



EVERTON GERALDO DE MORAIS

**NUTRIÇÃO E CRESCIMENTO DO
EUCALIPTO: EFEITO DE FONTES E
CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDOS HÚMICOS E DE
SUA INTERAÇÃO COM OS ÁCIDOS OXÁLICO E
CÍTRICO**

**LAVRAS-MG
2017**

EVERTON GERALDO DE MORAIS

**NUTRIÇÃO E CRESCIMENTO DO EUCALIPTO: EFEITO DE FONTES
E CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDOS HÚMICOS E DE SUA INTERAÇÃO
COM OS ÁCIDOS OXÁLICO E CÍTRICO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência do Solo,
área de concentração em Fertilidade
do Solo e nutrição de Plantas, para a
obtenção do título de Mestre.

Dr. Carlos Alberto Silva
Orientador

**LAVRAS-MG
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Morais, Everton Geraldo de.

Nutrição e crescimento do eucalipto: efeito de fontes e concentrações de ácidos húmicos e de sua interação com os ácidos oxálico e cítrico / Everton Geraldo de Moraes. - 2017.

88 p.

Orientador(a): Carlos Alberto Silva.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Substâncias húmicas. 2. Bioatividade de fragmentos húmicos. 3. Agregados supramoleculares. I. Silva, Carlos Alberto. II. Título.

EVERTON GERALDO DE MORAIS

**NUTRIÇÃO E CRESCIMENTO DO EUCALIPTO: EFEITO DE FONTES
E CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDOS HÚMICOS E DE SUA INTERAÇÃO
COM OS ÁCIDOS OXÁLICO E CÍTRICO
EUCALYPTUS NUTRITION AND GROWTH: THE EFFECT OF
SOURCES AND CONCENTRATIONS OF HUMIC ACIDS AND THEIR
INTERACTION WITH OXALIC AND CITRIC ACIDS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência do Solo,
área de concentração em Fertilidade
do Solo e nutrição de Plantas, para a
obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 18 de agosto de 2017.

Dr. Jader Galba Busato

UNB

Dr. Leônidas Carrijo Azevedo Melo

UFLA

Dr. Carlos Alberto Silva
Orientador

**LAVRAS-MG
2017**

A minha mãe (Ilma) e meu pai (Baltazar) pelo amor e apoio incondicional.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos em minha vida, sempre me colocando na direção certa.

A meu pai Baltazar e minha mãe Ilma, por serem meu exemplo pessoal e meu alicerce durante toda a minha vida, pessoas de extrema importância, às quais devo tudo e não há como expressar o carinho, amor, respeito e admiração que sinto por eles.

Aos meus irmãos Herivelto, Wellington e Wanderson, minha sobrinha Maria Clara e meu sobrinho Luiz Otávio, por me trazer alegrias em momentos difíceis durante a minha caminhada.

A Débora, pelo amor, companheirismo, cumplicidade, amizade, e pelas tantas conversas e incentivos durante o decorrer do mestrado, pessoa que sempre me fez crescer profissionalmente e pessoalmente.

Ao meu orientador, Professor Carlos Alberto Silva, pela receptividade, aprendizado, sugestões e valiosas lições durante o decorrer do mestrado.

Aos meus amigos do Laboratório de Estudo da Matéria Orgânica do Solo (LE MOS), Rimena, Otávio, Murilo, Marina, pelo companheirismo e conversas, em especial à Sara, pela parceria em experimentos, e ao Henrique, pela parceria em experimentos, críticas, sugestões e ensinamentos desde o início do mestrado até o final.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processos 303899/2015-8 e 461935/2014-7), e a FAPEMIG pelo financiamento do estudo.

Ao Departamento de Ciência do Solo da UFLA. Aos professores, pelos ensinamentos e funcionários, pela ajuda e demais contribuições para realização deste trabalho.

Aos meus demais familiares e amigos, que fizeram parte do meu crescimento pessoal.

Ao Instituto Federal Minas Gerais – campus Bambuí, pela formação e ensinamentos desde o curso Técnico em Agricultura e Zootecnia até o curso superior em Agronomia.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

“Em seu coração o homem planeja o seu caminho, mas o Senhor determina os seus passos” (Provérbios 16:9)

RESUMO

Ácidos húmicos (AH) podem aumentar o crescimento e otimizar a nutrição do eucalipto. Os efeitos normalmente observados pela aplicação de AH são dependentes de concentrações e fontes de AH, que se diferenciam em composição química, massa molar e bioatividade, sendo a ação dos AH otimizada por meio de alterações no meio de crescimento que aumentem sua bioatividade, como o uso conjunto com ácidos orgânicos de baixa massa molar (AOBM). Objetivou-se avaliar os efeitos de fontes e concentrações de AH, com aplicação simultânea de AOBM, no crescimento e nutrição de mudas de eucalipto cultivadas em solução nutritiva. No primeiro experimento, adotou-se delineamento em blocos casualizados (DBC), com quatro repetições, em esquema fatorial $3 \times 4 + 1$, combinando-se três fontes de AH (AH-L1, AH-L2 e AH-Com) e quatro concentrações de C-AH (5, 10, 25 e 100 mg L^{-1}), mais um tratamento controle (cultivo somente em solução nutritiva). No segundo experimento, adotou-se o DBC, com quatro repetições, testando-se a combinação de AH e AOBM, com os seguintes tratamentos: AH+ ácido cítrico (AC) + ácido oxálico (AO); AH+AC; AH+AO; AH; AC+AO; AC; AO e um tratamento controle (cultivo somente em solução nutritiva). Ao final de cada experimento, as plantas foram coletadas e divididas em raiz e parte aérea, no experimento 1, e raiz, caule e folha, no experimento 2, sendo determinadas a produção de massa seca e o acúmulo e eficiência de absorção de nutrientes. Houve aumento no crescimento das mudas de eucalipto com a elevação da concentração de C-AH até a concentração ótima de 15 mg L^{-1} , seguido de decréscimo para concentrações superiores à ótima. Na concentração ótima de C-AH, houve maior aquisição de N, P, K, Ca, B, Cu, Zn pelas plantas, sendo a magnitude do efeito dependente da fonte de AH. Com o aumento da concentração de C-AH, houve redução na aquisição de Fe e Cu, possivelmente, devido ao aumento de ligantes orgânicos. Também foi observado, indiretamente, efeito de diferentes AOBM na desagregação do AH, por meio do aumento da relação E4/E6, que sinaliza presença no meio de cultivos de fragmentos húmicos de menor massa molar. A sinergia entre AH e AO propiciou aumento do crescimento e maior aquisição de nutrientes pelo eucalipto. A aplicação de AH com AOBM aumentou a aquisição de micronutrientes metálicos, em relação à aplicação isolada de AH, sendo essa uma estratégia importante para minimizar a redução de absorção de Fe, Cu, Zn e Mn quando a concentração de AH é elevada. A resposta de mudas de eucalipto está associada à fonte e concentrações de AH testadas e, quando há efeito positivo do AH sobre as mudas, o uso conjunto de AO potencializa os ganhos.

Palavras-chave: Substâncias Húmicas. Bioatividade de fragmentos húmicos. Agregados supramoleculares. Ácidos orgânicos. Ácido oxálico.

ABSTRACT

Humic acid (HA) may increase growth and nutrition of eucalyptus. The effects normally related to the application of HA on crops are dependent on HA concentrations sources. Humic acid differs in chemical composition, molecular weight and bioactivity. Thus, its effect on plants can be optimized through techniques that allow greater bioactivity of humid fragments by it generated in the growth media. Some low molecular weight organic acids (LMWOA) may be important organic chelates to modulate effects of humic fertilization on crops. The aims of this study were to evaluate the effects of sources and concentrations of HA, combined with simultaneous application of LMWOA, on growth and nutrition of eucalyptus seedlings grown in the Hoagland's nutritive solution. In the first experiment, a randomized block design (RBC) was used, with four replicates, in a factorial scheme $3 \times 4 + 1$, in which three sources of HA (HA-L1, HA-L2 and HA-Com) and four concentrations of C-HA (5, 10, 25 and 100 mg L^{-1}) were combined, plus a control treatment in which plants were cultivated only in nutritive solution. In the second experiment, the following treatments were tested: HA + citric acid (CA) + oxalic acid (OA); HA+CA; HA+OA; HA; CA+OA; CA; OA and a control treatment, where the seedlings were cultivated only in Hoagland's solution. At the end of each experiment, plants were collected and divided into root and shoot in experiment 1; and root, stem and leaf, in experiment 2 for determination of dry mass and nutrient accumulation and use efficiency. Eucalyptus growth increases over C-HA concentrations up to optimum rate of 15 mg L^{-1} . At the optimum concentration of C-AH, there was a greater acquisition of N, P, K, Ca, B, Cu, Zn by plants in comparison to non-humic fertilized plants. Magnitude of eucalyptus dry mass increase is HA source-dependent. With the increase of C-HA concentration, there was a reduction in Fe and Cu acquisition, possibly due to the increase of organic ligands in the growth media and the formation of organo-metallic complexes with high chemical stability. It was also observed the effect of different LMWOA in the disaggregation of HA, through the increase in the E4/E6 ratio. The combined use of HA and OA is an effective strategy to produce bioactive small humic fragments that increase plant growth and nutrient acquisition. Applying HA with LMWOA improved the acquisition of metallic micronutrients in relation to the isolated application of HA, being a strategy to minimize the decreased uptake of Fe, Cu, Zn and Mn when the HA concentration is increased. The response of eucalyptus seedlings is HA source and concentration-dependent and also rely on the synergistic effect of oxalic acid on the HA action on plants and growth media.

Keywords: Humic Substances. Bioactivity of humic fragments. Supramolecular aggregates. Organic acids. Oxalic acid.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

INTRODUÇÃO GERAL..... 12

REFERÊNCIAS..... 18

SEGUNDA PARTE-ARTIGOS*..... 22

Artigo I - Aquisição de nutrientes e crescimento do eucalipto sob efeito de fontes e concentrações de ácidos húmicos 23

Artigo II - Crescimento e nutrição do eucalipto em resposta a alterações supramoleculares de ácidos húmicos induzidas pela interação com os ácidos oxálico e cítrico 56

CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 87

PRIMEIRA PARTE

INTRODUÇÃO GERAL

Substâncias húmicas (SHs) englobam moléculas orgânicas de ocorrência natural no solo ou oriundas de materiais compostados que são, numa abordagem inicial, classificadas de acordo com a solubilidade em meios básico e ácido em diferentes frações, como: huminas, ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (STEVENSON, 1994). Ampliando e atualizando o conceito de SHs, AH são estruturas supramoleculares orgânicas que se associam predominantemente por interações fracas entre seus constituintes, notadamente por ligações do tipo *Van der Waals* e por pontes de hidrogênio (PICCOLO, 2001; SUTTON; SPOSITO, 2005). Os AH podem possuir características contrastes quanto à composição química, grupamentos funcionais, massa molar, pH, condutividade elétrica e presença na supraestrutura húmica de fragmentos bioativos, dependendo de sua fonte, do processo de extração e da base forte utilizada na extração dessas moléculas húmicas, de modo que todos esses fatores podem determinar ação diferenciada dos AH sobre a nutrição e crescimento das plantas (AZCONA et al., 2011; GÁRCIA et al., 2016; LYONS; GENC, 2016; ROSE et al., 2014)

Dentre os materiais utilizados para extração de AH tem-se: leonardita, turfa, lignita, carvão e composto, o que gera grande diversidade de materiais húmicos, o que dificulta a comparação de composição entre uma fonte de AH e outra, fator que determina ação específica de cada AH na fisiologia, nutrição e crescimento das espécies vegetais (LYONS; GENC, 2016; ROSE et al., 2014). AH provenientes de materiais compostados podem ter maior efeito no crescimento de plantas, quando comparado a outras fontes, principalmente por possuírem em sua composição compostos resultantes do processo microbiano durante a compostagem, como ácidos orgânicos de baixa massa molar (AOBM) e compostos similares a hormônios vegetais (MARTINEZ-BALMORI et al., 2014). No cultivo de pimenta, além do efeito da concentração, AH provenientes

de compostos orgânicos (AH-Com) propiciaram maior crescimento e aumento na aquisição de Fe, Cu, Zn e Mn em relação a AH extraídos de Leonardita (AZCONA et al., 2011).

Devido à vasta diversidade de AH ofertada no mercado, a concentração ótima de AH que propiciam maior crescimento e melhoria da nutrição das plantas é variável, dependente da fonte de AH. AH mais ricos em compostos mais lábeis são mais efetivos no estímulo a processos fisiológicos, do que aqueles ricos em compostos recalcitrantes, promovendo maior crescimento vegetal (GÁRCIA et al., 2016). A resposta em crescimento das plantas à aplicação de concentrações de AH, em geral, se ajusta a modelos quadráticos, tendo em vista que há acréscimo no crescimento das plantas com o aumento da concentração de AH até uma concentração ótima; a partir da concentração ótima, há redução no crescimento à medida que se eleva a concentração de AH (ROSE et al., 2014). Em revisão ampla que englobou uma série de estudos e cenários de aplicação de materiais húmicos e cultivo em solução nutritiva, segundo Chen e Aviad (1990), a concentração ótima para otimizar a nutrição e crescimento das plantas encontra numa faixa de 5 a 300 mg L⁻¹ de AH. O baixo crescimento das plantas com o aumento da concentração de AH, possivelmente, é explicado pela possibilidade de complexação de AH com nutrientes, especialmente com Fe, Cu, Mn e Zn (NUZZO et al., 2013; BOGUTA; SOKOŁOWSKA, 2016, XU et al., 2016), formando complexos organometálicos (COMs) de alta estabilidade química, devido à grande oferta de ligantes orgânicos no meio de cultivo, que pode reduzir drasticamente a aquisição de metais pelas plantas (PINHEIRO; SILVA; FURTINI NETO, 2010). O efeito da complexação de metais na absorção de nutrientes pode ser benéfico em baixas concentrações de AH, principalmente quando se utilizam moléculas húmicas mais solúveis, como aquelas extraídas em água (TOMASI et al., 2013).

Os principais fatores que determinam a biodisponibilidade de COMs são: tamanho da molécula, estabilidade química, solubilidade, característica química dos AH, concentração do metal e dos AH, pH, e afinidade do metal e dos ligantes orgânicos por formarem complexos estáveis (BOGUTA; SOKULOWSKA, 2016; COLOMBO et al., 2014; PINHEIRO; SILVA; FURTINI NETO, 2010; ROSE et al., 2014). Neste contexto, deve-se determinar concentrações ótimas para aumentar o crescimento e nutrição de plantas (LYONS; GENC; 2016), sem que haja o comprometimento da absorção de nutrientes, especialmente de micronutrientes (PINHEIRO; SILVA; FURTINI NETO, 2010), ou adotar estratégias que propiciem maior bioatividade de fragmentos húmicos no meio de cultivo. Dentre essas estratégias, a desestabilização e desagregação de moléculas húmicas em fragmentos menores pode resultar em moléculas mais bioativas (CANELLAS et al., 2008; RIMA et al., 2011). O termo bioatividade refere-se à ação mais efetiva dos fragmentos húmicos sobre as plantas, em razão do maior crescimento de raízes, parte aérea, bem como o acréscimo na aquisição de nutrientes (ZANDONADI et al., 2014).

Vários fatores contribuem para desestabilização da estrutura supramolecular dos AH, que se fragmentam em unidades menores de maior bioatividade, sendo exemplos a concentração de cátions, pH, força iônica (NUZZO et al., 2013; PALMER; VON WANDRUSZKA, 2009) e também a presença de AOBM (PICOLLO et al., 2003). A presença de AOBM no meio de cultivo, com posterior desagregação dos AH, pode originar de diferentes fontes, como a exsudação radicular, que varia com cada espécie de planta (ADELEKE; NWANGBURUKA; OBOIRIEN, 2017), pode, ainda, ser devido a aplicações diretas de AOBM juntamente com AH no meio de cultivo (CANELLAS et al., 2008; PICCOLO et al., 2003; RIMA et al., 2011). Além disso, a própria aplicação de AH pode estimular a exsudação radicular de AOBM pelas plantas (PUGLISI et al., 2013). A fragmentação de unidades de AH devido à presença

de AOBM depende da concentração e do tipo de AOBM (CANELLAS et al., 2008; PICCOLO; NARDI; CONCHERI, 1996; PICCOLO et al., 2003). Piccolo, Nardi e Concheri (1996) verificaram que, para concentrações similares de AOBM, os ácidos dicarboxílicos são mais efetivos na desagregação dos AH do que os tricarboxílicos. Nesse aspecto, espera-se que o ácido oxálico (AO), por ser um ácido dicarboxílico, possa promover maior fragmentação dos AH, em relação ao ácido cítrico (AC), que é tricarboxílico; além disso, o AO possui menor massa molar, o que permitiria maior contato com as moléculas de AH.

A desestruturação da supraestrutura molecular de AH em frações menores se explica pelo aumento do conteúdo energético nas moléculas de AH, alterando a predominância dos tipos de ligações, responsáveis pela associação de fragmentos na fração húmica. Com isso há uma transição das moléculas de AH a novas conformações predominantemente estabilizadas por ligações por pontes de hidrogênio, resultando em moléculas de menor massa molar (PICCOLO et al., 2003). O efeito sinérgico da aplicação conjunta de AH e AO é relatado por El-Shabarawai et al. (2015) e Baldotto et al. (2011), no suprimento de AH via foliar, com aumentos significativos na produção e nutrição de trigo e abacaxizeiro, respectivamente. Rima et al. (2011) verificaram que a aplicação de AC com AH potencializou os efeitos dos AH, aumentando o número de raízes fisiologicamente ativas, sendo estes um dos efeitos da aplicação de AH em plantas; além disso, a aplicação de AH pode aumentar a aquisição de nutrientes e a biomassa de plantas (CANELLAS et al., 2015).

O efeito na melhoria da nutrição de plantas com a aplicação de AH pode ser pelo aumento da quantidade de raízes (CANELLAS et al., 2015; RIMA et al., 2011), que podem absorver maior quantidade de nutrientes, ou afetar a aquisição de nutrientes de forma direta, otimizando processos de absorção, como no estímulo a transportadores específicos de nutrientes (JINDO et al., 2016; TOMASI et al., 2013), ou por meio de complexação com posterior aumento da

disponibilidade de nutrientes (ROSE et al., 2014). Os AH estimulam transportadores de P, aumentando sua aquisição pelas plantas (JINDO et al., 2016), sendo que esse efeito pode se estender a outros nutrientes, como N e Fe (TAVARES et al., 2017; TOMASI et al., 2013). Vários efeitos de ação das SHs podem estar relacionados a alterações no meio de cultivo, principalmente quando o meio é o solo, melhorando as propriedades físico químicas do solo (LYONS; GENC, 2016; ROSE et al., 2014). O cultivo em solução nutritiva permite, de certo modo, reduzir o efeito do meio de cultivo. Porém, por se tratar de um meio pouco tamponado, a presença de AH pode induzir a formação de COMs de alta estabilidade química, afetando a aquisição de nutrientes pelas plantas (PINHERO et al., 2010).

Outros efeitos nas plantas devido à aplicação de AH também são relatados, como o aumento da atividade de H⁺-ATPase de membrana plasmática (CANELLAS et al., 2015) e o aumento do processo de fotossíntese (AZCONA et al., 2011), contribuindo significativamente para o aumento na absorção de nutrientes. Um dos fatores que mais determinam o potencial de resposta a aplicação de AH é a espécie de planta, decrescendo a magnitude de resposta na seguinte ordem: monocotiledôneas > dicotiledôneas > culturas perenes, sendo que o efeito em culturas perenes ainda é muito pouco estudado (ROSE et al., 2014), principalmente aquelas de alto valor agregado, como é o eucalipto.

Em trabalho realizado por Pinheiro, Silva e Furtini Neto (2010), a resposta à aplicação de AH no crescimento e nutrição do eucalipto cultivado em solução nutritiva foi baixa, com concentrações ótimas inferiores a 5 mg L⁻¹ de AH. Silva et al. (2016), trabalhando com imersão de mudas de eucalipto antes do plantio, com produto comercial à base de SHs, mostraram incremento linear do diâmetro, altura e sobrevivências das mudas com o aumento da concentração de AH na solução de imersão. Por isso, elucidar a base agrônômica que define o potencial de resposta das culturas à aplicação de AH se torna crucial,

notadamente quanto a aspectos ligados às concentrações ótimas, fonte de SHs, bem como a estratégias a serem adotadas para potencializar os efeitos dos AH sobre a fisiologia, nutrição e crescimento de mudas de eucalipto.

As hipóteses que fundamentam este trabalho são: i) diferentes fontes de AH apresentam efeitos distintos no crescimento e na nutrição do eucalipto, sendo a magnitude do efeito dependente de concentração ótima e da fonte de AH. Em relação à fonte de AH, espera-se que aquela proveniente de composto se sobressaia em relação às demais, pela maior quantidade de nutrientes e hormônios nos materiais compostados em comparação as fontes derivadas de leonardita. ii) o efeito da aplicação de AH em mudas de eucalipto pode ser otimizado pela aplicação conjunta com AOBM, dado que alguns ácidos orgânicos podem promover mudanças na estrutura supramolecular dos AH, promovendo a exposição de unidades mais bioativas, que, por isso, otimizam o crescimento e a nutrição de mudas de eucalipto. Assim, antevê-se que o AO seja mais efetivo que o AC em expor fragmentos húmicos mais bioativos.

O presente trabalho foi dividido em dois capítulos, a saber: “Aquisição de nutrientes e crescimento do eucalipto sob efeito de fontes e concentrações de ácidos húmicos” e “Crescimento e nutrição do eucalipto em resposta a alterações supramoleculares de ácidos húmicos induzidas pela interação com os ácidos oxálico e cítrico”.

Neste contexto, objetivou-se: i) avaliar o efeito de diferentes fontes e concentrações de AH sobre a nutrição e crescimento de mudas de eucalipto cultivadas em solução nutritiva. ii) avaliar o efeito do uso de ácido oxálico e cítrico, em uso conjunto como AH, em potencializar a ação da molécula húmica sobre o eucalipto, em razão de os AOBM promoverem modificações na estrutura supramolecular, como aumento da bioatividade dos AH; assim, foi objetivo deste estudo verificar se a maior bioatividade de fragmentos de AH otimizam a nutrição e o crescimento de mudas de eucalipto.

REFERÊNCIAS

ADELEKE, R.; NWANGBURUKA, C.; OBOIRIEN, B. Origins, roles and fate of organic acids in soils: A review. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p.393-406, 2017.

AZCONA, I.; PASCUAL, I.; AGUIRREOLEA, J.; FUENTES, M.; GARCÍA-MINA, J. M.; SÁNCHEZ-DÍAZ, M. Growth and development of pepper are affected by humic substances derived from composted sludge. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 174, n. 6, p. 916-924, 2011.

BALDOTTO, GIRO, V. B.; BALDOTTO, L. E. B.; CANELLAS, L. P.; VELLOSO, A. C. X. Initial performance of pineapple and utilization of rock phosphate applied in combination with organic compounds to leaf axils. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n. 3, p. 393-401, 2011.

BOGUTA, P.; SOKOŁOWSKA, Z. Interactions of Zn(II) Ions with Humic Acids Isolated from Various Type of Soils. Effect of pH, Zn Concentrations and Humic Acids Chemical Properties. **PLoS One**, San Francisco v. 11, n. 4, p. e0153626, 2016.

CANELLAS, L. P.; TEIXEIRA JUNIOR, L. R. L.; DOBBSS, L. B.; SILVA, C. A.; MEDICI, L. O.; ZANDONADI, D. B.; FAÇANHA, A. R. Humic acids crossinteractions with root and organic acids. **Annals of Applied Biology**, Hoboken, v. 153, n. 2, p. 157-166, 2008.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; AGUIAR, N. O.; JONES, D. L.; NEBBIOSO, A.; MAZZEI, P.; PICCOLO, A. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 196, n. 1, p. 15-27, 2015.

CHEN, Y.; AVIAD, T. Effects of Humic Substances on Plant Growth, In: MACCARTHY, P.; CLAPP, C. E.; MALCOLM, R. L.; BLOOM, P. R. **Humic Substances in Soil and Crop Sciences: Selected Readings**. Chicago: International Humic Substances Society, 1990. p. 161-186.

COLOMBO, C.; PALUMBO, G.; HE, J. Z.; PINTON, R.; CESCO, S. Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes. **Journal of Soils and Sediments**, Heidelberg, v. 14, n. 3, p. 538-548, 2014.

EL-SHABRAWI, H. M.; BAKRY, B. A.; AHMED, M. A.; ABOU-EL-LAIL, M. Humic and Oxalic Acid Stimulates Grain Yield and Induces Accumulation of Plastidial Carbohydrate Metabolism Enzymes in Wheat Grown under Sandy Soil Conditions. **Agricultural Sciences**, Dover, v. 6, n. 1, p. 175, 2015.

GARCÍA, A. C.; DE SOUZA, L. G. A.; PEREIRA, M. G.; CASTRO, R. N.; GARCÍA-MINA, J. M.; ZONTA, E.; LISBOA, F. J. G.; BERBARA, R. L. L. Structure-Property-Function Relationship in Humic Substances to Explain the Biological Activity in Plants. **Scientific Reports**, Londres, v. 6, n. 20798, p. 1-10, 2016.

JINDO, K.; SOARES, T. S.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, I. G.; AGUIAR, N. O.; MAZZEI, P.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; OLIVARES, F. L.; CANELLAS, L. P. Phosphorus speciation and high-affinity transporters are influenced by humic substances. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 179, n. 2, p. 206-214, 2016.

LYONS, G.; GENC, Y. Commercial Humates in Agriculture: Real Substance or Smoke and Mirrors? **Agronomy**, Basel, v. 6, n. 4, p. 1-8, 2016.

MARTÍNEZ-BALMORI, D.; SPACCINI, R.; AGUIAR, N.O.; NOVOTNY, E. H.; OLIVARES, F. L.; CANELLAS, L. P. Molecular Characteristics of Humic Acids Isolated from Vermicomposts and Their Relationship to Bioactivity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, New York v. 62, n. 47, p. 11.412-11.419, 2014.

NUZZO, A.; SÁNCHEZ, A.; FONTAINE, B.; PICCOLO, A. Conformational changes of dissolved humic and fulvic superstructures with progressive iron complexation. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 129, n. 1, p. 1-5, 2013.

PALMER, N. E.; VON WANDRUSZKA, R. The influence of aggregation on the redox chemistry of humic substances. **Environmental Chemistry**, Clayton, v. 6, n. 2, p. 178-184, 2009.

PICCOLO, A.; NARDI, S.; CONCHERI, G. Macromolecular changes of humic substances induced by interaction with organic acids. **European Journal of Soil Science**, Hoboken, v. 47, n. 3, p. 319-328, 1996.

PICCOLO, A.; CONTE, P.; SPACCINI, R.; CHIARELLA, M. Effects of some dicarboxylic acids on the association of dissolved humic substances. **Biology and fertility of soils**, New York, v. 37, n. 4, p. 255-259, 2003.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. **Soil science**, Philadelphia, v. 166, n. 11, p. 810-832, 2001.

PINHEIRO, G. L.; SILVA, C. A.; FURTINI NETO, A. E. Crescimento e nutrição de clone de eucalipto em resposta à aplicação de concentrações de C-ácido húmico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 4, p. 1217-1229, 2010.

PUGLISI, E.; PASCAZIO, S.; SUCIU, N.; CATTANI, I.; FAIT, G.; SPACCINI, R.; CRECCHIO, C.; PICCOLO, A.; TREVISAN, M. Rhizosphere microbial diversity as influenced by humic substance amendments and chemical composition of rhizodeposits. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 129, p. 82-94, 2013.

RIMA, J. A. H.; MARTIM, S. A.; DOBBSS, L. B.; EVARISTO, J. A. M.; RETAMAL, C. A.; FAÇANHA, A. R.; CANELLAS, L. P. Adição de ácido cítrico potencializa a ação de ácidos húmicos e altera o perfil protéico da membrana plasmática em raízes de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 4, p. 614-620, 2011.

ROSE, M. T.; PATTI, A. F.; LITTLE, K. R.; BROWN, A. L.; JACKSON, W. R.; CAVAGNARO, T. R. A Meta-Analysis and Review of Plant-Growth Response to Humic Substances. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 124, n. 1, p. 38-89, 2014.

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

SILVA, R. J. D.; FERREIRA JUNIOR, J. M.; SILVA, F. A.; SANTOS, A.; LIMA, S. D. O.; SILVA, R. R. D. Humic substances, purified MAP and hydrogel in the development and survival of *Eucalyptus urograndis*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 20, n. 7, p. 625-629, 2016.

SUTTON, R.; SPOSITO, G. Molecular structure in soil humic substances: the new view. **Environmental science & technology**, NW Washington, v. 39, n. 23, p. 9009-9015, 2005

TAVARES, O. C. H.; SANTOS, L. A.; FERREIRA, L. M.; SPERANDIO, M. V. L.; ROCHA, J. G.; GARCÍA, A. C.; DOBBSS, L. B.; BERBARA, R. L. L.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Humic acid differentially improves nitrate

kinetics under low- and high-affinity systems and alters the expression of plasma membrane H⁺-ATPases and nitrate transporters in rice: Humic acid alters nitrate uptake kinetics, PM H⁺-ATPases and NRT expression. **Annals of Applied Biology**, Hoboken, v. 170, n. 1, p. 89-103, 2017.

TOMASI, N.; DE NOBILI, M.; GOTTARDI, S.; ZANIN, L.; MIMMO, T.; VARANINI, Z; RÖMHELD, V.; PINTON, R.; CESCO, S. Physiological and molecular characterization of Fe acquisition by tomato plants from natural Fe complexes. *Biology and fertility of soils*, New York, v. 49, n. 2, p. 187-200, 2013.

XU, J.; TAN, W.; XIONG, J.; WANG, M.; FANG, L.; KOOPAL, L. K. Copper binding to soil fulvic and humic acids: NICA-Donnan modeling and conditional affinity spectra. **Journal of Colloid and Interface Science**, San Diego, v. 473, n. 1, p. 141-151, 2016.

ZANDONADI, D. B.; SANTOS, M. P.; MEDICI, L. O.; SILVA, J. Ação da matéria orgânica e suas frações sobre a fisiologia de hortaliças, **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 32, n. 1, p. 14-20, 2014.

SEGUNDA PARTE

Artigo 1: Versão preliminar submetida à Revista Semina: Ciências Agrárias

Artigo 2: Versão preliminar a ser submetida à Revista Journal of Soil Science
and Plant Nutrition

Artigo1. Versão preliminar submetida à Revista Semina: Ciências Agrárias

Aquisição de nutrientes e crescimento do eucalipto sob efeito de fontes e concentrações de ácidos húmicos

Eucalyptus nutrient acquisition and growth as affected by humic acid sources and concentrations

Resumo

A aplicação de ácidos húmicos (AH), no cultivo do eucalipto, pode aumentar o crescimento e a absorção de nutrientes, a depender da fonte, composição química, presença de fragmentos bioativos e concentração de AH aplicada. Objetivou-se avaliar o efeito de fontes e concentrações de AH na massa seca, aquisição e eficiência de absorção de nutrientes por mudas de eucalipto cultivadas em solução nutritiva. O experimento foi realizado em delineamento em blocos casualizados com quatro repetições em esquema fatorial $3 \times 4 + 1$, sendo testados três fontes de AH: AH comercial extraído de Leonardita 1 e 2 (AH-L1 e AH-L2) e AH extraído de composto por meio de uso de solução de KOH (AH-Com), sendo o composto produzido com carvão vegetal + esterco de galinha + casca de café. Para cada fonte de AH, foram testadas quatro concentrações de C-AH (5, 10, 25 e 100 mg L⁻¹), além do controle, no qual as mudas de eucalipto foram cultivadas somente em solução nutritiva. O experimento teve duração de 20 dias, mantendo-se três plantas por vaso. Ao final do experimento, foram avaliadas a produção de massa seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST), relação de massa seca de raiz/parte aérea e os acúmulos de N, P, K, Ca, B, Cu, Fe e Zn na parte aérea e raiz, além da eficiência de absorção desses nutrientes pelas mudas. A máxima produção de MSPA foi verificada para as concentrações de 14 e 13,5 mg L⁻¹ de C-AH, respectivamente, para AH-L1 e AH-Com. A MSR somente aumentou com o uso

de C-AH-Com, sendo a concentração ótima de C-AH de 55 mg L⁻¹. O acúmulo de Fe na parte aérea do eucalipto diminuiu com a aplicação de AH, comprometendo a translocação do nutriente da raiz para a parte aérea. Há restrição severa no acúmulo de Cu pelas plantas à medida que se aumenta a concentração de C-AH, independentemente da fonte de AH utilizado. O maior crescimento do eucalipto em concentrações s de C-AH menores que 15 mg L⁻¹ ocorre mais pelo estímulo ao crescimento da parte aérea e de raízes do que devido à maior aquisição e eficiência de absorção de nutrientes pelas plantas, sinalizando que o uso de altas concentrações de C-AH demanda maior concentração de alguns micronutrientes na solução nutritiva.

Palavras-chave: Absorção de nutrientes, bioatividade de fragmentos húmicos, complexos orgânicos-metálicos, eficiência de absorção de nutrientes, H⁺-ATPase.

Abstract

Addition of humic acid (HA) to nutritive solution can increase the growth and nutrient acquisition by eucalyptus seedlings. The magnitude of increase in plant growth and nutrient uptake rely on the source, chemical composition, presence of bioactive fragments and the concentration of HA applied. The objective of this study was to evaluate the effect of HA sources and concentrations on the dry matter, nutrient accumulation and use efficiency by eucalyptus seedlings cultivated in a nutritive solution. The experiment was carried out in a randomized block design with four replicates in a factorial scheme 3x4+1; thus, three HA sources were tested: commercial HA extracted from Leonardite 1 and 2 (HA-L1 and HA-L2) and HA extracted from compost produced with biochar+chicken manure+coffee husk, whose KOH solution was used to extract (HA-Com). HA sources were combined with four concentrations of C-HA (5,

10, 25 and 100 mg L⁻¹), in addition to a control treatment, where the eucalyptus seedlings were cultivated only in the modified Hoagland solution. The experiment lasted 20 days, maintaining three plants per pot. Shoot, root and total dry matter production, dry matter root/shoot ratio and N, P, K, Ca, B, Cu, Fe and Zn uptake by roots and their translocation to shoot as well as nutrient use efficiency were evaluated. Shoot dry mass maximum production was reached at the following HA concentrations: 14 and 13.5 mg L⁻¹ of C-AH for AH-L1 and AH-Com sources, respectively. Root growth is sharply increased over C-AH-Com concentrations, requiring more HA than the concentration required for plentiful shoot growth. Fe uptake decreases over HA-C concentrations regardless of the HA source used. Such decreased levels of Fe uptake in high-HA loaded cultivation solutions decreased Fe translocation from root to the eucalyptus shoot. Nutrient uptake and its use efficiency is increased over HA-C concentrations with a pattern characterized by maximum dry matter and nutrient uptake in an optimal HA concentration and sharp decrease in eucalyptus growth when this ideal HA concentration reached. Enhancement in eucalyptus growth in low-concentrated HA nutritive solutions is better explained by the increase in the dry mass production than by nutrient acquisition and its use efficiency by plants. Copper had its uptake sharply reduced over all HA sources and concentrations which may be due to high binding stability of the Cu-humic complexes formed in growth media rich in organic ligands. Humic acid sources can significantly increase eucalyptus seedling shoot dry mass but its effect in increasing nutrient uptake is limited to Fe and Cu. Humic acid effect on eucalyptus growth rely on the source and also on the concentration of HA-C added to the modified Hoagland nutritive solution.

Key words: Nutrient use efficiency, nutrient uptake, bioactive humic fragments, H⁺-ATPase, organic-metallic complexes.

Introdução

Ácidos húmicos (AH) são estruturas supramoleculares orgânicas que apresentam massa molar relativamente alta, na faixa de 50.000 a 100.000 Daltons (STEVENSON, 1994), que são compostos por fragmentos heterogêneos que se associam por ligações de baixa energia (PICCOLO, 2001). Já foi constatado o efeito positivo da aplicação de AH para diferentes culturas, o que demonstra o potencial de uso das substâncias húmicas (SHs) em aumentar a aquisição de nutrientes e crescimento das plantas em diferentes meios de cultivo (ROSE et al., 2014). Os efeitos relatados da aplicação de AH no crescimento e nutrição de plantas cultivadas ocorrem por ação direta nas plantas ou indireta, pela ação dos AH no meio de cultivo; por isso, na presença de SHs, há alterações na aquisição de nutrientes e crescimento das plantas (LYONS; GENC, 2016; ROSE et al., 2014). A ação direta das SHs engloba efeito similar à ação de auxinas sobre as plantas (DOBBSS et al., 2010; NARDI et al., 2016), que podem aumentar a quantidade de raízes fisiologicamente ativas (RIMA et al., 2011), otimizar a atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática, além do fato de os AH poderem estimular a atividade de transportadores de nutrientes (JINDO et al., 2016; TAVARES et al., 2017; TOMASI et al., 2014). Os efeitos indiretos são os associados com a capacidade dos AH em alterar o meio de cultivo, por alterar o pH, condutividade elétrica, complexar metais, afetando a disponibilidade de nutrientes (LYONS; GENC, 2016; PINHEIRO et al., 2010). Todos os efeitos ora mencionados na aquisição de nutrientes e crescimento das plantas dependem da fonte e concentração de AH utilizada (ROSE et al., 2014).

Os AH podem ser obtidos de turfa, leonardita, lignita, compostos e de resíduos urbanos humificados, como lodo de esgoto e composto de lixo (ROSE et al., 2014). Esta lista variada de fontes de AH engloba materiais que diferenciam-se quanto à composição química, massa molar das frações húmicas e bioatividade dos fragmentos nelas contidos, o que torna difícil antever a

eficiência agrônômica e determinar comparações e efeitos entre diferentes fontes de AH (GARCÍA et al., 2016; LYONS; GENC, 2016; ROSE et al., 2014). A estrutura, composição química e quantidade e tipos de grupamentos funcionais presentes nos AH é a chave para estabelecer a relação entre a natureza química e físico-química dos AH e seus efeitos em plantas (GARCÍA et al., 2016). AH provenientes de materiais orgânicos podem ter desempenho igual ou superior aos de outras fontes, por possuírem em sua composição outros metabolitos orgânicos, como ácidos orgânicos de baixa massa molar, hormônios, e fragmentos húmicos que se diferenciam de fontes minerais de AH, pelo fato de resultarem de metabólitos oriundos de processos microbianos intrínsecos à compostagem (MARTINEZ-BALMORI et al., 2014; ROSE et al., 2014), sendo que esse efeito é dependente também da concentração utilizada de AH, afetando a aquisição de nutrientes pelas plantas (AZCONA et al., 2011). Fontes, concentrações de AH e a espécie vegetal cultivada interagem controlando a magnitude de resposta aos AH na nutrição das plantas (AGUIAR et al., 2009; ROSE et al., 2014).

O potencial de resposta à aplicação de AH por culturas perenes é baixo, porém tal fato não pode ser considerado conclusivo, devido ao pequeno número de estudos cujo objetivo era avaliar a ação de AH em lenhosas, principalmente naquelas de importância econômica, como o eucalipto, de modo que há mais respostas à aplicação de AH para gramíneas e leguminosas (ROSE et al., 2014). Assim, o efeito dos AH sobre as plantas depende do grupo de culturas estudado e é afetado também pelas concentrações de AH, com concentrações ótimas menores para plantas cultivadas em solução nutritiva do que em solos, sendo esta resposta normalmente explicada por modelos matemáticos quadráticos, onde se tem aumento até uma concentração ótima, seguido de decréscimo de crescimento e aquisição de nutrientes pelas plantas a partir desta (ROSE et al., 2014). Pinheiro et al. (2010), cultivando mudas de eucalipto em solução

nutritiva, relatam que a concentração ótima de AH situou-se em torno de 5 mg L⁻¹ e que, com o aumento das concentrações de AH, a absorção Fe, Cu e Zn foi linearmente reduzida. A faixa de concentração ótima que assegura maior crescimento e acúmulo de nutrientes em diversas espécies vegetais encontra-se entre de 5 a 300 mg L⁻¹ de AH (CHEN; AVIAD, 1990), ao se englobar experimentos com cultivo em meio pouco ou muito tamponados. Entretanto, a concentração ótima de AH pode variar entre diferentes fontes, dado que fontes de AH que possuem compostos mais lábeis agem sobre as plantas em concentrações ótimas menores (GARCÍA et al., 2016). Segundo Rose et al. (2014) e Nardi et al. (2016), a fonte de AH modula seu efeito nas plantas em função dos seguintes fatores: alteração de pH, condutividade elétrica, concentração de nutrientes, presença de ácidos orgânicos, massa molar, presença de hormônios e outras substâncias e hormônios associados aos materiais húmicos que atuam em processos fisiológicos e bioquímicos da planta, sendo esses últimos fatores mais associados a AH derivados de matrizes compostadas.

O efeito positivo dos AH pode ser tanto pelo aumento do crescimento vegetal e maior absorção de nutrientes, como devido à maior eficiência na aquisição de nutrientes (BILLARD et al., 2014). Devido à diferença entre fontes de AH disponíveis no mercado, muitos aspectos ainda precisam ser elucidados, principalmente os ligados à concentração ótima de AH em função da fonte utilizada (ROSE et al., 2014), e se o aumento normalmente observado na aquisição de nutrientes com a aplicação de AH em baixas concentrações se dá em função do maior crescimento das plantas, estimulados pela aplicação de AH, ou em razão do acréscimo na eficiência de absorção de nutrientes. Na aquisição de nutrientes pelas plantas, os AH podem diminuir (PINHEIRO et al., 2010), aumentar (CANELLAS et al., 2015; EKINCI et al., 2015; NARDI et al., 2016), ou mesmo não alterar a absorção de nutrientes pelas culturas, dependendo das condições e características do meio de cultivo da planta.

Como os efeitos dos AH podem estar relacionados à influência do material húmico em aspectos físico-químicos no meio de cultivo, principalmente como é observado no solo (ROSE et al., 2014), o cultivo em solução nutritiva permite excluir esta influência, propiciando observar os efeitos diretos dos AH no crescimento e na aquisição de nutrientes pelas plantas. Entretanto, por se tratar de um meio pouco tamponado, os AH pode formar complexos estáveis e, ou, de baixa solubilidade com nutrientes, principalmente com metais, o que afetaria sua aquisição pelas plantas, em razão da redução em sua disponibilidade (PINHEIRO et al., 2010). O principal fator que controla a biodisponibilidade dos complexos formados entre nutrientes e AH é a sua estabilidade química (BOGUTA; SOKOŁOWSKA, 2016; NUZZO et al., 2013). Tomasi et al. (2014), em cultivo de pepino, verificaram incremento na aquisição de Fe aplicado juntamente com frações húmicas extraíveis em água. Porém, esta ligação dos AH com metais pode ser tão estável, como ocorre para alguns complexos organo-metálicos (COMs) de Cu e de Fe, em razão de ligações de alta energia que se estabelecem entre o ligante orgânico e o metal, o que resulta em complexos de alta estabilidade química (NUZZO et al., 2013; XU et al., 2016), diminuindo a aquisição pelas plantas (PINHEIRO et al., 2010).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de AH extraídos de leonardita e de composto e de suas concentrações sobre a aquisição de nutrientes e crescimento de mudas de eucalipto cultivado em solução nutritiva. São hipóteses deste estudo: i) os AH extraído de composto são mais efetivos em aumentar a produção de biomassa e o acúmulo de nutrientes do que AH extraídos de leonardita; ii) Existe uma concentração ótima de AH para o pleno crescimento do eucalipto, de modo que concentrações superiores à ideal diminuem a massa seca do eucalipto, em função da baixa eficiência das plantas em absorver Cu e Fe em ambiente com forte oferta de ligantes orgânicos que imobilizam os micronutrientes; iii) O aumento na

aquisição de nutrientes é mais relacionado a maior produção de massa e crescimento das plantas do que ao acréscimo na eficiência do uso de nutrientes.

Material e métodos

O experimento foi realizado em casa de vegetação, com cultivo em solução nutritiva de mudas clonais de eucalipto do híbrido VM 01 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis*). As mudas foram adquiridas de viveiro comercial com 1 ano e 3 meses de idade. Os tratamentos estudados consistiram na combinação de fontes de ácidos húmicos (AH) e concentrações de ácidos húmicos baseadas em seu teor de C (C-AH). Foram utilizadas 3 fontes de AH: AH-L1 e AH-L2, produtos comerciais de AH, que tem em comum, o uso da leonardita com fonte do AH, sendo extraídos com NaOH 0,5 mol L⁻¹ e KOH 0,5 mol L⁻¹, respectivamente. Além disso, foi utilizado AH-Com, que foi extraído de composto obtido após 150 dias de incubação, período equivalente à maturação completa do composto. O composto utilizado para extração de AH foi produzido segundo condições de descritas em Silva (2008), incubando-se mistura constituída de 60% (v/v) de casca de café, 30% de esterco de galinha e 10% de carvão vegetal. Ao término da compostagem, o composto foi seco, moído e teve sua composição química avaliada, seguindo marchas analíticas descritas em Higashikawa et al. (2010). Os teores de elementos químicos presentes no composto foram: 315, 16,4, 15,5, 3,5, 49,2, 3,1, 5,0, 0,44, 0,31, 1,55 g kg⁻¹, respectivamente, de C, N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn e Na, além de 4,0, 27,7, 60,3 mg kg⁻¹ de S, B e Cu, respectivamente.

A extração de AH-Com foi realizada utilizando-se solução de KOH 0,5 mol L⁻¹, conforme protocolo preconizado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas, descrito por Swift (1996). Os AH extraídos foram caracterizados quanto à sua composição química elementar (Tabela1), determinando-se os teores totais de carbono por combustão, com uso de

analisador elementar de C (TOC), de N, pelo método Kjeldahl (TEDESCO et al., 1995) e de P, K, Ca, S, Na, Fe, B, Cu, Mn e Zn segundo protocolos de digestão descrito em Malavolta (1997). Foram determinados os principais grupamentos químicos funcionais presentes na matriz húmica, segundo as assinaturas espectrais descritas em Stevenson (1994), por meio do uso da técnica de infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR-ATR). Os espectros foram gerados considerando-se a distribuição de grupamentos químicos na faixa espectral referente à região do infravermelho médio de 4000 a 800 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} (Figura 1).

Tabela 1. Composição química dos ácidos húmicos (AH) utilizados no experimento.

AH	C	N	P	K	Ca	S	Na	Fe	B	Cu	Mn	Zn
	-----g/kg-----								-----mg/kg-----			
L-1	333	7,5	0,2	3,9	5,6	4,5	71,4	11,9	13	46	19	25
Com	252	29,0	4,7	36,1	1,4	6,3	1,6	1,8	7	182	32	81
L-2	355	5,3	0,1	41,6	1,4	2,8	3,2	2,7	42	8	21	76

L-1: ácidos húmicos (AH), de leonardita extraído com NaOH, Com: AH extraído de composto com KOH; L-2: AH de leonardita extraído com KOH.

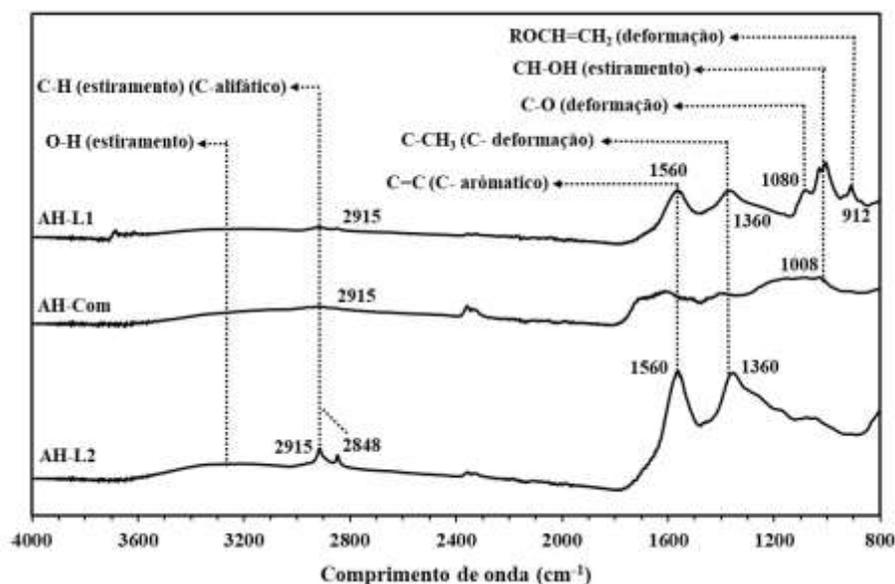


Figura 1. Análise de FTIR-ATR das amostras de ácidos húmicos (AH) utilizadas no experimento, com descrição dos principais grupos químicos funcionais presentes nos materiais húmicos. AH-L1: AH de Leonardita extraído com NaOH; AH-Com: AH extraído de composto com KOH; AH-L2: AH de Leonardita extraído com KOH.

O experimento foi realizado em delineamento em blocos casualizados com 4 repetições, em esquema fatorial $3 \times 4 + 1$, sendo combinadas três fontes de AH (AH-L1, AH-Com e AH-L2) com quatro concentrações (5, 10, 25 e 100 mg L⁻¹ de C-AH), mais o tratamento controle (cultivo somente em solução nutritiva). Foram cultivadas três plantas por vaso com capacidade de 2,3 L. As plantas, inicialmente, foram ambientadas por 21 dias em bandejas de 20 L contendo solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), com aumento gradual da força da solução nutritiva a cada 7 dias (25, 50 e 100 %). Após a etapa de ambientação, as plantas foram transferidas para os vasos contendo os tratamentos e cultivadas em solução nutritiva adaptada de Hoagland e Arnon (1950), que continha as seguintes concentrações de nutrientes: 14; 196; 31; 235; 160; 49; 68, 5, 0,8; 1; 0,20; 0,05 e 0,01 mg L⁻¹, respectivamente, para N-NH₄⁺; N-NO₃⁻; P; K; Ca; Mg; S, Fe, B; Mn; Zn; Cu e Mo. Os sais utilizados para

formulação da solução nutritiva foram provenientes de reagentes p.a. Após a adição de AH e suas concentrações na solução nutritiva, foi feito ajuste do pH da solução nutritiva para $5,5 \pm 0,2$, com adição de soluções de KOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ou de HCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Durante o período experimental, a aeração foi constante e individualizada em casa vaso.

Após um dia de cultivo, foi coletado uma alíquota de 30 ml da solução nutritiva de cada unidade experimental, para determinação do pH e condutividade elétrica (CE). As plantas foram cultivadas por 20 dias, com renovação da solução nutritiva a cada 10 dias, de modo que, no momento da troca, foram reaplicados os AH de diferentes fontes e suas concentrações testadas. No intervalo de renovação da solução nutritiva, diariamente, era completado o volume de cada vaso de cultivo, utilizando-se água deionizada. Ao final do experimento, as plantas foram coletadas, lavadas em água destilada e separadas em raiz e parte aérea e, posteriormente, secadas em estufa a 60° , por 72 horas, a fim de determinar a massa seca nos compartimentos estudados da planta. Em sequência, as amostras da parte aérea e da raiz foram moídas separadamente e passadas em peneira com malha de 1 mm, para a determinação dos teores totais de N pelo método Kjeldahl, após digestão com ácido sulfúrico (TEDESCO et al., 1995) e de P, K, Ca, B, Cu, Fe e Zn, após digestão do material vegetal em mistura de ácido nítrico: ácido perclórico, na proporção de 4:1 (MALAVOLTA, 1997). Foi calculado o acúmulo de cada nutriente, tanto na raiz, quanto na parte aérea, utilizando-se para isso o teor de nutriente no tecido vegetal, juntamente com sua respectiva produção de massa seca, de acordo com a equação 1. Também foi calculada a eficiência de absorção dos nutrientes (EAbs), baseando-se em índice proposto por Bataglia et al. (1983) (Equação 2).

$$\text{CN (mg vaso}^{-1}\text{)} = \text{MS} \times \text{Nu} \quad (\text{Eq. 1})$$

Sendo, CN o conteúdo acumulado de nutriente no compartimento da planta analisado (mg vaso^{-1}), MS a produção de massa seca do compartimento analisado (g vaso^{-1}), e Nu, o teor do nutriente no compartimento vegetal analisado (mg kg^{-1}).

$$E\text{Abs (mg g}^{-1}\text{)} = \text{CNT} / \text{MSR} \quad (\text{Eq. 2})$$

Sendo, EAbs a eficiência de absorção, CNT o conteúdo acumulado total do nutriente (mg vaso⁻¹), e MSR, a massa de seca de raízes (g vaso⁻¹)

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$), primeiramente testando-se o fatorial contra o tratamento controle. A comparação entre fontes e concentrações foi realizada de acordo com a ausência ou presença de interação entre os fatores (fontes e concentrações de AH) estudados. Foi utilizado o teste de agrupamentos de médias de Scott-Knott ($p < 0,05$), para diferenciação do efeito das fontes de AH sobre os atributos avaliados. Para as concentrações de C-AH foram ajustados modelos lineares de regressão, para explicar variações na produção de massa seca, aquisição de nutrientes e eficiência de absorção de nutrientes.

Resultados e discussão

Solução nutritiva

A aplicação de AH aumentou o pH e condutividade elétrica (CE) da solução nutritiva, em relação ao cultivo somente em solução nutritiva. O pH da solução nutritiva não foi afetado pelas concentrações de AH-Com, contudo, para as fontes provenientes de Leonardita (AH-L1 e AH-L2), houve aumento do valor de pH com o acréscimo na concentração de AH (Figura 2). A extração de AH com bases fortes, como KOH e NaOH, resultam em materiais com pH alcalino. O aumento do pH pelos AH da leonardita na solução de cultivo pode desempenhar efeito negativo na disponibilidade de nutrientes, devido a formação de complexos metálicos de maior estabilidade (BOGUTA; SOKOŁOWSKA, 2016). Após um dia de transferência das plantas de eucalipto para os tratamentos, houve redução do pH em cerca de uma unidade do valor inicial ajustado (5,5) no tratamento controle, porém observa-se que as concentrações

maiores de C-AH foram capazes de tamponar o meio de cultivo, em relação ao pH inicial. Isso mostra o potencial de acidificação promovido pelas raízes do eucalipto em meio pouco tamponado.

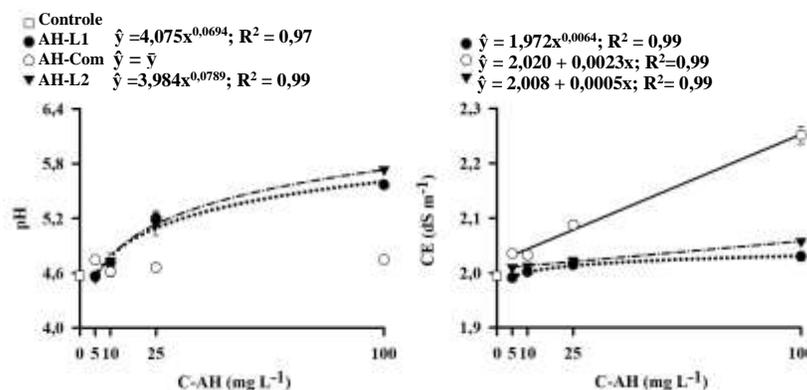


Figura 2. pH e Condutividade elétrica (CE) da solução nutritiva após um dia de cultivo em função da combinação de diferentes fontes de ácidos húmicos (AH) e concentrações de C-AH (mg L⁻¹). AH-L1: AH de Leonardita extraído com NaOH; AH-Com: AH extraído de composto com KOH; AH-L2: AH de Leonardita extraído com KOH.

Com o aumento das concentrações de C-AH, foi observado aumento da condutividade elétrica (CE), sendo o mais pronunciado o efeito para AH-Com. Este aumento da CE, foi relacionado à maior quantidade de nutrientes adicionadas em função do acréscimo nas concentrações de C-AH. Em alguns casos, este aumento da CE, para níveis acima do adequado para o eucalipto, reduz a produção de massa seca (PINHEIRO et al., 2010).

Produção de Massa seca

A produção de massa seca da parte aérea (MSPA) aumentou até a concentração de 14 mg L⁻¹ C-AH (8,22 g vaso⁻¹), para a fonte AH-L1, seguido de decréscimo para concentrações acima da mencionada (Figura 3). Para o AH-Com, foi observada a mesma tendência, porém, com concentração ótima de 13,5 mg C-AH L⁻¹ de C-AH. Não houve resposta à aplicação de concentrações de C-

AH na MSPA para o AH-L2, contudo, a MSPA aumentou em 20 e 28 % em relação as demais fontes, respectivamente para as concentrações de 5 e 100 mg L⁻¹ de C-AH. O AH-Com incrementou a produção de massa seca da raiz (MSR) até a concentração de 55 mg C-AH L⁻¹ (4,56 g vaso⁻¹), resultado bastante distinto em relação às outras fontes, pelo padrão de resposta a alta concentrações de C-AH de composto. Em função da diferença de concentrações ótimas para parte aera e raiz, é razoável que se adote a menor concentração de C-AH de composto, para que não se drene massa seca da parte aérea em função do crescimento exagerado da raiz.

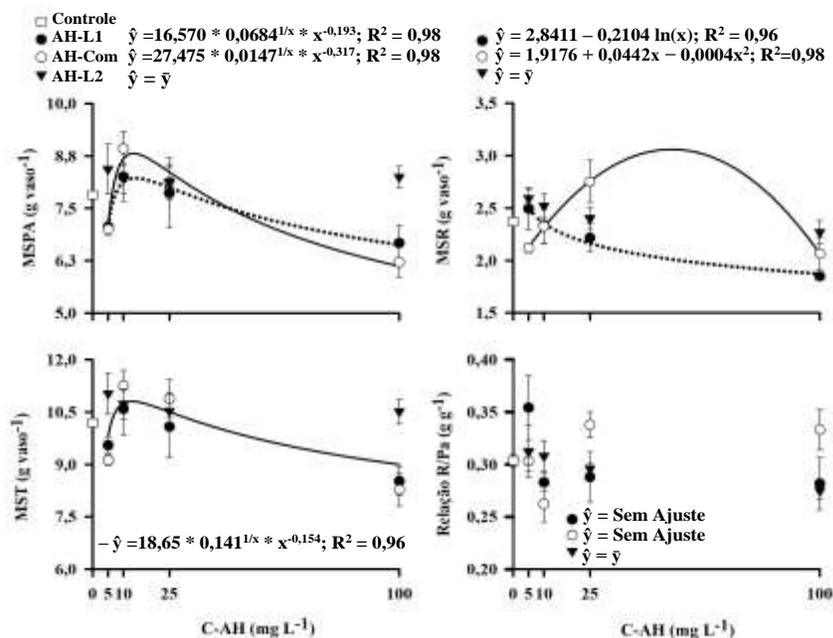


Figura 3. Produção de massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), massa seca total (MST) e relação massa seca de raiz/parte aérea (Relação R/PA), em função da combinação de diferentes fontes de ácidos húmicos (AH) e concentrações de C-AH (mg L⁻¹). AH-L1: AH de Leonardita extraído com NaOH; AH-Com: AH extraído de composto com KOH; AH-L2: AH de Leonardita extraído com KOH.

A produção de massa seca total (MST) foi influenciada somente pela concentração de AH, independentemente da fonte aplicada, sendo a máxima

produção de MST obtida na concentração de $12,6 \text{ mg L}^{-1}$ C-AH, 6% superior ao controle; foi notada redução de crescimento de mudas de eucalipto a partir desta concentração (Figura 3). Para a relação massa seca de raiz/parte aérea (R/PA), não foi possível o ajuste de modelos que relacionassem concentrações de C-AH e essa variável. Porém, observa-se que, na concentração maior de AH, a fonte AH-Com aumentou a relação R/PA em 19,7 %, em relação às demais fontes. Para a fonte AH-L2, não houve influência da concentração de C-AH aplicada, de modo que a concentração de 5 mg L^{-1} C-AH para AH-L1 promoveu maior R/PA e a concentração de 10 mg L^{-1} C-AH, diminuiu a R/PA para a AH-Com. A R/PA é plástica, regulada pela fonte de AH e dependente da concentração de AH utilizada, de modo que o aumento do crescimento das raízes pode implicar em redução da MST, já que fotoassimilados que poderiam ser utilizados na parte aérea são mobilizados para maximizar o crescimento do sistema radicular (PINHEIRO et al., 2010).

O estímulo no crescimento de raízes e das próprias plantas é relacionada com as características químicas dos AH, que, por sua vez, determinam a concentração ótima que promove maior bioatividade da fração húmica. AH constituídos de frações mais lábeis otimizam o crescimento do eucalipto em concentração ótima menor, tendo maior efeito sobre o crescimento vegetal (GARCÍA et al., 2016). A definição da concentração ótima de AH é crucial, pois o aumento da R/PA devido ao aumento da concentração de AH pode limitar o crescimento do eucalipto, visto que este pode haver fluxo maior de fotoassimilados e compostos que geram energia para a raiz, comprometendo assim o desenvolvimento da parte aérea. Em geral, o aumento da CE da solução de cultivo não foi o determinante para o crescimento do eucalipto, mas pode ter havido redução na produção de massa seca da parte aérea para concentrações de AH superiores a 15 mg L^{-1} de C-AH, principalmente quando se utiliza o composto com fonte de AH. Por isso, em solução nutritiva é recomendável que

concentrações de C-AH não sejam superiores a 15 mg L^{-1} de C-AH, para que o crescimento do eucalipto não seja reduzido.

Acúmulo de nutrientes na raiz e parte aérea

O acúmulo de N e P na parte aérea (PA) foi influenciado somente pela concentração de C-AH testada (Figura 4), sendo verificados acúmulos máximos de N e P para as concentrações de $11,7$ e $12,6 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, com aumentos de $4,3$ e $14,7 \%$ no N e P na PA, respectivamente. Houve acréscimo no acúmulo de K na PA até a concentração $13,5 \text{ mg L}^{-1}$ C-AH, com posterior queda para a fonte AH-L1. O acúmulo de K na PA com o uso das fontes AH-Com e AH-L2 não foi influenciado pelas concentrações de C-AH testadas. O acúmulo de N, P e K na raiz foi reduzido com o aumento da concentração de C-AH, para as fontes AH-L1 e AH-L2. Por outro lado, para a fonte AH-Com, houve aumento do acúmulo de N, P e K, até as concentrações de $15,5$, $23,1$ e $33,5 \text{ mg L}^{-1}$ de C-AH, respectivamente, seguido de queda na absorção dos nutrientes para concentrações superiores à ótima.

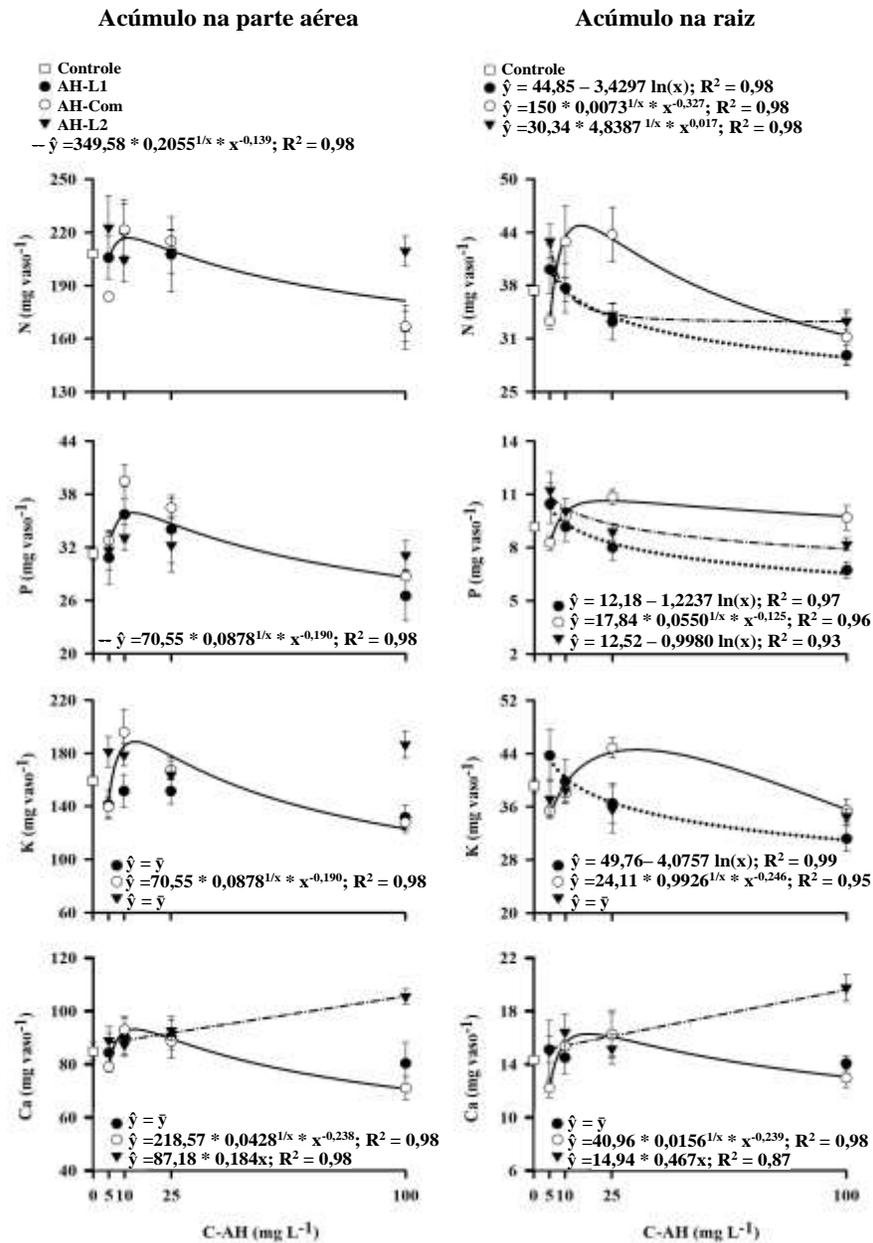


Figura 4. Acúmulo de N, P, K e Ca na parte aérea e raiz do eucalipto em função da combinação de diferentes fontes de ácidos húmicos (AH) e concentrações de C-AH (mg L⁻¹). AH-L1: AH de Leonardita extraído com NaOH; AH-Com: AH extraído de composto com KOH; AH-L2: AH de Leonardita extraído com KOH.

Os efeitos dos AH na aquisição de nutrientes pelas plantas pode ser devido aos efeitos diretos no crescimento da planta (CANELLAS; OLIVARES, 2014), ou ocorrer em razão do aumento da eficiência de processos que regulam a absorção de nutrientes (JINDO et al., 2016). A magnitude da bioatividade de AH é regulada pela concentração, composição química e natureza dos ligantes orgânicos presentes matriz húmica (AGUIAR et al., 2009; AZCONA et al., 2011; CANELLAS et al., 2015), sendo que AH provenientes de materiais orgânicos podem ser mais bioativos do que os originados de reservas minerais, por conter mais ácidos orgânicos, frações de menor massa molar e hormônios produzidos por microrganismos presentes nas pilhas compostagem (ROSE et al., 2014), com grande efeito no aumento do crescimento radicular vegetal (DOBBSS et al., 2010). Rose et al. (2014) relatam que o efeito de acréscimo no crescimento de diversas espécies de plantas com a aplicação de concentrações crescentes de AH é descrito por funções quadráticas, com maior crescimento das plantas até a concentração ótima de AH e queda de crescimento para concentrações superiores à adequada. O decréscimo em crescimento, possivelmente, é explicado pela formação de complexos de alta estabilidade química, principalmente com micronutrientes, que limitam o crescimento das plantas, e conseqüentemente afetam o acúmulo de macronutrientes. Observa-se que concentrações de até $13,5 \text{ mg L}^{-1}$ de C-AH favoreceram o acúmulo de N, P e K na PA do eucalipto, evidenciado pelo maior crescimento das plantas em baixas concentrações de AH. Somente o AH-Com se mostrou efetivo em aumentar o acúmulo de N, P e K na raiz, devido ao efeito no crescimento radicular em função do uso de AH extraído de composto.

Houve aumento do acúmulo de Ca até as concentrações de 13,6 e 17,4 mg L^{-1} de C-AH, para AH-Com, respectivamente, para PA e raiz, seguido de posterior queda para as concentrações de AH maiores do que as consideradas ótimas (Figura 4). A fonte AH-L2 aumentou linearmente o Ca acumulado na PA

e na raiz com o acréscimo na concentração de C-AH até 100 mg L^{-1} ; há aumento no acúmulo de Ca na PA e raiz de 39,3 e 46,1 %, respectivamente, em relação às demais fontes de AH. O Ca juntamente com P são nutrientes que fortemente limitam o crescimento do eucalipto (VIERA et al., 2015). A associação de Ca com substâncias húmicas (SHs) dá origem ao complexo de Ca-Actosol, que aumentou a absorção de Ca e a produtividade de tomateiro (EKINCI et al., 2015). Segundo Azcona et al. (2011), com o aumento da concentração de AH, houve maior acúmulo de Ca em plantas de pimenta, sendo este aumento regulado pela fonte de AH aplicada. Há no AH-L2 mais C-alifático (Figura 1) nos espectros de FTIR-ATR, desse modo, foi possível inferir que estruturas de C alifáticas podem apresentar maior capacidade de complexar o Ca, otimizando a aquisição do nutriente pelo eucalipto. O aumento do armazenamento de Ca na raiz pode ser uma estratégia para contornar o cultivo do eucalipto em condições de forte limitação no suprimento do nutriente às mudas, o que poderia assegurar maior pegamento e desenvolvimento inicial no campo, dado que é mais comum o cultivo de eucalipto em solos frágeis e de baixa fertilidade, que, mesmo com a calagem, possuem baixa capacidade de suprir Ca às plantas.

Para AH-L1 e AH-Com, houve aumento do acúmulo de B na PA com o aumento das concentrações até concentrações ótimas de 11,7 e $16,4 \text{ mg L}^{-1}$ C-AH, respectivamente, seguida de posterior queda a partir da concentração ótima (Figura 5). Mesma tendência e concentração ótima foi observado para o acúmulo de B na raiz, para a fonte AH-Com, já para AH-L2 não houve resposta às concentrações de C-AH no acúmulo de B na raiz. As diferentes concentrações de C-AH não influenciaram o acúmulo de B na PA quando se utilizou o AH-L2. Já, na raiz, houve aumento do acúmulo de B com o acréscimo na concentração de C-AH. A aplicação de AH, na solução de cultivo, aumentou o acúmulo de B na raiz do eucalipto em relação ao controle. O B possui a capacidade de formar complexos com SHs (B-Humato), favorecendo sua aquisição pelas plantas

(EKINCI et al., 2015). Quanto ao acúmulo de B pelo eucalipto, as fontes de AH regulam a resposta às concentrações de C-AH (PINHEIRO et al., 2010), que verificaram maior absorção de B quando se utilizou a concentração de 18 mg L^{-1} C-AH. O maior acúmulo de B pelas raízes do eucalipto mostra potencial deste ser fonte de B para a PA. O aumento no acúmulo de B devido à aplicação de AH ocorreu em baixas concentrações de AH e se mostrou dependente da fonte de AH utilizada.

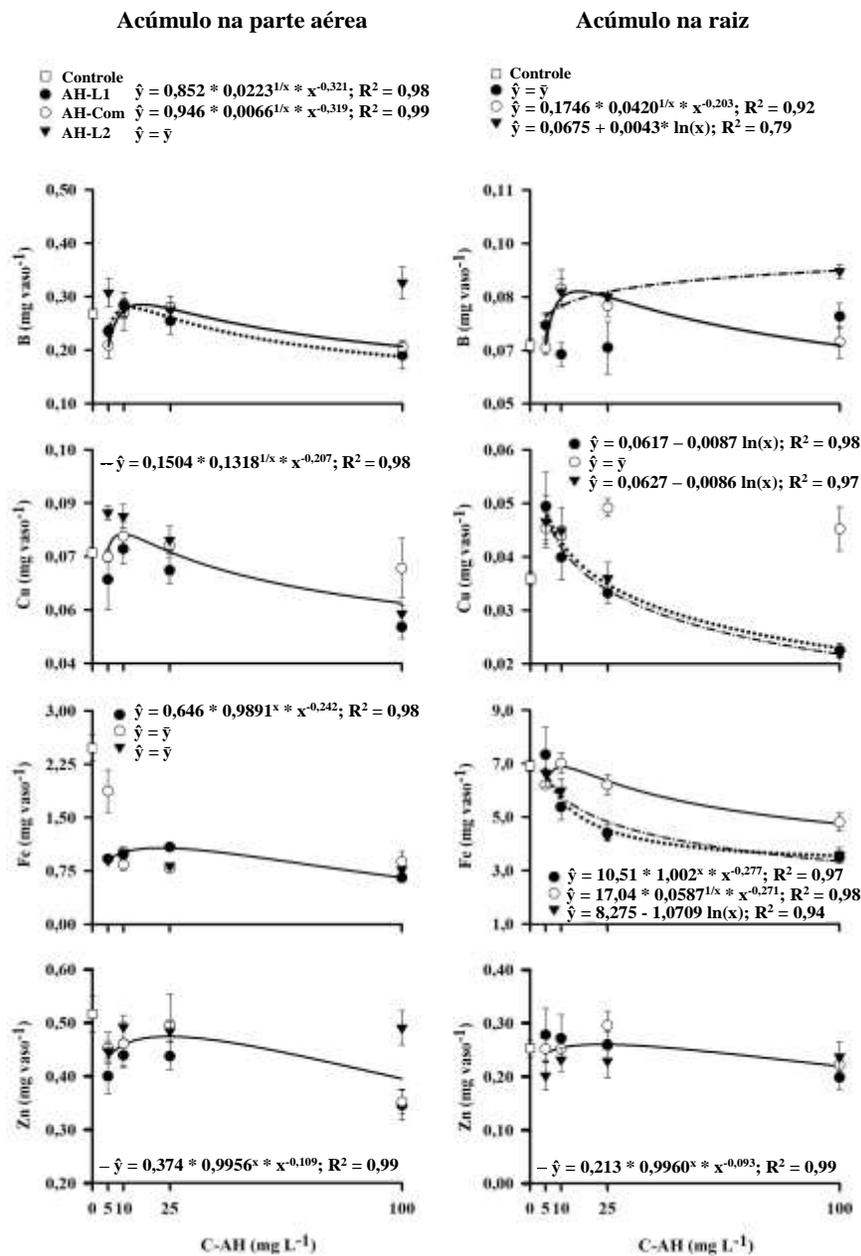


Figura 5. Acúmulo de B, Cu, Fe e Zn na parte aérea e raiz do eucalipto em função da combinação de diferentes fontes de ácidos húmicos (AH) e concentrações de C-AH (mg L⁻¹). AH-L1: AH de Leonardita extraído com NaOH; AH-Com: AH extraído de composto com KOH; AH-L2: AH de Leonardita extraído com KOH.

Houve efeito isolado de fontes e concentrações de C-AH no acúmulo de Cu na PA (Figura 5). As fontes AH-L2 e AH-Com aumentaram a aquisição de Cu em 12,7 %, com máximo acúmulo de Cu para a concentração de 9,8 mg L⁻¹ C-AH, seguido de queda no Cu da PA a partir da concentração ótima. O aumento da concentração de C-AH diminuiu o acúmulo de Cu na raiz, para AH-L1 e AH-L2, o que pode ser devido aos grupamentos aromáticos (C-aromático) mais evidentes nessas fontes, como mostrado nos espectros de FTIR-ATR (Figura 1), formando complexos estáveis. Não foi verificada influência de concentrações de C-AH no acúmulo de Cu, para AH-Com, sendo que este apresentou maior acúmulo de Cu na concentração de 25 e 100 mg L⁻¹ de C-AH. Com a aplicação das concentrações de 25 e 100 mg L⁻¹ de C-AH para a fonte AH-Com, foi adicionado à solução nutritiva 0,02 e 0,07 mg L⁻¹ de Cu, mostrando o potencial desta fonte em suprir Cu ao eucalipto. Diversos fatores determinam a formação de complexos organo-metálicos (COMs) e a capacidade desses complexos em suprir nutrientes às plantas, sendo estes: constante de interação entre íons e ligantes orgânicos presentes nas SHs, capacidade máxima de complexar metais dos ligantes na estrutura húmica, pH, força iônica do meio de cultivo, cátions que competem pelos sítios de complexação de metais e concentração de ligantes na fração húmica que são efetivamente capazes de mobilizar cátions na forma quelatizada (IGLESIAS et al., 2003).

Moléculas de AH possuem alta afinidade com o Cu, formando ligações altamente estáveis, do tipo covalente e de alta energia, com baixa propensão de clivagem dos COMs formados, sendo a estabilidade química dos quelatos formados controlada pela presença de grupos fenólicos e carboxílicos nos AH (XU et al., 2016). Devido à capacidade limitada dos COMs em liberar Cu às plantas, há redução no crescimento do eucalipto (PINHEIRO et al., 2010). O Cu possui alta afinidade por AH e o aumento da concentração aplicada prejudica sua aquisição e o crescimento das plantas, mas, dependendo da composição

química dos AH, a fonte utilizada pode se tornar fonte de Cu para as plantas, como observado para o AH-Com. Em investigações futuras, é preciso verificar se o complexo Cu-húmico suprido pelo composto é o responsável pela aquisição de Cu por mudas de eucalipto, ou se o efeito de maior absorção está ligado ao maior suprimento de Cu, que é mais concentrado no composto do que na Leonardita.

A aplicação de AH restringiu o suprimento de Fe para o eucalipto, diminuindo em 61,6 e 21,3 % o acúmulo de Fe, respectivamente, na PA e raiz, em relação ao cultivo das plantas sem aplicação de AH (Figura 5). Na concentração de 5 mg L⁻¹ de C-AH, o AH-Com, aumentou a aquisição de Fe em relação às demais fontes, contudo com queda de 24,4 % em relação ao controle. O acúmulo de Fe na raiz foi aumentado até a concentração de 10,7 mg L⁻¹ de C-AH para a fonte AH-Com, e para AH-L1 e AH-L2, houve queda do acúmulo com o aumento da concentração de AH. A estabilidade dos complexos formados entre moléculas orgânicas e o Fe determina se os COMs vão atuar como fonte ou dreno do nutriente às plantas, de modo que compostos húmicos com fragmentos de menor massa molar e COMs com menor estabilidade química aumentam a aquisição de Fe pela planta (COLOMBO et al., 2014). Tomasi et al. (2014), trabalhando com a aplicação de frações húmicas extraídas com água, na cultura do pepino, verificaram aumento na aquisição de Fe pela planta e melhoria na translocação do nutriente da raiz para a folha, devido a aplicação de tais frações. Entretanto, complexos formados entre Fe e AH podem ter alta estabilidade química, fato que deriva do Fe em sua maioria se encontrar na forma trivalente (NUZZO et al., 2013), o que pode reduzir drasticamente sua aquisição pelas plantas. A alta estabilidade de complexos formados entre AH e Fe reduziu a aquisição de Fe na PA do eucalipto e limitou a translocação de Fe da raiz para a PA. Em cultivo em solução nutritiva, o teor de Fe na solução deve ser aumentado, principalmente para concentrações altas de C-AH onde é plena a

disponibilidade de ligantes orgânicos na solução nutritiva, tudo isso, a fim de verificar se essa estratégia de nutrição elimina a carência de ferro, em parte, devido à formação de complexos Fe-húmicos, provavelmente, de alta estabilidade química e, ou, de baixa solubilidade.

A aplicação de AH diminuiu em 14,5 % o acúmulo de Zn na PA em relação ao cultivo somente em solução nutritiva (Figura 5). Houve efeito isolado de fontes e concentrações de AH no acúmulo de Zn na PA e raiz, sendo que as concentrações de 24 e 23 mg L⁻¹ de C-AH resultaram em maior acúmulo de Zn, respectivamente, na PA e raiz. A fonte AH-L2 aumentou o acúmulo de Zn na PA em 13%, contudo, diminuiu o acúmulo na raiz em 11,4 %, em relação às demais fontes estudadas. Büyükkeskin et al. (2015), ao cultivar feijão vagem em solução nutritiva, relataram o aumento do acúmulo de Zn com a aplicação de 10 ml L⁻¹ de AH, em condições de estresse por Al. Rose et al. (2014) sugerem que, em estudos hidropônicos, inicialmente, tem-se aumento crescente da biodisponibilidade de metais, como o Zn, com a aplicação da maior concentração de AH, porém, com o aumento concentração de AH, há formação de COMs de alta estabilidade, que diminuem a biodisponibilidade de Zn. O aumento da estabilidade de COMs entre AH e Zn é favorecida por baixas concentrações de Zn no meio de cultivo e aumento do grau de humificação do AH, podendo chegar a tal ponto que esta estabilidade é tão grande que a clivagem dos compostos formados é dificultada (BOGUTA; SOKOŁOWSKA, 2016), podendo restringir a nutrição de Zn em plantas. A concentração de AH foi mais efetiva em aumentar o acúmulo de Zn pelo eucalipto do que a fonte dessa fração húmica. Concentrações em torno de 24 mg L⁻¹ de C-AH extraído de composto foram efetivas em promover maior acúmulo de Zn pelo eucalipto. Acima da concentração ótima, o aumento da disponibilidade de C-AH no meio de cultivo pode ter propiciado a formação de complexos de alta estabilidade química, que afetaram a aquisição de Zn pelas plantas.

Eficiência de absorção de nutrientes

Não houve influência das fontes e concentrações de AH na eficiência de absorção (EAbs) de N e K (Figura 6), mas foi notada alteração na EAbs para P e Ca em função dos fatores testados de forma isolada. A fonte AH-L2 diminuiu a EAbs de P em 9,1 %, quando comparado às demais fontes. Houve queda na EAbs de Ca com o aumento da concentração C-AH. As SHs são capazes de otimizar a aquisição de nutrientes pelas plantas, seja pelo estímulo de transportadores da célula que aumentam a absorção de P (JINDO et al., 2016), estímulo da H^+ -ATPase de membrana plasmática, gerando diferença eletroquímica de prótons entre essa e o meio externo, o que altera a absorção de nutrientes (CANELLAS et al., 2015), aumentando a aquisição de N pelas plantas (TAVARES et al., 2017). Além disso, as SHs estimulam o número de raízes fisiologicamente ativas (RIMA et al., 2011) e aumentam o crescimento radicular (ROSE et al., 2014), o que depende da concentração e das características dos AH (AGUIAR et al., 2009). A labilidade dos compostos presentes nos AH, também, condicionam este efeito, sendo que fontes que possuem compostos mais lábeis apresentam maior efeito em concentrações menores de AH (GARCÍA et al., 2016). Os dados apresentados mostram que os efeitos observados no maior crescimento e acúmulo de N, P, K e Ca, em concentrações ótimas na solução, das plantas tratadas com AH, foi devido ao maior crescimento das plantas, tendo pouca influência na melhoria da aquisição de nutrientes, pela maior eficiência no uso. Isso mostra que o maior efeito observado dos AH está associado ao estímulo no crescimento das mudas de eucalipto em baixas concentrações.

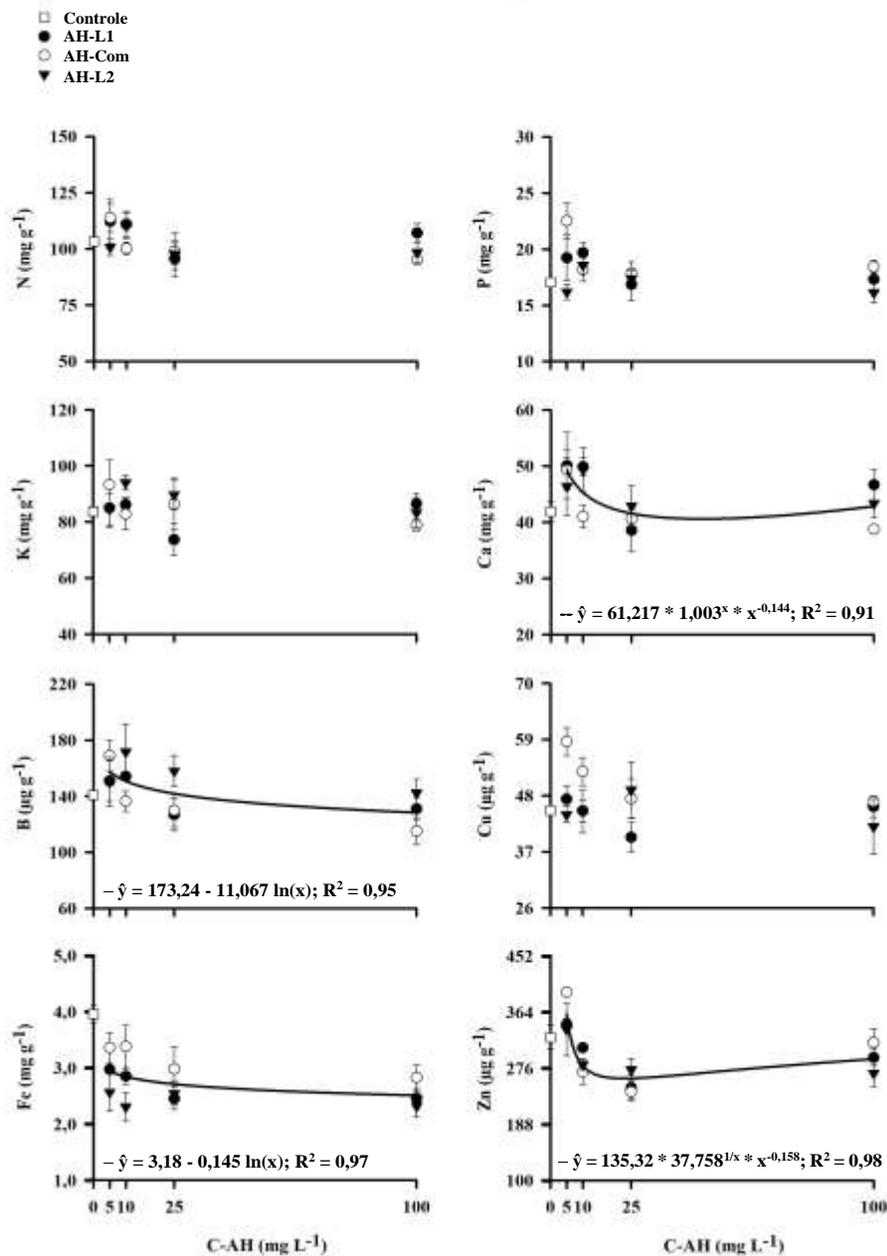


Figura 6. Eficiência de absorção de N, P, K, Ca, B, Cu, Fe e Zn por mudas de eucalipto em função da combinação de diferentes fontes de ácidos húmicos (AH) e concentrações de C-AH (mg L⁻¹). AH-L1: AH de Leonardita extraído com NaOH; AH-Com: AH extraído de composto com KOH; AH-L2: AH de Leonardita extraído com KOH.

Houve queda na EAbs de B, Fe e Zn com o aumento da concentração de AH, independentemente da fonte utilizada (Figura 6). No caso particular do Fe, a aplicação de AH, independentemente da fonte e concentração, reduziu em 30,5 % a EAbs, em relação a não adição de AH. Para o Cu, houve somente influência da fonte de AH, sendo que AH-Com aumentou a EAbs de Cu em 14,8 %, em relação às demais fontes estudadas, possivelmente por esta possuir o maior teor de Cu em sua composição química. Elena et al. (2009) relatam que a aplicação de AH extraídos de Leonardita estimularam a atividade da quelato-redutase do Fe (III), aumentando a eficiência na aquisição de Fe, além de favorecer maior acúmulo do nutriente, sendo as frações húmicas extraídas com água mais efetivas em aumentar o aproveitamento de Fe (TOMASI et al., 2014), o que, segundo os autores, ocorre devido à formação de complexos menos estáveis entre moléculas húmicas e o Fe. O efeito de complexação entre AH e metais, formando ligações de alta energia, reduz disponibilidade de alguns micronutrientes, o que compromete sua aquisição, diminuindo a EAbs destes, a ponto de induzir deficiências nutricionais de metais em plantas cultivadas (MOREIRA et al., 2016). O aumento da concentração de C-AH resulta em impactos negativos na aquisição de micronutrientes pelo eucalipto, comprometendo a eficiência no uso destes, principalmente Fe, porém, esta queda é mais pronunciada em concentrações elevadas de AH (100 mg L⁻¹ C-AH). Entretanto, pequenas concentrações de AH, apesar de não aumentar a EAbs de micronutrientes metálicos, promoveram maior crescimento das mudas de eucalipto cultivadas em solução nutritiva.

Conclusões

i) São necessárias baixas concentrações de C-ácido húmico, cerca de 14 mg L⁻¹, para aumentar de 6 a 18% a massa seca da parte aérea. Entre as fontes de ácidos húmicos, há um destaque para a extraída do composto, que assegurou maior

crescimento tanto da parte aérea como de raízes de mudas de eucalipto, embora fosse necessário, para otimizar o crescimento das raízes, concentração de C-AH cerca de cinco vezes maior do que a concentração ótima de AH de leonardita para pleno crescimento da parte aérea.

ii) Independentemente da fonte e concentração de C-ácidos húmicos, há redução acentuada no acúmulo de Fe na parte aérea, o que evidencia dificuldade de translocação do nutriente das raízes para o tecido foliar da planta. Há restrição acentuada de acúmulo de Cu nas raízes de eucalipto para concentrações maiores que 22 mg L^{-1} de C-AH. Por isso, o aumento da concentração de AH, ao elevar a oferta de ligantes orgânicos na solução nutritiva, reduz a aquisição de Fe e Cu por mudas de eucalipto.

iii) A interação fonte e concentração de AH não exerceu influência significativa sobre a eficiência de absorção de nutrientes, de modo que a maior ou menor aquisição de nutrientes em função da adubação húmica é mais explicada pela produção de massa seca, que é maior em baixas concentrações de C-AH, do que pelo acréscimo na eficiência de absorção e uso de nutrientes pelas mudas de eucalipto.

Agradecimentos

Ao CNPq (processos 461935/2014-7 e 303899/2015-8), à CAPES (CAPESPROEX AUXPE 590/2014), pelo financiamento do estudo e concessão de bolsas, e à FAPEMIG, pela concessão de bolsa à terceira autora. Os agentes financiadores não tiveram papel na concepção do estudo, tampouco interferiram na coleta e análise de dados, na decisão de publicação ou na edição do manuscrito.

Referências

AGUIAR, N. O.; CANELLAS, L. P.; DOBBSS, L. B.; ZANDONADI, D. B.; OLIVARES, F. L.; FAÇANHA, A. R. Molecular weight distribution of humic acids and root growth promotion. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1613-1623, 2009.

AZCONA, I.; PASCUAL, I.; AGUIRREOLEA, J.; FUENTES, M.; GARCÍA-MINA, J. M.; SÁNCHEZ-DÍAZ, M. Growth and development of pepper are affected by humic substances derived from composted sludge. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, Weinheim, v. 174, n. 6, p. 916-924, 2011.

BATAGLIA, O. C.; FURLANI, A. M. C.; TEIXEIRA, P. R.; FURLANI, P. R.; GALLO, J. R. *Métodos de análise química de plantas*. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 1983. 48 p. (Boletim Técnico, 78).

BILLARD, V.; ETIENNE, P.; JANNIN, L.; GARNICA, M.; CRUZ, F.; GARCIA-MINA, J. M.; YVIN, J. C.; OURRY, A. Two Biostimulants Derived from Algae or Humic Acid Induce Similar Responses in the Mineral Content and Gene Expression of Winter Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, New York, v. 33, v. 2, p. 305-316, 2014.

BOGUTA, P.; SOKOŁOWSKA, Z. Interactions of Zn(II) Ions with Humic Acids Isolated from Various Type of Soils. Effect of pH, Zn Concentrations and Humic Acids Chemical Properties. *PLoS One*, San Francisco v. 11, n. 4, p. e0153626, 2016.

BÜYÜKKESKIN, T.; AKINCI, Ş.; EROĞLU, A. E. Effects of Humic Acid on Root Development and Nutrient Uptake of *Vicia faba* L. (Broad Bean) Seedlings Grown under Aluminum Toxicity. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, Philadelphia, v. 46, n. 3, p. 277-292, 2015.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, Heidelberg, v. 1, n. 1, p. 1-3, 2014.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; AGUIAR, N. O.; JONES, D. L.; NEBBIOSO, A.; MAZZEI, P.; PICCOLO, A. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 196, n. 1, p. 15-27, 2015.

CHEN, Y.; AVIAD, T. Effects of Humic Substances on Plant Growth, In: MACCARTHY, P.; CLAPP, C. E.; MALCOLM, R. L.; BLOOM, P. R. *Humic Substances in Soil and Crop Sciences: Selected Readings*. Chicago: International Humic Substances Society, 1990. p. 161-186.

COLOMBO, C.; PALUMBO, G.; HE, J. Z.; PINTON, R.; CESCO, S. Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes. *Journal of Soils and Sediments*, Heidelberg, v. 14, n. 3, p. 538-548, 2014.

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*, New York, v. 58, n. 6, p. 3681-3688, 2010.

EKINCI, M.; ESRINGÜ, A.; DURSUN, A.; YILDIRIM, E.; TURAN, M.; KARAMAN, M. R.; ARJUMEND, T. Growth, yield, and calcium and boron uptake of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.) as affected by calcium and boron humate application in greenhouse conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, Ankara, v. 39, n. 5, p. 613-632, 2015.

ELENA, A.; DIANE, L.; EVA, B.; MARTA, F.; ROBERTO, B.; ZAMARREÑO, A.M.; GARCÍA-MINA, J. M. The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, Paris, v. 47, n. 3, p. 215-223, 2009.

GARCÍA, A. C.; DE SOUZA, L. G. A.; PEREIRA, M. G.; CASTRO, R. N.; GARCÍA-MINA, J. M.; ZONTA, E.; LISBOA, F. J. G.; BERBARA, R. L. L. Structure-Property-Function Relationship in Humic Substances to Explain the Biological Activity in Plants. *Scientific Reports*, London, v. 6, n. 20798, p. 1-10, 2016.

HALPERN, M.; BAR-TAL, A.; OFEK, M., MINZ, D.; MULLER, T.; YERMIYAHU, U. The Use of Biostimulants for Enhancing Nutrient Uptake, *Advances in Agronomy*, San Diego, v. 130, n. 1, p.141-174, 2015.

HIGASHIKAWA, F. S.; SILVA, C. A.; BETTIOL, W. Chemical and physical properties of organic residues. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 34, n. 5, p. 1742-1752, 2010.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. *The water culture method for growing plants without soil*. Berkeley: University of California Agricultural Experiment Station, 1950. 32 p. (Circular 347).

IGLESIAS, A.; LÓPEZ, R.; FIOL, S.; ANTELO, J. M.; ARCE, F. Analysis of copper and calcium–fulvic acid complexation and competition effects. *Water Research*, Oxford, v. 37, n. 15, p. 3749-3755, 2003.

JINDO, K.; SOARES, T. S.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, I. G.; AGUIAR, N. O.; MAZZEI, P.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; OLIVARES, F. L.; CANELLAS, L. P. Phosphorus speciation and high-affinity transporters are influenced by humic substances. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, Weinheim, v. 179, n. 2, p. 206-214, 2016.

LYONS, G.; GENC, Y. Commercial Humates in Agriculture: Real Substance or Smoke and Mirrors? *Agronomy*, Basel, v. 6, n. 4, p. 1-8, 2016.

MALAVOLTA, E. *Avaliação do estado nutricional de plantas: princípios e aplicações*. 2 ed. Piracicaba: Potafos, 1997. 308p.

MARTINEZ-BALMORI, D.; SPACCINI, R.; AGUIAR, N.O.; NOVOTNY, E. H.; OLIVARES, F. L.; CANELLAS, L. P. Molecular Characteristics of Humic Acids Isolated from Vermicomposts and Their Relationship to Bioactivity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, New York v. 62, n. 47, p. 11.412-11.419, 2014.

MOREIRA, S. G.; PROCHNOW, L. I.; KIEHL, J. C.; PAULETTI, V.; MARTIN-NETO, L. Chemical forms in soil and availability of manganese and zinc to soybean in soil under different tillage systems. *Soil and Tillage Research*, Amsterdam, v. 163, n. 1, p. 41-53, 2016

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; SCHIAVON, M.; ERTANI, A. Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 73, n. 1, p. 18-23, 2016.

NUZZO, A.; SÁNCHEZ, A.; FONTAINE, B.; PICCOLO, A. Conformational changes of dissolved humic and fulvic superstructures with progressive iron complexation. *Journal of Geochemical Exploration*, Amsterdam, v. 129, n. 1, p. 1-5, 2013.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. *Soil science*, Philadelphia, v. 166, n. 11, p. 810-832, 2001.

PINHEIRO, G. L.; SILVA, C. A.; FURTINI NETO, A. E. Crescimento e nutrição de clone de eucalipto em resposta à aplicação de concentrações de C-ácido húmico. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 34, n. 4, p. 1217-1229, 2010.

RIMA, J. A. H.; MARTIM, S. A.; DOBBSS, L. B.; EVARISTO, J. A. M.; RETAMAL, C. A.; FAÇANHA, A. R.; CANELLAS, L. P. Adição de ácido cítrico potencializa a ação de ácidos húmicos e altera o perfil protéico da membrana plasmática em raízes de milho. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 41, n. 4, p. 614-620, 2011.

ROSE, M. T.; PATTI, A. F.; LITTLE, K. R.; BROWN, A. L.; JACKSON, W. R.; CAVAGNARO, T. R. A Meta-Analysis and Review of Plant-Growth Response to Humic Substances. *Advances in Agronomy*, San Diego, v. 124, n. 1, p. 38-89, 2014.

SILVA, C. A. Uso de resíduos orgânicos na agricultura. In: SILVA, L. S.; CANELLAS, L. P.; CAMARGO, O. *Fundamentos Da Matéria Orgânica Do Solo - Ecossistemas Tropicais e Subtropicais*. 2 ed. Porto Alegre: Metrópole, 2008. p. 597-621.

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

SWIFT, R. S. Organic matter characterization. In: SPARKS, D. L.; PAGE, A. L.; HELMKE, P. A.; LOEPPERT, R. H.; SOLTANPOUR, P. N.; TABATABAI, M. A.; JOHNSTON, C. T.; SUMMER, M. E. *Methods of soil analysis part 3: chemical methods*. Madison: Soil Science Society American Journal, 1996. p. 1011-1020.

TAHIR, M. M.; KHURSHID, M.; KHAN, M. Z.; ABBASI, M. K.; KAZMI, M. H. Lignite-derived humic acid effect on growth of wheat plants in different soils. *Pedosphere*, Beijing, v. 21, n. 1. p. 124-131, 2011.

TAVARES, O. C. H.; SANTOS, L. A.; FERREIRA, L. M.; SPERANDIO, M. V. L.; ROCHA, J. G.; GARCÍA, A. C.; DOBBSS, L. B.; BERBARA, R. L. L.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Humic acid differentially improves nitrate kinetics under low- and high-affinity systems and alters the expression of plasma membrane H⁺-ATPases and nitrate transporters in rice: Humic acid alters

nitrate uptake kinetics, PM H⁺-ATPases and NRT expression. *Annals of Applied Biology*, Hoboken, v. 170, p. 89-103, 2017.

TEDESCO, M. J.; GIANLELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. (1995): *Análise de solo, plantas e outros materiais*. 2 ed. Porto Alegre: UFRGS/Departamento de Solos, 1995. 174p. (Boletim Técnico, 5).

TOMASI, N.; MIMMO, T.; TERZANO, R.; ALFELD, M.; JANSSENS, K.; ZANIN, L.; PINTON, R.; VARANINI, Z.; CESCO, S. Nutrient accumulation in leaves of Fe-deficient cucumber plants treated with natural Fe complexes. *Biology and Fertility of Soils*, New York, v. 50, n. 6, p. 973-982, 2014.

VIERA, M.; SCHUMACHER, M. V.; TRUBY, P.; ARAÚJO, E. F. Implicações nutricionais com base em diferentes intensidades de colheita da biomassa de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 45, n. 3, p. 432-439, 2015.

XU, J.; TAN, W.; XIONG, J.; WANG, M.; FANG, L.; KOOPAL, L. K. Copper binding to soil fulvic and humic acids: NICA-Donnan modeling and conditional affinity spectra. *Journal of Colloid and Interface Science*, San Diego, v. 473, n. 1, p. 141-151, 2016.

Artigo2. Versão preliminar a ser submetida na Revista Journal of Plant Nutrition and Soil Science

Crescimento e nutrição do eucalipto em resposta a alterações supramoleculares de ácidos húmicos induzidas pela interação com os ácidos oxálico e cítrico

Growth and nutrition of Eucalyptus in response to macromolecular changes of humic acid induced by interaction with oxalic and citric acids

Resumo

Fragmentos bioativos de ácidos húmicos (AH) são mais eficazes em aumentar o crescimento e a aquisição de nutrientes das plantas do que os agregados supramoleculares que os originam. As unidades fragmentadas de AH podem atuar de forma mais eficiente comparadas às frações maiores de AH, em vários processos bioquímicos e fisiológicos das plantas. Os ácidos orgânicos são capazes de fragmentar os AH em unidades supramoleculares menores de AH, muitas vezes, gerando fragmentos mais bioativos e eficientes em aumentar a absorção de nutrientes e crescimento do eucalipto. Objetivou-se avaliar o efeito do AH, sozinho ou em associação com ácidos cítrico (AC) e oxálico (AO), no crescimento, absorção e eficiência de absorção de nutrientes por mudas de eucalipto. A fragmentação do AH em unidades de menor massa molar foi verificada pela determinação da relação E4/E6, em condições normais de cultivo em solução nutritiva. As mudas de eucalipto foram cultivadas em solução nutritiva durante 45 dias. Os AH utilizados simultaneamente com AO tiveram suas estruturas supramoleculares fragmentadas em porções mais bioativas do que a molécula não associada com os ácidos orgânicos de baixa massa molar (AOBM), tendo como base a relação E4/E6 medida, resultando em fragmentos

de menor massa molar. O AC não é tão efetivo quanto o AO na quebra aparente de AH em unidades húmicas mais bioativas. Há evidências neste estudo de que o conceito de estruturas químicas supramoleculares se aplica aos AH, que adquirem características típicas de substâncias húmicas de baixa massa molar quando associado a AO adicionado ao meio de cultivo. Mudanças de eucalipto crescidas em solução nutritiva suplementada com AH mais AO apresentaram aumento significativo nas massas secas da parte aérea e da raiz, em média, com crescimento 30% maior do que a massa seca de mudas cultivadas exclusivamente na solução nutritiva. As mudanças no crescimento do eucalipto e nos padrões de aquisição de nutrientes são explicadas principalmente pelo aumento das quantidades de micronutrientes acumuladas na parte aérea. Os resultados obtidos neste trabalho revelam que os fragmentos bioativos de AH produzidos por AO, utilizados simultaneamente com os AH, são efetivos em aumentar o crescimento, mesmo para espécies florestais reconhecidamente pouco responsivas à fertilização húmica. A exposição de fragmentos húmicos menores na estrutura supramolecular dos AH em função do uso de AO é eficaz em aumentar as quantidades de Cu, Mn e Fe acumuladas na parte aérea do eucalipto.

Palavras-chave: Bioatividade de substâncias húmicas, H^+ - ATPase, relação E4/E6, agregados supramoleculares, complexos orgânicos-metálicos, absorção de micronutrientes, membrana plasmática celular, fragmentos húmicos.

Abstract

Bioactive fragments of humic acids (HA) are more effective in increasing plant growth and nutrient uptake than the supramolecular aggregates that originate them. Fragmented HA units can act more efficiently compared to larger HA fractions in various biochemical and physiological processes of plants. Organic acids are able to fragment AH into smaller supramolecular HA units, often

generating more bioactive and efficient fragments which may enhance nutrient uptake and eucalyptus growth. The aim of this study was to evaluate the effect of HA, alone or in association with citric (CA) and oxalic acids (OA), on the growth, nutrient acquisition and use efficiency by eucalyptus seedlings. The HA fragmentation in units of lower molar weight was verified by determination of the E4/E6 ratio of humic substances solubilized in the Hoagland nutritive solution. Eucalyptus seedlings were grown in nutrient solution during 45 days. The HA used simultaneously with OA had their supramolecular structures fragmented into more bioactive portions than the molecule not associated with low molecular weight organic acids (LMWOA), based on the measured E4/E6 ratio. Citric acid is not so effective as OA in breaking down intact HA in more bioactive humic units. There is evidence in this study that the concept of supramolecular chemical structures applies to HA, which acquire characteristics typical of humic substances of low molar weight when associated with OA. Eucalyptus seedlings grown in nutrient solution fertilized with HA plus OA increases shoot biomass is, on average, 30% greater than the dry mass of seedlings grown exclusively in the nutrient solution. Changes in eucalyptus growth and nutrient acquisition patterns due to HA fragmentation are mainly explained by the increase in the amount of micronutrients accumulated in plantlet shoot. The results obtained in this work reveal that the bioactive fragments of HA produced by OA are effective in increasing growth of eucalyptus, recognized by its low capacity to respond to humic fertilization. The exposure of smaller OA treated humic fragments in the supramolecule of HA is effective in increasing the amounts of Cu, Mn and Fe accumulated in eucalyptus shoot.

Keywords: Bioactivity of humic substances, H⁺-ATPase, E4/E6 ratio, supramolecular aggregates, organic-metallic complexes, micronutrient uptake, cellular plasma membrane, humic fragments.

1 Introdução

Os ácidos húmicos (AH) são constituídos por uma estrutura supramolecular, a qual é constituída por associação de moléculas orgânicas relativamente pequenas e heterogêneas, que se estabilizam por ligações de baixa energia, como forças de *Van der Waals* e pontes de hidrogênio (*Piccolo*, 2001; *Sutton e Sposito*, 2005; *Nuzzo et al.*, 2013). Quando os AH são utilizados em um meio de cultivo, essas fracas ligações dos AH podem ser rompidas e fragmentar a estrutura orgânica, cuja magnitude é dependente da força iônica, pH, concentração de cátions (*Palmer e Von Wandruszka*, 2009; *Nuzzo et al.*, 2013) e presença de ácidos orgânicos de baixa massa molar (AOBM) (*Canellas et al.*, 2008). Esses AOBM podem ser oriundos da exsudação radicular, da biomassa microbiana (*Adeleke et al.*, 2017), ou mesmo da aplicação direta desses ácidos no meio de cultivo de plantas (*Piccolo et al.*, 2003; *Canellas et al.*, 2008). Este efeito da planta em liberar AOBM e fragmentar moléculas de AH pode ser de grande impacto para plantas de eucalipto, visto que há grande capacidade desta espécie em liberar AOBM (*Ikka et al.*, 2013).

As propriedades químicas dos AOBM, como constante de equilíbrio e de dissociação, número e tipo de grupamentos funcionais e massa molar regulam a capacidade desses ácidos em fragmentar os AH (*Piccolo et al.*, 1996; 2003). Dessa forma, ácidos dicarboxílicos, como o ácido oxálico (AO), podem ser mais efetivos na ruptura das ligações, em comparação aos tricarboxílicos, como o ácido cítrico (AC), devido à menor massa molar do AO e, possivelmente, maior interação com os AH. Essa ruptura das ligações dos AH alteram a conformação da molécula, o que resulta na exposição de maior número de grupos funcionais e reduz a massa molar dos AH, expondo fragmentos de maior bioatividade (*Piccolo et al.*, 2003; *Canellas et al.*, 2008). Essas características dos fragmentos de AH conferem maior bioatividade, o que potencializa os processos bioquímicos e fisiológicos da planta, propiciando maior absorção de nutrientes

pelas culturas (*Canellas e Olivares, 2014*). Essa bioatividade magnificada dos AH podem melhorar os padrões de nutrição das plantas e minimizar os efeitos da complexação de nutrientes pelos AH, o que normalmente reduz a disponibilidade às plantas, devido à formação de complexos de esfera interna entre metal e quelante (*Moreira et al., 2016*).

A complexação de AH com nutrientes, especialmente metais, pode ser tão estável a ponto de comprometer sua disponibilidade no meio de cultivo e absorção pelas plantas, o que tem induzido a deficiências nutricionais (*Murray et al., 2011; Moreira et al., 2016*). A estabilidade, reatividade e solubilidade desses complexos organometálicos, bem como a redução da disponibilidade dos nutrientes envolvidos nessas interações são dependentes do tamanho da molécula, força iônica, pH e tipo de metal presente no complexo (*Colombo et al., 2014; Boguta e Sokolowska, 2016*). Assim, os nutrientes mais afetados pela complexação orgânica são os micronutrientes metálicos, Fe, Cu, Mn e Zn (*Nuzzo et al., 2013; Boguta e Sokolowska, 2016; Moreira et al., 2016; Xu et al., 2016*), o que tem diminuído sua disponibilidade às plantas com a aplicação de AH. *Pinheiro et al. (2010)* verificaram menor absorção de Fe, Zn e Cu pelo eucalipto em função do aumento da concentração de AH na solução nutritiva, o que reduziu a produção de massa seca da planta. Entretanto, com a fragmentação dos AH e formação de subunidades húmicas mais bioativas, as frações húmicas tornam-se mais acessíveis aos receptores celulares das raízes, estimulando o crescimento de raízes fisiologicamente mais ativas (*Rima et al., 2011*), fato que é essencial para a absorção de nutrientes (*Canellas et al., 2015*). Além disso, a fragmentação dos AH favorece a formação de complexos de menor massa molar, sendo estes mais biodisponíveis às plantas, quando comparado com complexos de maior massa molar (*Colombo et al., 2013*). A fragmentação das moléculas de AH podem ser mensuradas de forma indireta, por meio do aumento de valores da relação E4/E6 (*Canellas et al., 2008*).

Os AH são capazes de estimular vários processos na planta, como a transcrição de genes responsáveis pelo transporte de nutrientes como P, Fe e N, o que aumenta a eficiência de absorção desses nutrientes (*Elena et al., 2009; Jindo et al., 2016; Tavares et al., 2017*). Além disso, influenciam a absorção de nutrientes, por induzir mudanças no sistema radicular (*Halpern et al., 2015*). No geral, culturas perenes são menos responsivas à prática de aplicação de AH, talvez, pelo número reduzido de estudos com esse grupo de plantas (*Rose et al., 2014*). *Pinheiro et al. (2010)* verificaram que concentrações em torno de 5 mg L^{-1} de C-AH aumentaram a produção de massa seca do caule, folha e raiz do eucalipto. Os pequenos efeitos observados dos AH sobre culturas perenes podem ser otimizados por meio de técnicas que propiciem maior bioatividade das moléculas húmicas, sendo uma delas a produção de fragmentos húmicos mais bioativos, como relatam *Rima et al. (2011)*, que observaram que a aplicação de AC juntamente com AH estimulou a atividade da H^+ -ATPase nas raízes de milho, estimulando o crescimento radicular. Este sinergismo de AH com AO é demonstrado em aplicações foliares, aumentando a produção de trigo em 33% e, na cultura do abacaxi, aumentando a absorção de N, P, K Ca e Mg (*Baldotto et al., 2011; El-Shabrawi et al., 2015*). O efeito sinérgico entre AH e AO no estímulo de raízes de plantas, carece de mais estudos, visto o seu grande potencial.

São hipóteses deste estudo: (i) a fragmentação de moléculas de AH, por meio da aplicação de AOBM em solução nutritiva, é favorecida quando a fração húmica se associa ao AO, em relação ao AC; (ii) o AO é mais efetivo do que o AC em produzir no meio frações de AH mais bioativas e de menor massa molar, que contribuem para um maior crescimento do eucalipto e absorção de nutrientes. Objetivou-se avaliar: (i) avaliar o papel de AO e do AC em fragmentar os AH em unidades mais bioativas; (ii) determinar a produção de raízes e da parte aérea do eucalipto cultivado em solução nutritiva sob efeito de

AH, associado ou não ao AO e AC; e (iii) determinar o acúmulo de macro e micronutrientes na raiz, caule e folhas, bem como a eficiência de absorção desses nutrientes pelo eucalipto em função da adubação húmica e do uso conjunto de AH mais AOBM.

2 Material e métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com o cultivo de eucalipto do clone VM 01 (híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis*). As mudas foram adquiridas em viveiro comercial com 1 ano e 3 meses de idade. Os ácidos húmicos (AH) utilizados no estudo foram extraídos de leonardita, por meio do uso de solução de 0,5 mol L⁻¹ de KOH, seguindo-se a metodologia recomendada pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (Swift et al., 1996). Os AH apresentaram as seguintes características químicas: pH em água de 9,7, determinado na relação AH: água de 1:2,5 (m/v); teores totais de C de 354,9; N de 5,3; P de 0,05; K de 41,6; Ca de 1,4; Mg de 2,7; S de 2,8; Na de 3,2 e Fe de 2,7 g kg⁻¹ e de B de 41,6; Cu de 7,6; Mn de 21,0 e Zn de 76,3 mg kg⁻¹. As propriedades espectroscópicas dos AH foram determinadas por espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR-ATR). A faixa espectral analisada foi a referente à região do infravermelho médio de 4000 a 1200 cm⁻¹, com resolução de 2 cm⁻¹. As bandas de absorção que representam os grupamentos químicos orgânicos dos AH foram identificadas de acordo com as assinaturas espectrais e suas denominações descritas em Stevenson (1994) (Figura 1). O ácido cítrico (AC) e ácido oxálico (AO) foram utilizados na forma de reagentes p.a.

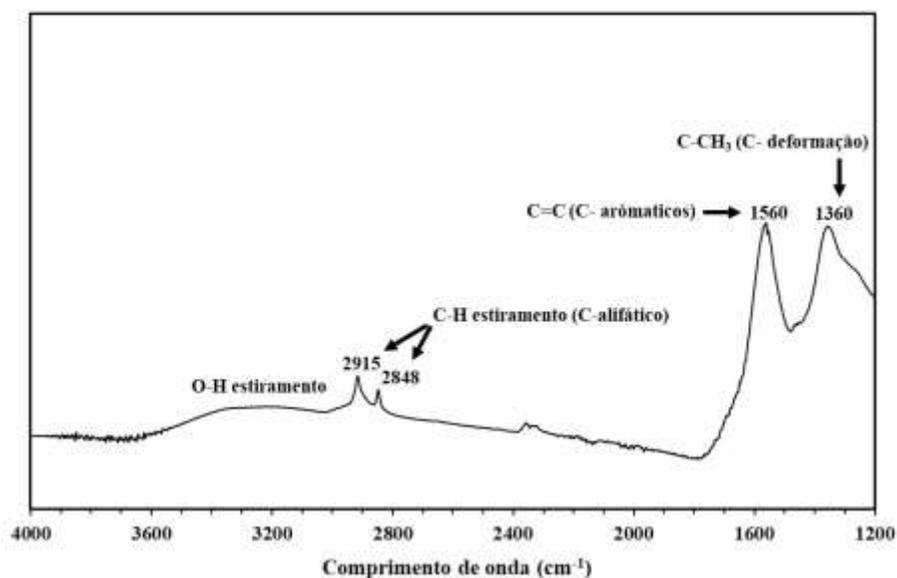


Figura 1. Espectro de FTIR-ATR e os principais grupamentos químicos orgânicos dos ácidos húmicos extraídos de leonardita.

A determinação da relação E4/E6 foi realizado em duas condições distintas, a primeira foi relacionada ao uso das amostras de AH+AC+AO, AH+AC, AH+AO e AH solubilizadas em solução 0,05 mol L⁻¹ de NaHCO₃, na proporção AH: solução de 1:3 (m/v), com pH da solução de cada mistura igual a 8,4, seguindo-se metodologia descrita por Reddy et al. (2014). Nesse procedimento, os AC e de AO foram aplicados nas mesmas concentrações e proporções com a concentração de AH utilizadas no estudo. A segunda condição de determinação da relação E4/E6 envolveu o uso de mesma solução nutritiva com os devidos tratamentos testados, pH e concentrações de AH, AC e AO utilizadas no meio de cultivo do eucalipto. Em ambas as condições estudadas, foram utilizadas três repetições para cada um dos tratamentos. Após o preparo das amostras com AH, as soluções foram submetidas à análise de espectrofotometria UV-visível, em espectrofotômetro SF-325NM da TECNAL®, no comprimento de onda de 465 e 665 nm. A relação E4/E6 foi calculada pela

relação entre os valores de absorvância em 465 nm e 665 nm, sendo essa razão utilizada para estimar as mudanças na estrutura supramolecular dos AH.

As mudas de eucalipto foram cultivadas em solução nutritiva de *Hoagland e Arnon* (1950), modificada pelo aumento da concentração de micronutrientes, de modo que foram adicionados na solução: 14; 196; 31; 235; 160; 49 e 68 mg L⁻¹ de N-NH₄; N-NO₃; P; K; Ca; Mg e S, respectivamente; além de 5; 0,8; 1; 0,20; 0,05 e 0,01 mg L⁻¹, respectivamente, para Fe; B; Mn; Zn; Cu e Mo, com o uso de sais na forma de reagentes p.a. As mudas foram ambientadas por 60 dias em solução nutritiva, em bandejas de 20 L, aumentando a cada 20 dias a força iônica da solução nutritiva, de 25 até 100%. O tempo de ambientação adotado teve por objetivo propiciar maior crescimento radicular das mudas antes de serem expostas aos tratamentos investigados.

Após o período de adaptação, cada planta de eucalipto foi transferida para vaso de 2,3 L de solução nutritiva com os tratamentos. Nesta etapa, a solução nutritiva teve seu pH ajustado para $5,5 \pm 0,2$, com adição de soluções de 0,5 mol L⁻¹ de KOH ou de 0,5 mol L⁻¹ de HCl e foi mantida em aeração constante durante o período experimental. Os tratamentos testados consistiram na adição de oito diferentes combinações de AH, AC e AO na solução nutritiva, sendo testados: AH+AC+AO, AH+AC, AH+AO, AH, AC+AO, AC, AO, além de um tratamento controle (cultivo somente em solução nutritiva). O experimento foi realizado em delineamento em blocos casualizados com quatro repetições.

As plantas foram cultivadas por 45 dias, sendo a solução nutritiva substituída a cada 15 dias, de forma a renovar as concentrações iniciais dos nutrientes e os tratamentos utilizados. Durante o intervalo da troca da solução nutritiva, diariamente, era completado o volume da solução nos vasos, utilizando-se água deionizada. Ao final do experimento, as plantas foram coletadas e separadas em raiz, caule e folha, que, posteriormente, foram secadas em estufa a 60°C por 72 horas, a fim de determinar a massa seca dos

compartimentos da planta. Em sequência, as amostras do tecido vegetal foram moídas e passadas em malha de 1 mm, para a determinação dos teores totais de N pelo método Kjeldahl, após digestão com ácido sulfúrico (*Tedesco et al.*, 1995) e; P, K, Ca, Mg, S, Cu, Mn, Fe e Zn foram determinados após digestão do tecido vegetal em mistura de ácido nítrico: ácido perclórico, na proporção de 4:1 (*Malavolta*, 1997).

Os teores dos nutrientes analisados na raiz, caule e folha do eucalipto foram relacionados com a produção de massa seca de cada compartimento vegetal, a fim de calcular o acúmulo do nutriente (CN) em cada órgão da planta (Equação 1). A eficiência de absorção dos nutrientes (EAbs) também foi calculada (Equação 2), conforme proposto por *Bataglia et al.* (1983).

$$\text{CN (mg planta}^{-1}\text{)} = \text{MS} \times \text{Nu} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde, CN é o conteúdo acumulado de nutriente na parte analisada da planta (mg planta^{-1}), MS é a produção de massa seca da raiz, caule ou folhas (g planta^{-1}), e Nu, é o teor do nutriente referente ao compartimento vegetal avaliado (mg kg^{-1}).

$$\text{EAbs (mg g}^{-1}\text{)} = \text{CN} / \text{MSR} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde, CN, é o conteúdo acumulado de nutriente total na planta (mg), e MSR, é a massa de seca de raízes (g).

Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando notado diferença significativa ($p < 0,05$), foi utilizado o teste de agrupamento de médias de Scott-Knott ($p < 0,05$), para diferenciação das médias dos tratamentos. Na etapa de análise estatística, utilizou-se o software SISVAR 5.6 (*Ferreira*, 2014).

3 Resultados e discussão

3.1 Relação E4/E6 e fragmentação de AH

O potencial de mudanças na estrutura supramolecular dos ácidos húmicos (AH) através da relação E4/E6, em condições de máxima solubilidade (pH = 8,4) não é influenciado pela adição de diferentes ácidos orgânicos de baixa massa molar (AOBM) (Figura 2-A). Em condições de cultivo em solução nutritiva, com pH corrigido para 5,5 (Figura 2-B), há interferência da aplicação da aplicação de AOBM no valor da relação E4/E6. *Piccolo et al. (2003)*, mostram o efeito do pH na estrutura supramolecular dos AH, sendo que a redução do pH provoca mudanças nas conformações de moléculas húmicas antes instáveis, mantidas por ligações dispersivas, a novas conformações mais estáveis, estabilizadas predominantemente por ligações do tipo pontes de hidrogênio, podendo também afetar a distribuição de grupamentos funcionais e a protonação desses. As diferenças nos valores observados da relação E4/E6 de AH mostram o efeito do pH na relação E4/E6, o que permite inferir mudanças na estrutura supramolecular dos AH, o que afeta o potencial de resposta das plantas ao AH em ação sinérgica com o AOBM.

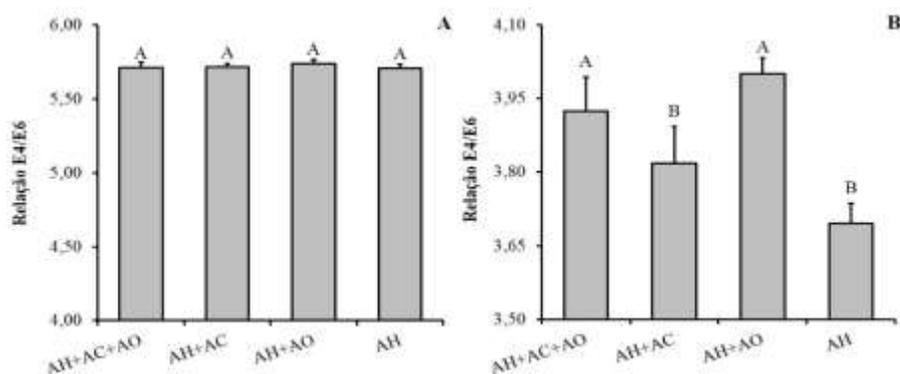


Figura 2. Relação E4/E6 das amostras de ácidos húmicos (AH) com diferentes ácidos orgânicos de baixa massa molar (AC: ácido cítrico; AO: ácido oxálico), segundo metodologia descrita por *Reddy et al., (2014)* (A); e na solução nutritiva de cultivo (B). Médias seguidas da mesma letra não se diferenciam pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

O ácido oxálico (AO) com menor massa molar ($90,03 \text{ g mol}^{-1}$) foi mais efetivo em aumentar a ruptura do AH em relação ao ácido cítrico (AC) (massa molar = $192,12 \text{ g mol}^{-1}$), em solução nutritiva, com aumento de 7% na relação E4/E6, em relação ao valor inicial de AH. Ácidos dicarboxílicos, devido à sua menor massa molar, são mais efetivos em aumentar a ruptura de moléculas húmicas em relação a ácidos tricarboxílicos, para uma mesma concentração de ácido orgânico (Piccolo et al., 1996). Tratamentos que aumentem a relação E4/E6 em função de um valor inicial de AH acarretam mudanças na estrutura supramolecular de AH, que é fragmentado em unidades menores de maior bioatividade (Canellas et al., 2008), sendo o efeito de fragmentação e exposição de unidades menores e mais bioativas contidas na estrutura supramolecular dos AH dependente do tipo de AOBM e de sua concentração no meio de cultivo. As mudanças observadas de acordo com a aplicação de AOBM na estrutura molecular dos AH, é devido a capacidade da interação de componentes hidrofóbicos dos AOBM juntamente com AH (Piccolo et al., 1999). Isso leva à indução da formação de pontes de hidrogênio intra ou intermolecular entre funções ácido protonadas e grupos contendo oxigênio, na associação dos AH com o AOBM, o que provoca o aumento do conteúdo energético das moléculas, havendo a transição das conformações húmicas antes estáveis, para associações de menor massa molar (Piccolo et al., 2003). Com isso, a aplicação de AO promoveu maior interação com AH do que o AC, provocando rupturas na associação supramolecular dos AH, resultando, em moléculas mais bioativas, que potencializaram os efeitos sobre o eucalipto.

3.2 Produção de massa seca

A adição de AH+AO na solução nutritiva aumentou a produção de massa seca de folha, caule e raiz em 18, 25 e 32 %, respectivamente, em relação ao cultivo do eucalipto em meio sem adição de frações orgânicas -

controle (Figura 3). Em relação à aplicação isolada de AH, a combinação com AO mostrou-se efetiva em aumentar a produção de massa seca no eucalipto, fato que não foi observado para o AC. Por outro lado, o uso de AOBM sem a aplicação de AH, e de AH+AC+AO diminuíram a produção de massa seca da folha e raiz em relação à biomassa de plantas do controle. Os tratamentos AH+AC+AO, AH, AC+AO e AO, mostraram maior produção de massa seca de raiz juntamente com AH+AO. A aplicação de AOBM juntamente com AH é capaz de promover mudanças na estrutura supramolecular dos AH, promovendo ruptura destes com conseqüente maior bioatividade dos fragmentos húmicos resultantes de menor massa molar (*Canellas et al., 2008*). O Eucalipto tem grande capacidade de liberar AOBM (*Ikka et al., 2013*) e, portanto, pode também aumentar a bioatividade de AH devido a fragmentação da fração húmica em unidades menores e de maior bioatividade. O efeito sinérgico entre a aplicação de AH e AO via foliar é relatado por *El-Shabrawi et al. (2015)* sobre o crescimento e produtividade do trigo, que foi elevado-se cerca de 33% com o fornecimento de AH+AO em relação ao suprimento isolado de AH. É muito provável que fragmentos húmicos de menor massa molar tenham agido no sentido de potencializar a ação do sobre as plantas, com estímulo ao crescimento do eucalipto. A sinergia que há entre o AH e AO é relevante, pois abre-se espaço para maior crescimento da parte aérea por unidade de massa seca de raiz produzida, muito provavelmente devido à ação do AO em produzir fragmentos húmicos mais bioativos, que conferem às raízes maior eficiência em utilizar água, nutrientes e energia para os processos fisiológicos de absorção de nutrientes e de crescimento e desenvolvimento da parte aérea e de outros processos fisiológicos e bioquímicos em mudas de eucalipto.

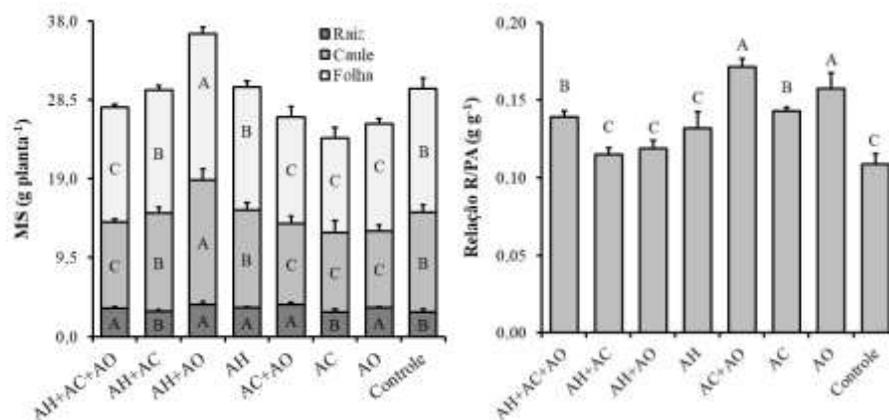


Figura 3. Massa seca (MS) da folha, caule e raiz de plantas de eucalipto (A), e relação da raiz/ parte aérea (B), em função dos tratamentos utilizados. AH: ácidos húmicos; AC: ácido cítrico; AO: ácido oxálico. Médias seguidas da mesma letra não se diferenciam pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

A relação da massa seca de raiz/parte aérea (relação R/PA) dos tratamentos AH, AH+AC e AH+AO foi igual ao controle e inferior aos tratamentos com adição somente de AOBM (Figura 3). Em trabalho realizado por *Nikbakht et al.* (2008), foi verificado que o efeito das substâncias húmicas (SHs) é mais pronunciado nas raízes comparado àquele sobre a parte aérea, por aumentar a eficiência de aquisição de nutrientes pelas raízes, o que acarreta gasto energético maior para o desenvolvimento radicular, comprometendo a produção da parte aérea. *Pinheiro et al.* (2010), ao avaliarem o efeito de concentrações de AH no crescimento do eucalipto, verificaram aumento da relação R/PA com o aumento da concentração de AH, porém, a produção de massa seca da parte aérea foi influenciada negativamente com o aumento da concentração de AH, estabelecendo um relação negativa entre o crescimento da biomassa da parte aérea e a relação R/PA. A manutenção da mesma relação R/PA com aumento da produção massa seca promovida pelo tratamento AH+AO ilustra o papel do AO em aumentar a bioatividade dos AH, dado que, com a mesma massa de raízes, produziu-se mais biomassa na parte aérea,

sinalizando para uso mais eficiente de nutrientes na raiz. Há, com essa sinergia, aumento na produção de massa seca nos compartimentos estudados.

3.3 Acúmulo de macro e micronutrientes

A maior parte do acúmulo de N, P, K, Ca, Mg e S ocorre nas folhas do eucalipto (Figura 4), órgão que é responsável por maior atividade metabólica. O tratamento com AH+AO promoveu o maior acúmulo na folha de N, P, Ca, Mg e S, da ordem de 30, 38, 28, 32 e 25 %, respectivamente; no caule, o uso conjunto de AH+AO resultou em aumento no acúmulo de N, K, Ca, Mg e S de 50, 25, 20, 38 e 96 %, respectivamente, em relação aos acúmulos notados para as plantas cultivadas exclusivamente na solução nutritiva. A aplicação de AOBM de forma isolada e ou em conjunto (AC, AO, AC+AO) resultou em menor acúmulo de macronutrientes na folha e caule. O potencial de resposta da produção de massa seca e nutrição das plantas devido ao uso de AH varia em função da planta cultivada; culturas perenes como o eucalipto são tidas como pouco responsivas à aplicação de AH (*Rose et al., 2014*). Em trabalho realizado com eucalipto em solução nutritiva, *Pinheiro et al. (2010)* verificaram que o aumento da concentração de AH diminuiu o acúmulo de N, P, K, Ca, Mg e S, sendo somente observada resposta ao uso de AH e melhoria na nutrição das plantas para concentrações de AH inferiores a $15 \text{ mg L}^{-1} \text{ C-AH}$.

A sinergia entre AH e AO foi demonstrada por *Baldotto et al. (2011)*, ao estudar os efeitos de diferentes combinações de imersões de AH e AC sobre o abacaxi, verificando incremento da massa seca e do acúmulo de N, P, K, Ca e Mg no tecido foliar, em relação à aplicação isolada de AH. Em função dos resultados alcançados neste estudo, o AC não foi tão efetivo quanto o AO em aumentar o acúmulo de macronutrientes no eucalipto. O estudo do AO na fisiologia das plantas, em relação ao AC, paralelo à aplicação de AH, ainda, é pouco difundido, e o presente trabalho mostra o potencial deste em atuar no

meio de cultivo, muito provavelmente, na fragmentação de AH, com aumento da sua bioatividade, com melhoria na nutrição e aumento do crescimento do eucalipto.

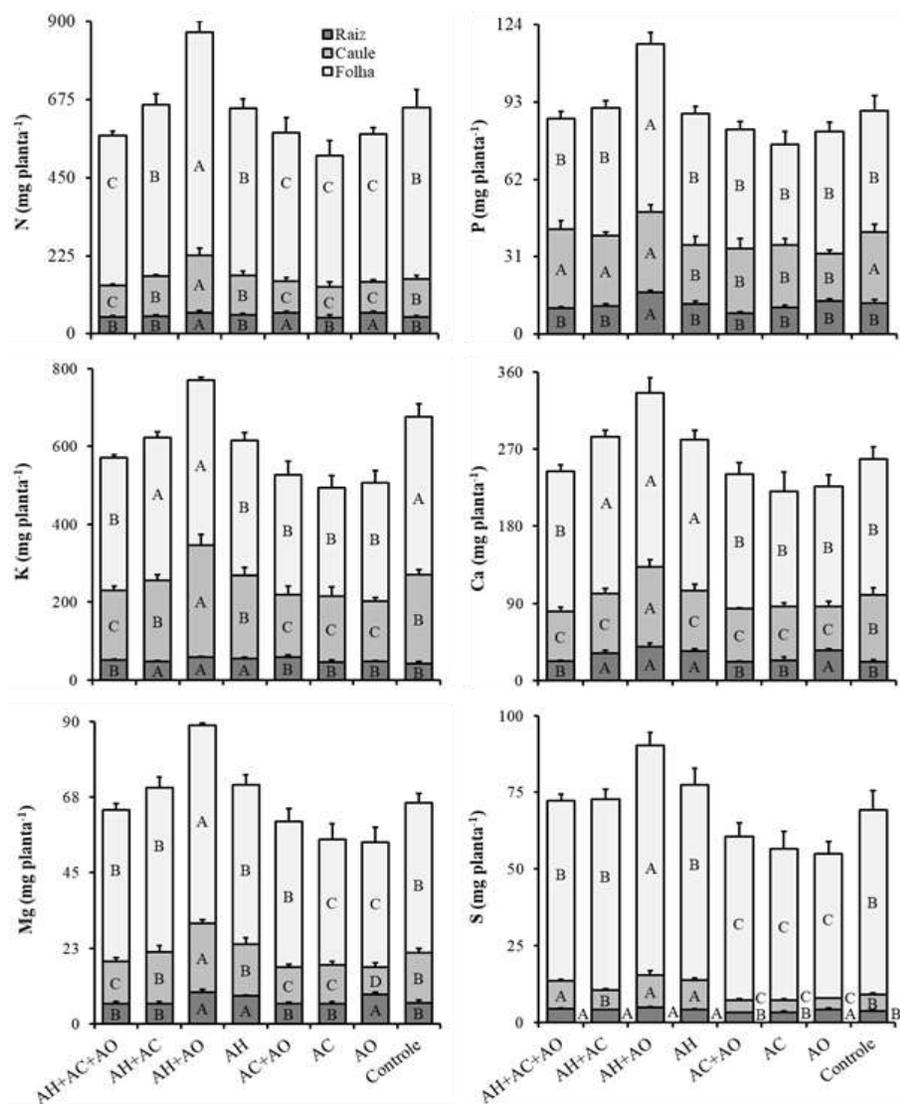


Figura 6. Acúmulo de N, P, K, Ca, Mg e S, na folha, caule e raiz do eucalipto, em função dos tratamentos utilizados. AH: ácidos húmicos; AC: ácido cítrico; AO: ácido oxálico. Médias seguidas da mesma letra em cada compartimento (folha, caule e raiz) não se diferenciam pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

A aplicação isolada de AH e de AOBM (Figura 5) influenciou negativamente o acúmulo de Zn nas folhas. Os tratamentos com a mistura de AH e AOBM (AH+AC+AO, AH+AC e AH+AO) causaram acúmulo de Zn na folha similar aos do controle. A aplicação de AOBM com AH estimulou a translocação do Zn para a folha, com eficiência similar à verificada para o controle. O Zn é um elemento químico que possui alta afinidade com moléculas húmicas; essa afinidade é maior com o aumento de ligantes orgânicos associados aos AH e baixas concentrações de Zn no meio de cultivo, o que resulta em complexos organo-metálicos (COMs) de alta estabilidade química (Boguta e Sokolowska, 2016). A estabilidade química define a solubilidade do COMs e posterior uso do nutriente presente nos COMs pelas plantas (Colombo et al., 2014). Em casos de alta afinidade do metal pelo ligante orgânico da matriz húmica, em vez de nutrir a planta, o agente quelatilizante pode interagir tão fortemente com metais, a ponto de se tornar um dreno em detrimento do papel de fonte de nutriente às plantas (Murray et al., 2011). Assim, é possível inferir que o AH+AO permite a ruptura da supraestrutura de AH, com formação de fragmentos húmicos que propiciam na solução nutritiva maior suprimento de Zn ao eucalipto. É preciso, agora, estudar, para os micronutrientes em geral, a reatividade, estabilidade química e solubilidade de complexos formados a partir de fragmentos mais bioativos de AH formados na presença de AO, pois isso interfere diretamente no suprimento de micronutrientes às plantas.

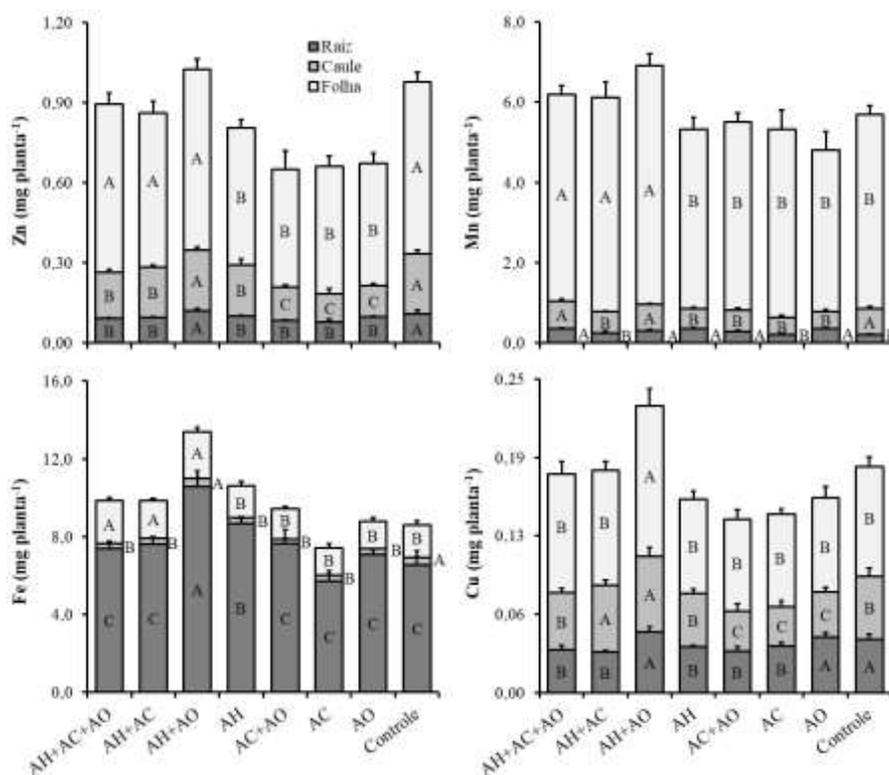


Figura 5. Acúmulo de Zn, Mn, Fe e Cu, na folha, caule e raiz do eucalipto, em função dos tratamentos utilizados. AH: ácidos húmicos; AC: ácido cítrico; AO: ácido oxálico. Médias seguidas da mesma letra em cada compartimento (folha, caule e raiz) não se diferenciam pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

O acúmulo de manganês nas folhas aumentou com a aplicação de AH em conjunto com o AC e, ou, AO (AH+AC+AO, AH+AC e AH+AO) em 45 % em relação aos demais tratamentos; no caule, o AH+AC+AO e AH+AO propiciaram acúmulos semelhantes ao do controle, já na raiz, os tratamentos que continham na mistura o AO (AH+AC+AO, AH+AO, AC+AO e AO) e aplicação isolada de AH favoreceram o acúmulo de Mn na raiz. A complexação de Mn com AH nem sempre beneficia a planta, dado que ela pode dificultar a translocação de Mn da raiz para a parte aérea. Isso ocorre devido à formação de complexos muito estáveis, com ligações do tipo covalente entre o Mn e os AH,

podendo induzir deficiência de Mn em plantas (*Moreira et al.*, 2016). Moléculas ou unidades húmicas menores, mais bioativas, atuam de modo similar aos efeitos observados pela aplicação de fitohormônios, como a auxina, e são capazes de promover melhoria na nutrição e uso de água em plantas (*Morard et al.*, 2010). A presença de AOBM e AH afeta a distribuição do Mn na planta, devido ao diferencial na acumulação de Mn nas partes estudadas do eucalipto, evidenciando o potencial do uso associado de AH+AC+AO, AH+AC e AH+AO em promover maior redistribuição de Mn da raiz para a folha.

O acúmulo de Fe foi mais acentuado nas raízes do eucalipto, em relação aos demais compartimentos da planta, com pouca translocação de Fe da raiz para a parte aérea. A aplicação de AH+AO propiciou maior acúmulo de Fe na raiz, seguido da aplicação isolada de AH. Observa-se que o acúmulo de Fe na folha no tratamento com AH+AO foi superior aos demais tratamentos. A aplicação isolada de AH provocou redução no acúmulo de Fe na folha, evidenciando a dificuldade do nutriente em ser translocado da raiz para a parte aérea, quando exposto a radicais de AH não fragmentados e, por conseguinte, pouco bioativos. Há, possivelmente, complexação do nutriente pelos AH intactos, mas os complexos formados podem ter massa molar elevada, a ponto de não garantir o suprimento adequado de Fe às plantas. Os principais fatores que controlam a disponibilidade de COMs formados com Fe são a estabilidade química e solubilidade do COMs (*Colombo et al.*, 2014). O Fe pode se encontrar no meio de cultivo na forma reduzida ou oxidada. Na forma oxidada, o Fe^{3+} , induz a formação de agregados de menor tamanho e maior estabilidade conformacional, com produção de COMs quimicamente mais estáveis (*Nuzzo et al.*, 2013), o que afeta absorção de Fe pelas plantas. Entretanto, com a aplicação de COMs solúveis de AH-Fe favorece-se a expressão de genes relacionados à absorção de Fe, criando condições para maior absorção do nutriente pelas raízes (*Tomasi et al.*, 2013). O tratamento com AH+AO propiciou formação na solução

nutritiva de fragmentos orgânicos com grande potencial de complexação de Fe, que, posteriormente foram absorvidos e translocados nas plantas de eucalipto. Essa otimização de absorção de Fe permite à planta estocar o nutriente em maior quantidade na raiz, que, eventualmente, pode se tornar fonte de Fe para parte aérea, atendendo demandas de processos fisiológicos e bioquímicos a longo prazo.

O acúmulo de Cu na folha foi igual para todos os tratamentos, com exceção do AH+AO, que promoveu aumento de 37% do nutriente acumulado na folha. No caule, o acúmulo de Cu foi favorecido pela combinação de AH+AC e AH+AO, e os tratamentos com AOBM sem a aplicação de AH apresentaram os menores valores de acúmulo de Cu. Na raiz, houve acúmulo similar entre a aplicação de AH+AO e o cultivo somente em solução nutritiva. A complexação com Cu por moléculas húmicas, afetando a absorção e acúmulo por plantas, pode refletir na produção da massa seca do eucalipto (*Pinheiro et al., 2010*), devido à alta complexação e estabilidade deste metal com o agente quelatizante. Em função dos grupos funcionais presentes em sua estrutura, os AH podem favorecer ou não a absorção de micronutrientes catiônicos, característica relacionada com o tipo de COMs formado, o que pode afetar a solubilidade destes no meio (*Halpern et al., 2015*). O potencial do uso do AH+AO se expressa neste aspecto por meio da formação de moléculas mais bioativas, que não comprometem, mas, sim, aumentem a absorção de Cu pelo eucalipto.

A absorção de Mn e Fe foi favorecida pela aplicação de AOBM com AH, e AH+AO aumentou o acúmulo de Cu, e manteve o acúmulo de Zn similar em relação ao controle. Tanto os AOBM e AH possuem a capacidade de se ligar eficientemente a metais (*Adeleke et al., 2017*), porém a ligação de metais a moléculas húmicas, conforme as características do ligante orgânico e tipo de ligação estabelecida com o metal pode ser tão estável a ponto de dificultar a sua posterior liberação no meio de cultivo e absorção pelas plantas. De acordo com

Xu et al. (2016), a presença de AH com maior grau de condensação e grupos fenólicos propicia a formação de complexos mais estáveis.

3.4 Eficiência de absorção de nutrientes

A eficiência da absorção (EAbs) de N e P foi similar para AH+AO, AH+AC e para o controle e superior a aplicação isolada de AH (Figura 6), com aumento de 17,4 e 18 %, respectivamente, para AH+AO AH+AC. A EAbs para o K foi maior para o controle, seguido de AH+AC e AH+AO. Em relação ao Ca e Mg, houve redução da EAbs com o uso de AOBM, sem a aplicação de AH, e quando se combinou AH+AC+AO, sendo que a aplicação de AC e AO juntamente com AH, não apresentou aumento da EAbs em relação a aplicação isolada de AH. Redução na EAbs de S foi verificada com a aplicação de AOBM, sem adição de AH. O aumento da EAbs de P pela aplicação de AH é relatado por Jindo et al. (2016), devido ao estímulo dos AH na transcrição de genes relacionados à sua absorção. Este aumento da eficiência de uso de P pelas plantas, devido à aplicação de AH, pode estar relacionado a outros fatores como a indução da H⁺-ATPase que, por sua vez, propicia a atuação de transportadores de íons secundários que promovem a absorção de nutrientes (Tavares et al., 2017), ou mesmo pelo aumento de crescimento de raízes fisiologicamente ativas (Rima et al., 2011). Moléculas húmicas de menor massa molar, comparadas às de maior massa molar, são responsáveis por desempenhar maior bioatividade, aumentando a eficiência de absorção de nutrientes por plantas (Trevisan et al., 2010) e a presença de AOBM seja pela aplicação no meio de cultivo (Piccolo et al., 1999; Rima et al., 2011) ou devido a exsudação radicular, em resposta ao uso de AH (Canellas et al., 2008), favorece a ruptura da estrutura supramolecular dos AH, expondo fragmentos menores e de mais baixa massa molar. De acordo com os dados mostrados, a aplicação conjunta de AC ou AO com AH, propiciou aumento na EAbs de macronutrientes, em relação a aplicação isolada de AH.

Observa-se que, devido à maior quantidade produzida de raízes pelo uso de AH+AO, houve maior acúmulo de macronutrientes, contudo a EAbs desses nutrientes não foi aumentada, mostrando que o efeito maior no crescimento foi devido, possivelmente, a maior proliferação de raízes, potencialmente fisiologicamente mais ativas, devido a ruptura da agregação dos AH pela aplicação de AO.

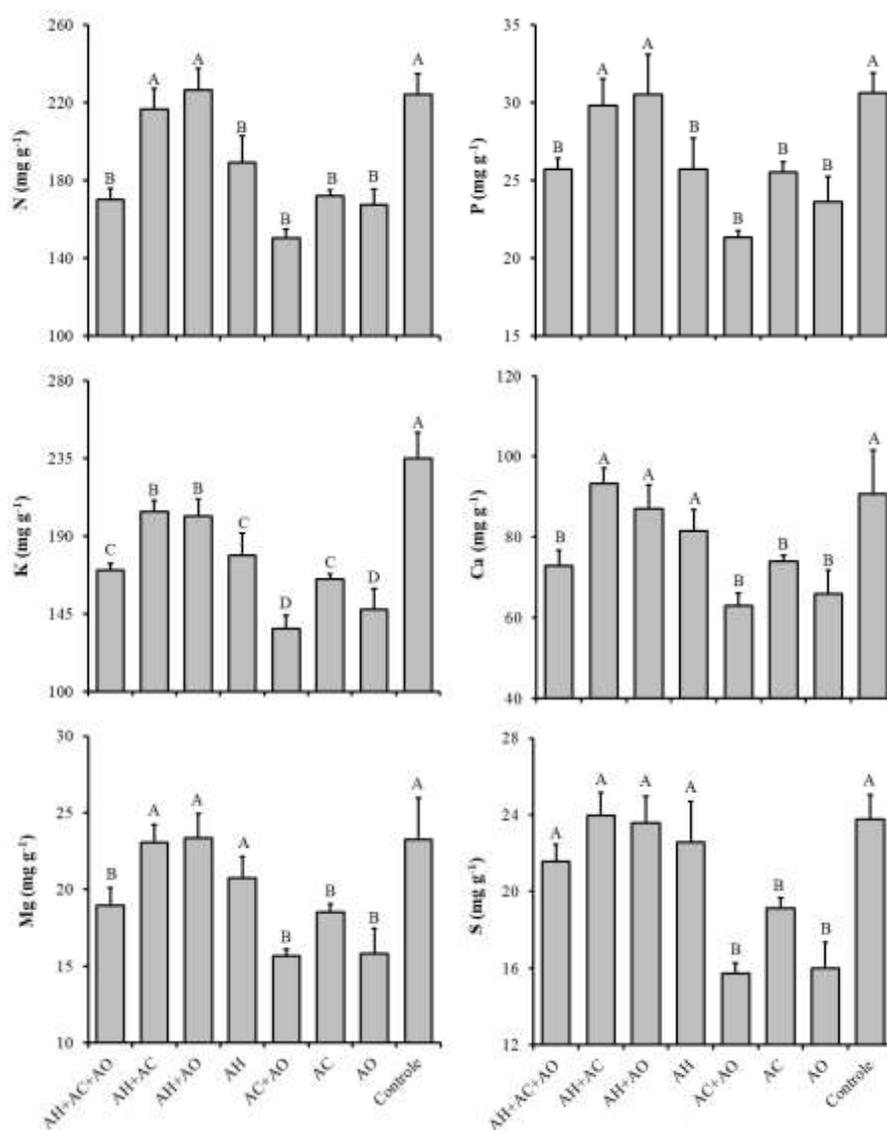


Figura 6. Eficiência de absorção de N, P, K, Ca, Mg e S, em função dos tratamentos utilizados. AH: ácidos húmicos; AC: ácido cítrico; AO: ácido oxálico. Médias seguidas da mesma letra em cada compartimento não se diferenciam pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

A EAbs de Zn (Figura 7) foi maior para o controle, em relação as combinações e aplicações isoladas de AH e AOBM, e os tratamentos que

continham AOBM em combinação com AH provocaram aumento, em média, de 16,4 %, em relação à aplicação isolada de AH. Um dos grandes problemas relacionados à aplicação de AH é a redução da disponibilidade e acúmulo de metais (*Pinheiro et al., 2010*), causando possíveis mudanças no meio de cultivo que interferem na aquisição desses nutrientes pelas plantas. Observa-se, de acordo com os dados mostrados, que há o aumento da EAbs de Zn pela aplicação conjunta de AOBM e AH, em relação a aplicação isolada de AH, mostrando que a diminuição da EAbs possa ser contornada por técnicas que propiciem fragmentação dos AH com produção simultânea de fragmentos mais bioativos.

A EAbs de Mn diminui com a aplicação de AH, AC+AO e AO em relação aos demais tratamentos. Os tratamentos com AOBM combinados com AH aumentaram a EAbs em 22,7% em relação a aplicação isolada de AH, mostrando uma melhoria na eficiência devido a desagregação dos AH pela aplicação de AOBM. Moléculas de AH afetam a absorção de nutrientes pelas plantas de diferentes modos, seja pelo aumento da eficiência do processo de fotossíntese, com maior crescimento das plantas (*Jannin et al., 2012; Canellas et al., 2015*), formação de COMs que diferem quanto à estabilidade química, reatividade e solubilidade e, que, conforme as características, podem aumentar a absorção de nutrientes (*Adeleke et al., 2017*). A presença de AOBM com AH mostra que o benefício do AOBM não é diretamente ligado ao seu uso, mas deve-se ao sinergismo com os AH, devido à exposição de suas unidades constituintes mais bioativas.

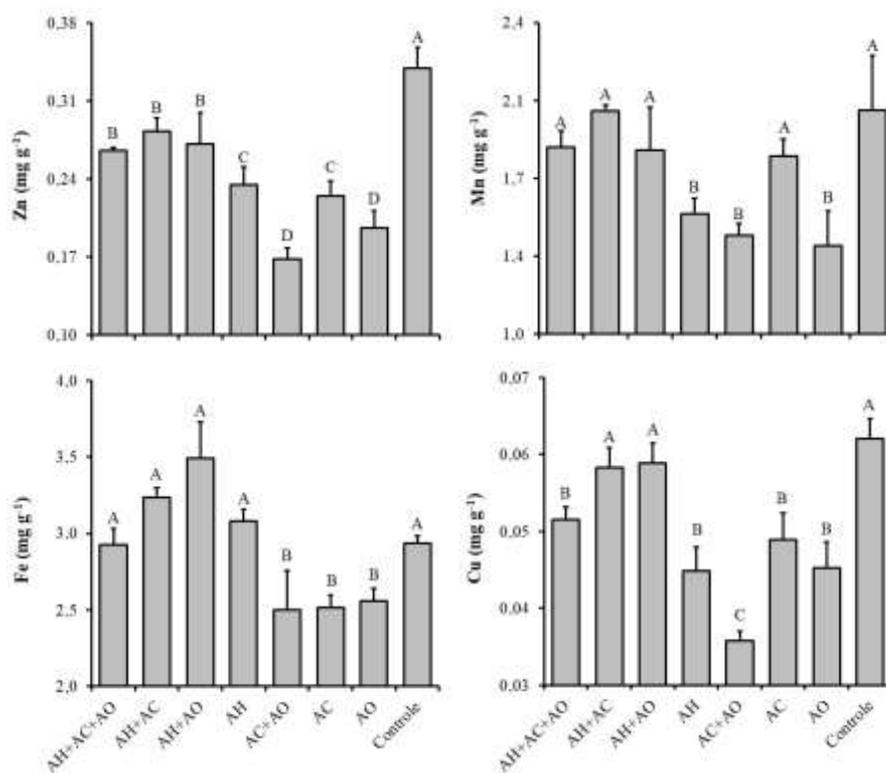


Figura 7. Eficiência de absorção de Zn, Mn, Fe e Cu em função dos tratamentos utilizados. AH: ácidos húmicos; AC: ácido cítrico; AO: ácido oxálico. Médias seguidas da mesma letra em cada compartimento não se diferenciam pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Para o Fe, houve diminuição da EAbs pela aplicação de AC+AO, AC e AO; a EAbs não foi influenciada pelo sinergismo entre aplicação de AOBM com AH. No caso particular do Fe, mesmo a manutenção da mesma EAbs de Fe, para os tratamentos AH+AC+AO, AH+AC, e AH+AO, em relação ao controle, a absorção e translocação destes foi maior para a folha, mostrando possíveis mecanismos relacionados à melhor redistribuição para a folha, órgão fisiologicamente mais ativo. *Elena et al. (2009)* mostraram que a aplicação de AH provocaram aumento da expressão gênica da quelato-redutase do Fe(III), genes esse relacionado à absorção de Fe, não associando a diminuição

significativa na aquisição de Fe na raiz ou na folha de pepino, inferindo estreita relação entre o desenvolvimento da planta e a nutrição de Fe, sendo que o maior efeito na nutrição de Fe pela aplicação de moléculas húmicas se dá pelo uso de moléculas de menor estabilidade e menor massa molar (Tomasi et al., 2013; Colombo et al., 2014). A maior quantidade de raiz produzida pelo uso AH+AO promoveu maior aquisição de Fe pela planta, com nutrição adequada de Fe à folha. Por outro lado, o uso de AH propiciaram maior aquisição de Fe pelas raízes e pouca translocação do nutriente para a folha.

A EAbs de Cu foi igual para AH+AC e AH+AO e controle, e maior em relação aos demais tratamentos. A aplicação de AC ou AO com AH, promovendo desestabilização da supraestrutura dos AH, devido a fragmentação destes, aumentaram a EAbs de Cu em 30,7 %, em relação à aplicação isolada de AH. O Cu é um dos metais que possuem maior afinidade com AH (Xu et al., 2016), o que pode afetar em grande parte sua aquisição pelas plantas (Pinheiro et al., 2010), diminuindo assim sua EAbs pelas plantas. O aumento da EAbs de nutrientes por plantas pode envolver vários mecanismos como o aumento da transcrição de genes relacionados à absorção (Jindo et al., 2016), modificação da morfologia da raiz e expressão genica de H⁺-ATPases e transportadores, provocando maior EAbs de nutrientes (Tavares et al., 2017). Entretanto, foi verificado que o sinergismo entre AH+AO e AH+AC pode eliminar o problema na aquisição de Cu pela aplicação isolada de AH e manter a EAbs desse nutriente, mas com o viés de promover maior crescimento e maior acúmulo de Cu.

A aplicação isolada de AH e AOBM provocou redução na EAbs e acúmulo da maioria dos nutrientes, contudo a aplicação conjunta de AH+AO assegurou manutenção da EAbs de nutrientes pelo eucalipto em relação ao controle, com maior produção de massa seca da folha, do caule e raiz e acréscimo na aquisição de macro e micronutrientes pelas raízes, de modo que

possíveis problemas associados à redução da disponibilidade e acúmulo de metais pelas plantas devido à formação de COMs estáveis foi, muito possivelmente, suplantada pelo uso conjunto de AH e AO.

4 Conclusões

- i) Houve fragmentação da supraestrutura molecular de ácidos húmicos (AH) devido à aplicação de ácido oxálico (AO), medido de forma indireta, através do aumento da relação E4/E6, nas condições de cultivo em solução nutritiva, o que aumentou a bioatividade dos fragmentos de AH expostos.
- ii) A aplicação isolada de AC (ácido cítrico), AO e AC+AO reduziu a produção de massa seca de folha, caule e raiz de eucalipto, e a sua aplicação conjunta com o AH+AO, por outro lado, aumentou em cerca de 30% a produção da massa seca de eucalipto.
- iii) A aplicação de AH+AO aumentou o acúmulo e a eficiência de absorção de macronutrientes nos compartimentos estudados em relação à aplicação isolada de AH. Houve sinergismo entre os AH e os AOBM, com aumento do acúmulo de, Zn, Mn, Fe e Cu no tratamento com AH+AO.

5 Agradecimentos

Ao CNPq (processos 461935/2014-7 e 303899/2015-8), à CAPES (CAPESPROEX AUXPE 590/2014), pelo financiamento do estudo e concessão de bolsas. Os agentes financiadores não tiveram papel na concepção do estudo, tampouco interferiram na coleta e análise de dados, na decisão de publicação ou na edição do manuscrito.

6 Referências

Adeleke, R., Nwangburuka, C., Oboirien, B. (2017): Origins, roles and fate of organic acids in soils: A review. *South African Journal of Botany* 108, 393–406.

Baalousha, M., Motelica-Heino, M., Coustumer, P.L. (2006): Conformation and size of humic substances: Effects of major cation concentration and type, pH, salinity, and residence time. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 272, 48–55.

Baldotto, M.A., Giro, V.B., Baldotto, L.E.B., Canellas, L.P., Velloso, A.C.X. (2011): Initial performance of pineapple and utilization of rock phosphate applied in combination with organic compounds to leaf axils. *Revista Ceres* 58, 393–401.

Bataglia, O.C., Furlani, A.M.C., Teixeira, P.R., Furlani, P.R., Gallo, J.R. (1983): Métodos de análise química de plantas. Instituto Agrônomo, Campinas.

Boguta, P., Sokolowska, Z. (2016): Interactions of Zn(II) Ions with Humic Acids Isolated from Various Type of Soils. Effect of pH, Zn Concentrations and Humic Acids Chemical Properties. *PLOS ONE* 11, e0153626.

Canellas, L.P., Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Jones, D.L., Nebbioso, A., Mazzei, P., Piccolo, A. (2015): Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae* 196, 15–27.

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

Colombo, C., Palumbo, G., He, J. Z., Pinton, R., Cesco, S. (2014): Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes. *Journal of Soils and Sediments* 14, 538–548.

Elena, A., Diane, L., Eva, B., Marta, F., Roberto, B., Zamarreño, A.M., García-Mina, J.M. (2009): The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 47, 215–223.

El-Shabrawi, H.M., Bakry, B.A., Ahmed, M.A., Abou-El-Lail, M. (2015): Humic and Oxalic Acid Stimulates Grain Yield and Induces Accumulation of Plastidial Carbohydrate Metabolism Enzymes in Wheat Grown under Sandy Soil Conditions. *Agricultural Sciences* 06, 175–185.

Ferreira, D.F. (2014): Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia* 38, 109–112.

Halpern, M., Bar-Tal, A., Ofek, M., Minz, D., Muller, T., Yermiyahu, U. (2015): The Use of Biostimulants for Enhancing Nutrient Uptake, in: *Advances in Agronomy*. Elsevier, pp. 141–174.

Hoagland, D.R., Arnon, D.I. (1950): *The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil*.

Ikka, T., Ogawa, T., Li, D., Hiradate, S., Morita, A. (2013): Effect of aluminum on metabolism of organic acids and chemical forms of aluminum in root tips of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. *Phytochemistry* 94, 142–147.

Jannin, L., Arkoun, M., Ourry, A., Laîné, P., Goux, D., Garnica, M., Fuentes, M., Francisco, S.S., Baigorri, R., Cruz, F., Houdusse, F., Garcia-Mina, J.-M., Yvin, J.-C., Etienne, P. (2012): Microarray analysis of humic acid effects on *Brassica napus* growth: Involvement of N, C and S metabolisms. *Plant and Soil* 359, 297–319.

Jindo, K., Soares, T.S., Peres, L.E.P., Azevedo, I.G., Aguiar, N.O., Mazzei, P., Spaccini, R., Piccolo, A., Olivares, F.L., Canellas, L.P. (2016): Phosphorus speciation and high-affinity transporters are influenced by humic substances. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 179, 206–214.

Malavolta, E. (1997): *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*, 2nd ed. Potafos, Piracicaba.

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

Moreira, S.G., Prochnow, L.I., de Castro Kiehl, J., Pauletti, V., Martin-Neto, L. (2016): Chemical forms in soil and availability of manganese and zinc to soybean in soil under different tillage systems. *Soil and Tillage Research* 163, 41–53.

Murray, H., Pinchin, T.A., Macfie, S.M. (2011): Compost application affects metal uptake in plants grown in urban garden soils and potential human health risk. *Journal of Soils and Sediments* 11, 815–829.

Nikbakht, A., Kafi, M., Babalar, M., Xia, Y.P., Luo, A., Etemadi, N. (2008): Effect of Humic Acid on Plant Growth, Nutrient Uptake, and Postharvest Life of Gerbera. *Journal of Plant Nutrition* 31, 2155–2167.

Nuzzo, A., Sánchez, A., Fontaine, B., Piccolo, A. (2013): Conformational changes of dissolved humic and fulvic superstructures with progressive iron complexation. *Journal of Geochemical Exploration* 129, 1–5.

Palmer, N.E., von Wandruszka, R. (2009): The influence of aggregation on the redox chemistry of humic substances. *Environmental Chemistry* 6, 178.

Piccolo, A. (2001): The supramolecular structure of humic substances. *Soil science* 166, 810–832.

Piccolo, A., Conte, P., Cozzolino, A. (1999): Effects of mineral and monocarboxylic acids on the molecular association of dissolved humic substances. *European Journal of Soil Science* 50, 687–694.

Piccolo, A., Conte, P., Spaccini, R., Chiarella, M. (2003): Effects of some dicarboxylic acids on the association of dissolved humic substances. *Biology and fertility of soils* 37, 255–259.

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

Pinheiro, G.L., Silva, C.A., Furtini Neto, A.E. (2010): Crescimento e nutrição de clone de eucalipto em resposta à aplicação de concentrações de C-ácido húmico. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 34, 1217–1229.

Reddy, S., Nagaraja, M.S., Punith Raj, T.S., Police Patil, A.S., Dhumgond, P. (2014): Elemental analysis, E4/E6 ratio and total acidity of soil humic and fulvic acids from different land use systems. *Annals of Plant and Soil Research* 16, 89–92.

Rima, J.A. H., Martim, S. A., Dobbss, L.B., Evaristo, J.A. M., Retamal, C. A., Façanha, A. R., Canellas, L.P. (2011): Adição de ácido cítrico potencializa a

ação de ácidos húmicos e altera o perfil protéico da membrana plasmática em raízes de milho. *Ciência Rural* 41, 614–620.

Rose, M.T., Patti, A.F., Little, K.R., Brown, A.L., Jackson, W.R., Cavagnaro, T.R. (2014): A Meta-Analysis and Review of Plant-Growth Response to Humic Substances, in: Advances in Agronomy. Elsevier, pp. 37–89.

Swift, R. S. (1996): Organic matter characterization. In: Methods of soil analysis part 3: chemical methods. Madison-SSSA, pp. 1011–1020.

Sutton, R., Sposito, G. (2005): Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View. Environmental Science & Technology 39, 9009–9015.

*Tavares, O.C.H., Santos, L.A., Ferreira, L.M., Sperandio, M.V.L., da Rocha, J.G., García, A.C., Dobbss, L.B., Berbara, R.L.L., de Souza, S.R., Fernandes, M.S. (2017): Humic acid differentially improves nitrate kinetics under low- and high-affinity systems and alters the expression of plasma membrane H⁺-ATPases and nitrate transporters in rice: Humic acid alters nitrate uptake kinetics, PM H⁺-ATPases and NRT expression. *Annals of Applied Biology* 170, 89–103.*

Tedesco, M. J., Gianello, C., Bissani, C. A., Bohnen, H., Volkweiss, S. J. (1995): Análise de solo, plantas e outros materiais, 2nd UFRGS/Departamento de Solos, Porto Alegre.

*Tomasi, N., De Nobili, M., Gottardi, S., Zanin, L., Mimmo, T., Varanini, Z., Römheld, V., Pinton, R., Cesco, S. (2013): Physiological and molecular characterization of Fe acquisition by tomato plants from natural Fe complexes. *Biology and Fertility of Soils* 49, 187–200.*

*Trevisan, S., Francioso, O., Quaggiotti, S., Nardi, S. (2010): Humic substances biological activity at the plant-soil interface: From environmental aspects to molecular factors. *Plant Signaling & Behavior* 5, 635–643.*

*Xu, J., Tan, W., Xiong, J., Wang, M., Fang, L., Koopal, L.K. (2016): Copper binding to soil fulvic and humic acids: NICA-Donnan modeling and conditional affinity spectra. *Journal of Colloid and Interface Science* 473, 141–151.*

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do primeiro artigo mostram que a resposta a aplicação de ácidos húmicos (AH) em termos de nutrição e crescimento de mudas de eucalipto cultivado em solução nutritiva foi influenciada tanto pela fonte como pela concentração AH, sendo que a concentração média de 15 mg L⁻¹ de C-AH estimulou o crescimento do eucalipto; com o aumento da concentração de AH, a partir da concentração ótima, há decréscimo no crescimento e menor aquisição de alguns nutrientes pelo eucalipto, efeito de maior queda para o acúmulo de Fe e Cu, possivelmente pelo aumento de ligantes orgânicos, com a formação de complexos de alta estabilidade química. Isso sinaliza para a necessidade de se aperfeiçoar as proporções de ligantes orgânicos e nutrientes nas caldas e adubos sólidos húmicos.

Os resultados do segundo artigo evidenciam que o efeito da aplicação de AH pode ser otimizado pela aplicação de ácidos orgânicos de baixa massa molar (AOBM), que modificam a estrutura supramolecular do AH, expondo seus fragmentos menores mais bioativos; com isso, há maior crescimento e aquisição de nutrientes pelas plantas de eucalipto cultivados em solução nutritiva, sendo mais eficiente o uso de AH conjuntamente com o ácido oxálico (AO) , possivelmente por este possuir menor massa molar e ter maior capacidade de interação com moléculas húmicas.

Diante dos resultados dos dois trabalhos, houve resposta positiva ao uso de AH no cultivo de mudas de eucalipto em solução nutritiva. A resposta à aplicação de AH foi verificada em baixas concentrações de AH, com estímulo no crescimento e nutrição. O uso de técnicas que propiciem maior bioatividade de AH, como a aplicação de AOBM, demonstrou ser essa uma estratégia promissora para se potencializar os efeitos positivos dos AH, principalmente quando se obtém o efeito sinérgico entre AH+AO, mostrando um sinergismo

que tem grande potencial para ser explorado, principalmente quando aplicado em culturas pouco responsivas a prática de adubação húmica, como ocorre para plantas lenhosas, segundo Rose et al. (2004).