (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation, EUA). A atividade específica foi definida como a unidade da atividade da enzima por mg de proteína.

4.9.6 Quantificação da glutathiona reduzida (GSH)

A quantificação da concentração 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 μL 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^o C e o sobrenadante aliquotado para análise. Para leitura da atividade, inicialmente foram adicionados 20 μL do sobrenadante a 20 μL 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 μL do sobrenadante foram transferidos para microplaca branca, adicionados 180 μL 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 μL 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). A concentração de GSH foi expressa μM por mg de proteína.

4.9.7 Atividade da enzima H^+ -ATPase

A atividade da H⁺-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⁺-ATPase) foi utilizada para avaliar a atividade da H⁺-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 µL 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^o C e o sobrenadante aliqotado para análise. Para leitura da atividade total da ATPase, foram adicionados em microplaca 5 µL do sobrenadante a 200 µL de meio de reação (Imidazol 30 mM, NaCl 45 mM, KCl 15mM, MgCl₂ x 6 H₂O 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⁺-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 durante quinze minutos em intervalos de 30 segundos em espectrofotômetro (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation, EUA). A atividade específica foi definida como a unidade da atividade da enzima por mg de proteína.

4.10 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). Adicionalmente foram realizadas análises de regressão para os resultados de pigmentos fotossintéticos, pois apenas estes resultados mostraram-se dose-dependente.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUZIO, A.; CONCHERI, G.; NARDI, S.; DELL'AGNOLA, G. Effect of humic fractions of different molecular size on the development of oat seedlings grown in varied nutritional conditions. In: Senesi, N., Mianom, T.M. (Eds.), **Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health**. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 199–204. 1994.

ALAMINO, R.C.J. **A utilização de lodo de esgoto como alternative sustentável na recuperação de solos degradados**: Viabilidade, avaliação e biodisponibilidade de metais. Rio de Janeiro, 2010.xxi, 221 f. Tese (Doutorado em Geologia) - Programa de Pós-Graduação em geologia, Instituto de Geociências, Universidade Federal do rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

ALLEN, R.D; WEBB, R.P.; SCHAKE, S.A. Use of transgenic plants to study antioxidants defenses. **Free Radical Biology and Medicine**, v.23, n.3, p.473-479, 1997.

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1331–1341, 2002.

ARANCON N.Q.; LEE S.; EDWARDS C.A.; ATIYEH R.M. Effects of humic acids and aqueous extracts derived from cattle, food and paper-waste vermicomposts on growth of greenhouse plants. **Pedobiologia** (Jena), v.47, p.744–781, 2003.

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.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p.601-639, 1999.

ATIYEH, R.M.; LEE, S.; EDWARDS, C.A.; ARANCON, N.Q.; METZGER, J.D. The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. **Bioresource Technology**, v.84, p.7-14.2002.

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.

BAGATINI, M.D.; SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S.B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais.

Revista Brasileira Farmacognosia, v.17, p.444-447, 2007.

BARTLING, D.; RADZIO, R.; STEINER, U.; WEILER, E.W. A glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*: molecular cloning and functional characterization. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 216, n. 2, p. 579-86, set., 1993.

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

BENINCASA, M.M.P. **Análise de crescimento de plantas** (noções básicas). 2ed Jaboticabal: FUNEP, p.41, 2003.

ANDREOLI, C.V.; PEGORINI, E.S. Gestão Pública do Uso Agrícola do Lodo de Esgoto. In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O.A. de (eds.). **Lodo de esgoto: Impactos Ambientais na Agricultura**. Embrapa Meio Ambiente: Jaguariúna, 2006a, 347p.

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.

BOWLER, C.; VANMONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, p.83-116, 1992.

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.

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.

BUURMAN, P.; NIEROP, K.G.J.; KAAL, J.; SENESI, N. Analytical pyrolysis and thermally assisted hydrolysis and methylation of EUROSOIL humic acid samples – a key to their source. **Geoderma**, v.150, p.10–22, 2009.

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⁺-ATPase activity in maize roots. **Plant Physiology**, v.130, p.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.

CASENAVE DE SANFILIPPO, E.; ARGUELLO, J.A.; ABDALA, G.; ORIOLI, G.A.; Content of Auxin-, inhibitor- and Gibberellin-like substances in humic acids. **Biologia Plantarum**, v.32, p.346–351, 1990.

CHEN, Y.; AVIAD, T. 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 Science of American**, Madison, Wisconsin, USA, pp. 161-186, 1990.

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.

CONTE, P.; AGRETTO, A.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Soil remediation: humic acids as natural surfactants in the washings of highly contaminated soils. **Environmental Pollution**, v.135, p.515–522, 2005.

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.

DIXON, D.P.; LAPHORN, A.; EDWARDS, R. Plant glutathione transferases. **Genome Biology**, v.3, p.1-10, 2002.

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.

DUDLER, R.; HERTIG, C.; REBMANN, G.; BULL, J.; MAUCH, F. A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione S-transferases. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, USA, v. 4, n. 1, p. 14-18, jan./fev., 1991.

EGITO, L.C.M.; MEDEIROS, M.G.; MEDEIROS, S.R.B.; AGNEZ-LIMA, L.F. Cytotoxic and genotoxic potential as surface water from the Pitimbu River, Northeastern/RN, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.30, n.2, p.435-441, 2007.

EVSEEVA, T.I.; GERASKIN, S.A.; SHUTOMOVA, I.I. Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of Allium-test. **Journal of Environmental Radioactivity**, Oxford, v.68, p.235-248,2003.

FAÇANHA, A.R.; FAÇANHA, A.L.O.; OLIVARES, F.L.; VELLOSO, A.C.X.; BRAZ-FILHO, R.; SANTOS, G.A.; CANELLAS, L.P. Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.1301-1310. 2002.

FACHINETTO, J.M.; BAGATINI, M.D.; DURIGON, A.C.F.S.; TEDESCO, S.B. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo de celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 17, p. 49-54, 2007.

FERNANDES, F. Estabilização e higienização de biossólidos. In: **W. Bettiol & O. A. Camargo** (Ed.). Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente. p.312, 2000.

FRIAS, I.; CALDEIRA, M.T.; PEREZ, C.J.R.; NAVARRO, A.J.P.; CULIANEZ, M.F.A.; KUPPINGER, O.; STRANSKY, A.; PAGES, M.; HAGER, A.; SERRANO, R. A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles. **Plant Cell**, v.8, p.1533-1544.1996.

FRIMMEL, F.H.; ABBT-BRAUN, G. Humic substances – linking structure to functions. In: **Proceedings of the 13th Meeting of the International Humic Substances Society**, Karlsruhe, Germany. 2006.

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.

GEYER, A.L.B. **Contribuição ao estudo da disposição final e aproveitamento da cinza se lodo de estações de tratamento de esgotos sanitários como adição ao concreto**. 2001. 216f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GIANNINI, J.L.; BRISKIN, D.P. Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissues. **Plant Physiology**, v.84, p.613-618, 1987.

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

GOENADI, D.H.; SUDHARAMA, I.M. Shoot initiation by humic acids of selected tropical crops grown in tissue culture. **Plant Cell Reports**, v.15, p.59–62. 1995.

GONZÁLEZ-PÉREZ, J.A.; GONZÁLEZ-VILA, F.J.; ALMENDROS, G. Advances in natural organic carbon and humic substances research 2008–2010. In: **Proceedings of the 15th Meeting of the International Humic Substances Society**, Tenerife, Canary Islands, Spain, v. 2, p.381, 2010.

GRANT, W. The present status of higher plants bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v.310, n.2, p.175-185, 1994.

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, 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.

HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; ZHU, J.K.; BOHNERT, H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 51, n. 1, p. 463-499, jun., 2000.

HENRIQUES, A.R. **Desenvolvimento de plantas e qualidade fisiológica de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) submetidas a diversas concentrações de cádmio**. PELOTAS, Rio Grande do Sul, Brasil, 2008. DISSERTAÇÃO - Universidade Federal De Pelotas Federal- pelotas instituto de biologia programa de pós-graduação em fisiologia vegetal.

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.

HOLTMAN W.L., HEISTEK J.C., MATTERN K.A., BAKHUIZEN R., DOUMA A.C. Beta-oxidation of fatty acids is linked to the glyoxylate cycle in the aleurone but not in the embryo of germinating barley. **Plant Science**, v.99, p.43–53, 1994.

HOSHINA, M.M.; MARIN-MORALES, M.A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and environmental safety**, v.72, n.8, p.2090-2095, 2009.

HUNT, R. **Plant growth analysis**. London: Edward Arnold Publishers Limited, p.67, 1978.

IGAMBERDIEV A.U.; LEA, P.J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. **Phytochemistry**, v.60, p.651-674, 2002.

KERBAUY, G. 2008. **Fisiologia vegetal**, 2a. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

KREUZ, K.; TOMMASINI, R.; MARTINOIA, E. Old enzymes for a new job. Herbicide detoxification in plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 111, n. 2, p. 349-53, jun., 1996.

LAOR, Y.; KOLKOV, C.H.; ARMON, R., **Environmental Science Technology**, v.36, p.1054, 2002.

LEÓN, A.M.; PALMA, J.M.; CORPAS, F.J.; GOMEZ, M.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; CHATTERJEE, D.; MATEOS, R.M.; DEL RIO, L.A.; SANDALIO, L.M. Antioxidative enzymes in cultivars of peppers plants with different sensitivity to cadmium. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, p.813-820, 2002.

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.

LIEDGENS, M.M. **Modelos numéricos para a descrição do crescimento da planta de soja (*Glycine max* L. Merrill, cultivar IAC-15) em condições sazonais diferenciadas.** 1993. Campinas: Unicamp, 101 p., 1993. Dissertação de Mestrado.

LIMA, A.A.; ALVARENGA, M.A.R.; RODRIGUES, L.; CARVALHO, J.G. Concentração foliar de nutrientes e produtividade de tomateiro cultivado sob diferentes substratos e doses de ácidos húmicos. **Horticultura Brasileira**, v, 29, p.63-69, 2011.

LEE, Y.S.; BARTLETT, R.J. Stimulation of plant growth by humic substances. **Soil Science Society of America Journal**, v. 40, p.876–879. 1976.

MAGALHÃES, A.C.N. Análise quantitativa do crescimento. In: FERRI, M. G. (Coord.). **Fisiologia vegetal 1.** São Paulo: EPU. Ed. da Universidade de São Paulo, v.1, cap. 8, p.331-350, 1979.

MALLICK, N.; MOHN F.H. Reactive oxygen species: response of alga cells. **Journal of Plant Physiology**, v.157, p.183-193, 2000.

MARRS, K.A. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.47, p.127–158, 1996.

MCNALLY, K.L.; CHILDS, K.L.; BOHNERT, R.; DAVIDSON, R.M.; ZHAO, K.; ULAT, V.J.; ZELLER, G.; CLARK, R.M.; HOEN, D.R.; BUREAU, T.E. Genomewide SNP variation reveals relationships among landraces and modern varieties of rice. **Proceedings of National Academy of Science. U.S.A.**, v.106, p.12273-12278, 2009.

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

NIU, X.; DAMSZ, B.; KONONOWICZ, A.K.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. NaCl induced alterations in both cell structure and tissue-specific plasma membrane H-ATPase gene expression. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 111, n. 3, p. 679–86, jul., 1996.

MELO, W.J; MARQUES, M. O potencial do lodo de esgoto como fonte de nutrientes para as plantas. In: W. Bettiol & O. A. Camargo (Ed.). **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto.** Jaguariuna<SP: Embrapa Meio Ambiente, 2000. P. 312.

MONTAVON, P.; KUKIC, K.R.; BORTILIK, K.A simple method to measure effective catalase activities: Optimization, validation, and application in green coffee. **Analytical Biochemistry**, 360:207-215, 2006.

MOZETO, A. Sedimentos e particulados lacustres: amostragens e análises biogeoquímicas. In: **Amostragem em Limnologia**, São Carlos, Rima, p.295- 317,

2006.

MUSCOLO, A.; FELICIM, M.; CONCHERI, G.; NARDI, S. Effect of earthworm humic substances on esterase and peroxidase activity during growth of leaf explants of *Nicotiana plumbaginifolia*. **Biology and Fertility of Soils**, v.15, p.127–131. 1993.

MUSCOLO, A.; PANUCCIO, M.R.; ABENAVOLI, M.R.; CONCHERI, G.; NARDI, S. Effect of molecular complexity and acidity of earthworm faeces humic fractions on glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase, and phosphoenolpyruvate carboxylase in *Daucus carota* a II cell. **Biology and Fertility of Soils**, v.22, p.83–88. 1996.

MUSCOLO, A.; BOVALO, F.; GIONFRIDDO, F.; NARDI, S. Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. **Soil Biology and Biochemistry**, v.31, p.1303–1311. 1999.

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.

NARDI, S.; CARLETTI, P.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A. 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. **Molecular Biology**, v.47, p.127–158, 1996.

NOCTOR, G.; GOMEZ, L.; VANACKER, H.; FOYER, C.H. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1283-1304, 2002.

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

OADES, J.M. Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management. **Plant Soil**, v.76, p.319-337, 1984.

OLIVEIRA, F.A.L. **Direto municipal sanitário: uma proposta legal para gestão integrada de resíduos sólidos no município de Belém**. Belém, 2000.469. Dissertação (mestrado em direito), Universidade Federal do Para, 2000.

OUYANG, S.; ZHU, W.; HAMILTON, J.; LIN, H.; CAMPBELL, M.; CHILDS, K.; THIBAUD-NISSEN, F.; MALEK, R.L.; LEE, Y.; ZHENG, L. The TIGR Rice Genome Annotation Resource: improvements and new features. **Nucleic Acids Research**, v.35, p.883-7, 2007.

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**, ID. 276235, 2013.

PEDROZA, M.M.; VIEIRA, G.E.G.; SOUSA, J.F.; PICKLER, A.C.; LEAL, E.R.M.; MILHOMEN, C.C. Produção e tratamento de lodo de esgoto – uma revisão. **Revista Liberato**, v. 17, p. 89-188, 2010.

PEIXOTO, C.P.; CERQUEIRA, E.C; SOARES, W.S.F.; NETO, M.T.C.; LEDO, C.A.S.; Matos, F, S; Oliveira, J, G. Análise de crescimento de diferentes genótipos de citros cultivados sob déficit hídrico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 3, p. 439-443, Dezembro 2006.

PERMINOVA, I.V.; KULIKOVA, N.A. From molecular understanding to innovative applications of humic substances. In: **Proceedings of the 14th International Meeting of the International Humic Substances Society**, Moscow, Saint Petersburg, Russia, 2008.

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.; LACOLETTI, G.; ASTOLFI, S.; VARANINI, Z. Modulation of nitrate uptake by water-extractable humic substances: Involvement of root plasma membrane H⁺-ATPase. **Plant and Soil**, v. 215, p. 155-163, 1999.

RAYLE, D.L.; CLELAND, R.E. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. **Plant Physiology**, v. 99, p. 1271-1274, 1992.

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 Plant Physiology**, v. 21, p. 87-94, 2009.

ROSSI, M.F. **Mecanismo antioxidante em plantas**. 10^o mostra acadêmica UNIMEP. 10^o Simpósio de ensino de graduação. 23-25/10/2012.

SAITO, M.L. 2007. **O Uso do Lodo de Esgoto na Agricultura: precauções com os contaminantes orgânicos**. Jaguariúna. EMBRAPA Meio Ambiente, cap 64, p 349-357. Disponível em: http://www.cnpma.embrapa.br/download/documentos_64.pdf .

SANTOS, G.A. **Contribution a letude des inteacctions matiere organique et phosphore dans um sol ferralitique**. Nancy:INPL, (Tese de doutorado em engenharia-Ciência do solo), Institut National Polytechnique de loraine, Nancy, 1984.

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

SCANDALIOS, J.G.; ACEVEDO, A.; RUZSA, S. Catalase gene expression in response to chronic high temperature stress in maize. **Plant Science**, v.156, p.103-110, 2000.

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 Agrobiologia**, v. 5, n. 2, p. 101-110, 1999.

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.

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.

SIQUEIRA, C.; LEAL, J.R.; VELLOSO, A.C.X.; SANTOS, G.A. Eletroquímica de solos tropicais de carga variável: II. Quantificação do efeito da matéria orgânica sobre o ponto de carga zero. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 14, p.13-17,1990.

SNIS – Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento. **Diagnóstico dos serviços de água e esgoto – 2010**. Ministério das Cidades – Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental, Brasília, 2012. 616p.

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

SZE, H. H⁺-translocating ATPases: advances using membrane vesicles. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 36, p. 175–208, jun., 1985.

TAN, K.H.; TANTIWIRAMANOND, D. Effect of humic acids on nodulation and dry matter production of soybean, peanut, and clover. **Soil Science Society of America Journal**, v.47, p.1121–1124, 1983.

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.

WILCE, M. C.; PARKER, M. W. Structure and function of glutathione S-transferases. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1205, n. 1, p. 1-18, mar., 1994.

VALDRIGHI, M.M.; PERA, A.; AGNOLUCCI, M.; FRASSINETTI, S.; LUNARDI, D.; VALLINI, G. Effects of compost-derived humic acids on vegetable biomass production and microbial growth within a plant (*Cichorium intybus*)-soil system: a comparative study. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.58, p.133–144, 1996.

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.

ZANDONADI, D.B. **Bioatividade de Substâncias Húmicas: Promoção do desenvolvimento radicular e Atividade das Bombas de H⁺**. Tese (mestrado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes - RJ, UENF, 160p. 2006.

ZANDONADI, D.B.; CANELLAS, L.P.; FAÇANHA, A.R. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. **Planta**, v.225, p. 1583-1595, 2007.

ZHAO, K.; WRIGHT, M.; KIMBALL, J.; EIZENGA, G.; MCCLUNG, A.; KOVACH, M.; TYAGI, W.; ALI, M.L.; TUNG, C.W.; REYNOLDS, A. Genomic diversity and introgression in *O. sativa* reveal the impact of domestication and breeding on the rice genome. **PLoS ONE**, v.5, p.10780, 2010.

6 RESULTADOS

Artigo 1:

Após tradução este artigo será submetido à revista “Soil Biology & Biochemistry”.

ISSN: 0038-0717.

Efeito do ácido húmico de lodo de esgoto em *Oryza sativa* L. sobre aspecto fisiológico e bioquímico, e citogenético em *Allium cepa* L.

Lívia Dorsch Rocha^a, Mariana Morozesk^a, Marina Marques Bonomo^a, Iara da Costa Souza^b, Ian Drumond Duarte^a, Leonardo Barros Dobbss^c, Eustaquio Vinicius Ribeiro de Castro^d, Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro Lima^d, Marisa Narciso Fernandes^b, e Silvia Tamie Matsumoto^{a*}.

^aDepartamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari, 514, 29075-910, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

^bDepartamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, Av. Washington Luiz, Km 235, 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brasil.

^cInstituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural, Rua Afonso Sarlo, 160, 29052-010, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

^dDepartamento 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

Resíduo sólido, mais especificamente, o lodo de esgoto sanitário vem aumentando drasticamente na sociedade e concomitante faltam formas de destinação final por apresentar poluentes e patógenos em sua composição além dos compostos orgânicos. Ácidos húmicos (AH) são substâncias resultantes do fracionamento de substâncias húmicas e apresentam como característica a riqueza em matéria orgânica. Neste contexto, foi realizada a extração de AH do lodo de esgoto para aplicação à cultura de arroz das quais serão feitas análises após tratamento. O presente trabalho teve como objetivo avaliar efeitos citogenéticos do AH no ensaio de *Allium cepa*, e respostas fisiológicas, anatômicas e bioquímicas em *Oryza sativa* L. tratado, por 20 dias, com AH de lodo de esgoto afim de investigar a sua viabilidade em organismos. O AH apresentou teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio elevados, podendo constituir uma fonte de nutrientes para as plantas. Não foi verificado potencial genotóxico, citotóxico e mutagênico nas doses de AH, com exceção da concentração 1 mM C L^{-1} a qual apresentou mutagenicidade. O vegetal apresentou respostas significativas em seu crescimento e teores fotossintéticos. Foi notado aumento significativo na expressão de enzimas do estresse oxidativo dependendo da dose e tratamento. Para a enzima ATPase o resultado foi expressivo em todos os tratamentos. Em geral, a integração das análises realizadas permitiu concluir que o AH promove mudanças benéficas no desenvolvimento do vegetal e desta forma, pode ser considerado como um bom destino final para o lodo de esgoto sanitário.

Palavras-chaves: ácido húmico; *Allium cepa*; análises bioquímicas; desenvolvimento vegetal; *Oryza sativa* L..

1. Introdução

O tratamento de águas residuais urbanas inclui várias etapas que resulta na geração de lodo de esgoto, um resíduo que apresenta diferentes níveis químicos e biológicos de acordo com o método de estabilização utilizado (Kelessidis e Stasinakis, 2012).

A composição média do esgoto aponta para uma mistura de água (99,9 %) e sólidos (0,1%) sendo que, do total de sólidos, 70% são orgânicos (proteínas, carboidratos, gorduras) e 30% inorgânicos (partículas minerais, sais e metais). Durante o processo de tratamento do resíduo sólido, ocorre a separação por decantação das frações sólidas e líquidas onde a fase líquida é composta por esgotos domésticos, águas de infiltração e despejos industriais e a sólida denominada de lodo de esgoto (Lima et al., 2011). O tratamento de esgotos resulta na produção de um lodo rico em nutrientes e matéria orgânica, denominado lodo de esgoto (Gray, 2005).

A escolha da alternativa de disposição final do lodo deve passar por avaliações de ordem técnica, econômica e ambiental, e mesmo assim cada uma delas podem apresentar potenciais impactos ao ambiente (Alamino, 2010). As alternativas mais usuais de disposição final do resíduo são aplicação agrícola, aterro controlado, reutilização industrial e incineração (Kelessidis e Stasinakis, 2012).

O lodo de esgoto sanitário é constituído de elevada carga orgânica o que possibilita a extração de substâncias húmicas e conseqüentemente do ácido húmico para sua posterior aplicação em culturas vegetais, já que estes compostos tem sido uma estratégia adotada para melhorar a qualidade do solo e restaurar sua sustentabilidade, pois ao ser extraída dos resíduos, constitui uma forma de reutilização, representando uma alternativa para reciclagem agrícola.

As substâncias húmicas (SH) compreendem um grupo de compostos de carbono gerados na decomposição dos resíduos orgânicos que sofrem ressíntese, formando um material denominado de húmus (Stevenson, 1994). O efeito das substâncias húmicas sobre o metabolismo das plantas foi descrito 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.

Apesar das diversas vantagens para a planta com a aplicação das substâncias húmicas, é necessário que a utilização destes derivados residuais, provenientes de compostos com comprovada toxicidade, esteja relacionada a análises de impacto ambiental, de forma a detectar poluentes e sua possível periculosidade. Testes de toxicidade e genotoxicidade auxiliam nestas análises, avaliando o potencial tóxico de sedimentos (Mozeto et al., 2006), expondo organismos à várias concentrações de substâncias para avaliar a influência genética de cada interação (Oliveira et al., 2006).

As análises de crescimento consistem em um método que descreve as condições morfofisiológicas da planta (Magalhães, 1979) frente a um tratamento. Assim como outros parâmetros fisiológicos, a análise de crescimento é, também, um instrumento que tem sido usado com o objetivo primordial de gerar descrição clara do padrão de crescimento da planta ou de partes dela, permitindo comparações entre situações distintas, podendo ser aplicada às mais diversas modalidades de estudos (Nogueira; Conceição, 2000). Esta análise permite observar respostas da *Oryza sativa* sob aplicação de AH proveniente do lodo de esgoto.

Os biomarcadores bioquímicos são essenciais na avaliação da resposta enzimática do estresse oxidativo, pois diante de um estresse o vegetal produz EROs (espécies reativas de oxigênio) e estas são extremamente tóxicas aos vegetais (Rossi, 2012). Para combater essas EROs as plantas dispõem de um sistema de defesa composto por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, que trabalham em conjunto e em sincronia eliminando-as (Rossi, 2012).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos fisiológicos, anatômicos e bioquímico da exposição da planta *Oryza sativa* L. a diferentes concentrações de ácido húmico extraído do lodo de esgoto sanitário, e efeitos citogenéticos em *Allium cepa* L., afim de investigar os possíveis riscos na utilização dos ácidos húmicos como insumo agrícola.

2. Materiais e Métodos

2.1 Extração do ácido húmico e dosagens utilizadas

A amostra de lodo de esgoto sanitário foi disponibilizada pela Companhia Espírito Santense de Saneamento (CESAN), para extração de ácido húmico. Uma amostra foi coletada para análise química e encaminhada para o centro tecnológico de análise CETAN, Vitória Espírito Santo.

Após peneiramento do lodo de esgoto seco, foram realizadas as extrações exaustivas 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⁻¹, 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 L⁻¹, em seguida, os ácidos húmicos foram lavados com água deionizada, dializados em membranas com poros 14 kDa e posteriormente liofilizados.

As dosagens do ácido húmico avaliadas foram determinadas de acordo com a os percentuais de carbono total, hidrogênio total e nitrogênio total, e oxigênio. Essa composição elementar foi realizada pelo analisador elementar automático (Leco, CHNS-932) onde foram determinadas 4 concentrações de ácido húmico (0,5; 1, 2 e 4 mM C L⁻¹) sendo estes valores baseados na literatura (Canellas et al., 2010; Canellas et al., 2012; Dobbss et al. 2010).

2.2 Sistema teste de *Allium cepa*

Para a avaliação citogenética, sementes de *A. cepa* foram expostas às diferentes concentrações de ácido húmico, proveniente de lodos de esgoto sanitário. O ensaio em *A. cepa* foi realizado com base no protocolo estabelecido por Grant (1982) com adaptações, utilizando sementes, variedade Baia Periforme, de mesmo lote. Como controle negativo foi utilizado água deionizada e como controle positivo metil metano sulfonato (MMS) na concentração de 4x10⁻⁴ M.

Radículas de aproximadamente 1 cm foram coletadas e fixadas em carnoy (etanol/ ácido acético). Para a análise citogenética lâminas foram confeccionadas a

partir da regiões de meristemas onde essas foram coradas pela metodologia convencional de Feulgen. 1000 células de cada região foram contabilizadas por lâmina totalizando 5 lâmina para cada tratamento. Foram aferidos o índice de germinação, índice mitótico, índice de aberrações cromossômicas (índice de genotoxicidade) e índice mutagênico.

2.3 Ensaio em *Oryza sativa* L.

Sementes de *O. sativa* L. (BRS-Primavera, 2012, semente certificada Roraima), disponibilizadas pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo- Alegre, foram germinadas em placa de Petri contendo papel-filtro com água destilada durante sete dias. Após a emergência da radícula com média de 1 a 3 cm, estas foram selecionadas e transferidas para vasos com volume total de 1100 mL, contendo solução de CaCl_2 com diferentes concentrações de AH. CaCl_2 é o meio mínimo de nutrientes necessário para o crescimento de uma planta (Pinton et al., 1999). Para o tratamento controle, as plantas foram submetidas somente à solução nutritiva CaCl_2 . O pH das soluções foram ajustados para 5.8 - 6.0. Para a condução do experimento foi montado um sistema de hidroponia. A exposição aos diferentes tratamentos foi realizada por um período de 20 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.

2.4 Teor de pigmentos fotossintéticos

Os teores de pigmentos foram determinados pelo 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. Foi coletado 0,1 g de material foliar por indivíduo e imerso em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e incubado à 70 °C por 120 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.

2.5 Medidas de crescimento

Após o término do experimento, foram selecionados aleatoriamente cinco plântulas de *Oryza sativa* L. de cada repetição, totalizando 25 indivíduos por tratamento, a fim de realizar medidas de altura, 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 raiz por parte aérea, massa foliar específica, área foliar 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.

2.6 Densidade estomática

Para cada tratamento foram coletadas amostras das raízes e de folhas de dez indivíduos de *Oryza sativa* L. e foram analisados doze campos por lâmina. Para a análise quantitativa as amostras foram fixadas e armazenadas em álcool etílico 70%. Das amostras de folhas foram realizadas impressões abaxiais, do terço mediano da região internervural.

A densidade estomática (mm^2) foi realizada utilizando uma gota de adesivo instantâneo universal éster de cianoacrilato (Super-Bonder, EUA) em uma lâmina histológica. Doze campos ópticos aleatórios foram analisados por indivíduo, totalizando 60 campos ópticos por tratamento. Já para determinação da quantidade de raízes laterais foram contabilizados três indivíduos por tratamento totalizando em quinze indivíduos ao final.

2.7 Análise enzimática

O extrato enzimático foi preparado a partir de amostras da folha e raiz de *O. sativa* coletadas após 20 dias de exposição. A concentração de proteína total em cada amostra foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976) a 595 nm, utilizando albumina bovina sérica para determinação da curva padrão em microplaca (Dynex Technologies Ltd., USA). Para avaliação de exposição, seis biomarcadores foram avaliados: superóxido dismutase (SOD), como descrito por McCord e Fridovich (1969); catalase (CAT), conforme descrito por Beutler (1995); glutationa-S-transferase (GST), descrito por Habig e Jakoby (1981); e glutationa reduzida (GSH), descrita 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⁺-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.

2.8 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). Adicionalmente foram aplicadas análises de regressão para os dados de pigmentos fotossintetizantes.

3. Resultados e Discussão

3.1 Caracterização química dos ácidos húmicos

As análises químicas do lodo de esgoto bruto indicaram o enquadramento do resíduo no Conselho Nacional do Meio Ambiente, Brasil, em sua resolução CONAMA 357 (Tabela 1).

Na análise da composição elementar dos ácidos húmicos foram quantificados o carbono em 280 g kg^{-1} , o nitrogênio $41,45 \text{ g Kg}^{-1}$ enquanto que o hidrogênio foi de $43,37 \text{ g Kg}^{-1}$ (Tabela 2). Esses resultados foram apresentados para verificação do grau de humificação onde foram feitas relações entre C/N, H/H e O/C. A amostra possui altos teores de carbono, nitrogênio e oxigênio. Tais resultados inferem grupos funcionais químicos ricos nestes elementos tais como: carboxílicos (COOH), hidroxilas (OH), carbonilas (C=O), metóxilas (OCH₃), ocasionalmente ésteres (COOR), éteres (COC) (Hayes et al., 1989; Silva et al., 1999). O teor de N quantificado nos AH isolados de lodo de esgoto foi elevado, demonstrando assim como fonte de compostos nitrogenados armazenados (Dobbss,2010). As relações entre C/N são utilizadas para monitorar as alterações estruturais das frações húmicas das substâncias húmicas de diferentes fontes (Adani et al., 2006) sendo um indicador do estado de humificação da matéria. Na decomposição da matéria orgânica dos solos a relação C:N é muito importante para a determinação da competição entre os nutrientes essenciais para a atividade dos microorganismos do solo (Luchese et al., 2002). Conforme a análise da Tabela 2, a alta relação C/N e a baixa relação H/C são consideradas indicadoras de um alto grau de estabilidade do húmus e de uma grande quantidade de estruturas condensadas (Stevenson, 1994), que têm sido tradicionalmente interpretadas como índices de avanço da “humificação”, indicando desta forma que o ácido húmico proveniente do lodo de esgoto possui alto grau de humificação.

3.2 Análise citogenética pelo sistema de *Allium cepa*

Os resultados da exposição de *A. cepa* à diferentes concentrações de ácidos húmicos são exibidos na Tabela 3. Não foram observadas alterações na frequência de germinação, no comprimento da raiz e no índice mitótico para os diferentes tratamentos com ácidos húmicos analisados. Apesar do ácido húmico promover o crescimento de raízes (Dobbss et al., 2010), neste trabalho não foi evidenciado este efeito nem no comprimento de raiz nem no índice mitótico que são parâmetros que avaliam o crescimento vegetal no teste *A. cepa*. Feretti et al. (2012) não observaram influência dos AH no desenvolvimento da radícula na avaliação da comparação entre AH oriundos de diferentes substâncias, corroborando com o resultado apresentado neste trabalho.

Em relação ao índice de genotoxicidade também não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com ácido húmico em relação ao controle negativo (Tabela 3). O índice de genotoxicidade remete a alterações cromossômicas que ocorrem durante a divisão celular e podem ser passíveis de reparo (Leme e Marin-Morales, 2008; Fernandes et al., 2009).

O índice de mutagenicidade se dá a partir da avaliação do número de células portadoras de micronúcleo e quebras cromossômicas. Não foi observado efeito mutagênico nos diferentes tratamentos com os ácidos húmicos, com exceção na concentração 1 mM C L^{-1} . Esse resultado aponta que o AH na concentração de 1 mM C L^{-1} causa dano que não são passíveis de mecanismos de reparo. Contudo, é necessária investigação mais detalhada com outros testes e organismos para evidenciar os efeitos mais precisos dos AH sobre o material genético.

3.3 Teor de pigmentos fotossintéticos

Nas análises de pigmentos por meio do SPAD e parâmetros fisiológicos como clorofila a, clorofila b, clorofila total e carotenoides, todos obtiveram resultados significativos nas maiores concentrações do tratamento (2 mM C L^{-1} e 4 mM C L^{-1}) demonstrando um aumento conforme a concentração aumentou. A clorofila a também apresentou diferença significativa quando comparado ao controle (Tabela 4 e Figura 1). O teor de clorofila nas folhas é influenciado por diversos fatores bióticos e abióticos, estando diretamente relacionado com o potencial de atividade fotossintética das plantas. Uma planta com alta concentração de clorofila é capaz de atingir taxas fotossintéticas mais altas, pelo seu valor potencial de captação de “quanta” na unidade de tempo. Entretanto, nem sempre esta relação existe pois a etapa bioquímica da fotossíntese (fase do escuro) pode limitar o processo (Porra et al, 1989; Chappelle e Kim, 1992). Nossos resultados corroboraram com os trabalhos de Nardi et al. (2002) e Ertani et al. (2013) que concluíram que o tratamento de plantas com SH aumenta o teor de clorofila, influenciando diretamente nas taxas fotossintéticas das plantas.

Os carotenóides têm papel importante no complexo de captura de luz e na fotoproteção dos fotossistemas. Vários estudos têm relatado que estes compostos são

muito importante na proteção da reação de fotossíntese contra fotodanos por interconversões entre as moléculas de xantofila (Young et al., 1997; Ort, 2001).

A variação da razão da clorofila total/carotenoide se mostra bom indicador de estresse em plantas (Hendry e Price, 1993), porém, não foi observado diferença significativa neste parâmetro podendo inferir que não foi gerado estresse na planta após o tratamento com ácido húmico (Tabela 4 e Figura 1).

3.4 Medidas de crescimento

Na análise do crescimento do vegetal, foi observado que o comprimento de raiz nas maiores concentrações (2 mM C L⁻¹ e 4 mM C L⁻¹) apresentaram valores significativamente elevados (Tabela 5). 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). A razão CR/ MSR (comprimento de raiz/ Massa seca de raiz) também obteve aumentos significativos nas maiores concentrações (2 mM C L⁻¹ e 4 mM C L⁻¹).

A altura da planta de arroz, após os tratamentos com ácidos húmicos, foi dose dependente, porém neste parâmetro não houve resultados significativos (Tabela 5). As SH tem relação na regulação de mecanismos envolvidos na estimulação do crescimento vegetal (Dobbss et al., 2007; Palanivell et al., 2013).

Os outros indicadores de crescimento tais como: altura da planta, número de folhas, massa seca raiz/ massa seca de P.A., área foliar/ massa seca P.A., Massa seca P.A./ Massa seca total, massa seca da raiz/ massa seca total e raiz lateral (Tabela 5) não obtiveram resultados significativos provavelmente devido ao pouco tempo de exposição.

3.5 Análises anatômicas

Em relação as análises anatômicas foram mensurados a quantidade de estômatos na folha. A concentração de 2 mM C L⁻¹ foi a única que apresentou aumento significativo no número de estômatos (Tabela 5). Esse resultado corroborou com o

trabalho realizado por Palanivell et al. (2013) onde os autores relatam que materiais húmicos com diferentes massas moleculares promoveram aumentos na quantidade de estômatos e alterações no mecanismo de abertura e fechamento estomático. Portanto, no tratamento com ácido húmico na dose de 2 mM C L⁻¹ houve aumento na densidade estomática. Os estômatos são órgãos de extrema importância na avaliação anatômica pois são responsáveis pela transpiração e pelo controle das trocas gasosas com o meio ambiente, influenciando diretamente a fotossíntese e conseqüentemente, a produtividade vegetal (Silva et al.,2004 e Azevedo et al.,2012).

3.6 Biomarcadores bioquímicos

Enzimas do estresse oxidativo são marcadores bioquímicos do estresse oxidativo que elas evidenciam a resposta da planta/organismo frente a um estresse biótico ou abiótico (Rossi, 2012). Qualquer estresse provoca a produção destas enzimas no organismo para acionar a defesa bioquímica contra a produção de ERO's (Espécies reativas de Oxigênio). Frente a isso, com a aplicação do ácido húmico em diferentes concentrações na planta de arroz observou-se um aumento na produção da enzima catalase (CAT) na raiz tratada com a dose 2 mM C L⁻¹, e na folha tratada com 4 mM C L⁻¹ (Tabela 6). Este aumento da enzima CAT demonstra (Muscolo et al., 2007) a capacidade de estimulação de síntese/atividade de proteínas e enzimas em diversos órgãos das plantas. A catalase (CAT) é responsável pela inativação do H₂O₂ formado durante a conversão do glicolato a glioxalato que ocorre durante a fotorrespiração, onde o peróxido é convertido pela enzima em H₂O e O₂ (Igamberdiev e Lea, 2002).

Para a enzima GST (glutathionas S-transferases) foi verificado alto teor quando comparada ao controle nas plantas tratadas com 0,5 mM C L⁻¹ e 4 mM C L⁻¹. Porém, na dose 2 mM C L⁻¹ foi verificado uma redução da síntese/atividade desta enzima (Tabela 6). A GST é uma enzima que catalisa a conjugação de GSH à substratos hidrofóbicos eletrofílicos, como xenobióticos (Dixon et al., 2002). Uma possível hipótese que justifique a redução da atividade da GST é o processo de biotransformação pelo sistema enzimático que leva à formação de compostos (metabólitos secundários) que podem inibir ou ativar esta enzima já que SH possuem uma variedade de grupos funcionais, assume-se que especialmente as enzimas de fase 2 do sistema de

biotransformação estão sujeitos a indução e modulação por exposições à SH (Wiegand et al., 2006, Menzel et al., 2005, Cazenave et al., 2006). Enquanto nas outras doses houve aumento desta enzima indicando que o AH promoveu sua síntese como verificado por Pflugmacher et al. (2001) onde houve exposição à relevantes concentrações ambientais de SH (0.5 mg/L) levando a ativação do microsomo e GST solúvel em *Ceratophyllum demersum*.

A diferença entre CAT e APX é que a segunda é responsável pela modulação fina das EROs por sinalização, enquanto que a CAT é responsável pela remoção de ERO's durante estresse (WILLEKENS et al., 1997). A enzima APX (ascorbato peroxidase) é responsável pela degradação do H_2O_2 utilizando o ascorbato como substrato agindo na defesa de tecidos fotossintéticos contra o estresse fotoxidativo (Rossi,2012). Quanto à sua atividade exposta ao AH foi notado aumento em folhas tratadas com 1 mM C L^{-1} e também aumento em raízes tratadas nas doses $0,5\text{ mM C L}^{-1}$ e 2 mM C L^{-1} quando comparadas ao controle (Tabela 6). Diversos trabalhos confirmam este resultado indicando que há aumento da atividade enzimática de CAT, SOD e APX quando submetidas à bioestimulantes (Zhang e Ervin, 2004; Zhang e Schmidt,1999).

A SOD (superóxido dismutase) é considerada a primeira linha de defesa com os danos causados pelas ERO's atuando na dismutação de $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 (Alscher et al., 2002). Desta forma, ela interfere na concentração das duas ERO's envolvidas na reação de Haber-Weiss, fazendo parte do mecanismo central de defesa dos organismos, evitando a formação do radical $\bullet OH$ – ERO mais reativa (León et al., 2002). O resultado desta enzima mostrou a concentração $0,5\text{ mM C L}^{-1}$ como a de maior atividade em folha e raiz (Tabela 6). Há evidências a respeito do AH promover a atividade da SOD (Zhang et al.,2004), apesar de estudos reportarem a estimulação da produção da SOD por substâncias húmicas (Cordeiro et al., 2011; Schiavon et al., 2010), neste trabalho ratificou-se a promoção a partir do ácido húmico.

As H^+ - ATPases têm papel central no balanço energético celular e na promoção do enraizamento, uma vez que fornecem energia para os transportadores de íons localizados na membrana plasmática e geram o gradiente eletroquímico responsável pela polarização da membrana plasmática (Dobbss, 2010) tornando-a mais permeável. Conforme demonstrado em diversos estudos (Façanha et al., 2002; Canellas et al. 2002; Zandonadi et al., 2007 e Canellas et al., 2010). Os AH de massa elevada (pelo

menos maior que 14 kDa) isolados de vermicomposto apresentaram estímulos sobre a atividade de hidrólise e transporte de H^+ das H^+ - ATPases de MP isoladas de raízes, corroborando com os resultados apresentados neste trabalho que apresentou aumento significativo da ATPase total em todos os tratamentos por AH, tanto na raiz quanto nas folhas, com exceção da raiz tratada com a dose 1 mM C L^{-1} que obteve um aumento não expressivo comparado ao controle (Tabela 6). Quanto ao resultado da enzima H^+ - ATPases foi observado elevada ativação desta, comparado ao controle, em todos os tratamentos tanto nas raízes quanto em folhas confirmando esta característica intrínseca dos AH (Tabela 6).

Nos resultados relacionados a esta enzima houve a estimulação de sua atividade apenas na concentração $0,5 \text{ mM C L}^{-1}$ em raiz (Tabela 6). Nos tratamentos 2 mM C L^{-1} e 4 mM C L^{-1} apresentou significativa diminuição desta enzima (Tabela 6). E, na concentração 1 mM C L^{-1} não houve diferença com o controle (Tabela 6). GSH (glutathionas S-transferases) catalisam a conjugação de GSH à substratos hidrofóbicos eletrofílicos, como xenobióticos (Dixon et al., 2002). São proteínas encontradas preferencialmente no citoplasma (Marrs, 1996). A GSH possui importante função como substrato para a remoção de H_2O_2 pela glutathiona peroxidase, convertendo-se para forma oxidada, o que previne a peroxidação dos lipídios e reage com o $\bullet OH$ e $1O_2$, protege os grupos SH (sulfidrilas) das enzimas essenciais ao metabolismo da célula, sendo oxidada no lugar destas, e tem o papel importante de regenerar o AA (ácido ascórbico) (Foyer et al.1994).

5. Conclusão

Com finalidade de avaliar os efeitos promovidos pelos AH de lodo de esgoto sanitário em *O. sativa*, foram avaliadas as respostas fisiológicas e bioquímicas das plantas. Com base na caracterização química o AH apresentou taxas elevadas de C, H e N que são elementos essenciais para o vegetal. Houve aumento expressivos da concentração de pigmentos, assim como no comprimento de raiz, evidenciando o início do desenvolvimento do vegetal. Foi observado aumento da expressão da ATPase e das enzimas do estresse oxidativo. Além disso, a concentração 2 mM C L⁻¹ foi a que melhor proporcionou resposta no crescimento de *O. sativa*. Com base em todas as variáveis avaliadas concluímos que o AH do lodo de esgoto tem influência positiva nas plantas, sugerindo seu uso como insumo agrícola como alternativa para o resíduo de forma sustentável.

Referências bibliográficas

ADANI, F.; GENEVINI, P.; TAMBONE, F.; MONTONERI, E. Compost effect on soil humic acid: A NMR study. **Chemosphere**, v.65, p.1414–1418, 2006.

ALAMINO, R.C.J. **A utilização de lodo de esgoto como alternative sustentável na recuperação de solos degradados: Viabilidade, avaliação e biodisponibilidade de metais.** Rio de Janeiro, 2010. xxi, 221 f. Tese (Doutorado em Geologia)- Programa de Pós-Graduação em geologia, Instituto de Geociências, Universidade Federal do rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p1331–1341, 2002.

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.

AZEVEDO, C.F.; BRUNO, R.L.A; QUIRINO, Z.G.M.; REGO, E.R.; GOMES, K.R.; BEZERRA, A.K.D. Efeito de sistemas de consórcio e inseticida na formação dos estômatos em plântulas de erva-doce (*Foeniculum vulgare* Mill.) **Revista Brasileira De Plantas Mediciniais**, v.14, 2012.

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

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⁺-ATPase activity in maize roots. **Plant Physiology**, v.130, p.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.

CAZENAVE, J.; DE LOS ANGELES BISTONI, M.; ZWIRNMANN, E.; WUNDERLIN, D. A.; WIEGAND, C. Attenuating effects of natural organic matter on microcystin toxicity in zebra fish (**Danio rerio**) embryos – benefits and costs of microcystin detoxication. **Environmental Toxicology**, v. 21, p. 22–32, 2006.

CHAPPELLE, E.W.; KIM, M.S. Ratio analysis of reflectance spectra (RARS): na algorithm for a remote estimation of the concentracions of clorophyll A, chorophyll B, and carotenoids in soybean leaves. **Remote Sensing of Environment**, v. 39, p. 239-247, 1992.

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

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.

DIXON, D.P.; LAPHORN, A.; EDWARDS, R. Plant glutathione transferases. **Genome Biology**, v.3, p.1-10, 2002.

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.

FAÇANHA, A.R.; FAÇANHA, A.L.O.; OLIVARES, F.L.; VELLOSO, A.C.X.; BRAZ-FILHO, R.; SANTOS, G.A.; CANELLAS, L.P. Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.1301-1310, 2002.

ERTANI, A.; SCHIAVON, M.; MUSCOLO, A.; NARDI, S. Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. **Plant & Soil**, v. 364, Issue 1/2, p.145, 2013.

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.

FERETTI, D.; CERETTI, E.; GUSTAVINO, B.; ZERBINI, I.; ZANI, C.; MONARCA, S.; RIZZONI, M. Ground and surface water for drinking: a laboratory study on genotoxicity. **Journal Public Health Research**, v.7, p.31–37, 2012.

FOYER, C.H., NOCTOR, G. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplast, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v.119, p.355-364, 2003.

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

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**, Amsterdam, v. 99, n. 3, p.273- 291, 1982.

GRAY, N.F. An introduction for environmental scientists and engineers. **Water technology**, p.645, 2005.

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

HAYES, M.H.B; MACCARTHY, P; MALCOLM, R.L.; SWIFT, R.S. Humic Substances II. **In Search of Structure**. West Sussex, UK: John Wiley & Sons Ltd. p.733, 1989.

HENDRY, G.A.F.; PRICE, A.H. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. **In: Hendry, G.A.F., Grime, J.P. (Eds.)**. Methods in Comparative Plant Ecology, p.148–152, 1993.

HUNT, L.A.; YAN, W.K. Biplot analysis of diallel data. **Crop Science**, v.42, p.21-30, 2002;

IGAMBERDIEV, A.U.; LEA, P.J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. **Phytochemistry**, v. 60, p.651-674, 2002.

KELESSIDIS, A.; STASINAKIS, A.S. Comparative study of the methods used for treatment and final disposal of sewage sludge in European countries. **Waste Managment**, v. 32, p.1186-1195, 2012.

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.

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.

LEÓN, A.M.; PALMA, J.M.; CORPAS, F.J.; GOMEZ, M.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; CHATTERJEE, D.; MATEOS, R.M.; DEL RIO, L.A. Sandalio LM. Antioxidative enzymes in cultivars of peppers plants with different sensitivity to cadmium. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, p.813-820, 2002.

LEYSER, O.; FITTER, A. Roots are branching out in patches. **Trends Plant Science**, v.3, p.203–204, 1998.

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.

LIMA, A.A.; ALVARENGA, M.A.R.; RODRIGUES, L.; CARVALHO, J.G. Concentração foliar de nutrientes e produtividade de tomateiro cultivado sob diferentes substratos e doses de ácidos húmicos. **Horticultura Brasileira**, v.29, p.63-69, 2011.

LUCHESE, E.B.; FAVERO, L.O.B.; LENZI, E. **Fundamentos da Química do Solo Teoria e Prática**. 2ª ed. Freitas Bastos, Rio de Janeiro, 2002.

MARRS, K.A. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant, Molecular Biology**, v.47, p.127–158, 1996.

MAGALHÃES, A.C.N. Análise quantitativa do crescimento. In: **FERRI, M. G. (Coord.). Fisiologia vegetal 1**. São Paulo: EPU. Ed. da Universidade de São Paulo, v.1, cap. 8, p.331-350, 1979.

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

MENZEL, R.; STURZENBAUM, S.; KULAS, J.; BARENWALDT, A.; STEINBERG, C. E. W. Humic material induces behavioral and global transcriptional responses in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Science Technology**, v.39, p. 8324-8332, 2005.

MOZETO, A.A. Sedimentos e particulados lacustres: amostragens e análises biogeoquímicas. In: **Amostragem em Limnologia**, São Carlos, Rima, p.295- 317, 2006.

MUSCOLO, A.; BOVALO, F.; GIONFRIDDO, F.; NARDI, S. Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. **Soil Biology and Biochemistry**, v.31, p.1303–1311, 1999.

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. 1993. Proprietà biochimiche e fisiologiche della sostanza organica. In: **P. Nannipieri (ed.). Ciclo della sostanza organica nel suolo: aspetti agronomici, chimici, ecologici, ecologici y selvicoltureali**. Bologna: Patron, p.67-78.

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

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

OLIVEIRA, E.C.P.; LAMEIRA, A.O.; ZOGHBI, M.G.B. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju, PA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8p.14-23, 2006.

ORT, D. When there is too much light. **Plant Physiology**, v.125, p.29–32, 2001.

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**, ID. 276235, 2013.

PINTON, R.; CESCO, S.; LACOLETTI, G.; ASTOLFI, S.; VARANINI, Z. Modulation of nitrate uptake by water-extractable humic substances: Involvement of root plasma membrane H⁺-ATPase. **Plant and Soil**, v. 215, p.155-163, 1999.

PORRA, R.J.; THOMPSON, W.A.; KRIDEMANN, P. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophylls standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimic et Biophysica Acta**, v.975, p. 384-394, 1989.

ROSSI, M.F. **Mecanismo antioxidante em plantas**.10^o mostra acadêmica UNIMEP.10^o Simpósio de ensino de graduação.23-25/10/2012.

SCHIAVON, M.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A.; VACCARO, S.; FRANCIOSO, O.; NARDI, S. High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.) **Journal of chemical ecology**, v.36, p.662-669, 2010.

SILVA, S.; RICARDO M.; ANDRÉ, J.; SIEWERDT, L.; JÚNIOR, S. 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.

SILVA, L.M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V.J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, p.120-122, 2004.

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

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.

YOUNG, A.J.; LOWE, G.M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, p. 20-27, 2001.

ZANDONADI, R.P. Atitudes de risco do consumidor em restaurantes de auto-serviço. **Revista Nutrição**, vol.20, n.1, p.19-26, 2007.

ZHANG, X.; SCHMIDT, R.E. Antioxidant response to hormone-containing product in Kentucky bluegrass subjected to drought. **Crop science**, v. 39, p.545-551, 1999.

ZHANG, X.; ERVIN, E.H. Cytokinin-containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokinins and drought resistance. **Crop Science**, v.44, p.1737-1745, 2004.

Figuras e Tabelas

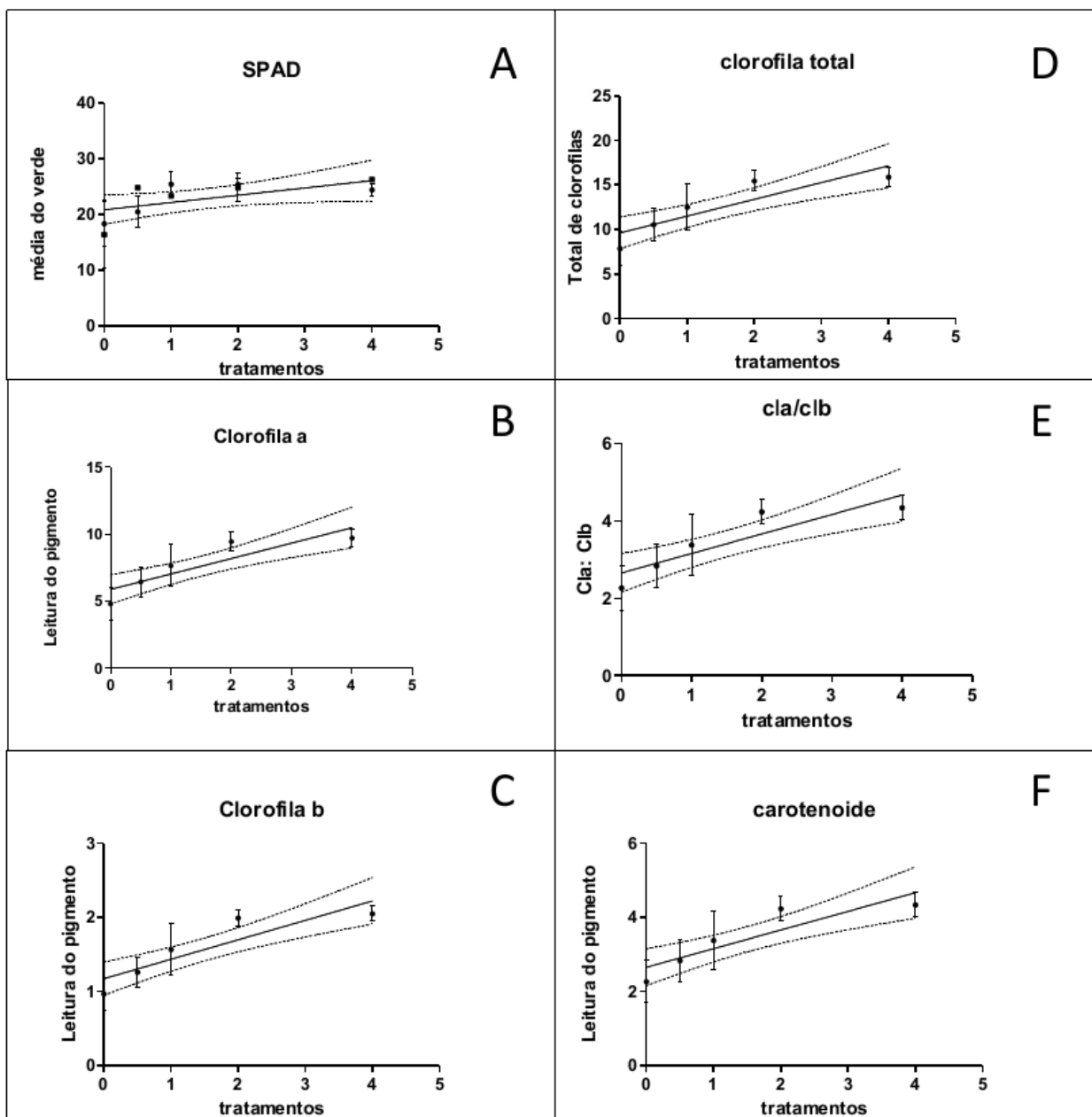


Figura 1. Resposta de dose-dependência dos pigmentos fotossintetizantes de *O. sativa* (A) valores da leitura SPAD; (B) quantidade de clorofila *a*; (C) quantidade de clorofila *b*; (D) quantidade de clorofila total; (E) relação clorofila *a/b*; (F) quantidade de carotenóides.

Tabela 1. Caracterização química do lodo de esgoto bruto para enquadramento nas condições estabelecidas pela legislação.

Parâmetro	Lodo de Esgoto Bruto
Benzenos clorados	
1,2-Diclorobenzeno	< 0,0001
1,3-Diclorobenzeno	< 0,0001
1,4-Diclorobenzeno	< 0,0001
1,2,3-Triclorobenzeno	< 0,0001
1,2,4- Triclorobenzeno	< 0,0001
1,3,5-Triclorobenzeno	< 0,0001
1,2,3,4-Tetraclorobenzeno	< 0,0001
1,2,4,5-Tetraclorobenzeno	< 0,0001
1,2,3,5- Tetraclorobenzeno	< 0,0001
Esteres de ftalatos	
Di-n-butyl ftalato	< 0,001
Di (2-etiexil)-ftalato (OEHP)	< 0,001
Dimetil-ftalato	< 0,001
Fenois nao clorados	
o-Cresol	0,00019
m-Cresol	0,00015
p-Cresol'	0,00034
Fenois clorados	
2,4-Diclorofenol	< 0,0001
2,4,6- Triclorofenol	< 0,0001
Pentaclorofenol	0,00066
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH)	
Benzo(a)antraceno	< 0,0001
Benzo(a)pireno	< 0,0001
Benzo(k)fluoranteno	< 0,0001
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	< 0,0001
Naftaleno	< 0,0001
Fenantreno	< 0,0001
Lindano	< 0,0001
Poluentes orgânicos persistentes (POP)	
Aldrin.	< 0,0001
Dieldrin	< 0,0001
Endrin	< 0,0001
Clordano	< 0,0001
Heptacloro	< 0,0001
DDT	< 0,0001
Toxafeno	< 0,0001
Mirex	< 0,0001
Hexaclorobenzeno	< 0,0001
PCB (Bifenilas Policloradas)	< 0,0001
Dioxinas e Furanos	< 0,0001
Parâmetros físicos e químicos	
Nitrogênio amoniacal	9580
Nitrato	268,6

Nitrato	6,58
Mercúrio	0,04
Molibdênio	6,25
Sólidos Totais Voláteis	458.500
Parâmetros biológicos	
<i>Salmonella</i> spp.	8 UFC/10mg
Coliformes Termotolerantes	3,5 x 10 ⁸ NMP/g
Ovos viáveis de Helmintos	6 ovo/g
Adenovírus	0,5 UFP/g
Gênero Enterovirus (Poliovírus, Echovirus, Cocksackievírus)	0,75 UFP/g

Tabela 2. Caracterização do ácido húmico e do lodo de esgoto bruto. AH: ácido húmico; LES: lodo de esgoto sanitário. Valores expressos por média \pm desvio padrão. NA: não aplicável.

	AH - LES	Lodo bruto
	g Kg⁻¹	
Elementos		
Carbono	280,00 \pm 23,58	109,60 \pm 1,30
Hidrogênio	41,45 \pm 2	20,9 \pm 3,23
Nitrogênio	43,37 \pm 3,87	23,3 \pm 0,28
Oxigênio	635 \pm 28,33	NA
Relações		
C/N	64,59 \pm 0,35	NA
H/C	1,49 \pm 0,12	NA
O/C	22,86 \pm 3,08	NA
Nutrientes		
Nitrogênio total	43,26 \pm 0,04	22,47 \pm 0,02
Fósforo	4,35 \pm 0,10	3,16 \pm 0,08
Potássio	0,03 \pm 0,02	4,12 \pm 0,01
Cálcio	2,86 \pm 0,24	7,80 \pm 0,27
Magnésio	1,56 \pm 0,03	4,26 \pm 0,03
Enxofre	11,37 \pm 0,02	9,76 \pm 0,04
Ferro	27960 \pm 139,08	12420 \pm 99,92
Cobre	820 \pm 2,25	156 \pm 2,89
Zinco	220 \pm 5,29	544 \pm 2,31
Manganês	40 \pm 1,15	156 \pm 4,62
Boro	1,77 \pm 0,93	3,53 \pm 0,13

Tabela 3. Avaliação citogenética de diferentes concentrações do ácido húmico proveniente do lodo de esgoto sanitário em *A. cepa* (n=5). Valores expressos em média \pm DP. CN: controle negativo, CP: controle positivo; AH: ácido húmico; LES: lodo de esgoto sanitário.

	Controle negativo	Controle positivo	AH – LES (0,5 mM C L⁻¹)	AH – LES (1 mM C L⁻¹)	AH – LES (2 mM C L⁻¹)	AH – LES (4 mM C L⁻¹)
Comprimento	1,000 \pm 0,281 ^a	0,591 \pm 0,31 ^a	0,863 \pm 0,266 ^a	1,221 \pm 0,333 ^a	1,342 \pm ,0332 ^a	1,161 \pm ,0217 ^a
Taxa de germinação (%)	0,70 \pm 0,04 ^a	0,56 \pm 0,07 ^a	0,64 \pm 0,02 ^a	0,64 \pm 0,05 ^a	0,57 \pm 0,02 ^a	0,62 \pm 0,02 ^a
Índice Mitótico	0,056 \pm 0,006 ^a	0,046 \pm 0,001 ^a	0,044 \pm 0,006 ^a	0,052 \pm 0,005 ^a	0,044 \pm 0,006 ^a	0,052 \pm 0,005 ^a
Índice de Genotoxicidade	0,060 \pm 0,004 ^a	0,04 \pm 0,00 ^a	0,04 \pm 0,00 ^a	0,05 \pm 0,00 ^a	0,04 \pm 0,00 ^a	0,05 \pm 0,00 ^a
Índice de Mutagenicidade	0,00 \pm 0,00 ^a	0,02 \pm 0,00 ^b	0,00 \pm 0,00 ^a	0,01 \pm 0,00 ^b	0,00 \pm 0,00 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a

Letras iguais para um mesmo índice não diferem significativamente (Tukey; P <0.05).

Tabela 4. Teor de pigmentos fotossintéticos em *O. sativa* para os tratamentos com diferentes concentrações de ácidos húmicos (AH) de lodo de esgoto sanitário (LES). Valores expressos por média \pm desvio padrão.

	Tratamentos				
	Controle negativo	AH – LES (0,5 M C L ⁻¹)	AH – LES (1 mM C L ⁻¹)	AH – LES (2 mM C L ⁻¹)	AH – LES (4 mM C L ⁻¹)
SPAD	17,58 \pm 1,93 ^a	22,26 \pm 1,38 ^a	24,64 \pm 0,85 ^b	25,20 \pm 0,67 ^b	25,22 \pm 0,56 ^b
Clorofila <i>a</i> (mg g ⁻¹)	4,82 \pm 0,68 ^a	6,47 \pm 0,64 ^a	7,67 \pm 0,91 ^a	9,47 \pm 0,41 ^b	9,73 \pm 0,39 ^b
Clorofila <i>b</i> (mg g ⁻¹)	0,97 \pm 0,13 ^a	1,26 \pm 0,11 ^a	1,57 \pm 0,20 ^b	1,99 \pm 0,06 ^b	2,05 \pm 0,06 ^b
Clorofila total (mg g ⁻¹)	7,86 \pm 1,12 ^a	10,56 \pm 1,05 ^a	12,52 \pm 1,48 ^a	15,46 \pm 0,67 ^b	15,88 \pm 0,65 ^b
Carotenóides (mg g ⁻¹)	2,27 \pm 0,33 ^a	2,84 \pm 0,32 ^a	3,38 \pm 0,45 ^a	4,24 \pm 0,18 ^b	4,34 \pm 0,18 ^b
Clr. <i>a</i> / Clr. <i>b</i>	4,96 \pm 0,26 ^a	5,11 \pm 0,05 ^a	4,90 \pm 0,06 ^a	4,74 \pm 0,06 ^a	4,74 \pm 0,06 ^a
Clr. total/ Carot.	3,48 \pm 0,13 ^a	3,72 \pm 0,06 ^a	3,72 \pm 0,07 ^a	3,65 \pm 0,06 ^a	3,65 \pm 0,00 ^a

Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente (Teste de Tukey; $P < 0.05$).

Tabela 5. Análise de crescimento e anatômica de *O. sativa* para os tratamentos com diferentes concentrações de ácidos húmicos (AH) provenientes de lodo de esgoto sanitário (LES). CR: comprimento da raiz; AF: área foliar; AR: área radicular; MSR: massa seca radicular; MSPA: NF: número de folhas; RL: raízes laterais; MSPA: massa seca da parte aérea; MFPA: massa fresca da parte aérea; MST: massa seca total.

Parâmetros	Tratamentos				
	Controle negativo	AH – LES (0,5 mMC L ⁻¹)	AH – LES (1 mMC L ⁻¹)	AH – LES (2 mMC L ⁻¹)	AH – LES (4 mMC L ⁻¹)
Altura (cm)	7,27 ± 0,43 ^a	8,35 ± 0,56 ^a	8,74 ± 0,55 ^a	8,87 ± 0,34 ^a	8,50 ± 0,49 ^a
CR (cm)	12,2 ± 0,32 ^a	13,16 ± 0,43 ^a	13,1 ± 0,41 ^a	14,64 ± 0,42 ^b	14,45 ± 0,31 ^b
NF	4,6 ± 0,36 ^a	5,12 ± 0,18 ^a	4,92 ± 0,23 ^a	4,80 ± 0,22 ^a	5,72 ± 0,29 ^a
MSR/ MSPA (g)	0,035 ± 0,002 ^a	0,037 ± 0,002 ^a	0,957 ± 0,063 ^a	0,852 ± 0,063 ^a	0,872 ± 0,075 ^a
AF/MSPA (cm ² g)	0,035 ± 0,002 ^a	0,037 ± 0,002 ^a	0,957 ± 0,063 ^a	0,852 ± 0,063 ^a	0,872 ± 0,075 ^a
CR/ MSR (cm g)	12,20 ± 0,12 ^a	13,16 ± 0,79 ^a	13,10 ± 0,68 ^a	14,64 ± 0,30 ^b	14,45 ± 0,16 ^b
MSPA/ MST (g)	0,49 ± 0,01 ^a	0,50 ± 0,01 ^a	0,52 ± 0,00 ^a	0,51 ± 0,00 ^a	0,49 ± 0,01 ^a
MSR/ MST (g)	0,50 ± 0,01 ^a	0,49 ± 0,01 ^a	0,48 ± 0,00 ^a	0,49 ± 0,00 ^a	0,50 ± 0,01 ^a
RL	133,33 ± 10,39 ^a	80,33 ± 14,38 ^b	159,66 ± 4,41 ^a	140,66 ± 12,33 ^a	166,33 ± 3,84 ^a
Estômatos	1800 ± 198,31 ^a	2322,66 ± 130,54 ^a	2686 ± 305,42 ^a	2850,66 ± 152,18 ^b	2530 ± 143,42 ^a
Raízes laterais	133,33 ± 10,39 ^a	80,33 ± 14,38 ^b	159,66 ± 4,40 ^a	140,66 ± 12,33 ^a	166,33 ± 3,84 ^a

Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente (Teste de Tukey; $P < 0.05$). Valores expressos por média ± desvio padrão.

Tabela 6. Análises bioquímicas realizadas em plântulas de *O. sativa* expostas por 20 dias às diferentes concentrações de ácidos húmicos (AH) provenientes lodo de esgoto sanitário (LES). Valores expressos por médias \pm desvio padrão. NE: não encontrado.

	Tratamentos				
	Controle negativo	AH – LES (0,5 mM C L ⁻¹)	AH – LES (1 mM C L ⁻¹)	AH – LES (2 mM C L ⁻¹)	AH – LES (4 mM C L ⁻¹)
CAT ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ mg Pt}^{-1} \text{ min}^{-1}$)					
Raiz	0,8 \pm 0,5 ^a	2,1 \pm 0,5 ^{a,b}	0,7 \pm 0,5 ^a	3,0 \pm 2,2 ^b	1,7 \pm 2,0 ^{a,b}
Folha	2,9 \pm 1,0 ^a	3,4 \pm 1,0 ^a	4,8 \pm 2,6 ^{a,b}	6,0 \pm 1,5 ^{a,b}	4,1 \pm 0,8 ^b
GST ($\mu\text{M mg Pt}^{-1} \text{ min}^{-1}$)					
Raiz	5,0 \pm 1,8 ^{a,b}	5,0 \pm 2,0 ^{a,b}	6,7 \pm 3,5 ^b	7,3 \pm 2,0 ^b	2,8 \pm 1,1 ^a
Folha	6,4 \pm 1,1 ^b	8,5 \pm 1,9 ^c	4,9 \pm 1,1 ^{a,b}	3,1 \pm 1,2 ^a	10,6 \pm 1,9 ^d
APX ($\mu\text{M Ac. A. mg Pt}^{-1} \text{ min}^{-1}$)					
Raiz	17,3 \pm 6,9 ^a	23,0 \pm 5,5 ^a	35,3 \pm 9,5 ^c	24,1 \pm 3,7 ^{a,b}	33,2 \pm 10,3 ^{b,c}
Folha	6,0 \pm 2,6 ^a	13,1 \pm 2,7 ^b	8,2 \pm 2,0 ^{a,b}	12,6 \pm 4,4 ^b	9,1 \pm 6,1 ^{a,b}
SOD (U mg Pt ⁻¹)					
Raiz	1,5 \pm 0,5 ^{a,b}	4,1 \pm 1,3 ^c	1,2 \pm 0,9 ^a	0,9 \pm 0,5 ^a	2,6 \pm 1,0 ^b
Folha	9,3 \pm 2,3 ^a	11,4 \pm 2,0 ^b	7,3 \pm 4,3 ^{a,b}	5,6 \pm 1,6 ^a	9,5 \pm 7,8 ^{a,b}
ATPase total ($\mu\text{M Pi mg Pt}^{-1} \text{ h}^{-1}$)					
Raiz	1,1 \pm 0,8 ^a	2,4 \pm 0,8 ^{b,c}	1,9 \pm 0,8 ^{a,b}	3,0 \pm 0,4 ^c	2,5 \pm 0,3 ^{b,c}
Folha	1,2 \pm 0,8 ^a	3,0 \pm 0,2 ^c	2,0 \pm 0,2 ^b	2,1 \pm 0,2 ^b	2,7 \pm 0,4 ^c
H⁺ - ATPase ($\mu\text{M Pi mg Pt}^{-1} \text{ h}^{-1}$)					
Raiz	0,9 \pm 0,5 ^a	2,0 \pm 0,8 ^{b,c}	1,6 \pm 0,6 ^{a,b}	2,7 \pm 0,3 ^d	2,3 \pm 0,3 ^{c,d}
Folha	0,8 \pm 0,6 ^a	2,0 \pm 0,2 ^c	1,4 \pm 0,2 ^b	1,5 \pm 0,3 ^{b,c}	1,7 \pm 0,4 ^{b,c}
GSH (nM mg Pt ⁻¹)					
Raiz	94,3 \pm 13,0 ^b	119,4 \pm 13,1 ^c	99,2 \pm 15,1 ^b	50,0 \pm 2,4 ^a	43,3 \pm 13,4 ^a
Folha	NE	NE	NE	NE	NE

Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente (Teste de Tukey; $P < 0.05$).